



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Aproximación al estudio de la poli ADP ribosilación
en protozoarios de interés en salud: Identificación y
caracterización de un candidato a poli (ADP-ribosa)
polimerasa de *Leishmania braziliensis***

Luis David Ramírez Enríquez

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2025

**Aproximación al estudio de la poli ADP ribosilación en
protozoarios de interés en salud: Identificación y
caracterización de un candidato a poli (ADP-ribosa)
polimerasa de *Leishmania braziliensis***

Luis David Ramírez Enríquez

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias - Bioquímica

Directora

Dr. rer. nat. María Helena Ramírez Hernández

Línea de investigación:

Bioquímica

Grupo de investigación:

Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica - LIBBIQ

Universidad Nacional de Colombia

Faculta de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2025

*“Se puede matar todo menos la nostalgia del reino,
la llevamos en el color de los ojos, en cada amor, en
todo lo que profundamente atormenta y desata y engaña”*

Julio Cortázar

Agradecimientos

Agradecimientos muy especiales a todos los soles de mi vida: mis abuelos Omar y Alba; a mis padres Alba y Diego; a los locos de mi corazón, Pipe y Camilo; a mi hogar y fantástica compañera de vida, Dani, gracias por todo el calor; a Leito y a Luigi. He sabido brillar gracias a ustedes.

Manifiesto mi profundo agradecimiento a la profesora María Helena Ramírez por creer en mi desde los primeros momentos, quien no solo fue mi directora de tesis, sino también una gran maestra con todas las connotaciones de la palabra. Al profesor Luis Ernesto Contreras por su incansable disposición a colaborar. A todo el grupo libbiq le debo mi crecimiento como joven investigador y persona.

Agradecimientos al profesor Mathias Ziegler y Marc Niere por su inconmensurable ayuda durante mi pasantía.

Al proyecto de alianza “Generación de insumos de relevancia biotecnología: en busca del fortalecimiento de laboratorios de docencia e investigación de biología molecular (HERMES: 57423)”, la sección de bienestar de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia y a la DIB que con la movilidad número 14360 aportaron un estipendio para mi movilidad internacional y permitieron la realización de este trabajo.

Sin la literatura y el *jazz* esto tampoco hubiese sido posible.

Resumen

Aproximación al estudio de la poli ADP ribosilación en protozoarios de interés en salud: Identificación y caracterización de un candidato a poli (ADP-ribosa) polimerasa de *Leishmania braziliensis*.

Las poli ADP-ribosa polimerasas (PARPs) son miembros de una amplia familia de proteínas que catalizan la transferencia de motivos ADP-ribosa provenientes del NAD⁺ a diferentes moléculas blanco. En mamíferos se ha encontrado que los polímeros de ADP-ribosa están involucrados en diversos procesos celulares como la preservación de la integridad del genoma, transcripción génica, reparación del ADN, entre otras. Las PARP han sido poco estudiadas en organismos unicelulares de alta incidencia en la salud pública. A la fecha esta proteína ha sido identificada y caracterizada en algunos miembros de la familia *Trypanosomatidae*. Por otro lado, en parásito del género *Leishmania* se han presentado varios reportes que dejan en la ambigüedad la existencia de una PARP en estos parásitos.

El principal propósito de esta investigación pretende realizar una incursión en la determinación de la existencia de una proteína tipo PARP en *Leishmania braziliensis* (LbPARP), una de las especies del género *Leishmania* que causa leishmaniasis en humanos. Para lo anterior, se partió de la amplificación de un candidato a LbPARP a partir de DNA genómico de promastigotes de *Leishmania braziliensis*, de donde fue posible clonar tres versiones del candidato en vectores de expresión en *E.coli*: pQE30-tLbPARP, pET26b(+)-Cter LbPARP y pET SUMO Nter LbPARP. La evaluación de las dos primeras versiones fue posible mediante estrategias *in vitro* (6xHis-tLbPARP) e *in vivo* (MTS-EGFP-Cter LbPARP) a través de su expresión en células de mamífero.

La obtención del candidato recombinante permitió la generación de anticuerpos α -6xHis tLbPARP a partir de un modelo aviar, con esta herramienta fue posible determinar la localización intracelular del candidato en promastigotes. Adicionalmente, se hizo una exploración a través de herramientas bioinformáticas para la identificación de proteínas candidatas a varios factores del sistema de ADP-ribosilación en parásitos del género *Leishmania*.

La identificación funcional de la proteína candidato a LbPARP se abordó combinando diferentes estrategia metodológicas y niveles celulares haciendo evidente la complejidad de los mecanismos de regulación que modulan la actividad de una proteína, los cuales deben ser considerados en estos estudios. Los resultados obtenidos representan un paso importante en la determinación de la existencia de una proteína tipo PARP en parásitos del género *Leishmania*.

Palabras clave: dinucleótido de adenina y nicotinamida (NAD⁺), *Leishmania braziliensis*, poli ADP-ribosa polimerasa (PARP).

Abstract

Approach to the study of poly ADP ribosylation in protozoa of health interest: Identification and characterization of a candidate poly (ADP-ribose) polymerase from *Leishmania braziliensis*.

Poly ADP-ribose polymerases (PARPs) are members of a large family of proteins that catalyze the transfer of ADP-ribose motifs from NAD⁺ to different target molecules. In mammals, ADP-ribose polymers have been found to be involved in diverse cellular processes such as preservation of genome integrity, gene transcription, DNA repair, among others. PARPs have been studied little in unicellular organisms of high incidence in public health. To date, this protein has been identified and characterized in some members of the *Trypanosomatidae* family. On the other hand, in parasites of the genus *Leishmania* there have been several reports that leave the existence of a PARP in these parasites ambiguous.

The main purpose of this research is to make an incursion into the determination of the existence of a PARP-like protein in *Leishmania braziliensis* (LbPARP), one of the species of the genus *Leishmania* that causes leishmaniasis in humans. For this purpose, a candidate LbPARP was amplified from genomic DNA of *Leishmania braziliensis* promastigotes, from which it was possible to clone three versions of the candidate in expression vectors in E.coli: pQE30-tLbPARP, pET26b(+)-Cter LbPARP and pET SUMO Nter LbPARP. The evaluation of the first two versions was possible by *in vitro* (6xHis-tLbPARP) and *in vivo* (MTS-EGFP-Cter LbPARP) strategies through their expression in mammalian cells.

Obtaining the recombinant candidate allowed the generation of α -6xHis tLbPARP antibodies from an avian model, with this tool it was possible to determine the intracellular localization of the candidate in promastigotes. Additionally, an exploration was made through bioinformatics tools for the identification of candidate proteins for several factors of the ADP-ribosylation system in parasites of the genus *Leishmania*.

The functional identification of the LbPARP candidate protein was approached combining different methodological strategies and cellular levels, making evident the complexity of the regulatory mechanisms that modulate the activity of a protein, which must be considered in these studies. The results obtained represent an important step

in the determination of the existence of a PARP-like protein in parasites of the genus *Leishmania*.

Key words: nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺), *Leishmania braziliensis*, poly ADP-ribose polymerase (PARP).

Contenido

Resumen.....	VIII
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas	XV
Lista de símbolos y abreviaturas	XVI
Introducción.....	1
1. Marco Teórico.....	2
1.1. ADP-ribosilación	2
1.2. Funciones celulares de la ADP-ribosilación	2
1.3. Código PAR	3
1.3.1. Enzimas encargadas de realizar ADP-ribosilación: Escritoras	4
1.3.2. Enzimas involucradas en la remoción de la ADP-ribosilación: Borradoras	7
1.3.3. Proteínas que reconocen señales de ADP-ribosilación: Lectoras	8
1.4. ADP-ribosilación y estabilidad génica	9
1.5. Distribución de las PARPs en los dominios de la vida	11
1.6. Protozoarios.....	12
1.6.1. Parásitos protozoarios.....	13
1.7. Leishmaniasis.....	15
1.8. Poli ADP-ribosilación en tripanosomátidos	17
2. Justificación.....	22
3. Hipótesis.....	23
4. Objetivos.....	23
4.1. General	23
4.2. Específicos	23
5. Materiales y métodos	24
5.1. Clonación y expresión de varias versiones del candidato a LbPARP	24
5.1.1. Generación de la proteína recombinante 6xHis tLbPARP en el sistema heterólogo de <i>E.coli</i>	24
5.1.2. Expresión de una versión truncada extendida de LbPARP (Cter LbPARP) en sistema heterólogo de <i>E.coli</i>	30
5.1.3. Aproximación a la obtención de una versión N-terminal del candidato a LbPARP (Nter LbPARP)	31
5.2. Ensayos de Poli-ADP ribosilación	32
5.2.1. Ensayo de ADP-ribosilación <i>in vitro</i>	32
5.2.2. Evaluación de actividad de poli ADP-ribosilación <i>in vivo</i> en HEK-293 y HeLa S3	34
5.3. Determinación de localización celular de LbPARP en promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> mediante el desarrollo de una herramienta inmunológica en modelo aviar	38

5.4.	Exploración <i>in silico</i> de componentes de ADP-ribosilación en parásitos del género <i>Leishmania</i>	42
6.	Resultados y discusión	42
6.1.	Construcción del plásmido recombinante pQE30-tLbPARP	42
6.2.	Expresión de 6xHis tLbPARP en el sistema heterólogo de <i>E.coli</i>	44
6.3.	Purificación de 6xHis tLbPARP	49
6.4.	Expresión y purificación de Cter LbPARP-6xHis	52
6.5.	Aproximación a la obtención de una versión N-terminal del candidato a LbPARP (Nter LbPARP)	55
6.6.	Estrategia <i>in vitro</i> para la evaluación catalítica del candidato	57
6.7.	Estrategia <i>in vivo</i> de evaluación catalítica del candidato	64
6.8.	Determinación de localización celular de LbPARP en promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> mediante el desarrollo de una herramienta inmunológica en modelo aviar	72
6.9.	Exploración <i>in silico</i> de componentes de código PAR en parásitos del género <i>Leishmania</i>	81
7.	Conclusiones y perspectivas	90
7.1.	Conclusiones.....	90
7.2.	Perspectivas	91
	Bibliografía	92

Lista de figuras

Figura 1. Esquema general de reacción de ADP-ribosilación.....	2
Figura 2. Funciones celulares asociadas al proceso de ADP-ribosilación.	3
Figura 3. Componentes del código PAR	4
Figura 4. Esquema de clasificación de enzimas con actividad de ADP-ribosa.	4
Figura 5. Dominio ART de la toxina de difteria de <i>Corynephage beta</i> (PDB: 1DTP).	5
Figura 6. Representación estructural de los dominios que constituyen a PARP1 de humano	6
Figura 7. ADP-ribosa glicosil hidrolasas de dos macrodominios (PARG y MACROD2) y un ARH co-cristalizados con sus sustratos	8
Figura 8. Estructura terciaria de dos dominios lectores de señales de ADP-ribosilación	9
Figura 9. Modelo del mecanismo de activación de PARP1 en respuesta a daños de DNA.....	10
Figura 10. Visualización de dominios de los diferentes clados de las ARTDs.....	12
Figura 11. Distribución global de 21 especies de <i>Leishmania</i> patogénicas para humanos	16
Figura 12. Representación esquemática ciclo de vida de parásitos del género <i>Leishmania</i>	17
Figura 13. Visualización de dominios conservados en PARPs de varios ortólogos	19
Figura 16. Esquema de las tres versiones de LbPARP clonadas en este estudio.	24
Figura 17. Generación e identificación del plásmido recombinante pQE30-tLbPARP. ... ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 18. Expresión de 6xHis tLbPARP (30 kDa) en <i>E.coli</i> BL21 Rosetta 2 (DE3).	45
Figura 19. Expresión de 6xHis tLbPARP (30 kDa) en <i>E.coli</i> M15(pREP4).	46
Figura 20. Solubilidad de 6xHis tLbPARP en fracciones de lisado celular M15(pREP4) inducido (IPTG 0,5 mM) por 2h.....	47
Figura 21. Solubilidad de 6xHis tLbPARP (30 kDa) en fracciones de lisado celular de medio de inducción suplementado con sorbitol 0,5 M.	48
Figura 22. Purificación de 6xHis tLbPARP (30 kDa) a partir de cuerpos de inclusión.....	50
Figura 23. Purificación de 6xHis tLbPARP (30 kDa) a partir de la fracción soluble de células M15(pREP4)	51
Figura 24. Expresión y purificación de Cter LbPARP-6xHis (57 kDa) por IMAC.	53
Figura 25. Purificación por IMAC denaturante de Cter LbPARP-6xHis (53 kDa).	54
Figura 26. Generación e identificación de pET SUMO Nter LbPARP.	56
Figura 27. Expresión de controles de actividad PARP (tLbPARP-30 kDa, TcPARP-65 kDa, TbPARP-66 kDa, HscatiPARP-40 kDa y HscatPARP kDa) en <i>E.coli</i>	59
Figura 28. Purificación de controles de actividad PARP (tLbPARP-30 kDa, TcPARP-65 kDa, TbPARP-66 kDa, HscatiPARP-40 kDa y HscatPARP kDa).....	60

Figura 29. Evaluación de controles de actividad PARP (tLbPARP-30 kDa, TcPARP-65 kDa, TbPARP-66 kDa, HscatiPARP-40 kDa y HscatPARP kDa) post-diálisis.	61
Figura 30. Evaluación de actividad de poli ADP-ribosa polimerasa de 6xHis tLbPARP a través de western blot en membrana de nitrocelulosa. Lisado de HEK-293	62
Figura 31. Evaluación de actividad de poli ADP-ribosa polimerasa de 6xHis tLbPARP-30 kDa.	63
Figura 32. Generación de los plásmidos recombinantes de expresión en el sistema eucariota: pCMV-EGFP-CterLbPARP/catTcPARP.	66
Figura 33. Evaluación de actividad de poli ADP-ribosa polimerasa de MTS-EGPF- Cter LbPARP y MTS-EGFP-catTcPARP in vivo en extractos de células HEK-293.	67
Figura 34. Evaluación de actividad de poli ADP-ribosa polimerasa de Cter LbPARP y catTcPARP in vivo en células HeLa S3 a través de inmunocitoquímica.	69
Figura 35. Caracterización de suero aviar α -6xHis-tLbPARP por western blot.	73
Figura 36. Purificación de IgYs a partir de yemas huevo mediante precipitación con PEG6000.	74
Figura 37. Cuantificación y evaluación de IgYs α -6xHis-tLbPARP purificadas a partir de fracción hidrosoluble de yemas mediante precipitación con PEG6000.	75
Figura 38. Evaluación de producción de IgYs α -6xHis-tLbPARP a través de ensayos de ELISA.	77
Figura 39. Evaluación por dot blot de IgYs α -6xHis-tLbPARP purificados mediante afinidad a partir de suero S4.	78
Figura 40. Inmunodetección de candidato a LbPARP endógena en promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> mediante microscopía de fluorescencia.	79
Figura 41. Comparación de estructuras tridimensionales de proteínas candidatas de <i>Leishmania infantum</i>	83
Figura 42. Predicción in silico de MPTs del candidato a LbPARP.	86
Figura 43. Resumen gráfico	90

Lista de tablas

Tabla 1.	Características generales de los parásitos protozoarios más importantes en salud humana.	14
Tabla 2.	Primers empleados para la amplificación de Lbparp y tLbparp.....	25
Tabla 3.	Primers empleados para la corroboración de identidad de pQE30 tLbPAR.	26
Tabla 4.	Primers empleados en la construcción de pCMV mito Cter LbPARP y catTcPARP.	34
Tabla 5.	Esquema de inmunización de modelo aviar para la obtención de IgYs contra 6xHis-tLbPARP.	38
Tabla 6.	Características bioquímicas de los candidatos a ARTD1, ARTD10, MacroD2 y ARH3 de parásitos del género <i>Leishmania</i>	82

Lista de símbolos y abreviaturas

NAD⁺: Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado

PARP: Poli ADP-ribosa polimerasa

MART: Mono ADP-ribosa transferasa

PAR: Polímeros de ADP-ribosa

MAR: Monómero de ADP-ribosa

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizante

WB: Western blot

PBS: Buffer fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDB: Protein Data Bank

PEG: Polietilenglicol

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

kDa: Kilo Dalton

OMS: Organización mundial de la salud

IgG: Inmunoglobulina G

IgY: Inmunoglobulina Y

IMAC: Cromatografía de afinidad a metales inmovilizados

DNA: Ácido desoxirribonucleótido

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DIC: Contraste de interferencia diferencial

GFP: Proteína verde fluorescente

MTS: Señal de direccionamiento a la mitocondria

6xHis: Etiqueta de hexa-histidinas

ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

Introducción

La leishmaniasis es causada por cerca de 20 especies de los parásitos intracelulares del género *Leishmania*, los cuales son transmitidos entre hospederos mamíferos por 30 especies diferentes de dípteros de la subfamilia *Phlebotominae*, conocidos comúnmente como moscas de la arena, es importante destacar que esta enfermedad no solo afecta humanos sino también otros mamíferos, creando reservorios zoonóticos lo que tiene serias implicaciones para el control de esta enfermedad ^{1,2}.

Esta parasitemia en humanos tiene tres manifestaciones clínicas : cutánea (LC), mucocutánea (MC) y visceral (LV). A nivel mundial esta enfermedad tiene una distribución en cerca de 100 países, la incidencia anual de LC estimada a nivel mundial se encuentra entre los 0,7 y 1,2 millones de casos, siendo sur América, América central, medio oriente, Etiopía y el norte de África las regiones más endémicas. De acuerdo con la organización panamericana de salud, esta enfermedad se encuentra entre las diez principales enfermedades tropicales desatendidas con más de 12 millones de personas infectadas en todas sus manifestaciones clínicas. En el caso de Colombia, según datos epidemiológicos del instituto nacional de salud, en el 2024 se reportó un acumulado de 5116 casos, presentándose como una problemática en salud pública. Se estima que cerca del 95% de los casos ocurren en las américas ²⁻⁷.

Los tratamientos de infecciones causadas por *Leishmania* se han abordado desde varias perspectivas. Aquí nos centraremos en los tratamientos basados en la administración de fármacos que buscan alterar alguna función vital en los parásitos. Los tratamientos quimioterapéuticos para esta enfermedad se fundamentan en la administración de anfotericina B y amonios pentavalentes, los cuales pueden llegar a producir cuadros severos de nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, entre otros efectos secundarios indeseables ⁸.

El desarrollo de una administración de anfotericina B a través de liposomas ha producido buenos resultados en cuanto al aumento de la eficacia en el tratamiento de la enfermedad y la disminución de los efectos adversos en los pacientes, sin embargo, esta vía de administración resulta en el aumento del costo del tratamiento. Desde su amplia distribución a nivel local y mundial, pasando por la complejidad de su proceso hasta la aparición de nuevas cepas farmacorresistentes; las enfermedades parasitarias causadas por *Leishmania* plantean la urgencia de encontrar nuevas dianas terapéuticas contra esta enfermedad, las cuales se pueden basar en el entendimiento de la bioquímica y biología celular del parásito ⁸.

Por lo anterior, nuestro grupo de investigación centra sus investigaciones en la generación de conocimiento básico en torno al metabolismo energético de este tipo

de parásitos delimitándolo especialmente a los procesos celulares que se desarrollan alrededor del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) con el ánimo de proponer eventuales dianas farmacológicas para el tratamiento de la leishmaniasis. En este trabajo se aborda la exploración del sistema de ADP-ribosilación en *Leishmania braziliensis* a través de la determinación de la existencia de una proteína tipo PARP en este parásito.

1. Marco Teórico

1.1. ADP-ribosilación

La ADP-ribosilación es un tipo de modificación postraduccional (MPT) reversible, altamente conservada en eucariotes. Esta modificación consiste en la transferencia de uno o varios motivos de ADP-ribosa (ADPr) provenientes del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD^+) a una proteína aceptora, esta transferencia ocurre sobre aminoácidos con cadenas laterales que poseen oxígenos, nitrógenos o azufres nucleofílicos, lo que resulta en la formación de un enlace *N*-, *O*- o *S*-glucosídico, siguiendo un mecanismo de reacción de tipo $\text{S}_{\text{N}}2$ en donde el ataque nucleofílico se realiza sobre el carbono anomérico $\text{C}1''$, como se muestra en la figura 1. La reacción de ADP-ribosilación puede ser repetida sobre el grupo hidroxilo $2''$ o $2'$ para la elongación o ramificación de la modificación. Este tipo de MPT altera las propiedades funcionales de las proteínas gracias a que: (i) A pH fisiológico los motivos de ribosa poseen dos cargas negativas y (ii) el anillo de adenina puede generar interacciones por puentes de hidrógeno o hidrofóbicas. Es importante resaltar que la ADP-ribosilación puede presentarse bajo dos modalidades: como mono ADP-ribosilación (MARilación) o como poli-ADP-ribosilación (PARilación)⁹⁻¹².

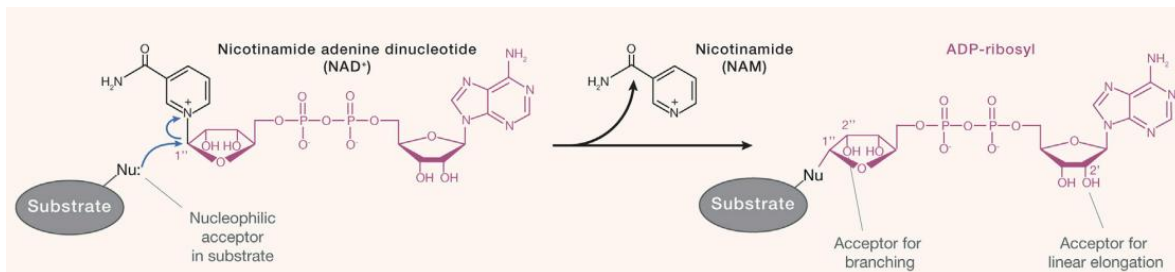


Figura 1. Esquema general de reacción de ADP-ribosilación, tomado de [12].

En los últimos años, se ha aumentado el tipo de biomoléculas que son sujetas a ADP-ribosilación, en estudios *in vitro* se ha podido observar la ADP-ribosilación reversible de ácidos nucleicos en bacterias, levaduras, mamíferos y plantas, lo que supone la apertura de un nuevo campo de estudio en el contexto de estas MPTs. La ADP-ribosilación de ácidos nucleicos puede ser dividida en tres categorías: ADP-ribosilación de bases de DNA, ADP-ribosilación de DNA fosforilado y ADP-ribosilación de extremos de RNA fosforilados¹³.

1.2. Funciones celulares de la ADP-ribosilación

La ADP-ribosilación es crucial en diversos procesos celulares tales como respuesta a daños de DNA, integridad génica, regulación de cromatina, biología telomérica,

replicación, control del ciclo, transcripción, metabolismo del RNA, inflamación, inmunidad y muerte celular. Debido a su versatilidad en este conjunto de funciones celulares, esta MPT puede estar relacionada en varios procesos pato-fisiológicos, siendo el más prominente la carcinogénesis. El rol regulatorio de esta modificación requiere del tiempo necesario para su generación y remoción; así mismo como su interpretación fisiológica adecuada en aras de desencadenar el evento celular adecuado. Lo anterior constituye el establecimiento de un lenguaje a nivel celular denominado “código PAR”⁹⁻¹⁴.

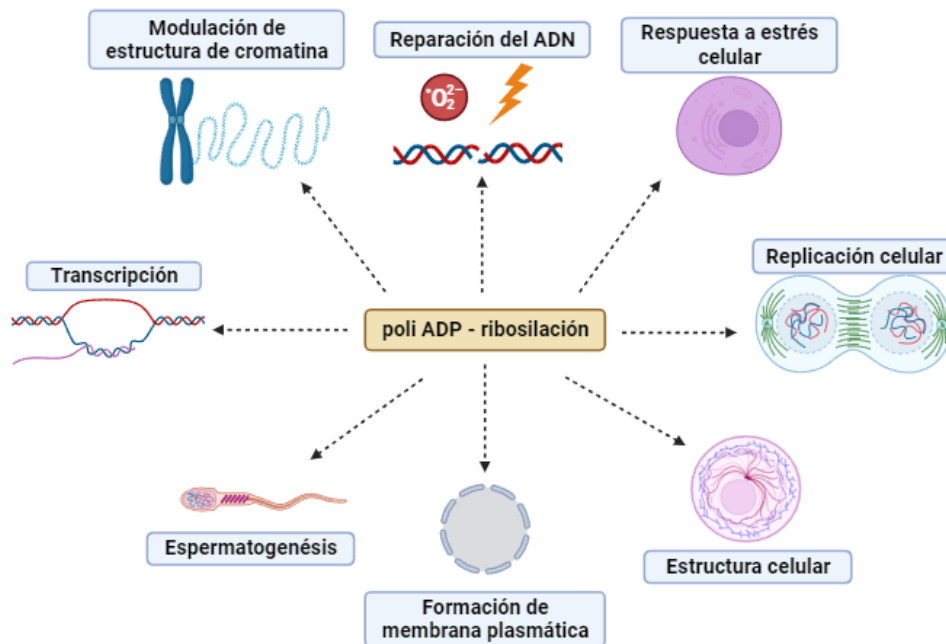


Figura 2. Funciones celulares asociadas al proceso de ADP-ribosilación, adaptado de [14].

1.3. Código PAR

Para que un lenguaje sea reconocido como tal, debe establecerse el fenómeno de interlocución, lo que implica una serie de pasos que van desde la emisión del mensaje hasta la ejecución de este. Así, el surgimiento del código PAR se da gracias a la instauración de complejas interacciones entre varios componentes celulares que articulan las diferentes etapas que constituyen este código. La descripción de las etapas y proteínas que hacen parte de este sistema serán cubiertas a continuación, haciendo un énfasis sobre las enzimas encargadas de generar la poli ADP-ribosilación

12.

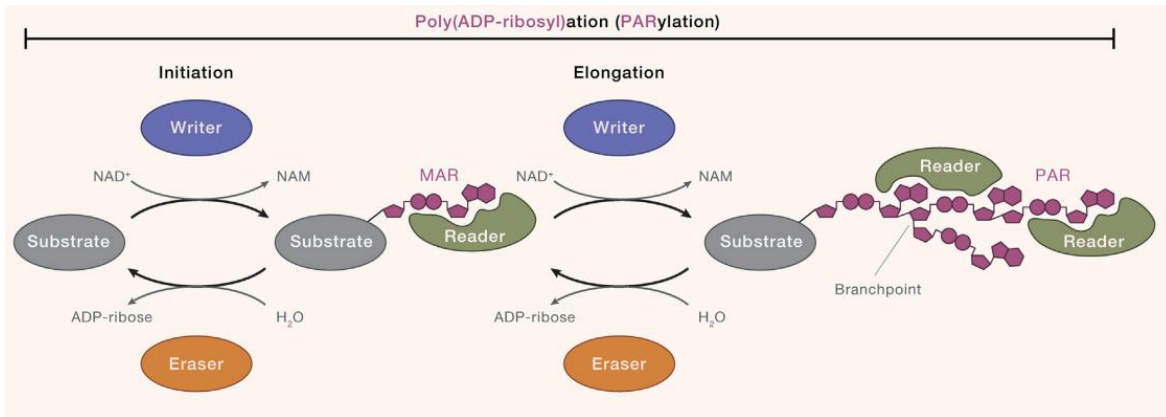


Figura 3. Componentes del código PAR tomado de [12].

1.3.1. Enzimas encargadas de realizar ADP-ribosilación: Escritoras

El primer eslabón del código PAR estará constituido por las proteínas encargadas de escribir el mensaje, esto es, la generación y transferencia de motivos de ADP-ribosa: Las reacciones de generación y transferencia de ADP-ribosa son catalizadas por lo menos por tres superfamilias de enzimas evolutivamente no relacionadas : ADP-ribosiltransferasas (ARTs), sirtuinas y la menos estudiada superfamilia TM1506 (figura 4)^{11,12}.

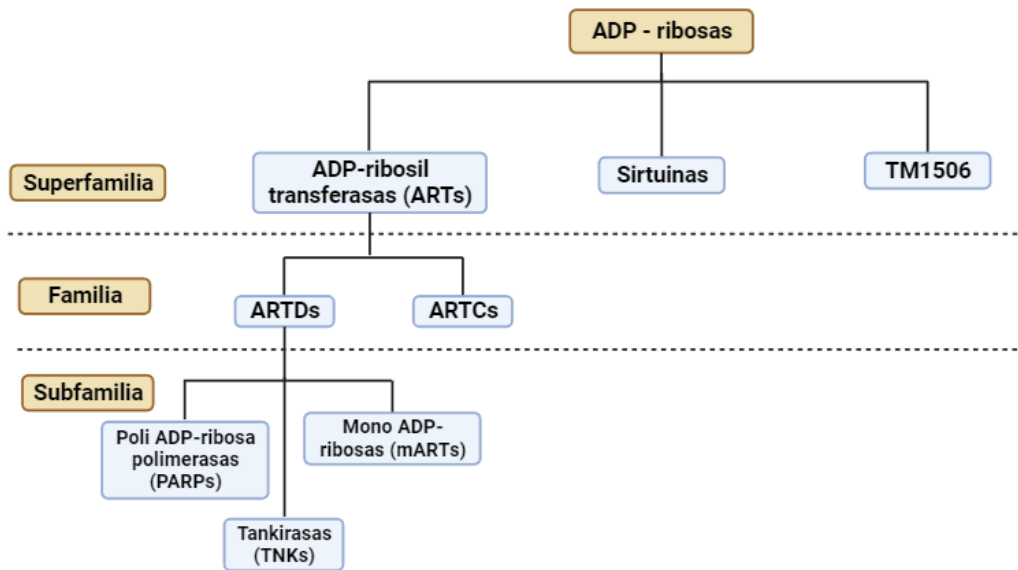


Figura 4. Esquema de clasificación de enzimas con actividad de ADP-ribosa, adaptado de [11].

La superfamilia de Las ARTs es la más diversa en términos de estructura, residuos del sitio activo y los objetivos a los cuales modifican en eucariotas son las principales enzimas encargadas de promover estas reacciones y existen 23 miembros de esta superfamilia, su característica principal reside en un plegamiento tipo ART que permite

la unión del NAD⁺, este motivo estructural se caracteriza por estar compuesto de dos dominios distintos de láminas β con tres hebras cada uno; 4-5-2|1-3-6 es el patrón general de alternancia de cada una de las hebras (“|” representa la separación entre los dos motivos). Es común observar que cada lámina β alterna con elementos helicoidales como se aprecia en la **figura 5**¹⁵.

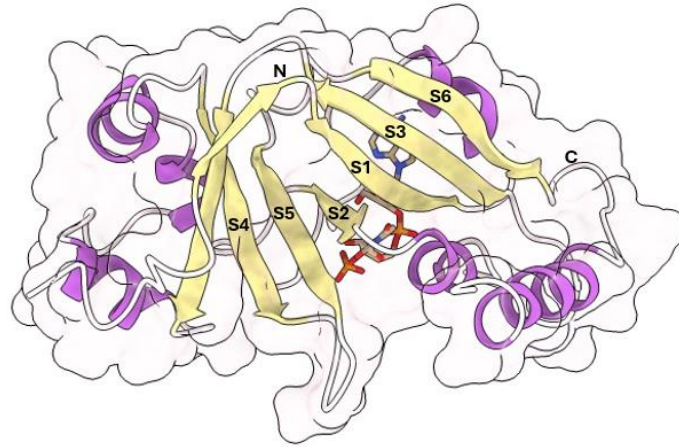


Figura 5. Dominio ART de la toxina de difteria de *Corynebacterium diphtheriae* (PDB: 1DTP), adaptado de [15].

En dominios ART se encuentra la presencia de tres aminoácidos que son críticos para su función, formando así una triada catalítica. Los integrantes de esta familia son clasificados en tres clados, clasificación que se hace en función a la composición de los aminoácidos que hacen parte de la triada: el clado H-Y-[EDQ], el clado R-[ST]-E y el clado H-H-h. Las ARTs del primer clado fueron las primeras en describirse para la toxina de difteria de *Corynebacterium diphtheriae* razón por la cual fueron denominadas ARTDs (ADP-ribosiltransferasa *diphtheria* toxin like); por otro lado, las ARTs del segundo clado fueron relacionadas con la toxina del colera *Vibrio cholerae* y se les denominó por lo tanto ARTCs (ADP-ribosiltransferasa *cholera* toxin like)^{11,16}.

1.3.1.1. Poli ADP-ribosa polimerasas

Las proteínas pertenecientes a la subfamilia ARTD fueron llamadas poli ADP-ribosa polimerasas (PARPs, EC: 2.4.2.30) en una primera instancia; esto, a pesar de que la gran mayoría de las ARTDs no pueden realizar PARilaciones, por lo tanto, se optó por acuñar el acrónimo PARP como nomenclatura unificadora para referirse a todos los miembros de la familia independientemente de si hacen PARilación o MARilación. En humanos, la familia de ARTDs posee 17 miembros que comparten el dominio tipo PARP hacia el carboxi-terminal. La capacidad de hacer PARilaciones reside únicamente en cuatro miembros: PARP1, PARP2, TNKS1 y TNKS2^{11,16}.

La PARP1 es el miembro más conocido y estudiado entre estas ARTs. Es una enzima multifuncional y altamente conservada en eucariotes, en humanos posee una longitud de 1014 aminoácidos (aa) y un peso molecular de 113 kDa, está constituida por cuatro dominios principalmente: Un dominio N-terminal de unión al ADN que consiste en motivos de dedos de zinc (F1-F3), un dominio BRCT, un WGR los cuales están sujetos a modificaciones y un dominio catalítico en el C-terminal altamente conservado. Como se mencionó anteriormente, es ya conocido que el dominio catalítico de estas proteínas, el dominio ART se encuentra conservado en los miembros que pertenecen a la familia de las PARP. El dominio ART se caracteriza específicamente por tener un sitio donador de motivos de ADP-ribosa y un sitio aceptor el cual se une al objetivo de PARilación. El sitio donador posee los residuos que interactúan con el anillo de nicotinamida, los grupos fosfato y la adenosina del sustrato (NAD^+) (**figura 6**)^{17,18}

En PARPs, el sitio de unión a nicotinamida está compuesto por la triada His-Tyr-Glu (H-Y-E), los cuales se encuentran en PARPs de varios ortólogos. Sin embargo, entre ARTDs, el tercer componente de esta triada puede presentar variaciones, la sustitución de este tercer componente por aminoácidos apolares ocasiona la pérdida de la capacidad de la enzima de realizar la elongación de los motivos de ADP-ribosa para la formación de polímeros y, por lo tanto, esta sustitución está presente en mono ADP-ribosa transferasas^{19,20}.

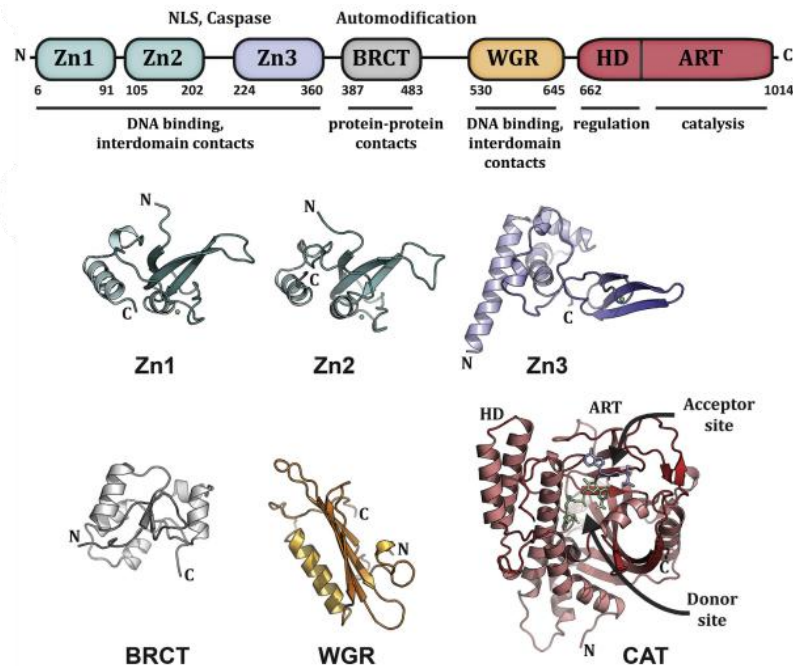


Figura 6. Representación estructural de los dominios que constituyen a PARP1 de humano: dominios de dedos de Zinc con interacción con el DNA: Zn1, Zn2 y Zn3. Dominios con C-terminal con el gen BRCA1: BRCT. Dominio de secuencia altamente conservada de Trp, Gly y Arg: WGR. Dominio catalítico:

CAT, el cual está compuesto de dos subdominios, el helicoidal (HD) y el de unión a NAD⁺ (ART).
Tomado de [20].

1.3.2. Enzimas involucradas en la remoción de la ADP-ribosilación: Borradoras

Los eventos celulares derivados de la generación de polímeros de ADP-ribosa dependerán en gran medida del balance en la tasa de recambio de estos. Dependiendo del caso, será necesario el establecimiento de relaciones de proporcionalidad de cantidad y actividad entre enzimas escritoras y borradoras, la existencia de enzimas borradoras permite entonces otorgar un carácter de reversibilidad a este tipo de MPT y además, el reciclaje de los sustratos que componen a los polímeros. Hasta el momento, tres superfamilias de proteínas han sido identificadas en la reversión total de la poli ADP-ribosilación: Macrodominios, dominios (ADP-ribosil) hidrolasa (ARH) y los más recientes dominios NADAR^{12,21,22}.

Macrodominios y ARH hidrolasas se han encontrado en todos los dominios de la vida, la diferencia de especificidad de sustratos (MARilación o PARilación) de los miembros pertenecientes a estas superfamilias resultan complementarios, esto, junto con la diferenciación en ubicaciones celulares supone una importante diferenciación en sus roles biológicos. Además de la reversión total se ha reportado que las señales de ADP-ribosilación pueden ser reducidas hasta el radical 5-fosfato-ribosido; reacción ejecutada por miembros de la familia fosfodiesterasa Nudix y ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa (ENPP)¹².

La poli-ADP ribosa glicohidrolasa es la mayor responsable del catabolismo de la ADP-ribosilación, esto lo hace a través de la hidrólisis de los enlaces $\alpha(1'-2'')$ O-glicosídicos entre las diferentes unidades del polímero, dando como producto monómeros libres de ADP-ribosa. En mamíferos se ha identificado un solo gen de PARG del cual se derivan cinco isoformas, a través de *splicing* alternativo. En bacterias, protozoos y mamíferos la estructura terciaria de PARG presenta en su sitio activo una estructura perteneciente a la superfamilia de los macrodominios con aminoácidos conservados en su sitio activo y un “cierre” de tirosina propio de PARGs^{21,22}.

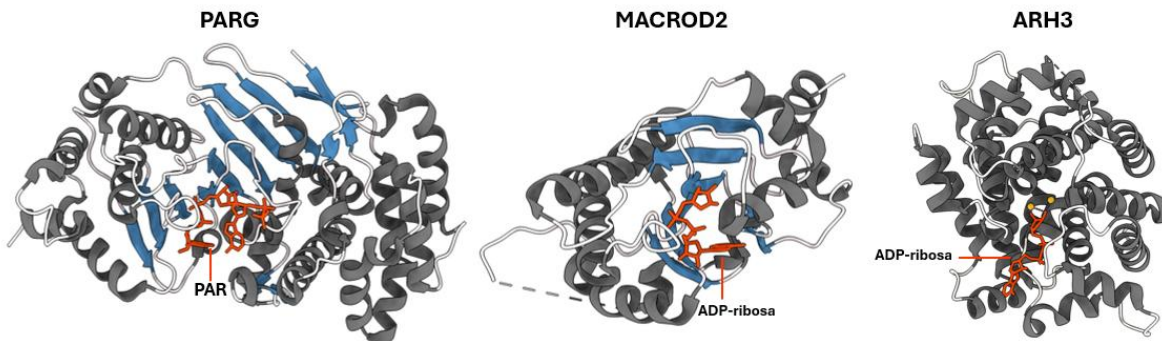


Figura 7. ADP-ribosa glicosil hidrolasas de dos macrodominios (PARG y MACROD2) y un ARH co-cristalizados con sus sustratos (PDBs: 4L2H, 4IQY y 7AKS), adaptado de [12].

1.3.3. Proteínas que reconocen señales de ADP-ribosilación: Lectoras

La lectura de las señales de ADP-ribosilación representa uno de los aspectos más importantes en la biología de esta MPT, los factores encargados de reconocer estas señales funcionarán como puentes entre el establecimiento del “mensaje” y el evento celular que desencadenará. El reconocimiento de señales de ADP-ribosilación, sean MAR o PAR, se hará a través del establecimiento de interacciones intermoleculares entre la señal y el factor reconocedor; en el caso de las PARilaciones, el reconocimiento de los polímeros también se hará en función de la longitud y el estado de ramificación de estos ¹².

En varias ocasiones, el reconocimiento de señales de ADP-ribosilación se atribuye a dominios con una arquitectura particular, principalmente, cuatro clases de estos módulos de reconocimiento han sido descritos en la literatura: (i) motivos de unión a PAR (PBMs), (ii) Macrodominios, (iii) dominios de triptófano-triptófano-Glutamato (WWE) como se muestra en la **figura 8** y (iv) dominios de dedos de zinc de unión a PAR (PBZ). En la actualidad se han descrito aún más módulos de unión, entre ellos, módulos RNA de reconocimiento (RRMs). La multiplicidad existente en estos módulos de reconocimiento ejemplifica nuevamente la complejidad bajo la cual se desarrollan los eventos de ADP-ribosilación, y el gran volumen de eventos celulares en los que esta MPT está involucrada ^{12,16}.

La constitución de estos “códigos” biológicos se dan a medida en que la modificación o el evento que se trata de codificar supone un rol regulatorio que puede dar lugar a acontecimientos de suma importancia en la biología de los sistemas vivos. Así pues, lo expuesto en esta sección permite interrelacionar el contexto de complejidad en el que se desarrolla el código PAR con las funciones celulares con el que este está envuelto.

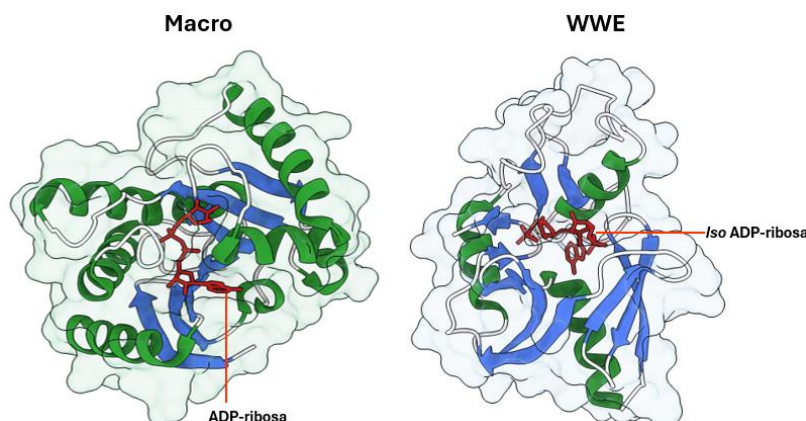


Figura 8. Estructura terciaria de dos dominios lectores de señales de ADP-ribosilación co-cristalizados con sus ligandos, adaptado de [12].

1.4. ADP-ribosilación y estabilidad génica

Como es bien sabido en el DNA reside toda la información necesaria para constitución y mantenimiento de los sistemas vivos, por lo tanto, su estabilidad es un asunto de extrema importancia para el desarrollo de los eventos celulares. El material genético se encuentra susceptible a daño: Luz ultravioleta, compuestos mutagénicos, radiación ionizante y especies reactivas de oxígeno (ROS) son algunos de los factores involucrados en promover estas alteraciones. La exposición a estos agentes puede causar lesiones en el DNA de dos maneras: rompimientos del DNA en una sola cadena (SSBs) y en doble cadena (DSBs), si las lesiones no son reparadas es de esperarse que el producto final sea el genoma con alteraciones lo que puede derivar en la perturbación de eventos celulares ²³⁻²⁵.

Es por lo anterior que las lesiones que puede sufrir el DNA resultan ser antagónicas con la vida y, por ende, el desarrollo de esta en la tierra ha ido de la mano con el surgimiento y evolución de diversos mecanismos de detección y reparación de daños del DNA. Como muchos procesos celulares, la respuesta a daños del material genético se encuentra regulado por MPTs, lo que permite una regulación temporal de estos mecanismos; muchas MPTs son utilizadas en estas rutas de reparación, pero es aquí cuando la ADP-ribosilación tiene un papel relevante ²⁵.

En humanos PARP1, PARP2 y PARP3 son clasificados como PARPs de respuesta a daños de DNA, por lo que es de esperarse que su ubicación sea nuclear. En términos de cantidad y actividad enzimática, PARP1 resulta ser la de mayor importancia entre las tres por lo que este apartado se centrará en hacer una aproximación descriptiva que buscará establecer una interrelación entre PARP1 y el mantenimiento de la integridad génica ^{24,25}.

La importancia de PARP1 reside en su rápida capacidad de reconocimiento de lesiones de DNA (entre 1 a 3 segundos después de ocasionado el daño) y al inicio del reclutamiento de factores de reparación a través de la generación de PAR. PARP1 se encuentra constantemente escaneando cromatina intacta a través de mecanismos ya descritos, para esto, se necesita la acción conjunta de sus dominios WGR, BRCT y sus tres dedos de Zinc. Bajo este estado PARP1 se encuentra enzimáticamente inactiva y su estado conformacional similar al de unas perlas unidas por un hilo, ante la presencia de una lesión del DNA, F1 y F2 interactuarán con las bases de los nucleótidos que han sido expuestos utilizando un “*loop* apilador de bases”, así

entonces el reconocimiento del daño por parte de F1 y F2 direccionará las interacciones entre F3 con F1 y el DNA (**figura 9**)^{23,24,26}.

En los últimos años, los detalles moleculares detrás del reconocimiento de daños del DNA por parte de PARP1 se han vuelto más complejos, en últimas, estos desencadenan en la pérdida de aquella arquitectura de perlas en hilo y ocasiona el establecimiento de una red de contactos inter dominios que resultan en la adquisición de una conformación enzimática activa por parte de PARP1 y por consiguiente, el inicio de reacciones de transferencia de ADP-ribosa; este mecanismo de activación refleja un modo interesante de regulación alostérica, en donde uno de los moduladores en este caso serán los daños de DNA²⁶.

Una vez activa, PARP1 modificará en primera instancia residuos de aspartato y glutamato en la muchas veces nombrada región de auto modificación que abarca el dominio BRCT y sus zonas colindantes como otro modo de regulación alostérica, así mismo, PARP1 promoverá modificaciones en *trans* de varios factores proteicos como las histonas H1, H2A y H2B. La alta concentración de PAR en zonas donde han sido detectadas lesiones en el DNA ocasionará múltiples eventos: En primera instancia, se dará un incremento en la carga negativa en estas zonas y como consecuencia, habrá lugar a una separación de fases, demarcando así una zona en donde se realizan labores de reparación del material genético^{24,26}.

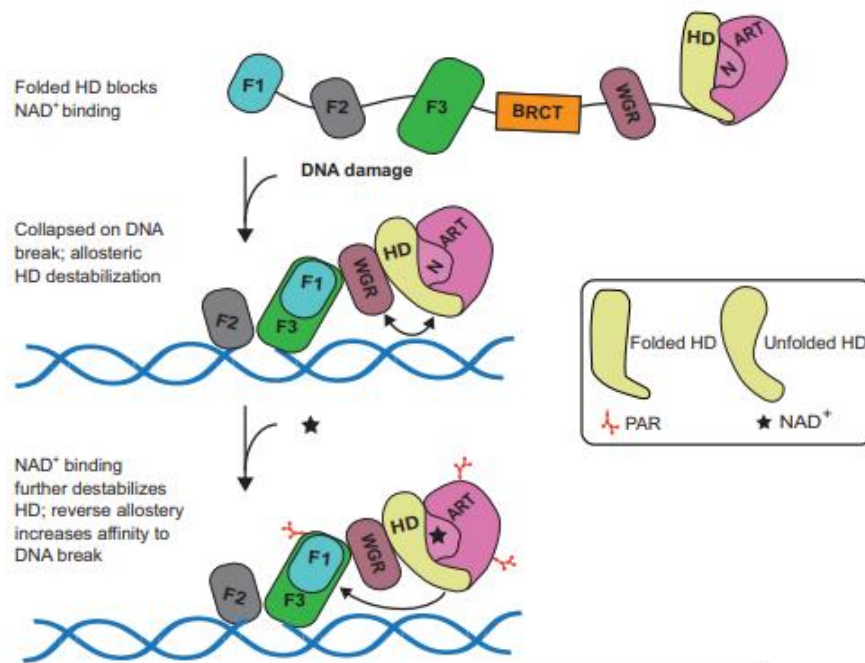


Figura 9. Modelo del mecanismo de activación de PARP1 en respuesta a daños de DNA, tomado de [26].

Así mismo, esta separación de fases y la PARilación de histonas, promoverá que, a nivel local, la cromatina pierda sus estructuras de orden superior, postulando a PARP1 adicionalmente como factor remodelador de la cromatina, el cual aumenta la accesibilidad de estos sitios de reparación a proteínas que posean dominios lectores tales como XRCC1, proteína andamio que interacciona con múltiples factores de reparación de DNA. El reclutamiento de otros factores remodeladores de la cromatina a través del reconocimiento de PAR también hace parte de los eventos de gran importancia desencadenados por PARP1^{25,26}.

Es de relevancia resaltar que los eventos de disociación del DNA por parte de PARPs también son un paso importante en la reparación de las lesiones, ya que da lugar a los factores encargados en remendar el daño. Varios modelos se han propuesto para la explicación de este fenómeno, uno de ellos se fundamenta en el establecimiento de una eventual repulsión electrostática entre las cargas negativas de PAR y el DNA, mientras otros se relacionan con el cambio de especificidad en los aminoácidos que son PARilados, proceso el cual es mediado por el factor accesorio Factor 1 de PARilación de Histonas (HPF1)²⁶.

Adicional a lo anterior, la generación y caracterización de modelos murinos deficientes en PARP1 y/o PARP2 han demostrado el rol crucial de estas proteínas en el mantenimiento de la integridad génica: ratones *parp1*^{-/-} presentan mayor sensibilidad a radiación ionizante y agentes alquilantes. Por otro lado, ratones *parp2*^{-/-} poseen una hiper radiosensibilidad. Resulta importante destacar que ratones *parp1*^{-/-} *parp2*^{-/-} no son viables²⁷.

Con lo expuesto en esta sección, se da un vistazo a la maravillosa complejidad bioquímica en la que se enmarcan los procesos de ADP-ribosilación en la intersección con eventos de reconocimiento y reparación del material genético, sustentando este mecanismo como un punto clave en el mantenimiento de la estabilidad génica.

1.5. Distribución de las PARPs en los dominios de la vida

Las ARTs se encuentran conservadas a lo largo de la evolución en los tres dominios de la vida: Archae, Bacteria y Eukarya. La primera diversificación de la superfamilia de las ARTs ocurrió en el contexto de diversos conflictos entre sistemas bacterianos, en donde las ARTs ocupaban papeles tanto ofensivos como defensivos, y fueron adquiridas repetitivamente por transferencia horizontal de genes a lo largo de la evolución de los eucariotas (figura 10)¹⁵.

Análisis filogenéticos han mostrado que el último ancestro común de los eucariotas tenía por lo menos dos enzimas tipo ARTD, esta subfamilia se ha subdividido en 9 clados. Muchas, sino todas las proteínas que pertenecen al primer clado presentan

actividad de poli ADP-ribosilación, esto junto a sus características estructurales y de secuencias hacen que en este clado se incluyan la PARP1, PARP2 y PARP3 de humano, que como se vio en secciones anteriores, son proteínas relacionadas íntimamente con las respuesta a daños del DNA. Dentro del reino *plantae* dos de las ARTDs de *Arabidopsis thaliana* se encuentran en el clado 1, AtPARP1 y AtPARP2, las cuales han mostrado actividad catalítica frente a la presencia de daños de DNA. En hongos ha sido posible caracterizar un miembro de este clado, PrpA de *Aspergillus nidulans*. Dentro de los protozoarios, los *Excavatas Trypanosoma cruzi* y *brucei* presentan una proteína que al igual que los anteriores, responde al daño en el material genético²⁸.

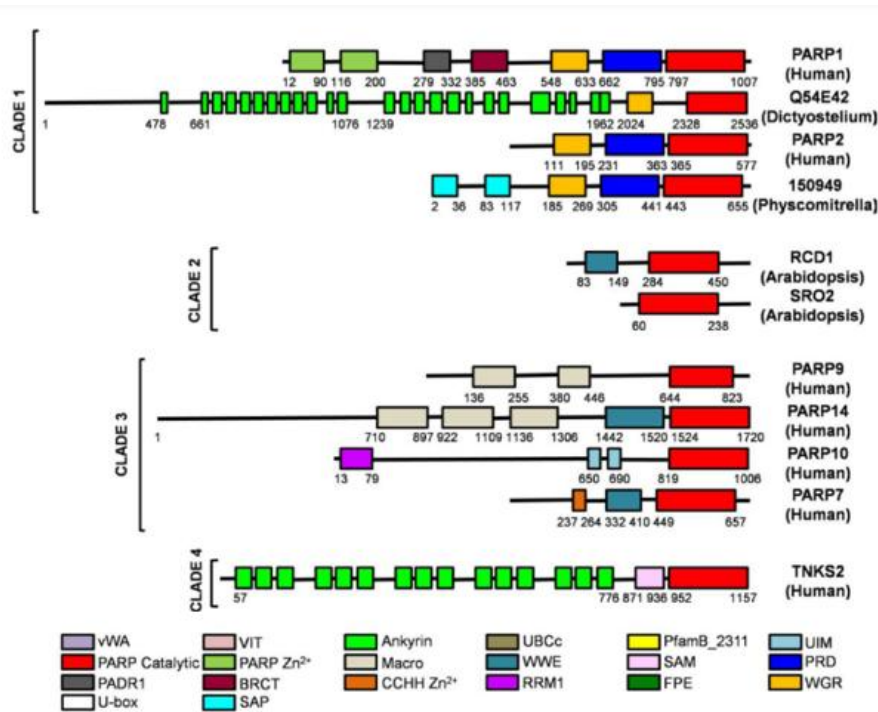


Figura 10. Visualización de dominios de los diferentes clados de las ARTDs, tomado de [28].

1.6. Protozoarios

Los protozoarios son eucariotas unicelulares los cuales junto con las algas unicelulares y los mohos de limo son clasificados dentro del reino protista, estos poseen una estructura más simple y primitiva que los miembros del reino animal. Como en todos los eucariotas su núcleo se encuentra delimitado por una membrana. Los organelos de los protozoarios tienen funciones similares que el de los eucariotas superiores. Muchos protozoarios, tienen al menos en una etapa de su vida estructuras locomotoras flageladas o ciliadas que les permiten moverse para obtener nutrientes. Este tipo de organismos usualmente se multiplican asexualmente a través de fisión binaria o múltiple^{29,30}.

Hasta el momento no ha habido un consenso con respecto a la clasificación de este tipo de organismos debido principalmente a la gran diversidad de sus estilos de vida, entre los cuales se destacan los de vida libre los cuales se ha descrito tienen roles importantes a nivel ecosistémico. Por otro lado, se tiene a los protozoarios con la capacidad de desarrollar relaciones simbióticas con organismos más complejos, desde comensales en el tracto digestivo de rumiantes e insectos que comen madera hasta protozoarios parasitarios que causan enfermedades en humanos como la malaria³¹.

En este apartado se propone exponer algunas generalidades sobre organismos protozoarios parasitarios, especialmente en parásitos del género *Leishmania*, dando un poco de atención a la relación existente entre su incidencia en salud pública y la necesidad de generar conocimiento básico en cuanto a la biología de sus fenómenos.

1.6.1. Parásitos protozoarios

Los protozoarios parasitarios desencadenan cambios a diferentes niveles dentro de sus hospederos, que pueden terminar en la muerte de este. Estos cambios están en gran medida relacionados con la densidad parasitaria, la especie del parásito y las condiciones fisiológicas del hospedero. Algunas de las condiciones más comunes desarrolladas por infecciones por parásitos protozoarios son: daño de tejidos como necrosis, degeneración parenquimática, entre otros; cambio de tejidos como, hiperplasia, neoplasia, hipertrofia³².

Las enfermedades causadas por protozoarios y helmintos son la mayor causa de mortalidad relacionada con enfermedades parasitarias, con un estimado anual de 1,1 millones de defunciones. Este fenómeno se ve agravado en zonas donde prevalecen condiciones socioeconómicas desfavorables, en donde se dificulta el acceso a tratamientos oportunos y las condiciones sanitarias promueven la propagación de estas enfermedades. La no existencia de vacunas efectivas hace imperativa la búsqueda de nuevos fármacos antiparasitarios que permitan la implementación de nuevas estrategias para el tratamiento de estas parasitemias. Algunas de las enfermedades más conocidas causadas por protozoarios como lo muestra la tabla 1, son: Malaria, Tripanosomiasis, Leishmaniasis y toxoplasmosis, siendo la mayoría de ellas catalogadas como enfermedades tropicales desatendidas, no obstante, el calentamiento global ha ampliado las regiones donde circulan los agentes etiológicos de estas enfermedades^{33,34}.

Tabla 1. Características generales de los parásitos protozoarios más importantes en salud humana adaptado de [34].

Enfermedad	Agentes Etiológicos Representativos	Localización Geográfica	Características Clínicas
Malaria	<i>Plasmodium falciparum</i> , <i>P. vivax</i>	Más de 100 países en zonas tropicales y subtropicales	Fiebre, escalofríos, tos, dificultad respiratoria, dolor articular, cefalea, diarrea acuosa, vómitos, convulsiones, anemia severa.
Tripanosomiasis Africana	<i>Trypanosoma brucei</i>	36 países del África subsahariana	Fase hemolítica inicial (fiebre, dolores articulares), seguida de trastornos neurológicos y somnolencia.
Enfermedad de Chagas	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Desde el norte de México hasta el sur de Argentina	Fase aguda (fiebre y esplenomegalia). Fase crónica (daño irreversible al corazón, esófago y colon).
Leishmaniasis	<i>Leishmania donovani</i> , <i>L. major</i> , <i>L. mexicana</i> , <i>L. braziliensis</i>	Más de 88 países en zonas tropicales y subtropicales	Úlceras cutáneas, complicaciones mucocutáneas y enfermedades viscerales (hepatoesplenomegalia).
Toxoplasmosis	<i>Toxoplasma gondii</i>	Mundial	Ceguera y retraso mental en niños con infección congénita. En pacientes inmunodeprimidos: esplenomegalia, polimiositis, dermatomiositis, coriorretinitis, miocarditis, neumonitis, hepatitis, encefalitis y fallo multiorgánico.
Tricomoniasis	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Mundial	Secreción vaginal, mal olor, edema o eritema.
Protozoos intestinales	<i>Giardia lamblia</i> , <i>Entamoeba histolytica</i> , <i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>Cyclospora cayetanensis</i>	Mundial	Hematuria, anemia, retraso del crecimiento. Fallo renal, hepático y esplénico.

Dentro de los parásitos protozoarios que despiertan mayor interés debido al impacto sobre la salud pública, se encuentran los tripanosomátidos, estos pertenecen a la clase *Kinetoplastida*, este nombre se desprende de la existencia de una estructura

celular que se denomina kinetoplasto, esta estructura, además de ser única de este tipo de organismos, comprende una red de DNAs circulares dispuestos en maxi y mini círculos que juntos reciben el nombre de kDNA. Dos géneros de tripanosomátidos son de extrema importancia en cuestiones de salud pública: *Trypanosoma* y *Leishmania*; los parásitos pertenecientes a estos géneros causan enfermedades humanas devastadoras como la Tripanosomiasis Africana, la enfermedad de Chagas y la Leishmaniasis ³⁵.

1.7. Leishmaniasis

La leishmaniasis es causada por cerca de 20 especies de los parásitos intracelulares del género *Leishmania*, los cuales son transmitidos entre hospederos mamíferos por 30 especies diferentes de dípteros de la subfamilia *Phlebotominae*, conocidos comúnmente como moscas de la arena, es importante destacar que esta enfermedad no solo afecta humanos sino también otros mamíferos, creando reservorios zoonóticos lo que tiene serias implicaciones para el control de esta enfermedad ^{1,2}.

Esta parasitemia en humanos tiene tres manifestaciones clínicas : cutánea (LC), mucocutánea (MC) y visceral (LV). A nivel mundial esta enfermedad tiene una distribución en cerca de 100 países, la incidencia anual de LC estimada a nivel mundial se encuentra entre los 0,7 y 1,2 millones de casos, siendo sur América, América central, medio oriente, Etiopía y el norte de África las regiones más endémicas, como se muestra en la figura 11. De acuerdo con la organización panamericana de salud, esta enfermedad se encuentra entre las diez principales enfermedades tropicales desatendidas con más de 12 millones de personas infectadas en todas sus manifestaciones clínicas. En el caso de Colombia, según datos epidemiológicos del instituto nacional de salud, en el 2024 se reportó un acumulado de 5116 casos, presentándose como una problemática en salud pública. Se estima que cerca del 95% de los casos ocurren en las américas ²⁻⁷.

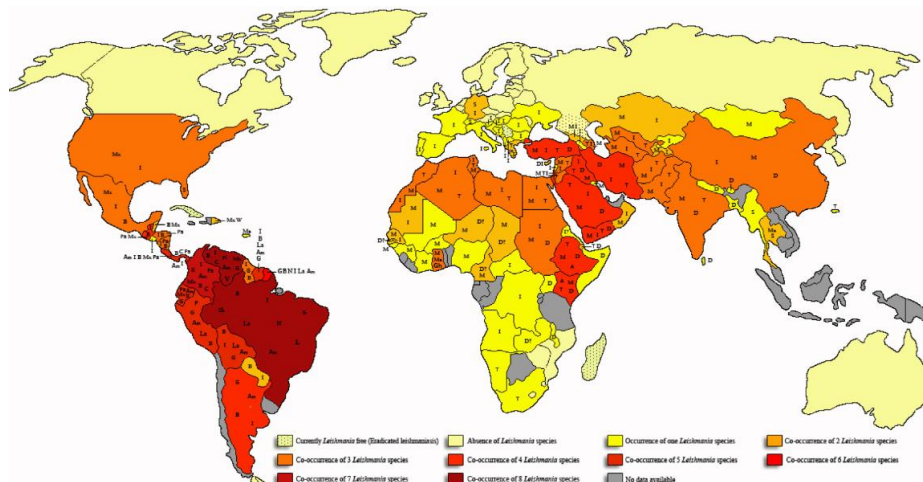


Figura 11. Distribución global de 21 especies de *Leishmania* patogénicas para humanos, tomada de [7].

Adicionalmente, Colombia cuenta con la mayor diversidad de parásitos de *Leishmania* a nivel mundial, circulan 9 especies, cuya incidencia en orden decreciente es: *Leishmania panamensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. colombiense*, *L. lainsoni* y *L. equatorensis*, las tres últimas con igual frecuencia. Lo anterior señala la importancia de estudiar la bioquímica y la biología del parásito con el propósito de identificar nuevos blancos que permitan el control del parásito y el tratamiento de estas patologías^{7,36}.

Los parásitos del género *Leishmania* presentan un ciclo de vida digénico en donde se alterna entre un huésped invertebrado y otro mamífero, lo anterior ocasiona que *Leishmania* presente dos principales morfologías: promastigote, caracterizada por presentar una forma alargada flagelar prominente en los intestinos del hospedero invertebrado y la forma amastigote, presente en hospederos mamíferos, posee una forma más pequeña y ovalada con un flagelo que no presenta movilidad y que apenas se puede observar saliendo desde el bolsillo flagelar².

A grandes rasgos, el proceso de infección ocurre cuando los promastigotes son inyectados en el hospedero mamífero a través de la picadura de una mosca de la arena que se encuentre infectada, una vez inyectados, los promastigotes serán fagocitados por parte de macrófagos en estructuras vesiculares denominadas fagolisosoma y es en estas estructuras en donde se dará la transición morfológica a promastigote. Se ha propuesto que este cambio se da principalmente en aras de minimizar la superficie celular que se encuentre expuesta a las agrestes condiciones presentes en el fagolisosoma; posteriormente se desarrollarán una serie de complejas interacciones huésped-parásito que determinarán el curso de la infección².

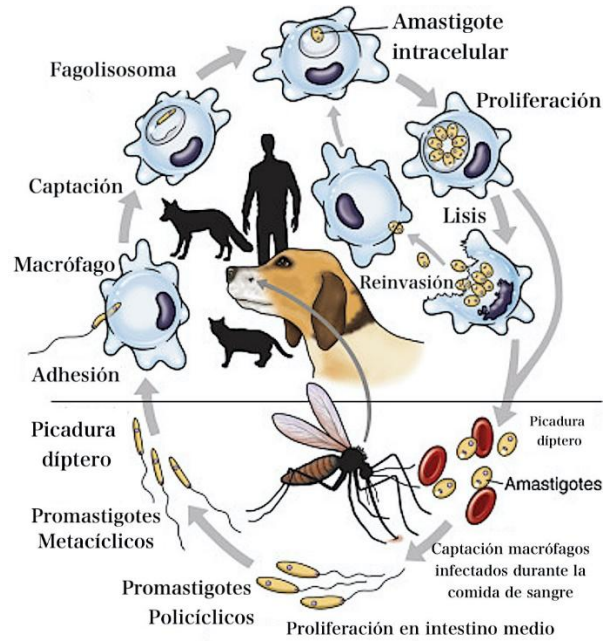


Figura 12. Representación esquemática ciclo de vida de parásitos del género *Leishmania*³⁷.

Los tratamientos de infecciones causadas por *Leishmania* se han abordado desde varias perspectivas, acá nos centraremos en los tratamientos basados en la administración de fármacos que buscan alterar alguna función vital en los parásitos. Los tratamientos quimioterapéuticos para esta enfermedad se fundamentan en la administración de anfotericina B y amonios pentavalentes, los cuales pueden llegar a producir cuadros severos de nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, entre otros efectos secundarios indeseables⁸.

El desarrollo de una administración de anfotericina B a través de liposomas ha producido buenos resultados en cuanto al aumento de la eficacia en el tratamiento de la enfermedad y la disminución de los efectos adversos en los pacientes, sin embargo, esta vía de administración resulta en el aumento del costo del tratamiento. Desde su amplia distribución a nivel local y mundial, pasando por la complejidad de su proceso hasta la aparición de nuevas cepas farmacorresistentes; las enfermedades parasitarias causadas por *Leishmania* plantean la urgencia de encontrar nuevas dianas terapéuticas contra esta enfermedad, las cuales se pueden basar en el entendimiento de la bioquímica y biología celular del parásito⁸.

1.8. Poli ADP-ribosilación en tripanosomátidos

En este apartado se procurará presentar un panorama general sobre el conocimiento que se ha generado en torno a los procesos de poli ADP-ribosilación de parásitos tripanosomátidos, enfocándose principalmente en parásitos del género *Leishmania*.

El primer acercamiento a los estudios de ADP-ribosilación en tripanosomátidos se dio a través de las PARPs. *Crithidia fasciculata* fue el primer tripanosomátido en el que se caracterizó una proteína de este tipo, esta se purificó y se comprobó su actividad enzimática a través de ensayos con histonas y DNA activado mediante digestión. El estudio de las PARPs en tripanosomátidos de interés en salud pública se dio a través de la clonación y caracterización bioquímica de la PARP de *Trypanosoma cruzi* (TcPARP). La identificación de TcPARP se logró inicialmente a través de un acercamiento bioinformático en donde se reconocieron los dominios conservados de estas proteínas y el hallazgo de la triada catalítica H-Y-E. Este estudio de igual forma presentó la caracterización bioinformática del candidato a PARP de *Trypanosoma brucei* (TbPARP). Estudios funcionales de PARPs de tripanosomátidos se han realizado por ejemplo con *T. cruzi*, en estos, se encontró que la inhibición de TcPARP interfiere en la proliferación y en la capacidad infectiva del parásito en cultivos de células Vero ³⁸⁻⁴⁰.

Así mismo, tanto en *T. brucei* como en *T. cruzi* ha sido posible la identificación de un gen que codifica para PARG, esto se hizo, mediante acercamientos bioinformáticos con los cuales fue posible demostrar la conservación de motivos estructurales típicos de PARGs presentes en otras especies. Resultan interesantes algunos estudios que muestran la dependencia existente entre el proceso infectivo de *T. cruzi* y la expresión de PARG humana, lo que posteriormente permitió postular la dependencia de PARG endógena y del hospedero por parte de este parásito para asegurar su éxito en la invasión del hospedero mamífero ⁴¹.

Otras APD-ribosa hidrolasas han sido encontradas en *T. cruzi* y *T. brucei* las cuales presentan homología con O-acetil-ADP-ribosa deacetilasas MacroD1 y MacroD2 las cuales tienen la capacidad de hidrolizar motivos de ADP-ribosa que se encuentren anclados a proteínas. Estas hidrolasas fueron denominadas *Trypanosoma brucei MacroD-like protein* (TbMDO) y *Trypanosoma cruzi MacroD-like protein* (TcMDO). Lo expuesto hasta el momento da cuenta de la simplificación presente en los sistemas de ADP-ribosilación de estos tripanosomátidos. El papel que puedan tener las PARs, la presencia de otras ADP-ribosa hidrolasas, así como los módulos encargados del reconocimiento de estas señales quedan por ser develados ^{41,42}.

El estudio de las PARP en protozoarios del género *Leishmania* ha sido escaso, Villamil *et al.*, 2008, en una aproximación *in silico* reportó que al tratar de buscar un candidato a PARP en el genoma de *Leishmania major*, no fue posible su identificación. El primer acercamiento experimental data del siglo pasado, en el que se determinó que antagonistas de PARPs inhibían la diferenciación de amastigote a promastigote en *Leishmania mexicana*. Estudios más recientes exploran el efecto de la exposición de los parásito a moléculas citotóxicas como peróxido de hidrogeno, derivados de 1,3,4-

Leishmania braziliensis, en donde fue posible la identificación y caracterización bioinformática de un candidato a PARP en este parásito (LbPARP) ⁵⁰.

El reconocimiento de la secuencia de aa del candidato a LbPARP fue posible tomando como plantilla la secuencia de aa de HsPARP-1 en la herramienta BLASTP disponible en el sitio web del NCBI. Se identificó un candidato con 1099 aa, una masa molecular de 123 kDa, lo cual difiere con la masa reportada en los *western blot* para las proteínas tipo PARP de *L. infantum* y *donovani*. La implementación de un alineamiento múltiple de secuencias (Figura 14) con el algoritmo de CLC (QIAGEN) y, la visualización de este junto con la comparación de la estructura secundaria de HsPARP2 y LbPARP en ESPrict 3.0 evidenciaron regiones homologas en el C-terminal del candidato con respecto a los ortólogos de otras especies. Se destaca la conservación de la triada catalítica compuesta por los aminoácidos H-Y-E en las regiones enmarcadas en naranja, resultado que contrasta con lo hallado por Genois *et al.*, 2014. La presencia de la triada en el candidato podría estar asociada con la actividad de ADP-ribosil polimerasa, también es importante aclarar que el número de acceso de LmPARP utilizado para realizar el alineamiento múltiple mostrado en la figura 14, concuerda con el reportado por Genois *et al*, aunque este último no logró identificar la triada catalítica ⁴⁹.

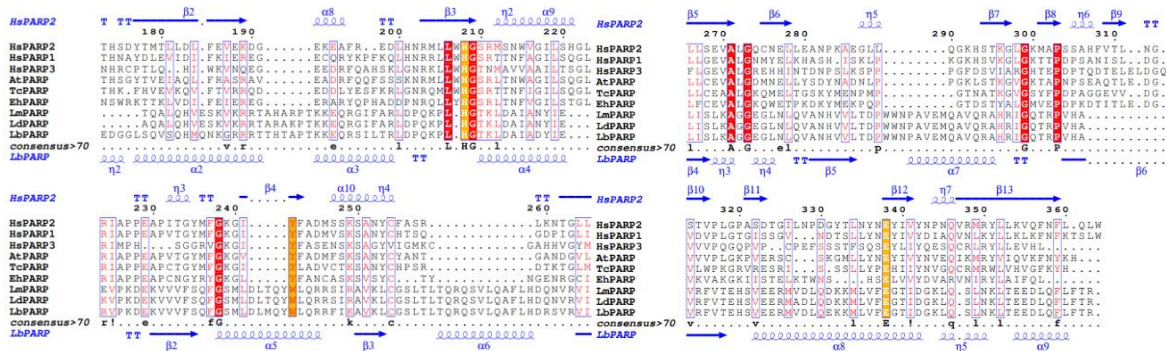


Figura 14. Alineamiento múltiple de secuencias y alineamiento de estructura secundaria de HsPARP2 y LbPARP obtenido con el programa ESPrict 3.0.

En el estudio de dominios conservados realizado en el Conserve Domain Database (CDD), se encontró en el candidato la presencia de un dominio de dedos de zinc característico en PARPs de varios ortólogos (Figura 15), aunque en la base de datos no se identificó el dominio catalítico canónico de las PARP, se pudo determinar la presencia de una región perteneciente a la super familia PLN03142. Las proteínas que hacen parte de esta familia se le asocian funciones remodeladoras de cromatina, función que también se ha reportado en HsPARP1 ⁴⁹.

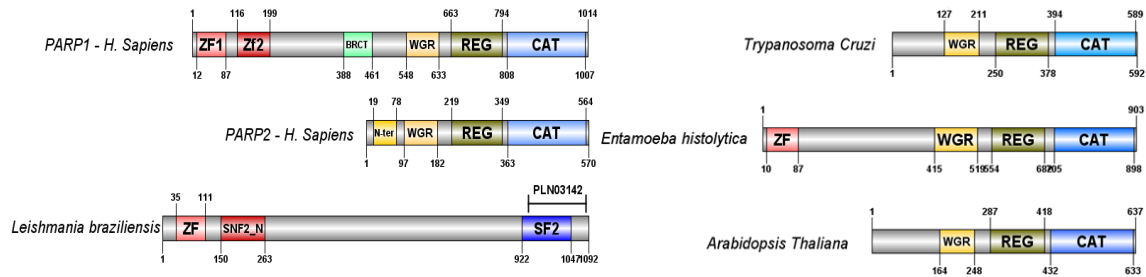


Figura 15. Visualización de dominios conservados en PARPs de varios ortólogos, realizado en DOG 2.0.

Adicionalmente, en este estudio se realizó un acercamiento experimental en donde fue posible la clonación de una versión truncada del candidato en el vector de expresión pET SUMO 6xHis tLbPARP, como un primer paso al estudio de la poli ADP-ribosilación en estos parásitos.

Por otro lado, la exploración de proteínas encargadas de la remoción de las señales de ADP-ribosilación en *Leishmania* es escasa. A nivel de estructura primaria, parece no haber una proteína que posea homología con PARG presente en ortólogos de eucariotes superiores, esta misma situación se observa a la hora de indagar la existencia de otros factores encargados de la misma función como macrodominios o proteínas de la familia ARH. Lo anterior muestra un panorama complejo en cuanto se refiere al entendimiento de los procesos de ADP-ribosilación en parásitos del género y así mismo plantea la apertura de posibilidades en la incursión de conocimiento básico en torno a estos eventos celulares, que puedan resultar útiles a la hora de entender estas parasitemias y proponer medidas de control y tratamiento ⁴¹.

2. Justificación

La leishmaniasis se encuentra entre las primeras 10 enfermedades tropicales desatendidas de acuerdo con la OPS. En Latinoamérica, la transmisión de la leishmaniasis tradicionalmente se ha restringido a selvas húmedas tropicales en las que los humanos se ven expuestos al parásito durante la realización de actividades bajo estos entornos, sin embargo, la transformación de hábitats inducidos por la acción humana han favorecido la proliferación de esta parasitemia en entornos no selváticos, lo que eleva el riesgo tanto de exposición como de contagio para los humanos y para otros mamíferos de interés productivo. Mediante la implementación de un modelo de nicho ecológico utilizando un algoritmo de máxima entropía, González *et al.*, 2010 concluye que el cambio climático exacerbará el riesgo ecológico de los humanos a la exposición a la leishmaniasis, lo anterior junto con la imperativa necesidad de encontrar nuevas dianas terapéuticas justifican el abordaje del estudio de esta enfermedad ⁵¹.

La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), se encuentra entre los mecanismos que emplea el sistema inmune innato cuando hay infección por parte del parásito. ROS son generadas durante el estallido respiratorio en el fagolisosoma, lo que sitúa al parásito en un ambiente de alto estrés oxidativo. Por otro lado, varias de las estrategias que se utilizan en el tratamiento de la enfermedad se basan en la producción de estrés oxidativo del parásito, lo que implica que, bajo estas situaciones, el material genético de estos organismos estará sujeto a modificaciones y, por lo tanto, se activarán vías antioxidantes y de reparación del ADN. La existencia de una LbPARP constituiría un factor clave para el reconocimiento de los daños oxidativos y la inducción de mecanismos de reparación, condiciones determinantes para el éxito que pueda tener el parásito en el proceso de infección y proliferación en el huésped mamífero, como se ha evidencia con TcPARP. Corroborar la existencia de una LbPARP aportaría conocimiento básico en cuanto a el entendimiento de los mecanismos de reparación del material genético en este género de protozoarios y adicionalmente plantearía un nuevo blanco farmacológico para el tratamiento de esta enfermedad ⁵².

3. Hipótesis

Existe una poli ADP-ribosa polimerasa en *Leishmania braziliensis* capaz de generar poli ADP ribosilación en promastigotes.

4. Objetivos

4.1. General

Determinar la existencia de poli ADP ribosilación en *Leishmania braziliensis* mediante el estudio de un candidato a poli ADP-ribosa polimerasa (LbPARP).

4.2. Específicos

1. Expresar y purificar el candidato a poli ADP-ribosa polimerasa (LbPARP) en el sistema heterólogo *E.coli* mediante estandarización de las condiciones óptimas.
2. Evaluar la actividad de la proteína recombinante de LbPARP a través de ensayos de enzimáticos.
3. Determinar la localización celular de LbPARP en promastigotes de *Leishmania braziliensis* mediante el desarrollo de una herramienta inmunológica en modelo aviar.
4. Explorar *in silico* los componentes del código ADP-ribosilación en protozoarios del género *Leishmania*.

5. Materiales y métodos

5.1. Clonación y expresión de varias versiones del candidato a LbPARP

Para la obtención del candidato a LbPARP en *E.coli*, se generaron varios constructos recombinantes mediante combinación de técnicas de biología molecular: pQE30-tLbPARP, pET26b(+)-Cter LbPARP y pET SUMO Nter LbPARP (**figura 16**), como se describe en los siguientes apartados.

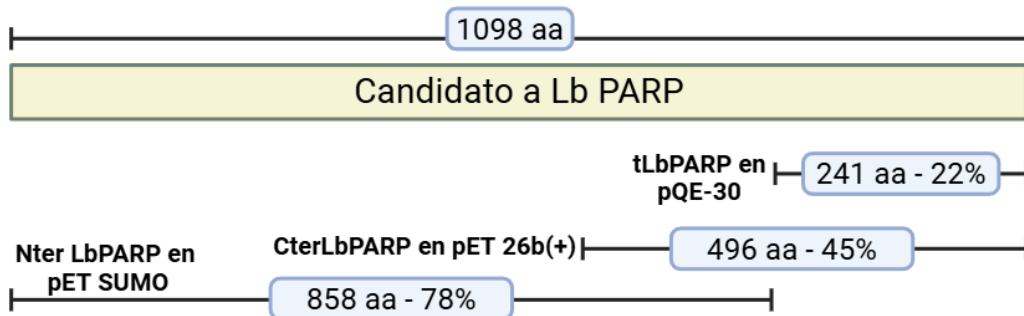


Figura 16. Esquema de las tres versiones de LbPARP clonadas en este estudio. Se muestra la longitud de aminoácidos y porcentaje de cobertura respecto al candidato de cada una de las versiones.

5.1.1. Generación de la proteína recombinante 6xHis tLbPARP en el sistema heterólogo de *E.coli*

- **Amplificación de la región codificante del gen Lbparp**

Partiendo de un material celular de *Leishmania braziliensis* fase promastigote de la cepa MHOM/BR/75/M2904, se realizó una extracción de ADN genómico del cual se llevó a cabo la amplificación del gen del candidato a Lbparp (ID : 5416151) identificado en un trabajo previo, con la enzima Taq polimerasa (*Thermus aquaticus*) y los *primers* No. 1 y 2 (tabla 2), en el termociclador Veriti Applied Biosystems. Las reacciones se hicieron a un volumen de 15 μ L mezclando H₂Odd, buffer de PCR 10X (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,3), MgCl₂ 2,5 mM, *primers* directo y reverso 0,2 μ M, dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,2 mM, y Taq polimerasa (0,5 U). Se agregó 1 μ L de gDNA a 200 ng/ μ L como plantilla (siendo el control negativo H₂Odd). Para la amplificación se hizo un paso inicial de desnaturalización 94 °C/10 min seguidos de 35 ciclos de amplificación con pasos de desnaturalización 94 °C/30 s, *annealing* 62 °C /25 s y extensión 72 °C/3 min; se programó el último ciclo con pasos de extensión de 72 °C/10 min y *hold* a 4 °C. El producto de PCR fue verificado mediante electroforesis con gel de

agarosa al 0,8 % en buffer TBE 0,5X, la cual se corrió a 100 V/40 min y se hizo tinción con bromuro de etidio. La documentación del gel se hizo en un analizador de imágenes Imager Gel Doc™ XR, con el software Quantity One Basic 4.6.3 de BIORAD™. La banda correspondiente a la región codificante de LbPARP (3300 bp) se purificó con el kit FavorPrep GEL/PCR Purification Mini Kit de FAVORGEN™⁵³⁻⁵⁵.

Tabla 2. Primers empleados para la amplificación de Lbparp y tLbparp

No. Primer	Nombre	Enzima de Restricción	Secuencia (5'-3')
1	Fw-LbPARP	Ninguna	ATGATGTGCGAACTTCGCACAACAT
2	Rv-LbPARP	Ninguna	CTACCGTGTAAGAGGAACTGCAG
3	Rv-LbPARP	HindIII	AAGCTTCTACCGTGTAAGAGGAACTGCAG
4	Fw-tLbPARP	BamHI	GGATCCGGCTTTGCGGCAGCGTTG

- **Producción del plásmido recombinante pGEM-T-Easy tLbparp**

tLbPARP constituye la región catalítica de LbPARP, considerando estudios previos, se obtuvo la forma truncada para evaluar la funcionalidad de la proteína, excluyendo la región amino terminal. Para obtener tLbparp (720 bp), se realizó una PCR anidada tomando el purificado de banda de Lbparp como plantilla y haciendo uso de los primers No. 3 y 4. En este caso, el perfil térmico establecido fue modificado en *annealing* de 57 °C/30 s y en extensión 72 °C/45 s. Con el amplicon obtenido, se hizo una clonación en el vector de mantenimiento pGEM-T-Easy /TA como se describe a continuación: 1,0 µL H₂Odd, 3,0 µL de producto de PCR, 1,0 µL del vector (50 ng/ µL), 5,0 µL de buffer 2X de ligasa T4 (Tris-HCl pH 7,8 60 mM; MgCl₂ 20 mM; DTT 20 mM; ATP 2 mM; PEG8000 10%) y 1,0 µL de ligasa T4 (1U/ µL). Se manejó una relación 1:3 vector: inserto; la reacción se incubó a 16 °C/3 h, luego se inactivó la ligasa a 65 °C/20 min, y posteriormente se dejó a 4 °C/*overnight*⁵³⁻⁵⁷.

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

Se transformaron células *E.coli* Top10 químicamente competentes por choque térmico con 5 µL del producto de ligación; luego de la transformación y la recuperación en medio SOC (extracto de levadura 0.5%, triptona 2%, NaCl 10 mM, MgCl₂ 210 mM, KCl 2.5 mM y glucosa 20 mM), las células se platearon en cajas de Petri con medio Luria Broth (LB)-Agar (Peptona 10 g/L; Extracto de levadura 5 g/L; NaCl 10 g/L, Agar 15 g/L) y ampicilina 100 µg/mL. El estriado se dejó incubando a 37 °C toda la noche. La selección de clones se hizo por PCR con el protocolo previamente mencionado. La plantilla de amplificación se obtuvo a través de la lisis de las colonias seleccionadas en 10 µL de H₂Odd a 95 °C durante 10 minutos. Los amplificados de PCR de colonia se corrieron en un gel de agarosa al 1,0 % en buffer TBE al 0,5X. Con cada uno de los

clones positivos en la PCR de colonia se realizó un inóculo en medio LB suplementados con ampicilina a una concentración de 100 µg/mL los cuales se incubaron a 37 °C por 16 h para posteriormente realizar la extracción del plásmido de mantenimiento recombinante mediante el protocolo de lisis alcalina ^{58,59}.

- **Subclonación de tLbparp en el vector de expresión pQE30**

Se realizó una doble digestión sobre los plásmidos pGEM-T-tLbparp y pQE30 (Qiagen) con BamHI y HindIII a 37 °C por 16 h, posteriormente las enzimas se desactivaron térmicamente y el producto de digestión de pGEM-T-tLbparp se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % en buffer TAE 1X, una vez corrido el gel, se purificó la banda correspondiente al inserto (732 bp) con el kit FavorPrep GEL/PCR Purification Mini Kit de FAVORGEN™. El purificado de banda y el vector doblemente digerido se ligaron empleando 3,0 µL de H₂O; 1,0 µL de buffer de ligasa T4 10X; 4,0 µL de inserto (9,0 ng/µL), 1,0 µL de vector (42,8 ng/µL); y 1,0 µL de T4 ligasa (1U/ µL). La reacción de ligación se realizó a 16 °C/3 h. La T4 se desactivó por calentamiento a 65 °C por 20 min, este producto de ligación se transformó en *E.coli* JM109 y la selección positiva de los clones se hizo por PCR de colonia. Las colonias positivas se inocularon en medio LB, suplementados con ampicilina (100 µg/mL) y se incubaron a 37 °C por 16 h. Finalmente, la extracción del plásmido recombinante se realizó por lisis alcalina ^{55,60-62}.

- **Verificación de identidad de pQE30 tLbparp por PCR y secuenciamiento**

El plásmido obtenido por lisis alcalina se sometió a diferentes ensayos de PCR con el fin de verificar su identidad, haciendo uso de cuatro sets de *primers*, como se observa en la tabla 3. En donde los *primers* Fw-pQE y Rv-pQE presentan complementación con regiones diferentes al inserto en el vector recombinante, mientras que los *primers* Fw-BamHI y Rv-HindIII corresponden al extremo 5' y 3' de tLbparp. En cada PCR se empleó el plásmido pQE30 vacío como control negativo de amplificación. Adicionalmente, se analizó la identidad del constructo a través de secuenciamiento por el método de Sanger, la que fue realizada por el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia (IGUN).

Tabla 3. Primers empleados para la corroboración de identidad de pQE30 tLbPARP.

No. set	Nombre	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)	Amplicon esperado (bp)
1	Fw-BamHI	GGATCCGGCTTTGCGGCAGCGT TG	69	732
	Rv-HindIII	AAGCTTCTACCGTGTAAGAGGA ACTGCAG	63	

2	Fw-pQE	GGAGAAATTA ACTATGAGAGG	49	826
	Rv-pQE	GTTCTGAGGTCATTACTGG	51	
3	Fw-BamHI	GGATCCGGCTTTGCGGCAGCGT TG	69	783
	Rv-pQE	GTTCTGAGGTCATTACTGG	51	
4	Fw-pQE	GGAGAAATTA ACTATGAGAGG	49	775
	Rv-HindIII	AAGCTTCTACCGTGTAAGAGGA ACTGCAG	63	

- **Expresión de la proteína recombinante 6xHis tLbPARP**

Para la expresión de la proteína recombinante se emplearon las cepas de expresión *E.coli* BL21 Rosetta 2(DE3) y M15(pREP4), estableciendo tiempos de inducción, temperatura y concentración de inductor, como se describe a continuación. Estas células se transformaron por choque térmico, se tomaron cuatro transformantes y se realizó un preinóculo de 5 mL en LB suplementado con 100 µg/mL de ampicilina a 37 °C por 16 h. Posteriormente se hizo el inóculo en 25 mL (dilución 1:50) en LB suplementado con ampicilina, el medio de cultivo se dejó a 37 °C con agitación constante (170 rpm) en la incubadora LabTech^R hasta llegar a una densidad óptica (OD_{600nm}) entre 0,5 y 0,6. La inducción de expresión de proteína se empezó con la adición de Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) al medio de cultivo a una concentración final de 0,5 mM a 37 °C por 16 h y agitación constante (150 rpm). Se colectaron muestras del cultivo inducido a 2, 4 y 16 h. Las muestras colectadas inmediatamente se centrifugaron a 6000 rpm por 10 min en la centrifuga Thermo Scientific Megafuge 16, los pellets de las células se almacenaron a -20 °C para análisis posteriores. Igualmente, con propósito de incrementar la presencia de la proteína recombinante en la fracción soluble, Se usó el medio 2X-YT (16 g Triptona, 10 g extracto de levadura y 5 g de NaCl por litro de solución) suplementado con sorbitol 0,5 M, la inducción se realizó con IPTG 0,2 mM a 20 °C por 16 h⁶³.

La evaluación de la expresión de 6xHis tLbPARP se realizó inicialmente con extractos totales de células inducidas, los cuales se obtuvieron con la resuspensión del pellet de bacterias proveniente del medio de inducción en buffer de carga 1X (Tris 0,083 M, SDS 1,74%, Glicerol 15%, β-mercaptoetanol 5,5% y azul de bromofenol 0,002%), promoviendo la desnaturalización de las proteínas a 95 °C por 10 min. Para determinar la solubilidad de la proteína, se realizó el lisado de las bacterias provenientes del medio de inducción. Los pellets almacenados a -20 °C se resuspendieron en buffer de lisis (0,5 mg/ml lisozima, 300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄ pH 8.0/NaOH, 10 mM imidazol, 10 % glicerol, coctel inhibidor de proteasas (Thermo Scientific) 1:400) manejando una relación de 5,0 mL de buffer por cada 1,0 g de peso húmedo celular, el

resuspendido se incubó a 4 °C por 1 h, posteriormente, el prelisado se sometió a ciclos de ultrasonido en baño frío (50 % amplitud, 30 s de pulso, 30 s de descanso por 5 min haciendo uso del sonicador SONICS vibra cell. El lisado se centrifugó 12000 rpm a 4 °C por 20 min en la centrifuga Thermo Scientific Megafuge 16. Con el fin de analizar las fracciones resultantes, se tomaron 40 µL del sobrenadante y una porción del pellet agregando 8 y 50 µL de buffer de carga 1X respectivamente y se calentaron a 95 °C por 10 min, el sobrante de cada fracción se almacenó a -20 °C. El análisis de los perfiles proteicos en cada paso se realizó mediante electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE - gel concentrador: 3.9%; gel separador: 12%). Se empleó Azul de Coomassie R-250 para la tinción de los geles y se visualizaron con el analizador de imágenes Imager Gel Doc™ XR, con el software Quantity One Basic 4.6.3 de BIORAD™⁶⁴.

- **Detección de 6xHis tLbPARP mediante western blot**

Con el objetivo de confirmar la expresión de 6xHis tLbPARP, se realizó su Inmunodetección por *western blot* tanto en extractos crudos como en fracciones de lisado celulares. Se empezó corriendo las muestras en un SDS-PAGE, luego, se hizo una electrotransferencia en membrana de nitrocelulosa a corriente constante (200 mA por 2 h) en buffer de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM y Metanol 10%, pH 8,3). Para verificar la electrotransferencia se realizó tinción de la membrana con rojo Ponceau S la cual se removió con H₂O. Posteriormente se dejó la membrana en bloqueo con agitación constante por 2 h en TBS-T leche descremada al 5% (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM y Tween-20 0,1%). Terminado el bloqueo, se incubó la membrana con una dilución de anti 6xHis-*mouse* 1:5000 (Abcam) en TBS-T por 2 h. Luego, se dejó incubando con el anticuerpo secundario *α-mouse* conjugado con fosfatasa alcalina en una dilución 1:10000 por 1 h. En cada uno de estos pasos se hicieron tres lavados de 10 min con TBS-T. Para la detección, se empleó el método colorimétrico, en el cual se sumerge la membrana en 4 mL de buffer de fosfatasa alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,0, NaCl 150 mM y MgCl₂ 1 mM), 16,5 µL de NBCIP (5-Bromo- 4-Cloro- 3'-Indolifosfato p-Toluidina Sal, S381C Promega (50mg/mL en 100% dimetilformamida)) y 16,5 µL de NBT (Nitro-Azul Cloruro de Tetrazolio, S380C, Promega (50 mg/mL en 70% dimetilformamida)). El medio de reacción se descartó al observar la aparición de señal. La membrana se lavó con H₂O y se secó⁶⁵.

- **Purificación de 6xHis tLbPARP desde cuerpos de inclusión**

Debido a que la proteína recombinante se encontraba enriquecida en la fracción insoluble del lisado celular, se decidió aplicar la metodología de solubilización de cuerpos de inclusión para su purificación. De este manera, los pellets

correspondientes a la fracción insoluble se resuspendieron en buffer de lavado #1 (Tris-HCl 100 mM pH 7.0, EDTA 5 mM, DTT 5 mM, urea 2 M, TritonX-100 2%), se centrifugó a 12000 rpm a 4 °C por 30 min en la centrifuga Thermo Scientific Megafuge 16, el lavado se repitió dos veces más. Posteriormente, se homogenizó el pellet con el buffer de lavado #2 (Tris-HCl 100 mM pH 7.0, EDTA 5 mM, DTT 5 mM) y de nuevo, se centrifugó a 12000 rpm a 4 °C por 30 min en la misma centrifuga. Finalizando el ciclo de lavados, se resuspendió el pellet en buffer de extracción (50 mM Tris-HCl pH 7.0, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 8 M cloruro de guanidino) y se centrifugó a 14000 rpm a 4 °C por 1 h en la centrifuga Thermo Scientific Megafuge 16, el sobrenadante se dispuso en 1 L de buffer diálisis (50 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl, 5 mM DTT) a 4 °C por 16 h con una membrana (MWCO) de 10 kDa. El dializado se centrifugó a 12000 rpm a 4 °C por 30 min. El pellet de la centrifugación se resuspendió en buffer de carga 1X, se usó el volumen necesario para poder solubilizar por completo el pellet, posteriormente la resuspensión se incubó a 95 °C por 10 min con el fin de realizar un SDS PAGE preparativo, empleando marcadores preteñidos (Thermo Scientific™ PageRuler™ Prestained Protein Ladder 10-180 kDa) con el fin de ubicar la proteína recombinante de acuerdo con el peso. Finalizada la separación electroforética, se cortó la banda correspondiente a 6xHis tLbPARP denominada banda media, adicionalmente, se cortó una banda superior e inferior con relación a la banda media. Las bandas fueron trituradas y sometidas a elución con H₂O MiliQ a 37 °C con agitación constante por 16 h. Luego, las muestras se centrifugaron a 5000 rpm por 10 min para recuperar el eluido. Este proceso se repitió dos veces más. Los eluidos recuperados se cuantificaron por el método de Bradford ⁶⁶.

La proteína obtenida en esta etapa fue empleada para la generación de anticuerpos en modelo aviar como se describe posteriormente.

- **Purificación de 6xHis tLbPARP desde fracción soluble del lisado celular**

Una vez optimizadas las condiciones de expresión de 6xHis tLbPARP, fue posible obtenerla en la fracción soluble, de esta manera, para purificarla se empleó una cromatografía de afinidad a metales (IMAC): Se usó una solución etanólica al 50% de la resina (Thermo Scientific™ Resina de Ni-NTA HisPur™), en una relación 1:10 con respecto a la fracción soluble. Para equilibrarla, se centrifugó a 3000 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante y la resina se resuspendió en 10 volúmenes del buffer de lisis anteriormente mencionado y se volvió a centrifugar a 3000 rpm por 5 min, este proceso se repitió dos veces más. Luego, se mezcló la fracción soluble con la resina equilibrada y se dejó interactuar a 4 °C por 1 h con agitación constante. Terminado el tiempo de interacción, la resina se empacó en una mini columna, se recolectó la fracción no retenida y se hicieron dos lavados con 10 volúmenes de buffer de lavado (300 mM NaCl,

50 mM NaH₂PO₄ pH 8.0/NaOH) que contenía concentración de imidazol de 50 y 80 mM. Finalmente, se hicieron tres eluciones con 400 µL de buffer de lisis que contenía imidazol 500 mM. El proceso de purificación se monitoreó por SDS PAGE. Posteriormente, los eluidos fueron dispuestos en un cassette de diálisis (Thermo Scientific Dialysis Cassette Slide-A-Lyzer 7 K MWCO), la diálisis se inició dejando los eluidos toda la noche a 4 °C en buffer de diálisis (20 mM NaPO₄, 300 mM NaCl pH 7,5), al día siguiente se incubó con buffer fresco por dos horas adicionales. El producto de diálisis fue evaluado por SDS-PAGE y cuantificado mediante el método de ácido bicinconínico (Pierce™ BCA Protein Assay Kits)⁶⁷.

5.1.2. Expresión de una versión truncada extendida de LbPARP (Cter LbPARP) en sistema heterólogo de E.coli

A partir de la secuencia de aminoácidos de LbPARP se seleccionó una región ubicada en el C-terminal del candidato que comprendía 496 aminoácidos, correspondiendo al 45 % de toda la secuencia de LbPARP, esta versión se denominó como Cter LbPARP. El plásmido de expresión pET26b(+) Cter LbPARP con codones optimizados para expresión en *E.coli* y en células de mamífero se sintetizó a través de la compañía GenScript. El plásmido fue transformado por choque térmico tanto en células de *E.coli* JM109 y BL21(DE3); terminado el protocolo de transformación, las células se plataron en LB-Agar suplementado con kanamicina (50 µg/mL).

Las transformantes positivas JM109 se dispusieron en medio líquido para una posterior extracción de plásmido por lisis alcalina. Un preinóculo líquido de 5 mL de medio LB suplementado con kanamicina se hizo con las transformantes positivas de BL21(DE3), al día siguiente, el preinóculo se diluyó en 25 mL de medio 2X-YT suplementado con kanamicina. El cultivo se incubó a 37 °C hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0,6. Llegado este punto, se realizó la inducción suplementando el cultivo con sorbitol 0,5 M e IPTG 0,2 mM a 20 °C por 16 h.

El cultivo inducido toda la noche se sometió a lisis celular bajo las mismas condiciones implementadas que con 6xHis-tLbPARP y la fracción soluble se sometió a protocolo IMAC para la purificación de Cter LbPARP-6xHis. La inducción de expresión, la lisis y la purificación por IMAC se monitorearon por SDS-PAGE de manera similar a lo mencionado con 6xHis-tLbPARP.

- **Purificación de Cter LbPARP-6xHis desde fracción insoluble del lisado celular a través de IMAC denaturante**

Las fracciones insolubles derivadas de la centrifugación del lisado celular que estaban expresando Cter LbPARP-6xHis se recolectaron y se lavaron con el buffer de lavado de cuerpos de inclusión (20 mM Tris-HCl, 2% Tritón X-100, 2M urea, pH 7,5) en una

proporción 1:10 p/v. Los lavados se hicieron resuspendiendo la fracción insoluble con el volumen de buffer de lavado adecuado y se centrifugaba a 4 °C a 12000 rpm por 30 min, esto se hizo en dos ocasiones. Posteriormente, la fracción insoluble se solubilizó con el buffer de solubilización (20 mM Na₃PO₄, 300 mM NaCl, 10 % glicerol, 8M Urea e imidazol 10 mM, pH 7,5) manteniendo la proporción pellet-volumen implementada en los lavados.

La solución resultante, se incubó con una resina Ni-NTA por 1 h. Terminado este tiempo, la resina se empacó y se recolectó la fracción de proteínas no unidas. Luego, se realizaron múltiples lavados con buffer de solubilización con concentración decrecientes de urea: 6, 4, 2 y 0 M. Después, se hizo un lavado adicional con buffer de solubilización suplementado con 50 mM de imidazol y se procedió a realizar tres eluidos, cada uno con 400 µL del mismo buffer suplementado con 500 mM de imidazol. El proceso se monitoreó por SDS-PAGE.

5.1.3. Aproximación a la obtención de una versión N-terminal del candidato a LbPARP (Nter LbPARP)

Nter LbPARP representa el extremo N-terminal de LbPARP (2598 bp), en él se presenta una región de dedos de zinc que presentaría unión al DNA y su obtención se abordó en este estudio. Similar a como se hizo con tLbPARP, el inserto de Nter LbPARP se obtuvo mediante PCR anidada en donde la plantilla para su amplificación fue el gen completo de LbPARP haciendo uso de los *primers* Fw-LbPARP y Rv- Nter LbPARP (5'-CAACGCTGCCGCAAAGC-3'). Para la amplificación se hizo un paso inicial de desnaturalización 94 °C/10 min seguidos de 35 ciclos de amplificación con pasos de desnaturalización 94 °C/30 s, *annealing* 61 °C /15 s y extensión 72 °C/2:50 min; se programó el último ciclo con pasos de extensión de 72 °C/10 min y *hold* a 4 °C. El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa TAE 1X desde el cual la banda correspondiente a Nter LbPARP se purificó.

El inserto de Nter LbPARP se ligó con el vector Champion™ pET SUMO mediante clonación T/A realizando la siguiente reacción: 4,0 µL H₂Odd, 2,0 µL de inserto (22,1 ng/µL), 1,0 µL del vector (25 ng/µL), 1,0 µL de buffer 2X de ligasa T4 (Tris-HCl pH 7,8 60 mM; MgCl₂ 20 mM; DTT 20 mM; ATP 2 mM; PEG8000 10%) y 1,0 µL de ligasa T4 (1U/ µL). La reacción de ligación se dejó a 16 °C toda la noche. Al día siguiente, 5 µL de la reacción de ligación se transformaron en células de *E.coli* Top10 bajo condiciones anteriormente descritas usando como marcador de selección kanamicina.

Las transformantes obtenidas fueron rastreadas por PCR evaluando presencia y adecuada direccionalidad del inserto . La presencia del inserto se evaluó con los *primers* Fw-LbPARP y Rv-Nter LbPARP mientras que la direccionalidad se determinó

con los *primers* Fw-SUMO (5'-AGATTCTTGACGACGGTATTAG-3') y Rv-Nter LbPARP (2783 bp). Los productos de PCR fueron corridos en gel de agarosa TBE 1X. Los clones positivos para presencia y direccionalidad del inserto se inocularon en 10 mL de LB suplementado con kanamicina (50 µg/mL) y se dejaron en incubación a 37 °C por 16h con agitación constante.

Al siguiente día los inóculos de toda la noche se sometieron a extracción de plásmido por lisis alcalina protocolo que se ha expuesto con anterioridad. Los plásmidos obtenidos fueron evaluados nuevamente a través de PCR y secuenciamiento para corroborar su identidad.

5.2. Ensayos de Poli-ADP ribosilación

Paralelo a la obtención de los diferentes constructos de LbPARP para llevar a cabo el estudio de la actividad enzimática a nivel *in vitro*, se produjeron diferentes proteínas como controles de ADP-ribosilación para la implementación del ensayo como se describe a continuación.

5.2.1. Ensayo de ADP-ribosilación *in vitro*

- **Generación de controles de actividad TcPARP, TbPARP, HscatPARP y HscatiPARP recombinantes**

La expresión y purificación de varias proteínas recombinante se empleó como método para obtención de los controles positivos y negativos de actividad funcional *in vitro*. En el caso de los controles positivos, las PARPs de *Trypanosoma cruzi* y *brucei* (TcPARP y TbPARP), así como la versión catalítica de la PARP 1 de humano (HscatPARP) fueron obtenidas; para el control negativo, la versión inactivada (HscatiPARP) fue producida. Las dos PARPs de tripanosomas fueron expresadas a partir de los plásmidos pET22-b(+) TcPARP y TbPARP los cuales fueron donados por el laboratorio de ADP-ribósidos y Enfermedades Parasitarias INGEPI-CONICET liderado por la Dra. Salomé Vélchez Larrea en Buenos Aires, Argentina.

TcPARP y TbPARP fueron expresadas en la cepas de *E.coli* BL21 Rosetta 2 (DE3) y BL21 Codon + (DE3) RILP, respectivamente. Para la inducción de la expresión de las proteínas, se partió de la dilución de un pre inóculo de toda la noche en 200 mL de medio 2X-YT en un factor 1:50, el medio fue suplementado en ambos casos con ampicilina (100 µg/mL) y cloranfenicol (50 µg/mL), luego, se dejaron los medios a 37 °C a agitación constante hasta alcanzar una OD a 600 nm de 0,6. Antes de realizar la inducción, los cultivos se dejaron en baño frío aproximadamente por 1 h, terminado este tiempo, se agregó benzamida 5 mM e IPTG 0,1 mM y se dejó induciendo toda la

noche a 20 °C a agitación constante. La inducción se evaluó a través de SDS-PAGE, como se ha descrito anteriormente^{39,64,68,69}.

Por otro lado, la porción catalítica de la PARP humana activa e inactiva se obtuvieron desde los plásmidos pET26-b(+) HscatPARP y HscatiPARP, estos fueron facilitados por el laboratorio del profesor Mathias Ziegler. Ambas proteínas fueron expresadas en células de *E.coli* BL21 (DE3) empleando una metodología similar a la descrita para la obtención de las PARPs de tripanosomas, en esta ocasión, el antibiótico empleado fue kanamicina (50 µg/mL)³⁹.

La purificación de las proteínas recombinantes a partir de la fracción soluble de los lisados celulares de *E.coli* se realizó empleando la cromatografía de afinidad IMAC como se describió previamente para 6xHis tLbPARP.

- **Ensayos enzimáticos**

Para determinar la actividad de ADP-ribosilación de tLbPARP se realizaron ensayos de Inmunodetección de los polímeros generados de ADP-ribosa (PAR) a través de *western blot*. Se partió de las proteínas recombinantes parcialmente purificadas y dializadas, estas se dispusieron en buffer de reacción (PBS 1X, 10 mM MgCl₂, pH 7,5) en una concentración final de 100 ng/µL, se incubó a 30 °C por 1 h con concentraciones de NAD⁺ de 100, 500 y 1000 µM para el caso de 6xHis-tLbPARP. En cuanto a los controles, se incubaron con 1000 µM de NAD⁺. En experimentos posteriores, se suplementó el medio de reacción de 6xHis-tLbPARP con 100 ng de 6xHis HscatiPARP y se hicieron variaciones en los tiempos de incubación⁶⁷.

Una vez terminado la incubación, se agregó buffer de carga 1X (Tris 0,083 M, SDS 1,74%, Glicerol 15%, β-mercaptoetanol 5,5% y azul de bromofenol 0,002%) y se calentaron las muestras por 10 minutos a 95 °C. Luego, parte del medio de reacción se corrió en un SDS-PAGE en gradiente (4–15% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gels) a 150 V por 1 h. Terminada la corrida, se realizó la electrotransferencia (Trans-Blot Turbo Transfer System Bio Rad) sobre membrana de nitrocelulosa haciendo uso del programa *Standard SD*, terminada la transferencia, se incubó la membrana en solución de bloqueo (5% leche descremada-TBS-T) a temperatura ambiente por 1 h^{64,70}.

La membrana de nitrocelulosa se seccionó en tres partes: Una sección se destinó exclusivamente para reconocimiento de PAR por lo que se dejó interaccionando con un anticuerpo monoclonal para el reconocimiento de estos polímeros (Poly(ADP-ribose), mAb (10H)-Enzo) en una dilución 1:10000. Otra de las secciones de la membrana se utilizó para hacer la detección del tag de seis histidinas de las proteínas recombinantes en cuestión haciendo uso del α-6xHis-*mouse* 1:5000 (Abcam). La

última de las secciones se utilizó para detectar en extractos celulares a HscatPARP que estaba fusionada con EGFP y estaba siendo expresada en mitocondrias de células HEK-293, esto, como un control positivo adicional; por lo tanto, la detección de esta proteína se hizo empleando un anticuerpo de reconocimiento de EGFP (Monoclonal Antibody (JL-8)-TakaraBio) en una dilución 1:15000. Todos los anticuerpos fueron diluidos en una solución 5 % leche TBS-T. La incubación con los anticuerpos primarios se hizo a 4 °C, toda la noche a agitación constante ^{64,70}.

Al día siguiente se hicieron tres lavados de 15 minutos cada uno con TBS-T, a continuación, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario α -mouse (Pierce™ Antibody-Thermo Scientific) conjugado con HRP en un factor de 1:10000 en una solución 5 % leche TBS-T a temperatura ambiente por 1h. Terminado este tiempo, se realizaron tres lavados de 15 minutos cada uno con TBS-T ⁷⁰.

El revelado se hizo a través de quimioluminiscencia (SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate), se preparó una solución luminol/peróxido de hidrógeno en una proporción 1:1 y se vertió sobre las membranas, se dejó interactuar por tres minutos. La adquisición de las imágenes se hizo con el sistema ChemiDoc MP ImageLab PC System ^{65,71}.

5.2.2. Evaluación de actividad de poli ADP-ribosilación *in vivo* en HEK-293 y HeLa S3

- **Obtención de los plásmidos pCMV MTS EGFP Cter LbPAR y catTcPARP**

Para la obtención de los plásmidos recombinantes de expresión en células de mamífero se partió de los plásmidos pET22-b(+)TcPARP, pET26-b(+)Cter LbPARP y EGFP MN14, a cada uno de estos plásmidos se le hizo un PCR empleando *primers* específicos para la amplificación de los insertos característicos (catTcPARP, Cter LbPARP y EGFP), esto, haciendo uso del kit Platinum™ SuperFi™ DNA Polymerase-Thermo scientific. Las reacciones se hicieron en un volumen final de 20 μ L (10 μ L PCR mix, 1 μ L *forward primer* (10 μ M), *reverse primer* (10 μ M), 4 μ L enhancer, 3 μ L H₂O y 1 μ L de plantilla) empleando un perfil térmico que consistió desnaturalización 94 °C/10 min seguidos de 35 ciclos de amplificación con pasos de desnaturalización 94 °C/30 s, *annealing* 52 °C /30 s y extensión 72 °C/45 s; se programó el último ciclo con pasos de extensión de 72 °C/10 min y *hold* a 4 °C ⁷².

Tabla 4. Primers empleados en la construcción de pCMV mito Cter LbPARP y catTcPARP

No. Primer	Nombre	Enzima de Restricción	Secuencia (5'-3')
1	Fw-EGFP	PstI	GCGGCTGCAGATGGTGAGCAAGGG
2	Rv-EGFP	Ninguna	CTTGACAGCTCGTCCATGC

3	Fw-CterLbPARP	Ninguna	CCGCTGCAAAACCGTGTGG
4	Rv-CterLbPARP	Sall	GCGGGTCGACGCGGGTAAACAGAAATTGC
5	Fw-catTcPARP	Ninguna	CAGCTCCTGGAGGATGATGC
6	Rv-catTcPARP	Sall	GCGGGTCGACATGATATTTAAACCCCATG

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1 % en TAE 1X/Bromuro de etidio, terminada la corrida electroforética, se cortaron las bandas correspondientes a los insertos de interés y se purificaron con el kit QIAEX II System. Para la obtención de los insertos acoplados a EGFP: EGFP-catTcPARP y EGFP-Cter LbPARP, los amplicones catTcPARP y Cter LbPARP fueron fosforilados en sus extremos 5' y 3' con la enzima T4 polinucleótido quinasa (10 U/ μ L) en 20 μ L de buffer de reacción: 2 μ L buffer A PNK 10X, 2 μ L 10 mM ATP, 1 μ L T4 PNK y 15 μ L producto de PCR a 37 °C por 45 min ⁷²⁻⁷⁴.

Terminado el tiempo de fosforilación, los insertos fosforilados fueron purificados nuevamente con el kit QIAEX II System para luego ligarlos al inserto EGFP con la enzima T4 ligasa (10 U/ μ L), esto se hizo en el siguiente buffer de reacción: 4 μ L EGFP, 4 μ L fosfo- catTcPARP/CterLbPARP, 1 μ L buffer T4 DNA ligasa 10X y 1 μ L T4 DNA ligasa a 16 °C por 16 h ⁷⁵.

Para obtener EGFP-catTcPARP y EGFP-CterLbPARP con la direccionalidad adecuada, se realizó una PCR con los primeros Fw-EGFP y Rv-catTcPARP/CterLbPARP, los productos de PCR fueron corridos en gel de agarosa al 1% TAE 1X/Bromuro de etidio. Posteriormente, se cortaron las bandas correspondientes a los insertos y se purificaron ⁷².

La ligación de los insertos purificados en los plásmidos de expresión, se empezó por hacer la doble digestión de 1 μ g del plásmido pCMV-MTS (*mitochondrial targeting site*) con las enzimas PstI y Sall en un volumen total de 20 μ L (2 μ L buffer 3 10X, 1 μ L PstI, 1 μ L Sall, 1,43 μ L pCMV-MTS, 14,57 μ L H₂O) a 37 °C por 4 h. Posteriormente, el plásmido doblemente digerido se purificó y se ligó empleando T4 ligasa con los insertos previamente obtenidos (5 μ L inserto, 3 μ L vector, 1 μ L buffer DNA ligasa 10X y 1 μ L T4 DNA ligasa) a 16 °C por 16 h ^{76,77}.

Con el producto de ligación se transformaron células de *E.coli* JM109 por choque térmico. Después de la recuperación de las células, estas se platearon en Lb-agar suplementado con ampicilina (100 μ g/mL). El rastreo de clones se hizo a través de PCR de colonia; para esta amplificación se hizo uso de los *primers forward* que anillaban en la región 5' de los genes que producían las proteínas Cter LbPARP y catTcPARP, y el *primer reverse* BGH (5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3') que anillaba en la región del

terminador BGH del plásmido. Los productos de PCR fueron evaluados en geles de agarosa al 1 % en TAE 1X/Bromuro de etidio. Los clones que resultaron positivos del rastreo se inocularon en 50 mL de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL), este, se incubó a 37 °C por 16 h a agitación constante ⁵⁸.

Para la extracción del plásmido recombinante de las células bacterianas, se tomó 1 mL del medio incubado toda la noche para realizar un miniprep con el kit *Miniprep—NucleoSpin Plasmid* (TakaraBio) y el resto del cultivo se dispuso para un maxiprep con el kit *Maxipreps for plasmid DNA purification—NucleoBond Xtra Maxi/Maxi Plus* (TakaraBio), los plásmidos purificados fueron cuantificados por espectroscopía UV-vis. Su identidad fue corroborada por ensayos con enzimas de restricción y secuenciación ^{59,78,79}.

- **Determinación de actividad enzimática de PARPs mediante detección de polímeros de ADP-ribosa en células HeLa S3 por inmunocitoquímica**

Las células HeLa S3 fueron cultivadas en una placa de 24 pozos en medio DMEM (37 °C – 5,0 % CO₂), suplementado con suero fetal bovino 10% (v/v) (DMEM completo), 100 U/mL de potasio de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin sulfato; antes de sembrar las células en cada pozo, en el fondo de cada uno de estos se colocó un cubreobjetos (no 1,5; Ø 12 mm). Se sembraron cerca de 75000 células en cada pozo un día antes de la transfección en 1 mL de medio. Al siguiente día, se cambió el medio y las células se transfectaron respectivamente con 1 µg de los plásmidos pCMV-MTS-EGFP, pCMV-MTS-EGFP-catHsPARP, pCMV-MTS-EGFP-catTcPARP y pCMV-MTS-EGFP-CterLbPARP haciendo uso del agente de transfección X-tremeGENE 9™ siguiendo las indicaciones del fabricante ^{80,81}.

Luego de 24 h, se removió el medio de transfección y se lavaron las células con 1 mL de PBS 1X, luego, las células fueron fijadas durante 25 min a temperatura ambiente con 500 µL de paraformaldehído frío al 4 % (v/v) en PBS 1X. Las células fijadas fueron lavadas con 1 mL de PBS 1X y permeabilizadas por 10 min con 500 µL de una solución de Tritón-X-100 al 0,5 % (v/v) en PBS 1X, terminado este paso, se hizo un lavado con 1 mL de PBS y se procedió a hacer el bloqueo por 1 h a temperatura ambiente con 1 mL de medio DMEM completo, terminado el bloqueo se hizo un lavado con PBS ⁸⁰.

Para el reconocimiento de las cadenas de ADP-ribosa se empleó el anticuerpo primario Poly(ADP-ribose), mAb (10H)-Enzo, este se diluyó en un factor 1:1000 en medio DMEM completo, se agregaron 250 µL de esta dilución a cada pozo y se dejó incubando a 4 °C por 16 h. Al día siguiente, se hacen lavados entre 1 a 5 min con 1 mL de PBS, continuando con un lavado de 1 a 5 min con 1 mL de una solución de Tritón-X-100 al 0,1 % (v/v) en PBS, el ciclo de lavados se termina con uno adicional de 1 a 5 min

con un 1 mL de PBS. La incubación del anticuerpo secundario (Alexa Fluor® 594-conjugated goat anti-mouse (IgG H + L)), se hizo con 250 µL de una dilución 1:1000 de este anticuerpo en medio DMEM completo dejando interactuar a temperatura ambiente por 2 h, terminado este tiempo se volvió a hacer un ciclo de lavados similar al descrito anteriormente ⁸⁰.

Para visualizar los núcleos de las células, se agregaron 500 µL por 10 minutos de una solución de DAPI en un factor 1:20000 en PBS 1X, se realizó otro ciclo de lavados ⁸⁰.

Finalmente, los cubreobjetos fueron tomados del fondo de los pozos y dispuestos en un portaobjetos utilizando solución de montaje, las imágenes fueron adquiridas en el microscopio confocal de fluorescencia Leica TCS SP8 STED 3X ⁸⁰.

- **Determinación de actividad enzimática de PARPs mediante detección de polímeros de ADP-ribosa en extractos de células HEK-293 por *western blot***

Las células HEK-293 fueron cultivadas bajo las mismas condiciones que las células HeLa S3, un día antes de la transfección las células se sometieron a un proceso de tripsinización y fueron contadas con una cámara de Neubauer, se sembraron cerca de 250,000,000 células por pozo en una placa de 6 pozos. Al día siguiente las células fueron transfectadas empleando una metodología similar a la descrita con las células HeLa S3, en este caso se implementó un control positivo adicional el cual consistía en un plásmido que codificaba HscatPARP con una señal de direccionamiento a peroxisomas (pex-catHsPARP), así como los controles de células no transfectadas y células transfectadas con un plásmido que codificaba para una proteína sin actividad de PARP: EGFP ^{80,81}.

Pasadas 24 h de la transfección, las células se lavaron con 1 mL de PBS y se agregó 120 µL de buffer de lisis (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 2% (p/v) SDS, 1 mM EDTA y 1 mM 3-aminobenzamida). El lisado celular fue recolectado con un raspador celular y dispuesto en un tubo de 1,5 mL, las muestras se pasaron por una jeringa de calibre 23 hasta que se alcanzaba mayor fluidez del lisado. La cuantificación de proteínas totales se hizo a través del método BCA con una dilución 1:10 del lisado ⁸⁰.

70 µg de proteínas fueron cargados por pozo en un gel 4–15% Mini-PROTEAN®. El procedimiento de *western blot* se realizó de manera similar al descrito en la sección 5.2.1, empleando como anticuerpo primario Poly(ADP-ribose), mAb (10H)-Enzo (1:10000) para la detección de los polímeros de ADP-ribosa y α-EGFP Monoclonal Antibody (JL-8)-TakaraBio (1:15000) para la detección de las proteínas fusionadas a EGFP expresadas en cada ensayo. El control de carga se realizó a través del reconocimiento de β-tubulina con el anticuerpo primario α-β-tubulina (abcam) (1:10000) y el anticuerpo secundario α-conejo IgG conjugado con HRP (Invitrogen)

(1:10000)⁸⁰.

5.3. Determinación de localización celular de LbPARP en promastigotes de *Leishmania braziliensis* mediante el desarrollo de una herramienta inmunológica en modelo aviar

- **Inmunización de gallinas para la producción de anticuerpos α -6xHis-tLbPARP**

Dos gallinas Hy-Line Brown de 84 semanas fueron inoculadas; una de ellas (#713), en todas las ocasiones, con 150 μ g de 6xHis-tLbPARP purificada a través de la metodología de cuerpos de inclusión (apartado 5.1.1) y la otra, siendo la gallina control (#720), se inoculó con PBS 1X. El esquema de inmunización diseñado fue de 30 días el cual constó de cuatro inoculaciones en los días 1, 13, 21 y 28. En la primera inoculación el antígeno se suministró en solución con adyuvante de Freud completo en una relación 1:1 de adyuvante: antígeno en volumen. El resto de inoculaciones se hicieron con adyuvante de Freud incompleto manteniendo la misma proporción en volumen como se describe en la tabla 5^{82,83}.

Tabla 5. Esquema de inmunización de modelo aviar para la obtención de IgYs contra 6xHis-tLbPARP.

Día de inoculación	Antígeno		Adyuvante	Suero colectado (S)
	6xHis-tLbPARP (μ g)	PBS 1X (μ L)		
1	150	150	Completo	S preimmune
13	150	150	Incompleto	S1
21	150	150	Incompleto	S2
28	150	150	Incompleto	S3

La inmunización y el mantenimiento de los animales empleados en este ensayo se realizaron en el centro de producción avícola de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, de acuerdo con las condiciones de mantenimiento y manejo de animales, siguiendo las normas éticas establecidas y con acompañamiento y asesoría de profesionales entrenados.

- **Recolección y evaluación de sueros de gallina α -6xHis-tLbPARP**

Para la evaluación de la producción de anticuerpos aviares, se tomaron un total de cinco sangrías: Una antes de la primera inoculación (preimmune), una antes de cada inoculación (S1, S2 y S3) y la quinta (S4) se tomó una semana después de la última inoculación. Cada una de estas contuvo un volumen entre 1 y 2 mL. Las muestras se tomaron desde la vena alar con jeringas de 5 mL en tubos recubiertos con EDTA, se incubaron a 37 °C por 30 min y se centrifugaron a 12000 rpm durante 20 min a 4 °C. El suero se tomó del sobrenadante y se almacenó a -20 °C en glicerol al 20 %. Las

capacidad de reconocimiento de las sangrías obtenidas al antígeno de interés se realizó a través de ensayos de *western blot*, empleando como anticuerpo primario las sangrías obtenidas en una dilución 1:2500 en TBS-T y como secundario y α -Chicken-Donkey acoplado a fosfatada alcalina (FA) (Sigma) en un factor de 1:10000. En experimentos posteriores aplicando la misma técnica, se evaluó la mínima cantidad de antígeno que podía reconocer un dilución de 1:2500 de S4 α -6xHis-tLbPARP variando la cantidad de antígeno desde los 250 hasta los 4 ng. Así mismo, se determinó la máxima dilución de S4 α -6xHis-tLbPARP capaz de reconocer 250 ng de 6xHis-tLbPAR, empezando por la dilución 1:2500 hasta 1:20000⁶⁵.

- **Purificación de anticuerpos policlonales a partir de yema de huevo de gallina (IgYs) α -6xHis-tLbPARP**

Durante los 30 días del esquema de inmunización, se recogieron un total de 27 huevos de la gallina #713 cuyas yemas se sometieron a una extracción de IgYs. Para lo anterior, las yemas en primera instancia fueron separadas de la clara, las yemas fueron depositadas en un Falcon de 50 mL y se disolvió en 2 volúmenes de PBS 1X, de lo anterior resultaba un solución de un volumen aproximado de 50 mL. De cada una de las soluciones de yema obtenidas, se tomaron 500 μ L y se depositaron en un Eppendorf de 2 mL en donde posteriormente se agregaron 500 μ L de acetona con el fin de deslipidar las muestras, esto, se incubó a -20 °C por 2 h. Luego, las 27 muestras se centrifugaron a 8000 rpm por 10 min y el sobrenadante se retiró⁸⁴.

Luego de la deslipidación, se agregó a la muestra 500 μ L de una solución de polietilenglicol 6000 (PEG6000) 3,5 % (p/v) en PBS 1X. El pellet se resuspendió y se incubó en baño de hielo a 4 °C durante 10 min, terminado este tiempo, las muestras se centrifugaron a 12000 rpm a 4 °C por 20 min. Los sobrenadantes resultantes de transfirieron a un nuevo Eppendorf de 2 mL y se les agregó PEG6000 para una concentración final de 8,5 %, las muestras se volvieron a someter a incubación y centrifugación. A los pellets resultantes se les agregó 500 μ L de una solución de PEG6000 al 12 % en PBS 1X para realizar un tercer proceso de precipitación. Los pellets obtenidos de este último paso fueron resuspendidos en 250 μ L de PBS 1X y almacenados a -20 °C. El proceso de precipitación de IgYs fue monitoreado a través de SDS-PAGE al 12 %; para la obtención de las muestras, se tomó una alícuota de sobrenadantes y pellets de cada paso de la precipitación. A los pellet se les agregó buffer de carga 1X y a los sobrenadante se les agregó buffer de carga 6x para una concentración final de 1X. Luego de una incubación de 10 min a 95 °C, las muestras se cargaron en el gel^{84,85}.

- **Evaluación de IgYs α -6xHis-tLbPARP mediante *western blot* y ELISA**

Para los ensayos de *western blot* se empezó por la cuantificación de proteínas en las muestras de IgYs obtenidas después de la precipitación, esto se hizo a través de

espectrofotometría UV-vis a 280 nm. Con la muestra que presentó mayor cantidad de proteínas se procedió a realizar los experimentos por *western blot*. Para esto, 250 ng de 6xHis-tLbPARP purificada por cuerpos de inclusión, 250 ng de BSA y una muestra de fracción insoluble proveniente de un lisado celular de *E. coli* que expresaban la proteína de interés, se corrieron en un gel de proteínas SDS-PAGE, el cual fue posteriormente electro transferido siguiendo el flujo de trabajo para este protocolo. Una dilución de 1:1000 del IgYs purificadas fue empleado como anticuerpo primario.

En el caso de los ensayos de ELISA, se inició con la ejecución de un ELISA preliminar con el fin de determinar las condiciones óptimas bajo las cuales se iba evaluar el reconocimiento del antígeno por parte de las IgYs de todos los huevos. De esta manera, tres cantidades de 6xHis-tLbPARP fueron evaluadas: 1000 ng, 500 ng y 250 ng; estas se prepararon en buffer carbonatos ($\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 300 mM - pH 9,6). Así mismo, tres diluciones de anticuerpo fueron probadas: 1:200, 1:500 y 1:1000; provenientes de la muestra que presentó mayor cantidad de proteínas. El protocolo se inició con la inmovilización de 100 μL de antígeno (6xHis-tLbPARP) en una placa de ELISA de 96 pozos (Greiner Bio-One MICROLON™) y se dejó incubar a 4 °C durante 16 h. Al siguiente día se hicieron tres lavados con PBS 1X pH 7,5 y se siguió con la etapa de bloqueo agregando 200 μL de una solución de PBS-leche al 5 % (p/v) dejando incubar a temperatura ambiente (RT) por 2 h. Posteriormente, se volvieron a realizar tres lavados y se procedió a la incubación con 100 μL de las diferentes diluciones de anticuerpo primario a RT por 2 h. Luego de lavar con PBS, se adicionaron 100 μL de anticuerpo secundario α -*chicken* acoplado a HRP (Invitrogen) en una dilución 1:10000 en PBS y se dejó interaccionar a RT por 2 h. 100 μL de sustrato TMB (Thermo Scientific™) fueron agregados por pozo y se dejó el desarrollo de color bajo condiciones ácidas durante 15 min. La lectura de la placa se hizo en el lector MicroFill™ – Biotek a 450 nm. El mismo protocolo se llevó a cabo para evaluar el reconocimiento del antígeno por parte de las IgYs purificadas de todos los huevos, adicionalmente, se empleó BSA como control de reconocimiento⁸⁶.

- **Evaluación y purificación por afinidad a antígeno de anticuerpos de gallina provenientes de suero**

1 mg de 6xHis tLbPARP se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, las proteínas no unidas a la membrana se lavaron en dos ocasiones con TBS-0,2 %Tween 20 y glicina 100 mM, pH 2,5. Se procedió con el paso del bloqueo en el que la membrana se dejó interactuar con una solución de TBS-T leche al 5 % a RT durante 1 h. Luego, la membrana fue lavada en tres ocasiones con TBS-T y se fragmentó en trozos pequeños, estos trozos pequeños se dejaron en interacción con el suero (S5) α -6xHis-tLbPARP a RT durante 16 h con agitación constante. Al día siguiente, el suero remanente se retiró (no unidas) y los trozos se lavaron en tres ocasiones con TBS-T. Para la elución de los anticuerpos, se agregaron 150 μL de una solución glicina 100 mM, pH 2,5 y se dejó

interactuar por tres minutos con una agitación vigorosa, a los eluidos obtenidos, se les adicionaron 15 μ L de una solución Tris-HCl 2M, pH 8,5. Se obtuvieron tres eluidos (E1, E2 y E3) de este proceso y las muestras fueron almacenadas a -20 °C⁸⁷.

Para la evaluación de las IgYs α -6xHis-tLbPARP, se hicieron experimentos de *dot blot*. Brevemente, diferentes porciones de membrana de nitrocelulosa fueron humedecidas en buffer de transferencia, posteriormente dispuestas sobre papel *Whatman*, en ellas se sembraron 250 ng de 6xHis-tLbPARP esperando hasta que la cantidad sembrada se absorbiera sobre la membrana, luego, el protocolo se siguió de manera similar al realizado en *western blot*, en donde los anticuerpos primarios acá probados consistieron en la fracción de anticuerpos no unidos, los tres eluidos y S4 sin purificar; 250 ng de BSA fueron empleados como control de inmunoreconocimiento⁸⁸.

- **Determinación de localización subcelular de LbPARP en promastigotes de *Leishmania braziliensis***

Promastigotes de *L. braziliensis* (M2904 MHOM/BR/75M2904) en cultivo Schneider, pH 7,4 (Sigma) suplementado con suero fetal bovino al 10 % fueron centrifugados y resuspendidos en el mismo medio con diferentes concentraciones de H₂O₂: 0 μ M, 250 μ M y 500 μ M; se incubaron por 10 minutos. Terminado este tiempo, los parásitos se centrifugaron a 4 °C a 5000 rpm por 5 min y se lavaron con 1 mL de PBS 1X, este procedimiento se repitió en tres ocasiones. Cerca de 3 x 10⁵ promastigotes se aplicaron sobre laminas tratadas con poli-L-lisina y fueron fijados con 15 μ L de paraformaldehído frío y filtrado al 4 % a RT durante 1 h, terminado este tiempo, se hicieron dos lavados con 100 μ L de PBS 1X. El paso del bloqueo se realizó con una solución de BSA al 3 % suplementada con Tritón-x100 0,5 %, en PBS 1X y se dejó incubando a 37 °C por 1 h en cámara húmeda, se continuó con dos lavados con PBS 1X y se adicionaron 15 μ L de diferentes concentraciones de E1 del inciso anterior como anticuerpo primario: 1,0 mg/mL, 5,5 mg/mL y 10 mg/mL; se dejó incubando a 4 °C por 16 h. Una dilución 1:1000 de suero pre inmune y una 1:1000 de α -tubulina ratón (Invitrogen) fueron implementados como controles. Seguida de la incubación del anticuerpo primario, se hicieron tres lavados con PBS 1X y se procedió a incubar con 15 μ L de anticuerpo secundario α -chicken conjugado con Alexa-488 (Invitrogen) en un factor de 1:1000 dejando incubar a 37 °C por 1 h. Luego de hacer los lavados con PBS 1X, se incubó cada pozo con 10 μ L de DAPI (1 μ g/mL) a RT por 15 min, se siguió con dos lavados con PBS 1X y uno con H₂O. Finalmente 10 μ L de glicerol por pozo y las placas se sellaron con un cubreobjetos. Las imágenes fueron adquiridas en el microscopio de fluorescencia Zeiss Axio Observer en el departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia⁶⁸.

5.4. Exploración *in silico* de componentes de ADP-ribosilación en parásitos del género *Leishmania*

En esta sección se hizo la identificación de proteínas candidatas que podrían estar involucradas en sistemas de ADP-ribosilación en parásitos del género *Leishmania* a través de herramientas bioinformáticas. Adicionalmente en este trabajo se abordó el estudio *in silico* para la determinación de posibles sitios de modificación postraducciona de LbPARP evaluada a lo largo de este estudio con el fin de profundizar en potenciales mecanismos de regulación de la proteína de interés.

- **Identificación y caracterización de proteínas candidatas mediante plataformas bioinformáticas**

Las obtención de las diferentes secuencias de las proteínas de *Leishmania* se hizo a través de la búsqueda de homología de estructura tridimensional mediante el programa *Foldseek* (<https://search.foldseek.com/search>) tomando como candidatas a las proteínas con E valor más bajo con respecto a las plantillas implementadas: el dominio ARTD de PARP1 y PARP10 (PDB: 6BHV y 6FXI), PARG (PDB:4L2H), MacroD2 (PDB:4IQY) y ARH3 (PDB:7AKS); todas provenientes de humano. Los modelos estructurales fueron generados con *AlphaFold3* (<https://alphafoldserver.com/welcome>) y superpuestos con el programa *ChimeraX*. Con la secuencia de aminoácidos de cada uno de los diversos candidatos se determinaron diversos aspectos fisicoquímicos de estos mediante el programa ProtParam⁸⁹⁻⁹².

- **Predicción de sitios de modificación postraducciona del candidato a LbPARP**

La secuencia aminoacídica del candidato (XP_001565567.1) se introdujo en varios servidores bioinformáticos para la determinación de diferentes sitios que pudieran estar sujetos a modificación en su secuencia: fosforilación (NetPhos 3.1: <https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>), sumoilación (DeepSumo: <http://deepsumo.renlab.org/server.html>), ubiquitinación y metilación (MusiteDeep: <https://www.musite.net>), estas modificaciones han sido reportadas previamente en PARPs de otras especies⁹²⁻⁹⁵.

6. Resultados y discusión

6.1. Construcción del plásmido recombinante pQE30-tLbPARP

En un trabajo previo se logró identificar un candidato a PARP en el genoma de *Leishmania braziliensis* de la cepa MHOM/BR/75/M2904 (ID : 5416151) a través de métodos bioinformáticos, en donde se evidenció la conservación de la triada catalítica por parte del candidato presente en ortólogos de otras especies y del dominio de

dedos de zinc el cual se relaciona con la unión a DNA. A partir de este estudio *in silico* se planteó el análisis experimental del candidato. De esta manera, se propuso el diseño de un sistema heterólogo para la producción de la proteína recombinante con el fin de evaluar la funcionalidad y ubicación subcelular del candidato a Lbparp, esto, haciendo uso del sistema procariote *E.coli*.

Durante la expresión de proteínas recombinantes en sistemas heterólogos, es común que se alteren los procesos de plegamiento, agregación y degradación de proteínas, con el fin de mantener la homeostasis a nivel proteico. En el caso de *E.coli*, se salvaguarda la homeostasis de proteínas a través de la formación de agregados insolubles de biomacromoléculas denominados cuerpos de inclusión (IBs) en donde se dispone la proteína recombinante que está siendo expresada, aunque en estas estructuras se encuentra una gran cantidad de la proteína de interés, por lo general no se encuentra en su plegamiento nativo y de igual forma, su purificación se dificulta por métodos cromatográficos. La formación de IBs está determinada por diversos factores, como la composición de aminoácidos (aa), la longitud de la proteína que se está expresando, la temperatura de inducción, la concentración del inductor en el medio, entre otros ⁹⁶.

Teniendo en cuenta la masa molecular hipotética del candidato (120 kDa) y considerando múltiples aproximaciones al estudio funcional de PARPs en humanos realizadas a través de la clonación de su dominio catalítico, como lo muestra Simonin *et al*, se decidió diseñar la estrategia de clonación partiendo del dominio catalítico de este que corresponde a la región C-terminal (tLbparp, ~30 kDa), con el fin de facilitar la expresión de esta proteína en el sistema heterólogo y así mismo evitar la formación de IBs ^{56,97-99}.

Como paso inicial para la obtención de la proteína recombinante se realizó la subclonación de tLbparp en el vector de expresión pQE30 (**figura 17**). De esta manera, el inserto de tLbparp (732 bp) obtenido a partir de Lbparp (3300 bp) por PCR anidada se clonó en el vector pGEM-T/TA y se ligó con T4 ligasa, se transformaron células *E.coli* TOP10 en donde se obtuvieron múltiples colonias, las cuales se evaluaron por PCR de colonia. Luego de realizar la lisis alcalina sobre las colonias seleccionadas se obtuvo el plásmido de mantenimiento recombinante pGEM-T-tLbparp.

Los plásmidos pGEM-T-tLbparp y pQE30 vacío se sometieron a digestión con BamHI y HindIII para generar los extremos cohesivos correspondientes, estos fragmentos se ligaron con T4 ligasa y el producto de ligación se transformó en células *E.coli* JM109, de esta transformación se obtuvo una colonia que se evaluó por PCR de colonia y se sometió posteriormente a lisis alcalina para la extracción del plásmido de expresión

recombinante pQE30-tLbPARP. La verificación de la identidad de pQE30-tLbPARP se realizó a través de experimentos de PCR empleando diferentes sets de *primers* en donde en todos los casos fue posible visualizar la presencia de los amplicones de peso esperado. Por otro lado, la identidad del plásmido recombinante también fue posible confirmarla a través de secuenciamiento, obteniendo una identidad del 99,85%.

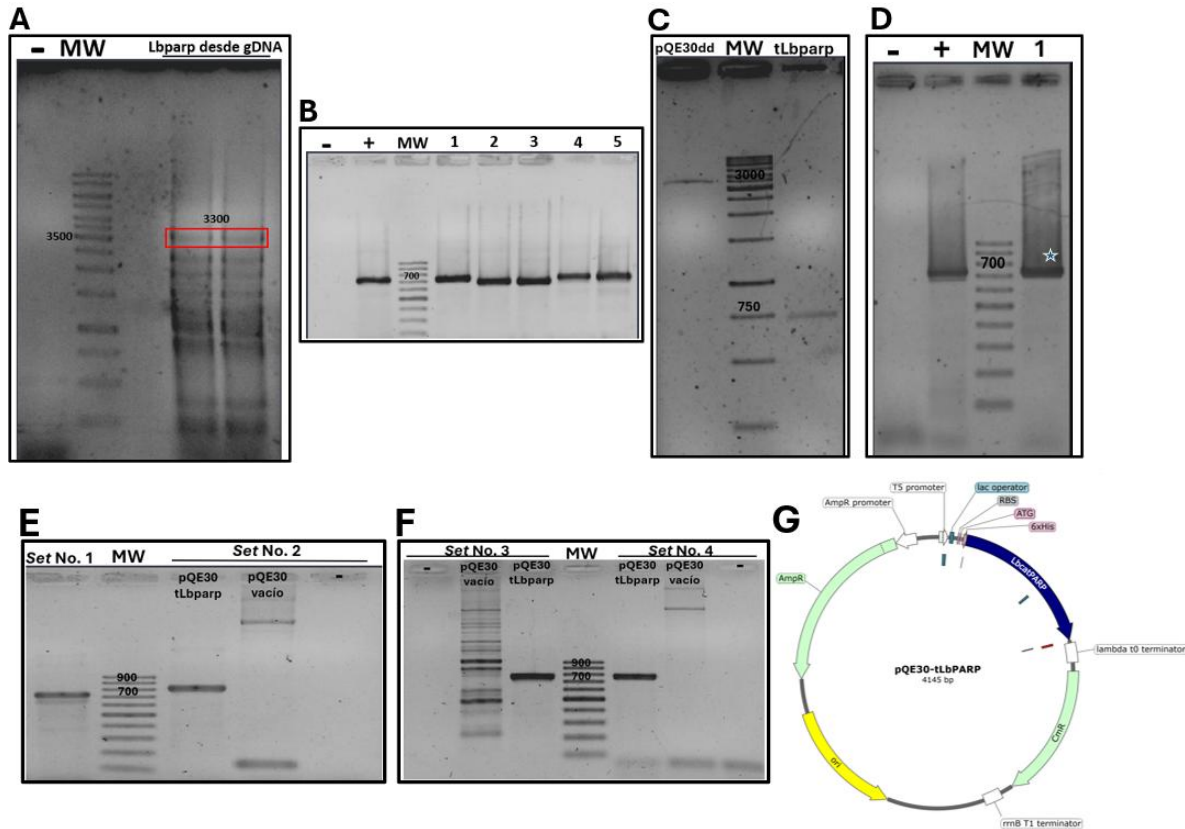


Figura 17. Generación e identificación del plásmido recombinante pQE30-tLbPARP. **A.** Amplificación del candidato Lbparp (3300 bp) mediante PCR a partir de gDNA. **B.** PCR de colonia de transformantes pGEM-T-tLbparp en TOP10 (1-5). **C.** Subclonación doble digestión de vector vacío (pQE30dd –3461 bp) y liberación de inserto (tLbPARP – 732 bp). **D.** PCR de colonia de transformantes pQE30-tLbPARP JM109 (1). **E y F.** Confirmación de identidad de pQE30-tLbPARP por PCR haciendo uso de varios sets de *primers* (set No. 1-4), pQE30 vacío como control. Agarosa al 1% TBE 1X. Tinción con bromuro de etidio. -: Control negativo (sin plantilla), +: Control positivo (Lbparp como plantilla), MW (bp-gene ruler Thermo Scientific). **G.** Mapa de vector de expresión pQE30-tLbPARP.

De esta manera, se logró la clonación de tLbPARP en un vector de mantenimiento (pGEM-T-tLbPARP) mediante clonación T/A y la clonación en el vector de expresión pQE-30 mediante clonación con enzimas de restricción, este vector fue empleado para obtención de la proteína recombinante a evaluar.

6.2. Expresión de 6xHis tLbPARP en el sistema heterólogo de *E.coli*

En la expresión de proteínas recombinantes, la frecuencia de los tRNAs empujados por el sistema heterólogo en su genoma juega un papel muy importante. La secuencia asociada a la proteína recombinante puede presentar codones que se asocian con una frecuencia baja de tRNAs en el organismo de expresión, estos codones se denominan codones raros. La deficiencia de estos tRNAs puede llevar a la incorporación incorrecta de aa o/y ocasionar que se dé un truncamiento en la síntesis de la cadena polipeptídica, afectando la producción de la proteína recombinante y la calidad de esta. Igualmente se ha establecido un efecto sobre la cinética de traducción y por ende sobre el correcto plegamiento de la proteína. Este problema se puede solucionar implementando diferentes estrategias, una de ellas se basa en el uso de sistemas de expresión modificados que tengan la capacidad de suplir la ausencia de los tRNAs para estos codones raros ^{100,101}.

Con el fin de direccionar los experimentos de expresión de la proteína recombinante en *E.coli*, se hizo en primera instancia una aproximación *in silico* para la selección de la cepa de expresión, para ello se utilizó el servidor ATGme, se analizaron los codones raros que pudiera presentar tLbparp en su secuencia. El uso de esta herramienta permitió evidenciar la presencia de varios codones raros en el candidato (figura 3.D), lo que podría limitar la obtención de la recombinante. Debido a esto, se eligió la cepa de *E.coli* BL21 Rosetta™ 2 (DE3), esta cepa contiene el plásmido pRARE2 que le otorga la presencia de varios tRNAs y resistencia a cloranfenicol ^{102,103}.

La expresión de la proteína fue evaluada en los transformantes obtenidos BL21 Rosetta™ 2 (DE3) pQE30 tLbPARP, para ello, se dejaron preinóculos de tres colonias en LB suplementado con glucosa al 2% para evitar autoinducción, iguales condiciones fueron empleadas para células no transformadas (NT) con el fin de usarlas como control de expresión. El preinóculo de alta densidad celular se utilizó para preparar el medio de inducción, al cual se le agregó 0,5 mM de IPTG cuando alcanzó valores de OD_{600nm} entre 0,5 y 0,6. La inducción se dejó a 37 °C y se monitoreó por SDS PAGE a las no inducidas (NI), 4 h y 16 h (ON). De igual forma, se realizó la electrotransferencia de la muestra de 4 h con el fin de detectar a 6xHis tLbPARP por *western blot* (**figura 18**).

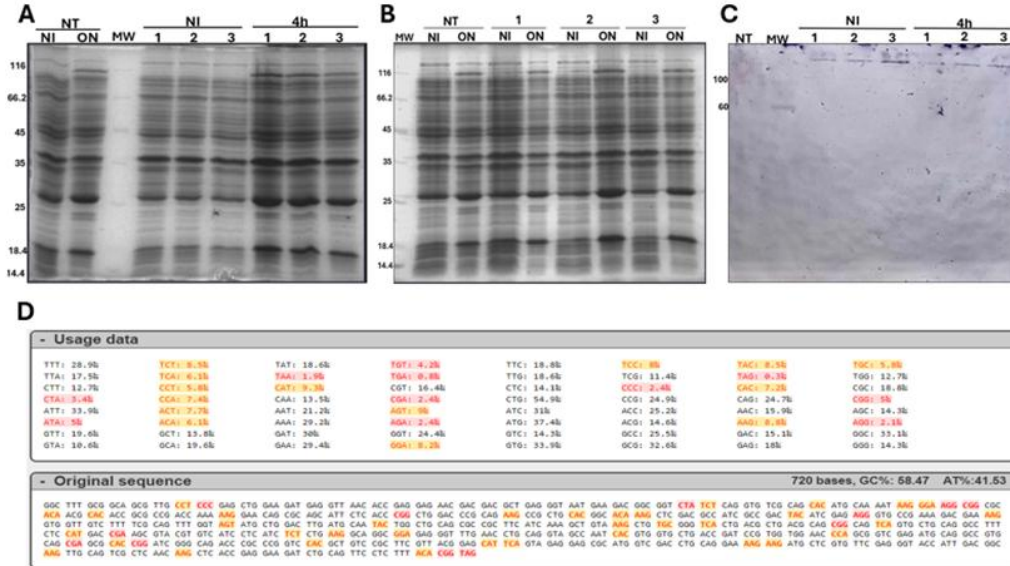


Figura 18. Expresión de 6xHis tLbPAP (30 kDa) en E.coli BL21 Rosetta 2 (DE3). **A y B.** Evaluación de extractos totales de tres clones (1-3) inducidos con IPTG (0,5 mM). 4h, 16 h (ON), no inducidos (NI) y no transformadas (NT), MW (kDa). SDS-PAGE al 12% visualizado con azul de Coomassie. **C.** western blot en membrana de nitrocelulosa, anticuerpo primario: anti 6xHis (1:5000) y anticuerpo secundario: anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina (1:10000), MW (kDa). **D.** Estimación de incidencia de codones raros en tLbPAP respecto a *E.coli*. ATGme software. Rojo: muy raros, Naranja: raros.

Como se presenta en la figura 18, en el sistema heterólogo evaluado no se observa la expresión de 6xHis tLbPAP. En esencia, esto podría atribuirse a que la serie de vectores pQE, regulan la expresión de la proteína recombinante con un promotor sintético derivado del colifago T5 el cual es reconocido por la RNA polimerasa de *E.coli* (RNAPol). Por otro lado, en el cromosoma de las cepas BL21 (DE3) como la acá utilizada, se incorpora una copia de la T7 RNA polimerasa (T7-RNAPol) vía lisógeno λ cuya expresión se encuentra regulada por el promotor inducible por IPTG *lacUV5* (promotor derivado del operón *lac*) esta RNA polimerasa presenta unión específica a la secuencia del promotor T7, más no a la del promotor T5. De esta forma, al momento de realizar la inducción con IPTG, la RNAPol tendría preferencia a unirse al operón *lacUV5* para la expresión de la T7-RNAPol, en vez del promotor T5 el cual no se encuentra presente en su genoma, limitando de esta manera la producción la proteína recombinante. Otra posible explicación a este fenómeno se relaciona con reportes de la disminución de la expresión de RNAPol endógena una vez se inicia la expresión de T7-RNAPol, lo que disminuiría la posibilidad de un eventual reconocimiento del promotor T5 presente en el plásmido de expresión. Adicionalmente, se resalta que el uso de la cepa Rosetta 2 (DE3) con codones adicionales, no contribuyó a la expresión de la proteína en cuestión¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

Lo anterior obligó el cambio de sistema de expresión, no en pro de la búsqueda de cepas que tuvieran la capacidad de sobrellevar la expresión de proteínas recombinantes con codones raros, sino que fueran más aptas para la expresión de genes recombinantes regulados con el promotor T5. De esta manera, se transformaron cepas M15(pREP4) con pQE30-tLbPARP, esta cepa de *E.coli* contiene el plásmido de baja copia pREP4, que le otorga resistencia a kanamicina y expresa constitutivamente el represor *lac* codificado por el gen *lacI*, cabe aclarar que esta cepa no posee una copia cromosómica de *lacI*, lo que hace necesaria la presencia de pREP4 para la regulación de expresión de proteína recombinante ¹⁰⁷.

Para la expresión de 6xHis tLbPARP se procedió de una manera similar al experimento anterior, se dejaron preinóculos de 16 h para realizar el medio de inducción a partir de este, la inducción se realizó agregando de igual forma 0,5 mM de IPTG y se dejó induciendo toda la noche, se implementó como control de inducción células no transformadas (NT) y no inducidas (NI). La verificación de la expresión de la proteína de interés se hizo a través de SDS-PAGE de extractos totales de proteínas y por ensayos de inmunoreconocimiento vía *western blot* (figura 19).

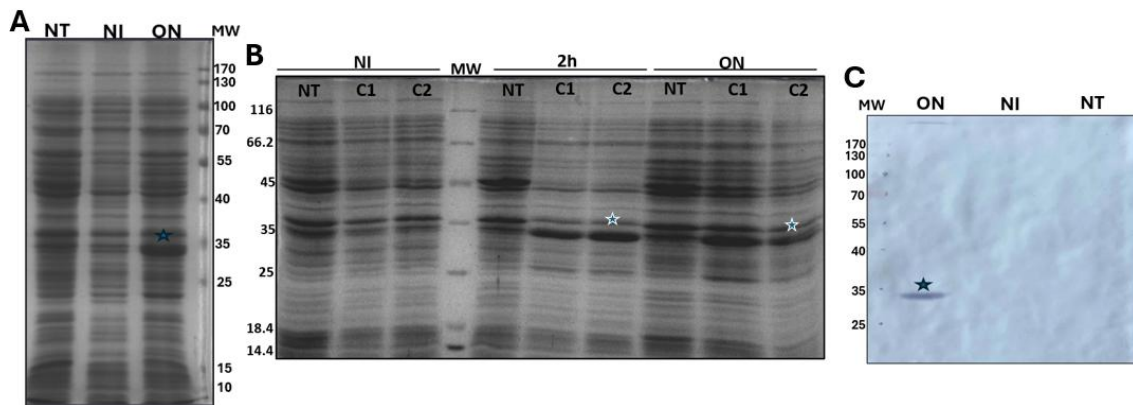


Figura 19. Expresión de 6xHis tLbPARP (30 kDa) en *E.coli* M15(pREP4). **A y B.** Evaluación de extractos totales de células inducidas con IPTG (0,5 mM) 16 h toda la noche (ON), 2 h, no transformadas (NT) y transformadas no inducidas (NI) de dos clones (C1 y C2); MW (kDa). SDS-PAGE al 12% visualizado con azul de Coomassie. **C.** *western blot* de extractos de proteínas totales en membrana de nitrocelulosa para la evaluación de 6xHis tLbPARP, anticuerpo primario: anti 6xHis (1:5000) y anticuerpo secundario: anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina (1:10000), MW (kDa). ★: proteína de interés

Como se aprecia en la figura 19, los transformantes de M15(pREP4) pQE30-tLbPARP bajo las condiciones evaluadas permiten la expresión de una proteína, visible tanto en el SDS-PAGE como en el ensayo de Inmunodetección mediante reconocimiento del tag 6xHis en la región N-terminal.

La proteína expresada se observó en el peso esperado (30 kDa) para 6xHis tLbPARP. Este peso se determinó a través de la realización de una curva de calibración de las

migraciones relativas de los patrones de masa molecular e interpolando en la curva el desplazamiento observado en el gel para la proteína recombinante. De igual forma fue posible estandarizar el tiempo de inducción, encontrando que el nivel de proteína recombinante producida en 2 h no presentaba una diferencia notable con inducciones de 16 h como se observa en los geles de SDS-PAGE. Por lo tanto, considerando que tiempos prolongados de inducción favorecen la agregación de la proteína recombinante se estableció las 2 h como tiempo de inducción para posteriores ensayos (**figura 19.B**).

Para determinar la solubilidad de 6xHis tLbPARP, se realizó el fraccionamiento del extracto total de las células inducidas (**figura 20**), en donde se puede observar un enriquecimiento de la proteína recombinante en la fracción insoluble y ausencia en la fracción soluble. Lo anterior indica que la expresión de esta proteína está favoreciendo la producción de IBs, lo cual podría atribuirse a la presencia de algunos codones raros como se mencionó anteriormente. De otro lado, alteraciones en la formación de puentes disulfuro en proteínas recombinante es un factor que por lo general está estrechamente relacionado con la aparición de IBs debido a que el citoplasma de *E.coli* no posee el ambiente reductor necesario para la adecuada formación de estos, en el caso de 6xHis tLbPARP esto último no resulta relevante debido a la ausencia de puentes disulfuro en su estructura^{101,108}.

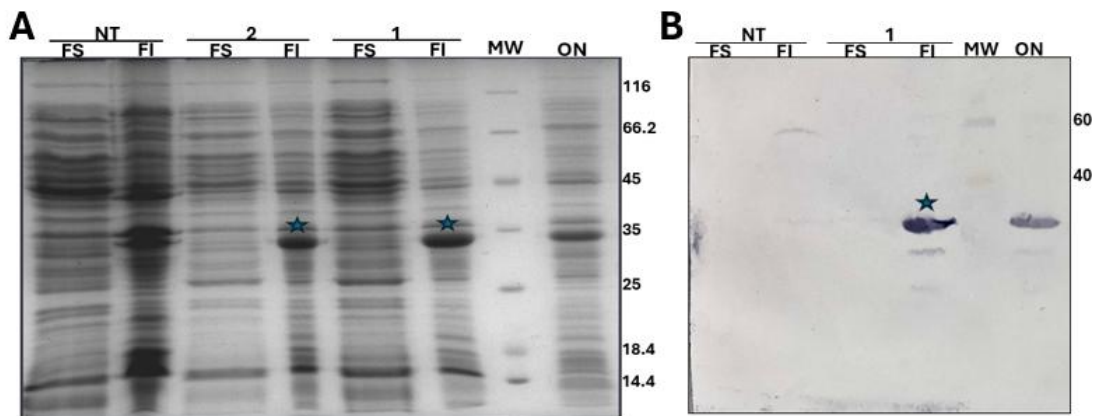


Figura 20. Solubilidad de 6xHis tLbPARP en fracciones de lisado celular M15(pREP4) inducido (IPTG 0,5 mM) por 2h. **A.** Evaluación de fracciones proteínas solubles (FS) e insolubles (FI) de células inducidas transformadas (1-2) y no transformadas (NT), fracción de proteínas totales de células inducidas 16 h (ON); MW(kDa). SDS-PAGE al 12% visualizado con azul de Coomassie. **B.** *western blot* para la evaluación de solubilidad de 6xHis tLbPARP en membrana de nitrocelulosa, anticuerpo primario: anti 6xHis (1:5000) y anticuerpo secundario: anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina (1:10000), MW (kDa).

En aras de obtener a 6xHis tLbPARP en la fracción soluble se evaluaron diferentes condiciones de inducción de la expresión, tales como: disminución de temperatura

(17 y 20 °C) y la concentración de IPTG (0,1 mM) (datos no mostrados), sin embargo, no fue posible obtener la proteína en la fracción soluble. A partir de estos resultados se exploró la idea de suplementar el medio de inducción con ciertos aditivos que ayudaran a la solubilización de la proteína recombinante.

Varios estudios han reportado el uso de moléculas orgánicas tanto en buffers renaturantes y medios de inducción que ayudan a asistir el correcto plegamiento de la proteína que fue o está siendo expresada, estos compuestos se denominan chaperonas químicas, algunas de ellas se encuentran dentro del grupo de compuestos denominados como osmolitos. Los osmolitos son moléculas orgánicas pequeñas que se encuentran naturalmente en los sistemas vivos, algunos de ellos pueden asistir el plegamiento de proteínas mientras otros desestabilizan la estructura tridimensional de estas. Hay tres categorías de osmolitos: Aminoácidos (como la arginina), polioles (como el sorbitol y la manosa) y compuestos de metil amonio ¹⁰⁹.

Basándose en uno de los protocolos en donde reportan el uso de sorbitol en el medio de inducción, se agregó sorbitol 0,5 M al medio de inducción, empleando una concentración de IPTG de 0,2 mM y una temperatura de inducción de 20 °C con agitación constante, incrementando el tiempo de inducción a 16 h. La solubilidad de la proteína recombinante se evaluó por SDS-PAGE y *western blot* (figura 21) ⁶³.

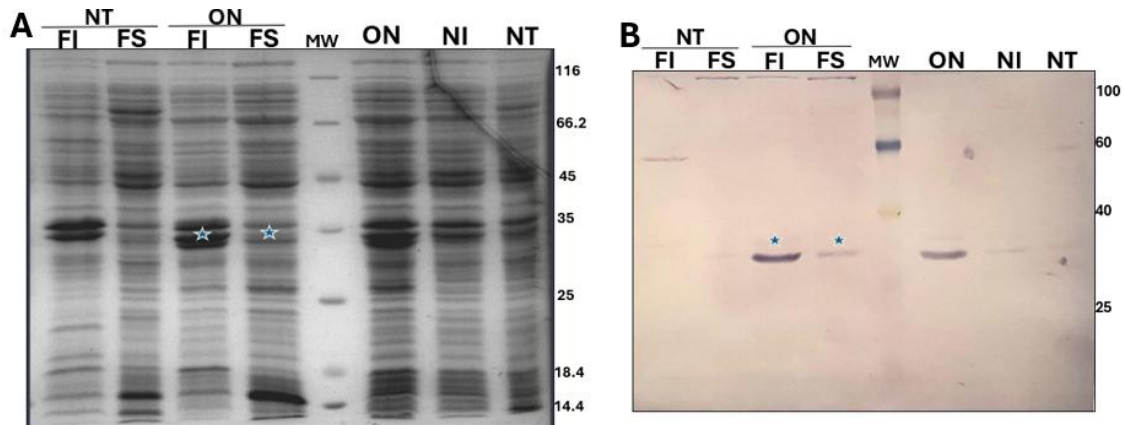


Figura 21. Solubilidad de 6xHis tLbPARP (30 kDa) en fracciones de lisado celular de medio de inducción suplementado con sorbitol 0,5 M. **A.** Evaluación de fracciones de proteínas solubles (FS) e insolubles (FI) de células inducidas transformadas 16 h (ON) y no transformadas (NT), fracción de proteínas totales de células inducidas 16 h (ON), no inducidas (NI) y no transformadas (NT); MW(kDa). SDS-PAGE al 12% visualizado con azul de Coomassie. **B.** *western blot* para la evaluación de solubilidad de 6xHis tLbPARP en membrana de nitrocelulosa, anticuerpo primario: anti 6xHis (1:5000) y anticuerpo secundario: anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina (1:10000), MW (kDa).

Como se observa en la figura 21, a través de la adición de sorbitol al medio de inducción fue posible obtener a 6xHis tLbPARP soluble. La explicación de este

fenómeno se da desde la termodinámica, si bien no es adecuado generalizar el mecanismo por el cual actúan estas chaperonas, como lo sugieren algunos autores; se ha construido un modelo general para entender este hecho natural. Se sugiere que este tipo de osmolitos nos presentan propiamente interacciones específicas con la proteína, más bien, su presencia en el medio acuoso ocasiona un efecto solvofóbico sobre las proteínas, lo que promueve el autoensamblaje de la proteína y por lo tanto a que esta llegue a su estado nativo. Esto se debe a que las energías de Gibbs para la interacción osmolito- proteína denaturada son positivas lo que hace que el proceso sea termodinámicamente desfavorable ^{110,111}.

6.3. Purificación de 6xHis tLbPARP

La formación de IBs al momento de inducir la expresión de proteínas recombinantes, no siempre implica un inconveniente. Como se mencionó con anterioridad en estas estructuras se puede encontrar la proteína recombinante en altas concentraciones. En la literatura se reportan diferentes metodologías para la recuperación de la proteína de interés a partir de IBs, varias de ellas se fundamentan en la solubilización de estos agregados con agentes caotrópicos como la urea y el cloruro de guanidinio (GdnHCl) ¹¹².

De esta manera, la primera estrategia que se empleó para la purificación de 6xHis tLbPARP fue a través de la solubilización de los IBs a partir de la fracción insoluble, la cual se lavó múltiples veces con el fin de deshacerse de algunas proteínas contaminantes; algunas subunidades de la RNAPol, proteínas pertenecientes a la membrana exterior y las proteínas encargadas de otorgar resistencia al marcador de selección son algunas de las reportadas por la literatura. Después de lavados, se solubilizaron con una solución de GdnHCl 8 M, las proteínas solubilizadas se dializaron y se separaron en un gel SDS-PAGE preparativo, cortando el gel justo donde había migrado la proteína de interés, se tomó una banda superior e inferior con respecto a esta. Estas bandas se trituraron y se dejaron en elución con H₂O. Los eluidos se evaluaron por SDS PAGE y *western blot* (**figura 22**), al confirmarse que 6xHis tLbPARP fue parcialmente purificada, se cuantificó por el método de Bradford obteniendo un rendimiento de 1,3 mg de proteína por 100 mL de cultivo o de 13 mg/L. En la literatura es posible encontrar rendimientos de obtención de proteínas recombinantes desde 0,2 hasta 220 mg/mL, lo cual está relacionado con las características inherentes de la proteína que está siendo expresada; por lo anterior y considerando la expresión de 6xHis tLbPARP observada durante el proceso de estandarización y la baja solubilidad predicha para esta mediante aproximaciones *in silico*, se puede señalar que el rendimiento alcanzado para su purificación por este

método fue eficiente. Además, presenta la solubilización de IBs como una alternativa para la purificación de proteínas.

Proteínas derivadas de estos procesos de purificación pueden ser empleadas para la generación de anticuerpos en modelos animales, empleándolas como antígenos, en donde no es indispensable el correcto plegamiento de la proteína de interés para obtener herramientas inmunológicas específicas al reconocimiento de estas. Igualmente, se ha reportado que bajo diferentes metodologías es posible recuperar hasta el 40 % de las proteínas recombinantes presentes en los IBs en su conformación bioactiva ^{113,114}.

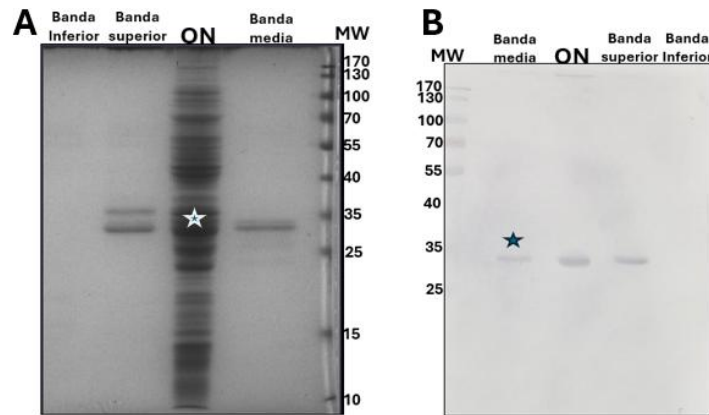


Figura 22. Purificación de 6xHis tLbPARP (30 kDa) a partir de cuerpos de inclusión. **A.** Evaluación de banda inferior, banda superior y banda media, se sembró de igual forma una muestra de extracto total de proteínas de células inducidas 16 h (ON), MW (kDa). SDS-PAGE al 12% visualizado con azul de Coomassie. **B.** *western blot* para la evaluación de inmunoreconocimiento de eluidos de banda en membrana de nitrocelulosa, anticuerpo primario: anti 6xHis (1:5000) y anticuerpo secundario: anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina (1:10000), MW (kDa).

Realizar esfuerzos para la obtención de la forma soluble y correctamente plegada de 6xHis tLbPARP cobran importancia a la hora de plantear estrategias experimentales que permitan corroborar la funcionalidad del candidato. La presencia de la proteína en la fracción soluble permitió realizar una aproximación a la purificación de esta mediante una cromatografía de afinidad a metales empleando una resina de Ni-NTA, esta estrategia se basa en la interacción entre la resina y la marquilla de seis histidinas que se fusionó al candidato durante el proceso de clonación en el vector de expresión. El níquel que se encuentra en la resina actúa como centro de coordinación para los nitrógenos presentes en el anillo imidazólico de las histidinas, por lo que es de esperarse que las proteínas con el tag 6xHis presenten mayor afinidad a esta fase estacionaria que otras proteínas del sistema heterólogo. Sin embargo, es común que, al realizar el proceso de elución, se presenten proteínas contaminantes propias de *E.coli*. En la literatura se reporta que estas proteínas que coeluyen con la proteína

recombinante están en su gran mayoría relacionadas con respuesta a estrés; entre estas, tenemos proteínas que presentan dominios de unión a metales tales como Fur, YodA y Cu/Zn-SODM, estas proteínas no constituirían una afectación a la hora de evaluar la actividad enzimática de tLbPARP¹¹⁵.

Una vez se terminó el tiempo de interacción entre la fracción soluble y la resina, se hicieron dos lavados incrementando la concentración de imidazol (50 y 80 mM), terminados los lavados, se realizaron tres eluciones con una concentración de imidazol de 500 mM en donde se pudo observar la elución de 6xHis tLbPARP junto con otras proteínas contaminantes. El seguimiento del proceso de purificación se hizo a través de SDS PAGE (**figura 23**). El resultado de la cromatografía de afinidad muestra una purificación parcial de 6xHis tLbPARP, en donde las proteínas contaminantes pueden corresponder a proteínas previamente reportadas que interactúan con la resina, las cuales no presentan actividad ADP-ribosa polimerasa por lo que se espera que no intervengan en la evaluación de la funcionalidad del candidato. El rendimiento de la purificación se determinó a través de la cuantificación de proteína presente en los eluidos, así pues, se determinó un rendimiento de 0,253 mg/mL.

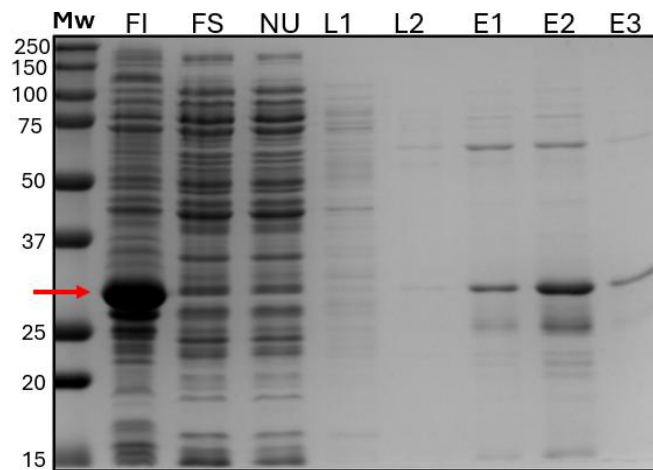


Figura 23. Purificación de 6xHis tLbPARP (30 kDa) a partir de la fracción soluble de células M15(pREP4) inducidas (IPTG 0,2 mM) por 16 h mediante cromatografía de afinidad a metales (IMAC). Fracción insoluble (FI), fracción soluble (FS), proteínas no unidas a la resina (NU), lavados de 50 y 80 mM de imidazol (L1-L2) y eluidos con 500 mM de imidazol (E1-E3); Mw (kDa). SDS-PAGE al 12% visualizado con azul de Coomassie.

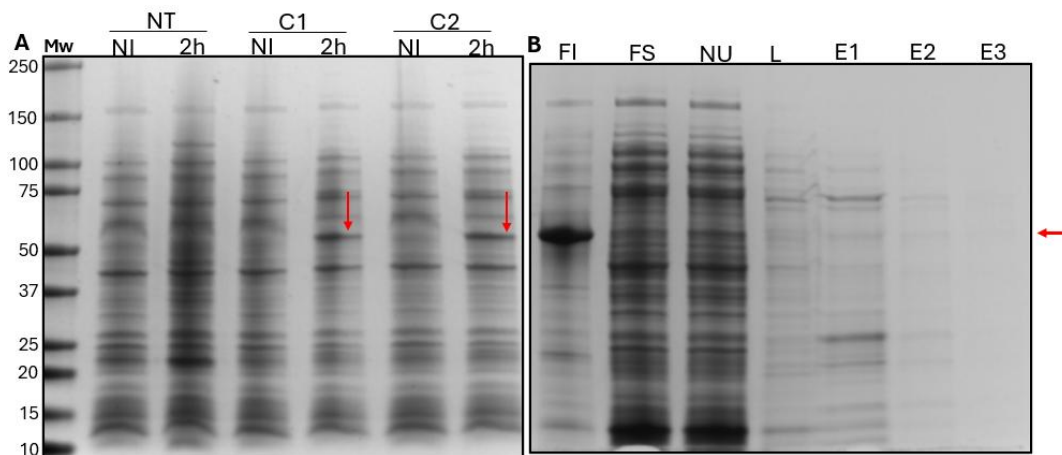
La obtención de 6xHis tLbPARP en el sistema heterólogo de *E. coli* a partir de la fracción insoluble (1,3 mg/mL) y la fracción soluble (0,253 mg/mL) señala la tendencia a la agregación de esta proteína recombinante en IBs. Como previamente se ha observado en otras proteínas de parásitos protozoarios^{87,116}.

6.4. Expresión y purificación de Cter LbPARP-6xHis

La eventual exploración funcional de una versión de LbPARP que cubriera una región más amplia de este constituyó un punto adicional que se abordó en este trabajo. La versión ampliada comprendió un producto proteico de longitud de 496 aa y una masa molecular de 57 kDa, lo anterior se tradujo en una cobertura del 45 % del candidato que se extendía a lo largo del C-terminal de este y por lo tanto se denominó como Cter LbPARP. De acuerdo con aproximaciones *in silico* esta versión involucraría los elementos característicos del dominio catalítico de las PARP.

El plásmido de expresión de Cter LbPARP en *E. coli* se diseñó y adquirió a través de la plataforma de Genscript. El vector en el que esta versión se dispuso fue el pET26b(+), el cual incorporaba el *tag* de 6xHis hacia la región C-terminal de la recombinante, presentaba la expresión de un marcador de resistencia a kanamicina, la transcripción del inserto recombinante estaba gobernada por el promotor T7 y a su vez, los codones de este se encontraban optimizados para su expresión en *E. coli* y en células de mamífero.

La expresión de la proteína recombinante se hizo a través de la inducción de expresión de Cter LbPARP-6xHis con IPTG en células de *E. coli* BL21(DE3); las condiciones de expresión utilizadas fueron las implementadas con 6xHis-tLbPARP con el propósito de favorecer la presencia de la recombinante en la fracción soluble del lisado celular. Para la purificación de la proteína de interés, se realizó un lisado celular y la fracción soluble derivada de este se dispuso para la ejecución de un protocolo IMAC con el fin de purificar Cter LbPARP-6xHis, como se describió con anterioridad (**figura 24**).



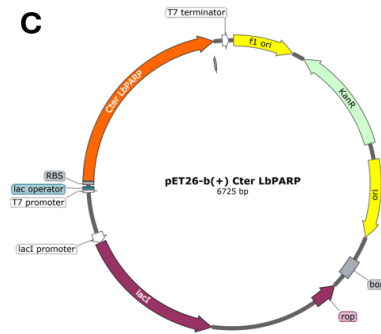


Figura 24. Expresión y purificación de Cter LbPARP-6xHis (57 kDa) por IMAC. **A.** Evaluación de extractos totales de proteínas de dos clones (C1-C2) inducidos 2 h, no inducidos (NI) y no transformadas (NT); Mw (kDa). **B.** Purificación por IMAC. Fracción insoluble (FI) y fracción soluble (FS) de lisado celular *E.coli* BL21(DE3) inducido con IPTG 0,2 Mm, 0,5 M de sorbitol, 20 °C ON. Proteínas no unidas a la resina (NU), lavado de 50 mM de imidazol (L) y eluidos con 500 mM de imidazol cada uno (E1-E3). SDS-PAGE 4-15 % visualizado con azul de Coomassie. **C.** Mapa de vector de expresión pET26-b(+). Cter LbPARP.

En la figura 24.A se observa la expresión de la proteína recombinante Cter LbPARP-6xHis en células de *E.coli* BL21(DE3) a las 2 h de agregarse el inductor. A su vez, en la figura 8.B se evidencia que la proteína expresada se encuentra mayoritariamente sobre la fracción insoluble del lisado celular. Adicionalmente, a partir de los extractos solubles, no fue posible purificar por IMAC de manera eficiente Cter LbPARP-6xHis.

De esta manera la figura 24 muestra el éxito en la expresión de Cter LbPARP-6xHis. No obstante, teniendo en cuenta que la secuencia codificante posee optimización de codones para su expresión en *E.coli*, no se observa un efecto positivo sobre la solubilidad, ya que la mayoría de la proteína no se encontró en la fracción soluble. La insolubilidad de la proteína podría estar relacionada con: (i) propiedades fisicoquímicas intrínsecas a la secuencia aminoacídica de la recombinante que sinérgicamente provocan el fenómeno observado, ante lo cual se podría abordar la coexpresión con proteínas chaperonas. (ii) la cinética de traducción asociada a la presencia de codones raros que modulan el plegamiento de algunas proteínas, como es el caso de la proteína FREQUENCY (FRQ) de *Neurospora* en donde se observó que la optimización de codones de *frq* provoca la abolición de la función de la proteína sintetizada debido a cambios conformacionales en su estructura^{117,118}.

Durante el paso de elongación en el proceso de traducción, la búsqueda y selección del tRNA que reconoce el codón constituye un paso limitante de la reacción y por lo tanto, este fenómeno modula la cinética de elongación. Este hecho resulta de vital importancia en el plegamiento co-traduccional de las proteínas teniendo en cuenta que un aumento de la longitud de la secuencia de aminoácidos aumenta el espacio conformacional del sistema ocasionando una desestabilización termodinámica de

este; de esta manera las pausas ocasionadas por el ribosoma debido a la baja concentración de ciertos tRNAs otorgan interludios necesarios para el correcto plegamiento de proteínas. Lo último resalta el sentido de la existencia de los codones raros durante la síntesis de proteínas y establecimiento de la estructura tridimensional, constituyendo así un limitante de la estrategia de optimización como se observó para Cter LbPARP-6xHis^{101,119,120}.

Considerando que, a pesar de las diferentes estrategias empleadas para la obtención de la proteína en la fracción soluble, Cter LbPARP 6xHis se encontró esencialmente en la fracción insoluble del lisado celular, se decidió emplear esta fracción para la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad a metales (IMAC) bajo condiciones denaturantes.

La metodología consistió en solubilizar la fracción insoluble previamente lavada, bajo concentraciones altas (6-8 M) de un agente caotrópico como la urea. Luego, la solución con la proteína solubilizada se dejó interactuando con la resina IMAC y una vez terminado el tiempo de interacción, la resina se empacó y se hizo una disminución en pasos discretos del gradiente de urea con el fin de permitir el adecuado plegado de la proteína recombinante anclada a la resina. Se procedió luego a hacer un lavado con 50 mM de imidazol y, por último, los tres eluidos con 500 mM de imidazol cada uno. El procedimiento fue monitoreado por SDS-PAGE (**figura 25**)¹²⁰.

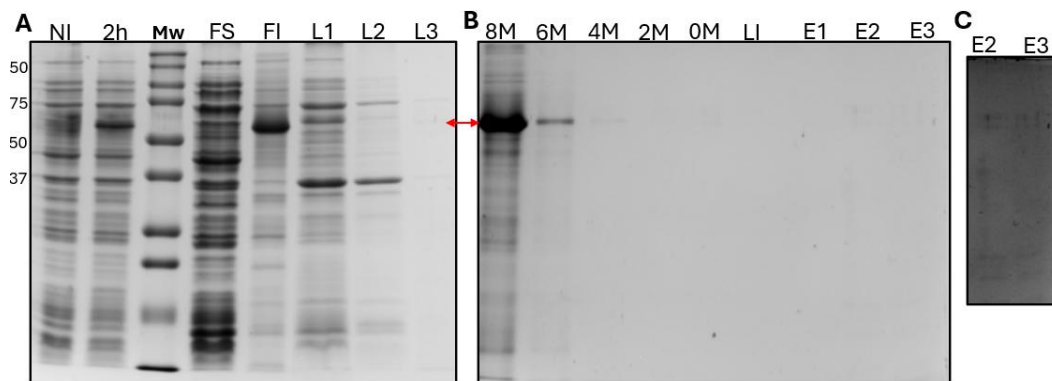


Figura 25. Purificación por IMAC denaturante de Cter LbPARP-6xHis (53 kDa). **A.** Obtención y solubilización de IBs. Extractos totales de células no inducidas (NI) e inducidas 2h. Proteínas de fracción soluble (FS), insoluble (FI) y lavados de IBs (L1-L3); Mw (kDa). **B.** Cromatografía de afinidad a Níquel. Fracción de proteínas no unidas (8 M). Proceso de renaturalización-proteínas provenientes de lavados con concentraciones decrecientes de Urea (6 M, 4 M, 2 M y 0 M), lavado con imidazol 50 mM (LI) y eluidos con 500 Mm de imidazol cada uno (E1-E3). **C.** Sobre exposición de E1 y E2 de B. SDS-PAGE al 12 % visualizado con azul de Coomassie.

Lo expuesto en la figura 25, evidencia que al implementar el protocolo IMAC denaturante para la purificación de Cter LbPARP 6xHis fue posible escasamente

obtener la proteína recombinante en los eluidos y que esta permaneció casi en su totalidad en la fracción de proteínas no unidas que corresponde al carril 8 M, habiendo una baja proporción en el carril 6 M y 4 M. Ante este tipo de escenarios, las razones que pueden ser asociadas con lo observado serían de un orden multifactorial como por ejemplo insuficiente tiempo de interacción con la resina y la naturaleza del agente caotrópico; aunque se ha reportado que la urea no presenta interacciones con la resina, es posible que su efecto no haya sido suficiente para una exposición del tag 6xHis y por lo tanto no se haya favorecido la unión de la proteína a la resina, se propone el uso de un agente caotrópico más fuerte como el cloruro de guanidino como se ha realizado previamente en otros trabajos. Sin embargo, se debe tener en cuenta que cada proteína propone sus propios desafíos y requiere una optimización individualizada. Sin embargo, esta versión de LbPARP será considerada en diferentes ensayos más adelante ¹¹².

6.5. Aproximación a la obtención de una versión N-terminal del candidato a LbPARP (Nter LbPARP)

En favor de realizar un abordaje integral en el estudio del candidato a LbPARP, se focalizaron esfuerzos hacia la obtención de la región N-terminal de este (Nter LbPARP) la cual se predice, posee dedos de zinc que permitirían su unión con el DNA. El propósito central de la obtención de esta versión del candidato respondía a la posibilidad de complementarla con tLbPARP lo que permitiría eventualmente el estudio funcional de esta versión complementada; estas aproximaciones han sido puestas en práctica con la PARP1 de humano o por ejemplo con la α -complementación, en donde la expresión del fragmento del C-terminal de la β -galactosidasa por parte de las bacterias transformadas se complementa con sus primeros 146 aminoácidos provenientes del plásmido introducido. Esto permite reconstituir la funcionalidad total de la proteína reestableciendo la disposición tridimensional ^{121,122}.

Nter LbPARP posee una longitud de 2598 bp y se traduce en una proteína de 113 kDa. La obtención de la región codificante de la proteína se hizo a través de PCR tomando como plantilla a LbPARP, por lo que se inició amplificando desde gDNA al candidato LbPARP y posteriormente desde este, se obtuvo Nter LbPARP el cual fue purificado desde el producto de PCR.

La estrategia de clonación propuesta consistió en la complementación de las adeninas de los extremos 5' y 3' del inserto incorporadas por la Taq polimerasa durante la PCR con las timinas presentes en el vector de expresión pET SUMO para su posterior

ligación con T4 ligasa. El producto de ligación se transformó en células de *E. coli* Top10 y el plásmido se aisló a partir de las transformantes positivas rastreadas a través de PCR. Así mismo, los plásmidos purificados se evaluaron por PCR y secuenciación. Todos los procedimientos mencionados se analizaron mediante geles de agarosa al 0,8 % (figura 26).

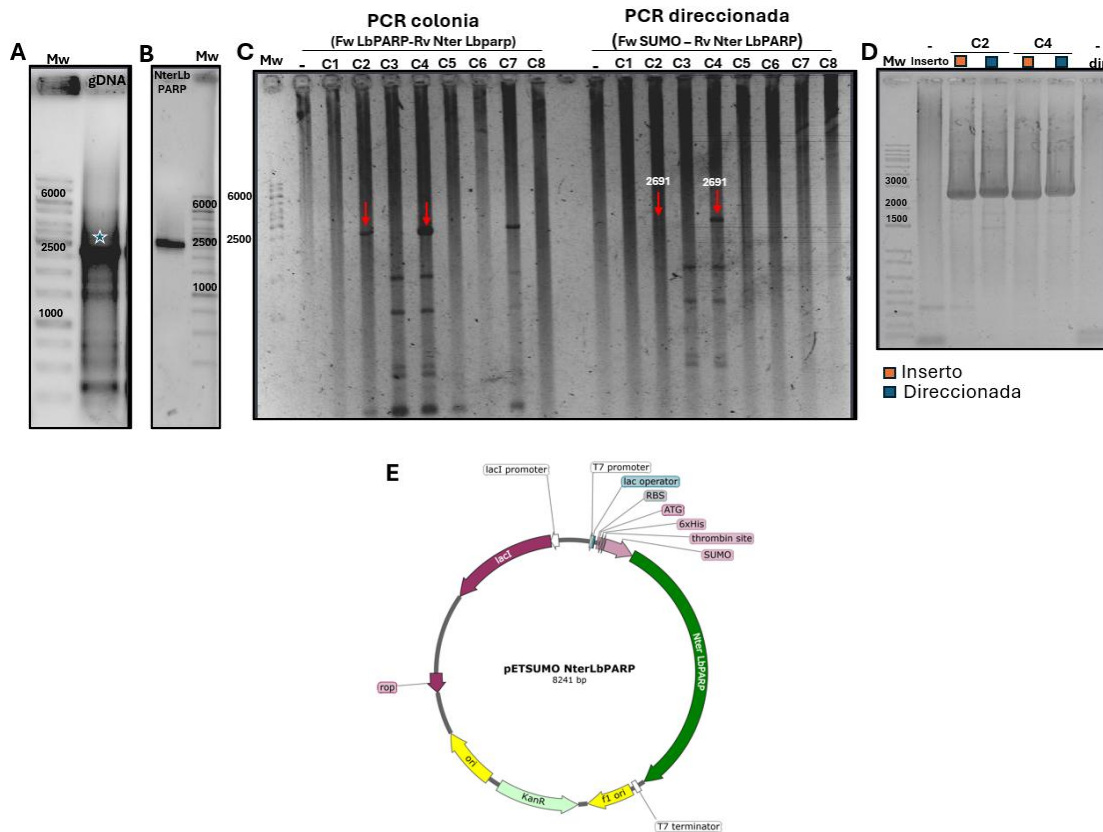


Figura 26. Generación e identificación de pET SUMO Nter LbPARP. **A.** Amplificación del candidato Lbparp (3300 bp) mediante PCR tomando como plantilla gDNA. **B.** Evaluación de purificación del inserto Nter LbPARP (2598 bp). **C.** PCR de colonia y direccionada de transformantes TOP10 (C1-C8) con pET SUMO Nter LbPARP. **D.** PCR de plásmido con pET SUMO Nter LbPARP para la verificación de presencia del inserto (recuadros naranjas) y de direccionalidad de este (recuadros en azul). -: Control negativo (agua como plantilla), Mw (bp). Geles de agarosa al 0,8 %: A y B en TAE 1X. C y D TBE 1X. Tinción con Bromuro de Etidio. **E.** Mapa del vector de expresión pET SUMO Nter LbPARP.

De la figura 26.C se puede dar cuenta que dos colonias, la 2 y la 4, fueron positivas tanto a presencia del inserto Nter LbPARP como a su adecuada direccionalidad. Esto permitió obtener dos plásmidos recombinantes que fueron evaluados con posterioridad a través de ensayos de PCR y el Clon 2 se evaluó adicionalmente a través de secuenciación. Al obtener los resultados de secuenciación se verificó la delección de los nucleótidos TA presentes en la transición entre la región codificante de SUMO y la de NterLbPARP (Anexo). Lo anterior implicaría una alteración en el marco

de lectura involucrado en la generación de la proteína recombinante completa y, por tanto, se esperaría que la proteína producida por el sistema heterólogo no fuera la de interés. Por esta razón la evaluación del Clon 4 y/o intentos adicionales para la obtención de Nter LbPARP recombinante suponen una perspectiva de este trabajo.

El desarrollo del primer objetivo: expresar y purificar el candidato a poli ADP-ribosa polimerasa (LbPARP) en el sistema heterólogo *E.coli* mediante estandarización de las condiciones óptimas. Se realizó al lograr: (i) clonar tres versiones del candidato LbPARP: Nter LbPARP con clonación T/A en pET SUMO, Cter LbPARP por síntesis y optimización de codones en pET26b(+) y tLbPARP mediante subclonación con enzimas de restricción en pQE-30. (ii) Expresar dos versiones de la proteína de interés en el sistema heterólogo de *E.coli*: 6xHis-tLbPARP y Cter LbPARP-6xHis y, (iii) purificar 6xHis-tLbPARP empleando diferentes estrategias de purificación. En donde para el caso de Cter LbPARP-6xHis, a pesar de la generación de proteína recombinante, la obtención de la proteína soluble constituyó un reto e hizo necesario abordar para su evaluación, estrategias alternas en otros sistemas de expresión como se discutirá más adelante.

La proteína a partir de los IBs representó un punto de partida crucial para la para la generación de herramientas de Inmunodetección de la misma.

6.6. Estrategia *in vitro* para la evaluación catalítica del candidato

Durante el diseño de la estrategia de la evaluación catalítica del candidato a PARP de *Leishmania braziliensis* se propusieron dos metodologías: La primera de ellas se basó en la instauración de una plataforma de obtención de proteínas recombinantes a partir del sistema heterólogo en *E.coli* para la obtención tanto del candidato (como se mostró en el desarrollo del primer objetivo), así como la de los controles de actividad, y el desarrollo de una metodología experimental para su evaluación *in vitro*. La segunda estrategia se fundamentó en el desarrollo de una plataforma de expresión transiente de proteínas recombinantes en células de mamífero con el objetivo de evaluar actividad enzimática *in vivo*.

En la actualidad, las estrategias para la evaluación enzimática de proteínas con capacidad de realizar poli ADP-ribosilación se fundamentan en diferentes aproximaciones. La Inmunodetección de polímeros de ADP-ribosa con un anticuerpo específico para su reconocimiento es una de las principales y más ampliamente utilizadas. De esta manera, el desarrollo de esta primer estrategia constó de tres etapas: expresión de proteínas a ser evaluadas, purificación de estas y su evaluación enzimática a través de ensayos de Inmunodetección de PAR a través de *western blot*

123,124

- **Expresión y purificación de PARPs en sistema heterólogo de *E. coli***

La expresión y purificación de 6xHis tLbPARP en *E. coli* como se discutió en el primer capítulo constituyó un reto debido a los escasos niveles de proteína en la fracción soluble. Adicional a los factores propios de su estructura que pueden influir en su agregación en IBs, es posible que proteínas que se sobre expresen en un sistema afecten el metabolismo del mismo, por lo anterior, se agregó al medio de inducción 3-aminobenzamida (3-AB), un inhibidor competitivo de PARPs; esto se hizo con el objetivo de disminuir la toxicidad asociada a la expresión de PARPs en sistemas bacterianos debido a la alteración del metabolismo energético que se deriva del agotamiento de NAD⁺ por parte de la PARP que está siendo expresada ¹²⁵.

Además de 6xHis-tLbPARP, cuatro controles de actividad fueron expresados en *E. coli*: PARPs de *Trypanosoma cruzi* (TcPARP-65 kDa) y *brucei* (TbPARP-66 kDa), así como la versión catalítica activa (HscatPARP-40 kDa) e inactiva (HscatiPARP-40 kDa) de la PARP1 de *Homo sapiens*; la última contiene una sustitución en el glutamato 988 por una glutamina, la cual anula su capacidad de hacer polímeros. Diferentes cepas de expresión fueron usadas para la obtención de las proteínas en cuestión, esta escogencia se hizo en base a reportes que abordaban su expresión y purificación, la suplementación de tRNAs mediante cepas modificadas tales como BL21 codon+ (DE3) RILP y Rosetta 2 (DE3) fueron cruciales para la expresión de las PARPs de tripanosomas^{39,68}.

Las estrategias adoptadas para la expresión de las proteínas se sustentaron en la implementación de condiciones óptimas de inducción que favorecieran la presencia de las proteínas en la fracción soluble del lisado celular, esto implicó bajas temperaturas de inducción (18 °C), bajas concentraciones de IPTG (0,1 mM) y largos tiempos de inducción. En todos los casos fue posible obtener la expresión de todas la proteínas recombinantes (**figura 27**).

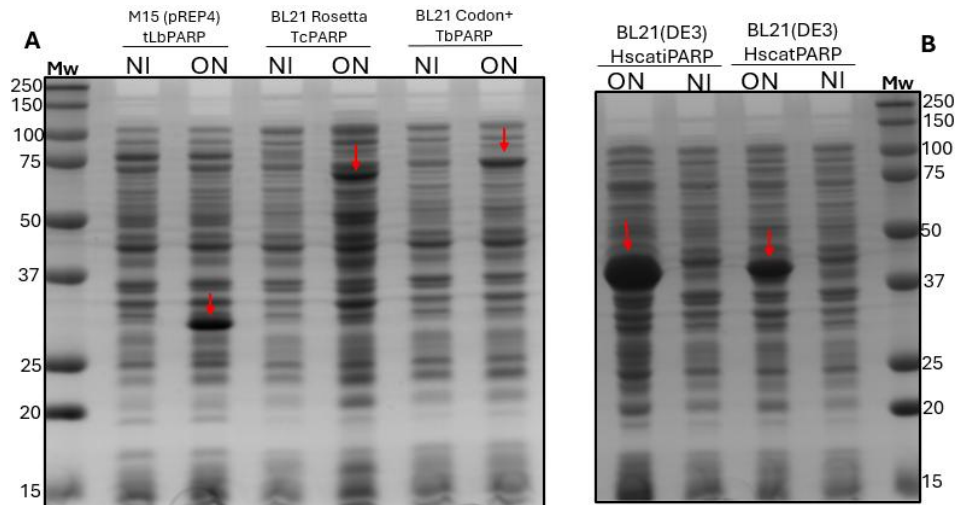


Figura 27. Expresión de controles de actividad PARP (tLbPARP-30 kDa, TcPARP-65 kDa, TbPARP-66 kDa, HscatiPARP-40 kDa y HscatPARP kDa) en *E.coli*. **A y B.** Evaluación de extractos de proteínas totales de células no inducidas (NI) e inducidas toda la noche 16 h (ON); Mw (kDa). **A.** Expresión de tres proteínas parasitarias con tag de 6xHis: tLbPARP, TcPARP y TbPARP. **B.** Expresión del dominio catalítico de la PARP 1 de humano en su versión inactiva E988Q (HscatiPARP) y activa (HscatPARP). SDS-PAGE al 12% visualizado con azul de Coomassie.

En la figura 27 puede apreciarse que, comparadas con las proteínas humanas, las proteínas de los parásitos presentan bajos niveles de expresión lo que sugiere nuevamente el reto que representa la obtención de estas a partir del sistema de *E.coli*. Además, señala la pertinencia del uso de 3-AB en los medios de inducción para reducir el efecto de la expresión de las PARP por el sistema heterólogo y favorecer la expresión de estas proteínas.

Al igual que con 6xHis-tLbPARP, La purificación de las proteínas expresadas se hizo a través de cromatografía de afinidad a metales tomando ventaja del *tag* de 6xHis que contenían. En todos los casos, el protocolo IMAC se hizo en modo *batch*, de una forma muy similar a la implementada con la 6xHis-tLbPARP. El seguimiento del proceso de purificación se hizo por SDS-PAGE; las proteínas lograron ser parcialmente purificadas y enriquecidas en los eluidos. Las fracciones que presentaron mayor cantidad de proteína fueron mezcladas (**figura 28**).

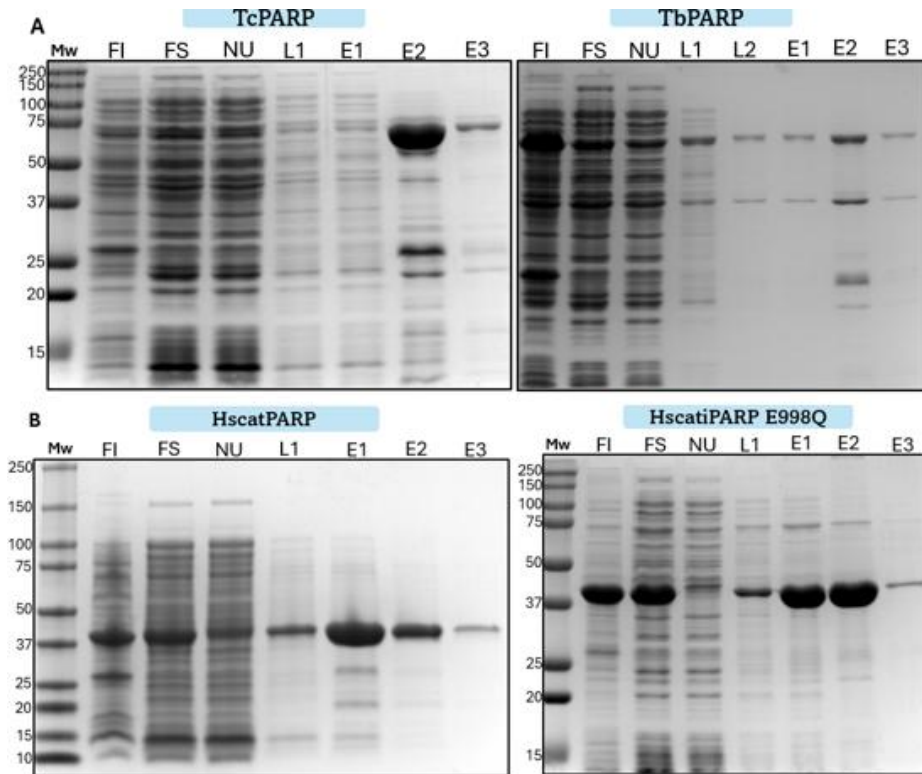


Figura 28. Purificación de controles de actividad PARP (tLbPARP-30 kDa, TcPARP-65 kDa, TbPARP-66 kDa, HscatiPARP-40 kDa y HscatPARP kDa) a partir de fracción soluble de lisado celular, mediante cromatografía de afinidad a metales (IMAC). **A y B.** Evaluación de purificación de controles de actividad expresados con el tag de 6xHis. Fracción insoluble (FI) y soluble (FS) del lisado celular, fracción de proteínas no unidas a la resina (NU), lavados de la resina con 50 mM (L1) y 80 mM (L2) de imidazol, eluidos con 500 mM de imidazol (E1-E2); Mw (kDa). **A.** Purificación de las proteínas de tripanosomas TcPARP y TbPARP 6xHis. **B.** Purificación de las proteínas humanas HscatPARP y HscatiPARP E988Q 6xHis. SDS-PAGE al 12% visualizado con azul de Coomassie.

Es de importancia destacar que, aunque se logró la expresión de todos los controles, la generación de proteínas recombinantes es un proceso individualizado, en la figura 28 se observan marcadas diferencias en la obtención de las proteínas, presentando una excelente expresión y purificación en TcPARP, HscatPARP y HscatiPARP. Lo cual contrasta con los niveles obtenidos para TbPARP un poco más altos a los del candidato evaluado en este trabajo por lo cual fue necesario para obtener cantidades suficiente de la proteína a evaluar emplear mayores volúmenes de inducción.

Con el objetivo de remover el imidazol de la solución en la que se encontraban las proteínas purificadas, se procedió a realizar un proceso de diálisis, este se hizo en dos fases: la primera durante toda la noche y la segunda por dos horas, el producto resultante de este proceso se cuantificó a través del método de BCA y se corrieron

cerca de 600 ng de proteína en un gel de SDS-PAGE, este proceso se hizo simultaneo con 6xHis-tLbPARP (**figura 29**).

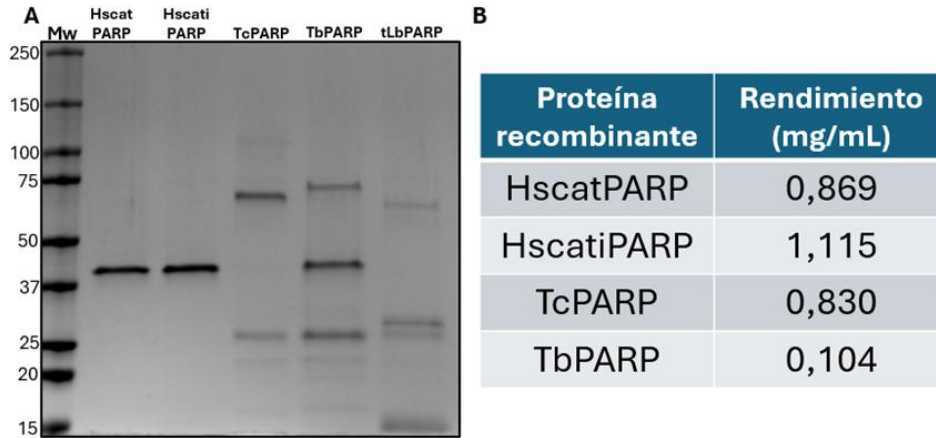


Figura 29. Evaluación de controles de actividad PARP (tLbPARP-30 kDa, TcPARP-65 kDa, TbPARP-66 kDa, HscatiPARP-40 kDa y HscatPARP kDa) post-diálisis. **A.** Productos proteicos después de la diálisis, cada carril corresponde al producto indicado; Mw (kDa). SDS-PAGE al 12% visualizado con azul de Coomassie. **B.** Tabla de rendimientos de purificación de los cuatro controles de actividad.

En la evaluación de los productos de diálisis a través de SDS-PAGE mostrada en la figura 29, se pudo comprobar que las proteínas en cuestión correspondían en masa a los controles de actividad previamente purificados. En algunos casos se visualizó la presencia de factores proteicos adicionales; en el caso de 6xHis -tLbPARP estos fueron discutidos con anterioridad. En lo concerniente a el perfil proteico observado en las productos derivados de la purificación y diálisis de las PARPs de tripanosomas, se aprecia una similitud en el perfil de ambos lo que se podría atribuir principalmente a productos de traducción provenientes de sitios de iniciación alternativos dentro de la secuencia codificante, lo anterior se observa con mayor prominencia en el perfil de TbPARP en el que el producto observado sobre los 40 kDa correspondería a la región C-terminal de la proteína, la cual, abarca el domino catalítico. De esta manera, al momento de realizar los ensayos de actividad PARP, estas no representarían algún factor de interferencia.

- **Evaluación de generación de polímeros de ADP-ribosa por *western blot***

Con la obtención de las proteínas purificadas y dializadas, la evaluación funcional de estas configuró el siguiente paso a seguir. En una primera aproximación, se planteó un ensayo con únicamente la proteína candidata y con dos controles: un extracto proteico de células HEK-293 que expresaban MTS-EGFP-HscatPARP y HscatPARP 6xHis expresada y purificada desde *E.coli*. Tanto el control como el candidato fueron dispuestos en medio de reacción en una concentración de 100 ng/μL. Teniendo en

cuenta que las condiciones de evaluación funcional para HscatPARP 6xHis ya se encontraban estandarizadas, esta se incubó con una sola concentración de NAD^+ , por otro lado, tres concentraciones de sustrato fueron probadas para la evaluación de 6xHis tLbPARP se evaluaron: 100, 500 y 1000 μM . Las reacciones se incubaron 1h a 30 $^{\circ}\text{C}$. La terminación de la reacción se dio agregando buffer de carga para SDS-PAGE y las muestras se corrieron en un gel de proteínas. Considerando que, se quería evidenciar la formación de PAR las muestras se separaron en un gel en gradiente (4-15 %), el gel de proteínas se electrotransfirió en una membrana de nitrocelulosa para llevar a cabo un experimento de *western blot*. La membrana se seccionó en varias partes con el objetivo de reconocer la formación de polímeros de ADP-ribosa y a la par confirmar la identidad de las proteínas que estaban siendo evaluadas, de esta manera, las proteínas provenientes del sistema de *E.coli* se reconocieron con el anticuerpo de reconocimiento del tag 6xHis mientras que MTS-EGFP-HscatPARP se reconoció a través de un anticuerpo para la detección de EGFP. (figura 30) ⁸⁰.

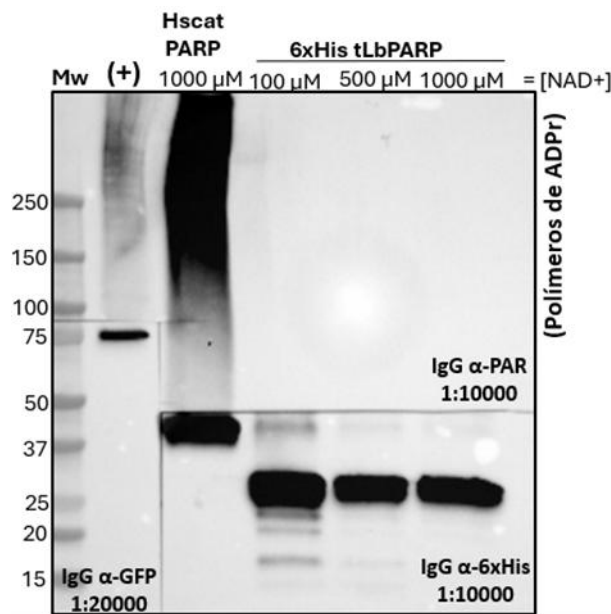


Figura 30. Evaluación de actividad de poli ADP-ribosa polimerasa de 6xHis tLbPARP a través de western blot en membrana de nitrocelulosa. Lisado de HEK-293 que expresan MTS-EGFP-HscatPARP (+). HscatPARP expresada y purificada del sistema heterólogo de *E.coli*. El resto de carriles corresponden a la evaluación enzimática de 6xHis tLbPARP con diferentes concentraciones de sustrato (NAD^+). Anticuerpos primarios: anti-PAR (1:1000)/parte superior, anti 6xHis (1:10000)/parte inferior derecha y anti GFP (1:20000)/parte inferior izquierda. Anticuerpo secundario: anti-ratón conjugado con HRP (1:10000); Mw (kDa).

La figura 30 sugiere que, bajo las condiciones empleadas en ese ensayo, no fue posible evidenciar polímeros de ADP-ribosa en los medios de reacción que contenían a 6xHis-tLbPARP, contrario a lo observado en los controles donde se observa un barrido en la

parte superior de la membrana correspondiente a cadenas de ADP-ribosa. Lo anterior provocó el diseño de un nuevo experimento en el que la concentración de sustrato no fuera la única variable. Se razonó que dos variables adicionales podrían ser testeadas: La primera de ellas era el tiempo, quizás mayores tiempos de incubación permitirían la síntesis de los polímeros. La segunda se relacionaba con la suplementación del medio de reacción con una proteína aceptora de polímeros de ADP-ribosa, esto a la luz de que la reacción *in vitro* observada con HscatPARP 6xHis era una reacción de automodificación y que, de esta manera, existía la posibilidad de que 6xHis- tLbPARP no poseyera una región de automodificación en su dominio catalítico dando como resultado final la ausencia de PAR²⁶.

La proteína empleada para la suplementación del medio de reacción de 6xHis-tLbPARP en este caso fue HscatiPARP 6xHis, por lo que esta no presenta actividad PARP, pero posee el dominio de automodificación; lo que la hizo una buena candidata como proteína aceptora. 100 ng de esta proteína fueron agregados y el tiempo de incubación se aumentó hasta las dos horas. Así mismo, en el nuevo experimento propuesto, las proteínas de los tripanosomas también fueron evaluadas. Todas las reacciones fueron llevadas a cabo con una concentración de 1000 μM de NAD^+ (**figura 31**).

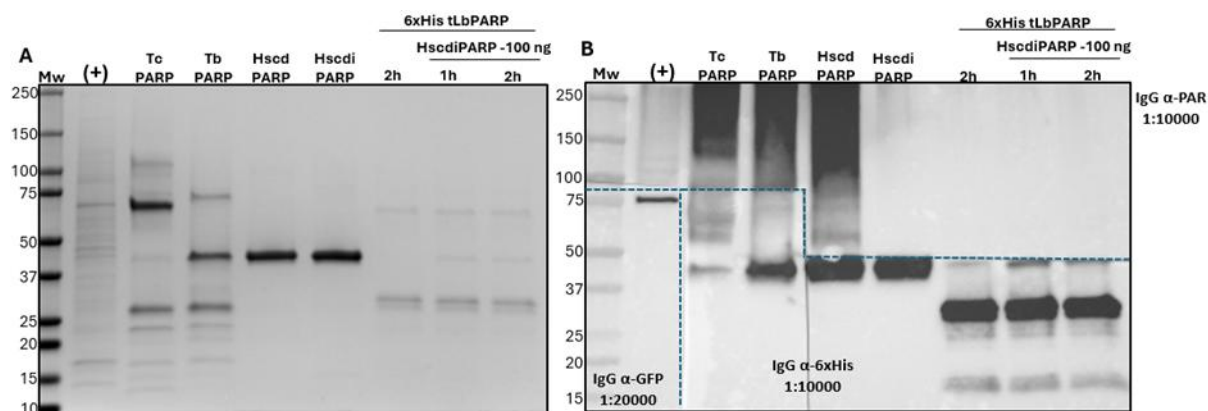


Figura 31. Evaluación de actividad de poli ADP-ribosa polimerasa de 6xHis tLbPARP-30 kDa. **A.** Efecto del tiempo de incubación (**1 h** y **2 h**) y suplementación con proteína aceptora de PAR (100 ng de HscatiPARP). Controles positivos de actividad: Lisado de HEK-293 que expresan MTS-EGFP-HscatPARP (+), las PARP de *Trypanosoma cruzi* (**TcPARP**-65 kDa) y *brucei* (**TbPARP**-66 kDa), **HscatPARP**-40 kDa y como control negativo **HscatiPARP**-40 kDa expresadas y purificadas del sistema heterólogo de *E.coli*. SDS-PAGE 4-15% visualizado con azul de Coomassie. **B.** western blot en membrana de nitrocelulosa del gel en A; Anticuerpos primarios: anti-PAR (1:10000)/ superior derecha, anti 6xHis (1:10000)/inferior derecha y anti GFP (1:20000)/inferior izquierda. Anticuerpo secundario: anti-ratón conjugado con HRP (1:10000); Mw (kDa).

La figura 31 señala la ausencia de PAR en las condiciones evaluadas (medios de reacción que contenían a 6xHis-tLbPARP, tiempo de incubación y proteína aceptora), confirmando los resultados mostrados en la figura 30. Descartando de esta manera las hipótesis relacionadas al tiempo de incubación y la ausencia de un factor aceptor de polímeros de ADP-ribosa. Con lo cual se podría concluir que la versión del candidato evaluada no presenta actividad PARP bajo estas condiciones.

Con relación a los controles positivos es clara la presencia de PAR en la parte superior de la figura 31.B los cuales se extienden desde la proteína recombinante hasta polímeros de alto peso molecular. Es interesante que en TcPARP y TbPARP se observa la automodificación como reportó Villamil *et al.*, 2008. Y adicionalmente se observó un barrido de menor peso molecular, que se extienden desde aproximadamente los 40 kDa, en donde también se visualiza una banda la cual como ya se había mencionado (figura 29). Estas bandas de bajo peso molecular podrían corresponder: (i) a un producto de degradación discreto en el cual se mantiene la región catalítica de las proteínas, hecho que se corrobora con la automodificación observada en la figura 31.B o (ii) la existencia de sitios de iniciación alternativos de la traducción; este es un fenómeno prevaleciente en varios dominios de la vida y se ha visto que modulan la traducción de marcos abiertos de lectura corriente abajo promoviendo en algunas ocasiones la síntesis de isoformas. En el contexto de los tripanosomátidos este fenómeno cobraría vital importancia debido a que los parásitos de este orden principalmente regulan la expresión génica postranscripcional para el control de su paisaje proteómico. Lo anterior podría constituir un mecanismo de regulación de expresión de las PARPs que no ha sido explorado en tripanosomas ¹²⁶.

6.7. Estrategia *in vivo* de evaluación catalítica del candidato

Ante el panorama resultante de la aproximación *in vitro*, se propuso continuar el trabajo con la versión extendida del dominio C-terminal del candidato LbPARP (Cter LbPARP) argumentando que, esta versión al incluir casi el 50 % de la secuencia aminoacídica de LbPARP poseería una mayor probabilidad de exhibir actividad PARP. Debido a que no fue posible la obtención de Cter LbPARP-6xHis mediante los diferentes protocolos IMAC aplicados, la expresión de esta proteína en células de mamífero surgió como una opción.

Esta aproximación se basó entonces en la expresión de Cter-LbPARP en células HEK-293 y HeLa S3 con el propósito de evidenciar la generación de PAR por parte de la proteína candidata a través de ensayos de *western blot* e inmunocitoquímica, haciendo necesaria la construcción de los plásmidos recombinantes para la expresión de Cter LbPARP en las líneas células eucariotes de mamífero. Con el objetivo de tener un control de otro tripanosomátido, la evaluación del dominio catalítico de TcPARP

(catTcPARP) en este sistema también fue abordada; región que conserva la actividad PARP de la proteína pero que no posee la señal de localización nuclear.

- **Generación de plásmidos de expresión pCMV MTS EGFP-Cter LbPARP/catTcPARP**

El sistema de expresión transiente en células de mamífero acá implementado consistió en la clonación de Cter LbPARP y catTcPARP en el vector de expresión pCMV con una señal de direccionamiento a la mitocondria (MTS); el direccionamiento de las proteínas que están siendo expresadas a este organelo resultó de particular conveniencia principalmente por dos razones: La primera se relaciona con las altas concentraciones de NAD⁺ presentes en este organelo (~250-500 μM) lo que se manifiesta en una gran disponibilidad de sustrato para las PARPs. Por otro lado, la mitocondria ofrece un compartimiento celular en el que los PAR que sean sintetizados allí no serán degradados con gran rapidez como si ocurre en el núcleo y, por lo tanto, se facilite su visualización^{127,128}.

Adicionalmente, las regiones codificantes de las proteínas de interés se fusionaron con EGFP, esto con el propósito de poder ubicar con facilidad la proteína fusión dentro de la célula en ensayos de inmunocitoquímica e, igualmente, para realizar el inmunoreconocimiento de las recombinantes a través del uso de anticuerpos específicos para EGFP.

En general, la metodología consistió en primera instancia de la generación de los insertos que serían ligados en el vector de expresión, esto era, ligar las regiones codificantes de las proteínas a ser expresadas fusionadas con el gen que codificaba para EGFP y realizar su amplificación específica a través de PCR. Una vez generados estos insertos, se procedió a ligarlos en el vector de expresión y se transformaron en células de *E.coli JM109*, las transformantes fueron evaluadas a través de PCR haciendo uso de un par de *primers* en donde el *forward* correspondió a el *primer* que presenta complementación hacia la región 5' del Cter LbPARP o catTcPARP y para el caso del *reverse* se empleó el *primer* que anillaba hacia una región de poli adenilación del plásmido: el terminador BGH (**figura 32**).

Las identidades de los plásmidos fueron corroboradas mediante ensayos de cortes con enzimas de restricción y secuenciamiento; de esta manera fue posible determinar que, comparando con la secuencia esperada, pCMV MTS EGFP CterLbPARP presentó una identidad del 99,99 % con únicamente un polimorfismo sinónimo, mientras que con pCMV MTS EGFP catTcPARP se obtuvo una identidad del 99,87 % con dos polimorfismos sinónimos y uno que ocasionaba cambio de un aminoácido (G108C).

En ninguno de los casos estos cambios provocaron una versión deletérea de las proteínas a ser expresadas (**figura 32**).

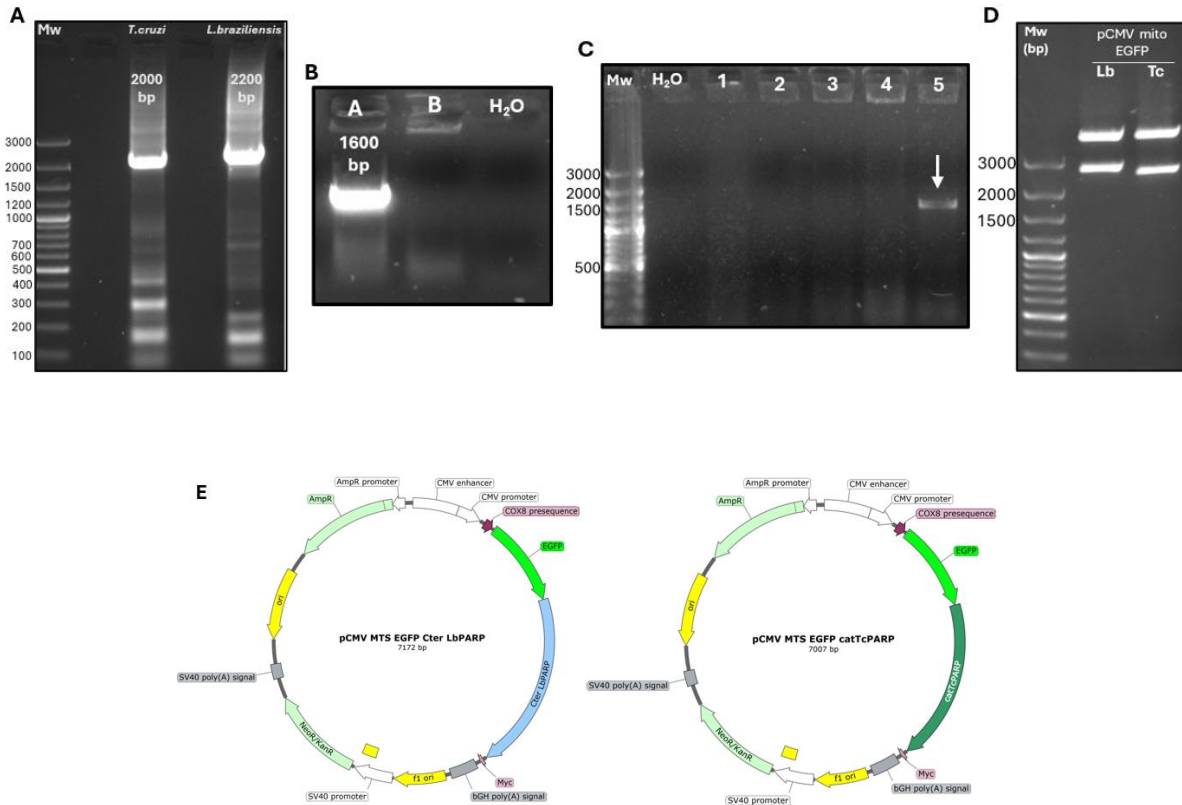


Figura 32. Generación de los plásmidos recombinantes de expresión en el sistema eucariota: pCMV-EGFP-CterLbPARP/catTcPARP. **A.** Amplificación de los insertos EGFP-catTcPARP (2000 bp) y EGFP-CterLbPARP (2200 bp) por PCR tomando como plantilla el producto de ligación entre la región codificante de EGFP y las de las proteínas de interés; Mw (bp). **B y C.** PCR de colonia transformantes JM109 con el producto de ligación entre insertos obtenidos en A y el plásmido pCMV-MTS. B: pCMV-MTS CterLbPARP (1600 bp) y C: pCMV-MTS catTcPARP (1435 bp), haciendo uso de los *primers forward* propio del inserto y *reverse* BGH propio del plásmido; H₂O: Control negativo. **D.** Confirmación de identidad de plásmidos recombinantes purificados mediante corte con enzimas de restricción (XhoI y NdeI). Agarosa 1 % TBE 1X. Tinción con bromuro de Etidio. **E.** Mapas de vectores de expresión en mamíferos pCMV MTS CterLbPARP/catTcPARP.

De este modo, la obtención de los plásmidos recombinantes pCMV MTS CterLbPARP y pCMV MTS catTcPARP constituyó un paso importante para la expresión de Cter LbPARP y catTcPARP en células de mamífero. Se resalta la implementación del protocolo de Maxi prep para su purificación, el cual permite la eliminación de endotoxinas de *E. coli* que poseen efectos negativos en las eficiencias de transfección ¹²⁹.

- **Determinación de actividad enzimática de MTS-EGFP-Cter LbPARP/catTcPARP en células HEK-293**

La estrategia aquí abordada consistió en la transfección de los plásmidos recombinantes obtenidos en células HEK-293 para la evaluación de la producción de PAR debida a la expresión de las proteínas recombinantes mediante ensayos de *western blot*.

Brevemente, las células HEK-293 previamente cultivadas en medio completo fueron transfectadas con un agente no liposomal multicomponente con 1 μ g de los plásmidos recombinantes generados. Los siguientes controles fueron incluidos: Células no transfectadas, células transfectadas que codifican únicamente para una versión mitocondrial de EGFP, con un plásmido que codifica para una versión mitocondrial de HscatPARP (MTS-EGFP-HscatPARP) y un plásmido que expresa una versión de HscatPARP dirigida hacia el peroxisoma (pex-HscatPARP). A las 24 h postransfección las células se lisaron y se pasaron en repetidas ocasiones a través de una jeringa con el objetivo de fragmentar el DNA genómico.

De cada uno de los lisados celulares se tomaron cerca de 70 μ g de proteína y fueron corridas en geles de proteínas los cuales fueron electro transferidos en membranas de nitrocelulosa. Una membrana fue incubada con los anticuerpos de reconocimiento a EGFP, para evaluar la expresión de las proteínas y otra fue incubada con anticuerpos para el reconocimiento de PAR con el propósito de determinar la actividad catalítica de las polimerasas (**figura 33**).

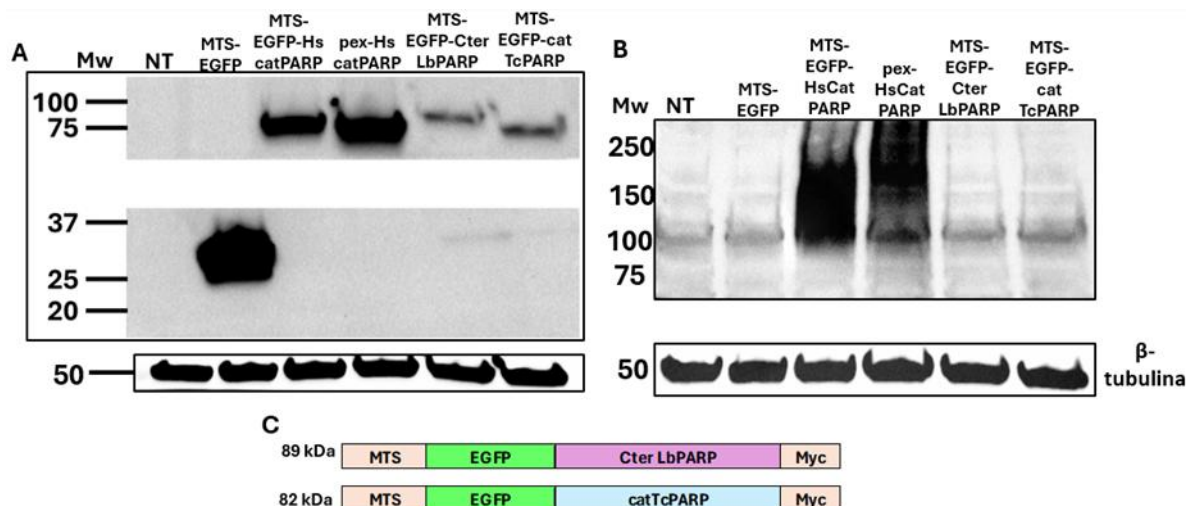


Figura 33. Evaluación de actividad de poli ADP-ribosa polimerasa de MTS-EGFP- Cter LbPARP y MTS-EGFP-catTcPARP in vivo en extractos de células HEK-293. **A.** *western blot* α -EGFP, anticuerpo primario: α -EGFP (1:15000). **B.** *western blot* α -PAR, anticuerpo primario: α -PAR (1:10000). **A y B.** No transfectadas (NT), MTS-EGFP (37 kDa), MTS-EGFP-HscatPARP (67 kDa), pex-HscatPARP (67 kDa), MTS-EGFP-Cter LbPARP

(89 kDa), MTS-EGFP-catTcPARP (82 kDa). Mw (kDa). Membrana de nitrocelulosa. Anticuerpo secundario: α -ratón conjugado con HRP (1:10000). Control de carga: β -tubulina. **C.** Mapa de constructos expresados en células HEK-293.

Como se observa en la figura 33.A fue posible realizar el reconocimiento de la expresión de todas las proteínas recombinantes evaluadas, en el tamaño molecular esperado. Con relación a las proteínas de origen parasitario MTS-EGFP-Cter LbPARP (89 kDa) y MTS-EGFP-catTcPARP (82 kDa) fusionadas con EGFP, estas proteínas presentaron una menor intensidad respecto a las señales de los controles, lo que se puede relacionar con la presencia de codones raros en los mRNAs que codifican para las proteínas, esto sería poco probable en la expresión de MTS-EGFP-Cter LbPARP teniendo en cuenta que la secuencia que codifica la proteína parasitaria se encuentra optimizada para su expresión en células de mamífero. Otra posibilidad se relaciona con bajas eficiencias de transfección asociadas a las secuencias de estos vectores ya que el procedimiento, las células transfectadas y el tamaño de los vectores fueron similares a los controles ¹³⁰.

En cuanto a la evaluación de la generación de PAR (figura 33.B) claramente se puede evidenciar la formación de los polímeros en los controles positivos MTS-EGFP-HscatPARP y pex-HscatPARP. De otro lado, no fue posible evidenciar que en los extractos celulares derivados de las células que expresaban MTS-EGFP-Cter LbPARP y MTS-EGFP-catTcPARP hubiese producción de PAR al igual que los controles negativos células no transfectadas y MTS-EGFP. Es importante resaltar que TcPARP fue previamente identificada por Villamil *et al.*, 2008 y en los ensayos *in vitro* (figura 5) presentó actividad PARP, la ausencia de la actividad de los ensayos *in vivo* podría atribuirse a: (i) bajas tasas de transfección correspondientes a una población pequeña de células que recibieron el plásmido y (ii) ya sea en conjunción o disyunción con la primera, alteraciones en la traducción de las proteínas de las células transfectadas, debido a la presencia de codones raros en la región codificante. Causando, de esta forma, que los PAR que estuvieran eventualmente generándose no presentaran la abundancia suficiente para ser reconocidos por *western blot*. Dando como resultado un panorama en el que la ausencia en señal de PAR no estuviera necesariamente relacionada con si las proteínas expresadas tenían actividad enzimática o no, sino con la sensibilidad del ensayo, de esta forma se pensó en realizar ensayos de inmunofluorescencia ya que el uso de fluorocromos incrementa la sensibilidad ³⁹.

La inmunocitoquímica representó de esta manera la metodología por la cual se podría evaluar la producción de PAR no en una población de células sino a nivel individual, eliminando el factor poblacional para la visualización de PAR. Consecuentemente, MTS-EGFP-Cter LbPARP, MTS-EGFP-catTcPARP, MTS-EGFP-HscatPARP y MTS-EGFP,

fueron expresadas en células HeLa S3 para la evaluación de producción de PAR a través de inmunofluorescencia; el empleo de esta línea celular se debe a que en comparación con las células HEK-293, las células HeLa presentan una proporción núcleo:citoplasma, que permite la visualización de estructuras celulares como las mitocondrias con mayor facilidad.

En este caso, las células fueron cultivadas en una placa de 24 pozos en donde al fondo de cada uno se dispuso un portaobjetos circular, las células se transfectaron como se mencionó anteriormente. 24 h postransfección, se inició el protocolo de inmunocitoquímica en donde para la detección de PAR se usó el mismo anticuerpo primario empleado en el *western blot* y como secundario se usó un α -ratón conjugado con el fluoróforo Alexa 594. Terminado el protocolo, los portaobjetos se dispusieron en un lamina y se visualizaron con microscopia confocal de fluorescencia (**figura 34**).

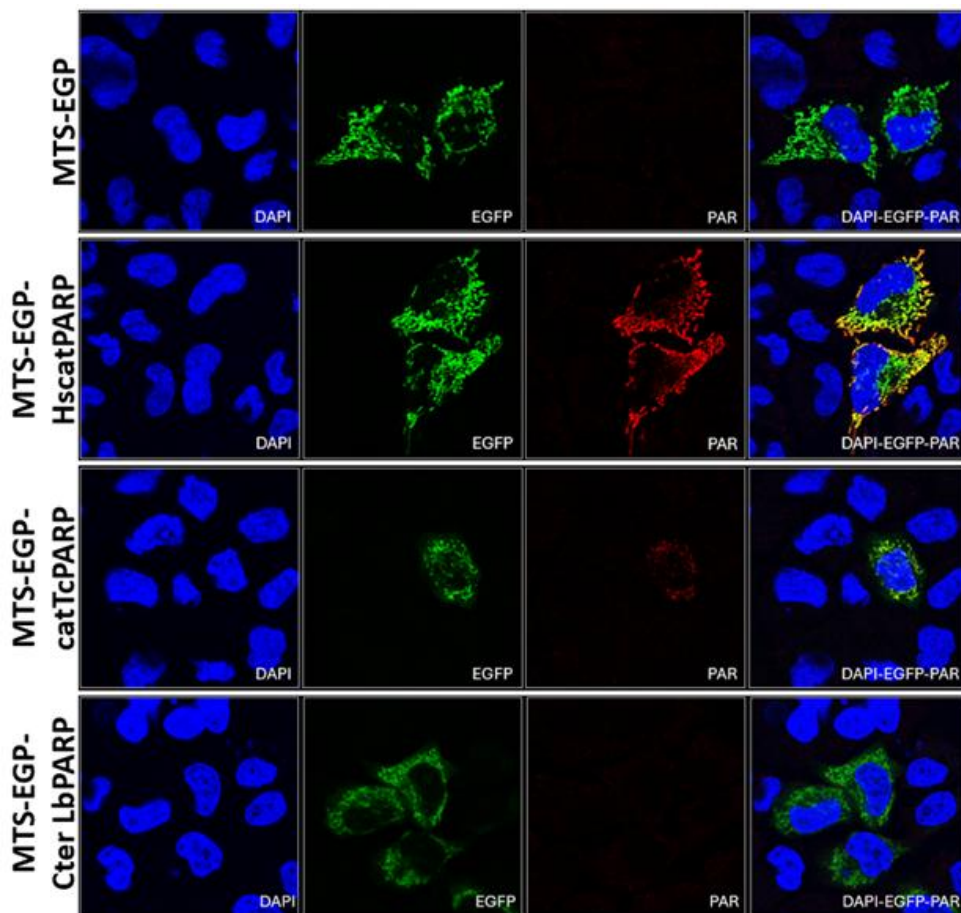


Figura 34. Evaluación de actividad de poli ADP-ribosa polimerasa de Cter LbPARP y catTcPARP in vivo en células HeLa S3 a través de inmunocitoquímica. Para la detección de PAR se utilizó anticuerpo primario: α -PAR (1:1000) y anticuerpo secundario α -ratón conjugado con Alexa 594 (1:1000). En cada fila se visualiza el mismo campo expuesto a excitación con diferentes longitudes de onda: DAPI (localización del núcleo), EGFP (localización de proteína recombinante fusionada con EGFP expresada en

mitocondrias), PAR (localización de polímeros de ADP-ribosa) y DAPI-EGFP-PAR (sobreposición de las excitaciones de las tres longitudes de onda). Microscopía confocal, escala de 20 μm . Control negativo (MTS-EGFP) y positivo (MTS-EGFP-HscatPARP). Microscopio confocal de fluorescencia Leica TCS SP8 STED 3X.

Al igual que con los ensayos de *western blot* de la figura 33, con la figura 34 fue posible confirmar que las proteínas recombinantes fusionadas con EGFP estaban siendo expresadas en esta línea celular, puesto que en todos los casos fue posible presenciar fluorescencia directa derivada de la excitación de EGFP (verde). En cuanto a la generación de PAR, estos fueron posibles visualizarlos tanto en las células que expresaban el control positivo MTS-EGFP-HscatPARP, así como en aquellas que expresaban MTS-EGFP-catTcPARP, al presenciarse fluorescencia indirecta Alexa 594 (rojo).

Es de destacar que resultó más laborioso en células transfectadas con pCMV MTS EGFP-catTcPARP, hallar células que estuviesen presentando señal de EGFP, esto era, la expresión de la proteína recombinante y, además, las que presentaron señal, no lo hicieron con la misma intensidad que la de los controles, situación que también se vio reflejada en la visualización de PAR; sugiriendo que la eficiencia de transfección y traducción de la proteína recombinante, representaron una limitante para la consecución de su expresión. Estos resultados apuntan a que en primer lugar la no visualización de PAR en las células que expresaban MTS-EGFP-catTcPARP en los ensayos de la figura 33 no estaban realmente relacionados con una ausencia de actividad PARP por parte de la proteína expresada, mostrando el impacto que puede tener la escogencia de la estrategia experimental a la hora de evaluar actividades enzimáticas.

Por otro lado, la ausencia de PAR en células transfectadas con pCMV MTS EGFP-Cter LbPARP podría estar determinada por varios motivos:

- El primero y más fácil de deducir, se justificaría en la ausencia de actividad PARP de la versión del candidato evaluado ya sea porque intrínsecamente no la posee o porque quizás para que su actividad sea ejercida, se necesite imperativamente la versión completa del candidato. La determinación de actividad de enzimas truncadas constituye un acercamiento experimental válido por ejemplo en PARPs humanas, la funcionalidad de cada uno de los dominios: regulador (autoinhibitorio), automodificación y catalítico fue establecida con versiones parciales de la proteína, igualmente en el presente estudio se emplearon como controles positivos versiones truncadas de HsPARP1 y TcPARP, las cuales mostraron con los diferentes acercamientos actividad enzimática (figura 31, figura 32 y figura 33), no obstante el estudio de versiones truncadas de enzimas aunque ofrece ventajas en términos de

expresión y estabilidad, depende de la estructura de la proteína y de las características de la versión truncada; existen reportes en donde se ve aumento de la actividad como en el caso de la carboxipeptidasa A de bovino y otros en donde se ve una disminución en la actividad como es el caso de la κ -carragenasa de *Pichia pastoris*^{121,131,132}.

- El segundo motivo se propone bajo un escenario en el que el candidato si tenga actividad PARP pero que requiera de algún tipo de particularidades como por ejemplo MPTs o la presencia de metabolitos que determinen su funcionalidad¹³³.

De esta manera, las aproximaciones experimentales aquí abordadas requerirían de la comunión de estos factores para potenciar la eventual actividad PARP del candidato. La presencia de poliaminas tales como la espermina han mostrado por ejemplo un potencial efecto activador en PARPs. Igualmente, podrían implementarse nuevas versiones truncadas o modificadas mediante adición de diferentes mutaciones tales como las fosfomiméticas la cual imita el efecto de la fosforilación sustituyendo el aminoácido que es fosforilado por uno con que a condiciones fisiológicas presente carga negativa, un ejemplo de esto sucede con mutante S727E del traductor de señal y activador de transcripción (STAT3) el cual presenta una mayor actividad con respecto al WT^{134,135}.

En general, las diversas aproximaciones experimentales empleadas para el abordaje de este objetivo indican idoneidad en la demostración de actividad PARP de varias proteínas, teniendo en cuenta que en los múltiples controles positivos acá empleados fue posible visualizar su actividad enzimática innata. Así mismo, la ausencia de actividad PARP en las dos versiones del candidato a LbPARP acá evaluadas sugiere la posibilidad de que el sistema de ADP-ribosilación en el parásito de *L. braziliensis*, desde sus mecanismos hasta su proceso evolutivo, sea más intrincado que lo observado en otros organismos incluso de su mismo orden, preguntas tan fundamentales como si este sistema se encuentra establecido en el parásito, los factores que actúan en el así como su historia evolutiva permanecen abiertas y conforman el establecimiento de un nuevo nicho de estudio enmarcado en el entendimiento de la bioquímica del parásito.

Los experimentos realizados en esta sección fueron realizados en el marco de la pasantía internacional en el laboratorio del profesor Mathias Ziegler en la Universidad de Bergen.

6.8. Determinación de localización celular de LbPARP en promastigotes de *Leishmania braziliensis* mediante el desarrollo de una herramienta inmunológica en modelo aviar

- **Obtención de IgYs policlonales α -6xHis-tLbPARP presentes en suero y huevos de gallina**

La producción de anticuerpos en modelo aviar se propuso como estrategia para la obtención de herramientas inmunológicas que permitieran la determinación de la ubicación subcelular del candidato a LbPARP en promastigotes de *L.braziliensis*. La elección de este modelo como plataforma de producción de anticuerpos se hizo principalmente por las siguientes razones: El desarrollo de las tecnologías de IgYs (IgGs aviares) comprenden un método no invasivo de obtención de altas cantidades de anticuerpos sin necesidad de desangrar al animal. Lo anterior radica en que las aves que no producen calostro hacen uso de la yema de sus huevos para la transferencia de inmunidad humoral a su descendencia y por lo tanto estas estructuras representan una fuente importante de anticuerpos, cuya purificación no requiere de procedimientos dispendiosos. Otra ventaja se fundamenta en el alto potencial hacia el reconocimiento específico de proteínas eucariotas dada la distancia evolutiva que puede existir entre aves y otros eucariotas multi o unicelulares ¹³⁶.

Teniendo lo anterior en cuenta, se diseñó un esquema de inmunización en un modelo aviar de 30 días de duración en el que se hicieron cuatro inoculaciones con 150 μ g de 6xHis-tLbPARP purificada a partir de cuerpos de inclusión en los días 1, 13, 21 y 28. De igual forma, se tomaron cinco sangrías (S pre inmune-S4), las cuales fueron evaluadas hacia el reconocimiento de 250 ng de antígeno recombinante 6xHis-tLbPARP mediante *western blot*, esto, implementando el control del suero no relacionado (SNR) obtenido de la gallina control (**figura 35.A**).

En aras de caracterizar el suero obtenido se propusieron dos ensayos: El primero constó de evaluar la capacidad de reconocimiento de varias diluciones del suero S4 hacia una cantidad fija (250 ng) de antígeno (6xHis-tLbPARP, 30 kDa); cinco diluciones fueron probadas, desde 1:2500 hasta 1:20000 (**figura 35.B**). La otra estrategia consistió en estimar la mínima cantidad de antígeno que podría ser reconocida por una dilución fija del suero S4; las cantidades de antígeno estuvieron entre los 250 y los 4 ng (**figura 35.C**). En todos los caso la albumina de suero bovino (BSA, 66,5 kDa) fue implementada como control de reconocimiento.

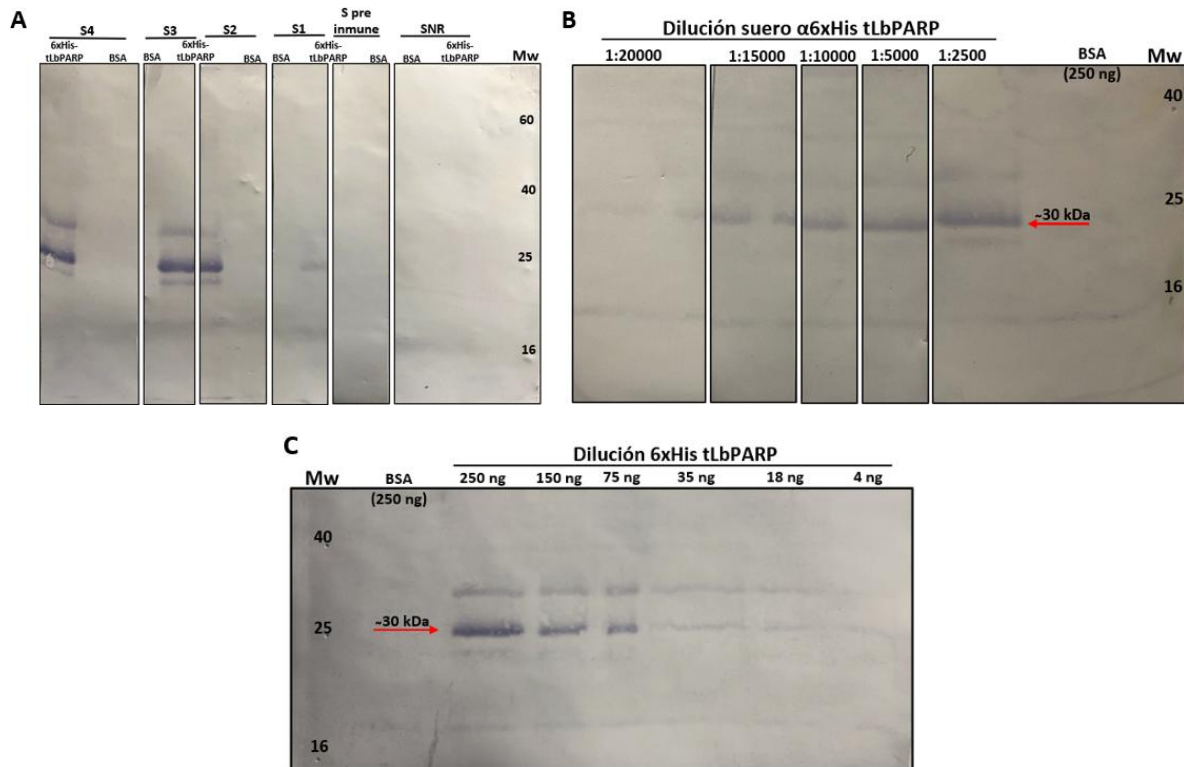


Figura 35. Caracterización de suero aviar α -6xHis-tLbPARP por western blot. **A.** Evaluación del reconocimiento de 6xHis tLbPARP (250 ng) por parte de los cinco sueros recolectados de la gallina inoculada: S preinmune, S1, S2, S3 y S4; y el suero control: suero no relacionado (SNR). Todos en una dilución 1:2500. **B.** Valoración de la máxima dilución de S4 que reconoce 6xHis tLbPARP (250 ng). **C.** Estimación de la mínima cantidad de 6xHis-tLbPARP reconocida por una dilución 1:2500 de S4. *Western blots* sobre membrana de nitrocelulosa con anticuerpo secundario α -chicken acoplado a fosfatasa alcalina en una dilución de 1:10000. En todos los casos se usó BSA (250 ng) como control de reconocimiento; Mw (kDa).

De esta manera, en la figura 35.A se puede apreciar que los sueros presentan reconocimiento hacia 6xHis-tLbPARP sobre los 30 kDa, desde inclusive S1, observando un aumento del reconocimiento en el transcurso del esquema de inmunización. Sugiriendo de esta manera el aumento del título de anticuerpos específicos al reconocimiento de 6xHis-tLbPARP. De igual forma, en la figura 35.B es posible constatar que diluciones de 1:20000 de S4 tienen la capacidad de reconocer 250 ng de antígeno recombinante y que, adicionalmente, una dilución 1:2500 de S4 presentan reconocimiento hacia 4 ng de antígeno recombinante. Lo anterior indica la generación de una herramienta de inmunoreconocimiento de gran valor para estudios *in vivo* o *in vitro* del candidato a LbPARP.

Como se había mencionado, la generación de anticuerpos en modelo aviar presenta adicionalmente, la obtención de anticuerpos a partir de la yema de los huevos puestos durante el esquema de inmunización. Se obtuvieron en total 27 huevos de cuyas yemas

se purificaron las IgYs presentes, esto se hizo a través de una metodología de precipitaciones sucesivas con PEG6000 (3,5; 8,5 y 12 %); método que se fundamenta en la disminución de moléculas de agua disponibles para la solubilización de las proteínas en el medio y, por lo tanto, ocasionando su precipitación. Es importante tener en cuenta que antes de someter la yema a las diferentes concentraciones de PEG6000, la yema se expuso a un proceso de deslipidación con acetona. La purificación de IgYs a partir de la fracción hidrosoluble de yema, se monitoreó a través de SDS-PAGE con el propósito de confirmar la presencia de las cadenas pesadas (68 kDa) y liviana (27 kDa) pertenecientes a las inmunoglobulinas en la fracción final de la precipitación (**figura 36**).

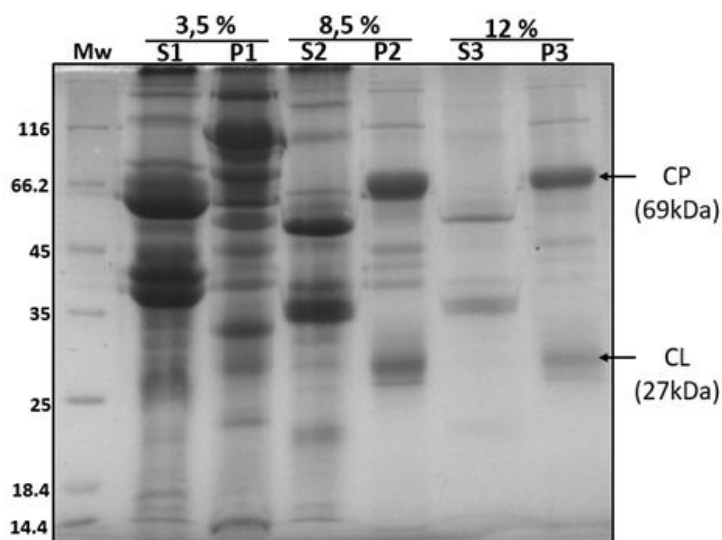


Figura 36. Purificación de IgYs a partir de yemas huevo mediante precipitación con PEG6000. Se indica en la parte superior de la imagen las concentraciones de PEG6000 con el sobrenadante (S) y el pellet (P) de cada una. En P3 se señala la cadena pesada (CP) y la cadena liviana (CL) correspondientes a las IgYs; Mw (kDa). SDS-PAGE al 12 % tinción de Coomassie

En la figura 36 se puede observar que durante el proceso de purificación de IgYs a partir de la fracción hidrosoluble de yemas fue posible en las primeras precipitaciones, deshacerse de proteínas contaminantes tales como vitelogeninas I, II y III cuya masa molecular ronda entre los 210 y 260 kDa, adicionalmente, proteínas como livetinas fueron descartadas o reducidas en su concentración a lo largo de este procedimiento, las mencionadas, componen cerca del 10 % de materia sólida en la yema y se han descrito varias subcategorías, algunas de ellas: α (~70 kDa), β (~40 kDa) y Y. En la última categoría se incluyen las IgYs presentes en las yemas. Por lo anterior, el método de purificación de IgYs acá empleado proporcionó una aproximación experimental adecuada para la obtención de las herramientas inmunológicas de interés ^{137,138}.

Con la intención de evaluar el reconocimiento del antígeno recombinante por parte de las IgYs purificadas desde huevo, se propuso inicialmente realizar su cuantificación a través de espectrofotometría UV-vis a 280 nm, esto, teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar de las inmunoglobulinas. Posteriormente, a partir de la muestra con mayor cantidad de proteínas se procedió a realizar ensayos de *western blot* para el reconocimiento de 250 ng de 6xHis-tLbPARP y de una muestra de fracción insoluble de células de *E.coli* M15 (pREP4) que estaban expresando el antígeno recombinante (figura 37).

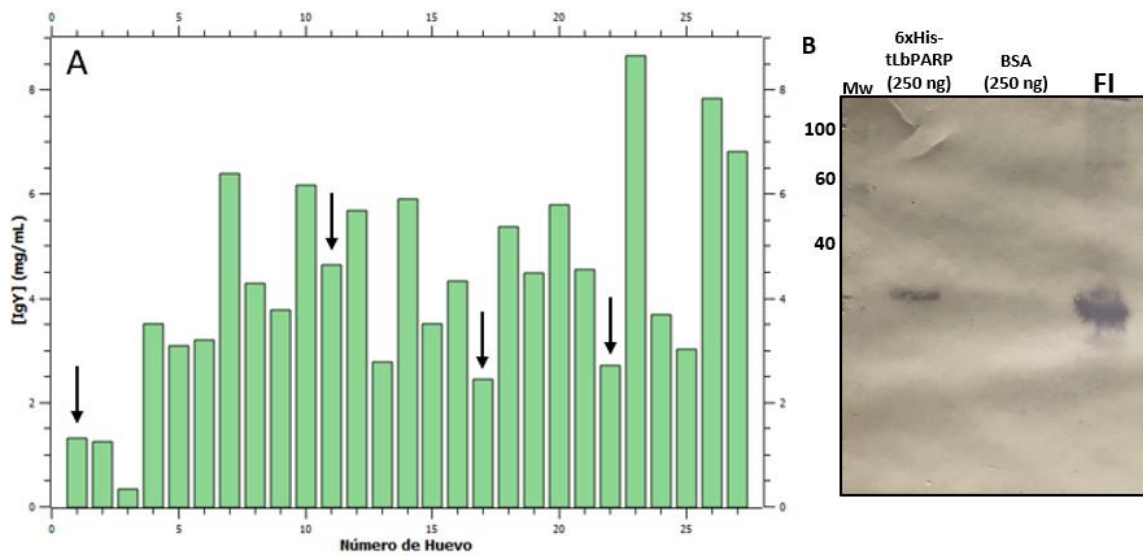


Figura 37. Cuantificación y evaluación de IgYs α -6xHis-tLbPARP purificadas a partir de fracción hidrosoluble de yemas mediante precipitación con PEG6000. **A.** Cuantificación de IgYs purificados provenientes de los 27 huevos colectados durante el esquema de inmunización por espectrofotometría UV-vis a 280 nm. Las flechas negras indican los días en los que se hicieron las cuatro inoculaciones. **B.** *Western blot* para la evaluación de reconocimiento de 6xHis-tLbPARP (250 ng), control BSA (250 ng) y fracción insoluble de lisado celular de *E.coli* M15(pREP4) que expresaban el antígeno recombinante (FI). Se hizo uso de las IgYs obtenidas en el huevo #23 como anticuerpo primario (1:1000) y α -chicken acoplado a fosfatasa alcalina como secundario (1:10000); Mw (kDa). Membrana de nitrocelulosa.

En la figura 37.A se visualiza, la cuantificación de proteínas por espectrofotometría UV-vis a 280 nm de las muestras que resultaron de la purificación de IgYs a partir de la fracción hidrosoluble de las yemas. Es de pertinencia señalar que las lecturas de absorbancia realizadas a 280 nm presentaran naturalmente una sobreestimación de la concentración real de las IgYs presentes en solución teniendo en cuenta que como se observó en la figura 36, que la fracción final poseía proteínas contaminantes. Así mismo, se recalca que previa a la inmunización existen inmunoglobulinas en los

sueros y huevos de estos organismos considerando que han sido expuestos a diferentes antígenos de manera natural, a pesar de encontrarse en situaciones de ambiente controlado, teniendo en cuenta que la evaluación de los sueros preinmunes no presentó reconocimiento frente a 6xHis-tLbPARP. Toda vez que la cuantificación de proteínas en la muestra derivada del huevo #23 presentó la mayor cantidad de proteínas, este se tomó para realizar los ensayos de inmunoreconocimiento por *western blot*.

Por su parte, la figura 37.B exhibe el resultado del reconocimiento de las IgYs presentes en el huevo #23 frente a dos formas del antígeno recombinante: Una derivada de su purificación a partir de cuerpos de inclusión y otra, una fracción insoluble proveniente de un lisado celular del sistema de *E.coli* M15(pREP4) 6xHis-tLbPARP. En este experimento fue posible detectar a 6xHis-tLbPARP en las dos muestras evaluadas, resaltando entonces la versatilidad de la herramienta biotecnológica generada.

Con la intención de monitorear la cinética de producción de IgYs α -6xHis-tLbPARP derivadas de huevo, a lo largo del esquema de inmunización, se formuló la realización de ensayos de ELISA con las muestras provenientes de la purificación de IgYs. Para esto, se propuso inicialmente la elaboración de un ELISA preliminar que permitiera determinar las condiciones apropiadas en cuanto a dilución de IgYs y cantidad de antígeno bajo las cuales se realizaría el ELISA de todos los huevos. Consecuentemente, en el ELISA preliminar se probaron tres diluciones de IgYs presentes en el huevo #23: 1:200, 1:500 y 1:1000. De igual forma, tres cantidades de antígeno fueron exploradas: 250 ng, 500 ng y 1000 ng (**figura 38.A**).

Con las condiciones estandarizadas, se procedió a realizar un ELISA indirecto en el que el reconocimiento de 6xHis-tLbPARP por parte de las IgYs provenientes de todos los huevos obtenidos de la gallina inoculada fueron estudiados. Adicionalmente, se hizo otro ELISA en paralelo en el que se puso a prueba el reconocimiento del antígeno recombinante por parte de IgYs derivadas de huevos de la gallina control, la cual fue durante el esquema de inmunización inoculada con PBS 1X en lugar de antígeno (**figura 38.B**).

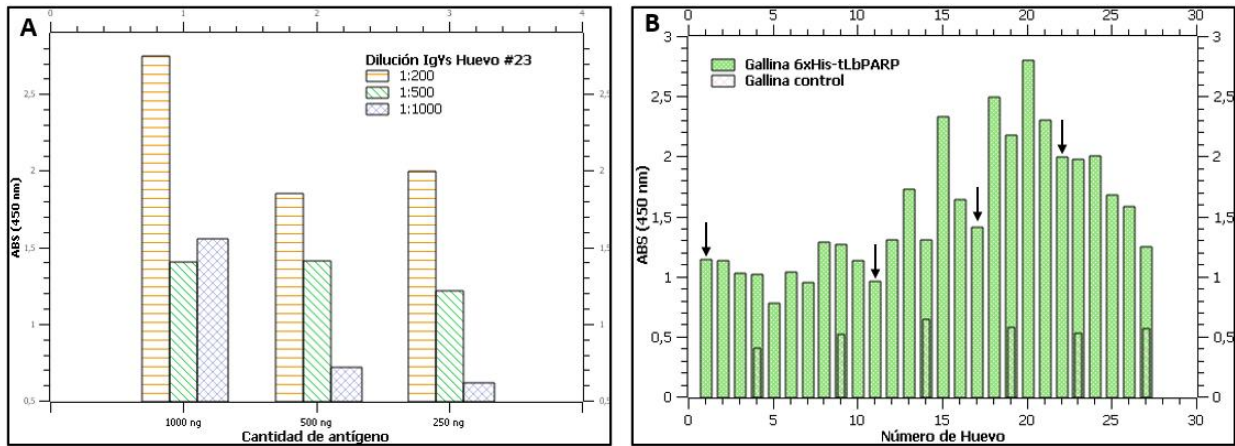


Figura 38. Evaluación de producción de IgYs α -6xHis-tLbPARP a través de ensayos de ELISA. **A.** Estandarización de condiciones de reconocimiento indirecto de IgYs α -6xHis-tLbPARP obtenidas del huevo #23. **B.** ELISA indirecto de IgYs provenientes de todos los huevos obtenidos a partir de la gallina inmunizada (barras en verde) y seis huevos representativos de la gallina inmunizada con PBS 1X (barras transparentes). Las flechas negras indican días de inoculación.

Los resultados obtenidos en la figura 38.A, indicaron que, en primera instancia, las condiciones óptimas de reconocimiento fueron 500 ng de antígeno recombinante con una dilución 1:500 de IgYs en el ensayo de ELISA, a su vez, estas condiciones permitieron un uso racional de los implementos biotecnológicos producidos. Así mismo, la figura 38.B sugiere que durante el transcurso del esquema de inmunización la gallina inoculada produjo una reacción inmune teniendo en cuenta el aumento de señal de detección por parte de las IgYs purificadas desde huevos. La dinámica de la respuesta inmune por parte del animal coincide con lo reportado en literatura en donde se espera un incremento de la respuesta entre los 8 a 10 días de comenzado el esquema, a esto, le sigue una caída repentina la cual puede volver a niveles considerablemente altos con la aplicación de dosis de refuerzo como se observó. Por lo tanto, lo anterior evidencia el éxito del esquema de inmunización llevado a cabo. Adicionalmente se reporta la obtención de 2 mg de IgYs por huevo. Lo anterior, resalta nuevamente, la relevancia de la herramienta biotecnológica obtenida ¹³⁹.

- **Determinación de ubicación subcelular de LbPARP en promastigotes de *Leishmania braziliensis* a través de inmunofluorescencia indirecta**

En la visualización de la ubicación subcelular del candidato se propuso realizar una aproximación a través de ensayos de inmunofluorescencia. Para esto, se planteó el uso de las IgYs obtenidas a partir de la gallina inoculada como herramienta de inmunoreconocimiento. Se tomaron de esta manera IgYs provenientes de S4 y se sometieron a un proceso de purificación por afinidad con el antígeno recombinante. Este proceso de purificación consistió en la transferencia de 1 mg de 6xHis-tLbPARP a una membrana de nitrocelulosa y su posterior incubación con S4. Las IgYs que

presentaron afinidad hacia el antígeno fueron eluidas a pHs ácidos y posteriormente, el pH del medio fue neutralizado. El proceso de purificación se monitoreó por *dot blot* en donde 250 ng de 6xHis-tLbPARP fueron sometidos a reconocimiento por parte de las diferentes fracciones de IgYs obtenidas durante la purificación utilizándolas como anticuerpo primario (**figura 39**).

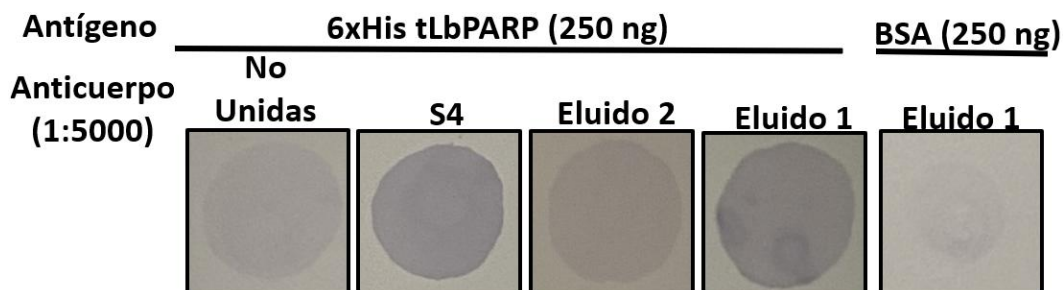


Figura 39. Evaluación por dot blot de IgYs α -6xHis-tLbPARP purificados mediante afinidad a partir de suero S4. Antígeno 6xHis tLbPARP (250 ng) y BSA (250 ng) y como anticuerpo primario diluciones 1:5000 de las cuatro fracciones de la purificación de IgYs: suero completo S4, fracción de IgYs no unidas después de interacción con antígeno (No unidas), IgYs eluidas en pH ácido (Eluido 1 y 2). Se usó como anticuerpo secundario α -chicken acoplado a fosfatasa alcalina (1:10000) sobre membrana de nitrocelulosa.

En la figura 39 se puede observar que fue posible presenciar el reconocimiento de 6xHis-tLbPARP por parte de los eluidos de IgYs, lo que sugiere el éxito del proceso de purificación implementado. Posteriormente, la concentración de las IgYs purificadas fue determinada por método de Bradford dando como resultado 247 ng/ μ L, y su uso se destinará para la realización de ensayos de Inmunodetección de la proteína endógena.

Para el desarrollo de la inmunofluorescencia se tuvieron presentes las siguientes consideraciones: en estudios *in silico* anteriores había sido posible la identificación de una secuencia de localización nuclear (NLS) bipartita en el candidato LbPARP como se ha observado en la PARP1 de humano, al igual que la presencia de dedos de Zinc, lo que permite asociar en términos teóricos, la función de esta proteína con procesos relacionados al núcleo del parásito. Con esto en mente, se propuso adicionalmente determinar si la ubicación subcelular del candidato en el parásito podría verse afectada ante la presencia de un estrés oxidativo como se ha observado en otros tripanosomátidos y de esta manera, poder relacionar la función de la proteína candidata a eventos de reparación de DNA; considerando que altas concentraciones de ROS se asocian con daños en el DNA. A pesar de que las versiones del candidato evaluadas en otros ensayos no exhibieron actividad PARP y a que en reportes previos no ha sido posible visualizar la generación de PAR en *Leishmania tarentolae* a través de inmunofluorescencia, en este ensayo se hace un acercamiento a entender el rol de la proteína endógena ^{50,68,140,141}.

Para lo anterior, el diseño experimental se asemejó al presentado en varios estudios de ubicación subcelular de PARPs de tripanosomas en los que se evaluaba a través de inmunofluorescencia indirecta la ubicación presentada por la proteína mencionada antes y después de someter los parásito a un estrés oxidativo con H_2O_2 . En consecuencia, se plantearon tres condiciones bajo las cuales se evaluó la ubicación de la proteína del parásito: 0, 250 y 500 μM de H_2O_2 ; esto se hizo en medio de cultivo durante 10 minutos. Después, se continuó con el protocolo habitual de inmunofluorescencia en donde una solución de 5,5 $\mu g/mL$ de IgYs α -6xHis tLbPARP purificadas mostradas en la figura 5 fueron usadas como anticuerpo primario (**figura 40**)^{68,140}.

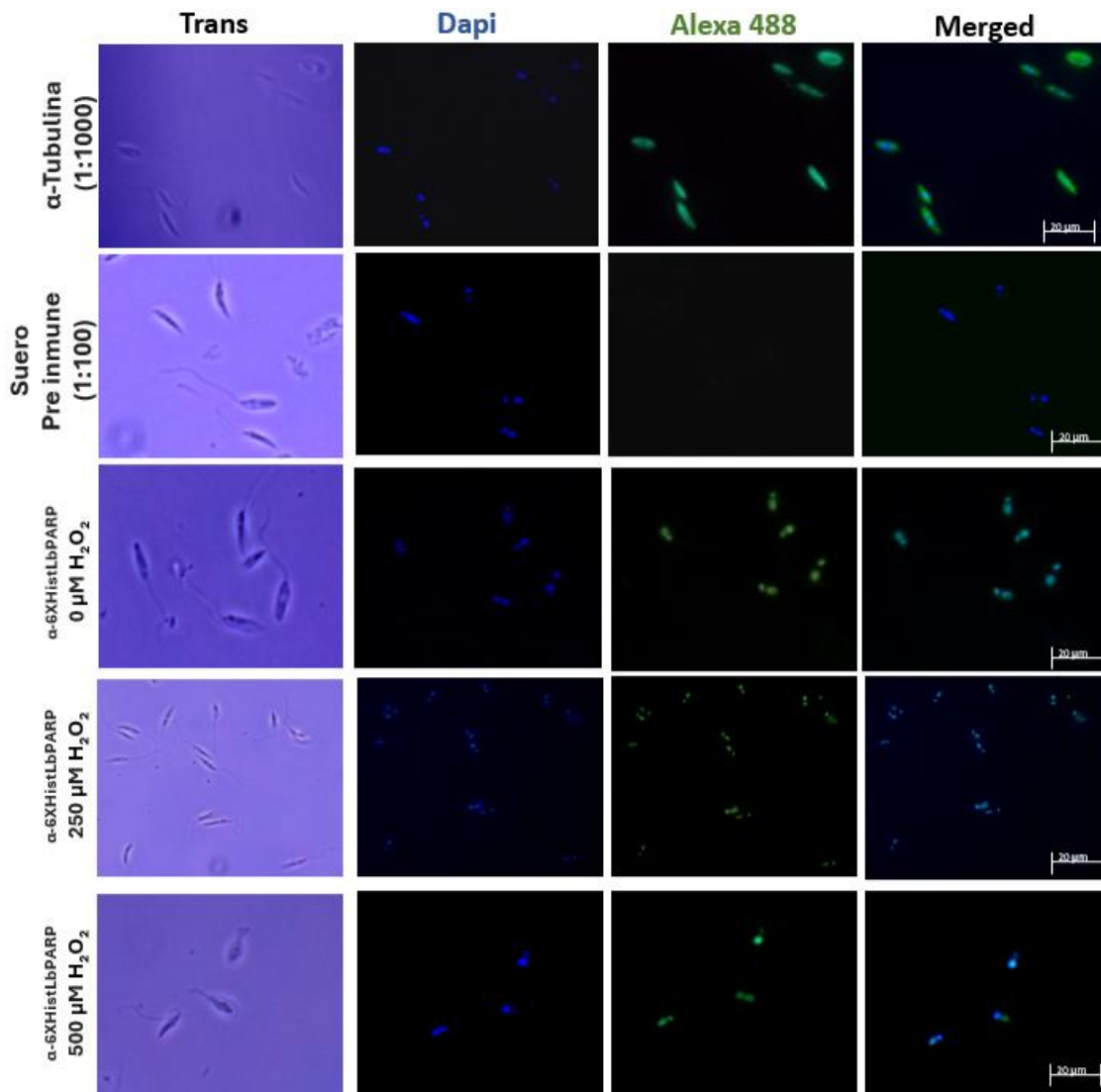


Figura 40. Inmunodetección de candidato a LbPARP endógena en promastigotes de *Leishmania braziliensis* mediante microscopía de fluorescencia. En la primera fila se muestra el control positivo de la metodología implementada: α -tubulina (1:1000) con anticuerpo secundario α -mouse conjugado con

Alexa 488. En la segunda fila se presencia el control negativo de reconocimiento: suero preinmune (1:100) con anticuerpo secundario α -*chicken* conjugado con Alexa 488. Las siguientes tres filas comprenden parásitos expuestos a diferentes concentraciones de H₂O₂ en donde el reconocimiento de LbPARP se hizo usando como anticuerpo primario 5,5 μ g/mL de IgYs α -6xHis-tLbPARP y como secundario α -*chicken* conjugado con Alexa 488. Los núcleos de los parásitos se tiñeron con DAPI. Microscopio de fluorescencia Zeiss Axio Observer.

De esta manera en la figura 40 se evidencia el reconocimiento de LbPARP endógena con IgYs α -6xHis-tLbPARP en promastigotes del parásito expuestos a 0, 250 y 500 μ M de H₂O₂, así mismo, este reconocimiento colocaliza con la señal de DAPI, tinción que coincide con el núcleo y el kinetoplasto del parásito. Análogamente, se evidencia la ausencia de señal en el canal de Alexa 488 en el control negativo: Suero pre inmune; resultado esperado dado a la ausencia de inmunoglobulinas específicas al reconocimiento de proteínas parasitarias.

El anterior resultado sugiere varias cosas: En primera instancia, el reconocimiento de la proteína endógena por parte de las IgYs derivadas del esquema de inmunización resultaron no ser únicamente valiosas para el reconocimiento del antígeno recombinante sino también, para la proteína endógena; postulando esta herramienta como un elemento valioso para estudios ulteriores de la proteína en cuestión. En segundo lugar, la presencia del candidato en el núcleo del parásito coincide con lo predicho a través de estudios *in silico* hechos en trabajos previos, lo que permite asociar la función del candidato LbPARP con procesos celulares a nivel nuclear. Resulta pertinente resaltar que el reconocimiento de la proteína no se vio afectado si los parásitos habían sido expuestos o no a H₂O₂, esto propone que la presencia y localización de la proteína del parásito en *Leishmania* no se encuentra supeditada a la existencia de estrés oxidativo como si se observa en tripanosomas. Lo anterior no descarta que esta proteína este asociada con rutas de reparación del material genético; ensayos en donde se sometan los parásitos a diversos agentes citotóxicos y se observe la formación de polímeros de ADP-ribosa podrían contribuir a clarificar el rol de esta proteína dentro del parásito. Estudios preliminares empleando H₂O₂ (1 mM) para la identificación de PAR mediante el uso de anticuerpos monoclonales no mostraron la generación de polímeros (datos no mostrados) ^{50,68}.

También se distingue la colocalización del candidato con el DAPI en el Kinetoplasto de los parásitos, este hallazgo representa una disparidad con lo presenciado en la localización de la PARP de *T.cruzi* y *T.brucei* en donde su ubicación está restringida al núcleo. Sin embargo, la presencia de PARPs en estructuras mitocondriales no es una rareza; en humanos se ha confirmado la presencia de PARP1 mitocondrial (mtPARP), en donde estaría involucrada en proceso de importancia como la regulación de la transcripción de genes mitocondriales ¹⁴².

De igual forma, en *Leishmania* proteínas que presentan una localización tanto en núcleo como en kinetoplasto siendo el caso de las topoisomerasas I y II, y la proteína

tipo RAD51, entre otras; aunque escasos, son factores asociados con procesos de importancia como recombinación homóloga, replicación, transcripción y reparación del DNA. De esta forma, la ubicación del candidato en el kinetoplasto permite ampliar la gama de procesos celulares bajo los cuales esta proteína estaría involucrada, aún más teniendo en cuenta los elementos estructurales que posee el candidato LbPARP (dedos de zinc) que le permiten interactuar con esta molécula^{143,144}.

En definitiva, en este apartado se logró construir una herramienta inmunológica valiosa derivada de modelo aviar para el estudio del candidato a LbPARP endógena. Para esto, se requirió de la conjunción de dos plataformas: una para la expresión de 6xHis tLbPARP en el sistema heterólogo de *E.coli*, la que permitió la obtención del antígeno recombinante y otra, de producción de anticuerpos policlonales en modelo aviar (IgYs). Con las IgYs obtenidas de huevo y sangría, se realizó su caracterización y purificación por afinidad. Con las últimas, se logró ubicar a nivel subcelular el candidato mediante técnicas de inmunofluorescencia, las cuales permitieron determinar su ubicación a nivel de núcleo y kinetoplasto, lo que resalta la asociación de su función con procesos enmarcados en torno al gDNA y kDNA de los parásito de *L.braziliensis*. Como perspectiva se propone la identificación de la proteína endógena en extractos del parásito mediante *western blot*.

6.9. Exploración *in silico* de componentes de código PAR en parásitos del género *Leishmania*

El análisis computacional de marcos abiertos de lectura a través de su similitud con otras secuencias en bases de datos constituye un paso central en la inferencia de la función de proteínas cuyas funciones no han sido estudiadas experimentalmente. Este principio fue el implementado en los comienzos de esta investigación, con las herramientas disponibles para ese entonces, se postuló al candidato de LbPARP acá evaluado. La revolución en la predicción *in silico* de estructuras tridimensionales de proteínas a través herramientas de inteligencia artificial ha permitido el desarrollo de nuevos algoritmos para la identificación de proteínas que aún no han sido evaluadas experimentalmente^{145,146}.

A pesar del éxito y amplio uso que ha tenido la inferencia de función de proteínas a partir de métodos basados en homología de secuencias, muchas proteínas no pueden ser identificadas debido a una relación distante en términos evolutivos con respecto a secuencias consenso. Por lo anterior, la búsqueda de similitudes estructurales (3D) para la proposición de proteínas candidatas resulta una operación con mayor sensibilidad con respecto a los métodos que se basan únicamente en la secuencia aminoacídica⁸⁹.

El principal objetivo de esta sección se centró en proponer y caracterizar bioinformáticamente varias proteínas candidatas que harían parte del sistema de ADP-ribosilación en parásitos del género *Leishmania* mediante la comparación estructural de estas con estructuras tridimensionales determinadas experimentalmente de varias proteínas pertenecientes al sistema de ADP-ribosilación de humanos. De este modo, un total de cinco proteínas humanas fueron utilizadas como estructuras de consulta: PARP1, PARP10, PARG, MacroD2 y ARH3 en el programa *Foldseek* en donde las candidatas que presentaron un E valor más bajo fueron escogidas para caracterización bioinformática mediante el programa *protparam* (Tabla 6).

Tabla 6. Características bioquímicas de los candidatos a ARTD1, ARTD10, MacroD2 y ARH3 de parásitos del género *Leishmania*.

Rol	Proteína consulta	Especie	No. Acceso	Longitud (aa)	Masa molecular (kDa)	PI	Coef. Extinción	Promedio de hidropaticidad
Escritora	ARTD1	<i>L. braziliensis</i>	XP_001567715.2	1330	145	9,12	1,176	-0,408
		<i>L. infantum</i>	XP_001468029.1	1318	142	9,26	1,055	-0,445
		<i>L. donovani</i>	AYU81905.1	1318	142	9,26	1,017	-0,446
		<i>L. major</i>	XP_001685661.1	1317	142	8,98	1,045	-0,434
Escritora	ARTD10	<i>L. braziliensis</i>	XP_001561967	1208	132	6,56	0,849	-0,387
		<i>L. infantum</i>	XP_001463115.1	1184	129	6,60	0,846	-0,348
		<i>L. donovani</i>	XP_003858341	1184	129	6,66	0,846	-0,343
		<i>L. major</i>	XP_001680802	1184	129	6,58	0,847	-0,342
Borradora/ Lectora	MacroD2	<i>L. braziliensis</i>	XP_001568971.1	276	31	8,28	1,245	-0,298
		<i>L. infantum</i>	XP_001469686.1	276	31	7,13	1,241	-0,275
		<i>L. donovani</i>	XP_003865460	276	31	7,13	1,241	-0,276
		<i>L. major</i>	XP_001686909	276	31	6,55	1,239	-0,273
Borradora	ARH3	<i>L. braziliensis</i>	XP_001566307.1	413	44	6,60	0,840	-0,030
		<i>L. infantum</i>	XP_001470305.1	417	44	6,01	0,870	-0,006
		<i>L. donovani</i>	XP_003862378	417	44	6,01	0,869	-0,012
		<i>L. major</i>	XP_001684546.1	417	44	5,94	0,842	0,018

Es de importancia aclarar que ARTD1 y ARTD10 corresponden a la región catalítica de PARP1 y PARP10, la elección de esta porción como proteína de consulta se hizo principalmente porque en primera instancia, no hay estructuras tridimensionales determinadas por métodos experimentales para las proteínas completas y en segunda, porque los dominios ARTDs de las PARPs son los elementos estructurales que mayor conservación presentan en estas proteínas ²⁸.

De este manera, en la tabla 6 se puede apreciar que fue posible encontrar proteínas candidatas en parásitos del género *Leishmania* para cuatro de las cinco proteínas humanas pertenecientes al sistema de poli ADP-ribosilación. Se destaca la ausencia

de candidatos a PARG en los parásitos, sin embargo, la identificación de otras ADP-ribosil hidrolasas como los macrodominios y ARH3 permite proponer que las hidrolisis de eventuales motivos de ADP-ribosa serían degradados por estas proteínas. Adicionalmente, se resalta que los números de acceso obtenidos de los candidatos para ARTD1 y ARTD10 no presenta similitud con el de la proteína evaluada experimentalmente en este estudio.

Con los candidatos obtenidos, se realizó una comparación estructural tomando como plantilla a las proteínas de consulta en el programa chimeraX.

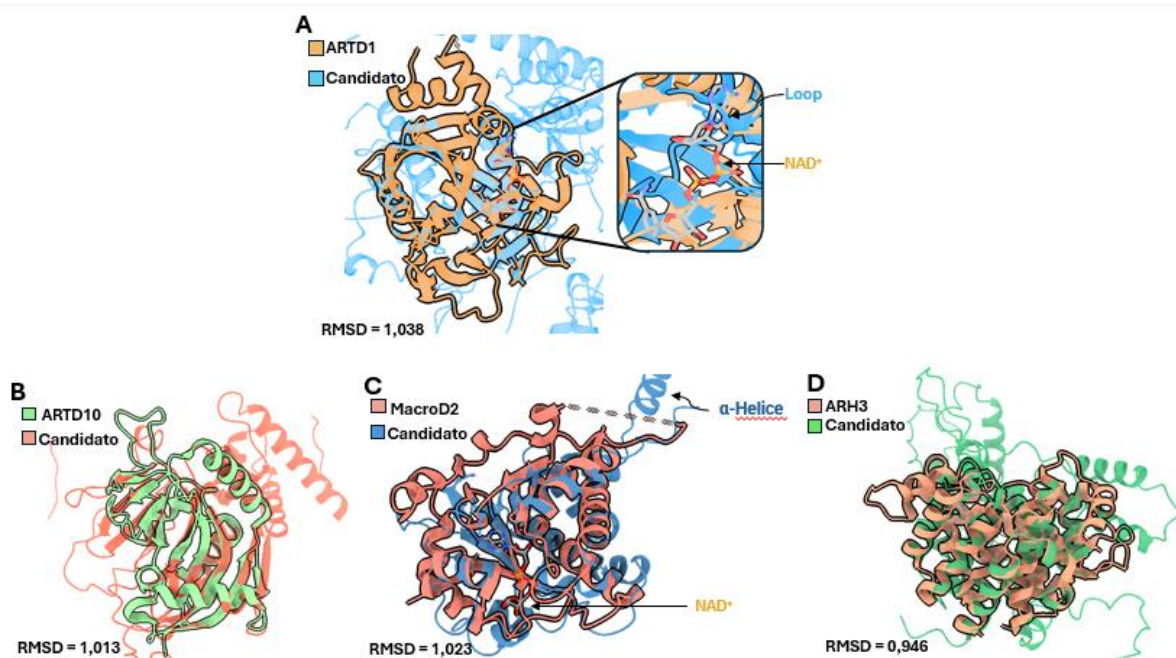


Figura 41. Comparación de estructuras tridimensionales de proteínas candidatas de *Leishmania infantum* predichas por AlphaFold3 con proteínas ARTD1, ARTD10, MacroD2 y ARH3 de humano.

La figura 41 muestra la comparación estructural de cuatro candidatos a LiPARP1, LiPARP10, LiMacroD2 y LiARH3 con respecto a proteínas humanas. De esta exploración se pueden discutir varios elementos de interés:

- La proteína homóloga a ARTD1 en parásitos del género *Leishmania* presentó en la bases de datos de uniprot (A4I8G0) una anotación de una proteína con dedos de zinc involucrada en reconocimiento de DNA. A pesar de que a la hora de comparar el candidato de *Leishmania infantum* con HsARTD1 en términos estructurales se obtienen RMSDs relativamente bajos, esta no presentaría los dominios característicos propios de PARPs de otros ortólogos al no presenciarse predicciones para la existencia de otros dominios como el BRCA, WWE y el dominio

autoinhibitorio compuesto por un conjunto de hélices alfa. Adicionalmente fue posible evaluar la unión que este candidato tendría con el NAD⁺, observando que en el lugar en donde debería encontrarse el sitio catalítico se interpone un loop el cual se encuentra señalado en la **figura 41.A**. Lo anterior indica que la búsqueda de una proteína que presente las características canónicas de PARPs en parásitos del género *Leishmania*, sigue representando un desafío aun utilizando este tipo de acercamientos computacionales.

- De igual manera, se evaluó la posibilidad de que, en los parásitos en cuestión, se pudiera encontrar una proteína con similitud a una mono ADP-ribosa transferasa (MARTs); para esto, la proteína de consulta ARTD10 fue escogida. Cabe aclarar que la diversificación estructural de este tipo de proteínas es de una gran amplitud y que el único rasgo que se ha mantenido a lo largo de la historia evolutiva de estas proteínas ha sido el dominio ARTD. El candidato encontrado en este caso presentó una gran similitud en la comparación estructural (**figura 41.B**), sin embargo, al momento de buscar dominios de homología hnRNP K (HK) en su estructura, no fue posible. Estos dominios son característicos por lo menos en PARP10 y se relacionan con su capacidad de interactuar con RNAs. No obstante, no se descarta la eventual relación de este candidato con eventos de MARilación, la búsqueda de otros elementos estructurales presentes en otras MARTs podría arrojar nuevos indicios sobre este candidato ¹⁴⁷.
- Uno de los descubrimientos más relevantes realizados en esta aproximación está en el hallazgo de dos candidatos a proteínas borradoras de señales de ADP ribosilación. LiMacroD2 y LiARH3 presentaron una similitud estructural considerable con respecto a las proteínas humanas a lo largo de toda su secuencia. En primer lugar, LiMacroD2 presentó una hélice α adicional (ver **figura 41.C**) que se podría relacionar con asociación a elementos de membrana, lo cual resultaría peculiar para una proteína de este tipo, también es de pertinencia adicionar que los macrodominios también cumplen funciones de lectores. Por su lado, como se observa en la **figura 41.D** LiARH3 presentó unas inserciones con respecto a la proteína humana, enriqueciendo aún más los objetos de discusión de este trabajo. En vertebrados, se reporta la existencia de tres ARH homologas, ARH3 se asocia con un gran espectro de remociones de ADP ribosa, desde PARilaciones hasta MARilaciones, sugiriendo una actividad similar en parásitos de *Leishmania*. Dada la ausencia de una PARP con características canónicas capaz de realizar PARilaciones en estos organismos, la posible existencia de MARTs y la ya reportada de sirtuinas justificarían la existencia de estas dos proteínas capaces de remover motivos de ADP-ribosa. Su identificación en este trabajo abre las puertas para su eventual abordaje experimental ^{148,149}.

- Con respecto a los módulos lectores, la probable existencia de un macrodominio en parásitos del género *Leishmania* también representa la existencia de este módulo lector de ADP-ribosilación. Adicionalmente, con las herramientas acá implementadas se lograron encontrar varias proteínas candidatas con módulos de lectura WWE como A4IDG5 y A4I269. De igual forma, la presencia reportada de proteínas con módulos de unión a PAR como BRCT y KU70 sugiere que estos parásitos poseen los factores necesarios para la lectura de señales de ADP-ribosilación^{49,150}.

- **Predicción de sitios de modificación postraducciona del candidato a LbPARP**

Diferentes mecanismos de regulación génica permiten a los sistemas vivos coordinar respuestas a diferentes estímulos ambientales, la armonización de estas respuestas se da a nivel transcripcional y postranscripcional. Las modificaciones postraduccionales (MPTs) representan un elemento adicional dentro de estos programas de respuesta y son claves para la modulación rápida de diferentes características de las proteínas tales como su actividad, su localización, su degradación y su interacción con otras proteínas¹⁵¹.

Como se refirió con anterioridad, las PARPs involucradas en respuesta a daños del DNA modulan principalmente su actividad a través del reconocimiento de daños en el material genético y por eventos de automodificación, sin embargo, otros mecanismos regulatorios importantes de carácter postraducciona han sido descritos para especialmente la PARP1 de humano. Resulta de especial interés por ejemplo el reporte en donde se estudia la activación alternativa de PARP1 la cual se da después de ser fosforilada (S372 y T373) por las quinasas reguladas por señales extracelulares 1/2 (ERK1/2). Adicional a esta modificación, MPTs como metilaciones, acetilaciones, SUMOilaciones y ubiquitinaciones también han sido reportadas en PARP1 a través de experimentos de espectrometría de masas^{152,153}.

Como se había discutido en el apartado de la evaluación enzimática de LbPARP, una de las posibles razones por las cuales no se haya observado la generación de PAR por parte de las dos versiones evaluadas se puede deber a que el modelo experimental empleado no le propicia las modificaciones postraduccionales adecuadas a la proteína para que esta exhiba su acción catalítica, de esta manera y teniendo en cuenta los reportes de MPTs en HsPARP, en uno de los propósitos de esta sección se encuentra la realización de una exploración *in silico* de MPTs que pueda estar experimentando LbPARP con el objetivo de direccionar estrategias experimentales a futuro.

Por lo anterior, cuatro servidores bioinformáticos fueron evaluados para la determinación de diversas MPTs en el candidato a LbPARP. Los análisis se centraron en fosforilaciones, SUMOilaciones, ubiquitinaciones y metilaciones (**figura 42**).

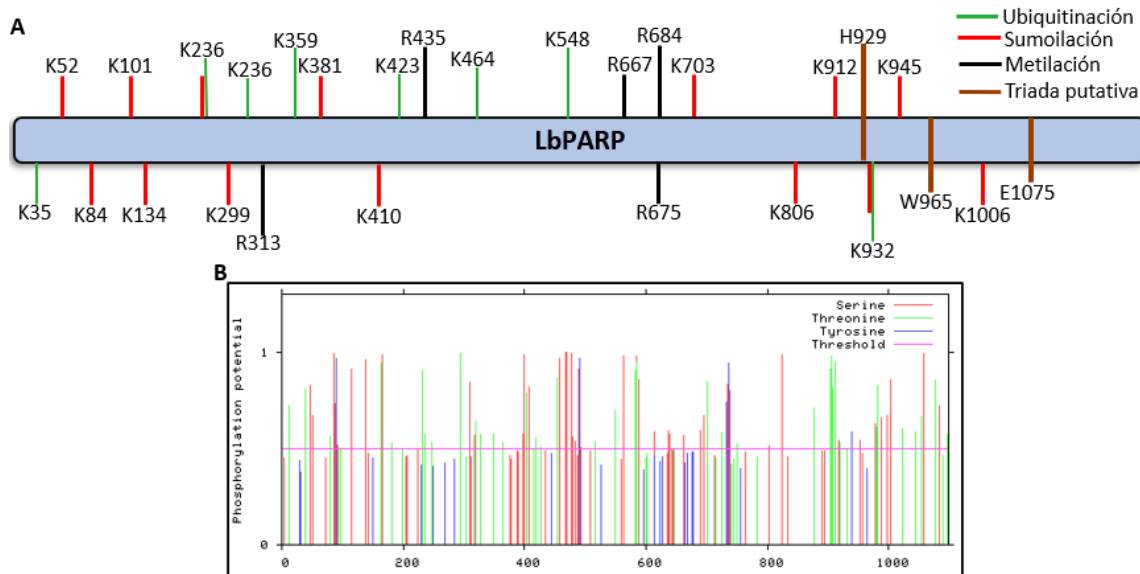


Figura 42. Predicción in silico de MPTs del candidato a LbPARP. **A.** Sitios de ubiquitinaciones, sumoilaciones y metilaciones. **B.** Sitios de fosforilaciones, línea en magenta representa el umbral.

La figura 42 da cuenta de las posibles MPTs que experimentaría el candidato a lo largo de su secuencia. En primer lugar, se predice la presencia de sumoilaciones, modificación que se ha descrito como conservada en parásitos del género *Leishmania*. En los parásitos, esta modificación posee una importancia crucial en por ejemplo la interacción con otras proteínas, cambios conformacionales y la promoción de otras MPTs como fosforilaciones y ubiquitinaciones; de esto último, llama la atención que los aminoácidos K236 y K932 presentarían tanto sumoilaciones como ubiquitinaciones, lo que propondría a estos sitios como puntos especialmente importantes para la estabilidad del candidato, esto, teniendo en cuenta que algunos patrones de ubiquitinación pueden promover la degradación de proteínas vía direccionamiento al proteasoma ¹⁵⁴.

De igual forma, se predice la presencia de metilaciones en varios sitios de la secuencia del candidato. En el caso de PARP1 de humano, se ha visto que las metilaciones son una de las MPTs más importantes que puede sufrir esta proteína; a través de un análisis por espectrometría de masas, se evidencia que la metilación en K528 promovió un incremento significativo de la actividad enzimática de esta proteína. En lo que concierne a este estudio, dada la poca abundancia de estas MPTs a lo largo de la secuencia del candidato, se podría proponer la sustitución de las argininas de los sitios

de metilación predichos, por aminoácidos apolares para la evaluación enzimática de versiones del candidato mimetizadas ¹⁵³.

En resumen, en este capítulo se hizo una aproximación *in silico* para la determinación de varios candidatos involucrados en el sistema de ADP-ribosilación de parásitos del género *Leishmania*. La determinación de una PARP en estos parásitos después de esta aproximación continúa siendo ambigua y requiere de más esfuerzos para la clarificación de la existencia de una proteína de esta clase. El hallazgo de un candidato con homología estructural a ARTD10 y la de dos proteínas borradoras y/o lectoras de señales de ADP-ribosilación abre las puertas para la continuación del estudio de estos mecanismos en este protozooario. De manera adicional, se realizó una predicción de sitios de MPTs para el candidato a LbPARP evaluado en este trabajo con el objetivo de diseñar estrategias experimentales que permitan profundizar en el estudio de su potencial PARP.

7. Conclusiones y perspectivas

7.1. Conclusiones

En este trabajo se realizó un acercamiento hacia el estudio del que sería un factor importante en el sistema de ADP-ribosilación en *Leishmania braziliensis*. Las diferentes estrategias abordadas para la evaluación de la actividad enzimática de dos versiones del candidato a LbPARP, aunque idóneas para los controles positivos, no permitieron que este exhibiera actividad enzimática. Con lo anterior, no fue posible la verificación de la generación de polímeros de ADP-ribosa por el candidato evaluado. De igual forma, fue posible mediante experimentos de inmunofluorescencia asociar la función del candidato con procesos relacionados al gDNA y kDNA como procesos de reparación y regulación génica.

Los resultados obtenidos indicaron diferencias relevantes entre el sistema de ADP-ribosilación del parásito en mención y los de humano, e inclusive, con respecto a parásitos de su mismo orden como *Trypanosoma cruzi* y *brucei*. Lo anterior propone un escenario interesante en el estudio de los sistemas de ADP-ribosilación en parásitos de este género los cuales han sido poco estudiados.

Esfuerzos que permitan el entendimiento de este sistema en los parásito de *Leishmania*, desde su historia evolutiva hasta los roles que desempeña a nivel celular permitirían entender los mecanismos bajo los cuales estos parásito se valen para mantener su estabilidad génica y de igual forma, permitiría develar aspectos nuevos bajo los que se enmarcan los sistemas de ADP-ribosilación.

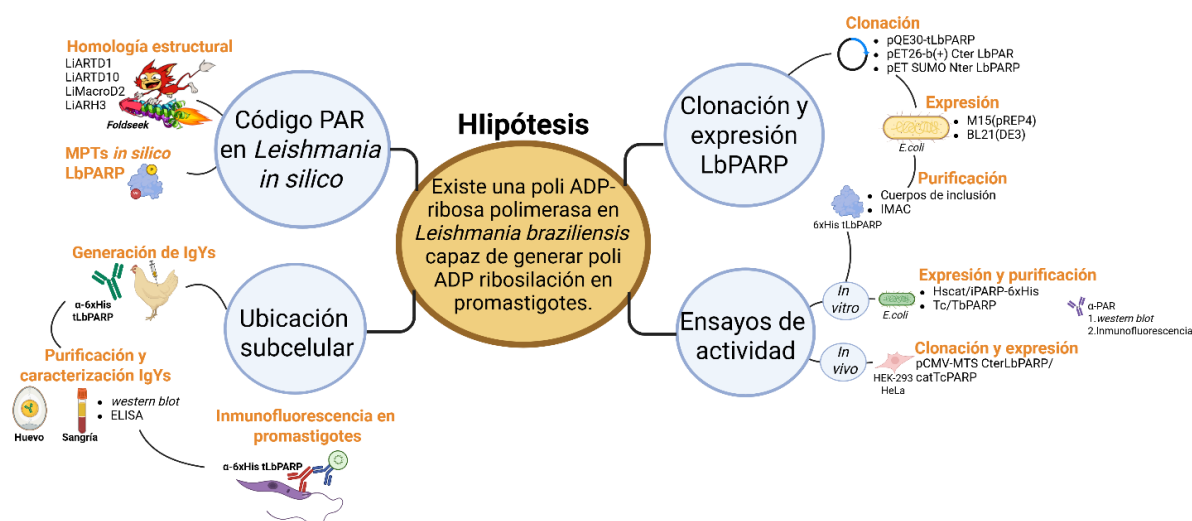


Figura 43. Resumen gráfico del trabajo realizado a lo largo del presente estudio.

7.2. Perspectivas

En este corto apartado se propone realizar una serie de planteamientos experimentales con el ánimo de diseñar un esquema de trabajo en cuanto refiere a la determinación de la existencia de una PARP en *Leishmania braziliensis*:

1. Se propone realizar la sobreexpresión del candidato a LbPARP evaluado en este trabajo en promastigotes de *Leishmania braziliensis* con el objetivo de propiciar el ambiente óptimo de operación de esta proteína. Con la sobreexpresión de esta proteína se puede evaluar su actividad de ADP-ribosilación en extractos de parásitos que la sobreexpresan.
2. Se contempla de igual forma se propone repetir la realización la detección de polímeros de ADPr en promastigotes de *Leishmania braziliensis* que han sido estresados a estrés citotóxico con agentes diferentes al H₂O₂. Lo anterior, alegando que quizá la activación de la posible PARP en este parásito se vea influenciada por la naturaleza del estrés al que se someta el parásito.
3. El intento de la expresión de la región N-terminal para realizar ensayos de complementación, así como la generación de versiones del candidato que presenten mimetismo molecular hacia ciertas modificaciones postraduccionales, como se discutió a lo largo de este escrito, siguen estando en la panorámica de esta investigación.

Anexo: Secuenciamiento de Nter LbPARP

Se muestra parte del alineamiento de secuencias de nucleótidos de Nter LbPARP (fila gris parte superior) con la secuencia obtenida mediante secuenciamiento haciendo uso del *primer* Fw-promotorT7 (parte inferior). Se señalan las dos deleciones discutidas.



Bibliografía

- (1) Ghorbani, M.; Farhoudi, R. Leishmaniasis in Humans: Drug or Vaccine Therapy? *Drug Des Devel Ther* **2017**, *12*, 25. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S146521>.
- (2) Sunter, J.; Gull, K. Shape, Form, Function and Leishmania Pathogenicity: From Textbook Descriptions to Biological Understanding. *Open Biol* **2017**, *7* (9). <https://doi.org/10.1098/RSOB.170165>.
- (3) Kaye, P. M.; Cruz, I.; Picado, A.; Van Bocxlaer, K.; Croft, S. L. Leishmaniasis Immunopathology—Impact on Design and Use of Vaccines, Diagnostics and Drugs. *Seminars in Immunopathology 2020 42:3* **2020**, *42* (3), 247–264. <https://doi.org/10.1007/S00281-020-00788-Y>.
- (4) *Leishmaniasis - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud*. <https://www.paho.org/es/temas/leishmaniasis> (accessed 2025-04-19).
- (5) *Leishmaniasis*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (accessed 2025-04-19).
- (6) *Boletín Epidemiológico*. <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Paginas/Vista-Boletin-Epidemilogico.aspx> (accessed 2025-04-19).
- (7) Akhoundi, M.; Downing, T.; Votýpka, J.; Kuhls, K.; Lukeš, J.; Cannet, A.; Ravel, C.; Marty, P.; Delaunay, P.; Kasbari, M.; Granouillac, B.; Gradoni, L.; Sereno, D. Leishmania Infections: Molecular Targets and Diagnosis. *Mol Aspects Med* **2017**, *57*, 1–29. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2016.11.012>.
- (8) De Menezes, J. P. B.; Guedes, C. E. S.; De Oliveira Almeida Petersen, A. L.; Fraga, D. B. M.; Veras, P. S. T. Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis. *Biomed Res Int* **2015**, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/815023>.
- (9) Lüscher, B.; Bütepage, M.; Ecke, L.; Krieg, S.; Verheugd, P.; Shilton, B. H. ADP-Ribosylation, a Multifaceted Posttranslational Modification Involved in the Control of Cell Physiology in Health and Disease. *Chem Rev* **2018**, *118* (3), 1092–1136. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00122>.
- (10) Manco, G.; Lacerra, G.; Porzio, E.; Catara, G. ADP-Ribosylation Post-Translational Modification: An Overview with a Focus on RNA Biology and New Pharmacological Perspectives. *Biomolecules* **2022**, *12* (3), 443. <https://doi.org/10.3390/BIOM12030443/S1>.

-
- (11) Lüscher, B.; Ahel, I.; Altmeyer, M.; Ashworth, A.; Bai, P.; Chang, P.; Cohen, M.; Corda, D.; Dantzer, F.; Daugherty, M. D.; Dawson, T. M.; Dawson, V. L.; Deindl, S.; Fehr, A. R.; Feijs, K. L. H.; Filippov, D. V.; Gagné, J. P.; Grimaldi, G.; Guettler, S.; Hoch, N. C.; Hottiger, M. O.; Korn, P.; Kraus, W. L.; Ladurner, A.; Lehtiö, L.; Leung, A. K. L.; Lord, C. J.; Mangerich, A.; Matic, I.; Matthews, J.; Moldovan, G. L.; Moss, J.; Natoli, G.; Nielsen, M. L.; Niepel, M.; Nolte, F.; Pascal, J.; Paschal, B. M.; Pawłowski, K.; Poirier, G. G.; Smith, S.; Timinszky, G.; Wang, Z. Q.; Yélamos, J.; Yu, X.; Zaja, R.; Ziegler, M. ADP-Ribosyltransferases, an Update on Function and Nomenclature. *FEBS J* **2022**, *289* (23), 7399–7410. <https://doi.org/10.1111/FEBS.16142>.
- (12) Suskiewicz, M. J.; Prokhorova, E.; Rack, J. G. M.; Ahel, I. ADP-Ribosylation from Molecular Mechanisms to Therapeutic Implications. *Cell* **2023**, *186* (21), 4475–4495. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2023.08.030/ASSET/2EC61D61-AE80-4939-8AB7-53F51782C3BF/MAIN.ASSETS/GR4.JPG>.
- (13) Gros Lambert, J.; Prokhorova, E.; Ahel, I. ADP-Ribosylation of DNA and RNA. *DNA Repair (Amst)* **2021**, *105*, 103144. <https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2021.103144>.
- (14) Richard, I. A.; Burgess, J. T.; O’Byrne, K. J.; Bolderson, E. Beyond PARP1: The Potential of Other Members of the Poly (ADP-Ribose) Polymerase Family in DNA Repair and Cancer Therapeutics. *Front Cell Dev Biol* **2022**, *9*, 801200. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.801200/BIBTEX>.
- (15) Aravind, L.; Zhang, D.; De Souza, R. F.; Anand, S.; Iyer, L. M. The Natural History of ADP-Ribosyltransferases and the ADP-Ribosylation System. *Curr Top Microbiol Immunol* **2015**, *384*, 3–32. https://doi.org/10.1007/82_2014_414.
- (16) Li, P.; Lei, Y.; Qi, J.; Liu, W.; Yao, K. Functional Roles of ADP-Ribosylation Writers, Readers and Erasers. *Front Cell Dev Biol* **2022**, *10*, 941356. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2022.941356/XML/NLM>.
- (17) Ray Chaudhuri, A.; Nussenzweig, A. The Multifaceted Roles of PARP1 in DNA Repair and Chromatin Remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2017**, *18* (10), 610. <https://doi.org/10.1038/NRM.2017.53>.
- (18) Vyas, S.; Chesarone-Cataldo, M.; Todorova, T.; Huang, Y. H.; Chang, P. A Systematic Analysis of the PARP Protein Family Identifies New Functions Critical for Cell Physiology. *Nature Communications* **2013**, *4* (1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/ncomms3240>.

-
- (19) Alemasova, E. E.; Lavrik, O. I. Poly(ADP-Ribosyl)ation by PARP1: Reaction Mechanism and Regulatory Proteins. *Nucleic Acids Res* **2019**, *47* (8), 3811. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKZ120>.
- (20) Karlberg, T.; Langelier, M. F.; Pascal, J. M.; Schüler, H. Structural Biology of the Writers, Readers, and Erasers in Mono- and Poly(ADP-Ribose) Mediated Signaling. *Mol Aspects Med* **2013**, *34* (6), 1088. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2013.02.002>.
- (21) O’Sullivan, J.; Tedim Ferreira, M.; Gagné, J. P.; Sharma, A. K.; Hendzel, M. J.; Masson, J. Y.; Poirier, G. G. Emerging Roles of Eraser Enzymes in the Dynamic Control of Protein ADP-Ribosylation. *Nature Communications* **2019**, *10*:1 **2019**, *10* (1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08859-x>.
- (22) Cohen, M. S.; Chang, P. Insights into the Biogenesis, Function, and Regulation of ADP-Ribosylation. *Nature Chemical Biology* **2018**, *14*:3 **2018**, *14* (3), 236–243. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2568>.
- (23) Liu, C.; Vyas, A.; Kassab, M. A.; Singh, A. K.; Yu, X. The Role of Poly ADP-Ribosylation in the First Wave of DNA Damage Response. *Nucleic Acids Res* **2017**, *45* (14), 8129. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKX565>.
- (24) Rouleau-Turcotte, É.; Pascal, J. M. ADP-Ribose Contributions to Genome Stability and PARP Enzyme Trapping on Sites of DNA Damage; Paradigm Shifts for a Coming-of-Age Modification. *Journal of Biological Chemistry* **2023**, *299* (12). <https://doi.org/10.1016/J.JBC.2023.105397/ASSET/4957B1B5-517A-4A77-B8B5-71C3C8BDB242/MAIN.ASSETS/GR3.JPG>.
- (25) Duma, L.; Ahel, I. The Function and Regulation of ADP-Ribosylation in the DNA Damage Response. *Biochem Soc Trans* **2023**, *51* (3), 995–1008. <https://doi.org/10.1042/BST20220749>.
- (26) Pandey, N.; Black, B. E. Rapid Detection and Signaling of DNA Damage by PARP-1. *Trends Biochem Sci* **2021**, *46* (9), 744–757. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2021.01.014/ASSET/813AE6C9-14B0-45DA-A24D-1C544FF06B63/MAIN.ASSETS/GR3.SML>.
- (27) Boehler, C.; Gauthier, L.; Yelamos, J.; Noll, A.; Schreiber, V.; Dantzer, F. Phenotypic Characterization of Parp-1 and Parp-2 Deficient Mice and Cells. *Methods Mol Biol* **2011**, *780*, 313–336. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-270-0_19.

- (28) Citarelli, M.; Teotia, S.; Lamb, R. S. Evolutionary History of the Poly(ADP-Ribose) Polymerase Gene Family in Eukaryotes. *BMC Evol Biol* **2010**, *10* (1), 1–26. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-308/FIGURES/12>.
- (29) *Protozoa: Structure, Classification, Growth, and Development - PubMed*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21413323/> (accessed 2025-04-19).
- (30) Saari, S.; Näreaho, A.; Nikander, S. Protozoa. In *Canine Parasites and Parasitic Diseases*; Elsevier, 2019; pp 5–34. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814112-0.00002-7>.
- (31) Finlay, B. J.; Esteban, G. F. Protozoa. *Encyclopedia of Biodiversity: Second Edition* **2013**, 286–297. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384719-5.00118-0>.
- (32) Bogitsh, B. J.; Carter, C. E.; Oeltmann, T. N. Human Parasitology, Fourth Edition. *Human Parasitology, Fourth Edition* **2012**, 1–430. <https://doi.org/10.1016/C2010-0-65681-1>.
- (33) Andrews, K. T.; Fisher, G.; Skinner-Adams, T. S. Drug Repurposing and Human Parasitic Protozoan Diseases. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* **2014**, *4* (2), 95–111. <https://doi.org/10.1016/J.IJPDDR.2014.02.002>.
- (34) Monzote, L.; Siddiq, A. Drug Development to Protozoan Diseases. *Open Med Chem J* **2011**, *5*, 1. <https://doi.org/10.2174/1874104501105010001>.
- (35) Kaufer, A.; Ellis, J.; Stark, D.; Barratt, J. The Evolution of Trypanosomatid Taxonomy. *Parasites & Vectors* **2017**, *10* (1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/S13071-017-2204-7>.
- (36) Salgado-Almario, J.; Hernández, C. A.; Ovalle-Bracho, C. Distribución Geográfica de Las Especies de Leishmania En Colombia, 1985-2017. *Biomédica* **2019**, *39* (2), 278–290. <https://doi.org/10.7705/BIOMEDICA.V39I3.4312>.
- (37) Burza, S.; Croft, S. L.; Boelaert, M. Leishmaniasis. *Lancet* **2018**, *392* (10151), 951–970. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2).
- (38) Podestá, D.; García-Herreros, M. I.; Cannata, J. J. B.; Stoppani, A. O. M.; Fernández Villamil, S. H. Purification and Properties of Poly(ADP-Ribose) Polymerase from *Crithidia Fasciculata*: Automodification and Poly(ADP-Ribosyl)ation of DNA Topoisomerase I. *Mol Biochem Parasitol* **2004**, *135* (2), 211–219. <https://doi.org/10.1016/J.MOLBIOPARA.2004.02.005>.

- (39) Fernández Villamil, S. H.; Baltanás, R.; Alonso, G. D.; Vilchez Larrea, S. C.; Torres, H. N.; Flawiá, M. M. TcPARP: A DNA Damage-Dependent Poly(ADP-Ribose) Polymerase from *Trypanosoma Cruzi*. *Int J Parasitol* **2008**, *38* (3–4), 277–287. <https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2007.08.003>.
- (40) Vilchez Larrea, S. C.; Haikarainen, T.; Narwal, M.; Schlesinger, M.; Venkannagari, H.; Flawiá, M. M.; Villamil, S. H. F.; Lehtiö, L. Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Interferes with *Trypanosoma Cruzi* Infection and Proliferation of the Parasite. *PLoS One* **2012**, *7* (9), e46063. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0046063>.
- (41) Leung, L.; Fehr, A.; Abraham, R.; Dowling, J.; Doig, C. L. Roles of ADP-Ribosylation during Infection Establishment by Trypanosomatidae Parasites. *Pathogens* **2023**, *Vol. 12*, Page 708 **2023**, *12* (5), 708. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS12050708>.
- (42) Haikarainen, T.; Lehtiö, L. Proximal ADP-Ribose Hydrolysis in Trypanosomatids Is Catalyzed by a Macrodomein. *Scientific Reports* **2016** *6:1* **2016**, *6* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep24213>.
- (43) Taylor, D. R.; Williams, G. T. *Leishmania Mexicana Amazonensis*: ADP-Ribosyltransferase Antagonists Specifically Inhibit Amastigote to Promastigote Differentiation. *Exp Parasitol* **1988**, *66* (2), 189–196. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(88\)90090-2](https://doi.org/10.1016/0014-4894(88)90090-2).
- (44) Das, M.; Mukherjee, S. B.; Shaha, C. Hydrogen Peroxide Induces Apoptosis-like Death in *Leishmania Donovanii* Promastigotes. *J Cell Sci* **2001**, *114* (Pt 13), 2461–2469. <https://doi.org/10.1242/JCS.114.13.2461>.
- (45) Verma, N. K.; Dey, C. S. Possible Mechanism of Miltefosine-Mediated Death of *Leishmania Donovanii*. *Antimicrob Agents Chemother* **2004**, *48* (8), 3010–3015. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.8.3010-3015.2004>.
- (46) Ardestani, S. K.; Poorrajab, F.; Razmi, S.; Foroumadi, A.; Ajdary, S.; Gharegozlou, B.; Behrouzi-Fardmoghdam, M.; Shafiee, A. Cell Death Features Induced in *Leishmania Major* by 1,3,4-Thiadiazole Derivatives. *Exp Parasitol* **2012**, *132* (2), 116–122. <https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2012.06.002>.
- (47) Sen, N.; Das, B. B.; Ganguly, A.; Mukherjee, T.; Tripathi, G.; Bandyopadhyay, S.; Rakshit, S.; Sen, T.; Majumder, H. K. Camptothecin Induced Mitochondrial Dysfunction Leading to Programmed Cell Death in Unicellular Hemoflagellate

- (57) *pGEM[®]-T Vector Systems | T Vector Cloning*.
<https://worldwide.promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-vector-systems/?catNum=A3600> (accessed 2025-04-19).
- (58) *Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) Molecular Cloning A Laboratory Manual. 3rd Edition, Vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. - References - Scientific Research Publishing*.
<https://www.scirp.org/reference/ReferencesPapers?ReferenceID=1765722> (accessed 2025-04-19).
- (59) Engebrecht, J.; Brent, R.; Kaderbhai, M. A. Minipreps of Plasmid DNA. *Curr Protoc Mol Biol* **2001**, Chapter 1 (1).
<https://doi.org/10.1002/0471142727.MB0106S15>.
- (60) *BamHI (10 U/μL)*.
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ER0051> (accessed 2025-04-19).
- (61) *HindIII (10 U/μL)*. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ER0501> (accessed 2025-04-19).
- (62) *The QIAexpressionist - (EN) - QIAGEN*.
<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=79ca2f7d-42fe-4d62-8676-4cfa948c9435&lang=en> (accessed 2025-04-19).
- (63) Prasad, S.; Khadatare, P. B.; Roy, I. Effect of Chemical Chaperones in Improving the Solubility of Recombinant Proteins in Escherichia Coli. *Appl Environ Microbiol* **2011**, 77 (13), 4603–4609. https://doi.org/10.1128/AEM.05259-11/SUPPL_FILE/REPLACEMENT__SUPPLEMENTAL_FILE.PDF.
- (64) Schägger, H. Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* **2006**, 1 (1), 16–22.
<https://doi.org/10.1038/NPROT.2006.4>.
- (65) Mahmood, T.; Yang, P. C. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *N Am J Med Sci* **2012**, 4 (9), 429–434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>.
- (66) Palmer, I.; Wingfield, P. T. Preparation and Extraction of Insoluble (Inclusion-Body) Proteins from Escherichia Coli. *Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.]* **2012**, 0 6 (SUPPL.70), 10.1002/0471140864.ps0603s70.
<https://doi.org/10.1002/0471140864.PS0603S70>.

- (67) *Purification of Polyhistidine-Containing Recombinant Proteins with Ni-NTA Purification System* | Thermo Fisher Scientific - CO. <https://www.thermofisher.com/co/en/home/references/protocols/proteins-expression-isolation-and-analysis/protein-purification-protocol/purification-of-polyhistidine-containing-recombinant-proteins-with-ni-nta-purification-system.html> (accessed 2025-04-19).
- (68) Haikarainen, T.; Schlesinger, M.; Obaji, E.; Fernández Villamil, S. H.; Lehtiö, L. Structural and Biochemical Characterization of Poly-ADP-Ribose Polymerase from *Trypanosoma Brucei*. *Scientific Reports* 2017 7:1 **2017**, 7 (1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03751-4>.
- (69) Langelier, M. F.; Steffen, J. D.; Riccio, A. A.; McCauley, M.; Pascal, J. M. Purification of DNA Damage-Dependent PARPs from *E. Coli* for Structural and Biochemical Analysis. *Methods in Molecular Biology* **2017**, 1608, 431–444. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6993-7_27.
- (70) Nikiforov, A.; Dölle, C.; Niere, M.; Ziegler, M. Pathways and Subcellular Compartmentation of NAD Biosynthesis in Human Cells: From Entry of Extracellular Precursors to Mitochondrial NAD Generation. *J Biol Chem* **2011**, 286 (24), 21767–21778. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.213298>.
- (71) Alegria-Schaffer, A. Western Blotting Using Chemiluminescent Substrates. *Methods Enzymol* **2014**, 541, 251–259. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00019-7>.
- (72) *Platinum SuperFi II DNA Polymerase-High Fidelity PCR Enzyme* | Thermo Fisher Scientific - CO. https://www.thermofisher.com/co/en/home/life-science/pcr/pcr-enzymes-master-mixes/platinum-high-fidelity-pcr-enzyme.html?ef_id=EAlalQobChMlivysponojAMVPahaBR2V_STDEAAYASAAEgLCp_D_BwE:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!558936143454!e!!g!!platinum%20superfi%20dna%20polymerase!11329799882!107921850861&cid=bid_mol_pch_r01_co_cp1358_pjt0000_bid00000_0se_gaw_bt_pur_con&gad_source=1&gbraid=0AAAAADxi_GTldDV6BynoeboiUL4we8gj&gclid=EAlalQobChMlivysponojAMVPahaBR2V_STDEAAYASAAEgLCp_D_BwE (accessed 2025-04-19).
- (73) *Sistema QIAEX II* | Purificación ADN en gel agarosa | QIAGEN. <https://www.qiagen.com/es-es/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/dna-clean-up/qiaex-ii-system> (accessed 2025-04-19).

- (74) *T4 Polynucleotide Kinase* | NEB. <https://www.neb.com/en/products/m0201-t4-polynucleotide-kinase?srsltid=AfmBOorOvyJ58Wg4CWgAx0J1ipwoGAYsztHO4rfgch2e-nTQui-Kt6uX> (accessed 2025-04-19).
- (75) Doherty, A. J.; Suh, S. W. Structural and Mechanistic Conservation in DNA Ligases. *Nucleic Acids Res* **2000**, *28* (21), 4051. <https://doi.org/10.1093/NAR/28.21.4051>.
- (76) *Sall* (10 U/ μ L). <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ER0641> (accessed 2025-04-19).
- (77) *PstI* (10 U/ μ L). <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ER0611> (accessed 2025-04-19).
- (78) *Plasmid purification—miniprep kits*. <https://www.takarabio.com/products/nucleic-acid-purification/plasmid-purification-kits/miniprep?srsltid=AfmBOooRglNjXL-5dRDxQUWzvjzL5f6L-3Tl5sZLmGXJ2cEqb132IFq> (accessed 2025-04-19).
- (79) *Maxipreps for plasmid DNA purification—NucleoBond Xtra Maxi/Maxi Plus*. https://www.takarabio.com/products/nucleic-acid-purification/plasmid-purification-kits/maxiprep/nucleobond-xtra?srsltid=AfmBOorEYJGdQD9CVYtnHn6Y3BlaeXcoQhLAGuDR_84rw4qnhbmFEgae (accessed 2025-04-19).
- (80) VanLinden, M. R.; Niere, M.; Nikiforov, A. A.; Ziegler, M.; Dölle, C. Compartment-Specific Poly-ADP-Ribose Formation as a Biosensor for Subcellular NAD Pools. *Methods Mol Biol* **2017**, *1608*, 45–56. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6993-7_4.
- (81) *X-tremeGENETM HP DNA Transfection Reagent Protocol*. https://www.sigmaaldrich.com/CO/en/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/transfection-and-gene-editing/xtghp-general-protocol?srsltid=AfmBOoqWwm3rFWid7cLWq9GKV_YNb-cVwIYaTtgxYaFfbaDzmgYZJa6f (accessed 2025-04-19).
- (82) Shubach, L. M. J.; Rodríguez, L. E. C.; Castañeda, J. E. G.; Hernández, M. H. R.; Shubach, L. M. J.; Rodríguez, L. E. C.; Castañeda, J. E. G.; Hernández, M. H. R. Functional Identification and Subcellular Localization of NAD Kinase in the Protozoan Parasite *Giardia Intestinalis*. *Revista Colombiana de Química* **2019**, *48* (1), 16–25. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v48n1.75273>.

- (83) *Making and Using Antibodies: A Practical Handbook, Second Edition* - Google Libros.
https://books.google.com.co/books?id=AfnRBQAAQBAJ&pgis=1&redir_esc=y
(accessed 2025-04-20).
- (84) 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**, No. 51. <https://doi.org/10.3791/3084>.
- (85) Guilmineau, F.; Krause, I.; Kulozik, U. Efficient Analysis of Egg Yolk Proteins and Their Thermal Sensitivity Using Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis under Reducing and Nonreducing Conditions. *J Agric Food Chem* **2005**, 53 (24), 9329–9336. <https://doi.org/10.1021/JF050475F>.
- (86) Kohl, T. O.; Ascoli, C. A. Immunometric Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Cold Spring Harb Protoc* **2017**, 2017 (6), 450–457. <https://doi.org/10.1101/PDB.PROT093716>.
- (87) Moreno-González, P. A.; Diaz, G. J.; Ramírez-Hernández, M. H. Producción y Purificación de Anticuerpos Aviares (IgYs) a Partir de Cuerpos de Inclusión de Una Proteína Recombinante Central En El Metabolismo Del NAD⁺. *Revista Colombiana de Química* **2013**, 42 (2), 12–20.
- (88) Magi, B.; Liberatori, S. Immunoblotting Techniques. *Methods Mol Biol* **2005**, 295, 227–254. <https://doi.org/10.1385/1-59259-873-0:227>.
- (89) van Kempen, M.; Kim, S. S.; Tumescheit, C.; Mirdita, M.; Lee, J.; Gilchrist, C. L. M.; Söding, J.; Steinegger, M. Fast and Accurate Protein Structure Search with Foldseek. *Nature Biotechnology* **2023**, 42 (2), 243–246. <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01773-0>.
- (90) Abramson, J.; Adler, J.; Dunger, J.; Evans, R.; Green, T.; Pritzel, A.; Ronneberger, O.; Willmore, L.; Ballard, A. J.; Bambrick, J.; Bodenstein, S. W.; Evans, D. A.; Hung, C. C.; O'Neill, M.; Reiman, D.; Tunyasuvunakool, K.; Wu, Z.; Žemgulytė, A.; Arvaniti, E.; Beattie, C.; Bertolli, O.; Bridgland, A.; Cherepanov, A.; Congreve, M.; Cowen-Rivers, A. I.; Cowie, A.; Figurnov, M.; Fuchs, F. B.; Gladman, H.; Jain, R.; Khan, Y. A.; Low, C. M. R.; Perlin, K.; Potapenko, A.; Savy, P.; Singh, S.; Stecula, A.; Thillaisundaram, A.; Tong, C.; Yakneen, S.; Zhong, E. D.; Zielinski, M.; Žídek, A.; Bapst, V.; Kohli, P.; Jaderberg, M.; Hassabis, D.; Jumper, J. M. Accurate Structure Prediction of Biomolecular Interactions with AlphaFold 3. *Nature* **2024**, 630 (8016), 493–500. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>.

- (91) Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Meng, E. C.; Couch, G. S.; Croll, T. I.; Morris, J. H.; Ferrin, T. E. UCSF ChimeraX: Structure Visualization for Researchers, Educators, and Developers. *Protein Science* **2021**, *30* (1), 70–82. <https://doi.org/10.1002/PRO.3943>.
- (92) Wilkins, M. R.; Gasteiger, E.; Bairoch, A.; Sanchez, J. C.; Williams, K. L.; Appel, R. D.; Hochstrasser, D. F. Protein Identification and Analysis Tools in the ExpASY Server. *Methods Mol Biol* **1999**, *112*, 531–552. <https://doi.org/10.1385/1-59259-584-7:531>.
- (93) Blom, N.; Gammeltoft, S.; Brunak, S. Sequence and Structure-Based Prediction of Eukaryotic Protein Phosphorylation Sites. *J Mol Biol* **1999**, *294* (5), 1351–1362. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3310>.
- (94) Zhao, Q.; Xie, Y.; Zheng, Y.; Jiang, S.; Liu, W.; Mu, W.; Liu, Z.; Zhao, Y.; Xue, Y.; Ren, J. GPS-SUMO: A Tool for the Prediction of Sumoylation Sites and SUMO-Interaction Motifs. *Nucleic Acids Res* **2014**, *42* (W1), W325–W330. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKU383>.
- (95) Wang, D.; Liu, D.; Yuchi, J.; He, F.; Jiang, Y.; Cai, S.; Li, J.; Xu, D. MusiteDeep: A Deep-Learning Based Webserver for Protein Post-Translational Modification Site Prediction and Visualization. *Nucleic Acids Res* **2020**, *48* (W1), W140–W146. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA275>.
- (96) Bhatwa, A.; Wang, W.; Hassan, Y. I.; Abraham, N.; Li, X. Z.; Zhou, T. Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in Escherichia Coli and Strategies to Address Them for Industrial Applications. *Front Bioeng Biotechnol* **2021**, *9*, 630551. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2021.630551/XML/NLM>.
- (97) Ooi, S. K.; Sato, S.; Tomomori-Sato, C.; Zhang, Y.; Wen, Z.; Banks, C. A. S.; Washburn, M. P.; Unruh, J. R.; Florens, L.; Conaway, R. C.; Conaway, J. W. Multiple Roles for PARP1 in ALC1-Dependent Nucleosome Remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2021**, *118* (36), e2107277118. https://doi.org/10.1073/PNAS.2107277118/SUPPL_FILE/PNAS.2107277118.SD01.XLSX.
- (98) Miranda, E. A.; Dantzer, F.; O’Farrell, M.; de Murcia, G.; De Murcia, J. M. Characterization of a Gain-of-Function Mutant of Poly(ADP-Ribose) Polymerase. *Biochem Biophys Res Commun* **1995**, *212* (2), 317–325. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1972>.

-
- (99) Hopp, A.-K.; Hottiger, M. O.; Hopp, A.-K. ;; Hottiger, M. O. Uncovering the Invisible: Mono-ADP-Ribosylation Moved into the Spotlight. *Cells* **2021**, Vol. 10, Page 680 **2021**, 10 (3), 680. <https://doi.org/10.3390/CELLS10030680>.
- (100) Rosano, G. L.; Ceccarelli, E. A. Rare Codon Content Affects the Solubility of Recombinant Proteins in a Codon Bias-Adjusted Escherichia Coli Strain. *Microb Cell Fact* **2009**, 8 (1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-41/FIGURES/5>.
- (101) Liu, Y.; Yang, Q.; Zhao, F. Synonymous but Not Silent: The Codon Usage Code for Gene Expression and Protein Folding. *Annu Rev Biochem* **2021**, 90, 375–401. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-071320-112701>.
- (102) Daniel, E.; Onwukwe, G. U.; Wierenga, R. K.; Quaggin, S. E.; Vainio, S. J.; Krause, M. ATGme: Open-Source Web Application for Rare Codon Identification and Custom DNA Sequence Optimization. *BMC Bioinformatics* **2015**, 16 (1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/S12859-015-0743-5/FIGURES/2>.
- (103) Enhanced Protein Coexpression in E. Coli. **2003**.
- (104) Steitz, T. A. The Structural Changes of T7 RNA Polymerase from Transcription Initiation to Elongation. *Curr Opin Struct Biol* **2009**, 19 (6), 683–690. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2009.09.001>.
- (105) Gentz, R.; Bujard, H. Promoters Recognized by Escherichia Coli RNA Polymerase Selected by Function: Highly Efficient Promoters from Bacteriophage T5. *J Bacteriol* **1985**, 164 (1), 70–77. <https://doi.org/10.1128/JB.164.1.70-77.1985>.
- (106) Studier, F. W.; Moffatt, B. A. Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-Level Expression of Cloned Genes. *J Mol Biol* **1986**, 189 (1), 113–130. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2).
- (107) Singh, U.; Deb, D.; Singh, A.; Grover, A. Glycine-Rich RNA Binding Protein of Oryza Sativa Inhibits Growth of M15 E. Coli Cells. *BMC Res Notes* **2011**, 4 (1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-18/FIGURES/4>.
- (108) Kong, B.; Guo, G. L. Soluble Expression of Disulfide Bond Containing Proteins FGF15 and FGF19 in the Cytoplasm of Escherichia Coli. *PLoS One* **2014**, 9 (1), e85890. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0085890>.
- (109) Auton, M.; Rösger, J.; Sinev, M.; Holthausen, L. M. F.; Bolen, D. W. Osmolyte Effects on Protein Stability and Solubility: A Balancing Act between Backbone

- and Side-Chains. *Biophys Chem* **2011**, 159 (1), 90–99.
<https://doi.org/10.1016/J.BPC.2011.05.012>.
- (110) Bolen, D. W. Protein Stabilization by Naturally Occurring Osmolytes. *Methods Mol Biol* **2001**, 168, 17–36. <https://doi.org/10.1385/1-59259-193-0:017>.
- (111) Kumar, R. Role of Naturally Occurring Osmolytes in Protein Folding and Stability. *Arch Biochem Biophys* **2009**, 491 (1–2), 1–6.
<https://doi.org/10.1016/J.ABB.2009.09.007>.
- (112) Singh, A.; Upadhyay, V.; Upadhyay, A. K.; Singh, S. M.; Panda, A. K. Protein Recovery from Inclusion Bodies of Escherichia Coli Using Mild Solubilization Process. *Microb Cell Fact* **2015**, 14 (1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S12934-015-0222-8/TABLES/3>.
- (113) Hart, R. A.; Rinas, U.; Bailey, J. E. Protein Composition of Vitreoscilla Hemoglobin Inclusion Bodies Produced in Escherichia Coli. *Journal of Biological Chemistry* **1990**, 265 (21), 12728–12733.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)38405-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)38405-4).
- (114) Singh, S. M.; Panda, A. K. Solubilization and Refolding of Bacterial Inclusion Body Proteins. *J Biosci Bioeng* **2005**, 99 (4), 303–310.
<https://doi.org/10.1263/JBB.99.303>.
- (115) Bolanos-Garcia, V. M.; Davies, O. R. Structural Analysis and Classification of Native Proteins from E. Coli Commonly Co-Purified by Immobilised Metal Affinity Chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2006**, 1760 (9), 1304–1313.
<https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2006.03.027>.
- (116) Villamil-Silva, S. E.; Ortiz-Joya, L. J.; Contreras-Rodriguez, L. E.; Díaz, G. J.; Ramírez-Hernández, M. H.; Villamil-Silva, S. E.; Ortiz-Joya, L. J.; Contreras-Rodriguez, L. E.; Díaz, G. J.; Ramírez-Hernández, M. H. Identificación de Una Triparedoxina Peroxidasa Citoplasmática En Leishmania Braziliensis. *Revista Colombiana de Química* **2021**, 50 (2), 3–14.
<https://doi.org/10.15446/REV.COLOMB.QUIM.V50N2.91721>.
- (117) Hebditch, M.; Carballo-Amador, M. A.; Charonis, S.; Curtis, R.; Warwicker, J. Protein–Sol: A Web Tool for Predicting Protein Solubility from Sequence. *Bioinformatics* **2017**, 33 (19), 3098.
<https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTX345>.

- (118) Zhou, M.; Guo, J.; Cha, J.; Chae, M.; Chen, S.; Barral, J. M.; Sachs, M. S.; Liu, Y. Non-Optimal Codon Usage Affects Expression, Structure and Function of Clock Protein FRQ. *Nature* **2013**, *495* (7439), 111–115. <https://doi.org/10.1038/nature11833>.
- (119) Zhang, G.; Ignatova, Z. Folding at the Birth of the Nascent Chain: Coordinating Translation with Co-Translational Folding. *Curr Opin Struct Biol* **2011**, *21* (1), 25–31. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2010.10.008>.
- (120) Bornhorst, J. A.; Falke, J. J. Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. *Methods Enzymol* **2000**, *326*, 245–254. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)26058-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)26058-8).
- (121) Langelier, M. F.; Planck, J. L.; Servent, K. M.; Pascal, J. M. Purification of Human PARP-1 and PARP-1 Domains from Escherichia Coli for Structural and Biochemical Analysis. *Methods in Molecular Biology* **2011**, *780*, 209–226. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-270-0_13.
- (122) Green, M. R.; Sambrook, J. Screening Bacterial Colonies Using X-Gal and IPTG: α -Complementation. *Cold Spring Harb Protoc* **2019**, *2019* (12), 790–794. <https://doi.org/10.1101/PDB.PROT101329>.
- (123) Challa, S.; Ryu, K. W.; Whitaker, A. L.; Abshier, J. C.; Camacho, C. V.; Kraus, W. L. Development and Characterization of New Tools for Detecting Poly(ADP-Ribose) in Vitro and in Vivo. *Elife* **2022**, *11*. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.72464>.
- (124) Simonin, F.; Briand, J. P.; Muller, S.; de Murcia, G. Detection of Poly(ADP Ribose) Polymerase in Crude Extracts by Activity-Blot. *Anal Biochem* **1991**, *195* (2), 226–231. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(91\)90321-J](https://doi.org/10.1016/0003-2697(91)90321-J).
- (125) Gagnon, S. N.; Desnoyers, S. Single Amino Acid Substitution Enhances Bacterial Expression of PARP-1D214A. *Mol Cell Biochem* **2003**, *243* (1–2), 15–22. <https://doi.org/10.1023/A:1021645327079/METRICS>.
- (126) Li, Y. R.; Liu, M. J. Prevalence of Alternative AUG and Non-AUG Translation Initiators and Their Regulatory Effects across Plants. *Genome Res* **2020**, *30* (10), 1418–1433. <https://doi.org/10.1101/GR.261834.120/-/DC1>.
- (127) Navas, L. E.; Carnero, A. NAD⁺ Metabolism, Stemness, the Immune Response, and Cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2021**, *6* (1), 1–20. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00354-w>.

- (128) Niere, M.; Mashimo, M.; Agledal, L.; Dölle, C.; Kasamatsu, A.; Kato, J.; Moss, J.; Ziegler, M. ADP-Ribosylhydrolase 3 (ARH3), Not Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase (PARG) Isoforms, Is Responsible for Degradation of Mitochondrial Matrix-Associated Poly(ADP-Ribose). *J Biol Chem* **2012**, *287* (20), 16088–16102. <https://doi.org/10.1074/JBC.M112.349183>.
- (129) Butash, K. A.; Natarajan, P.; Young, A.; Fox, D. K. Reexamination of the Effect of Endotoxin on Cell Proliferation and Transfection Efficiency. *Biotechniques* **2000**, *29* (3), 610–619. <https://doi.org/10.2144/00293RR04>.
- (130) Chong, Z. X.; Yeap, S. K.; Ho, W. Y. Transfection Types, Methods and Strategies: A Technical Review. *PeerJ* **2021**, *9*, e11165. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.11165/SUPP-1>.
- (131) Xiong, L.; Peng, M.; Zhao, M.; Liang, Z. Truncated Expression of a Carboxypeptidase A from Bovine Improves Its Enzymatic Properties and Detoxification Efficiency of Ochratoxin A. *Toxins* **2020**, *Vol. 12*, Page 680 **2020**, *12* (11), 680. <https://doi.org/10.3390/TOXINS12110680>.
- (132) Yu, Y.; Liu, Z.; Yang, M.; Chen, M.; Wei, Z.; Shi, L.; Li, L.; Mou, H. Characterization of Full-Length and Truncated Recombinant κ -Carrageenase Expressed in *Pichia Pastoris*. *Front Microbiol* **2017**, *8* (AUG), 281086. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.01544/BIBTEX>.
- (133) Lee, J. M.; Hammarén, H. M.; Savitski, M. M.; Baek, S. H. Control of Protein Stability by Post-Translational Modifications. *Nature Communications* **2023**, *14:1* **2023**, *14* (1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-35795-8>.
- (134) Kun, E.; Kirsten, E.; Mendeleyev, J.; Ordahl, C. P. Regulation of the Enzymatic Catalysis of Poly(ADP-Ribose) Polymerase by DsDNA, Polyamines, Mg²⁺, Ca²⁺, Histones H1 and H3, and ATP \dagger . *Biochemistry* **2003**, *43* (1), 210–216. <https://doi.org/10.1021/BI0301791>.
- (135) Qin, H. R.; Kim, H. J.; Kim, J. Y.; Hurt, E. M.; Klarmann, G. J.; Kawasaki, B. T.; Duhagon Serrat, M. A.; Farrar, W. L. Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 through a Phosphomimetic Serine 727 Promotes Prostate Tumorigenesis Independent of Tyrosine 705 Phosphorylation. *Cancer Res* **2008**, *68* (19), 7736–7741. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1125>.
- (136) Karachaliou, C.-E.; Vassilakopoulou, V.; Livaniou, E. IgY Technology: Methods for Developing and Evaluating Avian Immunoglobulins for the in Vitro Detection

- of Biomolecules. *World J Methodol* **2021**, *11* (5), 243–262.
<https://doi.org/10.5662/WJM.V11.I5.243>.
- (137) Yamamura, J. ichi; Adachi, T.; Aoki, N.; Nakajima, H.; Nakamura, R.; Matsuda, T. Precursor-Product Relationship between Chicken Vitellogenin and the Yolk Proteins: The 40 KDa Yolk Plasma Glycoprotein Is Derived from the C-Terminal Cysteine-Rich Domain of Vitellogenin II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1995**, *1244* (2–3), 384–394. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(95\)00033-8](https://doi.org/10.1016/0304-4165(95)00033-8).
- (138) Szépfalusi, Z.; Ebner, C.; Pandjaitan, R.; Orlicek, F.; Scheiner, O.; Boltz-Nitulescu, G.; Kraft, D.; Ebner, H. Egg Yolk Alpha-Livetin (Chicken Serum Albumin) Is a Cross-Reactive Allergen in the Bird-Egg Syndrome. *J Allergy Clin Immunol* **1994**, *93* (5), 932–942. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(94\)90388-3](https://doi.org/10.1016/0091-6749(94)90388-3).
- (139) Pacheco, B. L. B.; Nogueira, C. P.; Venancio, E. J. IgY Antibodies from Birds: A Review on Affinity and Avidity. *Animals* **2023**, *Vol. 13*, Page 3130 **2023**, *13* (19), 3130. <https://doi.org/10.3390/ANI13193130>.
- (140) Schlesinger, M.; Vilchez Larrea, S. C.; Haikarainen, T.; Narwal, M.; Venkannagari, H.; Flawiá, M. M.; Lehtiö, L.; Fernández Villamil, S. H. Disrupted ADP-Ribose Metabolism with Nuclear Poly (ADP-Ribose) Accumulation Leads to Different Cell Death Pathways in Presence of Hydrogen Peroxide in Procyclic Trypanosoma Brucei. *Parasit Vectors* **2016**, *9* (1), 1–15.
<https://doi.org/10.1186/S13071-016-1461-1/FIGURES/6>.
- (141) Fernández Villamil, S. H.; Vilchez Larrea, S. C. Poly(ADP-Ribose) Metabolism in Human Parasitic Protozoa. *Acta Trop* **2020**, *208*, 105499.
<https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2020.105499>.
- (142) Lee, J. H.; Hussain, M.; Kim, E. W.; Cheng, S. J.; Leung, A. K. L.; Fakouri, N. B.; Croteau, D. L.; Bohr, V. A. Mitochondrial PARP1 Regulates NAD⁺-Dependent Poly ADP-Ribosylation of Mitochondrial Nucleoids. *Experimental & Molecular Medicine* **2022**, *54* (12), 2135–2147. <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00894-x>.
- (143) Genois, M. M.; Mukherjee, A.; Ubeda, J. M.; Buisson, R.; Paquet, E.; Roy, G.; Plourde, M.; Coulombe, Y.; Ouellette, M.; Masson, J. Y. Interactions between BRCA2 and RAD51 for Promoting Homologous Recombination in Leishmania Infantum. *Nucleic Acids Res* **2012**, *40* (14), 6570–6584.
<https://doi.org/10.1093/NAR/GKS306>.

- (144) Das, A.; Dasgupta, A.; Sharma, S.; Ghosh, M.; Sengupta, T.; Bandopadhyay, S.; Majumder, H. K. Characterisation of the Gene Encoding Type II DNA Topoisomerase from *Leishmania Donovanii*: A Key Molecular Target in Antileishmanial Therapy. *Nucleic Acids Res* **2001**, *29* (9), 1844–1851. <https://doi.org/10.1093/NAR/29.9.1844>.
- (145) Steinegger, M.; Söding, J. MMseqs2 Enables Sensitive Protein Sequence Searching for the Analysis of Massive Data Sets. *Nature Biotechnology* **2017**, *35* (11), 1026–1028. <https://doi.org/10.1038/nbt.3988>.
- (146) Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O.; Tunyasuvunakool, K.; Bates, R.; Žídek, A.; Potapenko, A.; Bridgland, A.; Meyer, C.; Kohl, S. A. A.; Ballard, A. J.; Cowie, A.; Romera-Paredes, B.; Nikolov, S.; Jain, R.; Adler, J.; Back, T.; Petersen, S.; Reiman, D.; Clancy, E.; Zielinski, M.; Steinegger, M.; Pacholska, M.; Berghammer, T.; Bodenstein, S.; Silver, D.; Vinyals, O.; Senior, A. W.; Kavukcuoglu, K.; Kohli, P.; Hassabis, D. Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold. *Nature* **2021**, *596* (7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
- (147) Suskiewicz, M. J.; Munnur, D.; Strømland, Ø.; Yang, J. C.; Easton, L. E.; Chatrin, C.; Zhu, K.; Baretić, D.; Goffinont, S.; Schuller, M.; Wu, W. F.; Elkins, J. M.; Ahel, D.; Sanyal, S.; Neuhaus, D.; Ahel, I. Updated Protein Domain Annotation of the PARP Protein Family Sheds New Light on Biological Function. *Nucleic Acids Res* **2023**, *51* (15), 8217–8236. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAD514>.
- (148) Rack, J. G. M.; Perina, D.; Ahel, I. Macrod domains: Structure, Function, Evolution, and Catalytic Activities. *Annu Rev Biochem* **2016**, *85*, 431–454. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-060815-014935>.
- (149) Rack, J. G. M.; Palazzo, L.; Ahel, I. (ADP-Ribosyl)Hydrolases: Structure, Function, and Biology. *Genes Dev* **2020**, *34* (5–6), 263–284. <https://doi.org/10.1101/GAD.334631.119>.
- (150) Larrea, E.; Fernández-Rubio, C.; Peña-Guerrero, J.; Guruceaga, E.; Nguewa, P. A. The BRCT Domain from the Homologue of the Oncogene PES1 in *Leishmania Major* (LmjPES) Promotes Malignancy and Drug Resistance in Mammalian Cells. *Int J Mol Sci* **2022**, *23* (21). <https://doi.org/10.3390/IJMS232113203>.
- (151) Manco, G.; Lacerra, G.; Porzio, E.; Catara, G. ADP-Ribosylation Post-Translational Modification: An Overview with a Focus on RNA Biology and New Pharmacological Perspectives. *Biomolecules* **2022**, *12* (3), 443. <https://doi.org/10.3390/BIOM12030443/S1>.

- (152) Kauppinen, T. M.; Chan, W. Y.; Suh, S. W.; Wiggins, A. K.; Huang, E. J.; Swanson, R. A. Direct Phosphorylation and Regulation of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 by Extracellular Signal-Regulated 1/2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103* (18), 7136–7141.
https://doi.org/10.1073/PNAS.0508606103/SUPPL_FILE/08606FIG7.PDF.
- (153) Piao, L.; Fujioka, K.; Nakakido, M.; Hamamoto, R. Regulation of Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Functions by Post-Translational Modifications. *Frontiers in Bioscience - Landmark* **2018**, *23* (1), 13–26.
<https://doi.org/10.2741/4578/PDF>.
- (154) Bea, A.; Kröber-Boncardo, C.; Sandhu, M.; Brinker, C.; Clos, J. The Leishmania Donovanii SENP Protease Is Required for SUMO Processing but Not for Viability. *Genes* **2020**, *11* (10), 1198.
<https://doi.org/10.3390/GENES11101198>.