UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Estudio de un candidato a NAD quinasa en *Leishmania spp*

Gustavo Adolfo Garzón Fajardo

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá Colombia
2018

Estudio de un candidato a NAD quinasa en *Leishmania spp*

Gustavo Adolfo Garzón Fajardo

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

Directora:
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, Colombia
2018

Dedicatoria

“A quienes me convirtieron en la persona que hoy soy”

Agradecimientos

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

A la profesora María Helena Ramírez por su apoyo, paciencia y guía a lo largo de este proceso.

A la Facultad de Ciencias por su apoyo durante la realización de la maestría mediante beca Auxiliar docente.

A la Dirección de Investigación y Extensión (DIEB)- Sede Bogotá por el proyecto número: 37593.

A Dirección de Investigación y Extensión (DIEB)- Sede Bogotá y a Colciencias por su apoyo mediante la convocatoria 775 de jóvenes investigadores 2017.

A quienes fueron mis primeros maestros en el trabajo en laboratorio y un gran apoyo: Nico, Diana y Laura Marcela.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica (LIBBIQ): Santiago; Edian, Laura K, Lesly, Melissa, Sharon, Aravy, Cami, Andres M, Esteban, Rosalbis, Magda, Diana y Luis. Gracias por hacer de mis días en el laboratorio siempre algo memorable.

A mi familia por su apoyo y paciencia, en especial a mi mamá, porque todo esto, es por ella y gracias a ella.

A Ana Carolina por su apoyo incondicional incluso cuando todo parecía salir mal.

A Andrés Camilo Díaz por su apoyo incondicional.

Resumen

El NADP (H) es una molécula de gran importancia en el metabolismo de todos los seres vivos, caracterizada por la capacidad de donar y aceptar iones hidruro. Dada esta característica, el NADP(H) es usado como cofactor enzimático en múltiples reacciones de oxidoreducción del metabolismo anabólico. Adicionalmente, en la actualidad se ha reconocido su función como molécula de señalización y control del estrés oxidativo. Dicha molécula se obtiene mediante la fosforilación del NAD(H), proceso catalizado por una enzima denominada NAD quinasa (EC. 2.7.1.23), que favorece la transferencia de un grupo fosfato al 2-hidroxi del anillo de ribosa de la molécula de NAD(H)

Las NADKs son una familia de proteínas conservada en todos los seres vivos, siendo identificadas por primera vez en *S. cereviceae*. En la actualidad, se han identificado homólogos de esta proteína tanto en eucariotas como en procariotas, exceptuando el parásito intracelular *Chlamidya trachomatis*. Sin embargo a pesar de la importancia de las NADK en el funcionamiento celular, su estudio sido poco abordado en parásitos del genero *Leishmania*, los agentes causales de la enfermedad conocida como Leishmaniasis.

En este trabajo se presenta un primer acercamiento al estudio de las NADK en *Leishmania spp* mediante herramientas computacionales y la caracterización molecular de este, para ello se realizó la clonación, expresión en *E. coli*, purificación de la proteína recombinante, evaluación de la actividad NAD quinasa de la recombinante obtenida y la producción de anticuerpos para la inmunodetección e inmunolocalización en el parásito. Esto permitió la identificación de candidatos a NADK en 6 especies de *Leishmania*, de estos, se seleccionó el candidato LbNADK, el cual presento, características estructurales distintivas de este grupo de proteínas, como los motivos GGDG, NE/D, un dominio rico en glicinas en el extremo C-terminal y la presencia de una región variable en la región N-terminal del candidato LbNADK así como diferencias estructurales significativas con sus homologas humanas. La aproximación experimental permitió mediante el uso de proteínas recombinantes la identificación de la primera NADK presente en un parasito intracelular, así como el desarrollo y evaluación de una herramienta inmunológica que permitió el estudio *in-vivo* de la LbNADK.

El estudio *in-vivo* permitió inmunodetectar en extractos proteicos la proteína LbNADK, la cual presento un tamaño de 135kDa y mediante ensayos de inmunofluorescencia se localizó en el citoplasma del parásito, convirtiéndose no solo en la primera NADK identificada en parásitos intracelulares, sino también la de mayor tamaño y permitiendo ahondar en el estudio del metabolismo energético de *Leishmania*

Contenido

Pág.

Lista de figuras **10**

Lista de tablas **12**

1. Introducción **13**

2. Marco teórico **15**

2.1 *Leishmania spp:* Modelo de estudio 15
2.2 La leishmaniasis como problema de salud publica 16
2.3 El Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina Fosfato (NADP) 17
2.4 Biosíntesis del NADP(H) 18
2.5 NAD^+ Quinasa (EC 2.7.1.23): Enzima esencial en la biosíntesis del $NADP^+$. 19
2.6 Propiedades estructurales de las NADKs 19
2.7 El NADP(H) en *Leishmania* 22

3. Preguntas de Investigación **24**

4. Hipótesis de investigación **24**

5. Objetivos 25
5.1 Objetivo general 25
5.2 Objetivos específicos 25

6. Materiales y métodos **26**

6.1 Aproximación bioinformática 27
6.1.1 Identificación y búsqueda del candidatos a NAD quinasa en especies del genero *Leishmania* 27
6.1.2 Comparación de la secuencia de interés con secuencias homologas e identificación de dominios funcionales 27
6.1.3 Predicción de características fisicoquímicas, secuencias PEST y localización subcelular 28
6.1.4 Predicción de estructura 3D y validación del modelo 28
6.1.5 Estudio comparativo entre candidato a NADK de *Leishmania braziliensis* y las NADK de *Homo sapiens* 29
6.2 Aproximación experimental 29
6.2.1 Construcción de plásmidos recombinantes 29
6.2.1.1 Amplificación del fragmento Δ1-970*lbnadk* mediante PCR 29
6.2.1.2 . Amplificación del gen *lbnadk* por PCR de superposición 30
6.2.1.3 . Clonación en el vector recombinante pET-100/D-TOPO 30
6.2.1.4 Clonación en el vector pGEM-T-Easy 31
6.2.1.5 . Transformación de células químicamente competentes 32
6.2.1.6 Evaluación de colonias por PCR 32
6.2.1.7 Purificación de plásmidos recombinantes mediante lisis alcalina y evaluación por PCR 32
6.2.1.8 Evaluación de plásmidos recombinantes con enzimas de restricción 33
6.2.2 Expresión y purificación de proteínas recombinantes 34
6.2.2.1 Expresión de proteínas recombinantes 34
6.2.2.2 Lisis celular 34

6.2.2.3 Purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad a Níquel (IMAC-Ni) 35
6.2.2.4 Cuantificación de proteínas por método de Bradford 35
6.2.2.5 Expresión y purificación de la NADK humana recombinante HsNADK 35
6.2.3 Evaluación de la actividad enzimática.....36
6.2.3.1 Ensayos enzimáticos acoplados.....36
6.2.3.2 Ensayos enzimáticos directos.....36
6.2.3.3 . Caracterización enzimática de las proteínas 6xHis-LbNADK y 6xHis-Δ1-970LbNADK.....37
6.2.4 Generación, obtención y caracterización de anticuerpos policlonales aviares (IgY) 37
6.2.4.1 Producción de anticuerpos aviares (IgY): Esquema de inmunización.[55,56] 37
6.2.4.2 Obtención de sueros inmunes.....38
6.2.4.3 Caracterización de los sueros inmunes. 38
6.2.4.4 Purificación de anticuerpos a partir de huevo. 39
6.2.4.5 Evaluación de los anticuerpos obtenidos mediante ensayo de ELISA.....40
6.2.4.6 Purificación de anticuerpos por afinidad a antígeno 40
6.2.5 Inmunodetección e inmunolocalización de la proteína LbNADK 41
6.2.5.1 Inmunodetección de la proteína LbNADK endógena en extractos solubles de *L.braziliensis* 41
6.2.5.2 Inmunolocalización de la proteína LbNADK por Inmunofluorescencia.....42

7. Resultados y discusión 43
7.1 Identificación y caracterización computacional del candidato a NAD quinasa LbNADK 43
7.2 Comparación estructural entre el candidato LbNADK y las NADKs humanas.....52
7.3 Obtención de las proteínas 6xHis-LbNADK y 6xHis-Δ1-970LbNADK 57
7.3.1 Amplificación de las secuencias codificantes de la 6xHis-Δ1-970LbNADK y 6xHis-LbNADK.....57
7.3.2 Construcción de los vectores recombinantes pET100-Δ1-970LbNADK, pGEMT-EASY-LbNADK y pET100-LbNADK.....58
7.3.2.1 Obtención del vector recombinante pET100-Δ1-970*lbnadk* 58
7.3.2.2 . Construcción del vector recombinante pGEMT-Easy-*lbnadk* 60
7.3.2.3 . Construcción del vector de expresión pET100-*lbnadk* 61
7.3.3 Producción de las proteínas recombinantes 6xHis-Δ1-970LbNADK y 6xHis-LbNADK 63
7.3.3.1 Obtención de la proteína recombinante 6xHis- Δ1-970LbNADK 63
7.3.3.2 . Obtención de la proteína recombinante 6xHis-LbNADK 67
7.3.4 Evaluación funcional de las proteínas 6xHis-Δ1-970LbNADK y 6xHis-LbNADK. 69
7.3.4.1 Obtención de la proteína control 6xHis-HsNADK1 70
7.3.4.2 Determinación de la actividad enzimática de 6xHis-LbNADK y 6xHis-Δ1-970LbNADK.....71
7.3.4.3 Caracterización enzimática de las 6xHis-LbNADK y 6xHis-Δ1-970LbNADK 74
7.3.4.1 . Evaluación de la activación por CaM/Ca^{+2} de las 6xHis-LbNADK y 6xHis-Δ1-970LbNADK.....78
7.3.5 Obtención y caracterización de anticuerpos dirigidos contra la proteína 6xHis Δ1-970LbNADK.....81
7.3.5.1 . Evaluación de sueros inmunes α6xHis-Δ1-970-LbNADK 82
7.3.5.2 Obtención de anticuerpos mediante afinidad a antígeno. 83

7.3.5.3 . Obtención y caracterización de IgYs de yema de huevo.....85
7.3.6 Inmunodetección y localización de la LbNADK endógena 88

8. Conclusiones 92

9. Perspectivas..... 93

10. Referencias 94

11. Anexos.....101

Lista de figuras

Pág.

Figura 1. Ciclo de vida de *Leishmania braziliensis*[5]. 15
Figura 2. **A:** Reacción Redox del NADP(H). **B:** Reacción catalizada por la NAD quinasa. Ilustraciones realizadas con el programa Chemdraw. 18
Figura 3. Características estructurales generales de las NADKs. 20
Figura 4. Resumen de las funciones del NADP(H) en diferentes compartimentos celulares de *Leishmania* sp. 23
Figura 5. Metodología general presentada en forma gráfica. 26
Figura 6. Esquema explicativo de la PCR de superposición. 31
Figura 7. Alineamiento múltiple de la LbNADK región C-terminal de con NADKs caracterizadas experimentalmente.. 46
Figura 8. Modelo de estructura tridimensional del dominio NADK del candidato LbNADK generado mediante el servidor I-TASSER. 48
Figura 9. Comparación por superposición de la estructura predicha para el dominio NADK de la NADK de *Leishmania braziliensis* (LbNADK) y el modelo resuelto para la NADK de *Listeria monocytogenes* (LmNADK**)** 49
Figura 10. Evaluación del modelo de estructura tridimensional predicha para el dominio NADK de la LbNADK mediante grafico de Ramachandran. 50
Figura 11. Alineamiento múltiple de la LbNADK con las secuencias de las NADK humanas. ... 53
Figura 12. Comparación de las predicciones de fosforilaciones en la LbNADK y las HsNADk1 y HsNADK2. 56
Figura 13. Amplificación de las secuencias codificantes para mediante PCR. **Δ1-*970lbnadk y lbnadk***. 58
Figura 14. Construcción del vector recombinante pET100- Δ1-970*lbnadk*.. 59
Figura 15. Construcción del vector recombinante pGEMT-Easy-*lbnadk*.. 61
Figura 16. Construcción del vector recombinante pET100-LbNADK. 62
Figura 17. Evaluación de la expresión y solubilidad de la proteína 6xHis-Δ1-970LbNADK..... 64
Figura 18. Purificación de la proteína recombinante 6xHis-Δ1-970LbNADK mediante cromatografía de afinidad a Níquel (Ni-NTA). 65
Figura 19. Evaluación de la expresión y solubilidad de la 6xHis-LbNADK 68
Figura 20. Purificación de la 6xHis-LbNADKl. 69
Figura 21. Expresión y purificación del control positivo 6xHis-HsNADK1..... 70
Figura 22. Ensayos de actividad enzimáticos de la NADK acoplados a G6PDH. 71
Figura 23. Ensayos de actividad enzimática directos de las 6xHis-LbNADK y 6xHis-Δ1-970LbNADK por RP-HPLC.. 72
Figura 24. Condiciones óptimas de actividad enzimática de las 6xHis-LbNADK y 6xHis-Δ1-970LbNADK.. 74
Figura 25. Cinética la actividad enzimática de las 6xHis-LbNADK y 6xHis-Δ1-970LbNADK.... 76
Figura 26. Predicción y análisis bioinformático de la activación por CaM/Ca^{+2} para la LbNADK.78
Figura 27. Obtención de la recombinante Biotina-GiCaM.. 79
Figura 28. Evaluación experimental de la activación por CaM/Ca^{+2} para las 6xHis-LbNADK y 6xHis-Δ1-970LbNADK. 80

Figura 29. Evaluación de sueros inmunes α6xHis-Δ1-970-LbNADK mediante western blot. 82
Figura 30. Caracterización del suero inmune 3 mediante western blot. 83
Figura 31. Obtención y evaluación de anticuerpos por afinidad a antígeno..... 84
Figura 32. Purificación de IgYs de yema de huevo por precipitación con PEG-6000.. 86
Figura 33. Cuantificación y evaluación de IgYs-α6xHIs-Δ1-970LbNADK de yema de huevo..... 87
Figura 34. Reconocimiento de la LbNADK endógena mediante western blot. 88
Figura 35. Inmunolocalización de la LbNADK en promastigotes asincrónicos de *L. braziliensis*..90
Figura 36. Modelo de la localización y distribución de la NADK y el NADP(H) en *Leishmania*……91

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1. Propiedades de algunas NADKs de procariotas, eucariotas y arqueas..... 21

Tabla 2. Parámetros enzimáticos de algunas NADK de organismos procariotas y eucariotas..... 22

Tabla 3. Grupos de NADKs seleccionadas para la construcción de las secuencias consenso..... 27

Tabla 4. Secuencias de NADK identificadas experimentalmente empleadas en el alineamiento múltiple con el candidato LbNADK..... 28

Tabla 5. Secuencias de *primers* o iniciadores empleados en este trabajo. 30

Tabla 7. Esquema de inmunización empleado para la producción de anticuerpos policlonales en modelo aviar dirigidos contra la proteína 6xHis-LbNADK. 38

Tabla 8. Controles empleados en el ensayo de ELISA para la caracterización de anticuerpos obtenidos a partir de huevo..... 39

Tabla 9. Candidatos a NADK identificados en diferentes especies del género *Leishmania* 44

Tabla 10. Comparación entre el candidato LbNADK y NADKs de diferentes organismos eucariotas y procariotas mediante BLASTP**.** 44

Tabla 11. Predicción de dominios funcionales conservados en la secuencia LbNADK. (Predicción realizada en el servidor CDD, Conserved Domains Database)[43]..... 45

Tabla 12. Secuencias PEST identificadas en el candidato LbNADK mediante el servidor epestfind 51

Tabla 13. Valores teóricos de peso molecular y punto isoeléctrico con y sin la etiqueta de histidinas de la secuencia LbNADK y la Δ1-998LbNADK..... 51

Tabla 14. Resultados de predicción de localización subcelular para el candidato LbNADK mediante diferentes servidores bioinformáticos. 52

Tabla 15. Evaluación de la purificación de las proteínas empleadas en este trabajo. 73

Tabla 16. Parámetros cinéticos de las proteínas empleadas este trabajo. 77

1. Introducción

Los organismos el género *Leishmania* son parásitos intracelulares, unicelulares y con presencia de flagelo pertenecientes a la familia Tripanosomátideae, parásito es el agente causal de la leishmaniasis; una enfermedad endémica de la región tropical, considerada un serio problema en salud pública, debido a su alta morbilidad. Anualmente, presenta una incidencia de aproximadamente 1.3 millones de nuevos casos clínicos, de los cuales 20.000 se reportan en Colombia.

En la actualidad no existen vacunas efectivas para esta enfermedad en humanos y las estrategias para control y prevención de la Leishmaniasis consisten en: Control de las poblaciones del vector, para evitar la transmisión y el uso de sales de antimonio pentavalente (Sb^{5+}), como medida terapéutica, las cuales causan graves y numerosos efectos secundarios como cardiotoxicidad, deterioro de la función hepática y renal, entre otros.

Para el desarrollo racional de fármacos y la implementación de nuevas estrategias de control es necesario conocer la biología y maquinaria bioquímica, que permite el desarrollo y proliferación del organismo dentro de sus hospederos, tales como las moléculas implicadas en el metabolismo anabólico. Desde este punto de vista el NADP(H) y su precursor el NAD(H) resultan un blanco de estudio interesante, debido a sus múltiples funciones a nivel celular, no solo como cofactores de reacciones enzimáticas redox del metabolismo anabólico y catabólico respectivamente, sino también como precursores de moléculas señalizadoras.

Una de las enzimas clave del metabolismo de NADP(H), conocida como NAD Quinasa, no ha sido estudiada en los parásitos del género *Leishmania*. Su estudio puede brindar una herramienta importante para el desarrollo de agentes de control a través de la identificación de diferencias de estas enzimas respecto a la enzima de su hospedero. El creciente uso de proteínas recombinantes mediante las cuales es posible obtener altas concentraciones de la proteína de interés, facilita la caracterización enzimática de las mismas.

Estudios realizados en nuestro grupo de investigación permitieron la identificación de la enzima implicada en la síntesis de *novo* del NAD(H), la Nicotinamida Mononucleótido Adenilil Transferasa (NMNAT), lo cual permitió establecer las primeras evidencias experimentales sobre el metabolismo del NAD(H) en este parasito. Adicionalmente en años recientes se logró la identificación de la NAD quinasa del parasito protozoo *Entamoeba histolytica*, siendo esta la primera encontrada en organismos protozoarios.

Considerando lo anterior, el presente trabajo constituye una profundización en el metabolismo del NAD(H) en *Leishmania* y una primera aproximación al estudio de la biosíntesis del NADP(H). Para ello, se planteó la identificación computacional de candidatos a NADK diferentes especies de *Leishmania* y la caracterización experimental e identificación de la proteína endógena de un candidato a NADK encontrado en *L. braziliensis*.

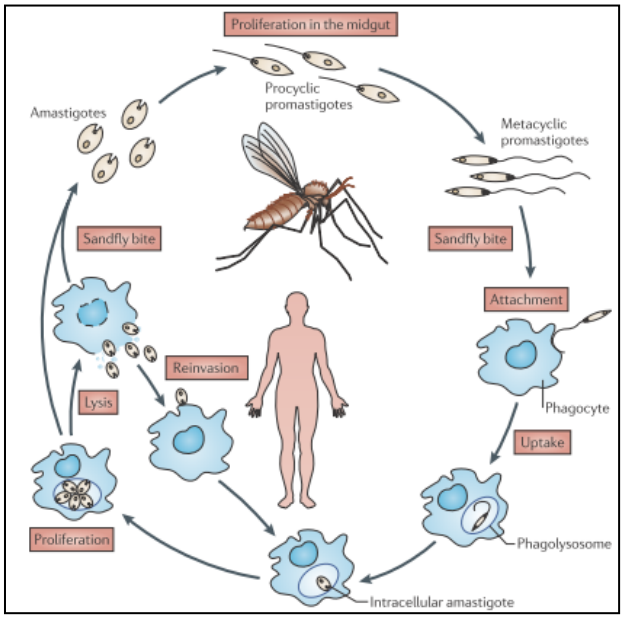
2. Marco teórico

Este trabajo tendrá como protagonistas a los parásitos del género *Leishmania*, causales de la enfermedad conocida como Leishmaniasis y en el marco de estos parásitos a la enzima NAD quinasa, la cual cataliza la reacción de biosíntesis del NADP(H).

2.1 *Leishmania spp:* Modelo de estudio

Las especies del género *Leishmania* infectan células mononucleares fagocíticas de mamíferos causando un amplio espectro de manifestaciones patológicas conocidas como Leishmaniasis. Se conocen alrededor de 20 especies de *Leishmania* capaces de infectar células humanas[1]. Los parásitos de *Leishmania* presentan características distintivas y únicas tales como: compartimentalización de vías metabólicas, transcripción policistronica, trans-splicing[2], una plasticidad genética activa que altera el número de copias de sus cromosomas[3] y un considerable número de proteínas más similares a las encontradas en los cloroplastos de plantas con respecto a sus homólogos en otros grupos de eucariotas[4].

Figura 1. Ciclo de vida de *Leishmania braziliensis*[5].



La leishmaniasis es una enfermedad endémica en 88 países, que afecta aproximadamente a 12 millones de personas a nivel mundial y de la cual se reportan cerca de 1.2 millones de nuevos casos al año[6] y dependiendo de sus síntomas puede clasificarse en 3 tipos: Leishmaniasis cutánea (CL), Leishmaniasis mucocutanea (MCL) y Leishmaniasis visceral (VL); dependiendo de la especie de *Leishmania* que infecte al hospedero. En Colombia la forma más abundante de esta enfermedad es la Leishmaniasis cutánea, representando cerca del 95% de los casos reportados. Además, es endémica en casi todo el territorio nacional y se estima que existen cerca de 10 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad.

Las especies de *Leishmania* presentan un ciclo de vida dimórfico que se alterna entre formas bien diferenciadas; promastigotes (forma flagelada) y amastigotes (forma no flagelada), dependiendo del hospedero en el cual se encuentra (Figura 1). El ciclo comienza cuando un insecto hembra del género *Phlebotomus* (Continente Americano) o *Lutzomya* (Asia, Europa y África) que se encuentre infectada, inyecta parásitos que se encuentran en sus glándulas salivales, en estado promastigote al torrente sanguíneo durante la picadura[2,7]. Posteriormente, los parásitos son reconocidos y fagocitados por células del sistema inmune (células dendríticas y macrófagos), mediante mecanismos redundantes en los cuales están directamente implicados lipopolisacaridos, glucopolisacaridos y proteínas de la membrana del parasito[5]. Una vez fagocitados, los promastigotes son sometidos a condiciones de estrés oxidativo y cambio de pH que conllevan a cambios moleculares y morfológicos del parasito y al paso de promastigotes a amastigotes[2,5].

Los amastigotes, encerrados en el fagolisosoma, comienzan a dividirse por fisión binaria y cuando la proliferación de estos al interior de la célula es alta, son liberados por la ruptura de los macrófagos para posteriormente ser absorbidos por otro flebótomo durante otra picadura y succión de sangre. De esta manera, del estadio amastigote se pasa a la forma promastigotes en el intestino medio del insecto, y así el parásito puede ser transmitido a un nuevo hospedero[7].

2.2 La leishmaniasis como problema de salud publica

La leishmaniasis es una enfermedad endémica en 88 países, que afecta aproximadamente a 12 millones de personas a nivel mundial y de la cual se reportan cerca de 1.2 millones de

nuevos casos al año[5] y dependiendo de sus síntomas puede clasificarse en 3 tipos: Leishmaniasis cutánea (CL), Leishmaniasis mucocutanea (MCL) y Leishmaniasis visceral (VL); dependiendo de la especie de *Leishmania* que infecte al hospedero.

En Colombia la forma más abundante de esta enfermedad es la Leishmaniasis cutánea, representando cerca del 95% de los casos reportados. Además, es endémica en casi todo el territorio nacional y se estima que existen cerca de 10 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad.

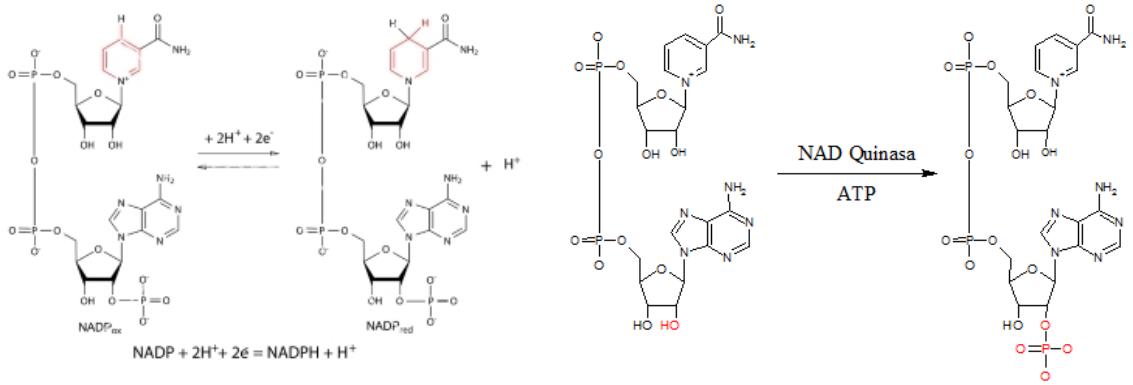
2.3 El Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina Fosfato (NADP)

El Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina (NAD^+/NADH) y su forma fosforilada ($NADP^+$/NADPH) son moléculas derivadas de la Niacina o Vitamina B3 que desempeñan funciones esenciales para los seres vivos[8]. El NAD(H) y el NADP(H) presentan una característica de gran relevancia a nivel bioquímico y celular, esta es la capacidad de aceptar y donar electrones (Figura 2A). Estas moléculas participan en más de 300 reacciones oxido-reductivas y, a pesar de que presentan similitud estructural desempeñan diferentes funciones a nivel celular. El NAD(H) está involucrado principalmente en reacciones catabólicas, mientras que el NADP(H) participa en reacciones del metabolismo anabólico y en la defensa frente al estrés oxidativo[8,9].

El $NADP^+$ es indispensable en procesos como: la fotosíntesis[10], la síntesis de ácidos grasos[11], aminoácidos, esteroides y ácidos desoxiribonucleicos[12]. La forma reducida, NADP(H), es considerada el principal agente reductor de las células; es cofactor de reductasas que permiten mantener el glutatión (GSH) y la tiorredoxina (Trx) reducidos[10], los cuales a su vez son cofactores requeridos por enzimas detoxificantes involucradas en la defensa frente al estrés oxidativo como GSH peroxidasas, Trx peroxidasas, peroxiredoxinas y glutaredoxinas, entre otras[13]. Debido a que el NADP(H) es indispensable en diferentes procesos celulares, la relación $NADP^+$/NADPH se encuentra usualmente bajo un estricto control, convirtiendose en un buen indicador del estado de la celula[8]

Figura 2. **A:** Reacción Redox del NADP(H). **B:** Reacción catalizada por la NAD quinasa. Ilustraciones realizadas con el programa Chemdraw.

A **B**



l

Además del papel como cofactor de numerosas oxidoreductasas se ha reconocido la función del $NADP^+$ en procesos de señalización celular. En dichos procesos el $NADP^+$ actúa como precursor del Dinucleótido de Adenina y Acido nicotínico fosfato (NaADP) un potente movilizador de Calcio, mediante la acción de una enzima ADP-ribosil-ciclasa[14]. El NaADP permite la liberación calcio (un segundo mensajero que controla numerosos procesos celulares) de los compartimentos celulares ácidos, al ser reconocido por dos canales (TPC1 y TPC2)[15].

2.4 Biosíntesis del NADP(H)

El NADP(H) es sintetizado mediante la trasferencia de un grupo fosfato al 2-hidroxilo del anillo de ribosa de la adenina en la molécula de NAD(H) a partir de un donador de grupos fosfato que puede ser ATP o poli(P) inorgánicos (Figura 2B). Dicha reacción es catalizada por la acción de la enzima NAD^+ quinasa (EC. 2.7.1.23) en presencia de un ion divalente como Mg^{+2}, esta es hasta ahora la única vía conocida de biosíntesis de NADP(H). La NAD^+ quinasa (NADK) es el principal punto de regulación de la relación NAD^+/NADP, equilibrio que define el estado energético de la célula.

2.5 NAD^+ Quinasa (EC 2.7.1.23): Enzima esencial en la biosíntesis del $NADP^+$.

Las NADKs son un grupo de proteínas ampliamente distribuidas en todos los dominios de la vida (Arquea, bacteria y eucaria). La primer NADK fue identificada y purificada en *S. cerevisiae* en 1950 por Kornberg[16]. Posteriormente, esta proteína ha sido identificada en organismos como *H. sapiens*[17], *M. tuberculosis*[18], *S. enterica*[19], entre otros. Dada la importancia de esta proteína en el metabolismo energético de los organismos, se ha hecho la búsqueda de secuencias homólogas en el genoma de organismos pertenecientes a los 3 dominios de la vida: arquea, bacteria y eucaria[20], encontrando al menos un gen homólogo en la secuencia de los organismos estudiados, con excepción de *Clamydia trachomatis*[19].

En general, los organismos eucariotas presentan al menos 2 genes codificantes para NADKs y los procariotas presentan solo uno. En organismos que presentan solo una NADK en su genoma como *M. tuberculosis*, se ha visto que mutaciones en el gen *nadk* resultan letales. Así mismo en parásitos intracelulares, la presencia de al menos una NADK es esencial, debido al estrés oxidativo al cual se encuentran sometidos. Ya que el NADP(H) les permite mitigar los daños causados por especies reactivas de oxigeno; la principal forma de ataque de la célula hospedera. Lo anterior enfatiza la importancia de las NADKs y la biosíntesis de NADP(H).

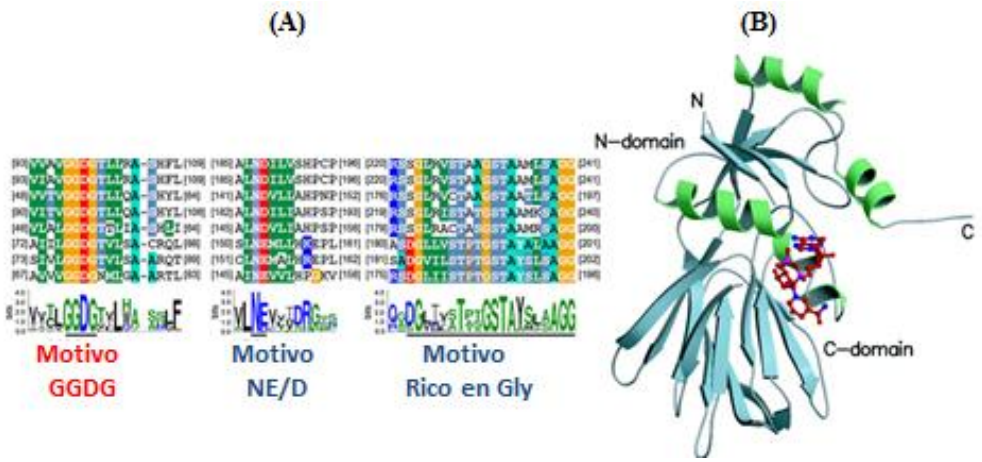
Las NADKs se pueden clasificar en 3 tipos dependiendo de su sustrato: (1) Las NADKs de bacterias Gram positivas y arqueas, que utilizan ATP y Poli(P) como donadores de fosfato, para fosforilar tanto NAD^+ como NADH (2) Las NADKs de mamíferos, que utilizan ATP como donador del grupo fosfato y fosforilan NAD^+ y NADH .(3) Las NADKs de bacterias Gram negativas que solo pueden utilizar ATP y NAD^+[21].

2.6 Propiedades estructurales de las NADKs

Las NADKs son proteínas solubles cuyo tamaño oscila entre 30 y 60 kDa[12] (Tabla 1). Se caracterizan por presentar 3 secuencias altamente conservadas (Figura 3A), un motivo GGDC, el cual es típico de este tipo de quinasas y está implicado en la unión con ATP[22,23]. Esta secuencia es altamente conservada en un amplio grupo de enzimas que incluye la Diacilglicerol quinasa y la Esfingosina quinasa[24]. Se ha demostrado que mutaciones

directas sobre el motivo GGDG conllevan a la pérdida de la actividad enzimática[23]. Adicionalmente las NADKs presentan un dominio rico en glicinas que es característico. Mutaciones puntuales sobre residuos de esta secuencia en la NADK de *M. tuberculosis* han demostrado que es esencial para la actividad catalítica, ya que se relaciona con unión a NAD(H)[20].

Figura 3. Características estructurales generales de las NADKs. **A:** Secuencias altamente conservadas en las NADKs[20]. **B:** Estructura tridimensional de la NADK de *M. tuberculosis* resuelta por cristalografía de rayos X[21].



En cuanto a estructura secundaria y terciaria, las NADK presentan un plegamiento tipo Rossman, característico de las proteínas de unión a nucleótidos como el NAD[25]. Este plegamiento consiste en hojas beta paralelas o antiparalelas flanqueadas o unidas por hélices alfa[26]. Al comparar la secuencia y estructura de las NADKs de diversos organismos, se ha observado que dichos motivos se encuentran en el extremo C-terminal, que compila el dominio catalítico de la proteína (Figura 3B). Esto ha llevado a varios autores a proponer que el extremo N-terminal de las NADK podría estar relacionado con regulación de la actividad catalítica[12]. El dominio catalítico de las NADKs se encuentra asociado a las dos regiones conservadas mencionadas anteriormente. En el caso de *M. tuberculosis*, intervienen 5 residuos: Asp85, Asn159, Glu160, Thr200 y Tyr202[23,25].

La ubicación intracelular de las NADKs y la demanda de NADP(H) se encuentran directamente relacionadas (Tabla 1). Por ejemplo en *H. sapiens* y *S. cerevisiae* existe una NADK citosolica y mitocondrial, esta última permite suplir las necesidades de NADP(H) para mitigar el daño por estrés oxidativo y funciones propias de este organelo[27]. En plantas

como *A. thaliana* NADK hay al menos 3 en citosol, mitocondria y cloroplastos. La deficiencia de la primera de ellas provocan mayor sensibilidad frente a condiciones de estrés oxidativo[28], mientras que la deficiencia de la tercera conllevan a menores contenidos de clorofila, crecimiento lento, entre otros efectos [29].

Tabla 1. Propiedades de algunas NADKs de procariotas, eucariotas y arqueas.

NAD quinasa	Longitud (No aa)	Masa molecular (kDa)	Localización subcelular	Referencia
H. sapiens 1	446	43.0	Citosol	[17]
H. sapiens 2	442	45.0	Mitocondria	[27]
A.thaliana 1	524	58.2	Nd	[30]
A.thaliana 2	985	109.2	Cloroplasto	[29,30]
A.thaliana 3	317	34.8	Citosol	[31]
M. tuberculosis	307	32.9	Citosol	[18,23]
E. histolytica	261	29.5	Citosol	[32]
A.fulgidus	249	27.9	Citosol	[33]
E. coli	292	32.6	Citosol	[34]

Las NADK pueden utilizar como donador de fosfato, sea Poly(P) o ATP, pero en algunos casos estos pueden ser reemplazados por otros nucleótidos incluido el GTP. Sin embargo, hay organismos en los que las NADK presentan preferencia por una molécula u otra. Por ejemplo: las NADK de *M. tuberculosis* y *M. flavus* tienen una mayor afinidad por el uso de Poli fosfatos inorgánicos[18]. En otros casos la proteína puede presentar preferencia por NAD o NADH, este es el caso de la NADK de *H. sapiens* y *E. coli*, que presentan mayor o estricta afinidad por el NAD respectivamente[25]. Adicionalmente, de las NADKs caracterizadas hasta ahora se ha podido observar que los valores de K_M son inferiores para el NAD(H), es decir presentan mayor afinidad por el aceptor que por el donador de fosfato y que sus pH óptimos se encuentran dentro del rango de 7.5 y 8.5, como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Parámetros enzimáticos de algunas NADK de organismos procariotas y eucariotas.

Organismo	Km ATP (mM)	Km NAD^+ (mM)	Km NADH (mM)	pH optimo	Temperatura optima °C
A.thaliana 1[30]	0.73	0..51	-	7.9	-
A.thaliana 2[30]	0.74	0.43	-	7.9	-
E. histolytica[32]	1.74	1.59	0.05	7.5	-
H. sapiens	0.9	0.22	-	7.8	50
M. jannaschi[35]	0.35	3	-	7.6	100
M. flavus[36]	0.23	0.26	-	-	-
L. monocytogenes[37]	2.1	1	-	-	-
S. cerevisiae[38]	2.3	0.68	2	8.5	45
M. tuberculosis[23]	2.2	1.2	-	-	-

2.7 El NADP(H) en *Leishmania*

A pesar de la importancia del NADP(H) en procesos metabólicos y control del estrés oxidativo, la biosíntesis de este ha sido un campo poco explorado en parásitos intracelulares como *Leishmania sp* y en la actualidad no es clara la ruta de biosíntesis del NADP(H) en estos organismos.

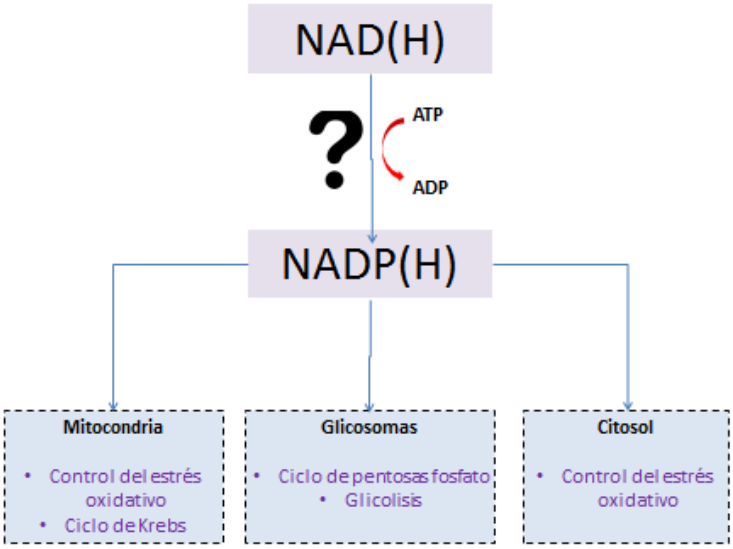
No obstante, se han identificado numerosos sistemas y rutas metabólicas dependientes de NADP(H) en parásitos de *Leishmania* tales como: La glicolisis, ruta de pentosas fosfato[39], síntesis de ácidos grasos entre otras (Figura 4); las cuales desempeñan un rol fundamental en la proliferación celular y sistemas redox dependientes de NADP(H) como el sistema del tripanotion[40][N1, N8-bis (glutationil) espermidina], un conjugado tripeptídico formado por una molécula de glutatión (GSSG) y el conector espermidina[41], presente únicamente en organismos Tripanosomatidos como sistema análogo al del glutatión en mamíferos.

El tripanotion es mantenido en forma reducida T(SH), mediante la acción de la enzima conocida como tripanotion reductasa (EC. 1 .6.4.8) una flavoproteina que emplea como sustrato para su actividad enzimática el NADPH. La anterior es la principal vía de protección presente en parásitos Tripanosomatidos contra el estrés oxidativo, causado ya sea por la respuesta inmune del hospedero[2] o por el tratamiento de la enfermedad con diversos medicamentos y el metabolismo oxidativo propio del organismo. Los principales

esfuerzos en controlar a parásitos Tripanosomatidos como *Leishmania y Tripanosoma* se han enfocado en la inhibición de la síntesis y reducción del tripanotion[41].

Sin embargo, dadas las anteriores funciones del NADP(H) en estos parásitos, no se ha contemplado al NADPH (sustrato de la tripanotion reductasa) y consecuentemente su ruta de biosíntesis como posible blanco farmacológico. Adicionalmente, se han identificado enzimas relacionadas con el metabolismo del NAD(H) como la Nicotinamida Mononucleotido Adenilil Transferasa (NMNAT)[42], proteína crucial en la biosíntesis del NAD(H) y por consiguiente del NADP(H).

Figura 4. Resumen de las funciones del NADP(H) en diferentes compartimentos celulares de *Leishmania* sp.



Lo anterior genera la pregunta ¿De dónde proviene el NADP(H) en *Leishmania*?, alrededor de esta pregunta surgen dos posibles respuestas. La primera de ellas, que el NADP(H) es tomado directamente del hospedero, sin embargo, frente a esta no existe evidencia aun de transporte de NADP(H) a través de la membrana celular en estos parásitos. La segunda de ellas, mediante de la acción de la enzima NAD quinasa, única vía de biosíntesis conocida para esta molécula, para la cual, aunque no se tiene evidencia aun de su existencia, recientemente se ha identificado la enzima encargada de la biosíntesis de su precursor el NAD(H), lo cual permite suponer la presencia de rutas metabólicas relacionadas con este y por ende la existencia de una NADK.

3. Preguntas de Investigación

Este proyecto tiene como propósito identificar la NAD Quinasa de *Leishmania braziliensis*. Para esto se emplearán herramientas computacionales, de biología molecular, bioquímica y microbiología para responder las siguientes preguntas de investigación:

¿Existe un homólogo de la NAD+ Quinasa en *Leishmania*?

¿Cuál es la localización de esta proteína en el parásito?

¿Cuáles son las características distintivas y las semejanzas entre la LbNADK y las proteínas homólogas en el hospedero (humano)?

4. Hipótesis de investigación

Existe una NADK en *Leishmania spp* y esta tiene diferencias estructurales y funcionales con la NADK de *Homo sapiens* que la hacen una posible diana farmacológica.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

- Estudiar un candidato a NAD quinasa en *Leishmania spp,* combinando estrategias computacionales y experimentales.

5.2 Objetivos específicos

- Identificar candidatos a NAD quinasa en *Leishmania* spp empleando herramientas computacionales.
- Realizar un estudio comparativo *in-silico* entre el candidato a NADK propuesto y las NADK de *Homo sapiens*.
- Producir uno de los candidatos a NAD quinasa de *Leishmania spp,* mediante el uso de proteínas recombinantes.
- Evaluar funcionalmente el candidato a NAD quinasa seleccionado.
- Producir y caracterizar una herramienta inmunológica que permita el estudio de la NAD quinasa de Leishmania braziliensis.
- Determinar la localización subcelular del candidato a NAD quinasa, mediante inmunodetección.

6. Materiales y métodos

A continuación, se presentan los materiales y métodos empleados en este trabajo de tesis, inicialmente de forma gráfica y general en la Figura 4 y posteriormente cada uno por separado. Para la realización de este trabajo se emplearon técnicas tanto experimentales como computacionales como se verá a continuación.

Figura 5. Metodología general presentada en forma gráfica.

6.1 Aproximación bioinformática

6.1.1 Identificación y búsqueda del candidatos a NAD quinasa en especies del genero *Leishmania*

Para la búsqueda de candidatos a NADK en *Leishmania* se construyeron 5 secuencias consenso representativas para cada grupo de organismos (Tabla 3) mediante el algoritmo BLASTP de la plataforma del NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Para cada consenso se emplearon 250 secuencias de NADKs presentes en la base de datos.

Cada uno de los consensos obtenidos fue comparado contra todos los genomas reportados y anotados de en la plataforma del NCBI y TriTryp DB. Los resultados obtenidos de cada predicción fueron organizados y comparados manualmente.

Tabla 3. Grupos de NADKs seleccionadas para la construcción de las secuencias consenso.

Grupo de organismos	No de secuencias comparadas
Eucaria y procaria	250
Eucaria	250
Procaria	250
Metazoa	250
Plantas verdes	250

6.1.2 Comparación de la secuencia de interés con secuencias homologas e identificación de dominios funcionales

La secuencia putativa de un candidato de la NAD Quinasa (Código de acceso NCBI: gi|389599908, Código UniprotKB A4H4L2) encontrada en el genoma de *Leishmania braziliensis*, se empleó para realizar alineamientos con secuencias de aminoácidos homólogas de diferentes organismos, pertenecientes a los tres dominios de la vida. Para esto, se empleó el programa BLASTP (Protein BLAST) de NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). El alineamiento múltiple se realizó empleando el algoritmo Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation (MUSCLE) insertado en el programa CLC Free Workbrench versión 7.6 y se comparó con las secuencias de aminoácidos de NADK identificadas experimentalmente mostradas en la tabla 4. La

búsqueda de posibles dominios conservados se realizó en el servidor CDD (Conserved Domains Database)[43]

Tabla 4. Secuencias de NADK identificadas experimentalmente empleadas en el alineamiento múltiple con el candidato LbNADK.

Organismo	No Identificación
E. coli	Gi: 67470903
M. tuberculosis	Gi: 614113618
A.fulgidus	Gi: 8480649
S. enterica	Gi: 54041727
T. acidophilum	Gi: 13959443
H. sapiens 1	Gi: 8480400
H. sapiens 2	Gi: 156630863
M. musculus 1	Gi: 341941154
M. musculus 2	Gi: 158564006
A.thaliana 1	Gi: 94717660
A.thaliana 2	Gi: 75169003
A.thaliana 3	Gi: 75276303
S. cerevisiae 1	GI: 729534
S. cerevisiae 2	GI: 418405

6.1.3 Predicción de características fisicoquímicas, secuencias PEST y localización subcelular

Las características fisicoquímicas y la posible localización subcelular de la proteína de interés se predijeron empleando herramientas disponibles en Expasy Bioinformatics Resource[44]. El cálculo de punto isoeléctrico, peso molecular y composición de aminoácidos se realizó en el servidor Protparam. El acercamiento bioinformático de la localización subcelular se realizó mediante diferentes servidores: SubLoc v 1.0[45] , Cello v 2.5, ESLpred[46] , PSORTII[47], Euk-mploc 2.0 .

6.1.4 Predicción de estructura 3D y validación del modelo

Se realizó la predicción de la estructura terciaria de la proteína LbNADK mediante el uso del servidor I-TASSER[48]. El modelo se visualizó haciendo uso del software UCSF chimera 1.10.1. Adicionalmente la validación del modelo se realizó mediante los parámetros

estadísticos del modelo generado por I-TASSER y la generación del plot de Ramachandran en el servidor RAMPAGE[49]: http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php.

6.1.5 Estudio comparativo entre candidato a NADK de *Leishmania braziliensis* y las NADK de *Homo sapiens*

Inicialmente se hizo la búsqueda de las secuencias de aminoácidos de las NAD quinasa humana en la base de datos del GenBank. A partir de estas se realizaron análisis de estructura mediante alineamientos múltiples de las NADK humanas y el candidato a NADK de *L. braziliensis*, en aras de buscar posibles secuencias exclusivas para la proteína LbNADK, haciendo uso del algoritmo Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation (MUSCLE) insertado en el programa CLC Free Workbrench versión 7.6. Posteriormente se generaron modelos de estructura terciaria de las proteínas, los cuales se visualizaron y compararon mediante el uso de software UCSF chimera 1.10.1. Finalmente se realizó la predicción de posibles sitios de fosforilacion tanto para las NADK humanas como para el candidato a NADK de *L. braziliensis* haciendo uso de las herramientas disponibles en la plataforma Expasy Bionformatics Resource[44]

6.2 Aproximación experimental

6.2.1 Construcción de plásmidos recombinantes

6.2.1.1 Amplificación del fragmento Δ1-970*lbnadk* mediante PCR

La amplificación del candidato a NADK se realizó mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se empleó como plantilla 100 ng de ADN genómico de Leishmania braziliensis de la cepa HOM/BR/75/M2903, los primers: Δ1-970*lbnadk* (Tabla 5), empleando 1.25U de la enzima *Pfu* polimerasa (Promega). Las condiciones de reacción fueron las siguientes, primers directo y reverso 0.2 µM, 2 mM, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 0.2 mM, $MgSO_4$ 2.5mM, Buffer de PCR 1X (20mM Tris-HCl pH 8.8, 10mM $(NH_4)_2SO_4$, 10mM KCl, 0.1% (v/v) Triton X-100, 0.1 mg/ml de BSA) y agua DEPC [50]. Los ciclos térmicos de la PCR fueron; Desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, seguida

de 25 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 65°C y 2 min a 72°C. El paso final de extensión fue de 10 min a 72°C (Termociclador My-Cycler Biorad). Los resultados fueron visualizados en geles de agarosa 1% p/v en Buffer TBE (Tris, Borato, EDTA) 0.5X y documentados en el analizador de imágenes Imager® Gel DocTMXR, que incluye el software Quantity One Basic 4.6.3 de $BIORAD^{TM}$

Tabla 5. Secuencias de *primers* o iniciadores empleados en este trabajo.

Nombre de la secuencia	Iniciador Directo	Iniciador Reverso
Δ1-970*lbnadk*	5'CACCATGAGCAGCAGCACCGGCA 3'	5´CAGCGTCTTGGGGAACTGCAT 3'
N-*lbnadk*	5'CACCATGCGCCGAATGTCAGTG 3´	5´AGCCGTCATCAGACACCACCGTGTCCA 3´
C-*lbnadk*	5´TGATGACGGCTTTGCGCTCTCGGTGAA 3'	5´CAGCGTCTTGGGGAACTGCAT 3'
lbnadk	5'CACCATGCGCCGAATGTCAGTG 3´	5´CAGCGTCTTGGGGAACTGCAT 3'

6.2.1.2 . Amplificación del gen *lbnadk* por PCR de superposición

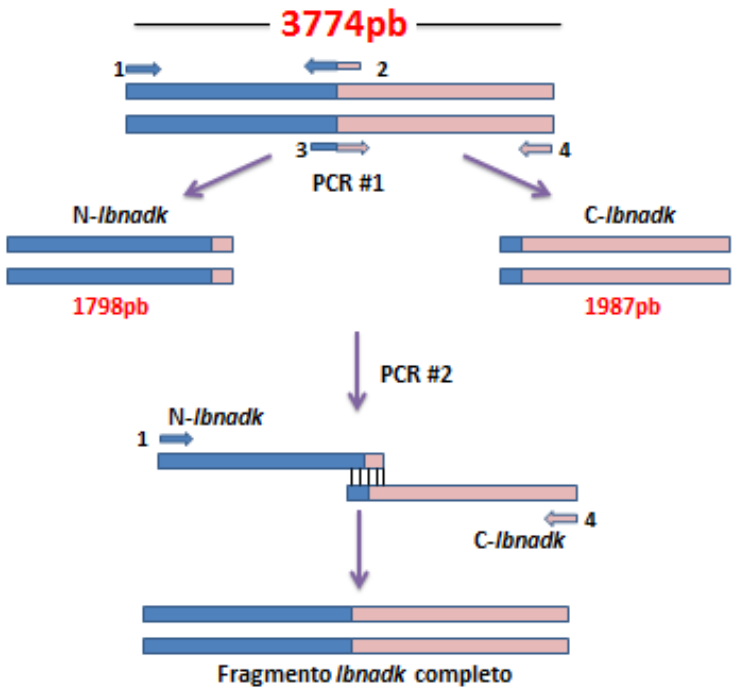
Para la amplificación de la secuencia *lbnadk* se empleó la metodología de PCR de superposición en la que se amplificaron los fragmentos N-*lbnadk* y C-*lbnadk*, los cuales presentan complementariedad en su extremo 3' (Figura 6). Una vez obtenidos los fragmentos de interés, se realizó una segunda PCR con los *primers* de los extremos 5' y 3' del candidato *lbnadk*, utilizando como plantilla cantidades iguales de N-*lbnadk* y C-*lbnadk*. Las condiciones de PCR empleadas fueron las descritas en la sección anterior.

6.2.1.3 . Clonación en el vector recombinante pET-100/D-TOPO

El producto de PCR obtenido en la amplificación con *Pfu* polimerasa se purifico empleando el kit comercial wizard® SV Gel and PCR Clean up de promega y se cuantifico por densitometría. Posteriormente se realizó la reacción de ligación con vector de clonación pET-100-D-TOPO, el cual otorga resistencia a antibióticos específicos (Ampicilina) y una etiqueta de 6 histidinas a la secuencia de interés para posterior identificación y purificación de la proteína. Las condiciones utilizadas para la reacción fueron las siguientes: 1-10 ng de

producto de PCR, 1µL de solución salina (1,2 M NaCl y 0.06M $MgCl_2$) y 1µL de vector en un volumen final de 6 µL. Una vez hecha la reacción de ligación esta se utilizara para transformar células *E. coli* TOP10 químicamente competentes.

Figura 6. Esquema explicativo de la PCR de superposición.



6.2.1.4 Clonación en el vector pGEM-T-Easy

El fragmento de ADN *lbnadk* de 3774pb mediante PCR de superposicion, fue purificado empleando el kit wizard® SV Gel and PCR Clean up de promega. Luego, se cuantifico por densitometría y se le adiciono el nucleótido adenina en los extremos 5' aprovechando la actividad adninil transferasa terminal de la *Taq* polimerasa, las condiciones empleadas fueron las siguientes: buffer de PCR 1X (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8.3 y Tritón X-100 0,1 % V/V), dATP 2mM, 1U de *Taq* polimerasa y 50 ng de *lbnadk* en un volumen final de 20µL a 72°C por 20 min.

Una vez obtenido el fragmento de ADN *lbnadk* con los extremos adenilados, este fue ligado en el vector comercial tipo TA pGEM-T-Easy, empleando una relación inserto vector 1:1, en buffer T4 (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl 2 , 10 mM Dithiothreitol 1 mM

ATP, pH 7.5), 1U de la enzima T4 ligasa en un volumen final de 20µL. La reacción de ligación se incubo durante 2 horas a 16°C y finalmente fue transformada en células *E. coli* TOP10 químicamente competentes.

6.2.1.5 . Transformación de células químicamente competentes

Para introducir el producto de DNA de interés en el sistema heterólogo *E.coli*, se realizó un proceso de trasformación por choque termico; se tomaron entre 3 y 5 ul del DNA de interés y se adicionaron sobre un vial de células competentes en hielo mezclando con movimientos circulares suaves. Posteriormente se incubo por 15 min en frio, para luego someterlas a un choque térmico pasando de 42°C/35 seg a 4°C, seguido de un periodo de recuperación adicionando 250ul de medio SOC (extracto de levadura 0.5%, triptona 2%, NaCl 10mM, MgCl2 10mM, KCl 2.5mM y glucosa 20mM) e incubando por 1 hora a 37°C. Finalmente las células se sembraron en medio solido de LB-agar (LB: triptona al 1 %, extracto de levaduras 0.5 %, NaCl 1 %) y antibiótico según la resistencia otorgada por cada vector

6.2.1.6 Evaluación de colonias por PCR

Las colonias obtenidas de la transformación de células químicamente competentes de las ligaciones se tomaron parra evaluación mediante PCR de colonia haciendo uso de la enzima *Taq* polimerasa. Las condiciones empleadas fueron las siguientes: buffer de PCR 1X (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8.3 y Tritón X-100 0,1 % V/V), primers LbNADK directo y reverso 0.2 µM, 2 mM, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 0.2 mM, 1U de *Taq* polimerasa. El ciclo térmico empleado fue el mencionado en el numeral 6.2.1.1. Los controles negativos tuvieron como plantilla agua DEPC y los resultados fueron visualizados en geles de agarosa 1% (p/v) en buffer TBE 0.5X y documentados como se mencionó anteriormente.

6.2.1.7 Purificación de plásmidos recombinantes mediante lisis alcalina y evaluación por PCR

La extracción de plásmidos se realizó mediante el método de lisis alcalina, a partir de un cultivo de 10 ml de las células transformadas (medio LB con ampicilina 100µg/ml).

Las células se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se adiciono a cada tubo 300 µL de Buffer P1 (50mM Tris HCl pH 8,0 y 10mM de EDTA) resuspendiendo el pellet totalmente, seguidamente se adicionaron 300µL de buffer P2 para lisis celular (200mM NaOH y 1% SDS(P/V)); la mezcla se homogenizo por inversión y se incubo en hielo por 10 min; luego se adicionan 300µL de buffer P3 de neutralización celular (3,0M de Acetato de Potasio pH 5,5) y se incubo nuevamente sobre hielo 10 min. Para finalizar la lisis, la mezcla se centrifugo a 12000 rpm durante 10 min a 4°C, y se descartó el pellet.

El sobrenadante de la lisis celular fue empleado en la purificación por Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico. Adicionando 1mL de este reactivo a la solución anterior y mezclando por inversión suave varias veces; luego de dejarse reposar por 10 min, se centrifugo a 12000 rpm durante 5 min seleccionando la fase acuosa a la cual se le añadieron 2.5 volúmenes de etanol absoluto a 4°C y 1/10 volúmenes de Acetato de Sodio 3M pH 5.2, se mezcló por inversión y se incubo a -80°C durante 2 horas, luego se centrifugo a 12000 rpm durante 15 min descartándose cuidadosamente el sobrenadante sin remover el pellet. Finalmente se tomó el pellet del ADN plasmídico precipitado para resuspensión en 50µL de agua (MQ). El producto de la extracción fue visualizado mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0,8% en buffer TBE 0.5X y documentados como se mencionó previamente. Posteriormente se cuantificara mediante espectrofotometría a 260 nm y 280 nm para obtener los valores de concentración de plásmido y pureza de los mismos.

Los plásmidos fueron utilizados como plantilla en reacciones de PCR empleando las condiciones mencionadas en el numeral 6.2.1.7, los amplificados obtenidos se evaluaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en buffer TBE 0.5X.

6.2.1.8 Evaluación de plásmidos recombinantes con enzimas de restricción

Con el fin de evaluar confirmar la presencia del inserto de interés en los vectores recombinantes se realizó un monitoreo por corte con la enzima de restricción EcoRV (Thermo Fisher), durante 2 horas a 37°C. Los posibles perfiles electroforéticos se

predijeron mediante la herramienta bioinformática Nebcutter y los resultados se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% (p/v) en buffer TBE 0.5X.

6.2.2 Expresión y purificación de proteínas recombinantes

6.2.2.1 Expresión de proteínas recombinantes

Los plásmidos recombinantes de pET100-*lbnadk* y pET100-Δ*1-970-lbnadk* fueron usados para transformar células químicamente competentes de la cepa de expresión *E. coli* BL21 DE3 Star. Las células transformadas con el vector se emplearon para realiza un inoculo en medio liquido LB suplementado con los antibióticos específicos para el vector y se incubo a 37°C aproximadamente 14 horas en agitación constante.

Partiendo del inoculo anterior se inició el crecimiento celular para la expresión de la proteína, nuevamente en medio LB suplementado con los antibióticos. Se realizó una dilución de 1:50 incubándose hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5 (OD 600nm). Posteriormente la inducción de la proteína se llevó a cabo adicionando Isopropil β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) a una concentración final de 0.5mM.

Para la expresión de las proteínas recombinantes, se evaluó el efecto del tiempo de inducción sobre la expresión de la misma, para esto se analizó la expresión a 0,4 y 18 horas después de la inducción. El tiempo que presento mayor expresión de la proteína se empleó posteriormente para realizar la lisis celular, en cada caso los resultados se analizaron mediante SDS–PAGE [51] y western blot [52].

6.2.2.2 Lisis celular

La solubilidad de la proteína recombinante se determinó por tratamiento de lisis celular del pellet total obtenido del cultivo celular inducido. El pellet celular se sometió a enfriamiento durante 30 minutos, para incrementar el rendimiento de la lisis y cantidad de proteína extraída. La composición del buffer de lisis a utilizado para la obtención de las fracciones solubles e insolubles fue 50 mM Na_2PO_4 pH 8, coctel inhibidor de proteasas (Sigma P8340: PMSF 1mM, Pepstatina 15 μM, Leupeptina 20 μM, Aprotinina 0,8 μM), 300 mM NaCl y lisozima 1mg/ml. La reacción se incubo a 4°C por 2 horas. Finalmente se centrifugo

a 10000 rpm durante 30 minutos y se separaran la fracción soluble e insoluble (cuerpos de inclusión).

6.2.2.3 Purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad a Níquel (IMAC-Ni)

Aprovechando la etiqueta de histidinas otorgada por el vector de expresión, las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad a Niquel. La concentración de proteína previa a la purificación se cuantifico por densitometría a partir de una curva de albumina de suero bovino (BSA). La fracción proteica se incubo con una resina de niquel-nitrilotriacético (NI-NTA Agarosa QIAGEN), previamente equilibrada con buffer de unión (50 mM Na_2PO_4 pH 8, 300 mM NaCl). Luego se procedió a empaquetar la resina ya unida a la fracción soluble en una columna de purificación. Para los lavados se adicionaron 5 volúmenes de buffer de lavado (Na_3PO_4 50mM pH 8, NaCl 300mM, Imidazol 20mM) y finalmente se realizó la elución de la proteína con 5 volúmenes de buffer de elución (Na_3PO_4 50mM pH 8, NaCl 300mM, Imidazol 500mM), recolectando los eluidos de la purificación [53]. El proceso de purificación se analizó por SDS-PAGE [51], western blot [52] y medición de la actividad enzimática.

6.2.2.4 Cuantificación de proteínas por método de Bradford

En todos los casos la cuantificación de proteínas solubles se realizó mediante el método de Bradford, incubando 20uL de muestra en 980 uL de reactivo de Bradford durante 5 min, posteriormente se realizó la medición espectrofotométrica a 595 nm y se calcula la concentración de proteína basados en una curva de calibración con Albumina de suero bovino (BSA)[54]

6.2.2.5 Expresión y purificación de la NADK humana recombinante HsNADK

Se realizó un inoculo en medio liquido LB suplementado con ampicilina 100µg/ml y cloranfenicol 50 µg/ml a 37°C aproximadamente durante 14 horas en agitación constante. Partiendo del inoculo anterior se inició el crecimiento celular para la expresión de la proteína, nuevamente en medio LB suplementado con los antibióticos. Se realizó una

dilución de 1:50 incubándose hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5 (OD 600nm). Posteriormente la inducción de la proteína se llevó a cabo adicionando Isopropil β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) a una concentración final de 1mM.

Una vez obtenida la proteína 6xHis-HsNADK en la fracción soluble, se realizo su purificación mediante IMAC-Ni siguiendo la metodología planteada en el numeral 6.2.2.3. Los resultados de esta purificación se siguieron mediante SDS-PAGE y ensayos de actividad enzimática.

6.2.3 Evaluación de la actividad enzimática

6.2.3.1 Ensayos enzimáticos acoplados

Obtenida la proteína recombinante Hisx6-LbNADK y posterior a su purificación se evaluó la actividad NAD quinasa del candidato propuesto por un ensayo acoplado, según la metodología utilizada por Kornberg en 1950. Los ensayos de actividad acoplados se hicieron utilizando la Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). La mezcla de reacción en este caso será NAD^+ 5 mM, ATP 5 mM, $MgCl_2$ 10 mM, Tris-HCl 100 mM pH 7,2. Para comenzar la reacción se agregó 1µg de la proteína recombinante, se incubo por 10 min a 22 °C y se agrega glucosa 6-fosfato 5 mM y 1 U de G6PDH, las lecturas de absorbancia se hicieron en un espectrofotómetro a 340nm [16].

6.2.3.2 Ensayos enzimáticos directos.

La actividad enzimática de la proteína Hisx6-LbNADK también se evaluó mediante un ensayo directo, en el cual la proteína se encontraba en presencia de sus sustratos. La mezcla de reacción (100 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM ATP, 5 mM NAD^+ y 1ug de proteína) se incubo durante media hora a 22°C. Una vez pasado el tiempo de incubación, se detuvo la reacción con $HClO_4$ 1.2M y se neutralizo la mezcla con K_2CO_3 1M. Los nucleótidos obtenidos se analizaron mediante RP-HPLC empleando una columna en fase reversa C18 (25 cm de longitud x 4.6 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula, Phenomenex, aplicando el siguiente gradiente de elusión con los buffers A (0.1 mM fosfato de potasio, pH 6.0) y B (Metanol): 5 min 100% buffer A, 2 min 10 buffer B, 4

min 20% buffer B, 2 min 10% buffer B, y 6 min 100% buffer A. La detección de los analitos se realizó a 254nm con un flujo de 1ml/min.

6.2.3.3 . Caracterización enzimática de las proteínas 6xHis-LbNADK y 6xHis-Δ1-970LbNADK

Los ensayos de uso de cofactores y cinética enzimática se realizaron mediante ensayos enzimáticos acoplados. Para determinar la preferencia de cofactores, se cambió el $MgCl_2$ por el respectivo ion divalente en la misma concentración (Mn^{+2}, Ca^{+2}, Ni^{+2}, Zn^{+2}, Co^{+2}). En los ensayos de saturación para cinética enzimática se emplearon concentraciones de saturación de 1mM para cada nucleótido y se variaron las concentraciones de ATP (0 a 1500µM) y NAD^+ (0 a 1000 µM). Finalmente, los cálculos de constantes cinéticas se realizaron en el *software* PRISM 8.0.1.

La determinación de pH óptimo de reacción se realizó mediante ensayos enzimáticos directos como se mencionó en el numeral 6.2.3.2, evaluado condiciones de pH de 4, 5, 6, 7 y 8. En cada caso se empleó buffer citrato (pH 5-6.5), buffer HEPES (pH 7-7.5) y buffer borato (pH 8-9) en el buffer de reacción,

6.2.4 Generación, obtención y caracterización de anticuerpos policlonales aviares (IgY)

6.2.4.1 Producción de anticuerpos aviares (IgY): Esquema de inmunización.[55,56]

La proteína recombinante 6xHis-GiNADK purificada mediante cromatografía de afinidad a Niquel se empleó como inmunógeno en la generación de anticuerpos policlonales IgY en gallinas Babcock Brown de 36 semanas de edad. Se realizó inoculación vía intramuscular de dos individuos: una gallina control (inoculada con PBS) y una gallina tratamiento (Inoculada con la proteína recombinante purificada previamente). El esquema de inmunización se muestra en la tabla 7. La gallina control y la gallina tratamiento se inocularon con el antígeno correspondiente hasta completar un total de 4 inoculaciones. La primera inoculación consistió en una mezcla homogénea (1:1 en volumen) de antígeno y adyuvante completo de Freund y los refuerzos adicionales fueron mezclas homogéneas (1:1 en volumen) de antígeno y adyuvante incompleto de Freund. El control de inmunización

consistió en una mezcla homogénea (1:1 en volumen) de PBS y el adyuvante correspondiente (completo o incompleto). A partir de este último se obtuvo el suero no relacionado.

Tabla 6. Esquema de inmunización empleado para la producción de anticuerpos policlonales en modelo aviar dirigidos contra la proteína 6xHis-LbNADK.

	Gallina Control				**Gallina Tratamiento**			
No Inoculación	1	2	3	4	1	2	3	4
Día	0	15	30	45	0	15	30	45
Adyuvante de Freund	C	I	I	I	C	I	I	I
Cantidad de antígeno (µg)	--	--	--	--	150	150	150	150
Volumen de inyección (µL)	300	300	300	300	300	300	300	300

6.2.4.2 Obtención de sueros inmunes.

Las muestras de sangre periférica de las gallinas se tomaron después de la cada inoculación y 15 días después de la última inoculación en cada individuo. El suero de cada muestra de sangre se colectó por centrifugación (12000 rpm durante 20 min a 4ºC) después de dejar coagular la sangre durante 30 min a 37 ºC. Al suero obtenido se adicionó Glicerol 20% (V/V) y se almacenó a -80°C.

6.2.4.3 Caracterización de los sueros inmunes.

Los anticuerpos obtenidos se caracterizaron empleando la recombinante 6xHis-LbNADK y la técnica de western blot. Los sueros pre-inmune, no relacionado y los 4 sueros inmunes aviares obtenidos se evaluaron por western blot contra 200 ng de la proteína recombinante 6xHis-LbNADK. El suero inmune que presento un mejor reconocimiento de la proteína recombinante fue seleccionado para evaluar su capacidad de reconocer cantidades diferentes de proteína recombinante (50, 25, 12.5, 6.25 y 3 ng) a una dilución constante de 1: 5000 anticuerpo-TBST. Así mismo se evaluó la dilución mínima capaz de reconocer 200ng de proteína recombinante.

Para cada uno de los casos se usaron como controles negativos de los sueros, los sueros pre-inmune y no relacionado. Como control negativo de proteína se empleó en cada caso una cantidad de BSA (Albumina de suero bovino) equivalente a la cantidad de proteína recombinante 6xHis-LbNADK utilizada.

6.2.4.4 Purificación de anticuerpos a partir de huevo.

Las inmunoglobulinas Y (IgY) se purificaron de acuerdo al método planteado por Pauly y colaboradores[57]. Las yemas de los huevos fueron cuidadosamente separadas de la clara y transferidas a un tubo falcon nuevo de 50ml, luego fueron solubilizadas en buffer PBS pH. 7.4 en una relación 2:1(PBS:Yema). Posteriormente se tomó una alícuota de 1ml por cada huevo, el primer paso en la purificación de los IgYs fue la eliminación de lípidos, esto se realizó mediante la adición de PEG-6000 a una concentración final de 3,5% P/V, luego se centrifugo a 14000 g/min durante 20min. El sobrenadante de este primer paso fue transferido a un tubo Eppendorf de 2ml y se adiciono PEG-6000 hasta completar 8,5% de saturación de acuerdo al nuevo volumen obtenido, la muestra fue incubada a temperatura ambiente con agitación constante durante 10min y se centrifugo a 14000 g/min durante 20 min. Se descartó el sobrenadante de esta precipitación y se resuspendio el pellet en 1ml de buffer PBS, posteriormente se adiciono PEG-6000 para completar un 12% P/V, la muestra fue incubada a temperatura ambiente con agitación por 10 min. Finalmente se centrifugo a 14000 g/min durante 20 min, el sobrenadante se descartó y el pellet fue resuspendido en 400 µL de buffer PBS. Todas las muestras fueron almacenadas a -20 °C para su posterior uso.

Tabla 7. Controles empleados en el ensayo de ELISA para la caracterización de anticuerpos obtenidos a partir de huevo.

No	Tipo de control	Ag	Ab1ro	Ab2ro
1	Negativo	PBS-leche 5% p/v	Sangría 1 Dilución 1:3000	Anti IgY- HRP Dilución 1:20.000
2	Negativo	6xHis-LbNADK 10µg/ml	Sangría 1 Dilución 1:3000	PBS
3	Negativo	6xHis-LbNADK 10µg/ml	PBS	Anti IgY- HRP Dilución 1:20.000
4	Positivo	Anti IgY- HRP Dilución 1:20.000	PBS	Anti IgY- HRP Dilución 1:20.000

6.2.4.5 Evaluación de los anticuerpos obtenidos mediante ensayo de ELISA

Se realizaron ensayos de ELISA indirectos según procedimientos estándar. Se emplearon placas de 96 pozos activadas con 100 ng de la proteína recombinante Hisx6-LbNADK en buffer carbonatos pH 9.6; las IgYs a evaluar fueron empleadas en dilución 1:1000 en buffer PBS. Como anticuerpo secundario utilizo IgG de burro anti IgY acoplado a peroxidasa (dilución 1:30000, Sigma Aldrich). El revelado de se llevó a cabo mediante la adición de 100 µL de 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina (TMB) a una concentración de 0.4 mg/mg, se incubo por 20 min y finalmente se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 450 nm para evidenciar la reacción colorimétrica producida por el sustratoTMB.

Las placas de ELISA (Falcon 353075) fueron activadas en 200 µL buffer carbonatos (pH 9.6) durante 48 horas, posteriormente se realizaron 3 lavados por aspersión con buffer PBS 1X. Luego de los lavados se incubo la placa con 200 µL de una solución de leche 5% p/v en PBS 1X durante 2 horas y se realizaron nuevamente lavados con PBS por aspersión. Los anticuerpos primarios (Obtenidos a partir de yema de huevo como se describió previamente) y secundario se incubaron durante 2 horas, seguidas por 3 lavados con PBS cada uno. Finalmente luego de los lavados del anticuerpo secundario, se llevó a cabo el proceso de revelado como se mencionó anteriormente.

Para este procedimiento se emplearon los controles mostrados en la tabla 8 y como muestras a analizar los anticuerpos obtenidos a partir de los huevos colectados durante el esquema de inmunización. Esto se realizó tanto para los huevos obtenidos del individuo inmunizado con la proteína 6xHis-LbNADK como para los obtenidos del individuo inmunizado con buffer PBS.

6.2.4.6 Purificación de anticuerpos por afinidad a antígeno

Los anticuerpos IgY producidos se purificaron por un método de afinidad al antígeno (Gi-6xHisNADK), a partir de membranas de nitrocelulosa, como se describe a continuación. Se cargó 250 µg de proteína recombinante 6xHis-LbNADK, purificada a partir de cuerpos de inclusión, en un gel SDS-PAGE T-10%. Se realizó electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa durante 2h a 200 mA. Y posteriormente se hizo tinción reversible con Rojo Ponceau S. Las bandas correspondientes al peso molecular esperado se cortaron y se lavó 5

min con TBS. Se realizó bloqueo con TBS-leche 5% (P/V) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con TBS (10 min c/u) y se cortó la membrana en cuadritos más pequeños (aprox. 2 a 3 mm x cada lado). Unión: Los cuadritos se sumergieron en 1 ml de suero de gallina y se incubó a temperatura ambiente, toda la noche, con agitación constante. Se retiró el suero remanente y se almacenó a -20°C. Lavados: Las membranitas se lavaron 3 veces con 1 ml de TBS, realizando vortex. Los lavados se almacenaron a -20°C.Elución: Se adicionó 125 µl de Glicina 100 mM, pH 2.5 y se incubó a temperatura ambiente y agitación constante durante 5 minutos (Cada minuto se hizo vortex). Se transfirieron los 125 µl a otro tubo que contenía 10 µl de Tris-HCl 2M pH 8,5. Se recogieron 3 eluidos en total (cada eluido en un tubo diferente), se cuantificaron por el método de Bradford. El eluido más concentrado se empleó para realizar inmunodetección sobre parásitos totales. Los cuadritos se almacenaron en 1 ml de TBS a -20°C. Se siguió este mismo procedimiento pero empleando suero no relacionado.

Evaluación de anticuerpos obtenidos por afinidad a antígeno

6.2.5 Inmunodetección e inmunolocalización de la proteína LbNADK

6.2.5.1 Inmunodetección de la proteína LbNADK endógena en extractos solubles de *L. braziliensis*

Para el establecimiento de líneas de promastigotes de *Leishmania braziliensis*, se cultivaron parásitos en medio Schneider suplementado con suero fetal bovino 10% (V/V) a una temperatura de 26°C, en flasks de 25 cm 2 (T25), sin agitación. Los cultivos una vez alcanzaron la fase de crecimiento estacionaria se diluyeron a una concentración inicial de 1 x 10^6 células/ml.

Se colectaron los promastigotes mediante centrifugación a 6000 rpm por 10 min a 4ºC, se lavaron 2 veces con 10 ml de PBS pH 7.4, se resuspendieron en 500 µl de buffer de lisis (0.1X PBS, coctel de inhibidores de proteasas (1:200), 0.1% (V/V) Tritón X-100) y se incubaron durante 30 min a 4ºC con agitación constante. La suspensión se centrifugo a 12000 rpm por 5 min a ºC y se almaceno el sobrenadante a -20°C (Fracción soluble).

La inmunodetección se realizó mediante la técnica de western blot empleando como

anticuerpo primario, los anticuerpos producidos previamente contra la proteína recombinante mediante los métodos mencionados anteriormente. Inicialmente se realizó el bloqueo de la membrana incubando la misma con buffer TBS-leche 5% p/v durante 24 horas a temperatura ambiente y con agitación constante, cumplidas las 24 horas de incubo la membrana con el anticuerpo 1ro (Anti 6xHis-LbNADK, dilución 1:250 en buffer TBST) durante 24 horas bajo las condiciones mencionadas anteriormente, posteriormente se realizó la incubación de la membrana con el anticuerpo 2ro (Anti IgY- Biotina, dilución 1:10.000 en buffer TBST) durante 2 horas. Finalmente se incubo la membrana con fosfatasa alcalina (dilución 1:1000 en buffer TBST) durante media hora y se realizó el revelado en buffer F (Tris-HCl 100mM, NaCl 100mM, $MgCl_2$ 5 mM)con los sustratos BCIP y NBT durante 30 segundos, entre cada uno de los pasos se realizaron 3 lavados con buffer TBST cada uno de 10 min a temperatura ambiente y con agitación constante.

6.2.5.2 Inmunolocalización de la proteína LbNADK por Inmunofluorescencia

Para los ensayos de microscopía los parásitos provenientes de 1 ml de cultivo se lavaron tres veces con 1 ml de PBS, centrifugando a 5000 rpm por 5 min a 4ºC. El precipitado de parásitos se resuspendio en 0.5 ml de PBS y se aplicó una cantidad conocida de promastigotes sobre láminas tratadas con poli-L-lisina. Las células se fijaron con paraformaldehido 4% (P/V) preparado en PBS durante 1 h a 4ºC. Luego se incubaron los parásitos con glicina 100mM en PBS 1X durante 15 min y se permeabilizaron con acetona durante 10 min a 4ºC.

Los montajes se bloquearon empleando BSA 1% (P/V) en PBS durante 24h. Se empleó como anticuerpo primario anti-6xHis-LbNADK y como anticuerpo secundario anti conejo IgY acoplado a Alexa 488. El anticuerpo primario se incubo durante 24 h y el anticuerpo secundario durante 2 horas, cada uno seguido de 3 lavados con PBS durante 10 minutos cada uno. Adicionalmente se efectúo la tinción de los núcleos, haciendo uso de DAPI a una concentración de 1 µg/ml en PBS durante 5 min. Finalmente se observaron los parásitos en el microscopio de fluorescencia NIKON C1 PLUS.

7. Resultados y discusión

7.1 Identificación y caracterización computacional del candidato a NAD quinasa LbNADK

Inicialmente se realizó la búsqueda de candidatos, empleando una secuencia consenso, obtenida a partir del alineamiento múltiple de 250 secuencias de NADK de organismos de los tres dominios de la vida (Anexo 1). Al hacer la búsqueda mediante comparación de dicha secuencia con el genoma de todas las especies del género *Leishmania* reportadas en las bases de datos del NCBI, se encontró un posible candidato a NADK presente en las 6 especies de *Leishmania* (Anexo 2).

Adicionalmente, se obtuvieron 4 secuencias consenso (Cada una hecha mediante el alineamiento de 250 secuencias) en las que se analizaron por separado eucariotas, procariotas, animales y plantas, con el objeto de establecer la proximidad a cada uno de estos grupos, las secuencias obtenidas se muestran en el anexo 1. Se realizó la predicción de posibles candidatos con estas 4 secuencias consenso y se identificó de manera reproducible el mismo candidato encontrado inicialmente (Tabla 9). Igualmente, todos los candidatos a NADK identificados presentaron *E-value* entre $1x10^{-4}$ y $1x10^{-8}$ para las 5 búsquedas realizadas, indicando que la probabilidad de encontrar secuencias idénticas a estas por azar en los genomas de las especies de *Leishmania* es muy baja. Por otro lado, los porcentajes de cobertura de los candidatos identificados fueron de entre 39 y 48% y los porcentajes de identidad entre 27 y 30% (Anexo 2).

Se seleccionó el candidato a NADK de *Leishmania braziliensis* (LbNADK) como modelo para el estudio de este grupo de proteínas en *Leishmania spp*, debido a que se dispone de esta cepa para la aproximación experimental. Este candidato se identifica con el código de acceso Gi: 389599909, presenta una única copia en el genoma del parásito, se encuentra ubicado en el cromosoma 6 con un tamaño de 3774pb y un peso esperado para la proteína de 135kDa.

Tabla 8. Candidatos a NADK identificados en diferentes especies del género *Leishmania*

Especie	No identificación
L, major	Gi: 157864208
L. donovani	Gi: 398010313
L. mexicana	Gi: 401415126
L. braziliensis	Gi: 389599909
L. panamensis	Gi: 731711555
L. infantum	Gi: 146071480

Con el objetivo de caracterizar la secuencia de interés, se llevó a cabo una comparación entre la secuencia de aminoácidos predicha para el candidato LbNADK con NADKs de eucariotas y procariotas mediante la herramienta BLASTP. Los resultados se pueden observar en la tabla 10, donde se puede apreciar que el candidato LbNADK presenta identidades entre 20 y 33% tanto con NADK de eucariotas como procariotas, destacando la NADK de *Entamoeba histolityca* con la cual presento una identidad de 33%. Estos resultados son similares a los encontrados para otras proteínas ya caracterizadas en especies del género *Leishmania* y proteínas como la NADK de *E. histolityca*[32], que también presentan valores de identidad bajos al ser comparados con proteínas tanto de eucariotas como de procariotas.

Tabla 9. Comparación entre el candidato LbNADK y NADKs de diferentes organismos eucariotas y procariotas mediante BLASTP**.**

	Organismo	Identidad	Score	E-value	Cobertura
Eucariotas	*A.thaliana*	27	237	$4.00x10^{-10}$	40%
	A.thaliana 2	29	155	$8.00x10^{-9}$	27%
	H. sapiens	20	57	0.028	18%
	E. histolityca	33	135	$4.00x10^{-40}$	18%
Procariotas	*A.fulgidus*	28	73.9	$9.00x10^{-14}$	28%
	T. acidophilum	25	68.9	$7.00x10^{-6}$	18%
	E. coli	31	74.7	$7\ x10^{-8}$	15%
	M. tuberculosis	26	74.3	$4.00x10^{-8}$	18%

Además, los *E-value* obtenidos al comparar el candidato LbNADK con cada una de las NADK de la tabla 9, con excepción de la NADK de *H. sapiens* fueron iguales o inferiores a $1x10^{-6}$, al igual que los valores obtenidos de la predicción con cada una de las secuencias consenso empleadas (Anexo 2), indicando que la probabilidad de encontrar de forma azarosa una secuencia idéntica a la del candidato LbNADK es baja.

Continuando con la caracterización bioinformática de la secuencia de interés y la determinación de la presencia o ausencia de características universales de las NADKs, inicialmente se llevó a cabo la búsqueda de dominios conservados, mediante el servidor CDD del NCBI. Se identificó el dominio NAD quinasa, característico de las NADK dependientes de ATP con una longitud de 155 aa[43]. Adicionalmente, se encontraron dos dominios característicos de NADKs; el PpnK relacionado con la capacidad de usar tanto ATP como polifosfatos inorgánicos (Como donadores del grupo fosfato) y el NadF implicado en la asociación del dinucleótido receptor (NAD o NAD(H)) (Tabla 11).

Tabla 10. Predicción de dominios funcionales conservados en la secuencia LbNADK. (Predicción realizada en el servidor CDD, Conserved Domains Database)[43].

Nombre	No. Acceso	Descripción	Intervalo	E-value
Ppnk	PRK04761	inorganic polyphosphate/ATP-NAD kinase	59-282	$3.10x10^{-43}$
NadF	COG0061	NAD kinase [Nucleotide transport and metabolism]	43-259	$4.29x10^{-37}$
NAD_kinase	pfam01513	ATP-NAD kinase; Members of this family include ATP-NAD kinases EC:2.7.1.23	50-205	$9.42x10^{-8}$

A nivel de estructura primaria se realizó un alineamiento múltiple, en el cual se comparó la secuencia de la LbNADK con secuencias de NADKs de organismos eucariotas y procariotas caracterizadas experimentalmente (Figura 7). Se lograron identificar 3 secuencias altamente conservadas de este grupo de proteínas, localizadas hacia la región carboxilo terminal, estas son: El motivo GGDG, motivo NE/D y el dominio rico en glicinas.

Figura 7. Alineamiento múltiple de la LbNADK región C-terminal de con NADKs caracterizadas experimentalmente (Realizado en CLC Workbench 7.7.2). Los aminoácidos señalados con el rectángulo negro corresponden a motivos que han sido propuestos como características universales de las NAD Quinasas: (1) Motivo GGDG (XGGDGXXL), (2) motivo corto NE/D y (3) motivo rico en glicinas (DGXXXXTPXGSTXY). La flecha roja señala el aminoácido determinante de la especificidad hacia el grupo aceptor de fosfato (NAD + /NADH). La conservación de los aminoácidos se muestra en forma de barras, siendo más altas aquellas que muestran un alto porcentaje de conservación.

El motivo GGDG se encuentra involucrado en la unión al sustrato donador de fosfatos en las NADKs y en las Diacilglicerol quinasas[23,24], estudios de mutagénesis dirigida sobre esta secuencia han permitido elucidar su importancia para la actividad catalítica en las NADKs de *M. tuberculosis* y *L. monocytogenes*[23,37]. Mientras que el motivo rico en glicinas, único de las NADKs, posiblemente se encuentra implicado en la coordinación de la unión a nucleótidos como ATP, mediante estructuras tipo bucle como se ha visto en otras proteínas que emplean estas moléculas como sustrato[58]. Finalmente, el motivo corto NE/D se ha visto mediante estudios cristalográficos que se encuentra relacionado con la interacción con NAD(H)[22].

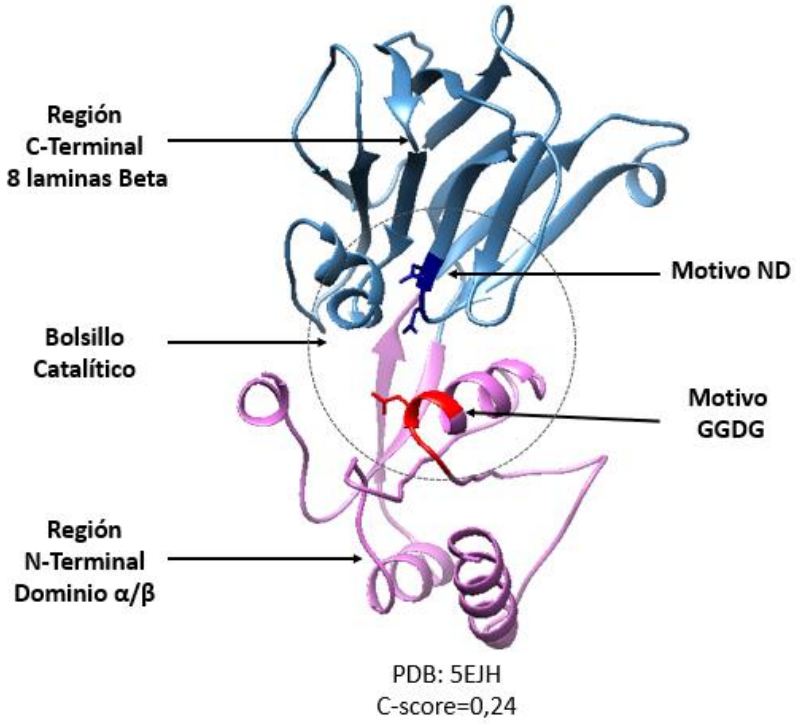
En estudios previos de la NADK de *Mycobacterium tuberculosis* (MtNADK) sobre el aa187 se evidencio que la presencia de un aminoácido polar no cargado o glicina permite especificidad dual NAD^+/NADH, mientras que la presencia de un aminoácido cargado o hidrofóbico implica especificidad por NAD^+[21,25]. En el caso del candidato LbNADK la presencia de arginina (R), un aminoácido cargado positivamente, en posición homologa al aa187 de la MtNADK, sugiere que esta podría fosforilar únicamente NAD^+ y clasifica la proteína candidato como NAD^+ quinasa (2.7.1.23).

Los alineamientos múltiples también permitieron identificar una región N-terminal exclusiva en el candidato LbNADK; comprendida entre los aa 2 y 998, la cual es común al género *Leishmania* y en general en la familia Tripanosomatideae (Anexo 3). La presencia de regiones N-terminal exclusivas de ciertos clados de organismos también ha sido encontrada en otras NADKs como la NADK1 de *A. thaliana,* que al compararse con sus homologas en otros organismos presenta una región N-terminal divergente, con un dominio de unión a Calmodulina (CaM)[30]. Se ha propuesto que dicha región N-terminal en este grupo de proteínas puede ser de longitud y secuencia muy variable y, que podría estar involucrada en regulación de la actividad enzimatica[12,59]. Esta región exclusiva podría ser interesante para futuros estudios de la NADK de *L. braziliensis* (Figura 7).

Para la identificación de dominios estructurales en este candidato, se realizó inicialmente la predicción de estructura tridimensional con toda la secuencia de aminoácidos haciendo uso

del servidor I-TASSER, el cual emplea el algoritmo de *threading*[48]. El modelo obtenido presentó características estructurales típicas de las NADKs, sin embargo, la calidad de dicho modelo fue baja, con valores de C-*score* cercano a -2 (Anexo 4A). Igualmente, al evaluar el modelo mediante el grafico de Rammachandran[49] el 65,3% de aminoácidos se encontró regiones favorecidas, 21% en regiones permitidas y 13,7% en regiones no permitidas (Anexo 4B), esto posiblemente debido a la baja similitud presentada por la región N-terminal de la secuencia con otras proteínas, que como se mencionó anteriormente es exclusiva de esta proteína. Por tal motivo para el análisis, se llevó a cabo el modelamiento de su dominio NADK, excluyendo la región amino terminal antes mencionada.

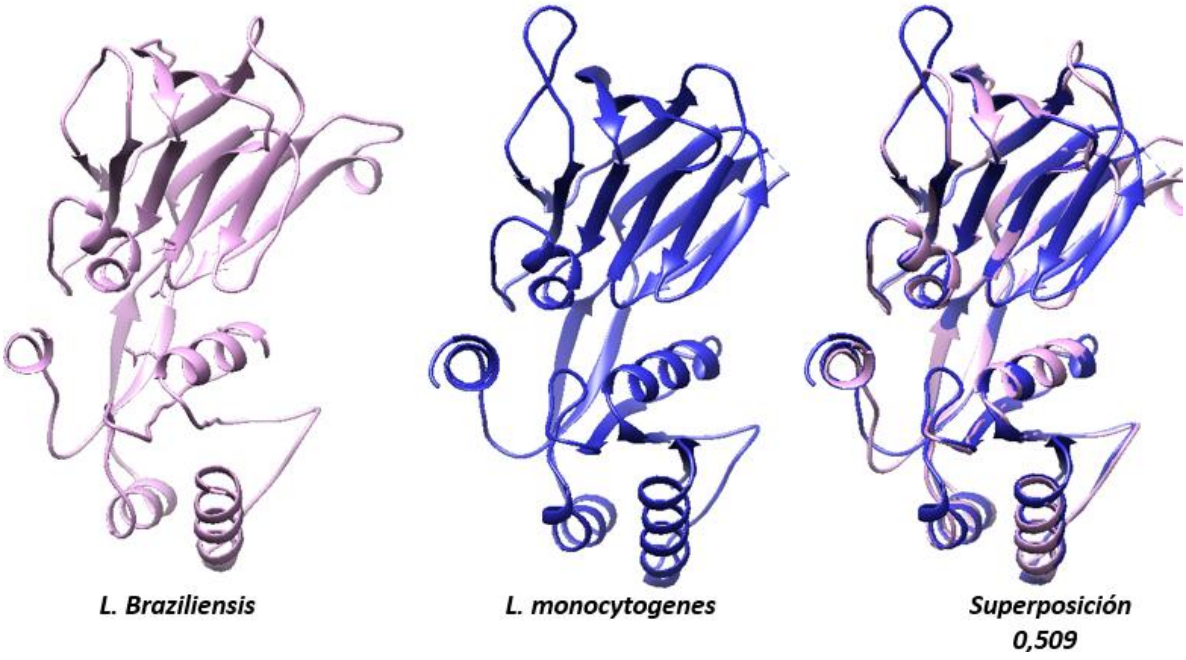
Figura 8. Modelo de estructura tridimensional del dominio NADK del candidato LbNADK generado mediante el servidor I-TASSER. (Visualización de estructura realizada con el programa UCSF Chimera 1.8.1)



El modelo generado a partir de la exclusión de la región N-terminal, permitió la identificación de dos dominios. El primero de ellos caracterizado por la presencia de un plegamiento tipo Rossman, compuesto por la secuencia βαβ y 7 láminas beta, ubicadas de forma anti-paralela, típico de proteínas de unión a NADP[26]. El segundo dominio, presento

un plegamiento de Rossman βαβ, característico de proteínas de unión a NAD y ATP (Figura 8). Al comparar el modelo obtenido con otras proteínas como la LmNADK, se observa que el candidato LbNADK presenta una arquitectura muy similar, lo cual se corrobora al realizar una superposición de estructuras, ya que se obtiene un valor RMSD cercano a 0.5 (Figura 9). Adicionalmente, al evaluar este modelo mediante el grafico de Rammachandran se obtuvieron 90.4% de aminoácidos en regiones favorecidas, 6.3% en regiones permitidas y 3.3% en regiones no permitidas (Figura 10), lo cual puede considerarse como un modelo aceptable.

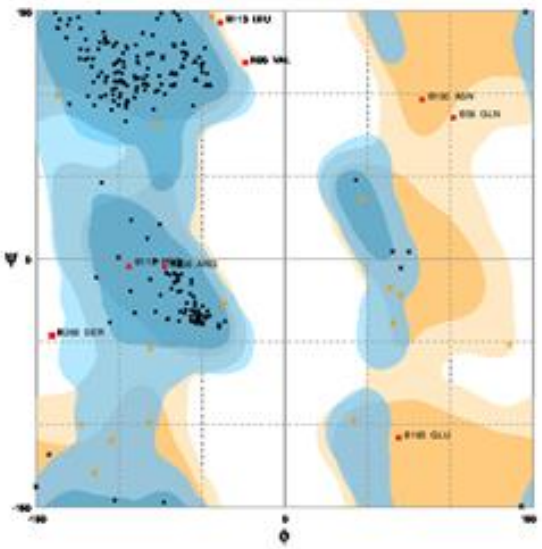
Figura 9. Comparación por superposición de la estructura predicha para el dominio NADK de la NADK de *Leishmania braziliensis* (LbNADK) y el modelo resuelto para la NADK de *Listeria monocytogenes* (LmNADK**)**[37]**.** Identidad 31%, RMSD: 0,509 A entre 236 pares de átomos. Azul oscuro; LmNADK (PDB:5EJH). Rosado; Estructura predicha para la LbNADK. (Visualización y superposición de estructuras realizada con el programa UCSF Chimera 1.8.1)



De acuerdo a los resultados obtenidos del análisis estructural del candidato LbNADK, que de ser identificado experimentalmente, sería la NADK de mayor tamaño descrita hasta ahora (135kDa) después de la NADK1 de *A.thaliana* (112kDa)[28,30], se decidió analizar de

forma computacional posibles modificaciones en el tamaño de la proteína endógena. Para esto se realizó la búsqueda de secuencias de procesamiento de la proteina a nivel postraduccional, tales como las secuencias PEST (Secuencias ricas en residuos de prolina, acido glutámico, serina y treonina). Este tipo de procesamiento, ya se ha visto en otras proteínas de organismos Tripanosomatidos, por ejemplo: la Ornitina decarboxilasa (ODC) de *Tripanosomma brucei*, pierde una región de su extremo C-terminal permitiendo una mayor estabilidad de la proteina[60].

Figura 10. Evaluación del modelo de estructura tridimensional predicha para el dominio NADK de la LbNADK mediante grafico de Ramachandran[49], residuos en región favorecida 90.4%, residuos en región permitida 6.3%, residuos en región no permitida 3.3%.



En este caso, encontramos 3 secuencias PEST con valores significativos según el predictor epestfind (Tabla 12). En específico el PEST *score* asigna un valor mayor de acuerdo a la hidrofobicidad de la secuencia y a la probabilidad de corte. Los resultados obtenidos sugieren que de las 3 secuencias identificadas aquella comprendida entre los aminoácidos 368 y 378 es la que presenta mayor probabilidad de corte, generando una posible isoforma de 93-94kDa.

Las posibles isoformas que se generan a partir de estos cortes presentaron tamaños variables al hacer la predicción de su masa molecular, sin embargo, las 3 comparten su extremo C-terminal con el dominio NADK del candidato. Teniendo en cuenta estos

resultados y la secuencia N-terminal del candidato LbNADK, disímil con otras NADK. Se decidió abordar el estudio de esta proteína mediante 2 aproximaciones. La primera de ellas la construcción de una proteína recombinante conservando únicamente el extremo C-terminal, que contiene el dominio NADK de la secuencia del candidato y la segunda; haciendo un constructo con la secuencia completa.

Tabla 11. Secuencias PEST identificadas en el candidato LbNADK mediante el servidor epestfind

Extensión #aa	Posición de los Aminoácidos	Secuencia de aminoácidos	PEST score	Posible tamaño (kDa)
45	65-111	HSPSSNISSAAQMEAAAWSSSSS FLPPQLSSASPGPSSDAGVTSYAK	2.46	123-127
40	762-803	RTYASVGASNSTSAMPATTEAGM VDESDAFGAEPSLLSSSSH	2.96	49-53
9	368-378	RSDPESSMEMR	5.9	93-94

Se realizó la predicción de peso molecular y punto isoeléctrico tanto para la secuencia completa del candidato (LbNADK) como para el dominio conservado NADK del mismo (Δ1-998-LbNADK), cada uno con y sin una etiqueta de 6 histidinas otorgada por el vector de expresión pET-100 D-TOPO (Invitrogen). Los resultados de la predicción se muestran en la tabla 13, donde se observa que la adición de la etiqueta de histidinas provoca un aumento del peso molecular en aproximadamente 4kDa, la cual fue de gran utilidad durante la fase experimental de este trabajo.

Tabla 12. Valores teóricos de peso molecular y punto isoeléctrico con y sin la etiqueta de histidinas de la secuencia LbNADK y la Δ1-998LbNADK.

Secuencia	pI	No. Aa	MW (kDa)
6xHis-LbNADK	6.26	1293	138.5
LbNADK	6.29	1257	134.4
6xHis-Δ1-998LbNADK	7.22	322	36
Δ1-998LbNADK	8.52	286	31.9

Finalmente, mediante el uso de 3 servidores bioinformáticos se realizó la predicción de la posible localización subcelular de la proteína dentro del parásito. Los resultados mostraron

que para 2 de los servidores empleados la proteína se localiza en la mitocondria del parásito y uno de ellos indico una localización citoplasmática (Tabla 14). Al comparar estos resultados con la localización de las NADKs en otros organismos (Tabla 1), se observa que estas proteínas son predominantemente citoplasmáticas y en algunos casos mitocondriales, pero nunca nucleares ni de membrana citoplasmática o membranas internas, concordante con lo predicho para el candidato LbNADK.

Tabla 13. Resultados de predicción de localización subcelular para el candidato LbNADK mediante diferentes servidores bioinformáticos.

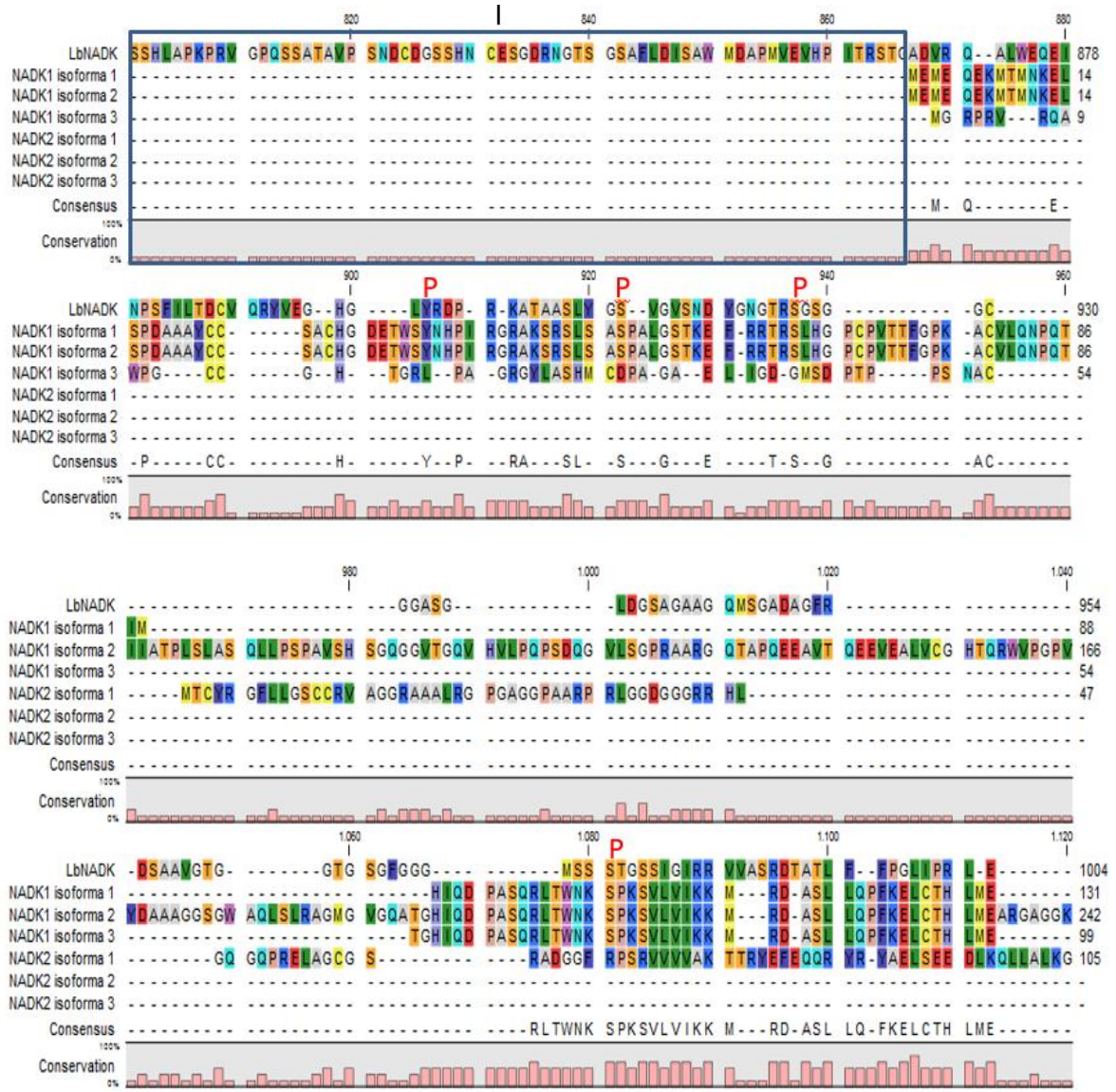
Servidor	Localización	Probabilidad
SherLoc2	Mitocondria	0.61
Multiloc2	Mitocondria	0.44
Euk-mPLoc2	Citoplasma	--

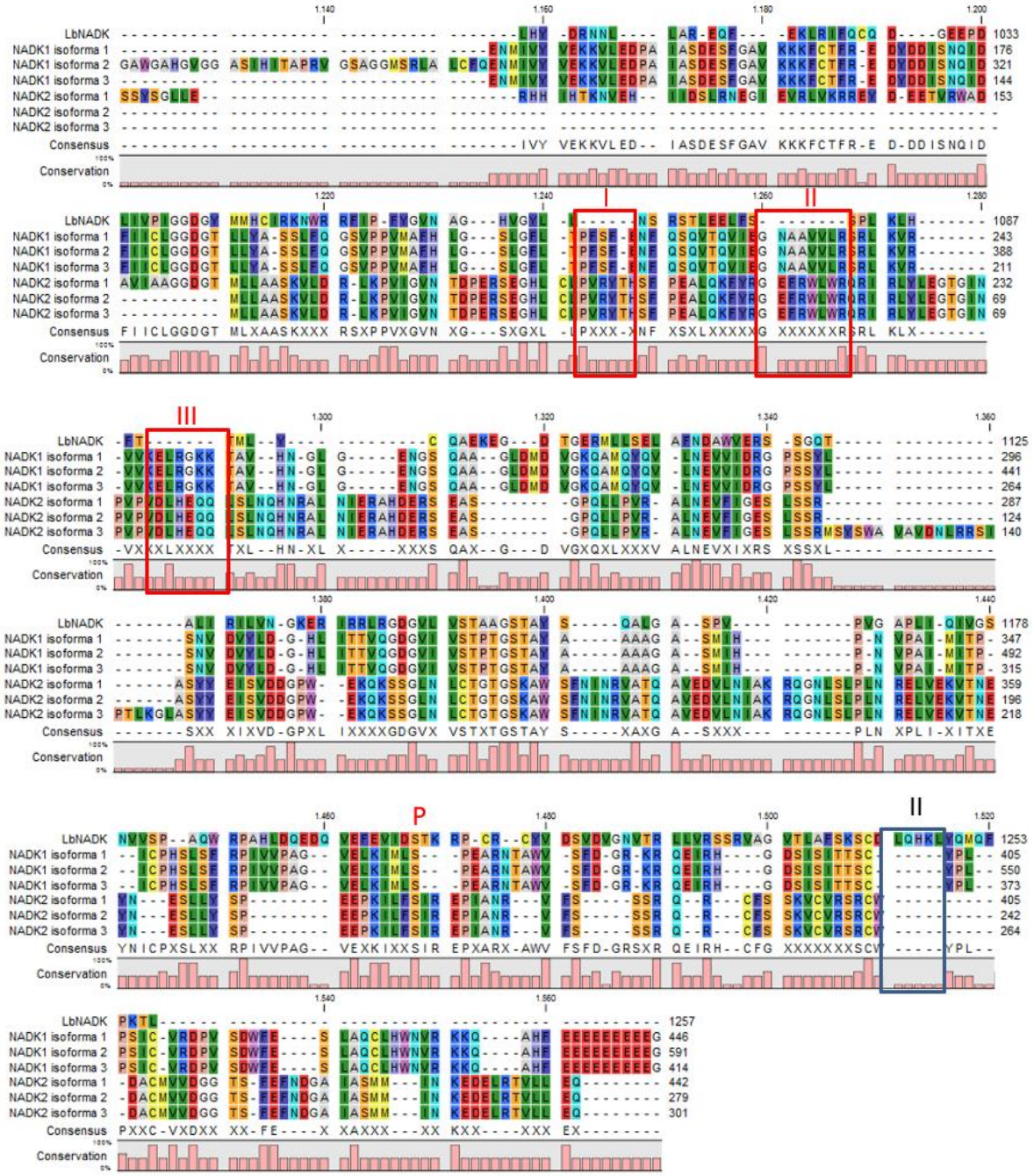
Estos resultados permiten concluir que el candidato LbNADK es una proteína de 135kDa, presenta características estructurales conservadas típicas de las NADKs, posible localización citoplasmática o mitocondrial y 3 posibles sitios de corte por secuencias PEST. Adicionalmente presenta secuencias específicas de los Tripanosomatidos que la podrían señalar como un buen blanco quimioterapéutico.

7.2 Comparación estructural entre el candidato LbNADK y las NADKs humanas

Como se mencionó anteriormente, las NADKs se pueden dividir en dos regiones, una región C-terminal muy conservada que incluye el dominio catalítico de la proteína y una región N-terminal, cuya longitud y secuencia es muy variable[12,59]. Sin embargo, en otras proteínas relacionadas con el metabolismo del NAD(H), tales como las NMNATs (Nicotinamida Mononucleotido Adenilil Trasnferasa) se ha encontrado que, estas han adquirido inserciones de relevancia en cuanto a su localización subcelular y funcionalidad[60].

Figura 11. Alineamiento múltiple de la LbNADK con las secuencias de las NADK humanas. Los recuadros negros señalan inserciones únicas del candidato LbNADK con respecto a las demás secuencias, los recuadros rojos señalan las secuencias exclusivas de las NADKs humanas con respecto a la LbNADK. Las letras P señalan los sitios de fosforilación homólogos entre las diferentes NADKs.





Con el objetivo del candidato LbNADK de caracterizar la secuencia LbNADK con respecto a sus homologas humanas y buscar este tipo de elementos, se comparó la secuencia de aminoácidos completa y las NADK humanas, las isoenzimas 1 y 2 cada una con sus 3 posibles isoformas. Para esto se empleó el software Worbenck CLC 7 (Figura 11).

Al comparar el candidato LbNADK con sus homólogos en *H. sapiens*, se encontró que este presenta un extremo N-terminal exclusivo que comprende desde el aminoácido 1 hasta el 998, el cual es común a todos los candidatos encontrados en tripanosomatidos. En cuanto a la región C-terminal, aunque es la región más conservada de las NADKs, presenta regiones variables entre las diferentes proteínas humanas lo cual dificulto el análisis de los resultados.

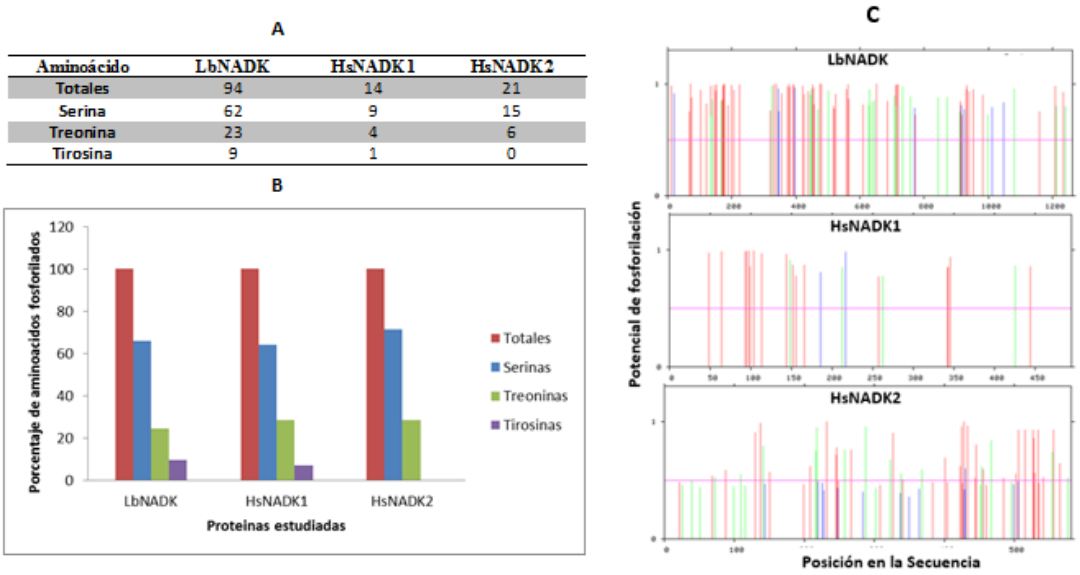
Sin embargo, vale la pena destacar que se identificó una región exclusiva para el candidato LbNADK, con una longitud de 5 aminoácidos comprendida entre las posiciones 1215 a 1219 ubicada en una región cercana al C-terminal de la proteína. Igualmente, se encontraron 3 regiones exclusivas de las NADKs de *H. sapiens.* Indicando que a nivel de estructura primaria la LbNADK ha experimentado tanto inserciones como deleciones, en comparación con sus homologas en el humano. Los resultados obtenidos muestran no solo que existen diferencias significativas entre las secuencias analizadas, también dan cuenta de historias evolutivas bastantes divergentes.

Para profundizar en la caracterización de la LbNADK con respecto a sus homologas humanas, se predijeron los posibles sitios de fosforilación tanto para la LbNADK como para las HsNADK isoenzimas 1 y 2. La fosforilación es una modificación postraduccional de gran relevancia en todos los procesos biológicos, muchas proteínas requieren estar fosforiladas en uno o varios aminoácidos simultáneamente para ser biológicamente activas, lo que da cuenta de la importancia de esta[61]. Dicha actividad, llevada a cabo por las quinasas, juega un rol importante en la regulación de casadas de señalización y el metabolismo en general[61].

Para la predicción de los sitios susceptibles de modificación por fosforilación se empleó el servidor Netphos, disponible en la plataforma Expasy, seleccionando aquellos sitios que presentaron un valor igual o superior a 0.7. Los resultados de la predicción se muestran en la figura 12A, y se puede apreciar inicialmente que para el candidato LbNADK se encontraron 94 posibles sitios de fosforilación, mientras que para las HsNADK1 y HsNADK2 se encontraron 14 y 21 respectivamente (Anexo 5). En la figura 12B se muestra

una comparación en cuanto a porcentajes de posibles aminoácidos fosforilados, donde se puede observar una tendencia clara hacia la fosforilación de serinas en las 3 proteínas estudiadas, seguido por los aminoácidos treonina y tirosina respectivamente.

Figura 12. Comparación de las predicciones de fosforilaciones en la LbNADK y las HsNADk1 y HsNADK2. **A:** Número de aminoácidos posiblemente fosforilados con *score* superior a 0.7. **B:** Porcentaje de serinas, treoninas y tirosinas posiblemente fosforilados con respecto al total de aminoácidos con *score* superior a 0.7**.C:** Grafico de residuos posiblemente fosforilados y su posición en la secuencia de cada proteína, las líneas rojas indican residuos de serina, las verdes indican treonina y las azules indican tirosina.



Aminoácido	LbNADK	HsNADK1	HsNADK2
Totales	94	14	21
Serina	62	9	15
Treonina	23	4	6
Tirosina	9	1	0

Al realizar una curación manual de todos los posibles sitios de fosforilación para las 3 proteínas analizadas, se observó que solo 5 presentan homología estructural como se puede observar en los alineamientos realizados (Figura 11). De estos residuos posiblemente fosforilados homólogos entre el candidato LbNADK y las diferentes NADKs humana, la serina 64 de la HsNADK1 fue previamente reportada como un sitio de fosforilación por la quinasa dependiente de calmodulina II (CaMKII)[59], al igual que otras NADKs fosforiladas en serina como las de *M. musculus y S. purpuratus*[59].

Por otro lado, un alto número de posibles sitios de fosforilación encontrados se localizan hacia la región N-terminal (Figura 12C) y se encuentran asociados a proteína quinasa A

(PKA) y proteína quinasa C (PKC)(Anexo 5), las cuales ya han sido reportadas como parte del *kinoma* de *Leishmania*[62]. Los resultados obtenidos concuerdan con lo propuesto por otros autores, que sugieren la región N-terminal de las NADKs es sensible a modificaciones postraduccionales y que posiblemente esté actuando como moduladora de la actividad enzimática[12]

Lo anterior sugiere que el candidato LbNADK presenta diferencias no solo a nivel de estructural con sus homologas humanas, sino que también presenta posibles sitios de fosforilación tanto homólogos como específicos y por ende diferencias en cuanto a regulación postraduccional. Estas diferencias podrían ser de gran interés en el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos a proteínas relacionadas al metabolismo del NAD (P), como se ha venido desarrollando en otras enfermedades como el cáncer[63] y patologías cardiacas[64] con proteínas de esta ruta.

7.3 Obtención de las proteínas 6xHis-LbNADK y 6xHis-Δ1-970LbNADK

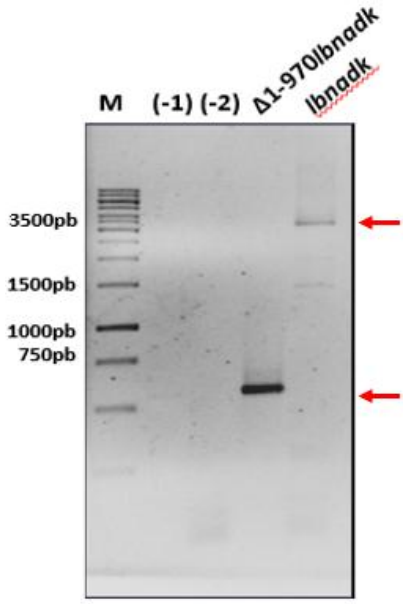
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de la caracterización computacional del candidato LbNADK, y con el ánimo de caracterizarlo de manera experimental se planteó la obtención de las proteínas 6xHis-LbNADK (Completa 135kDa) y 6xHis-Δ1-970LbNADK (Dominio NADK 35 kDa) mediante la tecnología de ADN recombinante como se muestra a continuación.

7.3.1 Amplificación de las secuencias codificantes de la 6xHis-Δ1-970LbNADK y 6xHis-LbNADK

Para la obtención de los constructos con las secuencias de interés, se realizó la amplificación de las secuencias de ADN mediante PCR (Sección 6.2.1.1) a partir de ADN genómico de *Leishmania braziliensis* (LbADN). Mediante esta metodología se obtuvo un fragmento de 861pb correspondiente a la 1-970LbNADK (Figura 13). En cuanto al fragmento codificante para la LNADK completa (3774pb), este se obtuvo mediante PCR de

superposición a partir de productos de PCR de las regiones amino y carboxilo (1789 y 1987pb) como se describe en el numeral 6.2.1.2 de la metodología (Figura 13), lo anterior debido a que no fue posible obtenerlo de forma directa empleando como plantilla LbADN, luego de probar diferentes condiciones experimentales (datos no mostrados).

Figura 13. Amplificación de las secuencias codificantes para mediante PCR. **Δ1-*970lbnadk y lbnadk*:** Fragmentos de ADN de interés. **-1 y -2:** Blancos de reactivos para cada fragmento de ADN. **M:** Marcador de peso molecular 1kb de Fermentas. Gel de agarosa 0.8% en TBE 0.5X, teñido con bromuro de etidio. Las flechas indican las bandas de interés.



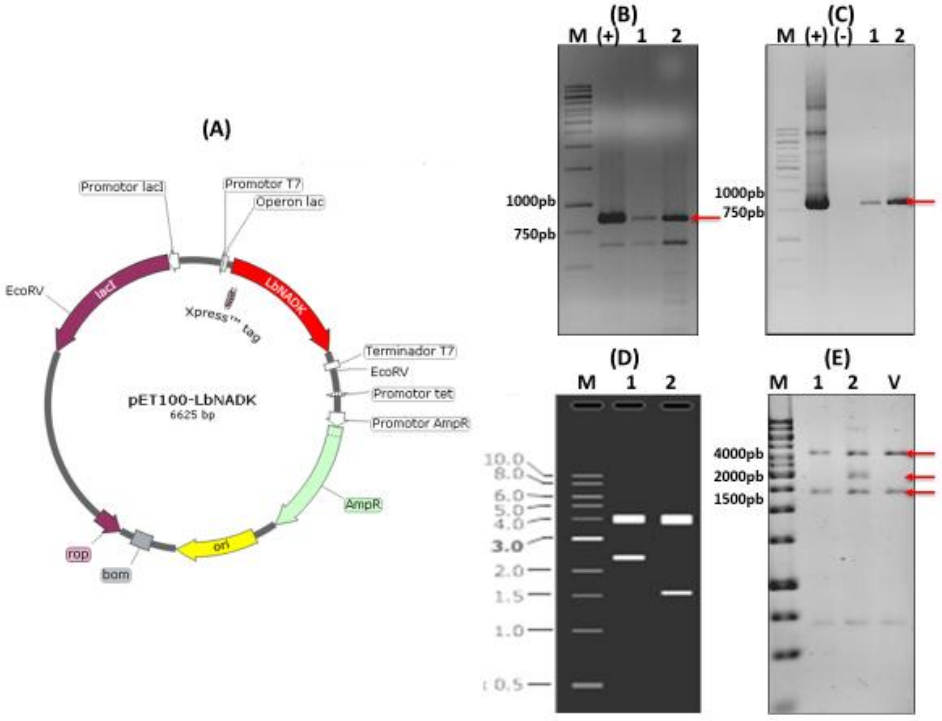
7.3.2 Construcción de los vectores recombinantes pET100-Δ1-970LbNADK, pGEMT-EASY-LbNADK y pET100-LbNADK

7.3.2.1 Obtención del vector recombinante pET100-Δ1-970*lbnadk*

El producto de PCR amplificado a partir de ADN genómico de promastigotes de *L. braziliensis*, se ligó en el vector comercial pET-100/D-TOPO y con el producto de ligación (Sección 6.2.1.3) se transformaron células *E. coli* TOP10 (sección 6.2.1.5), para la construcción del pET100- Δ1-970*lbnadk* (Figura 14A). Se obtuvieron 2 colonias, las cuales

fueron evaluadas mediante PCR de colonia (Sección 6.2.1.6); las dos presentaron el amplificado del tamaño esperado de 861pb (Figura 14B).

Figura 14. Construcción del vector recombinante pET100- Δ1-970*lbnadk*. **A**: Constructo pET100-Δ1-970*lbnadk*. **B**: Clonación de la región C-terminal del candidato *lbnadk*, Rastreo de colonias *E. coli* TOP10 mediante PCR. (1,2); Colonias evaluadas. **C**: Evaluación de plásmidos pET100- Δ1-970*lbnadk* por PCR. (1,2); Plásmidos evaluados. **D**: Predicción de sitios de corte con la enzima EcoRV para los plásmidos pET100 vacío y pET100- Δ1-970*lbnadk*. **E**: Evaluación de plásmidos pET100- Δ1-970*lbnadk* positivos para PCR por digestión con EcoRV. (1,2); Plásmidos positivos para PCR. Para todos los geles: (M); Marcador de peso molecular 1kb de Fermentas. (+); Control positivo, ADN genómico de *L. braziliensis* como plantilla. (-); Control negativo H2O DEPC como plantilla. (V); Vector vacío digerido. Geles de agarosa 1% en buffer TBE 0.5X, teñidos con bromuro de etidio. Las flechas rojas indican los fragmentos de ADN de interés.



A estas colonias se les realizo extracción de plásmido por lisis alcalina y ambos fueron evaluados por PCR y digestión con enzimas de restricción (Secciones 6.2.1.7 y 6.2.1.8). En ambos casos los plásmidos mostraron un amplificado del tamaño esperado de 861pb (Figura 14C) y al realizar digestión con la enzima de restricción se pudo observar que solamente la colonia 2 presento el perfil esperado para el plásmido recombinante pET100-Δ1-970*lbnadk* (Figuras 14D-E). La presencia de un amplificado de 861pb en la colonia 1,

que no presenta el perfil de digestión esperado puede implicar que esta presenta una co-transformación con vector vacío y vector recombinante, en la cual predomina la presencia del vector vacío; por tal motivo se empleó el plásmido pET100- Δ1-970LbADK obtenido a partir de la colonia 2 para realizar la expresión de la proteína recombinante 6xHis-Δ1-970LbNADK. Paralelo al secuenciamiento del vector mediante el servicio de Corpogen.

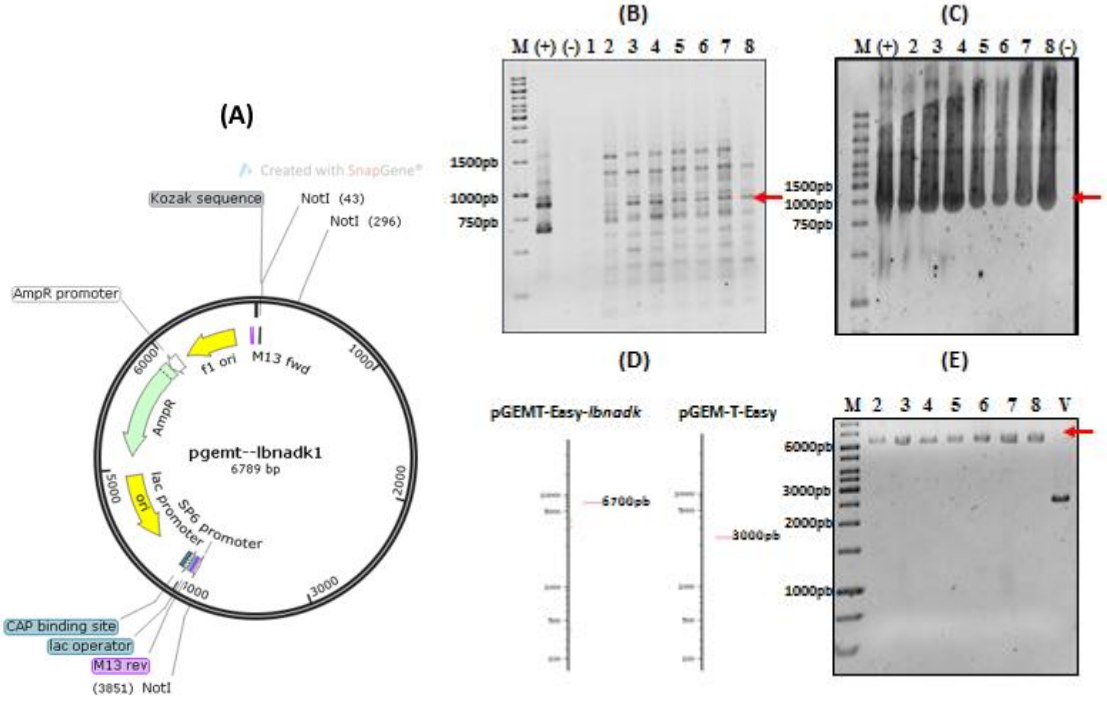
7.3.2.2. Construcción del vector recombinante pGEMT-Easy-*lbnadk*

Debido a la dificultad para amplificar de forma directa la secuencia *lbnadk* de 3774pb y con el ánimo de desarrollar una herramienta molecular que facilite el desarrollo de futuros trabajos con esta secuencia. Se decidió clonarla inicialmente en el vector de mantenimiento pGEM-T-Easy y a partir de este llevar a cabo la clonación en pET-100-D/TOPO.

El producto de PCR de 3774pb, se ligó en el vector comercial pGEM-T-Easy (sección 6.2.1.4); el cual permite hacer selección por color; mediante actividad b-galactosidasa, siendo las colonias blancas aquellas que contienen la secuencia de interés y las que presentan color azul aquellas que contienen el vector pGEM-T-Easy vacío. Con el producto de ligación se transformaron células *E. coli* TOP10, para obtener el constructo pGEMT-*lbnadk* (Figura 15A). Se obtuvieron 15 colonias, de las cuales 8 presentaron color blanco, estas colonias fueron evaluadas mediante PCR de colonia; donde 7 de las colonias evaluadas mostraron el amplificado del tamaño esperado de 861pb y algunas inespecificidades en la amplificación, debido posiblemente a la presencia de ADN genómico de *E. coli*[65] (Figura 15B).

A las colonias positivas para PCR se les realizo extracción de plásmido por lisis alcalina y fueron evaluados por PCR y digestión con enzimas de restricción. En este caso todos los plásmidos presentaron un amplificado de 861 pb (Figura 15C), igualmente, al realizar digestión con la enzima de restricción NotI se pudo observar todas presentaron el perfil de bandas esperado para el vector recombinante pGEMT-Easy-*lbnadk* (Figuras 15D-E). Se seleccionó uno de estos vectores para hacer la amplificación directa de la secuencia *lbnadk*, obteniéndose un amplificado del tamaño esperado de 3774pb (Anexo 6).

Figura 15. Construcción del vector recombinante pGEMT-Easy-*lbnadk*. **A**: Constructo pGEMT-Easy-*lbnadk*. **B:** Clonación del candidato *lbnadk* en el vector comercial pGEM-T-Easy, Rastreo de colonias *E. coli* TOP10 por PCR. **C:** Evaluación de plásmidos pGEMT-Easy-*lbnadk* por PCR. **D:** Predicción de sitios de corte con la enzima NotI para los plásmidos pGEM-T-Easy vacío y pGEMT-Easy-*lbnadk*, obtenido mediante el servidor Nebcutter 2.0. **E:** Evaluación de plásmidos pGEMT-Easy-*lbnadk* positivos para PCR por digestión con NotI. Para todos los geles: (M); Marcador de peso molecular 1kb de Fermentas. (+); Control positivo, ADN genómico de *L. braziliensis* como plantilla. (-); Control negativo H_2O DEPC como plantilla. (V); Vector vacío digerido. Geles de agarosa 1% en buffer TBE 0.5X, teñidos con bromuro de etidio. Las flechas rojas indican los fragmentos de ADN de interés.

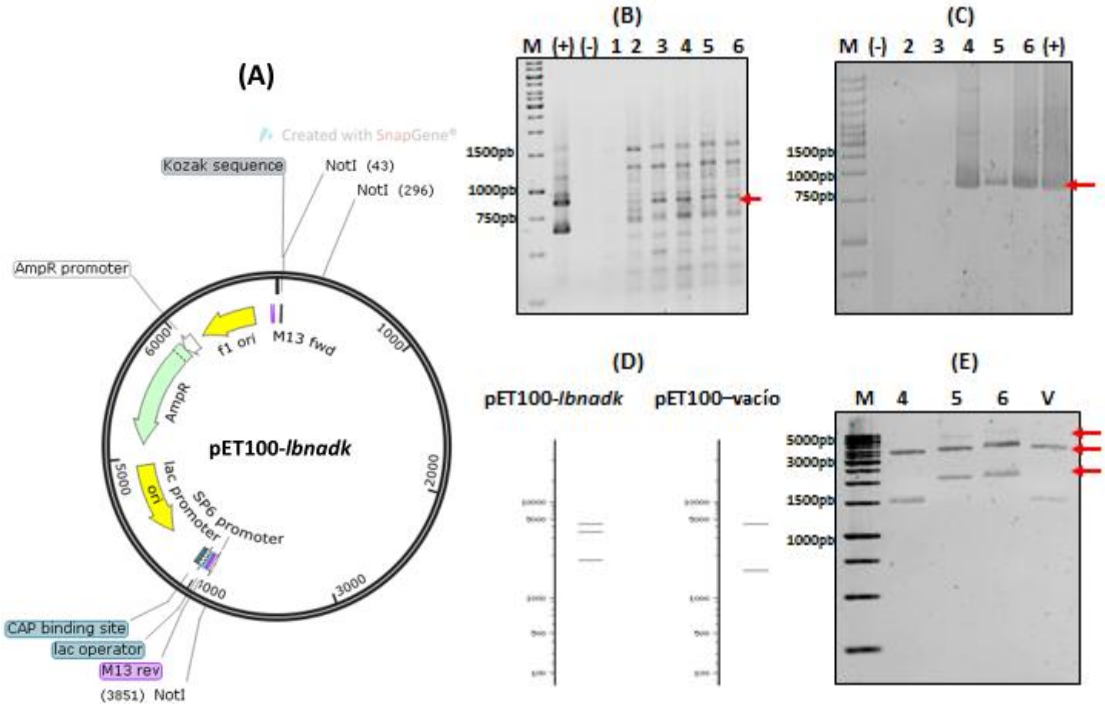


7.3.2.3. Construcción del vector de expresión pET100-*lbnadk*

El producto de PCR amplificado a partir del vector pGEMT-Easy-*lbnadks*, se ligó en el vector comercial pET-100/D-TOPO y con el producto de ligación se transformaron células *E. coli* TOP10, para obtener el constructo pET100-*lbnadk* (Figura 16A). Se obtuvieron 6 colonias, las cuales fueron evaluadas mediante PCR de colonia; obteniendo 5 con el amplificado del tamaño esperado de 861pb (Figura 16B).

A estas colonias se les realizo extracción de plásmido por lisis alcalina, los cuales fueron evaluados por PCR y digestión con enzimas de restricción. Los plásmidos evaluados mostraron un amplificado de 861 pb (Figura 16C) y al realizar digestión con EcoRV y BamHI se pudo observar que 2 de estos presentaron el perfil esperado para el plásmido recombinante pET100-*lbnadk* (Figuras 16D-E). Estos plásmidos fueron posteriormente empleados para la expresión de la 6xHis-LbNADK.

Figura 16. Construcción del vector recombinante pET100-LbNADK **A**: Constructo pET100-*lbnadk*. **B:** Clonación del candidato *lbnadk* en el vector pET-100-D-TOPO, Rastreo de colonias *E. coli* TOP10 por PCR. **C:** Evaluación de plásmidos pET100-*lbnadk* por PCR. **D:** Predicción de sitios de corte con la enzima EcoRV para los plásmidos pET100 vacío y pET100-*lbnadk;* obtenido mediante el servidor Nebcutter 2.0. **E:** Evaluación de plásmidos pET100-*lbnadk* positivos para PCR por digestión con EcoRV. Para todos los geles: (M); Marcador de peso molecular 1kb de Fermentas. (+); Control positivo, ADN genómico de *L. braziliensis* como plantilla. (-); Control negativo H_2O DEPC como plantilla. (V); Vector vacío digerido. Geles de agarosa 1% en buffer TBE 0.5X, teñidos con bromuro de etidio. Las indican los fragmentos de ADN de interés



7.3.3 Producción de las proteínas recombinantes 6xHis-Δ1-970LbNADK y 6xHis-LbNADK

El uso de proteínas recombinantes expresadas en sistemas heterólogos como *E. coli* ha sido ampliamente aplicado para el estudio de enzimas, debido a que permiten obtener altas cantidades de proteína con menor dificultad. En muchas casos estas proteínas se expresan adheridas a un tag o etiqueta de aminoácidos que buscan (i) detectar a lo largo del esquema de expresión y purificación, (ii) Lograr solubilidad, y (iii) purificarlo fácilmente del medio celular de *E. coli*[66]. En este sentido la etiqueta de histidinas, ha sido uno de los más utilizados en los estudios con proteínas recombinantes, debido a su alto efecto sobre la solubilidad[67] y bajo efecto en la estructura de la proteína de interés, por lo cual se utilizó dicha etiqueta para este trabajo.

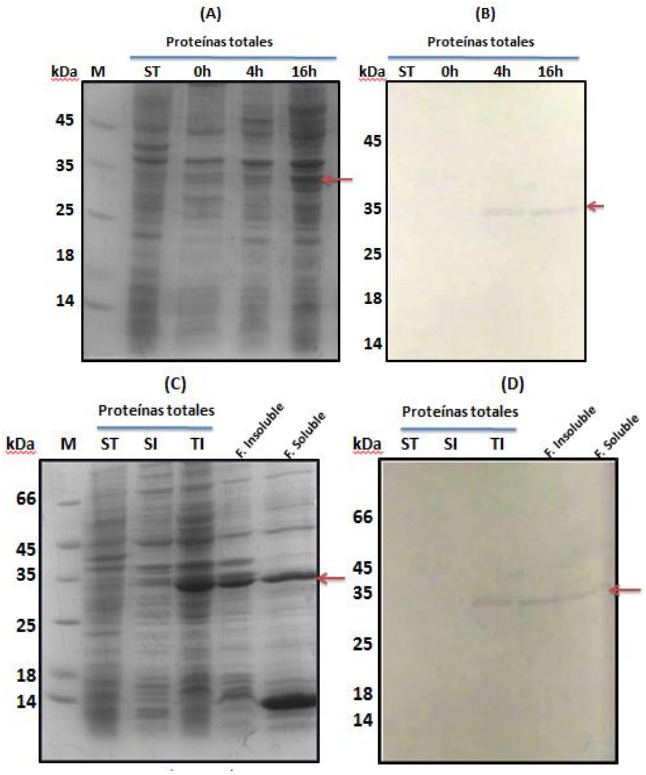
En términos generales el vector recombinante pET-100/D-TOPO otorga resistencia a ampicilina y una etiqueta de 6 histidinas en el extremo amino terminal de la proteína, la cual permite el monitoreo de la expresión y la purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad a Níquel. Con los vectores pET100-Δ1-970*lbnadk* y pET100-*lbnadk* previamente obtenidos, verificados y purificados, se transformó la cepa de expresión *E. coli* BL21 DE3 Star y se monitoreo mediante SDS-PAGE y western blot la expresión y purificación de las proteínas de interés, como se describió en la sección 6.2.2.1

7.3.3.1 Obtención de la proteína recombinante 6xHis- Δ1-970LbNADK

Inicialmente se observó la expresión de la 6xHis-Δ1-970LbNADK presente en proteínas totales de *E. coli* a diferentes horas de inducción con una concentración de inductor constante. En la figura 17A y B se observan los resultados obtenidos y se puede apreciar la expresión de una banda diferencial en un tamaño aproximado de 35kDa, correspondiente a la 6xHis-Δ1-970LbNADK (Tabla 12), dicha banda se observa después de 4 y 16 horas de inducción, comparado con los controles de proteínas totales de células sin transformar inducidas y células transformadas sin inducir. Lo anterior indica que: (i) la banda de aproximadamente 35kDa no corresponde a una proteína expresada de forma natural por la

cepa de *E. coli* empleada, (ii) que la misma no presenta autoinducción; es decir expresión en ausencia del agente inductor, (iii) que dicha banda corresponde a la proteína recombinante 6xHis-Δ1-970LbNADK y que se expresa mayoritariamente a las 16 horas de inducción.

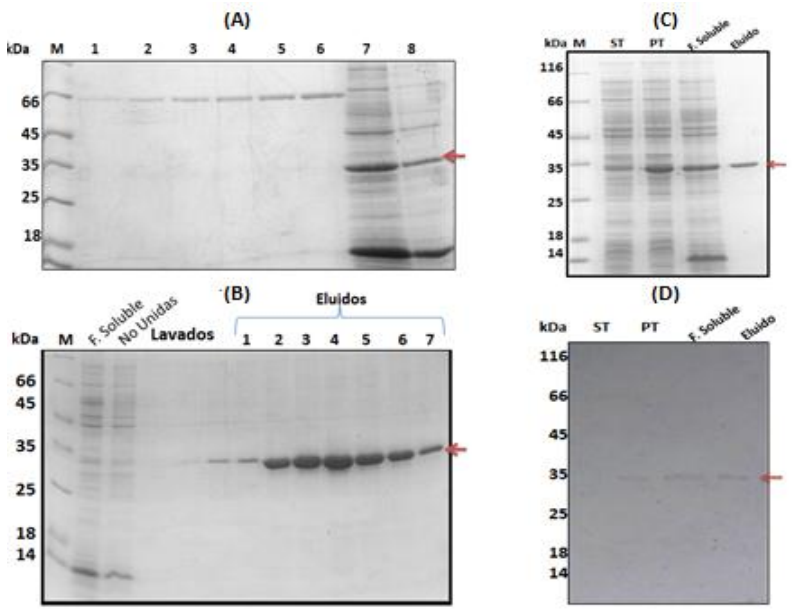
Figura 17. Evaluación de la expresión y solubilidad de la proteína 6xHis-Δ1-970LbNADK. **A y B:** Evaluación de la expresión de la proteína recombinante a diferentes tiempos de inducción. **C y D**: Evaluación de la solubilidad de la 6xHis-Δ1-970LbNADK. **A y C:** Son geles SDS-PAGE, T-10%, tinción azul de Coomassie. **B y D:** Son western blot en membrana de nitrocelulosa, anticuerpo primario anti-6xHis de ratón (1: 8000 TBS), sistema de revelado peroxidasa. Para todas: (M). Marcador de peso molecular (ST). Proteínas totales de células sin transformar. (SI). Proteínas totales de células sin inducir. (TI). Proteínas totales de células inducidas. La flecha indica la 6xHis-Δ1-970LbNADK y el asterisco indica la lisozima empleada en el proceso de fraccionamiento celular.



Posteriormente se evaluó la solubilidad de la proteína mediante el análisis de los extractos solubles (Sección 6.2.2.2), los resultados se monitorearon mediante SDS-PAGE y western blot, para ello se emplearon células transformadas con el vector recombinante e inducidas durante 16 horas. Los resultados se observan en las figuras 17C y D, en las cuales se puede

evidenciar la presencia de la proteína de interés en proteínas totales y en las fracciones soluble e insoluble de la lisis celular.

Figura 18. Purificación de la proteína recombinante 6xHis-Δ1-970LbNADK mediante cromatografía de afinidad a Níquel (Ni-NTA). **A:** Curva de calibración con BSA. **B:** Purificación de la 6xHis- Δ1-970LbNADK mediante cromatografía de afinidad a Níquel. **C y D:** Resumen de la purificación de la 6xHis-Δ1-970LbNADK **A, B y C:** SDS-PAGE, T-10%, tinción azul de Coomassie. **C:** Western blot en membrana de nitrocelulosa, anti-6xHis de ratón (1: 8000 TBS), sistema de revelado peroxidasa. **Para todas:** M. Marcador de peso molecular. ST. Proteínas totales de células sin transformar. SI. Proteínas totales de células sin inducir. TI. Proteínas totales de células inducidas. La flecha indica la 6xHis-1-970LbNADK



Estos resultados de solubilidad para la proteína recombinante son concordantes con los reportados por otros autores en proteínas similares, en las cuales se valuaron diferentes condiciones de expresión, tales como: temperatura, concentración de inductor y etiquetas. Encontrando que las condiciones óptimas de expresión son similares a las empleadas en este trabajo[68]. Es decir, 1 mM de agente inductor y una temperatura cercana o inferior a 25°C en la cepa *E. coli* BL21 DE3 Star.

Adicionalmente, la presencia de 6xHis-Δ1-970LbNADKa en la fracción insoluble es un fenómeno común en el uso de este tipo de vectores de expresión, los cuales presentan un promotor de expresión T7, garantizando no solo la presencia de la proteína en la fracción soluble, sino también su acumulación y agregación de la proteína en cuerpos de inclusión[69].

Una vez obtenida y verificada la expresión soluble de la proteína recombinante 6xHis- Δ1-970LbNADK, esta se utilizó para ensayos de purificación mediante cromatografía de afinidad a Níquel (Sección 6.2.2.3) con el propósito de obtenerla para determinar su identidad NADK mediante en de actividad enzimática y generar anticuerpos. La figura 18 muestra el proceso de purificación, inicialmente fue necesario llevar a cabo una curva de calibración con diferentes cantidades de BSA (Figura 18A) para establecer la cantidad de resina de afinidad a utilizar. Teniendo en cuenta que por cada 1mL de resina seca se pueden unir 5 mg de proteína recombinante se hicieron los cálculos necesarios para llevar a cabo un ensayo de purificación piloto.

Durante la purificación por afinidad a níquel (IMAC-Ni), la 6xHis-Δ1-970LbNADK se une a la resina de afinidad (Ni-NTA agarosa) por medio de la formación de un enlace coordinado entre el níquel y los residuos de histidina otorgados por el vector en la región amino terminal. De esta forma, aquellas proteínas del extracto que no presentan alta riqueza en histidinas eluyeron en la fracción proteica denominada proteínas no unidas. Posteriormente se realizaron lavados con concentraciones de imidazol de 10,30 y 75mM con el propósito de eliminar la mayor cantidad de proteínas contaminantes posible. La elusión final se realizó utilizado una concentración de 300mM de Imidazol, obteniendo la proteína recombinante en los eluidos de la cromatografía, (Figura 18B). El imidazol en este caso se emplea como un competidor por la formación de enlaces coordinados con el níquel divalente presente en la resina de afinidad.

A manera de resumen, la proteína 6xHis- Δ1-970LbNADK presente a nivel de extractos totales y solubles se obtuvo parcialmente purificada mediante cromatografía de afinidad a níquel. Estos resultados se confirmaron mediante western blot y se observó la presencia de la banda de aproximadamente 35kDa, correspondiente a la proteína de interés (Figura 18C y D). Los eluidos obtenidos de este proceso se juntaron en una sola alícuota con una concentración final de 1mg/ml de proteína, fueron a diálisis para eliminar el exceso de

imidazol, suplementados con glicerol 10% y almacenados a -20°C. Esta proteína purificada constituyo el material de partida en la generación de una herramienta inmunológica para el estudio de la LbNADK y para ensayos de actividad enzimática.

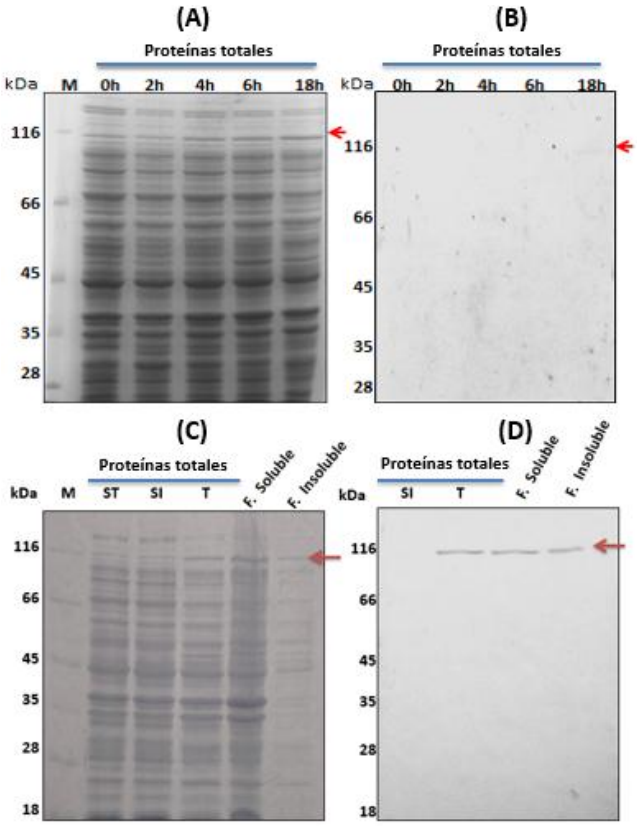
7.3.3.2. Obtención de la proteína recombinante 6xHis-LbNADK

Se monitoreo la expresión de la 6xHis-LbNADK a diferentes horas después de la inducción con IPTG en extractos proteicos totales de *E. coli* BL21 DE3 Star, se pudo observar su expresión cerca de los 116kDa, luego de un periodo de inducción de 16 horas, (Figura 19A y B). Aunque la proteína de interés se observa en un tamaño inferior al esperado de 135kDa (Tabla 12), esto puede deberse a cambios en la movilidad de la proteína en el SDS-PAGE, dependiendo de la cantidad de moléculas de SDS que se unen a esta[70,71]. De esta forma cuando la cantidad de SDS que se une a la proteína es diferente a la óptima ocurren variaciones complejas de predecir en el tamaño aparente de la proteína. Así mismo, dichos cambios están determinados por características estructurales de la proteína tales como: presencia de puentes disulfuro, secuencias ricas en aminoácidos cargados y algunas modificaciones postraduccionales[71,72].

Una vez comprobada la expresión de la proteína de interés en extractos proteicos totales, se procedió a verificar su presencia en extractos solubles. Los resultados obtenidos indicaron que la 6xHis-LbNADK se expresa tanto en fracciones solubles como insolubles (Figura 19C y D).

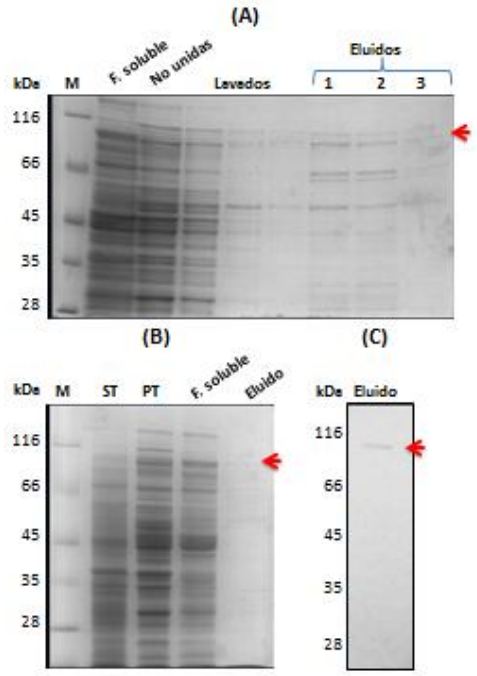
A partir de las fracciones proteicas solubles se realizó la purificación de la proteína 6xHis-LbNADK mediante cromatografía de afinidad a níquel, aprovechando la etiqueta de 6 histidinas otorgada por el vector pET-100-D/TOPO. Como resultado, se obtuvo la proteína parcialmente purificada mediante la elución con 300mM de imidazol con una concentración final de 0.1mg/ml de 6xHis-LbNADK (Figura 20A). La presencia de la 6xHis-LbNADK fue verificada mediante western blot (Figura 20B y C), indicando la proteína se encuentra en los eluidos de la cromatografía.

Figura 19. Evaluación de la expresión y solubilidad de la 6xHis-LbNADK **A y B:** Evaluación de la expresión de la proteína recombinante a diferentes tiempos de inducción. **C y D**: Evaluación de la expresión de la proteína recombinante en la fracción soluble e insoluble. **A y C**: SDS-PAGE, T-10%, tinción azul de Coomassie. **B y D:** Western blot en membrana de nitrocelulosa, anti-6xHis de ratón (1: 8000 TBS), sistema de revelado peroxidasa. Para todas: M. Marcador de peso molecular. ST. Proteínas totales de células sin transformar. SI. Proteínas totales de células sin inducir. TI. Proteínas totales de células inducidas. La flecha indica la 6xHis-LbNADK.



Adicionalmente, en comparación con la 6xHis-Δ1-970LbNADK, se pudo observar que la recombinante completa se obtiene en menor cantidad y con mayor contaminación. Este es un problema común al purificar proteínas recombinantes con etiquetas de afinidad, ya que, en algunas ocasiones debido al plegamiento de la proteína la etiqueta no se encuentra expuesta de manera total o parcial al medio, impidiendo la formación de los enlaces coordinados con el níquel de forma eficiente. En este caso, la presencia de la región N-terminal de la LbNADK posiblemente haya reducido la exposición de la etiqueta de histidinas en el amino terminal.

Figura 20. Purificación de la 6xHis-LbNADKl. **A:** Purificación de la 6xHis-LbNADK mediante cromatografía de afinidad a Níquel. **B y C:** Resumen de la purificación de la 6xHis-LbNADK **A y B:** SDS-PAGE, T-10%, tinción azul de Coomassie. **C:** Es western blot en membrana de nitrocelulosa, anti-6xHis de ratón (1: 8000 TBS), sistema de revelado peroxidasa. **Para todas:** M. Marcador de peso molecular. ST. Proteínas totales de células sin transformar. SI. Proteínas totales de células sin inducir. TI. Proteínas totales de células inducidas



En resumen, se obtuvo la proteína 6xHis-LbNADK parcialmente purificada, cuantificada y dializada, resultados corroborados mediante western blot (Figura 20B y C), esta se almaceno como se describió previamente para la mutante 6xHisC1-970LbNADK antes de realizar la evaluación funcional de la misma mediante ensayos de actividad enzimáticos.

7.3.4 Evaluación funcional de las proteínas 6xHis-Δ1-970LbNADK y 6xHis-LbNADK.

Posterior a la obtención de las 6xHis-LbNADK y 6xHis-Δ1-970LbNADK se realizaron ensayos de actividad enzimática, para determinar la actividad NADK de las proteínas recombinantes, luego se realizó la caracterización enzimática (determinación de pH optimo, uso de cofactores, K_m y K_{cat}). Adicionalmente se evaluó la activación por calmodulina/calcio (CaM/Ca^{+2}) para las dos proteínas. Para todos los ensayos de actividad enzimática de este trabajo se utilizó como control positivo la enzima NADK humana 1

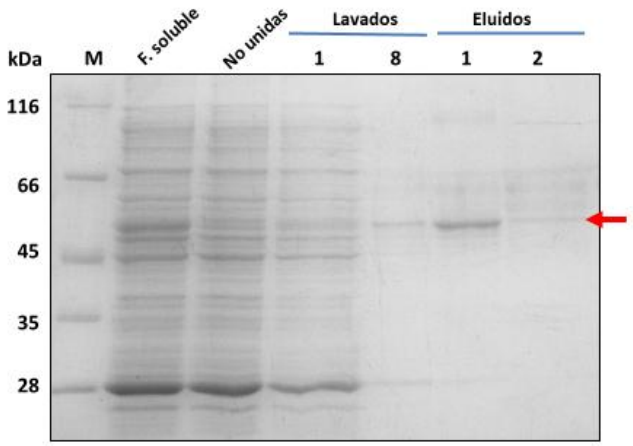
(6xHis-HsNADK1), expresada desde el vector pQE30-*hsnadk* donado por el Dr. Matthias Ziegler de la Universidad de Berger, Noruega.

Los ensayos de actividad enzimática se realizaron mediante 2 métodos (Indirectos y directos). En el primero de ellos se determinó la capacidad de la proteína de interés de fosforilar el NAD^+ en una reacción acoplada a la actividad de la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH), la cual toma el $NADP^+$ y lo reduce a NADPH en presencia de glucosa-6- Fosfato (G6P). El NADPH presenta un pico de máxima absorción de luz a una longitud de onda de 340nm, el cual puede ser medido espectrofotométricamente. Mientras que, en los ensayos directos, los nucleótidos producto de la reacción de la NADK fueron analizados mediante RP-HPLC a 254nm (6.3.4.1). Para los dos métodos se empleó 1µg de proteína recombinante.

7.3.4.1 Obtención de la proteína control 6xHis-HsNADK1

La recombinante 6xHis-HsNADK1 expresada desde el vector pQE30-*hsnadk1*, se encontró principalmente en la fracción soluble y se procedió a purificarla mediante IMAC-Ni (Sección 6.2.2.5), los resultados se muestran en la figura 21.

Figura 21. Expresión y purificación del control positivo 6xHis-HsNADK1. (M): Marcador de peso molecular. SDS-PAGE 10%, tinción azul de Coomassie. La flecha indica la proteína de interés.



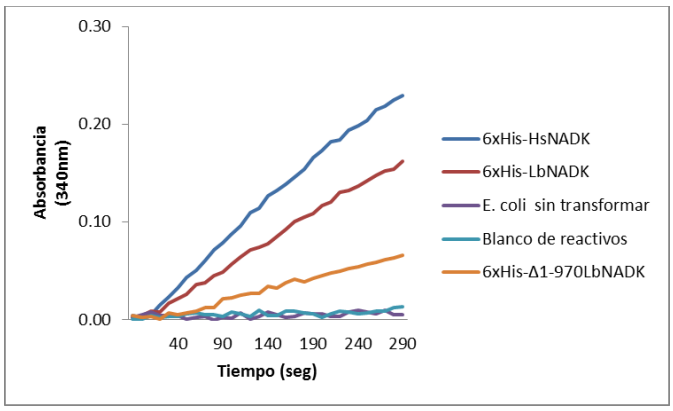
La proteína se obtuvo parcialmente purificada en los eluidos con un tamaño aproximado de 59kDa y una concentración final de 0,6mg/ml en un volumen de 0.6ml (Figura 21). Esta

proteína fue suplementada con glicerol, almacenada a -20°C y empleada como control positivo de los ensayos de actividad enzimática.

7.3.4.2 Determinación de la actividad enzimática de 6xHis-LbNADK y 6xHis-Δ1-970LbNADK

Las dos proteínas recombinantes analizadas, la NADK completa LbNADK y el dominio catalítico C-terminal (Δ1-970LbNADK) mostraron actividad enzimática, al igual que el control positivo 6xHis-HsNADK1 por los dos métodos empleados. En el caso de los ensayos de actividad acoplados se observó aumento a lo largo del tiempo de la absorbancia a 340nm, indicando la presencia de NADPH en la mezcla de reacción y por ende actividad enzimática NADK (Figura 22).

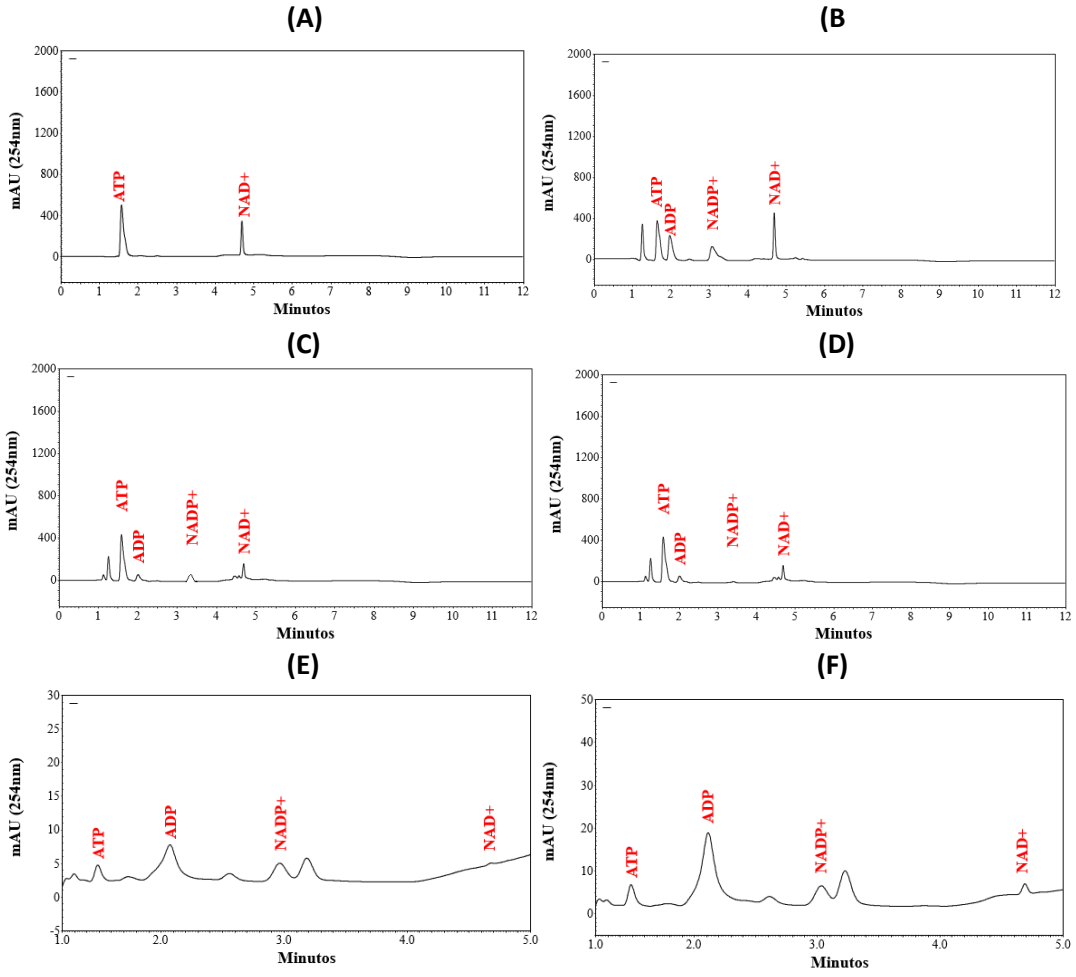
Figura 22. Ensayos de actividad enzimáticos de la NADK acoplados a G6PDH. Para 6xHis-HsNADK1, LbNADK se empleó un 1ug de proteína purificada. El blanco de reactivos corresponde a la mezcla de reacción sin proteínas. *E. coli* sin transformar corresponde a 1ug de extractos proteicos solubles de *E. coli* BL21 DE3 Star.



En los ensayos enzimáticos directos se observó la aparición de los productos de la reacción $ATP+NAD^{+} \rightarrow ADP + NADP^{+}$, para ello se determinaron inicialmente los tiempos de retención de cada nucleótido (Anexo 7) y posteriormente se observó la aparición de los productos de la reacción para las recombinantes de interés en comparación con los diferentes controles (Figura 23A-D). Adicionalmente, mediante este método fue posible determinar que tanto la proteína completa como el dominio catalítico NADK son capaces de catalizar la reacción reversa (Figura 23E y F).

Para los dos métodos empleados, se observó que las proteínas evaluadas presentan actividad enzimática diferencial, lo cual indica que la región N-terminal de la LbNADK no es esencial para la actividad catalítica, pero su remoción genera un efecto sobre la misma.

Figura 23. Ensayos de actividad enzimática directos de las 6xHis-LbNADK y 6xHis-Δ1-970LbNADK por RP-HPLC. **A:** Control negativo proteínas de *E. coli* BL21 DE3 Star sin transformar. **B:** Control positivo 6xHis-HsNADK. **C:** Reacción directa 6xHis-Δ1-970LbNADK. **D:** Reacción directa 6xHis-LbNADK. **E:** Reacción reversa 6xHis-Δ1-970LbNADK. **F:** Reacción reversa LbNADK.



Luego de determinar la actividad NADK de las proteínas de interés, se calculó el rendimiento de las purificaciones de cada una de las enzimas empleadas en este trabajo (Tabla 15). Donde, se obtuvieron las 3 proteínas con porcentajes de rendimiento entre el 30 y 50%, siendo la 6xHis-HsNADK1 la que se obtuvo con una mayor eficiencia.

Tabla 14. Evaluación de la purificación de las proteínas empleadas en este trabajo.

Proteína	Fracción	Volumen (ml)	Concentración Proteína (mg/ml)	Proteína total (mg)	Actividad Total (U)	Actividad especifica (U/mg)	Rendimiento (%)	Enriquecimiento
6xHis-HsNADK	Lisado	1	2.5	2.5	24.1	9.65	100	1
	Eluido IMAC-Ni	0.7	0.3	0.21	9	42.9	37.34	4.44
6xHis -Δ1-970LbNADK	Lisado	1	4.2	4.2	402	95.71	100	1
	Eluido IMAC-Ni	0.7	0.8	0.56	199	355.3	49.5	3.98
6xHis-LbNADK	Lisado	1	2.09	2.09	52	24.88	100	1
	Eluido IMAC-Ni	0.5	0.1	0.05	15.55	311	29.9	12.5

Al comparar los resultados obtenidos en este trabajo con la obtención de otras NADKs se pudo observar que, en cuanto a la proteína 6xHis-HsNADK1 el enriquecimiento y rendimiento de la actividad fue muy similar al obtenido por Lerner y colaboradores[17]. En cuanto a las proteínas 6xHis-LbNADK y 6xHis-Δ1-970lbNADK los resultados de rendimiento de la actividad enzimática fueron menores comparados con otras NADKs como las de *H. sapiens*[17], *A. thaliana*[30] y *E. histolytica*[32] entre otras. Lo anterior, se debe posiblemente a que las enzimas de *Leishmania* son altamente lábiles con tendencia a la perdida de la actividad enzimática, este comportamiento parece ser común en otras proteínas de esta familia, en particular la NADK2 de *A. thaliana*, que presenta un alto peso molecular al igual que la LbNADK, pierde gran parte de su actividad de enzimática en poco tiempo[30,31], sugiriendo que este factor podría contribuir a la inestabilidad de la proteína.

Hasta este punto se ha determinado experimentalmente la identidad de la LbNADK, convirtiéndose en la primer NADK identificada hasta ahora en un parasito intracelular. Igualmente, se confirmó que la eliminación de la región N-terminal de la proteína no suprime la actividad NADK, lo cual indica posiblemente una función reguladora. Con lo anterior se reconstruye la ruta de biosíntesis del $NADP^+$ en *Leishmania*, permitiendo proponer a la LbNADK como fuente de dicho nucleótido para rutas de vital importancia en el parasito tales como: la vía de pentosas fosfato[39] y como sustrato de la triparredoxina peroxidasa, la cual emplea NADPH como sustrato para reducir el tripanotion[41].

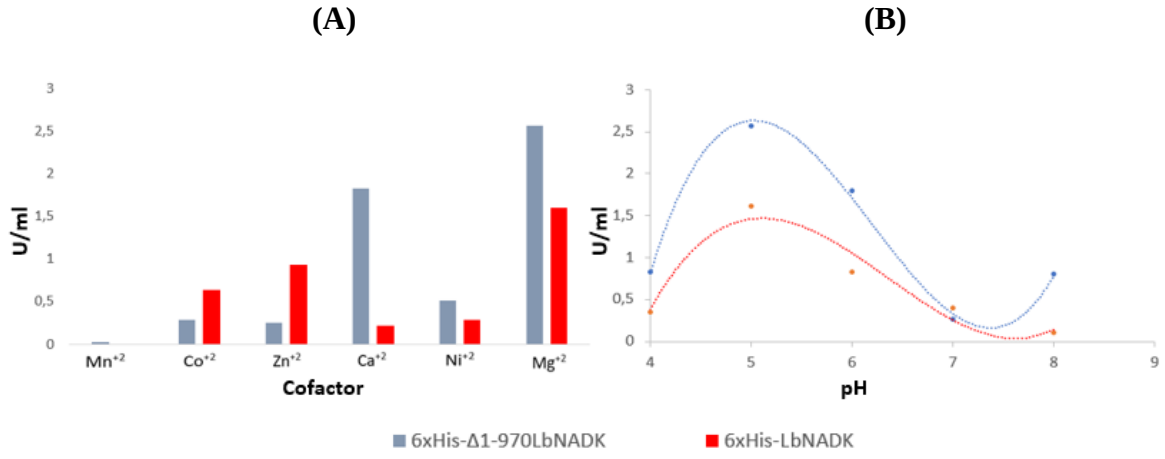
Teniendo en cuenta esto, estudiar la biosíntesis del $NADP^+$ como sustrato y cofactor de vital importancia en los diferentes estadios del parasito, constituye un campo interesante para la investigación y desarrollo de nuevas estrategias de control del parasito.

7.3.4.3 Caracterización enzimática de las 6xHis-LbNADK y 6xHis-Δ1-970LbNADK

La caracterización enzimática de las proteínas incluyó la determinación del pH óptimo de trabajo, uso de cofactores y determinación de constantes cinéticas. Inicialmente se evaluó mediante ensayos acoplados (6.2.3.1) la capacidad de las recombinantes de emplear diferentes iones divalentes como cofactor enzimático como se ha observado en otras NADKs, empleando una concentración 10mM[16,17] de cada uno de ellos. Para las dos proteínas, el ion con el cual se obtuvo la mayor actividad enzimática fue el Mg^{+2}, mientras que la tendencia en cuanto a los otros iones fue variable entre las dos proteínas (Figura 24A).

Algunos aspectos a destacar son que: luego del Mg^{+2} la proteína completa presenta preferencia por los iones Zn^{+2} y Co^{+2}, los cuales presentan radios iónicos muy similares al Mg^{+2}.Mientras que para la 6xHis-1-970LbNADK, se observó mayor preferencia para Mg^{+2}, Ca^{+2} y Ni^{+2} respectivamente, indicando que la remoción del extremo amino terminal tuvo un efecto sobre la preferencia por cofactores de la enzima, lo cual fortalece la hipótesis de que esta región de la proteína actúa como reguladora de la actividad enzimática[12,59].

Figura 24. Condiciones óptimas de actividad enzimática de las 6xHis-LbNADK y 6xHis-Δ1-970LbNADK. **A:** Cofactores enzimáticos**. B:** pH. Cada ion evaluado estaba a 10mM.



En las NADKs, la posición del ion divalente al igual que en las esfingosina quinasas no está resuelta del todo, pero se ha propuesto que este no se encuentra directamente dentro del sitio activo de la proteína, donde quela los grupos fosfato del NAD^+ y el ATP permitiendo la activación del donador de fosfatos, asistiendo el inicio de la reacción enzimática. Lo cual explica su capacidad de emplear diferentes iones divalentes como cofactor con diferentes preferencias, al igual que las NADKs de *E. histolytia* y *H. sapiens*, entre otras.

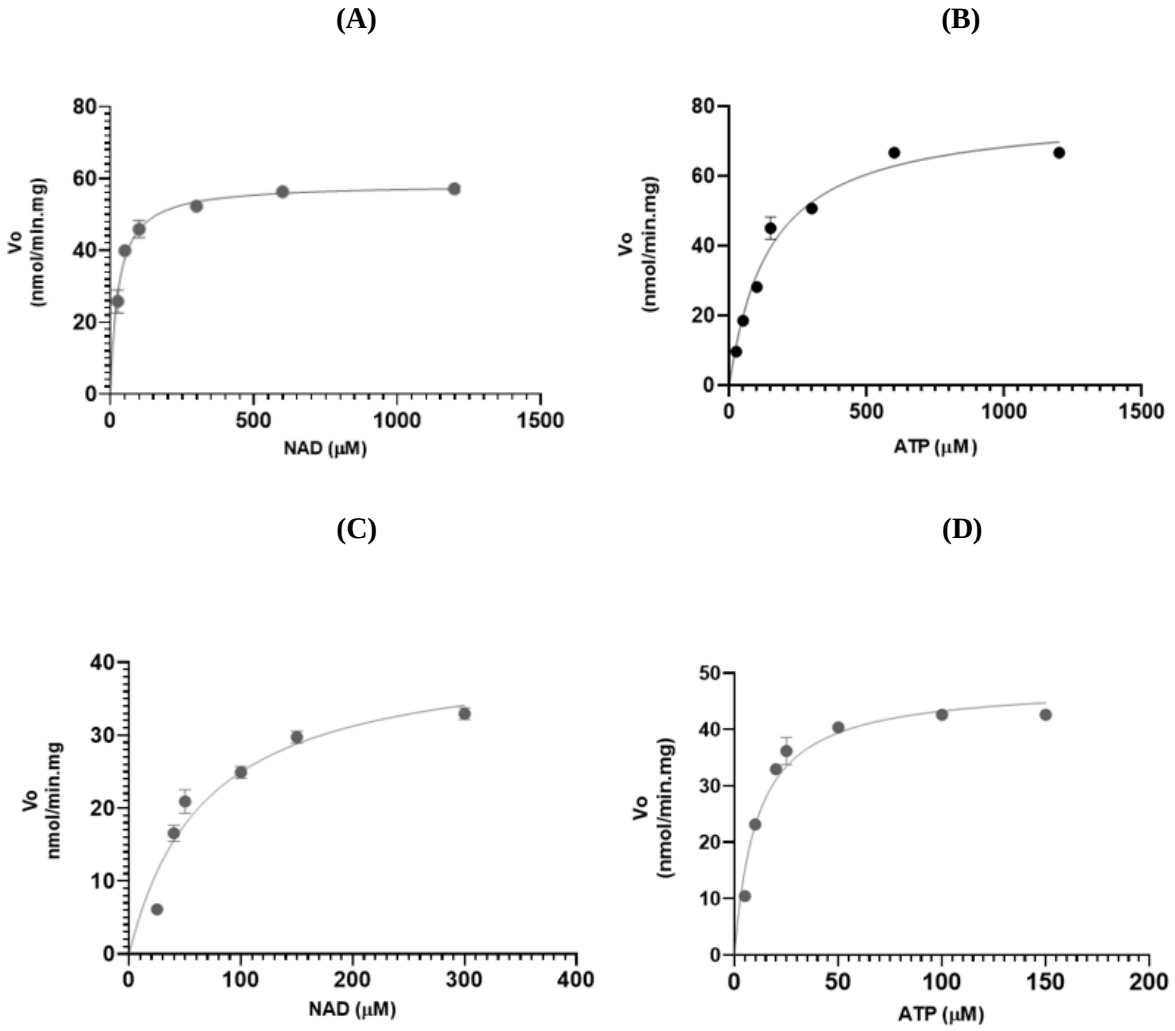
Al evaluar los valores de pH óptimo de reacción para las dos proteínas, la condición a la cual las enzimas mostraron mayor actividad específica fue a pH 5 (Figura 24B). Lo anterior indica que, incluso después de remover la región N-terminal de la LbNADK su comportamiento permanece constante frente a condiciones de pH.

Los valores de pH óptimos encontrados no coincidieron con el pH fisiológico de *Leishmania* que se mantiene entre 6.7 y 6.9[73]. Esto sugiere que a nivel fisiológico la LbNADK no se encuentra a su máxima capacidad catalítica y que el pH actúa como un regulador de la actividad NADK a nivel celular. Este comportamiento, difiere con el encontrado para NADKs identificadas en otros organismos, los cuales oscilan entre 7.5 y 9 (Tabla 2) al igual que para enzimas relacionadas con el NADP(H) como la tripanotion reductasa, cuyo pH optimo se encuentra a pH 7.0. Sin embargo, otras enzimas relacionadas con el control de especies reactivas de oxígeno en *Leishmania*, como la 2-Cys peroxirredoxina 1 (Prx1), cuya actividad catalítica se ve aumentada por cambios conformacionales provocados por acidificación del medio[74], presenta un pH óptimo de 4, similar a la LbNADK.

Este comportamiento ha sido asociado a que los cambios intracelulares de pH modulan los mecanismos de control de especies reactivas de oxígeno[75], lo cual a su vez resalta la importancia del mantenimiento del balance redox en estos parásitos y su asociación con el NADP(H).

Continuando con la caracterización de las 6xHis-LbNADK y 6xHis-Δ1-970LbNADK se procedió a determinar las constantes cinéticas para las dos proteínas. Se realizaron las curvas de saturación para cada uno de los sustratos de la reacción, usando concentraciones saturantes de 1mM para todos los casos (Figura 25)

Figura 25. Cinética la actividad enzimática de las 6xHis-LbNADK y 6xHis-Δ1-970LbNADK. **A y B:** Curvas de saturación de ATP y NAD^+ para la 6xHis-LbNADK. **C y D:** Curvas de saturación de ATP y NAD^+ para la 6xHis-Δ1-970LbNADK respectivamente. Graficas construidas mediante software PRISM 8.0.1.



Posteriormente se realizó el cálculo de constantes cinéticas empleando el software PRISM 8.0.1 (Tabla 14). Para el ATP se obtuvieron K_m de 147µM para la 6xHis-LbNADK, mientras que para la 6xHis-Δ1-970LbNADK fue de 10.87µM, lo cual representa una disminución de aproximadamente 10 veces. En cuanto al NAD^+ los valores de K_m fueron de 27.8 y 67.48 µM para las 6xHis-LbNADK y 6xHis-Δ1-970LbNADK respectivamente, mostrando que la remoción de la región N-terminal exclusiva de esta proteína genera cambios importantes en la afinidad por los sustratos de la LbNADK.

Considerando que la concentración de ATP intracelular es superior a la de NAD^+, tener una mayor afinidad por el NAD^+ que por el ATP resultaría razonable y ayudaría a garantizar la producción constante de $NADP^+$ para el parasito.

Al comparar los K_m de la LbNADK completa y del dominio NADK con las NADKs de la tabla 2, en ambos casos estos valores son más bajos que los observados para otras NADKs, incluso al realizar la comparación con la NADK de *E. histoltica*[32]. Por otro lado, cuando se contrastan los K_m de la LbNADK con los de la NADK de su hospedero[17], para los dos nucleótidos los valores presentados por la LbNADK son al menos 10 veces menores, lo cual parece ser una tendencia compartida con otras enzimas del metabolismo del NAD(H) en *Leishmania*, como la NMNAT[42].

Tabla 15. Parámetros cinéticos de las proteínas empleadas este trabajo.

Proteína	**Sustrato**	**V_{max}**	**K_m**	**K_{cat}**
		nmol/min.mg	**(µM)**	**min^{-1}**
6xHis-LbNADK	**ATP**	78.31	147.6	0.15662
	NAD^+	58.41	27.8	0.11682
6xHis-Δ1-970LbNADK	**ATP**	47.95	10.87	0.0959
	NAD^+	41.77	67.48	0.08354

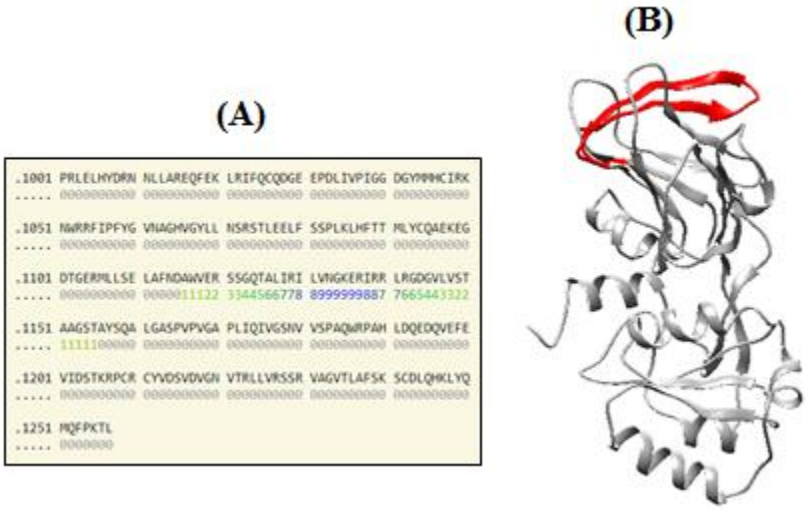
Los K_m de las 6xHis-LbNADK, 6xHis-Δ1-970LbNADK y la NADK humana para ATP y NAD^+, podrían ser en un contexto celular ventajosos para el parasito suponiendo competencia por los sustratos de la reacción y baja disponibilidad de los mismos, considerando que los Km de la HsNADK1 son de 0.9 para el ATP y 0.22 para el NAD^+. En conjunto, las diferencias estructurales y enzimáticas entre la LbNADK y la HsNADK1 pueden ser aprovechadas como punto de partida para el desarrollo y/o evaluación de inhibidores más selectivos por la enzima del parasito.

Además, en la actualidad existen algunos medicamentos basados en la estructura del NAD(P), empleados en tratamientos contra enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide[76], los cuales han sido reportados como posibles inhibidores de las NADKs y que podrían llegar a ser usados como punto de referencia.

7.3.4.1 . Evaluación de la activación por CaM/Ca^{+2} de las 6xHis-LbNADK y 6xHis-Δ1-970LbNADK

La calmodulina (CaM) es una proteína de aproximadamente 148aa muy conservada y un modulador de procesos dependientes de Ca^{+2} en células eucariotas. La CaM presenta sitios de unión a Ca^{+2}, que una vez son ocupados por este ion (CaM/Ca^{+2}) inducen cambios conformacionales, que le permiten interactuar con otras proteínas modulando su actividad[77]. Muchas de las proteínas que interactúan con CaM/Ca^{+2}, se encuentran relacionadas con procesos de fosforilación o defosforilación bien sea de moléculas pequeñas u otras proteínas, tales como la quinasa dependiente de CaM II (CaMKII)[78].

Figura 26. Predicción y análisis bioinformático de la activación por CaM/Ca^{+2} para la LbNADK. **A:** Predicción de sitios de unión a CaM/Ca^{+2} en la LbNADK mediante el servidor de la base datos de blancos de calmodulina. **B:** Localización del posible sitio de unión a CaM/Ca^{+2} en la estructura de la LbNADK.



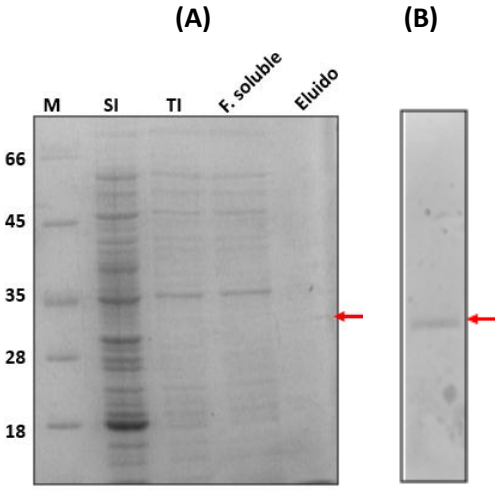
Este tipo de interacciones han sido previamente identificadas en NADKs de animales[59] y plantas[30,78]. En el caso de animales la activación de la NADK de *S. purpuratus* vía interacción con CaM/Ca^{+2} se encuentra ligada al desarrollo embrionario del organismo. Mientras que, en plantas, donde se han identificado más NADKs activadas por CaM/Ca^{+2}, se han encontrado casos como la NADK de *P. sativum* cuya actividad enzimática es estrictamente dependiente de CaM/Ca^{+2} [79]. Dado que, las NADKs son la única vía de biosíntesis conocida para el NADP(H) y que estas actúan como punto de regulación de la

relación NAD(H)/NADP(H), mantener un control sobre su actividad catalítica es crucial para los organismos.

Así mismo, en *Leishmania* y otros Tripanosomatidos se ha visto la importancia de la señalización por Ca^{+2} durante el proceso invasión celular[80], dentro del cual la CaM/Ca^{+2} está implicada en procesos motilidad flagelar, estimulación de la Ca^{+2}-ATPasa de membrana plasmática (responsable de mantener las concentraciones citoplasmáticas de Ca^{+2})[81] y la translocación de la Triparredoxina peroxidasa mitocondrial desde el citosol hacia el interior de la mitocondria[82].

Con el objetivo de evaluar si la LbNADK presenta activación por CaM/Ca^{+2} al igual que algunas de sus homologas en otros organismos y otras proteínas de *Leishmania*, se predijeron posibles sitios de interacción con esta proteína mediante el servidor disponible en la base de datos de blancos de Calmodulina (*calmodulin target database*). Se encontró un posible sitio, el cual se localiza entre los 1115 y 1150aa de la LbNADK (Figura 26A) en una región constituida por dos laminas beta dentro del dominio NADK de la proteína (Figura 26B), es decir que se encuentra presente en la 6xHis-LbNADK y 6xHis-Δ1-970LbNADK

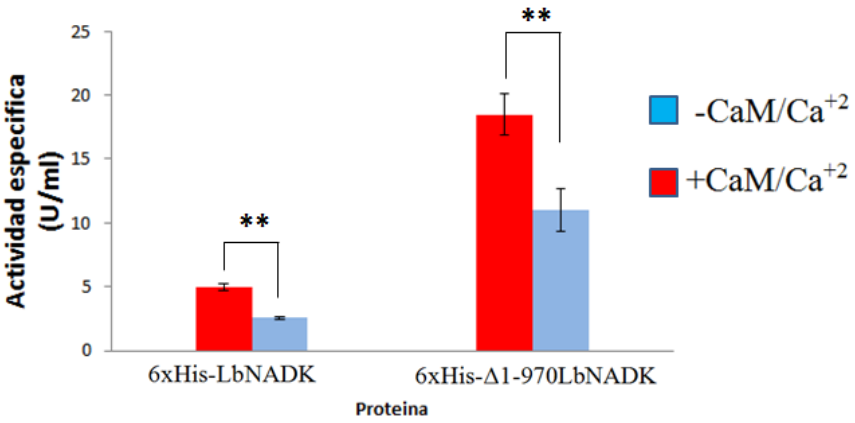
Figura 27. Obtención de la recombinante Biotina-GiCaM. **A:** Resumen de la purificación de la Biotina-GiCaM mediante cromatografía de afinidad a avidina. **B:** Confirmación de la identidad de la Biotina-GiCaM mediante pseudo-western blot, membrana de nitrocelulosa, revelado con fosfatasa alcalina. (M); Marcador de peso molecular. (SI); Proteínas totales sin inducir de *E. coli* Bl21DE3. (TI); Proteínas totales inducidas. SDS-PAGE 10%, tinción azul de Coomassie.



Para probar si la LbNADK es activada mediante esta vía, fue necesario expresar y purificar, la CaM de *Giardia intestinalis* (GiCaM), la cual fue expresada desde el vector Pinpoint-Biotina-GiCaM donado por la Dr. Magda Alvarado de la Universidad Nacional de Colombia. Este vector acopla a la proteína de interés una Biotina-ligasa, permitiendo su purificación mediante cromatografía de afinidad a avidina (Figura 27A y B).

Una vez obtenida la Biotina-GiCaM, se llevaron a cabo ensayos de actividad enzimáticos en ausencia y en presencia del posible activador. Se observó que, al suplementar las 6xHis-LbNADK y 6xHis-Δ1-970LbNADK con CaM/Ca^{+2} en una relación molar 1:1 NADK: activador, hubo un aumento significativo de la actividad enzimática especifica (Figura 28), permitiendo concluir que la LbNADK es una proteína activada por CaM/Ca^{+2}.

Figura 28. Evaluación experimental de la activación por CaM/Ca^{+2} para las 6xHis-LbNADK y 6xHis-Δ1-970LbNADK. Los asteriscos representan el nivel de significancia estadística con un valor $p < 0.05$.



Lo anterior permite inferir que, la LbNADK podría ser activada vía CaM/Ca^{+2} durante eventos de invasión celular, en los cuales se libera Ca^{+2} desde los diferentes compartimentos celulares. En tal caso, el aumento en la biosíntesis de NADP(H) brindaría al parásito herramientas para la defensa frente a los radicales libres de oxigeno (característicos de la respuesta de la célula hospedera) al mismo tiempo que promovería la biosíntesis reductiva y la proliferación celular, procesos que en conjunto son cruciales durante el estadio intracelular de *Leishmania.*

7.3.5 Obtención y caracterización de anticuerpos dirigidos contra la proteína 6xHis Δ1-970LbNADK.

Los anticuerpos policlonales son una herramienta de amplio uso en estudios bioquímicos y biomédicos[83]. Existen diversos modelos animales para la obtención de anticuerpos tales como: aves, ratones, conejos, entre otros. En particular las inmunoglobulinas Y (IgY) homologas de las inmunoglobulinas G (IgG) de mamíferos[55], han sido ampliamente usados en la actualidad como una alternativa al uso de las IgG[57]. Algunos ejemplos de su uso en investigaciones son: detección de venenos de cobra[84], diagnóstico médico[85], entre otras.

Las IgYs tienen características distintivas en comparación con las IgG, entre las cuales se destacan algunas ventajas, como por ejemplo: Los IgYs mantienen el titulo más estable a lo largo del ciclo de inmunización[86], mayor especificidad[87], disminución del ruido de fondo en estudios histoquímicas[88], no se unen a proteína G ni a proteína A como las IgG[89], entre otras. Adicionalmente, la producción de inmunoglobulinas en gallinas es constante y se da en altas cantidades, las cuales son transmitidas desde el sistema circulatorio hacia el ovocito en desarrollo junto con pequeñas cantidades de IgA e IgM[90].

Las cantidades de IgYs que son transferidas a la yema de huevo pueden ser variables y dependen de factores como: la edad de la gallina y el tamaño de huevo. Se producen entre 70 y 100 mg de IgY de acuerdo al tamaño del huevo[91], siendo una fuente abundante de anticuerpos policlonales que pueden ser aislados a partir de huevos obtenidos de gallinas inmunizadas, con diferentes rendimientos de acuerdo al método de purificación. Dado el interés de obtener estas proteínas en concentraciones elevadas y con un alto grado de pureza se han desarrollado diversos métodos para su purificación[92], cuyo objetivo principal es la eliminación de lípidos y lipoproteínas las cuales se encuentran en grandes cantidades en la yema de huevo. Dentro de los métodos utilizados para la purificación de este grupo de proteínas uno de los más promisorios es el método de precipitación con Poli etilen glicol 6000 (PEG-6000)[93].

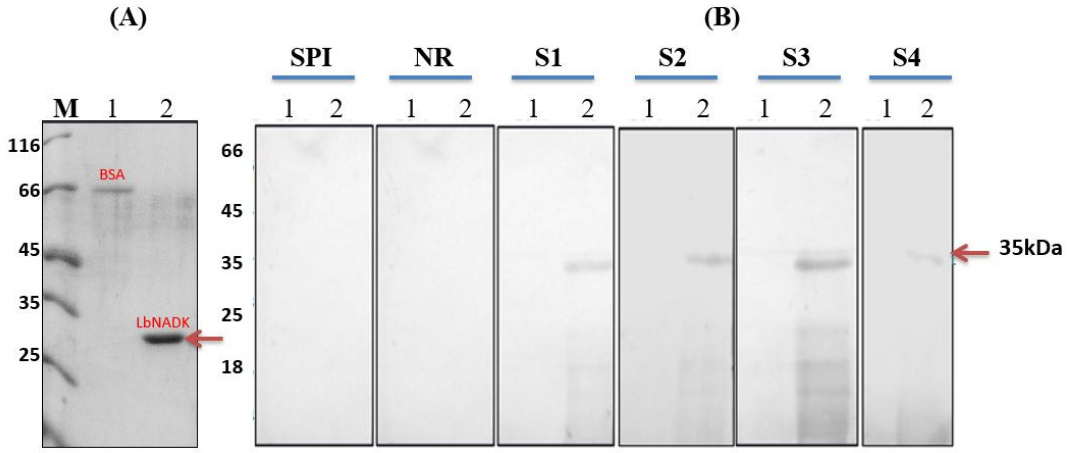
Con el ánimo de generar una herramienta inmunológica para el estudio de la LbNADK en el parasito. Se realizó la producción de anticuerpos policlonales (IgYs) mediante la inmunización de un modelo aviar como se describe en el numeral 6.2.4.1. De este esquema de inmunización se obtuvieron 4 sueros inmunes y 40 huevos, a partir de los cuales se purificaron los IgYs α6xHis-Δ1-970LbNADK mediante 3 aproximaciones (i) A partir de

sueros inmunes (ii) mediante afinidad a antígeno (iii) precipitación con polietilenglicol 6000

7.3.5.1 . Evaluación de sueros inmunes α6xHis-Δ1-970-LbNADK

Los sueros inmunes obtenidos del proceso de inmunización fueron evaluados mediante western blot, a continuación en la figura 29 se muestran los resultados de dicha caracterización. Inicialmente se evaluó la capacidad de cada una de las sangrías de reconocer 100 ng de proteína recombinante purificada (Figura 29A y B) y se encontró que los sueros obtenidos de a partir del día 15 después de la primera inmunización presentaron reconocimiento de la proteína de interés, comparado con el suero pre-inmune y el suero no relacionado (obtenido del individuo inmunizado con buffer PBS).

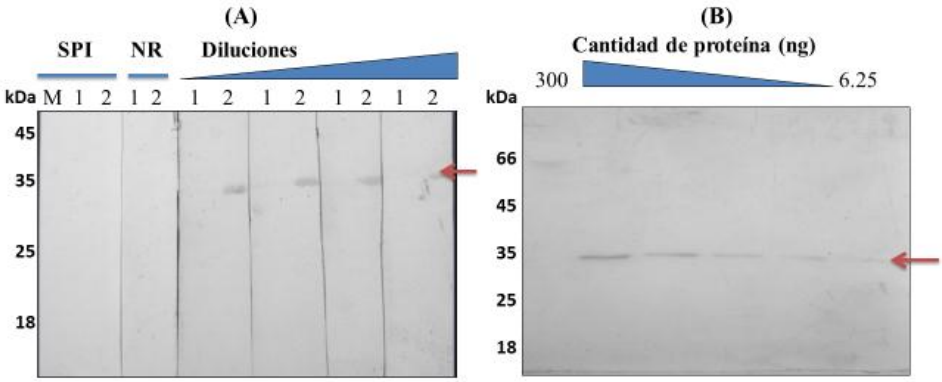
Figura 29. Evaluación de sueros inmunes α6xHis-Δ1-970-LbNADK mediante western blot. **A:** Antígenos evaluados. SDS-PAGE 10%, tinción con azul de Coomassie. **B:** Evaluación de sueros inmunes mediante western blot. Membrana de nitrocelulosa, anticuerpo primario 1:5000 TBST, fosfatasa alcalina. (M); Marcador de peso molecular. (1); 200 ng de BSA. (2); 200ng de 6xHis-Δ1-970LbNADK. (SPI); Suero preinmune. (NR); Suero no relacionado. (S1-S4); Sueros obtenidos del esquema de inmunización



De los sueros evaluados el que presento mejor reconocimiento, fue el obtenido luego del tercer refuerzo de inmunización. Este suero fue tomado para evaluar la mínima dilución de trabajo y mínima cantidad de antígeno reconocible a una dilución especifica como se indica en el numeral 6.2.4.3. Los resultados se muestran en las figuras 30A y B en las que se

puede evidenciar que los anticuerpos policlonales obtenidos de dicha sangría son capaces de reconocer 200ng de proteína hasta una dilución de 12.500 y que a una dilución fija de 1:10.000 estos anticuerpos son capaces de reconocer hasta 25ng de recombinante purificada. Se colectaron entre x y x ml de suero por sangría, los cuales suplementados con glicerol al 10% v/v y almacenados a -20 y -80°C.

Figura 30. Caracterización del suero inmune 3 mediante western blot. **A:** Evaluación de la dilución máxima de trabajo del suero inmune. **B:** Evaluación de la cantidad mínima de antígeno reconocido a una dilución fija de trabajo. Membrana de nitrocelulosa, anticuerpo primario 1:5000 TBST, fosfatasa alcalina. Para todos: (M); Marcador de peso molecular. (1); 200 ng de BSA. (2); 200ng de 6xHis-Δ1-970LbNADK. La flecha indica la banda de interés.



En general, se sabe que en gallinas se pueden presentar respuestas inmunes de varios tipos frente a un esquema de inmunización. Woolley & Landon[94], describieron que en gallinas se podía presentar una respuesta inmune clásica, caracterizada por una fuerte respuesta después de la segunda inmunización o se podía presentar una fuerte respuesta inmune después de la tercera inmunización. En este trabajo se obtuvieron resultados similares a los encontrados por Wolley & Landon, donde la respuesta inmune más fuerte corresponde a la obtenida después del tercer refuerzo de inmunización.

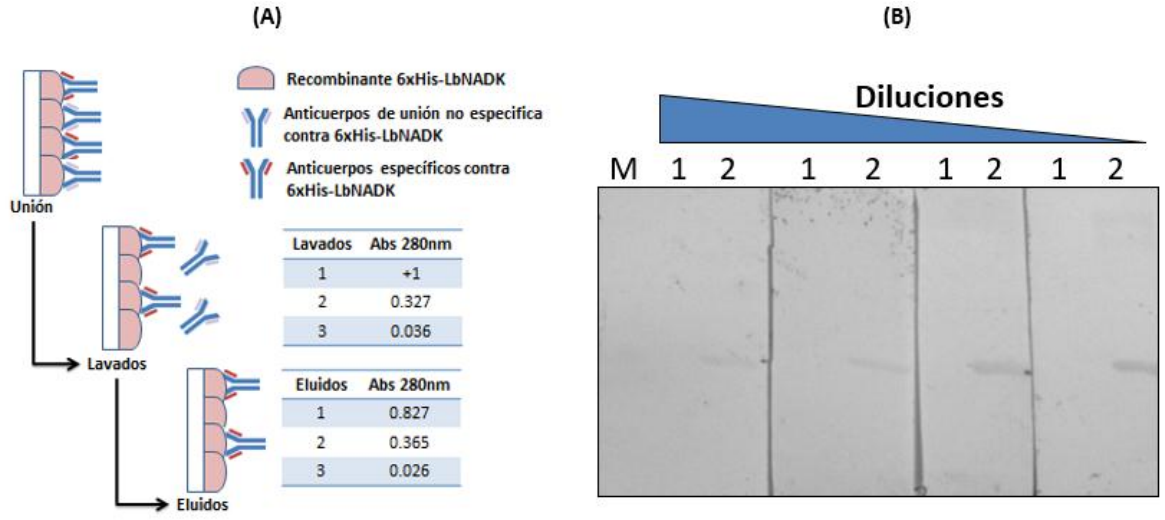
7.3.5.2 Obtención de anticuerpos mediante afinidad a antígeno.

Para mejorar la especificidad de los anticuerpos, se llevó a cabo un proceso de purificación del suero inmune por afinidad a la proteína recombinante 6xHis-LbNADK desnaturalizada y anclada a una membrana de nitrocelulosa. Como se muestra en la figura 31A, al incubar la membrana de nitrocelulosa con la proteína de interés anclada a esta en el suero inmune

de la sangría 3, a esta se unen anticuerpos de alta y baja afinidad, los cuales son removidos mediante lavados en los cuales la cantidad de proteína obtenida, es decir de anticuerpos es cada vez menor.

Posteriormente cuando se realiza la elusión con buffer glicina a pH 2, los anticuerpos cuyos paratopes presentan una mayor afinidad al antígeno son eluidos y posteriormente renaturalizados en buffer Tris-HCl. Las IgYs purificadas presentaron un alto contenido de proteínas según lo observado al realizar la medición de absorbancia a 280nm. Estos anticuerpos fueron evaluados mediante western blot para su posterior uso. Se encontró que, dichos eluidos presentaron reconocimiento de 200 ng de la proteína recombinante 6xHis-LbNADK hasta una dilución de 1:12.500 (Figura 31B).

Figura 31. Obtención y evaluación de anticuerpos por afinidad a antígeno. **A:** Esquema y resultados de la purificación de IgYs por afinidad a antígeno. **B:** Evaluación de IgYs presentes en los eluidos de la purificación a diferentes diluciones. Membrana de nitrocelulosa, revelado con fosfatasa alcalina. En B: (M); Marcador de peso molecular. (1); 200 ng de BSA. (2); 200ng de 6xHis-Δ1-970LbNADK. La flecha indica la banda de ineres.



Aunque al evaluar los anti-6xHis-delta 1-970LbNADK de los eluidos de la purificación los resultados fueron muy similares a los del suero sin purificar, lo cual señala l especificidad del suero de partida, el proceso de purificación de anticuerpos aprovechando su afinidad hacia la proteína recombinante presenta diversas ventajas frente a otros métodos, ya que

permite la eliminación de anticuerpos no específicos para la proteína de interés y adicionalmente conlleva al enriquecimiento de paratopes de mayor especificidad y en este caso de paratopes de estructura primaria, lo anterior debido a que la proteína 6xHis-LbNADK empleada en este proceso se encontraba desnaturalizada.

Dado esto, los eluidos de esta purificación podrían permitir un mejor reconocimiento de la proteína en experimentos como western blot sobre extractos proteicos del parásito *L. braziliensis*. Estos anticuerpos fueron suplementados con glicerol al 10% v/v y almacenados a -20 y -80°C para fututos trabajos.

7.3.5.3. Obtención y caracterización de IgYs de yema de huevo

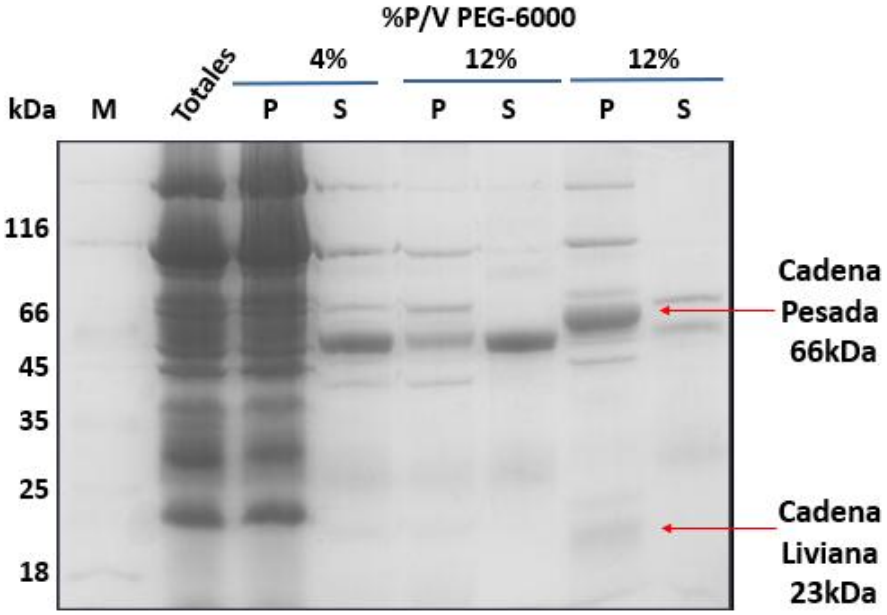
La precipitación fraccionada se realizó con todos huevos obtenidos durante el esquema de inmunización y se seleccionó uno al azar para realizar el seguimiento de la purificación mediante SDS PAGE. La figura 32 muestra un resumen de las precipitaciones realizadas sobre un huevo escogido de manera aleatoria.

En cuanto al fraccionamiento con 3.5 % de PEG-6000 P/V, se observó que la mayor parte de las proteínas en la muestra precipitan, dejando en el sobrenadante principalmente las IgY que corresponden a las bandas de alrededor de 66kDa (Cadenas pesada) y 25kDa (Cadenas livianas), junto algunas bandas de diferentes pesos moleculares. Las proteínas que precipitaron a este porcentaje de PEG-6000 muy probablemente pueden ser lipoproteínas de baja densidad como las vitelinas y algunas otras fosfolipoproteinas, las cuales son uno de los componentes más importantes de la yema de huevo y presentan solubilidad reducida[76]. Esto concuerda con lo reportado en otros trabajos[62] en los que se propone el uso del PEG como agente precipitante de lipoproteínas.

Posteriormente, al realizar las precipitaciones con PEG-6000 12% P/V, se observó que en ambos casos las IgYs se encontraban en el pellet de la precipitación, mientras que en el sobrenadante se encontró una banda de un tamaño similar al de las cadenas pesadas de las IgYs y una banda de aproximadamente 40kDa. Inicialmente se pensó que la banda de aproximadamente 66kDa presente en el sobrenadante de estas precipitaciones podría corresponder a las cadenas pesadas de los IgYs, sin embargo esta hipótesis se descartó

debido a que en el mismo carril no hay presencia de bandas del tamaño de la cadena liviana, por lo que se concluye que esta banda corresponde a alguna otra proteína de un tamaño similar.

Figura 32. Purificación de IgYs de yema de huevo por precipitación con PEG-6000. (M); Marcador de peso molecular. (P); Pellet de la precipitación. (S); Sobrenadante de la precipitación. SDS-PAGE 10%, tinción azul de Coomassie.

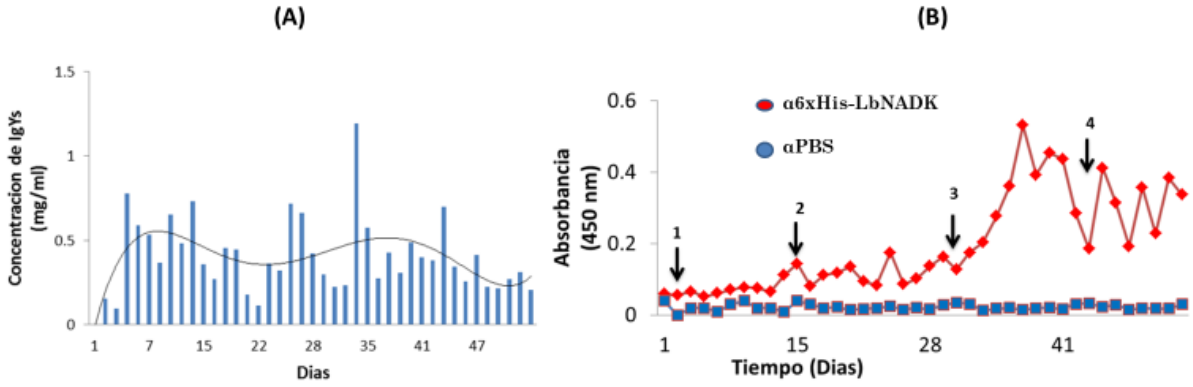


Finalmente se obtienen las IgYs parcialmente purificadas. En este caso, se partió de un huevo con una cantidad de 2.5 mg de proteína y se obtuvo una cantidad final de 0,5 mg de proteína en el pellet de la 3 precipitación. En trabajos realizados por autores como Bizhanov & Vyshniauski[93] y Akita & Nakai[92] en los que se comparan diferentes métodos para la obtención de IgYs a partir de yema de huevo por precipitación, se reporta que el uso de PEG-6000 como agente precipitante para la obtención de IgYs, presenta mejores resultados en cuanto a pureza de los anticuerpos, lo cual concuerda con lo obtenido en este trabajo, basado en el patrón de bandas observado en el SDS-PAGE (Figura 32).

Posteriormente, se calcularon las concentraciones de IgYs presentes en las muestras mediante medición de la absorbancia a 280nm, teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar de estas proteínas[95]. Las concentraciones de IgYs obtenidas fueron bastante

variables a lo largo del esquema de inmunización, obteniéndose valores entre 0,1 y 1,2 mg/ml. Sin embargo, se observa según la línea de tendencia de los datos obtenidos que, a lo largo del proceso de inmunización hay aumento de la concentración de proteínas obtenidas después de la primera y la segunda inmunización (figura 33A).

Figura 33. Cuantificación y evaluación de IgYs-α6xHIs-Δ1-970LbNADK de yema de huevo. **A:** Cuantificación de IgYs mediante medición de absorbancia a 280nm. **B:** Evaluación de los α6xHIs-Δ1-970LbNADK mediante ELISA. Revelado con peroxidasa, sustrato TMB. Las flechas indican los tiempos en los que se realizaron los refuerzos de inmunización.



Los IgYs obtenidos se evaluaron mediante un ensayo de ELISA (Sección 6.2.4.5), donde, luego de la segunda inmunización comienza a verse un aumento en el reconocimiento del antígeno representado en aumento de la absorbancia a 450nm. Adicionalmente, se puede observar que el aumento en la producción en anticuerpos específicos para la proteína recombinante se da después de la 3 inmunización, alcanzando la mayor producción justo entre los días 35 y 45 del esquema de inmunización (Figura 33B)**.** Resultados que concuerdan con lo hallado durante la evaluación de los sueros inmunes (Figura 29).

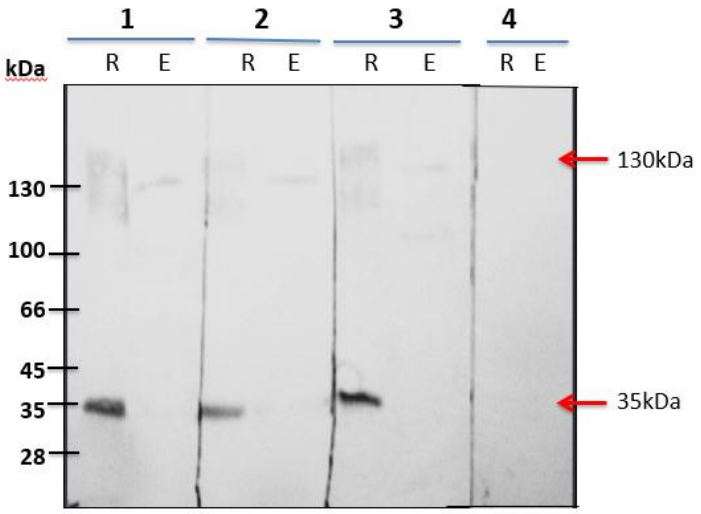
Teniendo en cuenta estos resultados se seleccionaron las 3 yemas con mayor reconocimiento de la recombinante 6xHis-Δ1-970LbNADK y se realizó la purificación de los IgYs totales, obteniendo concentraciones finales de 5, 4.8 y 4.2 mg/ml respectivamente en un volumen final de 10 ml para cada una. Estos anticuerpos fueron suplementados con glicerol al 10% v/v y almacenados a -20 y -80°C para futuros trabajos.

7.3.6 Inmunodetección y localización de la LbNADK endógena

Para realizar el reconocimiento de la LbNADK endógena del parásito se cultivaron promastigotes asincrónicos de *L. braziliensis* en medio Schneider como se menciona en el numeral 6.2.5.1. Los parásitos fueron colectados y lisados como se menciona en el numeral 6.2.5.1, obteniéndose fracciones proteicas totales, insolubles y solubles.

Basados en lo reportado para otras NADKs como las de la tabla 1, las cuales son proteínas solubles, predominantemente localizadas en citoplasma. Se realizó el reconocimiento de la LbNADK endógena mediante la técnica de western blot en extractos proteicos solubles del parásito, siguiendo la metodología planteada en el numeral 6.2.5.2. Para ello se emplearon los anticuerpos obtenidos y evaluados previamente en el numeral 7.3.5.

Figura 34. Reconocimiento de la LbNADK endógena mediante western blot. (R); 200ng de proteína recombinante 6xHis-Δ1-970LbNADK. (E); Extractos proteicos solubles de *L. braziliensis*. Empleando los siguientes IgYs (1); α6xHis-Δ1-970LbNADK del suero inmune 3. (2); α6xHis-Δ1-970LbNADK purificados por afinidad a antígeno. (3); α6xHis-Δ1-970LbNADK purificados desde yema de huevo. (4); suero no relacionado. Todos los anticuerpos evaluados se emplearon en dilución 1:250 TBST, membrana de nitrocelulosa, revelado con fosfatasa alcalina. Las flechas indican las bandas de interés.



El western blot realizado con los anticuerpos generados en modelo aviar permitió reconocer una banda especifica de aproximadamente 130kDa (Figura 34), la cual corresponde al peso esperado para la NADK de *L. braziliensis* (Tabla 12). Como controles negativos se

emplearon el suero pre inmune y el suero no relacionado tomado del individuo inmunizado con buffer PBS. Como control positivo de la técnica se utilizó la proteína recombinante 6xHis-LbNADK parcialmente purificada mediante cromatografía de afinidad.

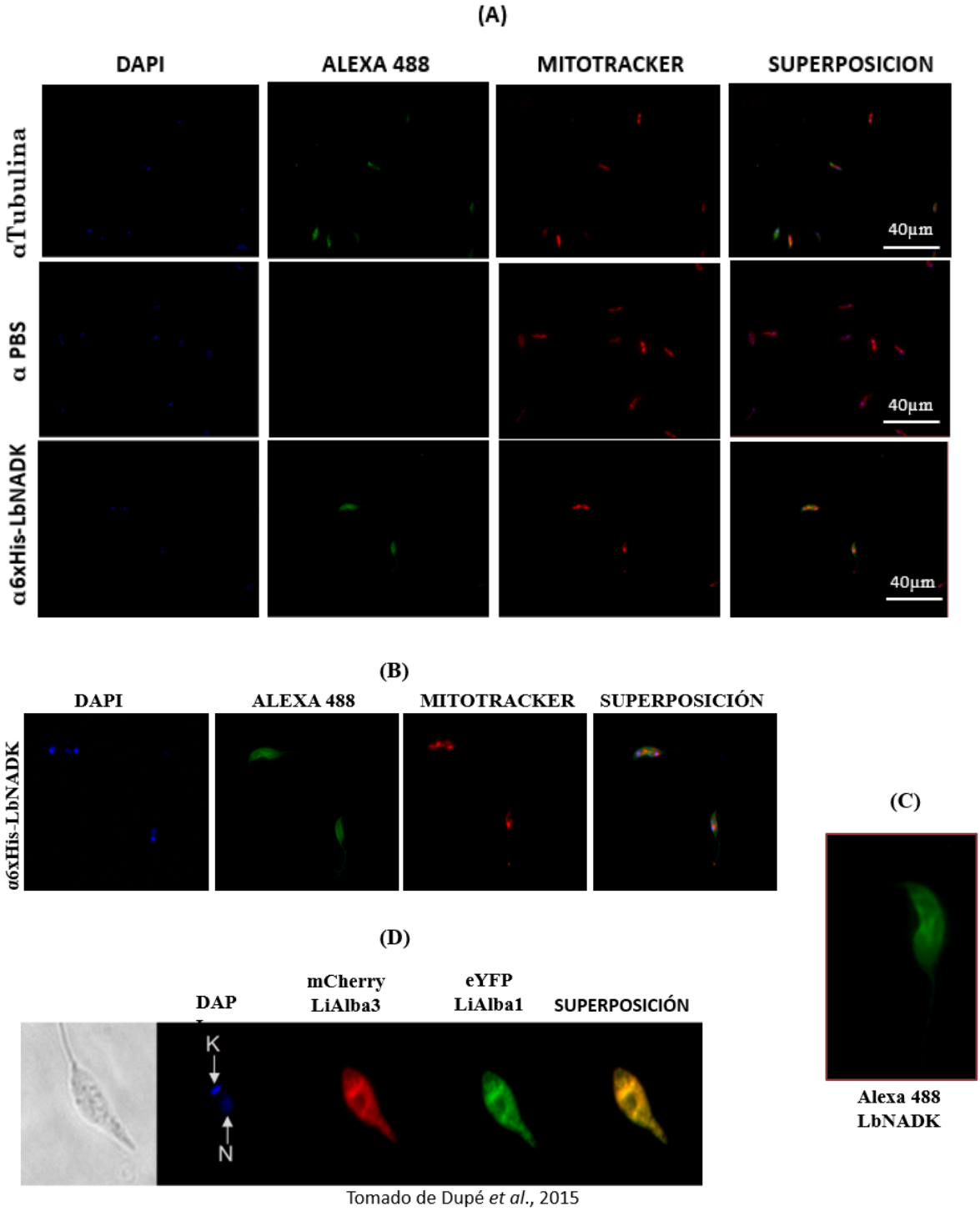
Los resultados permiten concluir que, la LbNADK se expresa en el parásito con un peso aproximado de 130kDa, con lo cual constituye la NADK de mayor tamaño descrita hasta el momento (Tabla 1), superando a la NADK2 de *A. thaliana* (110 kDa)[29,30], es con esta última que la LbNADK presenta mayor similitud en términos de estructura primaria, como se mostró en la sección computacional de este trabajo.

Con el objetivo de determinar la localización subcelular de la proteína de interés en promastigotes de *Leishmania braziliensis*, se emplearon los anticuerpos con mejor reconocimiento en extractos proteicos para ensayos de inmunofluorescencia indirectos, siguiendo la estrategia planteada en el numeral 6.2.5.3. Como se observa en la figura 35A, la proteína LbNADK presenta una localización predominantemente citoplasmática con una distribución heterogénea, posiblemente debido a agregación o asociación a otras estructuras celulares (Figura 35B y C). Como control positivo se empleó tubulina, una proteína de expresión constitutiva que se distribuye uniformemente en el citoplasma, flagelo y diferentes organelos celulares. Como controles negativos se utilizaron los sueros no relacionado y pre-inmune, los cuales no presentaron reconocimiento de proteínas en el parásito y por tanto fluorescencia.

Al contrastar los patrones de fluorescencia de la LbNADK con los de proteínas citoplasmáticas identificadas en otros trabajos, como las proteínas Alba[96], se encontró que en ambos casos la distribución es similar, permitiendo concluir que, la LbNADK es citoplasmática.

Por otro lado, al comparar los resultados obtenidos con las predicciones realizadas con los servidores SherLoc2, Multiloc2 y Euk-mPloc2 se encontraron resultados discrepantes. SherLoc2 y Multiloc2 predijeron una localización mitocondrial con una probabilidad superior a 0.6, mientras que Euk-mPloc2 predijo una localización citoplasmática. Esta última confirmada mediante observación experimental

Figura 35. Inmunolocalización de la LbNADK en promastigotes asincrónicos de *L. braziliensis*. (A): Inmunolocalización de la LbNADK mediante inmunoflorescencia indirecta. (B): Ampliación del reconocimiento con el α6xHis-Δ1-970LbNADK en *L. braziliensis*. (C): Ampliación del reconocimiento de la LbNADK sobre un promastigote *de L braziliensis*. (D): Distribución de algunas proteínas citoplasmáticas en promastigotes de *Leishmania*[96].

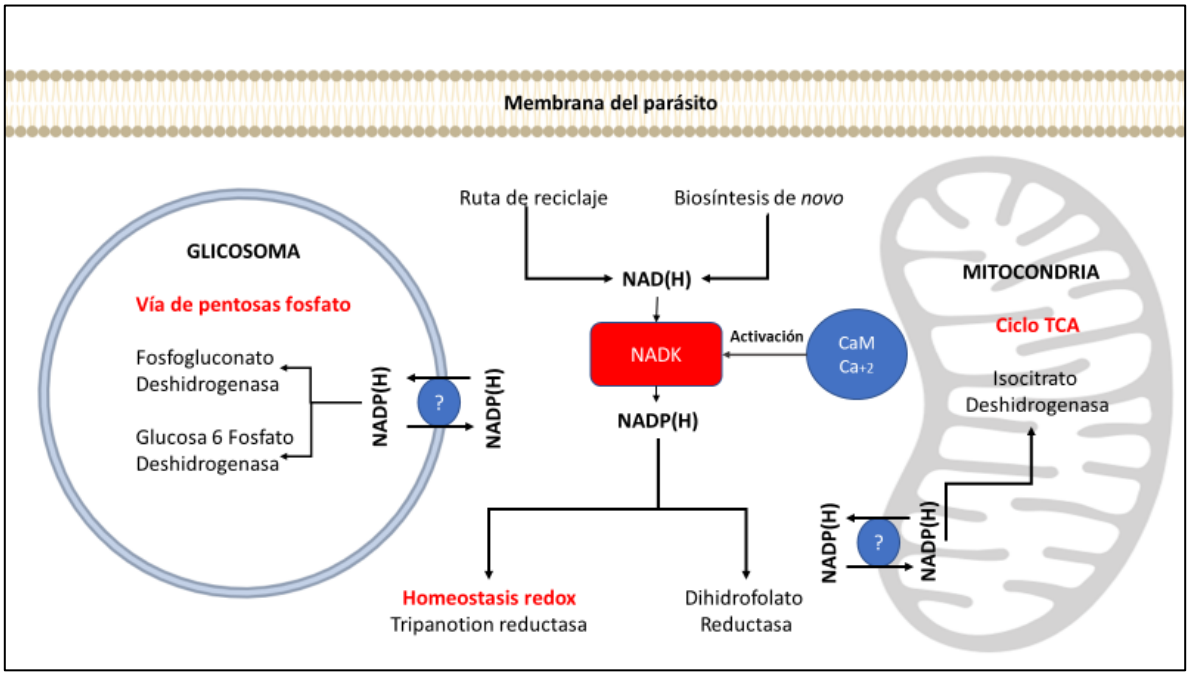


Tomado de Dupé *et al.*, 2015

Las NADK como grupo de proteínas han sido principalmente asociadas a los sitios con mayor demanda de NADP(H), en diferentes organismos como *A. thaliana* existe una NADK en cloroplasto[29,30] y otra en citosol[29,31]. En otros casos como *H. sapiens* se sabe que en células de hígado se expresa mayoritariamente la NADK isoenzima 2, la cual es predominantemente mitocondrial, supliendo así los altos requerimientos de NADP(H) de este organelo[27], en concordancia con lo planteado por Kawai y colaboradores[21,22].

Sin embargo, con los resultados obtenidos hasta el momento, no es clara la relación de la proteína LbNADK y vías metabólicas de gran importancia como la glicolisis y pentosas fosfato en el parásito, las cuales están limitadas a un compartimento celular llamado glicosoma. En trabajos realizados por Opperdoes y colaboradores en 2006, mediante análisis bioinformáticos se encontró que las NADKs de diferentes tripanosomatidos comparten la señal de localización peroxisomal 2, que en estos organismos es indicativo de localización glicosomal[97]. Con lo cual, se propone a la NADK como principal fuente de NADP(H) en este compartimento, para el desarrollo de reacciones biorreductivas. No obstante de presentar dicha señal de localización peroxisomal, la LbNADK se ubica en el citoplasma como se menciono previamente.

Figura 36. Modelo de la localización y distribución de la NADK y el NADP(H) en *Leishmania*.



Con los resultados de reconocimiento en extractos proteicos solubles e inmunolocalización de la proteína LbNADK, se identificar por primera vez la expresión de una NADK en un parasito intracelular. Lo anterior, permite plantear un modelo respecto a la biosíntesis y distribución del NADP(H) en *Leishmania.* Donde, la NADK como unica vía de biosíntesis del NADP(H), localizada en el citoplasma se convierte en la fuente de NADP(H) para enzimas de vías metabólicas como: pentosas fosfato[39], ciclo de los ácidos tricarboxilicos, homeostasis redox[41], entre otras[98,99], localizadas en diferentes compartimentos celulares y posiblemente suplidas de NADP(H) mediante la participación de transportadores del cofactor (Figura 36).

8. Conclusiones

- Se logró identificar mediante métodos computacionales 6 candidatos a NADK en diferentes especies del género *Leishmania.*

- Los análisis de estructura primaria y terciaria realizados para el candidato LbNADK demostraron que este presenta homología con las proteínas pertenecientes a la familia de las NAD quinasa y que este presenta una región N-terminal exclusiva comparada con sus homólogos tanto en procariotas como en eucariotas, esta región N-terminal es común a todos los candidatos identificados.

- La proteína LbNADK presenta diferencias estructurales de relevancia a nivel de estructura primaria y terciaria con sus homologas humanas. Así mismo presenta posibles sitios de fosforilacion diferencial con respecto a la NADK1 humana, lo cual permite postularla como un posible blanco de estudio en la búsqueda de nuevos fármacos dada su función crucial en el metabolismo del organismo.

- Se identificó la proteína LbNADK como la primera NADK de *L. braziliensis* y la primera descrita en una especie parasítica intracelular, mediante la clonación de la región codificante del dominio NADK de esta proteína y la evaluación de su actividad enzimática por dos métodos distintos.

- Se desarrolló una herramienta inmunológica para el estudio de la proteína LbNADK. La cual fue obtenida mediante 3 métodos diferentes y evaluada mediante western blot y ensayos de ELISA.

- Se logró la detección de la proteína LbNADK endógena en extractos solubles de *L. braziliensis* con un tamaño aproximado de 135kDa; la más grande descrita hasta ahora, mediante western blot empleando la herramienta inmunológica obtenida por los diferentes métodos.

- Se determinó la localización subcelular citoplasmática para la proteína LbNADK mediante ensayos de Inmunofluorescencia.

9. Perspectivas

La identificación de la proteína LbNADK en *L. braziliensis* permitió el desarrollo de herramientas de gran utilidad para futuros estudios dirigidos a explorar el metabolismo del NADP(H) en este parasito. Finalmente como perspectivas a este trabajo se proponen:

- Estudiar la función de la región N-terminal exclusiva de la proteína LbNADK

- Estudiar las diferentes modificaciones postraduccionales a las cuales es susceptible la proteína LbNADK mediante inmunoprecipitación y reconocimiento de residuos fosforilados en esta.
- Estudiar las interacciones existentes entre la NADK de L. braziliensis y otras proteínas en extractos solubles de proteínas mediante co-inmunoprecipitación.

10. Referencias

(1) Desjeux, P. Human Leishmaniases: Epidemiology and Public Health Aspects. *World Heal. Stat Q* **1992**, *45* (2–3), 267–275.

(2) Vannier-Santos, M. a; Martiny, a; de Souza, W. Cell Biology of Leishmania Spp.: Invading and Evading. *Curr. Pharm. Des.* **2002**, *8* (4), 297–318.

(3) Mannaert, A.; Downing, T.; Imamura, H.; Dujardin, J. C. Adaptive Mechanisms in Pathogens: Universal Aneuploidy in Leishmania. *Trends Parasitol.* **2012**, *28* (9), 370–376.

(4) Hannaert, V.; Saavedra, E.; Duffieux, F.; Szikora, J.-P.; Rigden, D. J.; Michels, P. A. M.; Opperdoes, F. R. Plant-like Traits Associated with Metabolism of Trypanosoma Parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100* (3), 1067–1071.

(5) Kaye, P.; Scott, P. Leishmaniasis: Complexity at the Host-Pathogen Interface. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9* (8), 604–615.

(6) Handman, E. Leishmaniasis : Current Status of Vaccine Development Leishmaniasis : Current Status of Vaccine Development. *Clin. Microbiol. Rev.* **2001**, *14* (2), 229–243.

(7) Sharma, U.; Singh, S. Insect Vectors of Leishmania: Distribuition, Physiology and Their Control. *Jounal vector borne Dis.* **2008**, *45* (4), 255–272.

(8) Pollak, N.; Dölle, C.; Ziegler, M. The Power to Reduce: Pyridine Nucleotides – Small Molecules with a Multitude of Functions. *Biochem. J.* **2007**, *402* (2), 205–218.

(9) Berger, F.; Ramírez-Hernández, M. H.; Ziegler, M. The New Life of a Centenarian: Signalling Functions of NAD(P). *Trends Biochem. Sci.* **2004**, *29* (3), 111–118.

(10) Christine H. FoyerBarry Halliwell. The Presence of Glutathione and Glutathione Reductase in Chloroplasts: A Proposed Role in Ascorbic Acid Metabolism. *Planta An Int. J. Plant Biol.* **1976**, *133* (1), 21–25.

(11) Li, W.; Wu, H.; Li, M.; San, K.-Y. Effect of NADPH Availability on Free Fatty Acid Production in Escherichia Coli. *Biotechnol. Bioeng.* **2018**, *115* (2), 444–452.

(12) Agledal, L.; Niere, M.; Ziegler, M. The Phosphate Makes a Difference: Cellular Functions of NADP. *Redox Rep.* **2010**, *15* (1), 2–10.
(13) Sies, H. Glutathione and Its Role in Cellular Functions. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *27* (9–10), 916–921.
(14) Guse, A. H.; Lee, H. C. NAADP: A Universal Ca2+ Trigger. *Sci. Signal.* **2008**, *1* (44).
(15) Brailoiu, E.; Churamani, D.; Cai, X.; Schrlau, M. G.; Brailoiu, G. C.; Gao, X.; Hooper, R.; Boulware, M. J.; Dun, N. J.; Marchant, J. S.; et al. Essential Requirement for Two-Pore Channel 1 in NAADP-Mediated Calcium Signaling. *J. Cell Biol.* **2009**, *186* (2), 201–209.
(16) Arthur, B. Y. SYNTHESIS OF TRIPHOSPHOPYRIDINE NUCLEOTIDE. **1949**, 805–814.
(17) Lerner, F.; Niere, M.; Ludwig, A.; Ziegler, M. Structural and Functional Characterization of Human NAD Kinase. **2001**, *74*, 69–74.
(18) Kawai, S.; Mori, S.; Mukai, T.; Suzuki, S.; Yamada, T.; Hashimoto, W.; Murata, K. Inorganic Polyphosphate / ATP-NAD Kinase of Micrococcus Flavus and Mycobacterium Tuberculosis H37Rv. **2000**, *63*, 57–63.
(19) Grose, J. H.; Joss, L.; Velick, S. F.; Roth, J. R. Evidence That Feedback Inhibition of NAD Kinase Controls Responses to Oxidative Stress. **2006**, *103* (20).
(20) Li, W. Y.; Wang, X.; Li, R.; Li, W. Q.; Chen, K. M. Genome-Wide Analysis of the NADK Gene Family in Plants. *PLoS One* **2014**, *9* (6).
(21) KAWAI, S.; MURATA, K. Structure and Function of NAD Kinase and NADP Phosphatase: Key Enzymes That Regulate the Intracellular Balance of NAD(H) and NADP(H). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2008**, *72* (4), 919–930.
(22) Shigetarou Mori, Masayuki Yamasaki, Yukie Maruyama, Keiko Momma, Shigeyuki Kawai, Wataru Hashimoto, Bunzo Mikami, K. M. NAD-Binding Mode and the Significance of Intersubunit Contact Revealed by the Crystal Structure of Mycobacterium Tuberculosis NAD kinase–NAD Complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *327* (2), 500–508.
(23) Raffaelli, N.; Finaurini, L.; Mazzola, F.; Sorci, L.; Amici, A.; Magni, G.; Pucci, L.; Biochimiche, B. Characterization of Mycobacterium Tuberculosis NAD Kinase : Functional Analysis of the Full-Length Enzyme by Site-Directed Mutagenesis Characterization of Mycobacterium Tuberculosis NAD Kinase : Functional Analysis of the Full-Length Enzyme by Site-Direct. *Cloning* **2004**, 7610–7617.
(24) Labesse, G.; Douguet, D.; Assairi, L.; Gilles, A. M. Diacylglyceride Kinases, Sphingosine Kinases and NAD Kinases: Distant Relatives of 6-Phosphofructokinases. *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27* (6), 273–275.
(25) Mori, S.; Kawai, S.; Shi, F.; Mikami, B.; Murata, K. Molecular Conversion of NAD Kinase to NADH Kinase through Single Amino Acid Residue Substitution. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (25), 24104–24112.
(26) Hanukoglu, I. Proteopedia: Rossmann Fold: A Beta-Alpha-Beta Fold at Dinucleotide Binding Sites. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **2015**, *43* (3), 206–209.
(27) Zhang, R. MNADK , a Novel Liver-Enriched Mitochondrion- Localized NAD Kinase. **2013**.
(28) Jean-Guy BerrinOlivier PierruguesCatherine BrutescoBéatrice AlonsoJean-Luc MontilletDominique RobyMichael Kazmaier. Stress Induces the Expression of AtNADK-1, a Gene Encoding a NAD(H) Kinase in Arabidopsis Thaliana. *Mol.*

Genet. Genomics **2005**, *273* (1), 10–19.
(29) Chai, M. F.; Chen, Q. J.; An, R.; Chen, Y. M.; Chen, J.; Wang, X. C. NADK2, an Arabidopsis Chloroplastic NAD Kinase, Plays a Vital Role in Both Chlorophyll Synthesis and Chloroplast Protection. *Plant Mol. Biol.* **2005**, *59* (4), 553–564.
(30) Turner, W. L. Cloning and Characterization of Two NAD Kinases from Arabidopsis. Identification of a Calmodulin Binding Isoform. *Plant Physiol.* **2004**, *135* (3), 1243–1255.
(31) Waller, J. C.; Dhanoa, P. K.; Schumann, U.; Mullen, R. T.; Snedden, W. A. Subcellular and Tissue Localization of NAD Kinases from Arabidopsis: Compartmentalization of de Novo NADP Biosynthesis. *Planta* **2010**, *231* (2), 305–317.
(32) Jeelani, G.; Husain, A.; Sato, D.; Soga, T.; Suematsu, M.; Nozaki, T. Biochemical and Functional Characterization of Novel NADH Kinase in the Enteric Protozoan Parasite Entamoeba Histolytica. *Biochimie* **2013**, *95* (2), 309–319.
(33) Liu, J.; Lou, Y.; Yokota, H.; Adams, P. D.; Kim, R.; Kim, S. Crystal Structures of an NAD Kinase from Archaeoglobus Fulgidus in Complex with ATP , NAD , or NADP. **2005**, 289–303.
(34) Kawai, S.; Mori, S.; Mukai, T.; Hashimoto, W.; Murata, K. Molecular Characterization of Escherichia Coli NAD Kinase. **2001**, *4365*.
(35) Kawai, S.; Fukuda, C.; Mukai, T.; Murata, K. MJ0917 in Archaeon Methanococcus Jannaschii Is a Novel NADP phosphatase/NAD Kinase. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (47), 39200–39207.
(36) Kawai, S.; Mori, S.; Murata, K. Primary Structure of Inorganic polyphosphate/ATP-NAD Kinase from Micrococcus Flavus, and Occurrence of Substrate Inorganic Polyphosphate for the Enzyme. *Biosci Biotechnol Biochem* **2003**, *67* (8), 1751–1760.
(37) Poncet-Montange, G.; Assairi, L.; Arold, S.; Pochet, S.; Labesse, G. NAD Kinases Use Substrate-Assisted Catalysis for Specific Recognition of NAD. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (47), 33925–33934.
(38) Shi, F.; Kawai, S.; Mori, S.; Kono, E.; Murata, K. Identification of ATP-NADH Kinase Isozymes and Their Contribution to Supply of NADP(H) in Saccharomyces Cerevisiae. *FEBS J.* **2005**, *272* (13), 3337–3349.
(39) Julie Kovářová, M. P. B. The Pentose Phosphate Pathway in Parasitic Trypanosomatids. *Trends Parasitol.* **2016**, *32* (8), 622–634.
(40) Baiocco, P.; Colotti, G.; Franceschini, S.; Ilari, A. Molecular Basis of Antimony Treatment in Leishmaniasis. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (8), 2603–2612.
(41) Maruenda, H. Tripanotión Reductasa Como Blanco Quimioterapéutico Contra La Tripanosomosis Y La Leishmaniosis. **2002**, 33–41.
(42) Contreras, L. E.; Neme, R.; Ramírez, M. H. Identification and Functional Evaluation of Leishmania Braziliensis Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase. *Protein Expr. Purif.* **2015**, *115*, 26–33.
(43) Marchler-Bauer A et al. CDD: NCBI's Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res.*. **2015**, *43(D)* (222–6).
(44) Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D., B. A. ExPASy: The Proteomics Server for in-Depth Protein Knowledge and Analysis. *Nucleic Acids Res.*. **2003**, *31*, 3784–3788.
(45) Hua, S.; Sun, Z. Support Vector Machine Approach for Protein Subcellular Localization Prediction. **2001**, *17* (8), 721–728.

(46) Bhasin, M.; Raghava, G. P. S. ESLpred: SVM-Based Method for Subcellular Localization of Eukaryotic Proteins Using Dipeptide Composition and PSI-BLAST. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32* (WEB SERVER ISS.), 414–419.
(47) Yu, C.; Lin, C.; Hwang, J.-K. Predicting Subcellular Localization of Proteins for Gram-Negative Bacteria by Support Vector Machines Based on N -Peptide Compositions. *Protein Sci.* **2004**, *13* (5), 1402–1406.
(48) Yang, J.; Yan, R.; Roy, A.; Xu, D.; Poisson, J.; Zhang, Y. The I-TASSER Suite: Protein Structure and Function Prediction. *Nat. Methods* **2014**, *12* (1), 7–8.
(49) Lovell, S. C.; Davis, I. W.; Adrendall, W. B.; de Bakker, P. I. W.; Word, J. M.; Prisant, M. G.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. Structure Validation by C Alpha Geometry: Phi,psi and C Beta Deviation. *Proteins-Structure Funct. Genet.* **2003**, *50* (August 2002), 437–450.
(50) Gibbs, R. DNA Amplification by the Polymerase Chain Reaction. *Anal. Chem* **1990**, *62*, 1202–1214.
(51) Schägger, H. Tricine–SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* **2006**, *1* (1), 16–22.
(52) Mahmood, T.; Yang, P. C. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *N. Am. J. Med. Sci.* **2012**, *4* (9), 429–434.
(53) Joshua A. Bornhorst; Joseph J. Falke. [16] Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. *Methods Enzymol.* **2000**, *326*, 245–254.
(54) Hammond, J. B.; Kruger, N. J. The Bradford Method for Protein Quantitation. *Methods Mol. Biol.* **1988**, *3*, 25–32.
(55) Schade, R.; Calzado, E. G.; Sarmiento, R.; Chacana, P. A.; Porankiewicz-Asplund, J.; Terzolo, H. R. Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY-Technology): A Review of Progress in Production and Use in Research and Human and Veterinary Medicine. *Altern. Lab. Anim.* **2005**, *33* (2), 129–154.
(56) Howard, G. & Kaser, M. *Making and Using Antibodies: A Practical Handbook Lavoisier.Fr*; 2007.
(57) Pauly, D.; Chacana, P. A.; Calzado, E. G.; Brembs, B.; Schade, R. IgY Technology: Extraction of Chicken Antibodies from Egg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG) Precipitation. *J. Vis. Exp.* **2011**, *i* (51), 2–7.
(58) Matti Saraste, Peter R. Sibbald, A. W. The P-Loop — a Common Motif in ATP- and GTP-Binding Proteins. *Trends Biochem. Sci.* **1990**, *15* (11), 430–434.
(59) Love, N. R.; Pollak, N.; Dölle, C.; Niere, M.; Chen, Y.; Oliveri, P.; Amaya, E.; Patel, S.; Ziegler, M. NAD Kinase Controls Animal NADP Biosynthesis and Is Modulated via Evolutionarily Divergent Calmodulin-Dependent Mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112* (5), 1386–1391.
(60) Lau, C.; Gossmann, T. I.; Agledal, L.; Niere, M.; Kingdom, U. ISOFORM-SPECIFIC TARGETING AND INTERACTION DOMAINS (ISTIDs) IN HUMAN NICOTINAMIDE MONONUCLEOTIDE ADENYLYLTRANSFERASES (NMNATs). *J. Biol. Chem.* **2010**, *3*, 1–20.
(61) Patwardhan, P.; Miller, W. T. Processive Phosphorylation : Mechanism and Biological Importance ☆. *Cell. Signal.* **2007**, *19*, 2218–2226.
(62) Parsons, M.; Worthey, E. A.; Ward, P. N.; Mottram, J. C. Comparative Analysis of the Kinomes of Three Pathogenic Trypanosomatids : Leishmania Major , Trypanosoma Brucei and. *BMC Genomics* **2005**, *19*, 1–19.
(63) Tedeschi, P. M.; Bansal, N.; Kerrigan, J. E.; Abali, E. E.; Scotto, K. W.; Bertino, J.

R. NAD Þ Kinase as a Therapeutic Target in Cancer. **2016**, No. 21, 5189–5196.
(64) Mericskay, M. Nicotinamide Adenine Dinucleotide Homeostasis and Signalling in Heart Disease : Pathophysiological Implications and. *Arch. Cardiovasc. Dis.* **2016**, *109* (3), 207–215.
(65) Kenneth H. Roux. Optimization and Troubleshooting in PCR. In *Cold Springer Harbor Protocols*; 2009; p pdb-ip66.
(66) Rosano, G. L.; Ceccarelli, E. A. Recombinant Protein Expression in Escherichia Coli: Advances and Challenges. *Front. Microbiol.* **2014**, *5* (APR), 1–17.
(67) Esmeralda A. WoestenenkMartin HammarströmSusanne van den BergTorleif HärdHelena Berglund. His Tag Effect on Solubility of Human Proteins Produced in Escherichia Coli: A Comparison between Four Expression Vectors. *J. Struct. Funct. Genomics* **2004**, *5* (3), 217–229.
(68) Savari, M.; Zarkesh Esfahani, S. H.; Edalati, M.; Biria, D. Optimizing Conditions for Production of High Levels of Soluble Recombinant Human Growth Hormone Using Taguchi Method. *Protein Expr. Purif.* **2015**, *114*, 128–135.
(69) James F.KaneDonna L.Hartley. Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in Escherichia Coli. *Trends Biotechnol.* **1988**, *6* (5), 95–101.
(70) Weber, K. L. A. U. S., & Osborn, M. A. R. Y. *The Proteins-Proteins and Sodium Dodecyl Sulfate: Molecular Weight Determination on Polyacrylamide Gels and Related Procedures.*; 1975.
(71) Rock, L. The Binding of Detergents to Proteins. *Proteins* **1971**, *246* (12), 3895–3901.
(72) ROSALIND PITT-RIVERS AND F. S. AMBESI IMPIOMBATO*. The Binding of Sodium Dodecyl Sulphate to Various Proteins. *Biochem. J.* **1968**, *109* (5), 825–839.
(73) Glaser, T. A.; Baatz, J. E.; Kreishman, G. P.; Mukkada, A. J. pH Homeostasis in Leishmania Donovani Amastigotes and Promastigotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, *85* (20), 7602–7606.
(74) Morais, M. A. B.; Giuseppe, P. O.; Souza, T. A. C. B.; Alegria, T. G. P.; Oliveira, M. A.; Netto, L. E. S.; Murakami, M. T. How pH Modulates the Dimer-Decamer Interconversion of 2-Cys Peroxiredoxins from the Prx1 Subfamily. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290* (13), 8582–8590.
(75) Lagadic-Gossmann, D.; Huc, L.; Lecureur, V. Alterations of Intracellular pH Homeostasis in Apoptosis: Origins and Roles. *Cell Death Differ.* **2004**, *11* (9), 953–961.
(76) Friedman, B.; Cronstein, B. Methotrexate Mechanism in Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Jt. Bone Spine* **2018**.
(77) Of, S. B.; By, T. R. Structural Basis of Target Recognition By Calmodulin. *Biophys. Chem.* **1995**, 85–116.
(78) Roberts, D. M.; Harmon, A. C. Calcium-Modulated Proteins: Targets of Intracellular Calcium Signals in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **2003**, *43* (1), 375–414.
(79) E. AllanA. Trewavas. Quantitative Changes in Calmodulin and NAD Kinase during Early Cell Development in the Root Apex of Pisum Sativum L. *Planta* **1985**, *165* (4), 493–501.
(80) Docampo, R.; Huang, G. Calcium Signaling in Trypanosomatid Parasites. *Cell Calcium* **2015**, *57* (3), 194–202.
(81) Mazumder, S.; Mukherjee, T.; Ghosh, J.; Ray, M.; Bhaduri, A. Allosteric

Modulation of Leishmania Donovani Plasma Membrane Ca2+-ATPase by Endogenous Calmodulin. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (26), 18440–18446.
(82) Aich, A.; Shaha, C. Novel Role of Calmodulin in Regulating Protein Transport to Mitochondria in a Unicellular Eukaryote. *Mol. Cell. Biol.* **2013**, *33* (22), 4579–4593.
(83) Schade, R., & Hlinak, A. Egg Yolk Antibodies, State of the Art and Future Prospects. . *ALTEX* **1995**, *13* (5), 5–9.
(84) Brunda, G.; Sashidhar, R. B.; Sarin, R. K. Use of Egg Yolk Antibody (IgY) as an Immunoanalytical Tool in the Detection of Indian Cobra (Naja Naja Naja) Venom in Biological Samples of Forensic Origin. *Toxicon* **2006**, *48* (2), 183–194.
(85) Use of IgY Antibodies and Semiconductor Nanocrystal Detection in Cancer Biomarker Quantitation. *Yan Xiao Xiugong Gao* **2010**, *4* (2), 227–239.
(86) Tu, Y.; Chen, C.; Chang, H. Isolation of Immunoglobulin in Yolk (IgY) and Rabbit Serum Immunoglobulin G (IgG) Speci ® c against Bovine Lactoferrin by Immunoa • Nity Chromatography. *Food Res. Int.* **2001**, *34*, 783–789.
(87) Ohnishi, T.; Kakimoto, K.; Hashida, S.; Fujii, M.; Hirono, S.; Nishiyama, K.; Amita, Y.; Ishikawa, E.; Tsubouchi, H.; Daikuhara, Y. Development of Highly Sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Hepatocyte Growth Factor/scatter Factor (HGF/SF): Determination of HGF/SF in Serum and Urine from Normal Human Subjects. *J. Immunol. Methods* **2000**, *244* (1–2), 163–173.
(88) A. Di LonardoM. Luisa MarcanteF. PoggialiE. HamsøíkovàA. Venuti. Egg Yolk Antibodies against the E7 Oncogenic Protein of Human Papillomavirus Type 16. *Arch. Virol. 146* (1), 117–125.
(89) Larsson, A.; Karlsson-Parra, A.; Sjoquist, J. Use of Chicken Antibodies in Enzyme Immunoassays to Avoid Interference by Rheumatoid Factors. *Clin. Chem.* **1991**, *37* (3), 411–414.
(90) Mohammed, S. M., Morrison, S., Wims, L., Trinh, K. R., Wildeman, A. G., Bonselaar, J., & Etches, R. J. Deposition of Genetically Engineered Human Antibodies into the Egg Yolk of Hens. *Immunotechnology* **1998**, *4* (2), 115–125.
(91) Hamal, K. R.; Burgess, S. C.; Pevzner, I. Y.; Erf, G. F. Maternal Antibody Transfer from Dams to Their Egg Yolks, Egg Whites, and Chicks in Meat Lines of Chickens. *Poult. Sci.* **2006**, *85* (8), 1364–1372.
(92) Akita, E. M.; Nakai, S. Comparison of Four Purification Methods for the Production of Immunoglobulins from Eggs Laid by Hens Immunized with an Enterotoxigenic E . Coli Strain. **1993**, *160*, 207–214.
(93) Bizhanov, G.; Vyshniauskis, G. A Comparison of Three Methods for Extracting IgY from the Egg Yolk of Hens Immunized with Sendai Virus. **2000**, *24*, 103–113.
(94) Woolley, J. A., & Landon, J. Comparison of Antibody Production to Human Interleukin-6 (IL-6) by Sheep and Chickens. *J. Immunol. Methods* **1995**, *178* (2), 253–265.
(95) Beaven, G. T., & Holiday, E. R. Ultraviolet Absorption Spectra of Proteins and Amino Acids. *Adv. Protein Chem.* **1952**, *7*, 319–386.
(96) Dupé, A.; Dumas, C.; Papadopoulou, B. Differential Subcellular Localization of Leishmania Alba-Domain Proteins throughout the Parasite Development. **2015**, 1–29.
(97) Opperdoes, F. R.; Szikora, J. In Silico Prediction of the Glycosomal Enzymes of Leishmania Major and Trypanosomes. **2006**, *147*, 193–206.
(98) Gilbert, I. H. Inhibitors of Dihydrofolate Reductase in Leishmania and

Trypanosomes. **2002**, *1587*, 249–257.

(99) Meek, T. D.; Garvey, E. P.; Santi, D. V. Purification and Characterization of the Bifunctional Thymidylate Synthetase-Dihydrofolate Reductase from Methotrexate-Resistant Leishmania T Ropicat. **1985**, No. 1981, 678–686.

11. Anexos

Anexo 1. Secuencias consenso empleadas para la búsqueda de candidatos a NADK en *Leishmania* spp

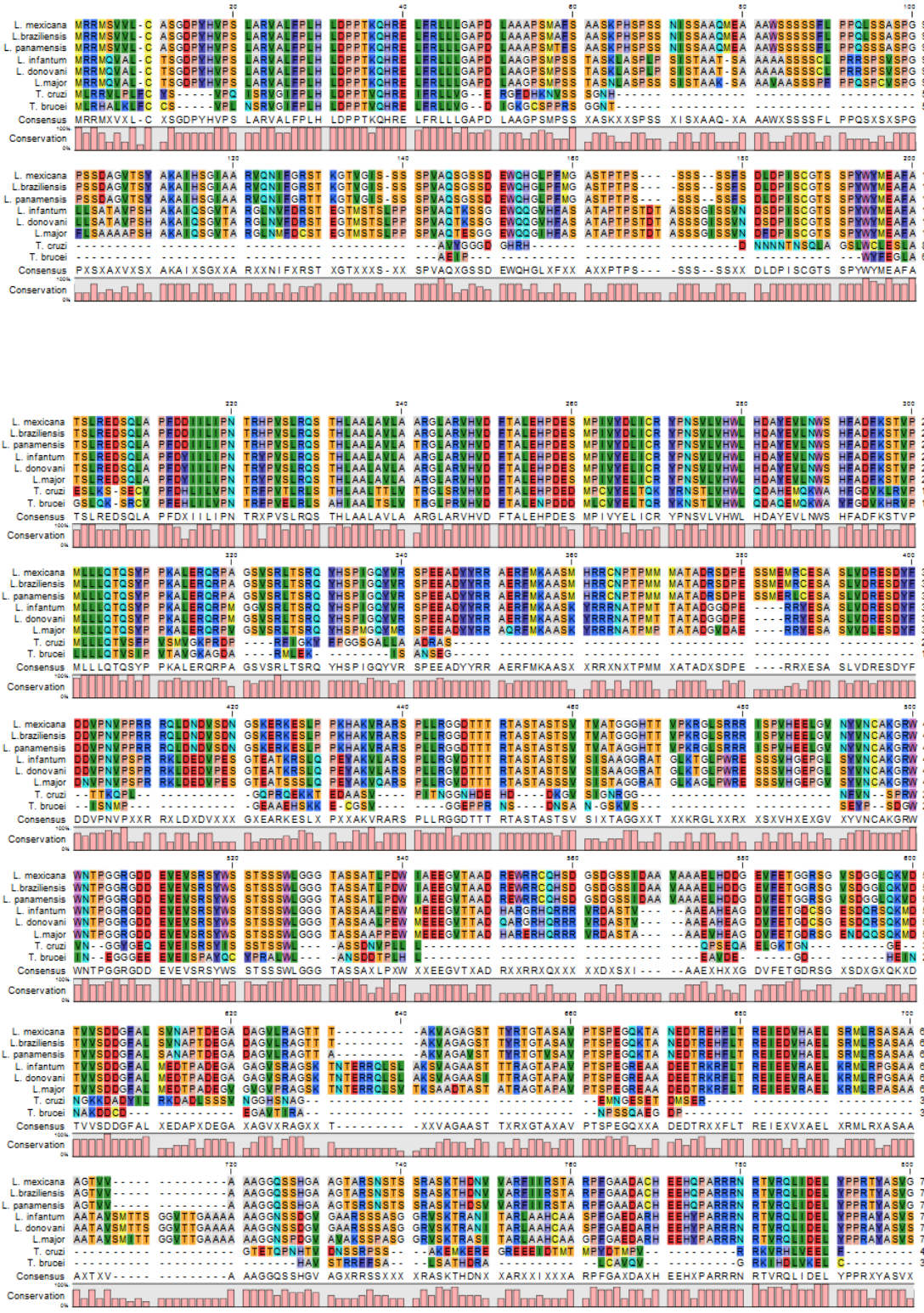
Grupo de organismos	Secuencia consenso	Longitud de secuencia consenso	Numero de secuencias alineadas
Eucaria Procaria	MRRTRSLNAPSPIQQFGPCGRIMKNSAMVMTIQDPA SQRLTWYKPPLTVLVIKKVRDSSVLPPFVQLVTWLIE EKRMVVFVEASVLEDPALARDPRFQGVRDRLQTFR DGTDDLQDRIDFIVCLGGDGTLLYASLLFQQSVPPV MAFHLGSLGFLTPFEFDNFQEQVTNVLEGHAALTLR SRLRCIIMRKGEEGQPTKPPTNLLVLNEVVVDRGPSP YLSNIDLFIDGKHVTSVQGDGLIVSTPTGSTAYAVAA GASMIHPSVPAIMITPICPHSLSFRPIVVPAGVELKISV SPDSRNTSWVSFDGRNRQELFHGDSLRVTTSIYPVPS ICAADQITDWFDSLAECLHWNVRKRQKHLDELSDLT HSSSNDTLDSLDRDS	355	250
Eucaria	RTRSLNAPSPIQQFGPCGRIMKNSAMVMTIQDPASQR LTWYKPPLTVLVIKKVRDSSVLPPFVQLVTWLIEEKR MVVFVEASVLEDPALARDPRFQGVRDRLQTFRDGT DDLQDRIDFIVCLGGDGTLLYASLLFQQSVPPVAFHL GSLGFLTPFEFDNFQEQVTNVLEGHAALTLRSRLRCII MRKGEEGXPAKPPTNLLVLNEVVVDRGPSPYLSNID LFIDGKHVTSVQGDGLIVSTPTGSTAYAVAAGASMI HPSVPAIMITPICPHSLSFRPIVVPAGVELKISVSPDSR NTSWVSFDGRNRQELFHGDSLRVTTSIYPVPSICAAD QITDWFDSLAECLHWNVRKKQKHLDELSDLTHSSSN DTLDSLDRDS	378	250
Procaria	MNNHFKCIGIVGHPRHPTALTTHEMLYRWLCTKGY EVIVEQQIAHELQLKNVKTGTLAEIGQQADLAVVVG GDGNMLGAARTLARYDIKVIGINRGNLGFLTDLDPD NAQQQLADVLEGHYISERKRFLLEAQVCQQDCQKRI STAINEVVLHPGKVAHMIEFEVYIDEIFAFSQRSDGLI ISTPTGSTAYSLSAGGPILTPSLDAITLVPMFPHTLSAR PLVINSSSTIRLRFSHRRSDLEISCDSQIALPIQEGEDV LIRRCDYHLNLIHPKDYSYFNTLSTKLGWSKKLF	293	250
metazoa	NSAMVMTIQPDASQRLTWYKPPLTVLVIKKVRDSSV LPPFVQLVTWLIEEKRMVVFVEASVLEPDALARDPR FQGVRDRLQTFRDGTDDLQDRIDFIVCLGGDGTLLY ASLLFQQSVPPVMAFHLGSLGFLTPFEFDNFQEQVTN VLEGHAALTLRSRLRCIIMMRKGEEGXPAKPPTNLL VLNEVVVDRGPSPYLSNIDLFIDGKHVTSVQGDGLIV STPTGSTAYAVAAGASMIHPSVPAIMITPICPHSLSFR	358	250

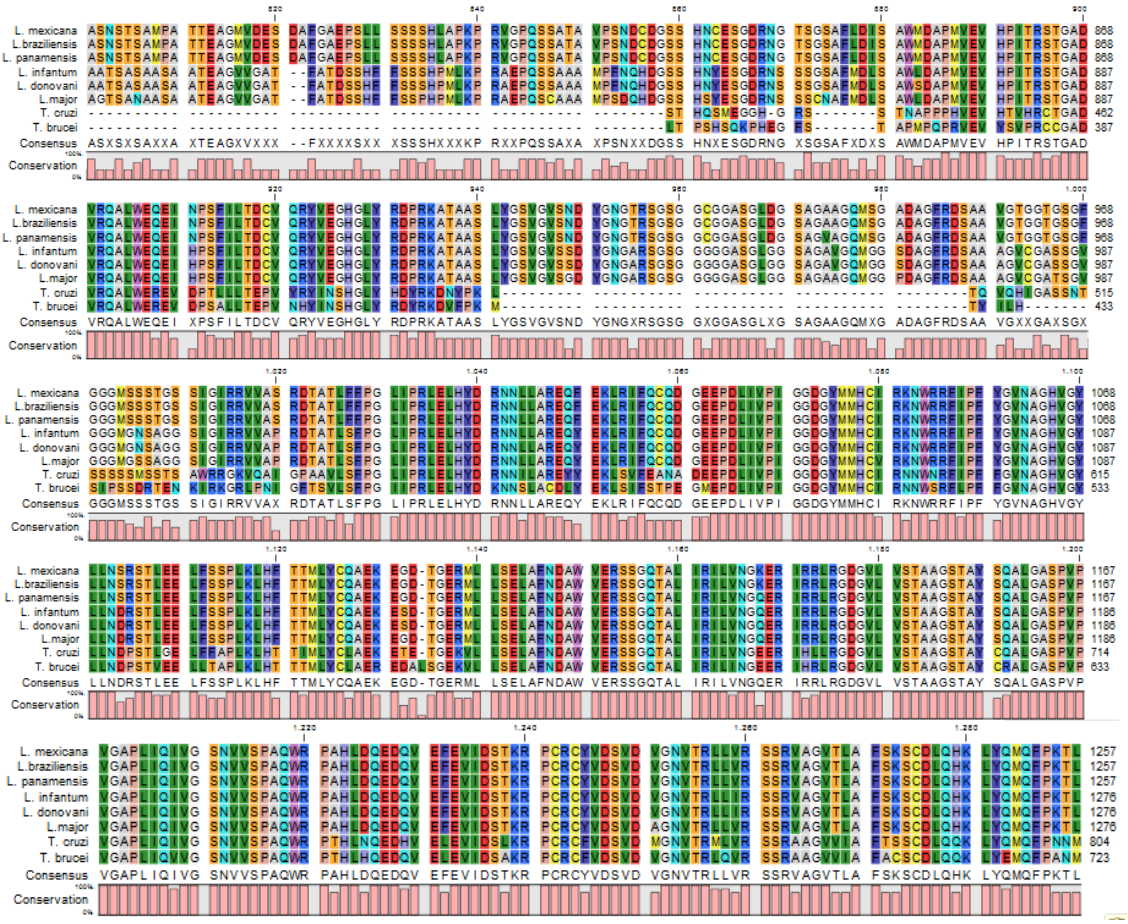
	PIVVPAGVELKISVSPDSRNTSWVSFDGRNRQELFHG DSLRVTTSIYPVPSICAADQITDWFDSLAECLHWNVR KKQKHLDELSDLTHSSSNDTLDSLDRDS		
Plantas verdes	ESALFWGQELWLGTIDREDYAPQVFVSDYHSEGRTS AMSRWQRSDGSSENGFDSLSSEKALQQDPLKAQDPP LNEFSRKEMSRFAEGKAIAPAEYAEWKRKELERAPN SRLEHKGGSSEGENGDNRTNLSNQLLSNSQSECKNG ICSHEVLSDDELEGNMCASATGVVRVQSRRKAEMFL VRTDGWSCTREKVTESSLAFTHPSTQQQMLKWKST PKTVLLLKKLGTELMEEAKEASFLYEQEKMNVLVEP RVHDLFARIPGFGVQTFYDQDTSDLHEKVDLVACLG GDGVILHASNLFKGAVPPVVSFNLGSLGFTSHHFED YRQDLDQVIHGNNXIGVYITLRMRLRCEIFRNGKAM PGKVFDVLNEVVVDRGSNPYLSKIECYEHDXLITKV QGDGVIVATPTGSTAYSTAAGGSMVHPNVPCMLFTP ICPHSLSFRPVILPDSATLELKIPFDARSNAWVSFDGK RRQQLSRGDSVRISMSXHPLPTVNKVDQTGDWFRSL IRCLNWNERLDQKAL	520	250

Anexo 2. Candidatos a NADK identificados mediante BLAST con las 5 secuencias consenso

Especie	No identificación	Consenso 1			Consenso 2			Consenso 3			Consenso 4			Consenso 5			Descripción
		E-value	Cobertura	Identidad	E-value	Cobertura	Identidad	E-value	Cobertura	Identidad	E-value	Cobertura	Identidad	E-value	Cobertura	Identidad	
L, major	Gi: 157864208	4.00E-08	39%	28%	2.00E-07	39%	28%	3.00E-05	48%	30%	2.00E-06	42%	28%	5.00E-05	33%	27%	ATP-NAD kinase-like protein
L. donovani	Gi: 398010313	4.00E-07	39%	27%	2.00E-06	39%	27%	7.00E-05	48%	30%	9.00E-06	42%	27%	3.00E-04	33%	26%	ATP-NAD kinase-like protein
L. mexicana	Gi: 401415126	2.00E-07	39%	27%	7.00E-07	39%	27%	2.00E-04	48%	29%	1.00E-05	42%	27%	2.00E-05	33%	27%	ATP-NAD kinase-like protein
L. braziliensis	Gi: 389599909	1.00E-08	39%	28%	5.00E-08	39%	28%	4.00E-04	48%	29%	8.00E-07	42%	28%	6.00E-05	33%	27%	ATP-NAD kinase-like protein
L. panamensis	Gi: 731711555	4.00E-08	39%	28%	2.00E-07	39%	28%	3.00E-04	48%	29%	2.00E-06	42%	28%	6.00E-05	33%	27%	ATP-NAD kinase-like protein
L. infantum	Gi: 146071480	4.00E-07	39%	27%	2.00E-06	39%	27%	6.00E-05	48%	30%	1.00E-05	42%	27%	4.00E-04	33%	26%	ATP-NAD kinase-like protein

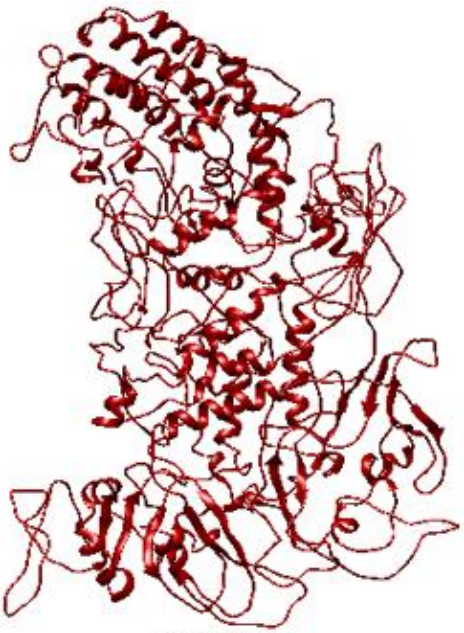
Anexo 3. Alineamiento múltiple entre los candidatos a NADK y sus homólogos en otros tripanosomatidos




L. mexicana
L.braziliensis
L. panamensis
L. infantum
L. donovani
L.major
T. cruzi
T. brucei
Consensus
Conservation

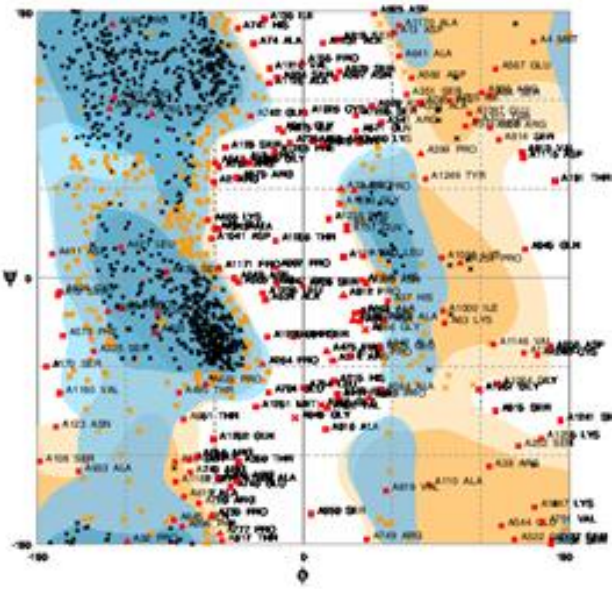
Anexo 4. Obtención y evaluación de modelos estructurales del candidato LbNADK. **(A)** Modelo de estructura tridimensional de la secuencia de aminoácidos completa del candidato LbNADK. **(B)** Evaluación del modelo de estructura tridimensional de la LbNADK mediante Plot de Ramachandran, residuos en región favorecida 65.3%, residuos en región permitida 21%, residuos en región no permitida 13.7%.

A



PDB: 5EJH
C-score: -1.84

B



Anexo 5. Sitios de fosforilación predichos mediante el servidor Netphos para las proteínas LbNADK, HsNADK1 y HsNADK2. (PKC) Proteína quinasa C. (PKA) Proteína quinasa A. (UNSP) Proteína quinasa no especificada.

HsNADK2				
#Aminoacido	**Aminoacido**	**Secuencia**	**Score**	**Kinasa**
77	T	VVAKTTRYE	0.744	PKC
78	T	VAKTTRYEF	0.946	unsp
93	S	YAELSEEDL	0.998	unsp
106	S	ALKGSSYSG	0.713	PKA
107	S	LKGSSYSGL	0.778	unsp
119	T	HHIHTKNVE	0.757	PKC
128	S	HIIDSLRNE	0.757	PKC
148	T	YDEETVRWA	0.957	unsp
188	S	DPERSEGHL	0.902	unsp
285	S	GESLSSRAS	0.957	unsp
289	S	SSRASYYEI	0.997	unsp
294	S	YYEISVDDG	0.963	unsp
306	S	KQKSSGLNL	0.8	PKA
328	T	NRVATQAVE	0.838	unsp
367	S	SLLYSPEEP	0.997	unsp
376	S	KILFSIREP	0.978	unsp
387	S	NRVFSSSRQ	0.996	unsp
388	S	RVFSSSRQR	0.855	PKC
395	S	QRCFSSKVC	0.812	PKC
415	T	VDGGTSFEF	0.74	unsp
416	S	DGGTSFEFN	0.939	Unsp

HsNADK1				
#Aminoacido	**Aminoacido**	**Secuencia**	**Score**	**Kinasa**
29	S	QDPASQRLT	0.964	unsp
33	T	SQRLTWNKS	0.909	PKC
37	S	TWNKSPKSV	0.866	unsp
40	S	KSPKSVLVI	0.777	PKC
51	S	XRDASLLQP	0.748	PKA
97	T	KKFCTFRED	0.851	unsp
102	S	FREDYDDIS	0.979	unsp
142	S	FHLGSLGFL	0.75	PKA

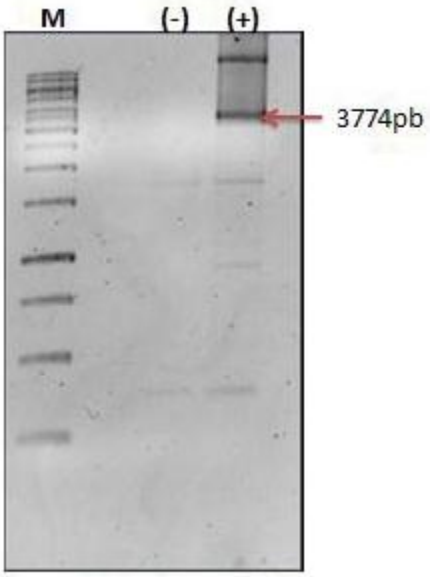
147	T	LGFLTPFSF	0.779	unsp
227	S	DRGPSSYLS	0.845	unsp
228	S	RGPSSYLSN	0.859	unsp
231	S	SSYLSNVDV	0.935	unsp
311	T	EARNTAWVS	0.864	unsp
329	S	RHGDSISIT	0.854	unsp

LbNADK				
#Aminoácido	**Aminoácido**	**Secuencia**	**Score**	**Quinasa**
5	S	MRRMSVVLC	0.855	PKA
15	Y	SGDPYHVPS	0.914	Uns
62	S	FSAASKPHS	0.754	PKC
66	S	SKPHSPSSN	0.997	unsp
69	S	HSPSSNISS	0.878	unsp
97	S	LSSASPGPS	0.941	unsp
115	S	KAIHSGIAA	0.821	unsp
128	S	IFGRSTKGT	0.763	PKC
129	T	FGRSTKGTV	0.718	unsp
132	T	STKGTVGIS	0.859	PKC
139	S	ISSSSPVAQ	0.986	unsp
144	S	PVAQSGSSD	0.937	unsp
147	S	QSGSSDEWQ	0.994	unsp
161	T	MGASTPTPS	0.845	unsp
165	S	TPTPSSSSS	0.855	unsp
166	S	PTPSSSSSS	0.981	unsp
167	S	TPSSSSSSF	0.768	unsp
168	S	PSSSSSSFS	0.991	unsp
169	S	SSSSSSFSD	0.828	unsp
170	S	SSSSSFSDL	0.997	unsp
172	S	SSSFSDLDP	0.994	unsp
183	S	CGTSSPYWY	0.807	unsp
194	S	AFATSLRED	0.987	unsp
199	S	LREDSQLAP	0.943	unsp
218	S	RHPVSLRQS	0.825	PKC
314	S	RPAGSVSRL	0.759	unsp
319	T	VSRLTSRQY	0.894	PKC
325	S	RQYHSPIGQ	0.991	unsp
333	S	QYVRSPEEA	0.997	unsp

339	Y	EEADYYRRA	0.957	unsp
340	Y	EADYYRRAE	0.753	unsp
351	S	MKAASMHRR	0.909	unsp
369	S	TADRSDPES	0.975	unsp
373	S	SDPESSMEM	0.996	unsp
374	S	DPESSMEMR	0.968	unsp
383	S	CESASLVDR	0.987	unsp
389	S	VDRESDYFD	0.991	unsp
391	Y	RESDYFDDV	0.961	unsp
414	S	SDNGSKERK	0.981	unsp
420	S	ERKESLPPK	0.77	PKA
432	S	VRARSPLLR	0.933	unsp
440	T	RGGDTTTRT	0.897	unsp
441	T	GGDTTTRTA	0.948	unsp
446	S	TRTASTAST	0.991	unsp
449	S	ASTASTSVT	0.959	unsp
451	S	TASTSVTVA	0.815	unsp
462	T	GGHTTVPKR	0.77	PKC
469	S	KRGLSRRRI	0.769	PKC
474	S	RRRISPVHE	0.82	PKA
495	T	RWWNTPGGR	0.938	unsp
512	S	RSYWSSTSS	0.8	unsp
513	S	SYWSSTSSS	0.778	PKC
517	S	STSSSWLGG	0.904	unsp
551	S	RCQHSDGSD	0.949	unsp
557	S	GSDGSSIDA	0.989	unsp
558	S	SDGSSIDAA	0.861	unsp
603	S	GFALSVNAP	0.811	PKC
622	T	RAGTTTAKV	0.804	unsp
623	T	AGTTTAKVA	0.762	PKC
632	T	GAGSTTYRT	0.836	PKC
638	T	YRTGTASAV	0.849	unsp
645	S	AVPTSPEGQ	0.997	unsp
680	S	LRSASAAAG	0.846	unsp
701	T	GAAGTARSN	0.894	PKC
706	S	ARSNSTSSR	0.71	PKA
707	T	RSNSTSSRA	0.803	PKC
708	S	SNSTSSRAS	0.866	PKC
709	S	NSTSSRASK	0.818	PKC

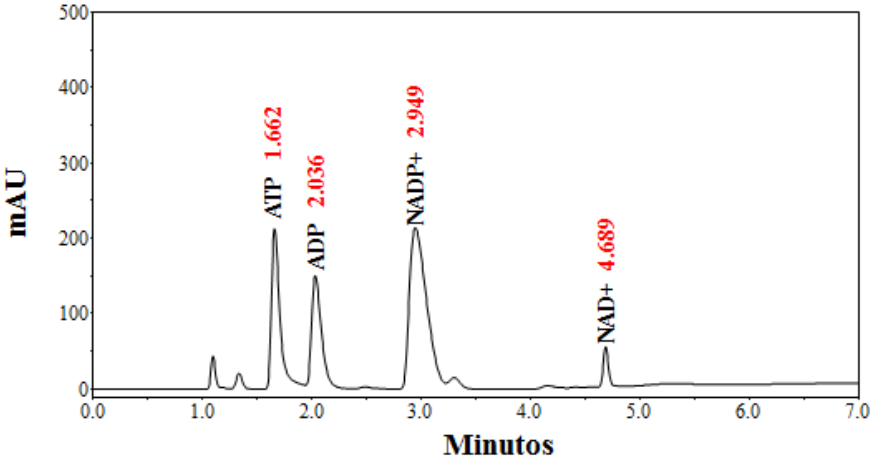
712	S	SSRASKTHD	0.994	unsp
727	T	IIRSTARPF	0.891	PKC
750	T	RRNRTVRQL	0.74	PKC
764	Y	PPRTYASVG	0.78	unsp
766	S	RTYASVGAS	0.722	PKC
839	T	DRNGTSGSA	0.873	unsp
865	T	ITRSTGADV	0.881	unsp
905	T	PRKATAASL	0.753	PKA
908	S	ATAASLYGS	0.844	unsp
910	Y	AASLYGSVG	0.809	unsp
912	S	SLYGSVGVS	0.724	PKC
919	Y	VSNDYGNGT	0.772	unsp
925	S	NGTRSGSGG	0.949	unsp
927	S	TRSGSGGCG	0.985	unsp
934	S	CGGASGLDG	0.93	unsp
947	S	AGQMSGADA	0.947	unsp
978	S	SSTGSSIGI	0.897	unsp
993	T	RDTATLFFP	0.72	PKC
1007	Y	LELHYDRNN	0.786	unsp
1043	Y	GGDGYMMHC	0.833	Unsp
1075	T	NSRSTLEEL	0.957	Unsp
1154	S	TAAGSTAYS	0.749	PKC
1204	S	EVIDSTKRP	0.717	PKC
1205	T	VIDSTKRPC	0.75	PKC
1229	S	LVRSSRVAG	0.752	PKA
1235	T	VAGVTLAFS	0.792	PKC

Anexo 6. Amplificación de la *lbnadk* completa a partir del vector pGEMT-Easy-*lbnadk*



TBE 0.5X Agarosa 0.8%%
Tinción bromuro etidio

Anexo 7. Determinación de tiempos de retención de los nucleótidos de la reacción enzimática de las NADK mediante RP-HPLC. A: Cromatograma obtenido. B: Tiempos de retención de los 4 nucleótidos de la reacción.



Nucleótido	Tiempo de retención
ATP	1.662
ADP	2.036
NADP	2.949
NAD	4.689