UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

LABORATORIO DE ENZIMOLOGÍA DE PARÁSITOS

Análisis *in silico*, docking molecular, expresión, purificación y evaluación de la actividad de la enzima Per-ARNT-Sim fosfogliceratoquinasa (PAS-PGK) recombinante de *Trypanosoma cruzi*

www.bdigital.ula.ve

Trabajo Especial de Grado presentado por

Marirene Chacón Arnaude

Como requisito parcial para optar al título de

Licenciada en Biología

Tutor Dr. Wilfredo Quiñones

Mérida, mayo de 2021

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

A mis padres,

mis pilares y mi alegría

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Wilfredo Quiñones por ser mi guía durante esta investigación, por su apoyo, dedicación, enseñanzas y amistad a lo largo de esta etapa. A los profesores Ana Cáceres y Héctor Acosta por sus consejos y asesorías, por estar dispuestos a aclarar cualquier duda y ayudar en elaboración de este proyecto. A estas tres personas agradezco su enseñanza inspiradora, por contagiarme su pasión por la bioquímica, biología molecular y por la ciencia.

Al profesor Juan Luis Concepción cuya asesoría permitió encaminarme mejor en este lio que es el mundo de la ciencia, por sus recomendaciones que facilitaron la culminación de esta investigación, por ser un gran ejemplo.

A mis compañeros del Laboratorio de Enzimología de Parásitos (LEP) quienes fueron mi segunda familia, por siempre estar dispuestos a compartir sus conocimientos y brindarme su apoyo; en especial Diego Andrade y Mary Carmen Pérez quienes me instruyeron y actuaron como guías en el laboratorio durante toda esta etapa, gracias por siempre estar atentos, por sus sugerencias en todo momento y por tanta paciencia. También agradezco a Mairenis Hernández por sus comentarios siempre pertinentes, a la Sra. Betty cuyo entusiasmo y alegría hace más ameno el trabajo y al profesor Ascanio Rojas quién me brindó su ayuda en los análisis bioinformáticos.

A mis amigos Valeria Chacón, Evelyn Escalona, Alejandro Bonive y Armando Sánchez por estar siempre junto a mí y brindarme su apoyo incondicional, por sus ocurrencias que me hacían reír cuando más lo necesitaba.

A la Universidad de los Andes y la Facultad de Ciencias, de las que siempre me sentiré orgullosa de haber pertenecido.

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

RESUMEN

Los dominios Per-ARNT-Sim (PAS) son estructuras protéicas conservadas que cumplen funciones diversas, en donde se resalta la habilidad de actuar como sensores biológicos y estar involucrados en procesos de señalización. Recientemente en *Trypanosoma cruzi* se ha identificado y caracterizado una isoenzima fosfoglicerato quinasa (PGK) asociada a un dominio PAS denominada PAS-PGK cuyo rol preciso en el parásito aún no ha sido dilucidado, y se ha sugerido que el dominio PAS podría ayudar en las adaptaciones metabólicas que sufre durante su ciclo de vida. En este trabajo se hicieron estudios *in silico* para predecir la estructura tridimensional de la proteína y se evaluó su unión a ligandos mediante acoplamiento molecular utilizando las herramientas bioinformáticas Phyre2, QUARK, RAMPAGE y SwissDock. Adicionalmente, se optimizó la sobreexpresión y purificación de la proteína PAS-PGK recombinante de *T. cruzi*, para luego evaluar su actividad catalítica bajo distintas condiciones. Para esto se utilizó la cepa BL21 DE3 y Rosetta de *Escherichia coli,* en medio TB a 25 ºC, y se probaron varias condiciones de purificación utilizando una columna de afinidad a metales His-Link. Los estudios bioinformáticos indican que la proteína es una PGK clásica unida a un dominio PAS ubicado en la región N-terminal y presenta una interacción favorable a través de este dominio con la glucosa y el FAD^+. Los ensayos experimentales muestran que la proteína PAS-PGK recombinante *T. cruzi* se expresa mayoritariamente en la fracción insoluble en forma de cuerpos de inclusión, el pequeño porcentaje de proteína soluble se logró purificar a homogeneidad saliendo en las fracciones eluidas con concentraciones de 125-150 mM de imidazol. Además, se encontró que la proteína PAS-PGK recombinante de *T. cruzi* no es activa bajo las condiciones evaluadas, por lo que se sugiere realizar estudios con la proteína nativa para hacer la caracterización cinética de la enzima.

Palabras claves: Dominios Per-ARNT-Sim (PAS), fosfoglicerato quinasa (PGK), unión a glucosa, docking molecular, actividad enzimática, *Trypanosoma cruzi*.

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

ABREVIATURAS

1,3BPG	1,3-bifosfoglicerato
3PGA	3-fosfoglicerato
ADH	Alanina deshidrogenasa
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
ARNT	*Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*
ATP	Adenosin trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
CBM	Motivos de unión a carbohidratos
CO_2	Dioxido de carbono
$CoCl_2$	Cloruro de cobalto
D.O	Densidad óptica
DAB	Diaminobenzidina
E. coli	*Escherichia coli*
FAD	Flavina adenina dinucleótido oxidado
FMN	Flavin mononucleótido
FRD	Fumarato reductasa
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
HCl	Ácido clorhídrico
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
HK	Hexoquinasa
IgG	Inmunoglobulina G
IPTG	β-thiolgalactopiranosido
KCl	Cloruro de potasio
kDa	Kilodalton

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

ki	Constante de inhibición
km	Constante de Michaelis-Menten
L. major	*Leishmania major*
LB	Luria Bertani
LmPAS-PGK	PAS-PGK de *Leishmania major*
MDH	Malato deshidrogenasa
$MgSO_4$	Sulfato de magnesio
NaCl	Cloruro de sodio
NAD^+	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
PAS	Per-ARNT-Sim
PASK	PAS quinasa
PBS	Buffer fosfato salino
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
Per	*Period circadian protein*
PGK	Fosfoglicerato quinasa
PGM	Fosfoglicerato mutasa
PK	Piruvato quinasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPDK	Piruvato Fosfato Diquinasa
PYP	*Photoactive yellow protein*
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes
Sim	*Single-Minded protein*
T. cruzi	*Trypanosoma cruzi*

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

TB	*Terrific broth*
TcPAS-PGK	PAS-PGK de *Trypanosoma cruzi*
TEA	Trieatanolamida
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN 1

1. La enfermedad de Chagas 1

1.2. *Trypanosoma cruzi* 1
1.2.1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* 2

1.3. Metabolismo de *Trypanosoma cruzi* 3

1.4. La fosfoglicerato quinasa (PGK) 6
1.4.1. La PGK en *Trypanosoma cruzi* 7

1.5. Los dominios Per-ARNT-Sim (PAS) 9
1.5.1. Estructura y localización 9
1.5.2. Unión a ligandos 11
1.5.3. Los dominios PAS y la PAS-PGK en *Trypanosoma cruzi* 12

2. HIPÓTESIS 16

3. OBJETIVOS 16

3.1. Objetivo general 16

3.2. Objetivos específicos 16

4. METODOLOGÍA 17
4.1. Estudios bioinformáticos 17
4.1.1. Modelado molecular del dominio PAS y PGK y de la proteína PAS-PGK de *T. cruzi* 17
4.1.1.1. Modelado molecular del dominio PAS 17
4.1.1.2. Modelado molecular del dominio PGK 17
4.1.1.3. Modelado molecular de la proteína PAS-PGK 18
4.1.2.1. Estudios de acoplamiento de la glucosa con el dominio PGK y la proteína PAS-PGK de *Trypanosoma cruzi* 18
4.1.2.1. Estudios de acoplamiento entre el FAD^+ y la proteína PAS-PGK completa de *Trypanosoma cruzi* 19
4.2. Análisis de secuencia y alineamientos de la proteína PAS-PGK recombinante de *Trypanosoma cruzi* 19

4.3. Material Biológico 20
4.3.1. *Escherichia coli* (*E. coli*) cepa *Rosetta* 20
4.3.2. *Escherichia coli* (*E. coli*) cepa BL21 (DE3) 20

4.4. Sobreexpresión de la proteína 21
4.4.1. Método de sobreexpresión por autoinducción (Studier, 2005) 21

4.5. Ruptura celular y purificación de la PAS-PGK recombinante de *T. cruzi* 23

4.5.1. Optimización de la ruptura celular y purificación de la PAS-PGK recombinante de *T. cruzi* 24

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

4.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) 27
4.7. Determinación de la concentración de proteínas 27
4.9. Ensayos Enzimáticos 29
4.9.1. Medición de la actividad de la PAS-PGK 29
4.9.2. Determinación de la variación de la actividad con respecto a la concentración de la enzima PAS-PGK recombinante de *T. cruzi* 29
4.9.3. Evaluación de la actividad de la enzima PAS-PGK recombinante de *T. cruzi* 30
4.10. Análisis de datos cinéticos 30
5. RESULTADOS 31
5.1. Estudios bioinformáticos 31
5.1.1. Evaluación de la secuencia aminoacídica de la proteína PAS-PGK de *Trypanosoma cruzi* 31
5.1.2. Modelado del dominio PAS, del dominio PGK y de la proteína PAS-PGK 31
5.1.3. Refinamiento y validación del modelo 34
5.1.4. Estudios de acoplamiento molecular de la glucosa con el dominio PGK y la proteína PAS-PGK completa de *Trypanosoma cruzi* 37
5.1.4.1. Estudios de acoplamiento entre la glucosa y el dominio PGK de la proteína PAS-PGK 37
5.1.4.2. Estudios de acoplamiento entre la glucosa y la proteína PAS-PGK 38
5.1.5. Estudios de acoplamiento entre el FAD^+ y el dominio PAS de la proteína PAS-PGK completa 40
5.1.6. Comparación de la secuencia de la proteína PAS-PGK de *Trypanosoma cruzi* con otras PGKs y análisis de los motivos de unión a carbohidratos. 42
5.2. Ensayos de inducción de la proteína PAS-PGK recombinante 45
5.3. Purificación de la proteína PAS-PGK recombinante de *Trypanosoma cruzi* 48
5.5. Ensayos enzimáticos de la proteína PAS-PGK recombinante de *Trypanosoma cruzi* 54
6. DISCUSIÓN 56
6.1. Análisis de la secuencia aminoacídica de la proteína PAS-PGK 56
6.2. Modelado molecular del péptido dominio PAS, dominio PGK y la proteína PAS-PGK de *T. cruzi* 56
6.3. Estudios de unión a ligandos por acoplamiento o *docking* molecular 60
6.3.1. Unión a glucosa 60
6.3.2. Unión a FAD^+ 63
6.4. Expresión y purificación de la proteína PAS-PGK recombinante 64
6.5. Identificación de la proteína PAS-PGK recombinante 66
6.6. Ensayos enzimáticos 67
7. CONCLUSIONES 72

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

8. PERSPECTIVAS 73
9. REFERENCIAS 74
10. ANEXOS 88

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura cristalográfica de la PGK citosólica de *Trypanosoma brucei* 7

Figura 2. Diferentes roles metabólicos de las isoenzimas PGK de *Trypanosoma cruzi* (Barros-Álvarez *et al*., 2014) 8

Figura 3. Estructura tridimensional del dominio PAS A de *Azotobacter vinelandii* NifL (2GJ3) 10

Figura 4. Motivos de unión a carbohidratos (CBM) identificados en la secuencia proteica de la PAS-PGK recombinante de *T. cruzi* 14

Figura 5. Predicción de dominios en la secuencia aminoacídica de la PAS-PGK de *Trypanosoma cruzi* 31

Figura 6. Estructura tridimensional del péptido dominio PAS perteneciente a la proteína PAS-PGK de *Trypanosoma cruzi* 32

Figura 7. Estructura de la proteína PAS-PGK truncada (dominio PGK) de *T. cruzi* 33

Figura 8. Estructura de la PAS-PGK completa de *T. cruzi* 34

Figura 9. Gráfico de Ramachandran para los modelos del dominio PAS y las proteínas PAS-PGK truncada y PAS-PGK 36

Figura 10. Acoplamiento molecular entre el ADP y la proteína PAS-PGK truncada de *Trypanosoma cruzi* 37

Figura 11. Acoplamiento molecular entre la glucosa y la proteína PAS-PGK truncada de *Trypanosoma cruzi* 38

Figura 12. Acoplamiento molecular entre la glucosa y la proteína PAS-PGK de *Trypanosoma cruzi* 39

Figura 13. Acoplamiento molecular entre el FAD^+ y el dominio PAS de la proteína PAS-PGK de *Trypanosoma cruzi* 41

Figura 14. Alineamiento de la secuencia aminoácidos de la proteína PAS-PGK de *Trypanosoma cruzi* con otras secuencias PAS-PGK 43

Figura 15. Comparación de los motivos de unión a carbohidratos (CBM) de la secuencia aminoacídica de la proteína PAS-PGK de *Trypanosoma cruzi* con otras secuencias de proteínas PGKs 44

Figura 16. Ensayo de autoinducción en presencia de etanol de la proteína PAS-PGK recombinante en *E. coli* Rosetta 45

Figura 17. Ensayos de expresión con IPTG de la proteína PAS-PGK recombinante en *Escherichia coli* BL21 (DE3) 46

Figura 18. Ensayos de expresión en medio TB de la proteína PAS-PGK recombinante en las cepas de *Escherichia coli* BL21 (DE3) y Rosetta 47

Figura 19. Purificación de la proteína PAS-PGK recombinante 48

Figura 20. Purificación de la proteína PAS-PGK recombinante bajo las condiciones propuestas por Adhikari *et al*., (2019) 49

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

Figura 21. Purificación de la proteína PAS-PGK recombinante utilizando un gradiente lineal con concentraciones entre 50 – 300 mM de imidazol (Todas las fracciones) 50

Figura 22. Purificación de la proteína PAS-PGK recombinante utilizando un gradiente lineal con concentraciones entre 50 – 300 mM de imidazol 51

Figura 23. Evaluación de la expresión y purificación de la proteína PAS-PGK recombinante por Western blot 53

Figura 24. Análisis de la identidad de la proteína PAS-PGK recombinante por Western blot 54

Figura 25. Variación de la velocidad con respecto a la concentración de enzima PAS-PGK recombinante de *Trypanosoma cruzi* bajo distintas condiciones 55

Figura 26. Estructura de los dominios PAS 59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Constantes cinéticas de las enzimas PGK nativas (n) y recombinantes (r) de *Trypanosoma cruzi* 9

Tabla 2. Condiciones de purificación utilizadas para la obtención de la proteína PAS-PGK recombinante 26

Tabla 3. Valores de las regiones del gráfico de Ramachandran para los modelos del péptido dominio PAS, proteína PAS-PGK truncada y proteína PAS-PGK completa antes del refinamiento 35

Tabla 4. Valores de las regiones el gráfico de Ramachandran para los modelos del péptido dominio PAS, proteína PAS-PGK truncada y proteína PAS-PGK completa después del refinamiento 35

Tabla 5. Parámetros de acoplamiento evaluados para la interacción entre las proteínas PAS-PGK truncada y PAS-PGK completa con la glucosa 40

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

1. INTRODUCCIÓN

1. La enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, también conocida como Tripanosomiasis Americana es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, un protozoario flagelado perteneciente al orden Kinetoplástida, familia Tripanosomatidae. Esta enfermedad se extiende desde el sur de Estados Unidos hasta la Patagonia Argentina y en la actualidad es un problema de salud pública en América del Sur, de donde es endémica. Se estima que 8 millones de personas se encuentran infectadas con *T. cruzi* en 21 regiones y esto ha ido en aumento debido a las migraciones que se han dado hacia las regiones no endémicas, por lo que se considera como una de las 17 enfermedades tropicales desatendidas (WHO, 2012). El modo de transmisión de esta enfermedad es principalmente a través de vectores hematófagos de la subfamilia Triatominae, aunque existen otras rutas de transmisión tales como transfusiones de sangre, trasplantes de órganos, transmisión transplacentaria y brotes orales (Quijano & Dumonteil, 2011). Hasta los momentos no se han desarrollado vacunas contra esta enfermedad y los agentes quimioterapéuticos disponibles presentan una baja efectividad, haciendo que el tratamiento para la enfermedad de Chagas sea difícil (Maugeri *et al*., 2011). En Venezuela la enfermedad de Chagas se considera como un problema de riesgo para aproximadamente seis millones de personas que viven en 198 municipios de 14 unidades federales, dentro de un territorio de 101.488 km^2, que incluye entre los estados más afectados a Trujillo, Lara, Portuguesa y Barinas, debido a sus características geográficas de pie de monte, donde las condiciones de vida facilitan la infestación por triatominos, vectores de la enfermedad (MPPS *et al*., 2007).

www.bdigital.ula.ve

1.2. *Trypanosoma cruzi*

Los kinetoplástidos son organismos uniflagelados tanto de vida libre como parásitos de vertebrados, invertebrados y plantas. Algunos de estos son los causantes de enfermedades humanas severas como la enfermedad de Chagas, la Tripanosomiasis Africana y la Leishmaniasis (Fernandes *et al*., 1993; Maslov *et al*., 2001). En los últimos años los kinetoplástidos pertenecientes a la familia Trypanosomatidae (donde se incluyen los géneros

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

Trypanosoma y *Leishmania*), han sido de gran interés económico en la medicina humana, veterinaria y en la agricultura (De Souza, 2010). Estos se caracterizan por presentar ciclos en donde se alternan entre un hospedador vertebrado y uno invertebrado e involucran cambios morfológicos y metabólicos drásticos.

Trypanosoma cruzi es un protozoario flagelado parásito, causante de la enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana. Este parásito presenta un complejo ciclo de vida que involucra dos huéspedes uno vertebrado y otro invertebrado. El huésped invertebrado es un insecto vector hematófago de la familia Reduviidae y subfamilia Triatominae, el cual transmite el parásito a un mamífero. Se han reportado aproximadamente 180 especies de mamíferos como reservorios naturales de *T. cruzi* (Herrera, 2010). Desde su descubrimiento, hace más de un siglo, se ha indicado que la asociación entre *T. cruzi* y los triatominos es esencial para la propagación exitosa de la enfermedad (Garcia *et al*., 2007; Nogeuira *et al*., 2015).

www.bdigital.ula.ve

1.2.1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

El ciclo de vida de *T. cruzi* es uno de los más complejos dentro de los kinetoplástidos presentando diversos estadios de desarrollo entre un huésped invertebrado y vertebrado. El ciclo inicia cuando un insecto de la familia Reduviidae ingiere la sangre de un mamífero infectado, llevándose consigo la forma trypomastigote del parásito, que circula en el torrente sanguíneo. Una vez esta es ingerida, la gran mayoría de los trypomastigotes son lisados en el estómago del insecto y los sobrevivientes se transforman a una forma esférica (conocidos como esferomastigotes) o en epimastigotes los cuales migran al intestino donde proliferan y se adhieren a las membranas perimicroviliares que son secretadas por las células del intestino medio posterior. Este paso de adhesión parece ser fundamental para desencadenar el proceso de transformación de los epimastigotes a trypomastigotes metacíclicos, forma infectiva del parásito que es liberada en las heces y la orina del insecto vector. Esta etapa es sumamente infecciosa para distintos mamíferos en donde se incluye el hombre (De Souza *et al*., 2010). Luego de penetrar la célula mediante un proceso endocítico, estos trypomastigotes metacíclicos residen en una estructura denominada vacuola parasitófora, de la que escapan al citosol secretando una hemolisina (De Souza, 2002; De Souza *et al*., 2010). Es en el citosol

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

donde se diferencian a amastigotes, la forma replicativa intracelular, y una porción de estos amastigotes se diferencian a trypomastigotes los cuales reingresan al torrente sanguíneo y podrán ser ingeridos por el vector cuando este se alimente (De Souza, 2002). Estudios han sugerido que el proceso de proliferación de *T. cruzi* dentro del vector, está influenciado y modulado por factores como la osmolaridad, pH, uso de L-alanina como única fuente de carbono y estrés nutricional (Osuna *et al*., 1990).

1.3. Metabolismo de *Trypanosoma cruzi*

El conocimiento de cómo funcionan las vías metabólicas esenciales para la supervivencia del parásito *Trypanosoma cruzi* es importante ya que puede permitir el diseño de estrategias para el combate de la enfermedad de Chagas. *Trypanosoma cruzi* no presenta una reserva intracelular de glucosa como glicógeno o almidón, por lo que la misma debe ser obtenida desde el ambiente, como puede ser la sangre del mamífero, a través de un sistema de transporte (Silber *et al*., 2005). El ambiente encontrado por el parásito a lo largo de su ciclo de vida es diverso, por lo tanto, su metabolismo se adapta de manera diferente en cada etapa (González-Marcano *et al*., 2014). Las diferentes formas del ciclo de vida de estos parásitos reprogramen su metabolismo para persistir y proliferar en los distintos hospedadores o compartimientos de los mismos. La capacidad metabólica refleja la disponibilidad de nutrientes en su entorno específico. *Trypanosoma cruzi* encuentra varios ambientes con niveles muy diferentes de aminoácidos y carbohidratos cuando se transmite secuencialmente a lo largo del tracto del insecto, la sangre de los mamíferos y el citosol de la célula de los mamíferos (Haanstra *et al*., 2016; Souza *et al*., 2021).

Trypanosoma cruzi tiene la capacidad de consumir tanto glucosa como aminoácidos, siendo la glucosa el sustrato preferencial en medios de cultivo axénicos (Cazzulo, 1994). La glucosa es una fuente principal de carbono y energía para la mayoría de las etapas del desarrollo dentro del huésped vertebrado (Bringaud *et al*., 2006). El uso de los carbohidratos como fuente de carbono y energía durante los distintos estadios del ciclo de vida de *T. cruzi* presenta un comportamiento inusual. En presencia de grandes concentraciones externas de glucosa estos parásitos la oxidan de manera incompleta, incluso en la presencia de oxígeno, dando como resultado una mezcla de CO_2 y productos reducidos como ácidos

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

monocarboxílicos y dicarboxílicos (principalmente succinato) y pequeñas cantidades de otros compuestos como L-alanina y acetato (Urbina, 1994; Barisón *et al*., 2018). Otra característica del metabolismo glicolítico de los tripanosomátidos es la ausencia del efecto Pasteur. Este efecto señala que, en la gran mayoría de los organismos, existe una transición de anaerobiosis a aerobiosis que va de la mano con un rápido decrecimiento en la utilización de la glucosa, debido a la regulación de la ruta glicolítica y el ciclo del ácido cítrico. En muchos casos, los tripanosomátidos parecen tener un "efecto Pasteur inverso", en donde el consumo de glucosa puede ser menor bajo condiciones anaeróbicas. Este comportamiento está relacionado a la ausencia de los puntos de regulación negativa en la ruta glicolítica (Maugeri, 2011). Se ha observado que durante el crecimiento en cultivo los epimastigotes de *T. cruzi* sufren un cambio del metabolismo glicolítico al proteico, y esto es evidenciado por la excreción de grandes cantidades de amonio en el medio (Urbina, 1994; Barros-Álvarez *et al.*, 2014; Barisón *et al*., 2018).

Los aminoácidos pueden ser obtenidos desde tres fuentes principales: biosíntesis de precursores metabólicos, transporte activo desde el medio y degradación de proteínas (Silber *et al*., 2005). El catabolismo de aminoácidos es de gran importancia en *T. cruzi*, debido a que este organismo es capaz de utilizar los aminoácidos como fuentes de carbono y energía. El parásito tiene la capacidad de degradar aminoácidos como leucina y prolina a CO_2 y otros productos biosintéticos (Urbina, 1994; Barisón *et al*., 2018). Se ha propuesto que la prolina tiene un papel importante promoviendo la diferenciación de formas intracelulares, desde epimastigotes a trypomastigotes; por otra parte, la leucina parece tener un efecto opuesto al de la prolina en el proceso de diferenciación (Barisón *et al*., 2018; Manchola *et al*., 2016; Silber *et al*., 2005). En ausencia de glucosa, los aminoácidos (L-prolina, L-treonina y L-glutamina) se utilizan a menudo como la principal fuente de energía (Silber *et al*., 2009). En estudios previos, se reportó la ausencia del transportador de glucosa TcrHT1 en el estadío amastigote, y se propuso que este estadío no podía consumir glucosa (Silber *et al*., 2009). Sin embargo, evidencias recientes indican que además de aminoácidos y ácidos grasos como fuente de carbono, los amastigotes tienen la capacidad de consumir glucosa (Li *et al.*, 2016; Shah-Simpson *et al*., 2017).

En *T. cruzi*, al igual que en otros organismos pertenecientes al clado protista de Kinetoplastidea, la mayor parte de la vía glucolítica está se lleva a cabo en el glicosoma, una

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

forma especializada de peroxisomas que se caracterizan por contener la mayoría de las enzimas de esa vía (Gualdrón-López *et al*., 2012). Típicamente, las primeras seis o siete enzimas, desde la hexoquinasa (HK) hasta la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) o la fosfoglicerato quinasa (PGK) se encuentran en el glicosoma y las últimas cuatro o tres enzimas de la vía, desde PGK o desde fosfoglicerato mutasa (PGM) hasta piruvato quinasa (PK) se ubican en el citosol (Haanstra *et al*., 2016; Acosta *et al*., 2019).

El ATP que se invierte en las primeras reacciones de la glicólisis es regenerado en reacciones catalizadas por la fosfoglicerato quinasa (PGK), la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y la piruvato fosfato diquinasa (PPDK) (Acosta *et al*., 2004). La PPDK glicosomal genera piruvato que debe ser excretado al citosol, sin embargo, la presencia en los glicosomas de una alanina deshidrogenasa (ADH) implica que al menos una parte del piruvato es reducido a alanina antes de ser excretado. Por otra parte, el balance redox se puede dar a nivel de la ruta malato deshidrogenasa-fumarato reductasa (MDH-FRD) excretando succinato, o a nivel de la alanina deshidrogenasa (ADH). El sistema PPDK: ADH y el PEPCK: MDH, se encarga del mantenimiento de los balances redox y energético de los glicosomas. El NADPH, el cual es necesario para las rutas de síntesis de nucleótidos y esteroles, es posiblemente generado por la ruta de β-oxidación de ácidos grasos y por la reacción catalizada por glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la 6-Pgluconato deshidrogenasa glicosómicas dependientes de $NADP^+$ (Acosta *et al*., 2004).

www.bdigital.ula.ve

Una particularidad que presenta este parásito es que la ruta glucolítica no se encuentra regulada en los puntos de control clásicamente conocidos (hexoquinasa y fosfofructoquinasa), de hecho, el único mecanismo de control que está claramente definido es la activación de la piruvato quinasa citosólica por concentraciones micromolares de fructosa-2,6-bifosfato, y la inhibición de la misma enzima por concentraciones milimolares de fosfato inorgánico y ATP (Barros-Álvarez, 2006; Urbina, 1994; Cazzulo, 1992). Otro mecanismo propuesto es el de regulación por histéresis de la hexoquinasa (HK), donde se sugiere que esta enzima es capaz de actuar como un sensor que responde a las fluctuaciones de glucosa en la célula, y que sirve como mecanismo para amortiguar los cambios drásticos de las concentraciones de glucosa (o ATP) durante el ciclo de vida del parásito (Acosta *et al*., 2015).

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

1.4. La fosfoglicerato quinasa (PGK)

La enzima fosfoglicerato quinasa (PGK, EC 2.7.2.3) es una enzima "*moonlighting"* que presenta una función tanto glicolítica como gluconeogénica, catalizando la transferencia de un grupo fosfato del 1,3-bifosfoglicerato (1,3BPG) al ADP, formando ATP y 3-fosfoglicerato (3PGA), utilizando Mg^{2+} como cofactor (Bernstein *et al*., 1997; Voet y Voet, 2007). Actualmente se sabe que esta enzima se encuentra ampliamente distribuida en muchos organismos, donde se localiza en el citosol cumpliendo tanto funciones glucolíticas como gluconeogénicas, aunque también se han encontrado en plastidios de algas donde cumple una función en el ciclo de Calvin (Brinkmann y Martin, 1996) o en la mitocondria de oomicetes como *Phytophthora infestans* (Abrahamian *et al*., 2017).

La PGK, en la mayoría de los organismos, es una enzima monomérica conformada por unos dominios N- y C-terminal conectados por una región de bisagra muy conservada (Bernstein *et al*., 1997), pero se ha reportado que en algunas archaeas extremófilas como *Pyrococcus woesei* y *Sulfolobus solfataricus*, esta enzima se presenta como dímero o tetrámero (Barros-Álvarez, 2006; Bentahir *et al*., 2000). Hasta el momento, todas las PGK estudiadas son estructuralmente homólogas (figura 1).

www.bdigital.ula.ve

El mecanismo catalítico de la PGK es de "flexión de bisagra", donde hay un movimiento inducido y extensivo de la bisagra por la unión simultánea de ambos sustratos, provocando un cambio conformacional que induce el cierre y aumenta la proximidad de los dominios, dando lugar a la catálisis y a la transferencia del grupo fosfato. El ion magnesio cumple un rol fundamental en este proceso ya que permite la estabilización de las cargas del grupo fosfato (Bernstein *et al*., 1997).

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

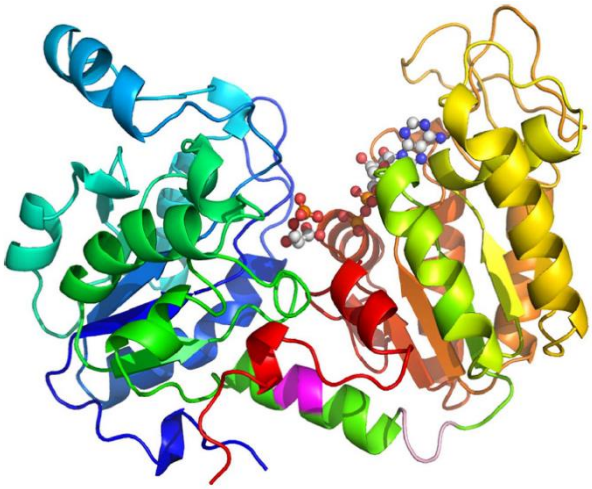


Figura 1. Estructura cristalográfica de la PGK citosólica de *Trypanosoma brucei*. La región N-terminal se muestra en azul, mientras que la región C-terminal en rojo. Los sustratos del complejo terciario se representan como esferas y la región de bisagra flexible en rosa (Roja-Pirela *et al*., 2018; Bernstein *et al*., 1997).

1.4.1. La PGK en *Trypanosoma cruzi*

www.bdigital.ula.ve

En *Trypanosoma cruzi* hasta hace poco se conocían tres isoenzimas para la fosfoglicerato quinasa (PGK), que presentan pesos moleculares y ubicaciones subcelulares diferentes; localizándose dos de ellas en el glicosoma (PGKA y PGKC) y otra en el citosol (PGKB). Las tres isoenzimas se expresan en todos los estadios del ciclo de vida del parásito y juegan un papel fundamental en su metabolismo glicolítico permitiendo la producción neta de ATP dentro del glicosoma (Barros-Álvares *et al.,* 2014; Concepción *et al*., 2001). La isoenzima PGKB (45 kDa) representa el 80% de la actividad total, seguida por PGKA (56 kDa) asociada a la membrana glicosomal y PGKC (47 kDa) localizada en la matriz glicosomal (Barros-Álvares *et al.,* 2015). Recientemente se ha identificado una cuarta isoenzima la PAS-PGK (Acosta *et al*., 2019; Rojas-Pirela *et al*., 2018).

La ubicación de las isoenzimas PGK dentro y fuera del glicosoma condiciona la producción neta de ATP dentro de esta organela (figura 2). Esto indica que la producción neta de ATP destinado para la síntesis en el glicosoma, es dependiente de la actividad y regulación de las PGKA y PGKC (Acosta *et al*., 2004; Barros-Álvarez *et al*., 2014., Concepción *et al*., 2001).

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

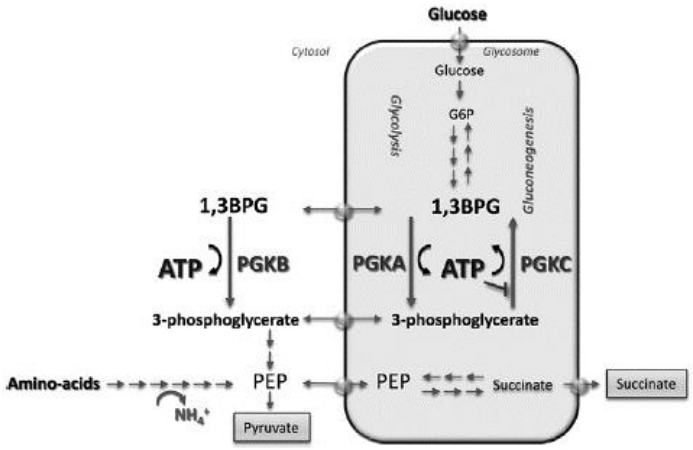


Figura 2. Diferentes roles metabólicos de las isoenzimas PGK de *Trypanosoma cruzi* (Barros-Álvarez *et al*., 2014)

La presencia de dos isoenzimas en el mismo compartimiento subcelular pareciera ser redundante puesto que si ambas presentaran comportamientos cinéticos similares cumplirían la misma función. Una de las principales diferencias entre estas dos isoenzimas (PGKA y PGKC) es su actividad específica, la cual es considerablemente mayor para PGKC. Se ha sugerido que el rol de la PGKA en el glicosoma es la conversión de 1,3BPG a 3PGA generando ATP, sin embargo, debido a su baja actividad específica la mayoría del 1,3BPG abandonaría el glicosoma, pasando a ser sustrato de la PGKB citosólica (Barros-Álvarez *et al*., 2014).

Por otra parte, al evaluar las constantes cinéticas de cada isoenzima (tabla 1), se nota que PGKC tiene un Km muy bajo para el ATP (0,010 mM) en comparación con las otras dos isoenzimas, además es inhibida por altos niveles de ATP (Ki = 270 µM) indicando, posiblemente, un papel gluconeogénico para esta enzima (Barros-Álvarez *et al*., 2014).

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

Tabla 1. Constantes cinéticas de las enzimas PGK nativas (n) y recombinantes (r) de *Trypanosoma cruzi*

Isoenzima	Km		Referencia
	ATP (mM)	3PGA (mM)	
PGKAn	0,217	0,174	Barros-Álavarez *et al.*, 2014
PGKAr	0,236	0,850	Barros-Álavarez *et al.*, 2014
PGKBn	0,099	0,625	Quiñones, Resultados no publicados
PGKCn	0,010	0,192	Barros-Álavarez *et al.*, 2014
PAS-PGKr	0,82	0,39	Rojas-Pirela, 2018

www.bdigital.ula.ve

1.5. Los dominios Per-ARNT-Sim (PAS)

Los dominios Per-ARNT-Sim (PAS) son una familia de dominios que sirven como sensores versátiles y módulos de interacción en la transducción de señales, detectan estímulos físicos y químicos los cuales regulan la actividad de diversos dominios efectores. Su nombre se debe a las proteínas donde estos dominios fueron identificados por primera vez, las proteínas de *Drosophila* del periodo circadiano (Per) y single-minded (Sim) y el transportador nuclear del receptor de hidrocarbono aril (Arnt) (Möglich *et al*., 2009).

1.5.1. Estructura y localización

Los motivos PAS son regiones homólogas de aproximadamente 50 aminoácidos de las proteínas Per, ARNT y Sim (Nambu *et al*., 1991; Möglich *et al*., 2009). Sin embargo, otros estudios han encontrado que los dominios PAS también pueden estar formados por regiones

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

comprendidas entre 100-150 aminoácidos (Pellequer *et al*., 1998; Rojas-Pirela *et al*., 2018). A pesar de que los diversos dominios PAS presentan poca similitud en sus secuencias de aminoácidos, su estructura tridimensional es aparentemente conservada y todos tienen una estructura parecida a la proteína PYP ("*Photoactive Yellow Protein"*), que es el dominio PAS más caracterizado, y en el cual se conoce con gran detalle su función catalítica (Vreede *et al*., 2003).

Los dominios PAS adoptan un plegamiento dominado por una lámina β antiparalela. Algunos posibles esquemas han sido desarrollados para describir las características estructurales de estos dominios (figura 3). El más concordante está basado en la estructura original de la PYP y consiste en un núcleo PAS compuesto por dos láminas beta y tres alfa hélices, un conector helicoidal compuesto por una alfa hélice larga que diagonalmente cruza una lámina beta y un andamio beta compuesto por tres hebras que conforman la segunda mitad de la lámina beta central (Zhong *et al*., 2003).

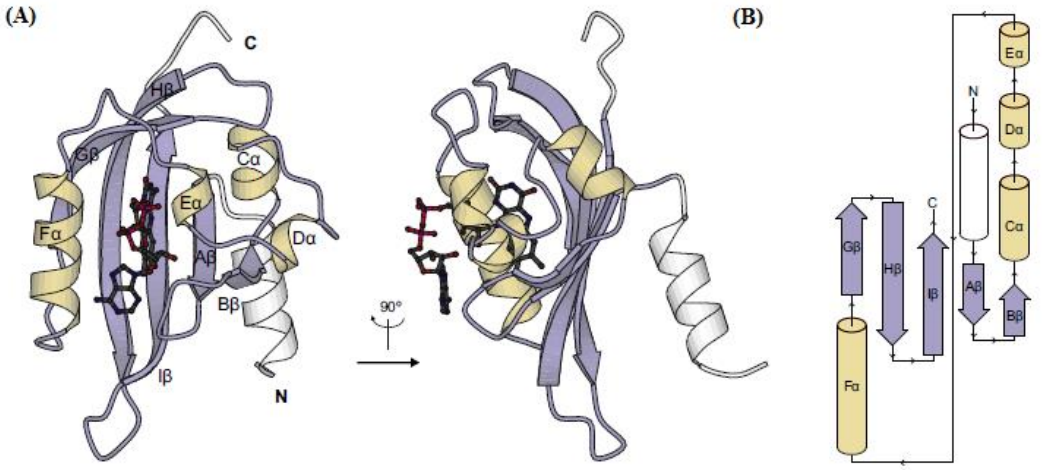


Figura 3. Estructura tridimensional del dominio PAS A de *Azotobacter vinelandii* NifL (2GJ3). (A) Se presenta la estructura secundaria característica del dominio PAS, con un núcleo compuesto por láminas beta y una alfa hélice flanqueante en el extremo N-terminal. (B) Diagrama topológico de 2GJ3 (Möglich *et al*., 2009).

Las proteínas con dominios PAS presentan diferentes ubicaciones subcelulares. Se han descrito una cantidad de proteínas de membrana con dominios PAS localizados en regiones

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

adyacentes a la región transmembranal. También pueden ser parte de proteínas citoplasmáticas solubles, las cuales pueden tener un único o múltiples dominios PAS en su estructura (DeMille y Grose, 2013; Rojas-Pirela *et al*., 2018).

1.5.2. Unión a ligandos

En la gran mayoría de las proteínas, los dominios PAS funcionan como sensores a cambios ambientales u otros estímulos (oxígeno, pH, iones, glucosa, estado de oligomerización, ácidos carboxílicos, niveles de energía o ácidos grasos) y como un modulador de interacciones proteína-proteína. Se han reportado una diversa cantidad de ligandos en la familia de los dominios PAS, que incluyen cofactores como flavina adenina dinucleótido (FAD), flavin mononucleótido (FMN), grupos hemos y otros como ácidos grasos, ácidos carboxílicos y carbohidratos como la glucosa (Rojas-Pirela *et al*., 2018). Estos ligandos son los responsables de la detección de estímulos específicos y muchos de estos se unen al núcleo hidrofóbico del dominio PAS.

www.bdigital.ula.ve

En el caso de dominios PAS unidos a FAD, se tiene el ejemplo de la proteína Aer de *E. coli*, una flavoproteína de membrana que tiene un grupo FAD unido a su dominio N-terminal de PAS. El FAD actúa como un sensor redox y media la aerotaxis, una respuesta positiva aerotactica (Herrmann *et al*., 2004; Rojas-Pirela *et al*., 2018). Por otra parte, existe un grupo de proteínas cuyos dominios PAS utilizan el flavin mononucleótido (FMN) como un sensor intermediario (Rojas-Pirela *et al*., 2018), los cuales son conocidos como dominios LOV, ya que tienen la habilidad de responder a estímulos de luz, oxígeno y voltaje (Henry y Crosson, 2011). Se han encontrado dominios PAS-Hemo que pueden unir grupos hemo tipo b y c (Rao *et al*., 2011). Las variaciones en las concentraciones de gases detectadas por el grupo hemo provocan un cambio conformacional del dominio PAS que eventualmente causa una alteración en la actividad reguladora y catalítica de la proteína (Uchida *et al*., 2005; Shimizu, 2013).

Existe poca información sobre la glucosa como ligando de los dominios PAS. Hao (2008) estudiando los roles de varias proteínas reguladoras (sensores energéticos) reporta que en las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) existe una PAS quinasa (PASK) que fosforila la enzima UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa 1 (Ugp1), provocando una fracción de la

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

glucosa sea utilizada en la síntesis de glucano y para compensar los gastos en la síntesis de glicógeno. En consecuencia, la PASK de la levadura es activada como una respuesta celular al estrés y ante el crecimiento en fuentes de carbono no fermentativas. Por otra parte, Grose (2010) menciona que las PAS quinasas también tienen un papel importante en la regulación del metabolismo de la glucosa en mamíferos a nivel hormonal y celular. En un cultivo de células beta provenientes del páncreas, la PAS quinasa es activada por concentraciones elevadas de glucosa y es requerida para la transcripción estimulada por glucosa del gen de la insulina.

1.5.3. Los dominios PAS y la PAS-PGK en *Trypanosoma cruzi*

A través de estudios genómicos y de proteómica se ha revelado que *T. cruzi* contiene aproximadamente 22.570 genes codificadores de proteínas, de los cuales 12.570 representan pares alélicos y entre estos genes se encuentran diferentes familias de proteínas quinasas (El Sayed *et al*., 2005). Algunas de estas proteínas quinasas parecen tener diferentes módulos regulatorios dentro de su estructura, incluyendo los dominios PAS (Rojas-Pirela *et al*., 2018). En *T. cruzi* se han identificado dos genes, *pgka* y *pgkb/c*, que se encuentran en tándem en el cromosoma 9, mientras que hay un tercer gen que codifica para la PAS-PGK, que se encuentra ubicado en el cromosoma 32. La proteína PAS-PGK es sólo 44-45% idéntica a TcPGKA y TcPGKB, pero parece haber conservado todos los residuos de aminoácidos involucrados con la unión de sustratos PGK y la catálisis. Además de esto, la secuencia del gen *pas-pgk* contiene una región que codifica un dominio PAS en el extremo N-terminal de la proteína. Análisis bioinformáticos arrojaron que la PAS-PGK es una proteína PGK activa que tiene todos los sitios de unión a los sustratos (ADP/1,3PGA), una región o dominio catalítico y una región asociada a bisagra flexible, además por la secuencia de aminoácidos se predice que esta proteína tiene un peso molecular de aproximadamente 58 kDa (Rojas-Pirela *et al*., 2018).

Las proteínas PAS-PGK codificadas en los diferentes tripanosomatides (con excepción de *T. brucei*) poseen un tripéptido C-terminal conformado por un motivo de importación peroxisomal tipo 1 (PTS1), que sugiere que esta puede estar ubicada en el glicosoma. Esto es soportado por Acosta *et al*., 2019, quienes a través de análisis proteómicos detectaron esta

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

proteína en glicosomas purificados de formas epimastigotes del parásito. Es importante destacar, que la proteína apareció de manera más abundante en el proteoma de los organismos muestreados en la fase de crecimiento estacionaria que en las de parásitos que fueron colectados en fase exponencial. Este resultado podría estar relacionado con un posible rol de esta proteína PAS-PGK cuando la disponibilidad de la glucosa es baja durante el crecimiento estacionario. Rojas-Pirela (2018) sugiere un sistema de regulación de la vía glicolítica, el cual es mediado por el dominio PAS, que le permitiría a la PAS-PGK comportarse como un interruptor que regula algunas vías metabólicas en respuesta a cambios ambientales o nutricionales.

Hasta hace poco no se sabía de la existencia de la PAS-PGK y menos sobre la función de esta enzima en los tripanosomátidos, específicamente en *T. cruzi*. El hecho de que esta enzima PAS-PGK tiene en su estructura un dominio PAS podría significar que posiblemente puede tener un papel más allá del metabolismo energético del parásito. Una propuesta sería que el dominio PAS tendría un efecto regulatorio alostérico sobre la actividad de la enzima (Rojas-Pirela, 2018), funcionando con un mecanismo similar al observado por DeMille y Grose (2013) en las PAS quinasa de levaduras. El procesamiento de la PAS-PGK a través de un corte proteolítico podría formar parte de un sistema de regulación, que funcionaría de manera similar al que actúa sobre la PPDK. Durante condiciones de escasez de glucosa la PPDK es sometida a una fosforilación y clivaje proteolítico que conlleva a su inactivación, que permitiría a un cambio de metabolismo de aminoácidos, proceso que podría estar relacionado con el hecho de que ambas proteínas están asociadas de manera periférica a la membrana del glicosoma (González-Marcano *et al*., 2014; Acosta *et al*., 2019).

Se han identificado motivos de unión a carbohidratos en el extremo C-terminal de la proteína PAS-PGK de *T. cruzi* (figura 4). Rojas-Pirela (2018) estudió el efecto de distintas concentraciones de glucosa en la actividad de la PAS-PGK, reportando una inhibición de esta enzima a partir de 70 µM de glucosa, mientras que para la PAS-PGK truncada (dominio PGK) no se presentó este efecto. Esto podría sugerir una importancia fisiológica sobre la posible función de esta enzima en el glicosoma específicamente en la regulación de la gluconeogénesis, donde la inhibición por glucosa puede ser un indicio de que esta enzima trabaje en esta vía e incluso podría hacer que esta proteína funcione como un interruptor entre las diferentes vías metabólicas presentes en los glicosomas. Adicionalmente, se propone que

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

la presencia del dominio PAS podría vincularse a un mecanismo adaptativo que permite que los parásitos sobrevivan y se adapten a las diferencias ambientales encontradas durante las distintas etapas del ciclo de vida, teniendo una función relacionada con la gluconeogénesis y la β-oxidación de los ácidos grasos (Silber *et al*., 2009; Souza *et al*., 2021; Rojas-Pirela, 2018).

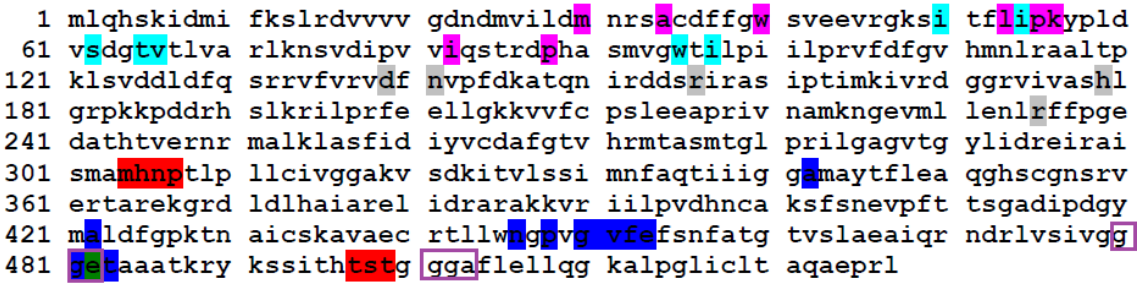


Figura 4. Motivos de unión a carbohidratos (CBM) identificados en la secuencia proteica de la PAS-PGK recombinante de *T. cruzi*. Los CMB fueron identificados en la región C-terminal de la proteína (recuadro violeta). Los colores indican los sitios activos identificados en las regiones correspondientes al dominio PAS y al dominio PGK. Dominio PAS: sitio activo putativo (rosado) y bolsillo de unión química o de unión al grupo hemo (turquesa). Dominio PGK: sitio de unión de sustratos 1,3 PGA (gris) y ADP (azul), sitio de la bisagra flexible (rojo) y sitio catalítico (verde). Se observa un solapamiento entre el CMB y los sitios activos para el ADP. (Modificado de Rojas-Pirela, 2018).

www.bdigital.ula.ve

El rol de la enzima PAS-PGK en *Trypanosoma cruzi* aún no se tiene claro, pero se plantea que el dominio PAS podría ayudar en las adaptaciones metabólicas que sufre el parásito durante su ciclo de vida. Algunos autores sugieren que la enzima PAS-PGK presente en *T. cruzi* podría comportarse como un interruptor metabólico que permitiría regular algunas vías en respuesta a cambios ambientales o nutricionales y muestran que existe un papel inhibitorio por parte de la glucosa sobre la actividad de la enzima, indicando una posible función del dominio PAS en un mecanismo de regulación y sugiriendo que el rol de la PAS-PGK depende de la disponibilidad de glucosa (Rojas-Pirela, 2018).

La determinación de parámetros cinéticos del efecto inhibitorio y/o activador de la glucosa o el FAD^+ para la enzima PAS-PGK representa un aporte importante en el estudio del metabolismo de *T. cruzi* que se realiza en el Laboratorio de Enzimología de Parásitos (LEP), ya que el conocimiento de las propiedades o comportamiento bioquímico de las enzimas unido a su característica de alta especificidad para determinados sustratos, las hace

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

candidatas como dianas terapéuticas para combatir enfermedades, tales como el mal de Chagas, mediante la modulación de sus actividades con inhibidores y/o activadores que pueden disminuir o aumentar las actividades enzimáticas. En este sentido ayudaría en el diseño racional de drogas o medicamentos que sean más eficaces, mejor tolerados y de bajo costo, para garantizar que enfermedades tales como la Tripanosomiasis Americana ya no se consideren como una enfermedad tropical desatendida.

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

2. HIPÓTESIS

Conociendo que la actividad de la enzima PAS-PGK en *Trypanosoma cruzi* es afectada por glucosa y otros ligandos como FAD^+ se esperaría que el modelado molecular aportara evidencias de como el dominio PAS influye en la actividad de la enzima.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

- Evaluar *in silico* si los ligandos glucosa y FAD^+ se asocian a la proteína PAS-PGK, y la influencia que puede tener esta asociación sobre la actividad de la enzima PAS-PGK de *Trypanosoma cruzi*

3.2. Objetivos específicos

www.bdigital.ula.ve

- Realizar modelados *in silico* del dominio PAS, el dominio PGK y la proteína PAS-PGK completa de *Trypanosoma cruzi.*
- Evaluar a través de herramientas bioinformáticas la interacción de la glucosa y el FAD^+ con la proteína PAS-PGK.
- Expresar y purificar la proteína PAS-PGK recombinante de *T. cruzi.*
- Evaluar y optimizar las condiciones para la medición de la actividad PAS-PGK recombinante.

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

4. METODOLOGÍA

4.1. Estudios bioinformáticos

4.1.1. Modelado molecular del dominio PAS y PGK y de la proteína PAS-PGK de *T. cruzi*

Con el objetivo de evaluar la unión de la glucosa en la enzima PAS-PGK de *T. cruzi* se realizó el modelado de la secuencia denominada "PAS-domain container phosphoglycerate kinase, putative" (*Trypanosoma cruzi* línea CL Brener) cuyo número de acceso es Tc00.1047053506945.20 (Uniprot, 2019). Los dominios de la secuencia fueron previamente evaluados con InterPro (Mitchell *et al*., 2019) y posteriormente se realizaron tres modelos: (1) Dominio PAS, (2) dominio PGK y (3) PAS-PGK completa.

4.1.1.1. Modelado molecular del dominio PAS

Para modelar el péptido dominio PAS de *Trypanosoma cruzi* se utilizó servidor QUARK, diseñado para péptidos menores de 200 residuos de aminoácidos y que consiste en un algoritmo que utiliza métodos de modelado *ab initio* (o *de novo*) para la predicción de la estructura y plegamiento de la proteína a partir de su secuencia de aminoácidos (Xu y Zhang, 2012). Se tomó la secuencia de la proteína completa (Tc00.1047053506945.20) y se seleccionaron los aminoácidos correspondientes al dominio PAS, información que fue introducida en el servidor. Una vez obtenido el modelo, este fue refinado tres veces con la herramienta Refine2 del servidor GalaxyWEB (Ko *et al*., 2012), posteriormente fue validado por medio de gráficos de Ramachandran utilizando el servidor RAMPAGE: Ramachandran Plot Assessment (Lowell *et al*., 2002), en donde se pueden verificar las interacciones de los ángulos de torsión phi y psi en las cadenas polipeptídicas para encontrar conformaciones estables. Para la visualización y presentación del modelo se utilizó el software UCSF Chimera 1.13.1 (Pettersen *et al*., 2004).

4.1.1.2. Modelado molecular del dominio PGK

Para modelar el dominio PGK de la proteína PAS-PGK primeramente se tomó la secuencia de la proteína completa y se eliminaron los aminoácidos correspondientes al

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

dominio PAS. Esta secuencia fue introducida en el servidor online Phyre2 (Kelley *et al*., 2015), que permite realizar un proceso de alineamiento de la proteína con secuencias de estructuras conocidas. El modelo obtenido fue refinado tres veces con el servidor Refine de GalaxyWEB (Ko *et al*., 2012) y validado con RAMPAGE como se indicó en la sección 4.1.1.1. La visualización y presentación del modelo se hizo con UCSF Chimera 1.13.1 (Pettersen *et al*., 2004).

4.1.1.3. Modelado molecular de la proteína PAS-PGK

La proteína PAS-PGK fue modelada con el servidor Phyre2 (Kelley *et al*., 2015). Seguidamente el modelo fue refinado siete veces con el servidor Refine de GalaxyWEB (Ko *et al*., 2012) y validado con RAMPAGE como se indicó en la sección 4.1.1.1. La visualización y presentación del modelo se hizo con UCSF Chimera 1.13.1 (Pettersen *et al*., 2004).

www.bdigital.ula.ve

4.1.2. Estudios de acoplamiento molecular

4.1.2.1. Estudios de acoplamiento de la glucosa con el dominio PGK y la proteína PAS-PGK de *Trypanosoma cruzi*

Para evaluar la interacción de la glucosa con la proteína PAS-PGK de *T. cruzi*, se realizaron estudios de *docking* o acoplamiento molecular. El *docking* molecular es una herramienta bioinformática que facilita la comprensión de las interacciones de unión entre un ligando y una macromolécula, prediciendo la energía y el modo de enlace entre ambas moléculas. Si la interacción que se presenta entre ambas es favorable estas podrían potencialmente unirse *in vitro* o *in vivo*.

El *docking* molecular se realizó a través de la plataforma SwissDock (Grosdidier *et al*., 2011), los ligandos glucosa, ADP y 1,3 BPG fueron descargados de la base de datos ZINC database (Irwin *et al*., 2012). La visualización y análisis del acoplamiento se hizo con el software Chimera 1.13.1. Los parámetros de selección para el mejor ajuste fueron la energía libre (ΔG), Fullfitness y formación de puentes de hidrógeno entre el ligando y el receptor.

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

4.1.2.1. Estudios de acoplamiento entre el FAD^+ y la proteína PAS-PGK completa de *Trypanosoma cruzi*

Estudios de unión a ligando con la proteína PAS-PGK de *T. cruzi* indican que el FAD^+ tiene un efecto estimulatorio en la proteína, aunque este fenómeno no se observó en ensayos realizados con sólo el dominio PGK de la proteína PAS-PGK, lo que sugiere que el cofactor interactua con la proteína a través del dominio PAS (Rojas-Pirela, 2018).

Para evaluar la interacción del FAD^+ con la proteína PAS-PGK de *Trypanosoma cruzi*, se realizaron estudios de acoplamiento molecular entre este ligando y el dominio PAS de la proteína. En este caso, en el modelo de la proteína completa se seleccionó la región que corresponde al dominio PAS y luego de prepararse se introdujo en la plataforma SwissDock (Grosdidier *et al*., 2011) junto con el ligando FAD^+ que fue descargado desde la base de datos ZINC database (Irwin *et al*., 2012). La visualización, análisis y edición del acoplamiento se hizo con el software Chimera 1.13.1. Los parámetros de selección para el mejor ajuste fueron la energía libre (ΔG), Fullfitness y formación de puentes de hidrógeno entre el ligando y el receptor.

www.bdigital.ula.ve

4.2. Análisis de secuencia y alineamientos de la proteína PAS-PGK recombinante de *Trypanosoma cruzi*

Para evaluar el grado de conservación de la PAS-PGK en la familia tripanosomatidae, se realizó un alineamiento local con otras proteínas PAS-PGK de otros organismos pertenecientes a esta familia, dentro de los cuales se consideraron *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*, *Leshmania major* y *Leptomonas pyrrhocoris*, enfocándose principalmente en los sitios de unión a los sustratos en el dominio PGK. Así mismo, se hizo un análisis de la ubicación de los posibles residuos de unión a glucosa para ver el grado de conservación de estos residuos en la secuencia de distintas proteínas PGKs. Para esto se utilizó la herramienta MUSCLE (Edgar, 2004) y COBALT (Papadopoulos y Agarwala, 2007), que generan un alineamiento local entre las secuencias problema. Posteriormente, el alineamiento fue visualizado y editado con el software Jalview (Waterhouse *et al*., 2009). Por otra parte, con el propósito de estudiar que tan similar es la estructura y secuencia de proteína PAS-PGK de *T. cruzi* CL Brener con la secuencia parcial del constructo pGEM-

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

T/inserto PAS-PGK de *T. cruzi* EP, se compararon mediante alineamientos utilizando la función *MatchMaker* del software UCSF Chimera.

4.3. Material Biológico

Se hicieron ensayos con dos cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) con el fin de seleccionar aquella que exprese mayor rendimiento en la fracción soluble de la proteína.

4.3.1. *Escherichia coli* (*E. coli*) cepa *Rosetta*

Se utilizó la cepa *Rosetta* de *E. coli* transformada con el vector pET28a-PAS-PGK, suministrada por el Laboratorio de Enzimología de Parásitos (LEP). La construcción contiene una etiqueta peptídica formada por seis histidinas en su extremo N-terminal (Rojas-Pirela, 2018). Esta fue cultivada en medio Luria Bertani (LB) (0.5% p/v) de extracto de levadura, 1% (p/v) de triptona, 1% (p/v) de NaCl, pH 7.0) suplementado con cloranfenicol (60 µg/ml) y kanamicina (33 µg/ml).

www.bdigital.ula.ve

4.3.2. *Escherichia coli* (*E. coli*) cepa BL21 (DE3)

Tomando como referencia los resultados obtenidos por Adhikari *et al*., (2019) para la expresión de la proteína recombinante PAS-PGK de *Leshmania major*, se utilizó la cepa BL21 (DE3) de *E. coli*, transformada con el vector pET28a-PAS-PGK. Para esto se inoculó un cultivo de 100 ml de medio LB con la cepa BL21 (DE3) y se dejó creciendo a 37 °C con una agitación de 180 rpm, hasta alcanzar una absorbancia de 0,6 a 600 nm, para posteriormente refrigerarlo a 4 °C durante 15 minutos, procediendo a centrifugar a 3000 x g por 20 minutos, seguidamente se lavaron las células con tres porciones de 50 ml de agua destilada estéril y fría. Finalmente, las células fueron resuspendidas en 1,4 ml de agua destilada.

Se tomó 1 µL de ADN plasmídico obtenido por Rojas-Pirela (2018) y se mezcló con 9 µL de agua destilada estéril y se agregaron 5 µl de esta solución a la cubeta de electroporación en la que previamente se habían colocado 200 µl de la solución de las células resuspendidas.

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

Paralelamente se hizo un control de viabilidad para la cepa, donde en vez de agregar 5 µL de ADN se agregan 5 µL de agua destilada. Cada cubeta se sometió a electroporación durante 5,4 mseg y a 250 V.

Luego de transformar, las células se introdujeron inmediatamente en 3 ml de medio de recuperación (medio LB), y se dejaron crecer a 37 °C durante 1 hora. Transcurrido el tiempo, los cultivos se desmontaron y se centrifugaron por 15 min a 3000 x g. Para concentrar las células, se descartaron 2,5 ml del medio y se resuspendieron en los 500 µL restantes. Para finalizar la transformación, se tomaron 100 µL de las células y se sembraron en una placa suplementada con kanamicina (33µg/ml). El cultivo sé dejó creciendo a 37 °C durante toda la noche, para la obtención de colonias.

Ya seleccionadas las colonias, las bacterias fueron cultivadas en medio Luria Bertani (LB) (0.5% (p/v) de extracto de levadura, 1% (p/v) de triptona, 1% (p/v) de NaCl, pH 7.0) suplementado con kanamicina (33 µg/ml).

www.bdigital.ula.ve

4.4. Sobreexpresión de la proteína

En la búsqueda del mejor método de sobreexpresión o de aquel que produzca el mejor rendimiento en la proteína de estudio, se ensayaron tres métodos.

4.4.1. Método de sobreexpresión por autoinducción (Studier, 2005)

Se sembró el clon 1 de *E. coli Rossetta* en una placa con medio LB suplementado con kanamicina (33 µg/ml) y cloranfenicol (60 µg/ml), dejándose crecer por 24 horas a 37 °C. Para la preparación del preinóculo, el clon 1 desde la placa fue sembrado en 5 ml de medio LB suplementado con kanamicina (33 µg/ml), cloranfenicol (34 µg/ml) y NaCl (250 mM), siendo incubado a 28 °C con una agitación de 180 rpm durante toda la noche.

Posteriormente 1,5 ml del preinóculo se utilizó para inocular 100 ml de medio de autoinducción, igualmente suplementado con kanamicina (33 µg/ml), cloranfenicol (34 µg/ml) y NaCl (250 mM). Motivado a que el método de autoinducción no presentó el rendimiento esperado y con el objetivo de aumentar la expresión soluble de la proteína PAS-PGK, se hizo una prueba en presencia de etanol siguiendo el protocolo propuesto por Chhetri

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

et al (2015). Para ello se evaluaron cuatro tratamientos (sin etanol, etanol 1%, etanol 2% y etanol 3%) en un medio de autoinducción suplementado con kanamicina (33 µg/ml), cloranfenicol (34 µg/ml), NaCl (250 mM). Las muestras se llevaron a un volumen final de 5 ml y se inocularon con 75 µl del cultivo de bacterias crecido en medio LB (preinóculo), incubando por 48 horas a 28 °C con una agitación de 180 rpm. Las células fueron colectadas por centrifugación a 3000 x g durante 20 minutos descartando el sobrenadante y se almacenó el sedimento a -20 °C. El sedimento fue resuspendido (detalles de ruptura se describirán en la siguiente sección) y se evaluó la expresión en SDS-PAGE al 12 %. La concentración de etanol más adecuada para expresión de la proteína en forma soluble era de 2 %, la cual fue en definitiva la utilizada en el método de autoinducción.

4.4.2. Método de sobreexpresión con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG)

Para la preparación del preinóculo se sembró una colonia aislada de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3), en 5 ml de medio LB suplementado con kanamicina (33 µg/ml), este fue incubado a 37 °C con una agitación de 180 rpm durante toda la noche. Se utilizaron 2ml del preinóculo para sembrar un cultivo de 20 ml de medio LB suplementado con kanamicina (33 µg/ml), se incubó a 37 °C con una agitación de 180 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5 a 600 nm (aproximadamente 1 hora luego de inocular). Se tomó una alícuota de 1 ml (denominada tiempo cero) y al resto del cultivo se le agregó 250 µM de IPTG. Se recolectaron fracciones de 2 ml cada hora, durante un período de tres horas y luego se centrifugaron a 30.000 xg durante 5 minutos. El sobrenadante fue descartado y el sedimento celular fue resuspendido en 100 µL de buffer de carga, para analizar la expresión de la proteína en un SDS-PAGE al 12%.

4.4.3. Ensayos de sobreexpresión con medio TB ("*Terrific broth"*)

En este caso se decidió realizar ensayos induciendo en medio TB ("*Terrific broth"*), siguiendo el protocolo descrito por Adhikari *et al*., 2019, para la sobreexpresión de la proteína PAS-PGK recombinante de *Leshmania major*. La construcción del pET28a que expresa la proteína recombinante PAS-PGK de *T. cruzi* fue usada para transformar la bacteria

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

Escherichia coli cepas BL21 (DE3) y Rosetta, y se dejó creciendo a 37 °C durante toda la noche en 50 ml de medio LB suplementado con los respectivos antibióticos (kanamicina (33 µg/ml) para BL21 (DE3) y kanamicina (33 µg/ml) y cloranfenicol (34 µg/ml) para Rosetta). Este cultivo se utilizó para inocular 100 ml de medio TB, cuando se alcanzó una densidad celular de entre 0.6-1.0 a 600 nm se agregó una solución de β-thiolgalactopiranosido (IPTG) hasta una concentración de 0.5 mM. Las bacterias se dejaron crecer durante aproximadamente 18 horas a 25 °C y posteriormente, las células fueron colectadas mediante centrifugación a 3000 xg durante 20 min, luego estas se lavaron una vez con PBS 1X pH 7,8 y se almacenan a – 20 °C.

El sedimento del cultivo fue resuspendido en 10 ml de buffer Tris-HCl 50 mM, KCl 250 mM y glicerol 10%, suplementado con PMSF 1 mM. (detalles de ruptura se describirán en la siguiente sección). La evaluación de las fracciones se hizo mediante SDS-PAGE al 12%.

4.5. Ruptura celular y purificación de la PAS-PGK recombinante de *T. cruzi*

www.bdigital.ula.ve

La proteína recombinante fue purificada mediante una cromatografía de afinidad a metales utilizando una columna His-Link™ acoplada a níquel, de la casa comercial Promega.

A partir de un cultivo de 500 ml, se montó una inducción bajo las condiciones previamente establecidas (sección 4.4.1). Pasadas las 48 horas del tiempo de inducción, se centifugó y las células fueron recolectadas y guardadas a -20 °C. El sedimento fue resuspendido en 10 ml de tampón de lisis (50 mM de Tris- HCl, 100 mM de NaCl), suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich dilución 1/1000), con PMSF (1mM) y 5 mg de lisozima, luego se dejó durante 1 hora en hielo y se almacenó a -20 °C durante un mínimo de 12 horas. Para romper el ADN presente en la muestra, se sometió el homogenato a una sonicación de 8 pulsos de intensidad 7 por 20 segundos con intervalos de descanso de 3,5 minutos en frío (mezcla de agua:hielo). Las bacterias lisadas se centrifugaron a 12000 x g por 20 minutos y el sobrenadante se pasó través de 1 ml de resina, previamente equilibrada con 20 ml de buffer de unión (50 mM de Tris- HCl, 100 mM de NaCl y 10 mM de imidazol pH 7,5). A continuación, se hizo un lavado con 20 ml de buffer de lisis suplementado con 20 mM en imidazol y luego un lavado con 20 ml de buffer de lisis, suplementado con 50 mM en imidazol. La proteína recombinante PAS-PGK fue eluida con 5 ml de buffer de lisis

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

suplementado con 250 mM de imidazol, recolectando en fracciones de 1 ml. El grado de pureza de la proteína recombinante se evaluó mediante geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE al 12%). En la tabla 2 se resumen las condiciones utilizadas para la purificación de la proteína PAS-PGK recombinante.

4.5.1. Optimización de la ruptura celular y purificación de la PAS-PGK recombinante de *T. cruzi*

Debido a la dificultad que se observaba al medir la actividad de la proteína PAS-PGK recombinante de *T. cruzi*, se buscó optimizar el proceso de ruptura celular y purificación.

Con el fin de aumentar el rendimiento de la purificación para obtener más proteína y así facilitar la medición de actividad se decidió seguir el protocolo para la purificación de la PAS-PGK recombinante de *Leshmania major* propuesto por Adhikari *et al*. (2019). Para ello, el sedimento de un cultivo de 500 ml (obtenido bajo las condiciones descritas en la sección 4.4.3) fue resuspendido en 10 ml de tampón de lisis (50 mM de Tris-HCl, 250 mM de KCl, 10% glicerol), suplementado con cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich dilución 1/1000), con PMSF (1mM) y 5 mg de lisozima, luego se dejó durante 1 hora en hielo y se almacenó a -20 °C durante un período mínimo de 12 horas. Luego, la muestra se descongeló durante 5 min a 37 °C, seguidamente se agregó DNAsas (dilución 1/1000) y se incubó durante 15 min a 37 °C y luego otros 15 min en hielo. Para terminar de eliminar el ADN de la muestra, se sometió el homogenato a una sonicación de 8 pulsos de intensidad 8 por 20 segundos con intervalos de descanso de 5 minutos en frío (mezcla de agua:hielo). Para la obtención de un extracto clarificado, las células se centrifugaron en tres etapas: (1) a 3000 xg durante 20 min, (2) se tomó el sobrenandante y nuevamente se centrifugó a 3000 xg durante 15 min y (3) el sobrenadante se transfirió a tubos Eppendorf y se centrifugó a 12000 xg por 5 minutos. El extracto se incubó durante 45 min en 1 ml de resina, previamente equilibrada con buffer unión (50 mM de Tris-HCl, 250 mM de KCl, glicerol 10 % y 10 mM de Imidazol pH 7,5). Se hizo un lavado con 20 ml de buffer de lisis suplementado con 20 mM en imidazol y luego un lavado con 20 ml de buffer de lisis, suplementado con 50 mM en imidazol. La proteína recombinante PAS-PGK fue eluida con 5 ml de buffer de lisis

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

suplementado con 250 mM de imidazol, recolectando un pool de 3 ml y dos fracciones de 1 ml.

Debido a la necesidad de tener certeza sobre la identidad de la proteína PAS-PGK recombinante, era necesario purificarla a homogeneidad, para tener seguridad que al momento de medir su actividad esta fuera específicamente de la proteína de interés y no fuera afectada por la presencia de un contaminante. Por este motivo, se hicieron otros ensayos de purificación adicionales (tabla 2.B).

Para disminuir la presencia de contaminantes en la fracción purificada, se realizó una purificación con el uso de un gradiente lineal de imidazol (a diferencia de los ensayos anteriores donde se usó un gradiente discontinuo), con un rango desde 50 hasta 300 mM de imidazol, utilizando un hacedor de gradiente conectado a una bomba P-1 peristáltica con una velocidad de 3.5, y a un colector de fracciones LBK (Pharmacia biotech). Para este ensayo se cambió la composición del buffer tanto de lisis como el utilizado para equilibrar la columna y eluir la proteína, motivado a: (1) lograr que la proteína se uniera a la resina y (2) que eluya con la menor cantidad de contaminantes posibles. El protocolo de inducción y ruptura celular seguido fue aquel descrito en la sección 4.2.3, las células fueron resuspendidas en 20 ml de buffer Tris-HCl (25 mM), KCl (500 mM), glicerol (5 %), ß-mercaptoetanol (2 mM) e imidazol (10 mM) pH 7,8 suplementado con PMSF (1mM); seguidamente este lisado se almacenó a -20 ºC durante toda la noche, transcurrido el tiempo se descongeló la muestra y se le agregó 5 mg de lisozima, se incubó en hielo durante 45 min y luego se incubó con DNAsas (dilución 1/1000) durante 1 hora. Para terminar de romper el ADN de la muestra, a esta se le aplicaron 8 pulsos de sonicación de intensidad 8 con una duración de 10 seg e intervalos de descanso de 5 min en frío, se separó el pellet y el sobrenadante mediante centrifugación, el sobrenadante fue colectado y filtrado a través de un filtro de 0,2 µM para luego pasarse cuatro veces por 1,5 ml de resina His-link. Se realizó un lavado con 75 ml de buffer Tris-HCl (25 mM), KCl (500 mM), glicerol (5 %), ß-mercaptoetanol (2 mM) e imidazol (10 mM) pH 7,8; seguido de un lavado de 50 ml con buffer Tris-HCl (25 mM), KCl (250 mM), glicerol (5 %), ß-mercaptoetanol (2 mM) e imidazol (50 mM) pH 7,4. Como se mencionó anteriormente, la elución de la proteína se hizo con un gradiente continuo, que comprendía un rango de entre 50 y 300 mM de imidazol; se colectaron fracciones de 2 ml (40 gotas). Dependiendo del ensayo la muestra fue dializada en una columna pd10

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

(Amhershan) y concentrada 10 veces. El grado de pureza de la proteína recombinante para cada uno de los ensayos se evaluó mediante geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE al 12%). En la tabla 2 se resumen las condiciones utilizadas para la purificación de la proteína PAS-PGK recombinante.

Tabla 2. Condiciones de purificación utilizadas para la obtención de la proteína PAS-PGK recombinante.

Ensayo	Buffer de lisis	Buffer de Unión	Lavados	Buffer de Elución
A	10 ml de Tris-HCl (50 mM), NaCl (100 mM) pH 7,5 suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (dilución 1/1000) y PMSF (1mM)	20 ml de Tris-HCl (50 mM), NaCl (100 mM) + Imidazol (10 mM) pH 7,5	2 lavados de 20 ml c/u Lavado 1: Tris-HCl (50 mM), NaCl (100 mM) + Imidazol (20 mM) Lavado 2: Tris-HCl (50 mM), NaCl (100 mM) + midazol (50 mM) pH 7,5	5 ml de Tris-HCl (50 mM), NaCl (100 mM) + Imidazol (250 mM) pH 7,5
B	20 ml de Tris-HCl (50 mM), KCl (250 mM), glicerol 10% pH 7,5 suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (dilución 1/1000) y PMSF (1mM)	20 ml de Tris-HCl (50 mM), KCl (250 mM) / glicerol 10 % + Imidazol (10 mM) pH 7,5	2 lavados de 20 ml c/u Lavado 1: Tris-HCl (50 mM), KCl (250 mM), glicerol 10% + Imidazol (20 mM) Lavado 2: Tris-HCl (50 mM), KCl (250 mM), glicerol 10% + Imidazol (50 mM) pH 7,5	5 ml de Tris-HCl (50 mM), KCl (250 mM), glicerol 10% + Imidazol (250 mM) pH 7,5
C	20 ml de Tris-HCl (25 mM), KCl (500 mM), glicerol 5%, ß-mercaptoetanol (2 mM), Imidazol (10 mM) pH 7,8 suplementado con PMSF (1 mM)	30 ml de Tris-HCl (25 mM), KCl (500 mM), glicerol 5%, ß-mercaptoetanol (2 mM), Imidazol (10 mM) pH 7,8 suplementado con PMSF (1 mM)	2 lavados: Lavado 1: 75 ml de buffer Tris-HCl (25 mM), KCl (500 mM), glicerol 5% , ß-mercaptoetanol (2 mM), Imidazol (10 mM) pH 7,8 Lavado 2: 50 ml de buffer Tris-HCl (25 mM), KCl (200 mM), glicerol 5% , ß-mercaptoetanol (2mM), Imidazol (50 mM) pH 7,4	Gradiente de elución entre 50 – 300 mM de imidazol. 25 ml de buffer Tris-HCl (25 mM), KCl (200 mM), glicerol 5% , ß-mercaptoetanol (2mM), Imidazol (50 mM) pH 7,4 25 ml de buffer Tris-HCl (25 mM), KCl (200 mM), glicerol 5% , ß-mercaptoetanol (2mM), Imidazol (300 mM) pH 7,4

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

4.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

La electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes se realizó siguiendo el protocolo descrito por Laemmli (1970). El gel de resolución se preparó al 12 % de acrilamida en solución buffer Tris-HCl 375 mM pH 8.8, 0.1 % (p/v) de SDS, 0.01 % (p/v) de persulfato de amonio y 0.3 % (v/v) de TEMED. El gel concentrador se preparó al 5 % de acrilamida en solución buffer Tris-HCl 125 mM, pH 6.8, 0.1 % (p/v) de SDS, 0.02 % (p/v) de persulfato de amonio y 0.5 % (v/v) de TEMED.

Las muestras de proteínas fueron mezcladas con solución buffer de muestra (62 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2 % (p/v) de SDS, 10 % (v/v) de glicerol, 100 mM de β-mercaptoetanol y azul del bromofenol) en relación 4:1, hervidas durante 5 min y luego centrifugadas por 30 segundos a máxima velocidad en una microcentrífuga Eppendorf, para luego cargar los sobrenadantes en los pozos destinados. Las corridas electroforéticas se realizaron a 15 miliamperios fijos y voltaje libre, utilizando el sistema para mini geles *Biorad* en buffer de corrida (Tris 25 mM, Glicina 190 mM, 0.1% (p/v) SDS), pH 8.3.

www.bdigital.ula.ve

La visualización de las proteínas en los geles se realizó mediante la tinción en solución colorante (45.2 % (v/v) de metanol, 9.2 % (v/v) de ácido acético glacial y 0.25 % (p/v) de azul de Coomassie R250) durante aproximadamente 45 minutos, seguido del tratamiento de los mismos con solución decolorante (25 % (v/v) de metanol y 7.5 % (v/v) de ácido acético glacial) durante 2 horas.

Se usaron los marcadores de peso molecular para SDS-PAGE de Sigma: albúmina de suero bovino (66 kDa), albúmina de huevo (45 kDa), gliceraldehído-3-P-deshidrogenasa (36 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), tripsinógeno (24 kDa), inhibidor de tripsina (20 kDa) y lactoalbúmina (14.2 kDa).

4.7. Determinación de la concentración de proteínas

La determinación de proteínas se realizó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA). Cada una de las

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

fracciones obtenidas en la purificación se le agregó 1 ml de reactivo de Bradford de la casa comercial Bio-Rad, se dejó reaccionando durante 10 min y se midió la densidad óptica de la muestra (D.O) a 595nm.

4.8. Western blot

La identificación específica de la proteína recombinante como una proteína PGK que contiene un dominio PAS se hizo mediante inmunodetección con la técnica de Western Blot, donde se utilizaron anticuerpos primarios α-PGKA de *Trypanosoma cruzi* (Quiñones *et al*., 2008), α-PGKC de *Trypanosoma brucei* (donado por el Dr. Paul Michels) y α-PAS (Rondón, 2018).

La proteína recombinante purificada se sometió a una corrida electroforética en SDS-PAGE, el gel obtenido fue equilibrado durante 20 min en tampón de transferencia (Tris-base 48 mM, glicina 38 mM y metanol 20% v/v). Seguidamente se realizó la transferencia de las proteínas desde el gel hacia una membrana de nitrocelulosa previamente hidratada por 2 min en agua destilada y equilibrada por 15 min en tampón de transferencia. La transferencia se hizo de manera activa mediante la aplicación de un campo eléctrico en una cámara de transferencia Semi-dry (Amershan biosciences), durante una 1 hora 30 min, con una intensidad de corriente según el área a transferir igual a 0,8 mA/cm^2 (Ausubel *et al*., 1989).

Terminada la transferencia, las membranas fueron incubadas en solución de bloqueo (5% p/v de leche descremada; 0,1 % v/v de tween 20, en tampón fosfato salino (PBS) pH 7,4) durante toda la noche a 4 °C. Luego, las membranas fueron lavadas tres veces, durante 5 min cada vez, en agitación y a temperatura ambiente con solución de lavado (0,1 % de Tween 20 en PBS). La incubación de la membrana con los anticuerpos primarios se realizó a temperatura ambiente y en agitación durante una hora. Los anticuerpos primarios producidos en conejo, α-PGKA y α-PAS, se utilizaron en una dilución 1/50, mientras que el anticuerpo primario α-PGKC se utilizó en una dilución 1/250 en tampón de incubación (1% p/v de leche descremada en PBS). Posteriormente las membranas fueron lavadas como se describió antes y seguidamente fueron incubadas durante una hora en agitación y a temperatura ambiente, con el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo producido en cabra, acoplado a peroxidasa

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

de Sigma-Aldrich) en solución de incubación. Finalizada la incubación con el anticuerpo secundario se lavaron las membranas tres veces durante 5 min a temperatura PBS. El revelado se hizo introduciendo la membrana en solución de revelado (0,05 % p/v de diaminobenzidina y 0,192 mM de $CoCl_2$, en PBS). La reacción se disparó con 25 µl de H_2O_2 al 3% (para un volumen de 5 ml de solución) y se incubó por unos minutos en agitación hasta observar señal o transcurridos 30 min. La reacción se detuvo descartando la solución de revelado y lavando las membranas con agua destilada.

4.9. Ensayos Enzimáticos

4.9.1. Medición de la actividad de la PAS-PGK

La actividad de la PAS-PGK se determinó midiendo la desaparición de NADH a 340 nm, en una mezcla de reacción preparada en una cubeta con un volumen final de 1ml que contenía la enzima a ensayar PAS-PGK purificada y los sustratos ATP (3 mM) y 3-fosfoglicerato (3mM), además de NADH (0,4 mM), sulfato de magnesio ($MgSO_4$) 2 mM, buffer trietanolamida (TEA) 0,1 mM pH 7,6 y 1,4 UE.µl-1 de la enzima acoplante gliceraldehido-3-fostato deshidrogenasa (GAPDH). La reacción es:

www.bdigital.ula.ve

$$\text{3-fosfoglicerato + ATP} \xleftrightarrow{\text{PAS-PGK}} \text{1,3-bifosfoglicerato + ADP}$$

$$\text{1,3- bifosfoglicerato + NADH} \xleftrightarrow{\text{GAPDH}} \text{gliceraldehído-3-fosfato + } NAD^+$$

4.9.2. Determinación de la variación de la actividad con respecto a la concentración de la enzima PAS-PGK recombinante de *T. cruzi*

Para estudiar si existe dependencia de la actividad específica de la enzima con respecto a su concentración, se realizaron ensayos en donde se varió la concentración de muestra (enzima PAS-PGK purificada) 0,1 a 10 µg.ml^{-1}, manteniendo saturantes las concentraciones de sustratos (ATP 3 mM y 3PGA 3 mM). La medición de actividad se realizó de la manera descrita en la sección 4.9.1.

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

4.9.3. Evaluación de la actividad de la enzima PAS-PGK recombinante de *T. cruzi*

Distintas condiciones de trabajo o ensayo fueron evaluadas para facilitar la medición de actividad de la proteína PAS-PGK recombinante. A continuación, se describirán brevemente los ensayos realizados.

(1) Se varió la concentración de $MgSO_4$ en el buffer de medición, ya que basándose en lo reportado por Biswas *et al* (2020), la actividad de la enzima en *Leishmania major* disminuye al utilizar concentraciones mayores de 0,8 mM de $MgSO_4$. Las concentraciones evaluadas en este estudio fueron 0,25; 0,50; 0,8 y 2 mM de $MgSO_4$.

(2) Se utilizaron distintas concentraciones de los sustratos ATP y 3-PGA, ya que se ha reportado una inhibición por sustrato (ATP) en la PAS-PGK de *L. major* (Biswas *et al*., 2020). En este caso se evaluaron las siguientes concentraciones: 0,5; 1 y 3 mM de ATP y 2,5 y 3 mM de 3PGA.

(3) Se probaron distintos tampones de medición, estos fueron: TEA 0,1 M pH 7,5; Tris-HCl 50 mM pH 7,5 y Acético/Acetato 0,1 M pH 5,5.

www.bdigital.ula.ve

4.10. Análisis de datos cinéticos

Con los datos de velocidades iniciales en función de concentraciones de sustratos se determinarán los parámetros cinéticos utilizando las ecuaciones y gráficas apropiadas con la ayuda del programa Sigma Plot versión 11.0.

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

5. RESULTADOS

5.1. Estudios bioinformáticos

5.1.1. Evaluación de la secuencia aminoacídica de la proteína PAS-PGK de *Trypanosoma cruzi*

La secuencia aminoacídica de la proteína PAS-PGK de *T. cruzi* fue analizada con InterPro, un software que utiliza un conjunto de bases de datos para la identificación y descripción de dominios y regiones que componen una proteína. El resultado obtenido muestra que esta es una proteína multidominio, identificando un dominio PAS, que corresponde a aproximadamente los primeros 113 residuos de aminoácidos ubicados en la región N-terminal y un dominio PGK, que corresponde a los aminoácidos restantes ubicados en la región C-terminal (Figura 5).

Figura 5. Predicción de dominios en la secuencia aminoacídica de la PAS-PGK de *Trypanosoma cruzi*. Se observa la presencia de un dominio PGK y un dominio PAS.

5.1.2. Modelado del dominio PAS, del dominio PGK y de la proteína PAS-PGK

Para evaluar la interacción entre la glucosa y la proteína PAS-PGK se necesita disponer, de la estructura de la proteína y como esta no esta resuelta por técnicas como cristalografía de rayos X o RMN, se realizó un modelo o estudio *in silico* del péptido dominio PAS, la

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

proteína PAS-PGK sin el dominio PAS (PAS-PGK truncada o dominio PGK) y la proteína PAS-PGK completa.

Inicialmente usando o trabajando con la secuencia de 130 aminoácidos del péptido correspondiente al dominio PAS, el modelo obtenido con el servidor QUARK muestra que el dominio PAS de la proteína PAS-PGK de *T. cruzi*, adopta el plegamiento α/β típico de estos dominios con múltiples alfa hélices flanqueantes y un núcleo compuesto por láminas beta antiparalelas (Figura 6). A diferencia de otros dominios PAS, como el clásico PYP o el dominio FixL de *Rhizobia* (Groese y Rutter, 2010), cuyo núcleo está compuesto por cinco láminas beta antiparalelas, el núcleo del dominio PAS de *T. cruzi* presenta sólo dos láminas beta y un conjunto de *loops*.

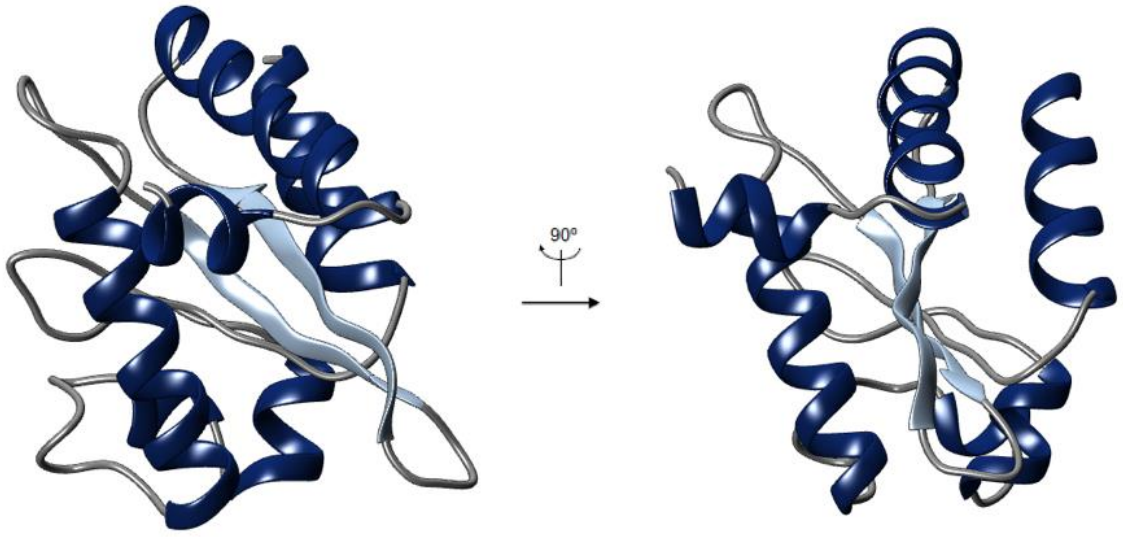


Figura 6. Estructura tridimensional del péptido dominio PAS perteneciente a la proteína PAS-PGK de *Trypanosoma cruzi.* Se muestra el plegamiento PAS característico, con un núcleo compuesto por láminas beta y flanqueado por hélices alfa.

Para el modelado de la proteína PAS-PGK truncada, se insertó la secuencia de 397 aminoácidos que corresponde al dominio PGK de la proteína completa, en el servidor Phyre2. En la figura 7 se presenta el resultado, siendo la estructura similar a la de otras PGK compuestas por un dominio N y C -terminal conectados por una región de bisagra flexible,

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

con el sitio de unión para 1,3 bifosfoglicerato (1,3 BPG) en la región N-terminal y para ADP en la región C-terminal (figura 7.B).

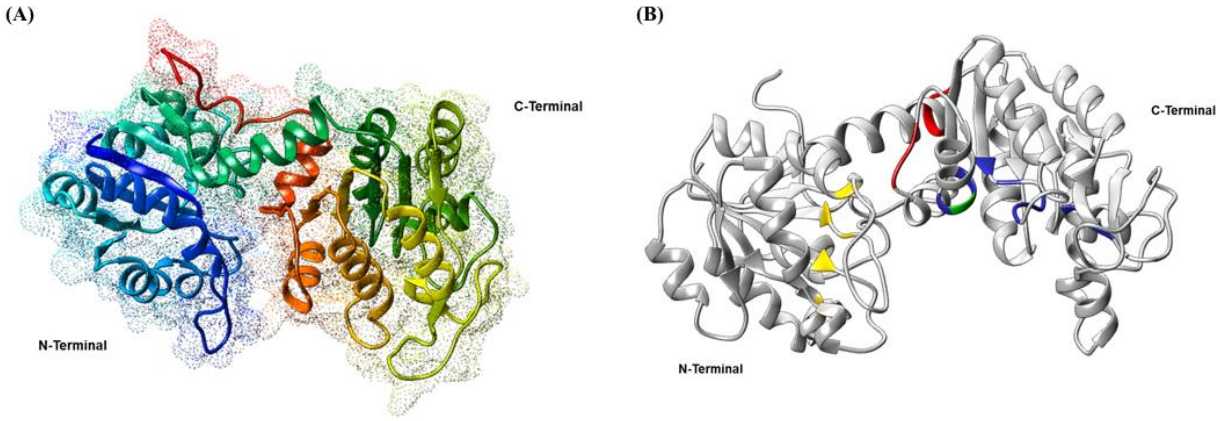


Figura 7. Estructura de la proteína PAS-PGK truncada (dominio PGK) de *T. cruzi*. (A) Estructura secundaria y de superficie de la PAS-PGK truncada, se presentan los dominios N-terminal (azul) y C-terminal (rojo). (B) Estructura secundaria de la PAS-PGK truncada, los colores indican los sitios activos identificados en la proteína: sitio de unión de sustratos 1,3 BPG (amarillo) y ADP (azul), sitio de la bisagra flexible (rojo) y sitio catalítico (verde).

www.bdigital.ula.ve

Por último, se modeló la secuencia completa de 527 aminoácidos correspondiente a la proteína PAS-PGK de *T. cruzi*. El dominio PAS se encuentra ubicado en la región N-terminal de la proteína mientras que el dominio catalítico PGK se sitúa entre el dominio PAS y la región C-terminal (Figura 8.A). En contraste con el modelo de la secuencia del dominio PAS solo (figura 6), en la proteína completa se observan las cinco láminas antiparalelas típicas de los dominios PAS, lo que sugiere que posiblemente la secuencia del linker que une al péptido con el dominio PGK es necesario para que adopte esta conformación. Adicionalmente, en la figura 8.B se presentan las regiones que participan en la unión de los sustratos, el residuo catalítico y la región de bisagra flexible para el dominio PGK, y en el dominio PAS se muestran las regiones involucradas en la unión de ligandos.

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

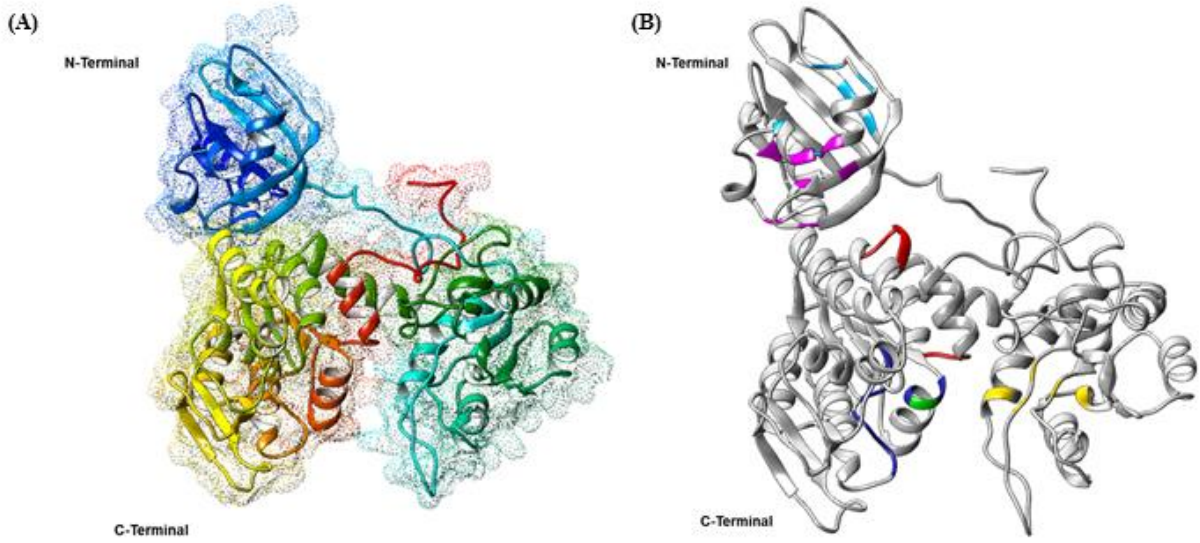


Figura 8. Estructura de la PAS-PGK completa de *T. cruzi*. (A) Estructura secundaria y de superficie de la PAS-PGK, se presentan los dominios N-terminal (azul) y C-terminal (rojo). El dominio PAS se presenta de color azul y turquesa en la región N-terminal de la proteína y el dominio PGK se presenta en verde, rojo, naranja y amarillo. (B) Estructura secundaria de la PAS-PGK, los colores indican los residuos de aminoácidos de los sitios activos de las regiones correspondientes al dominio PAS y al dominio PGK. Dominio PAS: sitio activo putativo de unión a ligandos (rosado) y bolsillo de unión química o de unión al grupo hemo (turquesa). Dominio PGK: sitio de unión de sustratos 1,3 BPG (amarillo) y ADP (azul), sitio de la bisagra flexible (rojo) y sitio catalítico (verde).

www.bdigital.ula.ve

5.1.3. Refinamiento y validación del modelo

Las estructuras descritas fueron refinadas y optimizadas con el servidor GalaxyWEB, seguidamente fueron validadas mediante gráficos de Ramachandran utilizando RAMPAGE: Ramachandran Plot Assement. Las regiones favorables general y Pro-Pro se muestran en color azul oscuro y representan las mejores combinaciones de los valores phi-psi. La región general y la región Pro-Pro permitida se muestran en azul claro. La región favorable y permitida para la glicina se presentan en naranja oscuro y claro respectivamente. La región no permitida es de color blanco. Los valores obtenidos para los residuos que se ubican en las regiones favorables, permitidas y no permitidas de los modelos de las proteínas antes y después del refinamiento se resumen en la tabla 3 y 4, las gráficas se muestran en la figura 9. Se observa que después del refinamiento aumenta la cantidad residuos presentes en la región favorable.

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

Tabla 3. Valores de las regiones del gráfico de Ramachandran para los modelos del péptido dominio PAS, proteína PAS-PGK truncada y proteína PAS-PGK completa antes del refinamiento.

Modelo	Región favorable (%)	Región permitida (%)	Región desfavorable (%)
Dominio PAS	77,3	15,6	7,0
PAS-PGK truncada	95,4	3,0	1,5
PAS-PGK	92,0	4,6	3,4

www.bdigital.ula.ve

Tabla 4. Valores de las regiones el gráfico de Ramachandran para los modelos del péptido dominio PAS, proteína PAS-PGK truncada y proteína PAS-PGK completa después del refinamiento.

Modelo	Región favorable (%)	Región permitida (%)	Región desfavorable (%)
Dominio PAS	100	0,0	0,0
PAS-PGK truncada	98,5	1,0	0,5
PAS-PGK	97,1	1,9	1,0

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

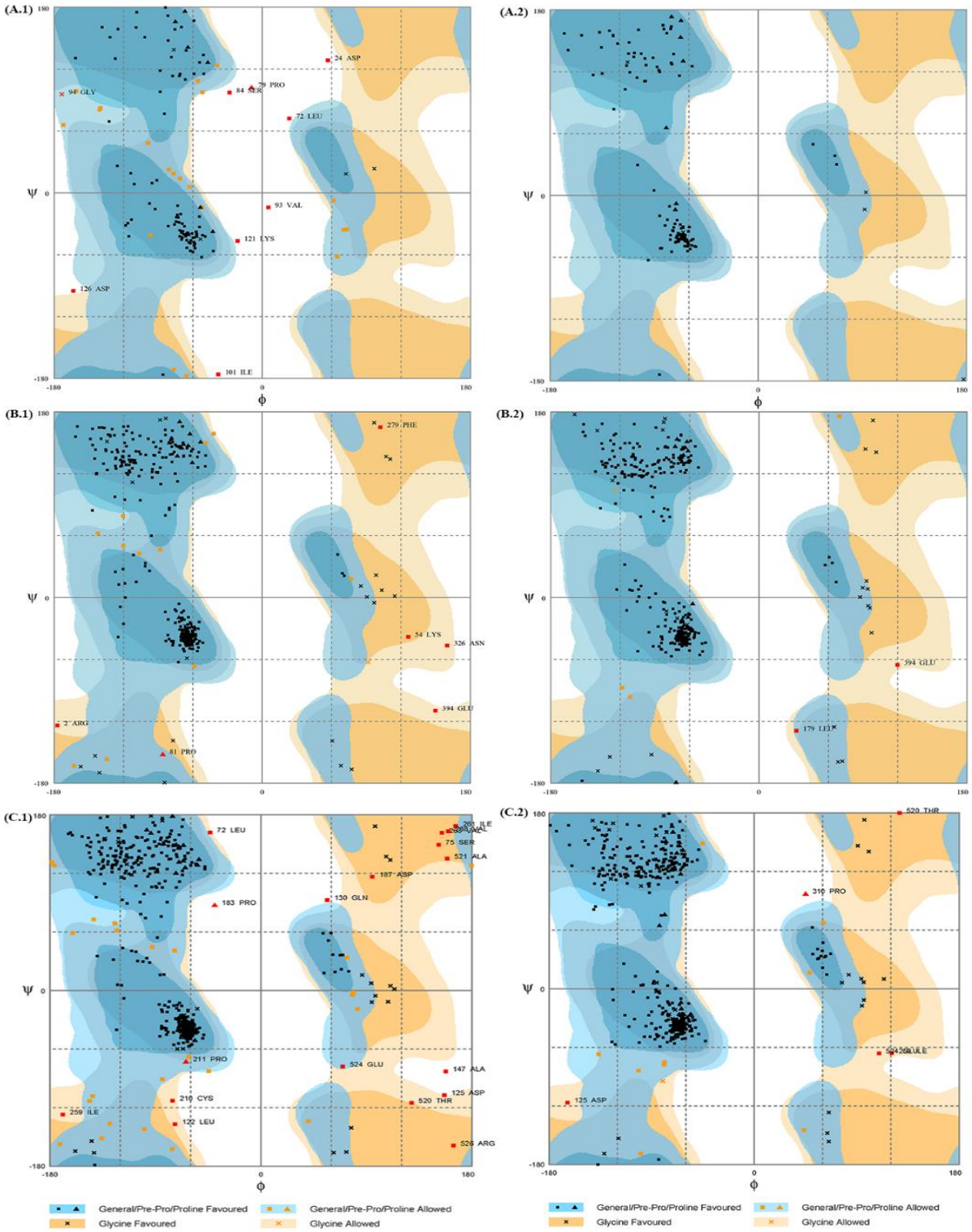


Figura 9. **Gráfico de Ramachandran para los modelos del dominio PAS y las proteínas PAS-PGK truncada y PAS-PGK.** Las regiones favorables generales y Pro-Pro se muestran en azul oscuro. Las regiones general y Pro-Pro permitidas se muestran en azul claro. Las regiones favorables y regiones permitidas de la glicina se presentan naranja oscuro y naranja claro respectivamente. (A) Gráfico de Ramachandran para el modelo del péptido dominio PAS, A.1 antes del refinamiento, A.2 después del refinamiento. (B) Gráfico para el modelo de la proteína PAS-PGK truncada, B.1 antes del refinamiento, B.2 después del refinamiento. (C) Gráfico para el modelo de la proteína PAS-PGK completa, C.1 antes del refinamiento, C.2 después del refinamiento.

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

5.1.4. Estudios de acoplamiento molecular de la glucosa con el dominio PGK y la proteína PAS-PGK completa de *Trypanosoma cruzi*

En la proteína PAS-PGK de *T. cruzi* por análisis bioinformáticos se han reportado seis residuos involucrados en la unión a carbohidratos ubicados en el extremo C-terminal del dominio PGK (Rojas-Pirela, resultados no publicados). Para estudiar la posible unión de glucosa, a estos residuos se procedió a realizar un docking molecular a través de la plataforma SwissDock. Evaluando la unión de la glucosa tanto con la proteína truncada como con la completa.

5.1.4.1. Estudios de acoplamiento entre la glucosa y el dominio PGK de la proteína PAS-PGK

Con el fin de estimar o comprobar la validez o ajuste del programa utilizado se realizó el estudio de acoplamiento para el sustrato ADP con la enzima para determinar si existía el solapamiento ya reportado entre los residuos para la unión de azúcares y el sitio de unión para el ADP. En la figura 10 se muestra el acoplamiento entre el ADP y la proteína PAS-PGK truncada (dominio PGK), donde la variación de energía libre para la asociación entre el sustrato y la proteína fue de -12,17 kcal/mol. De los residuos identificados para la unión al sustrato solo se encontró una interacción por puentes de hidrógeno con la glicina 351 (Gly 351).

www.bdigital.ula.ve

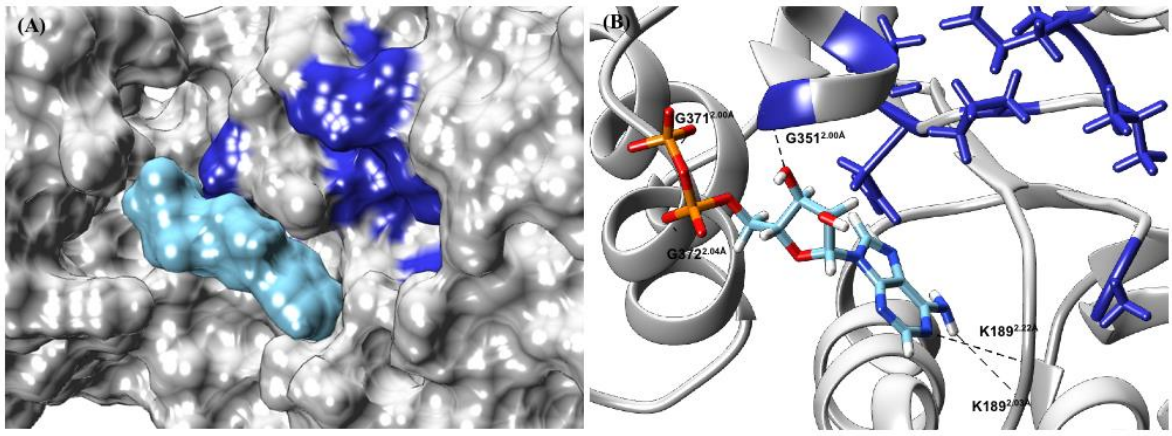


Figura 10. Acoplamiento molecular entre el ADP y la proteína PAS-PGK truncada de *Trypanosoma cruzi*. (A) Estructura de superficie entre el ADP (azul turquesa) y la PAS-PGK truncada (gris). (B) Modelo de interacción energéticamente más favorable entre el ADP y la proteína PAS-PGK truncada (ΔG = -12,17 kcal/mol). Las regiones en azul oscuro indican los residuos reportados para el sitio de unión a ADP.

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

Para la interacción entre la glucosa y la proteína truncada, Fig. 11, se encontró que los residuos que posiblemente estén interactuando mediante la formación de puentes de hidrógeno con la glucosa son lisina 189 (Lys 189), alanina 188 (Ala 188) y ácido glutámico 352 (Glu 352), los cuales se ubican en la región C-terminal de la proteína correspondiente al dominio PGK, cercano al sitio de unión a ADP. La interacción con el residuo Glu 352 es de interés ya que este está reportado como el residuo catalítico de la proteína, sugiriendo que teóricamente podría existir una interferencia en la catálisis del sustrato. La variación de energía libre (ΔG) para la unión del ligando con la proteína es de – 6,89 kcal/mol y todas las interacciones presentan una distancia menor de 3.6 Å, que indica una unión muy favorable entre el ligando y los residuos de aminoácidos.

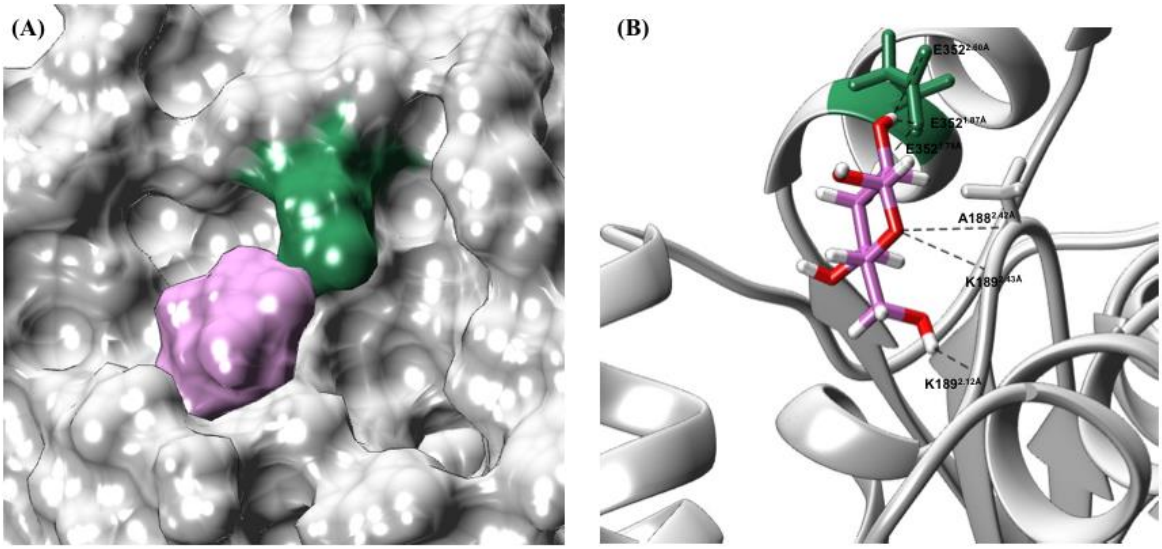


Figura 11. Acoplamiento molecular entre la glucosa y la proteína PAS-PGK truncada de *Trypanosoma cruzi*. (A) Estructura de superficie entre la glucosa (morado) y la PAS-PGK truncada (gris). (B) Modelo de interacción energéticamente más favorable entre la glucosa y la proteína PAS-PGK truncada (ΔG = -6,89 kcal/mol). La región en verde oscuro hace referencia al residuo catalítico reportado para la proteína.

5.1.4.2. Estudios de acoplamiento entre la glucosa y la proteína PAS-PGK

Para evaluar la interacción entre la glucosa con la proteína PAS-PGK completa se consideran dos parámetros, la variación de energía libre de unión (ΔG) y la formación de puentes de hidrógeno entre el ligando y el receptor. En la figura 12 se exponen los modelos seleccionados; la figura 12.A corresponde al modelo donde el acoplamiento presenta la

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

mayor formación de puentes de hidrógeno y se observa que los residuos que interactúan con el ligando son serina 33 (Ser 33) y arginina 15 (Arg 15), ubicados en la región N-terminal de la proteína que corresponde al dominio PAS y esta interacción tiene un ΔG = -6,17 kcal/mol. En contraste, en la figura 12.B se presenta el modelo de interacción energéticamente más favorable entre la glucosa y la proteína PAS-PGK con un ΔG = -6,73 kcal/mol, donde los residuos involucrados en la unión del ligando con el receptor son leucina 213 (Leu 213) y serina 212 (Ser 212), los cuales se encuentran ubicados en la región C-terminal del dominio PGK.

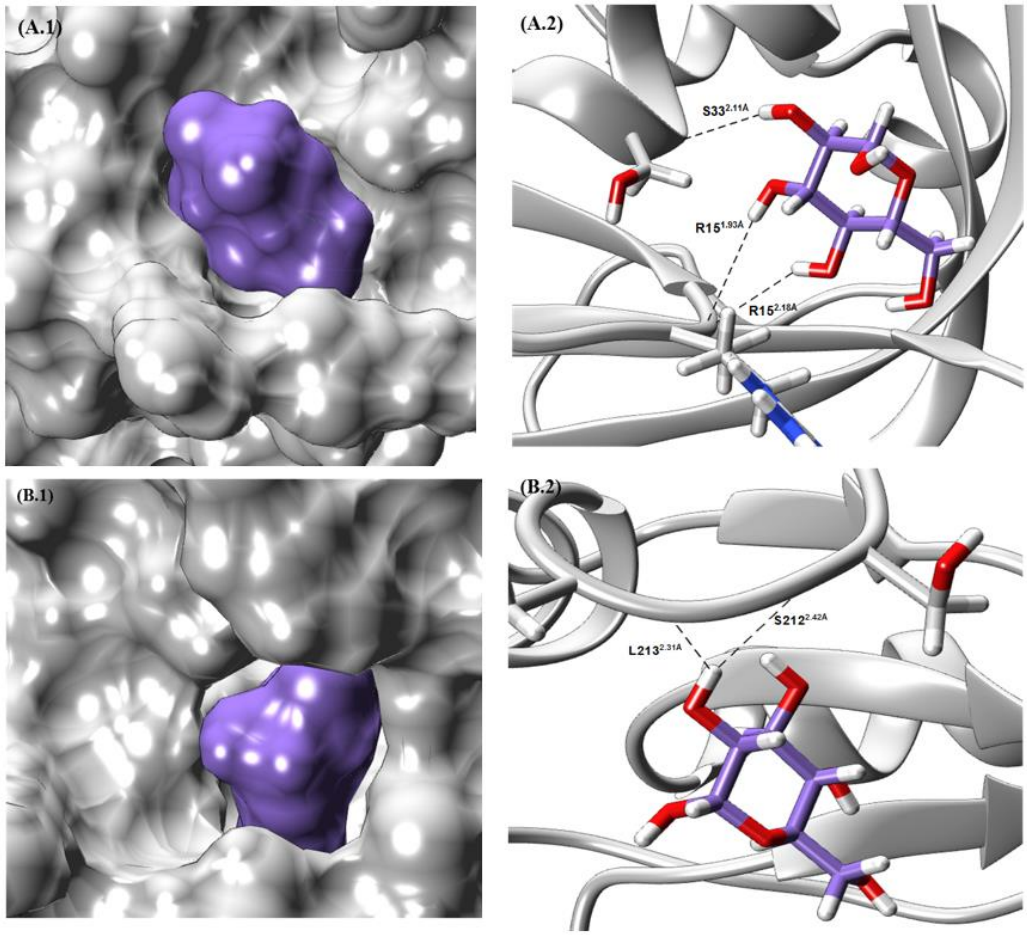


Figura 12. Acoplamiento molecular entre la glucosa y la proteína PAS-PGK de *Trypanosoma cruzi*. (A) Interacción que presenta la mayor formación de puentes de hidrógeno (ΔG = -6,17 kcal/mol) entre la proteína PAS-PGK (gris) y la glucosa (morado), A.1 estructura de superficie, A.2 estructura secundaria. (B) Modelo de interacción energéticamente más favorable entre la glucosa y la proteína PAS-PGK (ΔG = -6,73 kcal/mol), B.1 estructura de superficie, B.2 estructura secundaria.

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

En la tabla 5 se resumen los valores que se obtuvieron para cada uno de los parámetros considerados en los estudios de acoplamiento (*docking*), de las diferentes proteínas con el ADP y la glucosa.

Tabla 5. Parámetros de acoplamiento evaluados para la interacción entre las proteínas PAS-PGK truncada y PAS-PGK completa con la glucosa

Modelo	ΔG (kcal/mol)	FullFitness (kcal/mol)	Puentes de hidrógeno
PAS-PGK truncada – ADP	-12,17	-2400,74	6
PAS-PGK truncada – Glucosa	-6,89	-2111,76	6
PAS-PGK – Glucosa	-6,17 (N-Ter)	-3153,23	5
	-6,73 (C-Ter)	-3160,09	3

www.bdigital.ula.ve

5.1.5. Estudios de acoplamiento entre el FAD^+ y el dominio PAS de la proteína PAS-PGK completa

Para evaluar *in silico* está interacción se decidió hacer un estudio de acoplamiento o docking molecular entre el dominio PAS de la proteína PAS-PGK de *T. cruzi* y el FAD^+. En la figura 13 se muestra la interacción energéticamente más favorable entre el ligando y la proteína, presentando un valor de variación de energía libre (ΔG) de -12,28 kcal/mol, y los residuos que posiblemente están interactuando mediante la formación de puentes de hidrógenos con el FAD^+ son aspartato 8 (Asp 8), aspartato 29 (Asp 29), metionina 30 (Met 30) y arginina 32 (Arg 32), los cuales se ubican en la región N-terminal de la proteína. Se destaca la interacción con el residuo Met 30, que es uno de los residuos que se reporta como parte del sitio activo putativo, también conocido como el sitio de unión a ligandos en el dominio PAS.

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

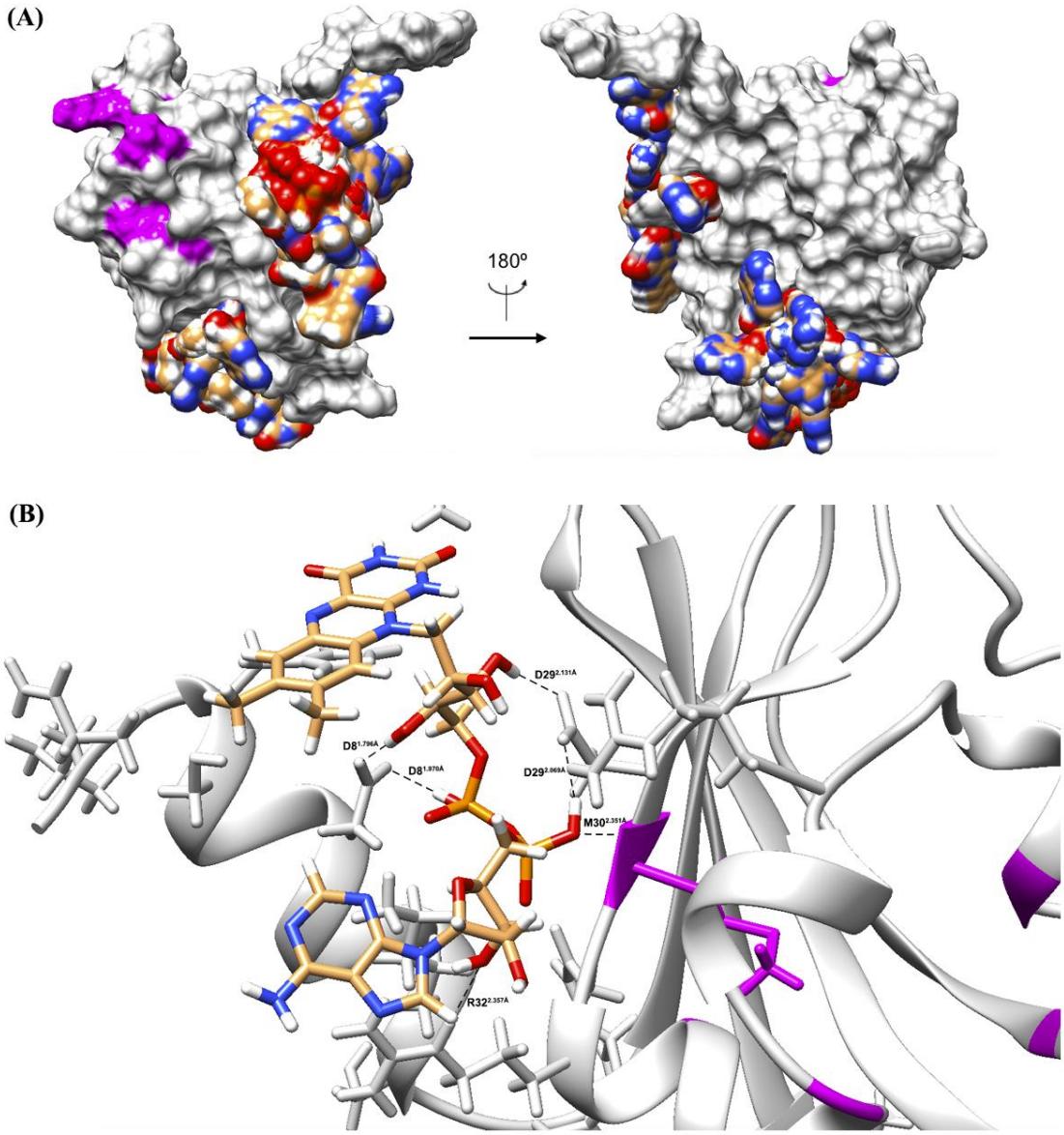


Figura 13. Acoplamiento molecular entre el FAD+ y el dominio PAS de la proteína PAS-PGK de *Trypanosoma cruzi*. (A) Estructura de superficie de la interacción entre el FAD+ (naranja) y la proteína PAS-PGK (gris). (B) Modelo de interacción energéticamente más favorable entre el FAD^+ y la proteína (ΔG = - 12,28 kcal/mol). La región en fucsia indica los residuos del sitio activo putativo, que se han reportado participan en la unión de ligandos en el dominio PAS.

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

5.1.6. Comparación de la secuencia de la proteína PAS-PGK de *Trypanosoma cruzi* con otras PGKs y análisis de los motivos de unión a carbohidratos.

Para evaluar el grado de conservación de la proteína PAS-PGK de *Trypanosoma cruzi* en la familia tripanosomatidae, se realizó un alineamiento local con otras proteínas PAS-PGK de otros organismos pertenecientes a esta familia, dentro de los cuales se consideraron *Trypanosoma rangeli*, *Leshmania major* y *Leptomonas pyrrhocoris*. El alineamiento de la secuencia muestra un grado de conservación en la región que correspondería a el dominio PGK, específicamente en los residuos de aminoácidos que formarían parte de los sitios de unión a los sustratos, ADP y 1,3 PGA (figura 14).

El estudio de comparación mediante alineamientos de la secuencia de la base de datos para la PAS-PGK de *T. cruzi* CL Brener con la secuencia parcial del constructo pGEM-T/inserto PAS-PGK de *T. cruzi* EP (Rojas-Pirela, 2018) se presenta en el anexo 1 donde se muestra el grado de semejanza a nivel de estructura y secuencia. Los resultados indican que a pesar de solo disponer de una región parcial (equivalente aproximadamente a 1/3 de la proteína completa), hay una gran semejanza entre estructuras y secuencias, con un alto grado de similaridad entre los residuos de aminóacidos para las secuencias de ambas cepas.

www.bdigital.ula.ve

De igual manera, se hizo un alineamiento local con distintas isoenzimas PGK de tripanosomátidos y otros organismos (ver anexo 2); en este diagrama se identificaron los residuos de aminoácidos que forman parte del sitio activo de la proteína observándose nuevamente una conservación en estos residuos en todas las PGKs estudiadas.

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

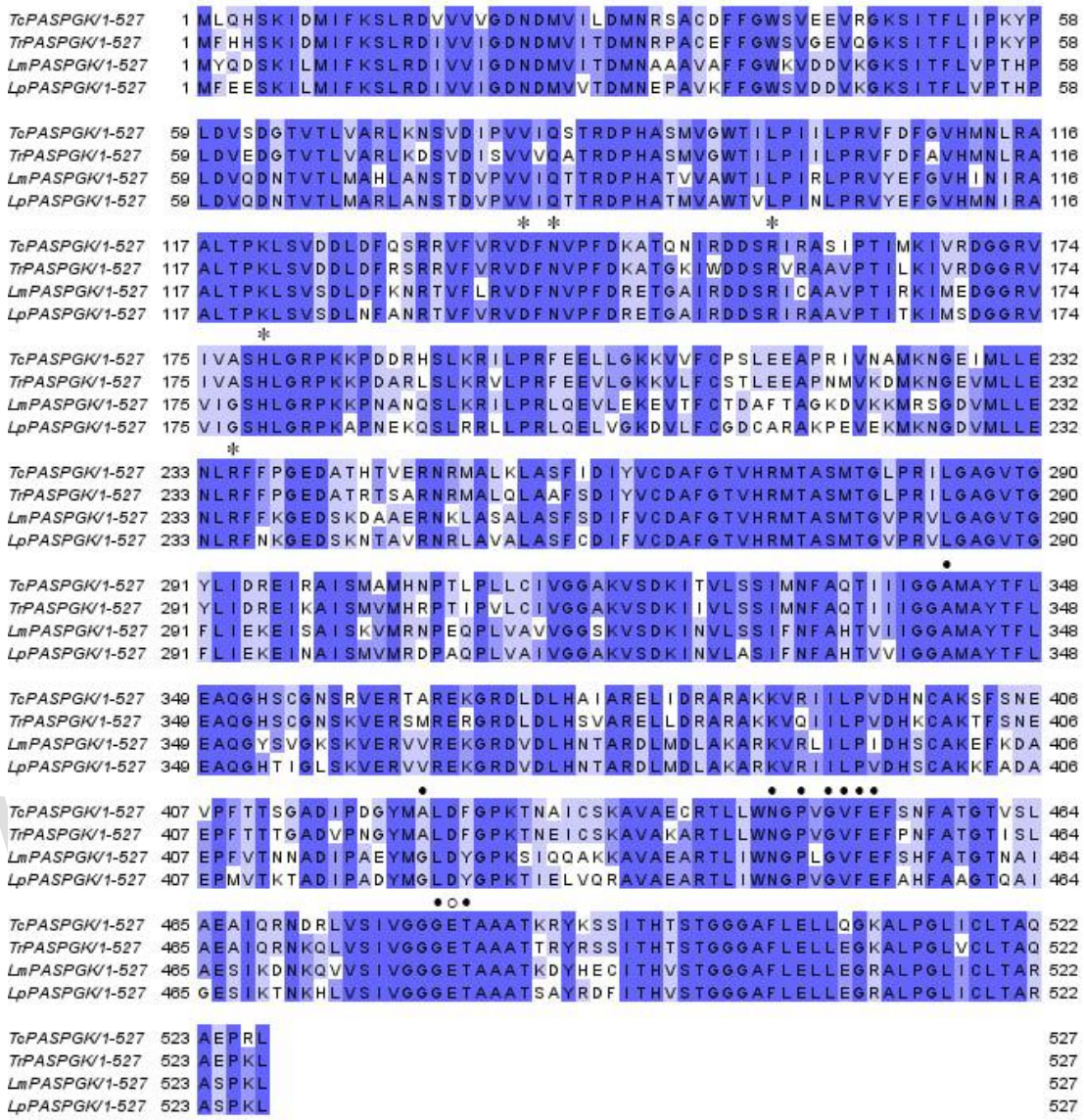


Figura 14. Alineamiento de la secuencia aminoácidos de la proteína PAS-PGK de *Trypanosoma cruzi* con otras secuencias PAS-PGK. Resultado del alineamiento de secuencias entre la proteína PAS-PGK de *T, cruzi* con proteínas PAS-PGK de otros organismos de la familia tripanosomatidae. Tc, *Trypanosoma cruzi*; Tr, *Trypanosoma rangeli*; Lm, *Leshmania major*; Lp, *Leptomonas pyrrhocoris*. Los asteriscos (*) indican el sitio de unión a 1,3 PGA; los círculos negros (•) el sitio de unión a ADP y el círculo blanco (°) señala el residuo catalítico. Los recuadros indican que al menos dos secuencias comparten aminoácidos idénticos o altamente conservados. Números de acceso: Tc, Q4DX96; Tr, A0A061J132; Lm, Q4Q6V; Lp, A0A0M9G6E2.

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

Para evidenciar posibles sitios de unión de carbohidratos, en distintas secuencias aminoacídicas para varias PGK de tripanosomatides y mamíferos, se hizo un alineamiento local con la herramienta COBALT. Se encontró que los residuos propuestos como los sitios de unión a carbohidratos, GGE y GGA ubicados en el dominio PGK son conservados en todas las secuencias (figura 15), esto indicaría que es poco probable que estos residuos estén involucrados en la unión de la glucosa en la proteína PAS-PGK, ya que si fuera así se hubiese reportado un efecto de este metabolito en otras PGKs. Todo ello sugiere la posibilidad de que la glucosa interaccione con la proteína PAS-PGK a través del dominio PAS.

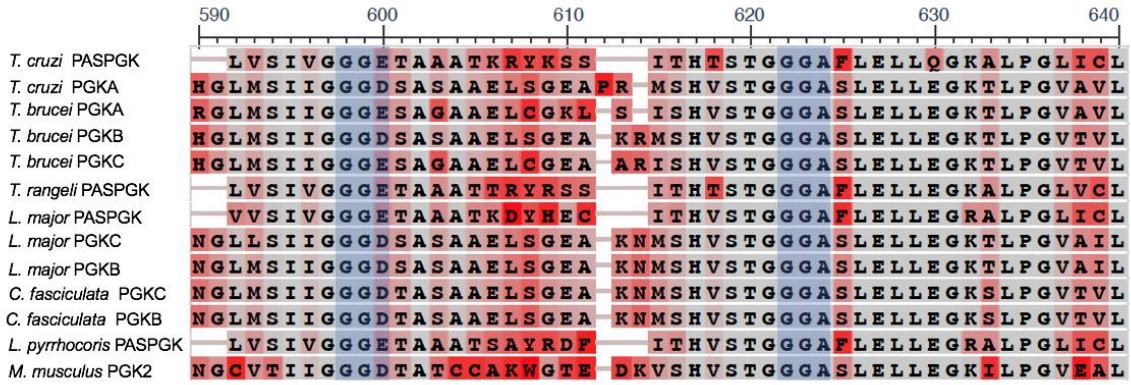


Figura 15. Comparación de los motivos de unión a carbohidratos (CBM) de la secuencia aminoacídica de la proteína PAS-PGK de *Trypanosoma cruzi* con otras secuencias de proteínas PGKs. Resultado del alineamiento de secuencias entre la proteína PAS-PGK de *Trypanosoma cruzi* con proteínas PGK encontradas en organismos pertenecientes a la familia Tripanosomatidae y mamíferos. En gris se presentan las regiones de la secuencia que presentan mayor conservación de residuos de aminoácidos, mientras que en rojo se señalan las regiones menos conservadas. Las regiones azules corresponden a los motivos de unión a carbohidratos (CBM) predichos para cada una de las secuencias.

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

5.2. Ensayos de inducción de la proteína PAS-PGK recombinante

Con el objetivo de mejorar la expresión soluble de la proteína se evaluaron tres concentraciones de etanol (1%, 2% y 3%) en un medio de autoinducción a 28°C**.** En la figura 16 se puede observar que la mayor expresión correspondiente a la proteína PAS-PGK de aproximadamente 62 kDa se obtienen a una concentración de 2% de etanol tal como se muestra en los pozos 7 y 8. Esto diverge con lo presentado por Chhetri *et al* en 2015, los cuales trabajando con distintas proteínas recombinantes de *Escherichia coli* (*E. coli*) determinaron que la concentración de etanol donde se evidencia la mayor expresión de la proteína de estudio es al 3%, aunque es de destacar que la diferencia entre ambas concentraciones es mínima.

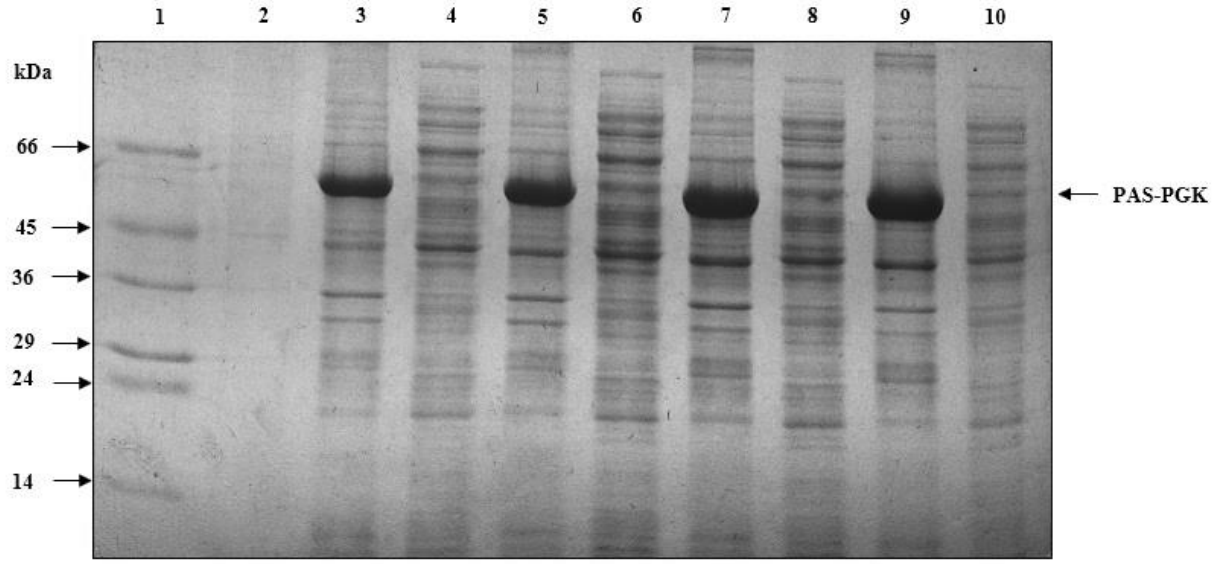


Figura 16. Ensayo de autoinducción en presencia de etanol de la proteína PAS-PGK recombinante en *E. coli* Rosetta. Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE 12%) de la sobreexpresión de la proteína en medio de autoinducción a 28 °C. Línea 1, Marcadores de peso molecular (Sigma); línea 2, control de autoinducción (Fracción soluble tomada a las 6 horas de haber iniciado la inducción); línea 3, 5, 7 y 9 fracciones insolubles de los ensayos de autoinducción con etanol: control (sin etanol), 1%, 2% y 3% respectivamente; línea 4, 6, 8 y 10 fracciones solubles de los ensayos de autoinducción con etanol: control, 1%, 2% y 3% respectivamente.

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

Con el objetivo de aumentar el rendimiento de expresión soluble de la proteína PAS-PGK recombinante se decidió transformar en una cepa diferente a la que se venía utilizando últimamente que era *E. coli* Rosetta, en este caso se seleccionó la cepa BL21 (DE3) de *E. coli*. Al evaluar los lisados de la inducción con IPTG en un gel de poliacrilamida al 12%, se observa como en el tratamiento control (antes de agregar el inductor) no hay expresión de la proteína, es luego de agregar el IPTG cuando aparece una banda de sobreexpresión correspondiente a la proteína PAS-PGK de aproximadamente 62 kDa, y que se mantiene a lo largo de las 3 horas que se evaluó la inducción. Esto indica que la transformación de la cepa BL21 (DE3) con el plásmido pET28/PAS-PGK fue exitosa (figura 17).

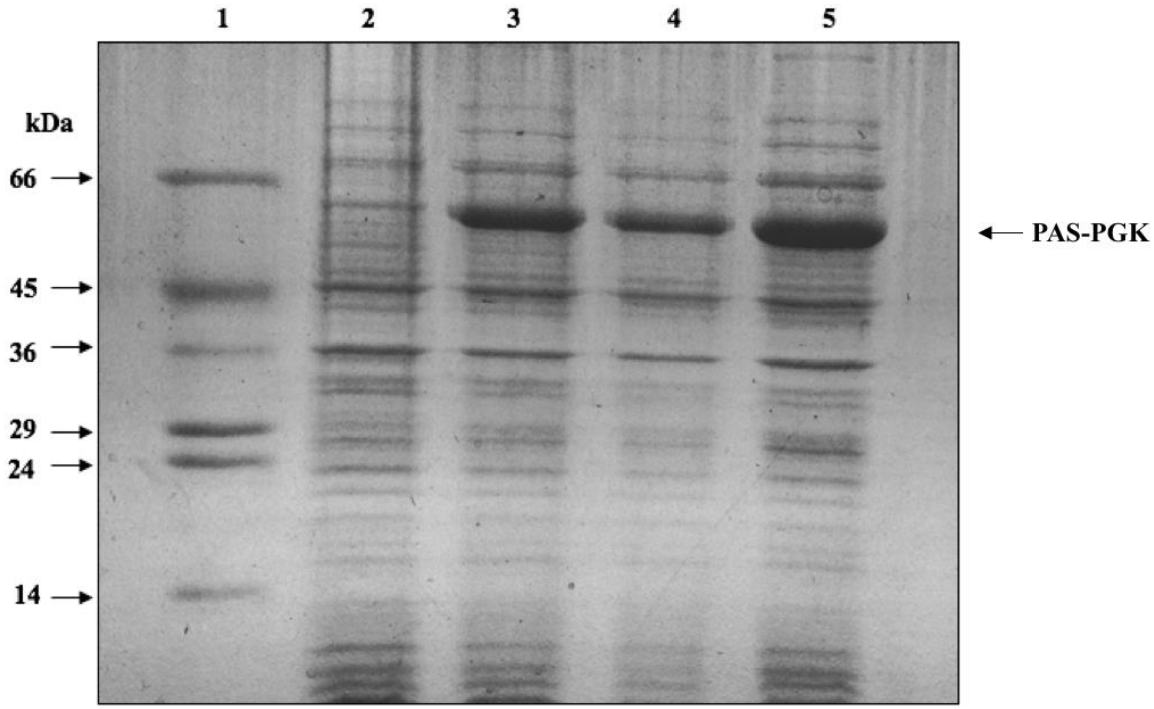


Figura 17. Ensayos de expresión con IPTG de la proteína PAS-PGK recombinante en *Escherichia coli* BL21 (DE3). Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE 12%) de la sobreexpresión de la proteína con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) a 37 °C. Línea 1, Marcadores de peso molecular (Sigma); línea 2, control de inducción (Fracción de células colectadas antes de agregar el IPTG); línea 3, 4 y 5, fracciones luego de 1, 2 y 3 horas de agregar el IPTG respectivamente.

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

Para mejorar el rendimiento en la expresión de proteína soluble se decidió probar otro método de inducción, ya que el de autoinducción en presencia de etanol (Studier, 2005; Chhetri *et al*., 2015) que se había utilizado y estandarizado anteriormente producía un rendimiento bajo. Para ello se realizó la expresión de la proteína en medio TB y los resultados indican un incremento en la sobreexpresión con respecto al medio de autoinducción siendo más pronunciado en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3), que en Rosetta (figura 18). Esto puede deberse a que el tiempo de inducción al usar el medio TB es mucho menor (18 horas en comparación con las 48 horas que requiere el método de autoinducción), por lo que es menos probable que factores externos como fallas de electricidad, afecten el crecimiento del cultivo y por ende la expresión de la proteína.

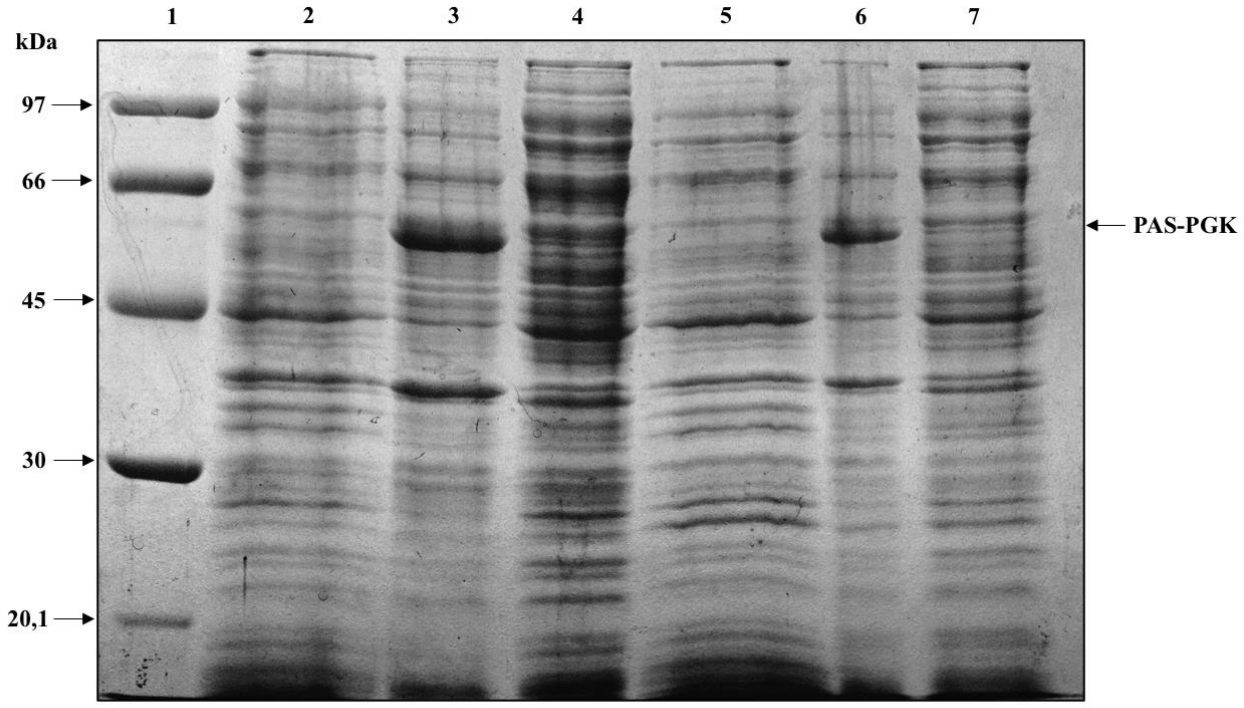


Figura 18. Ensayos de expresión en medio TB de la proteína PAS-PGK recombinante en las cepas de *Escherichia coli* BL21 (DE3) y Rosetta. Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE 12%) de la sobreexpresión de la proteína con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) en medio TB a 25 °C. Línea 1, Marcadores de peso molecular (Roche); línea 2, 3 y 4, control de inducción (Fracción de células colectadas antes de agregar el IPTG), fracción insoluble y fracción soluble, respectivamente en la cepa BL21 (DE3); línea 5, 6 y 7, control de inducción, fracción insoluble y fracción soluble respectivamente, evaluados en la cepa Rosetta.

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

5.3. Purificación de la proteína PAS-PGK recombinante de *Trypanosoma cruzi*

La proteína PAS-PGK fue purificada a través de una columna de afinidad a metales His-Link. En la figura 19 se presentan los resultados de la purificación, donde se observa que la proteína eluye con una solución de imidazol 250 mM (líneas 6, 7, 8, 9 y 10) saliendo enriquecida en la fracción II (línea 7). Es de notar que la mayoría de las proteínas de la bacteria no se adhieren a la columna (línea 4) y que aquellas proteínas que tienen uniones inespecíficas se desprenden con los lavados de 20 y 50 mM de la solución de imidazol (líneas 5 y 6). La banda que corresponde a la proteína PAS-PGK purificada se encuentra entre 45 y 66 kDa, teniendo un peso molecular cercano a 62 kDa, valor que es próximo al peso teórico de 58 kDa reportado para la proteína nativa (Rojas-Pirela, 2018).

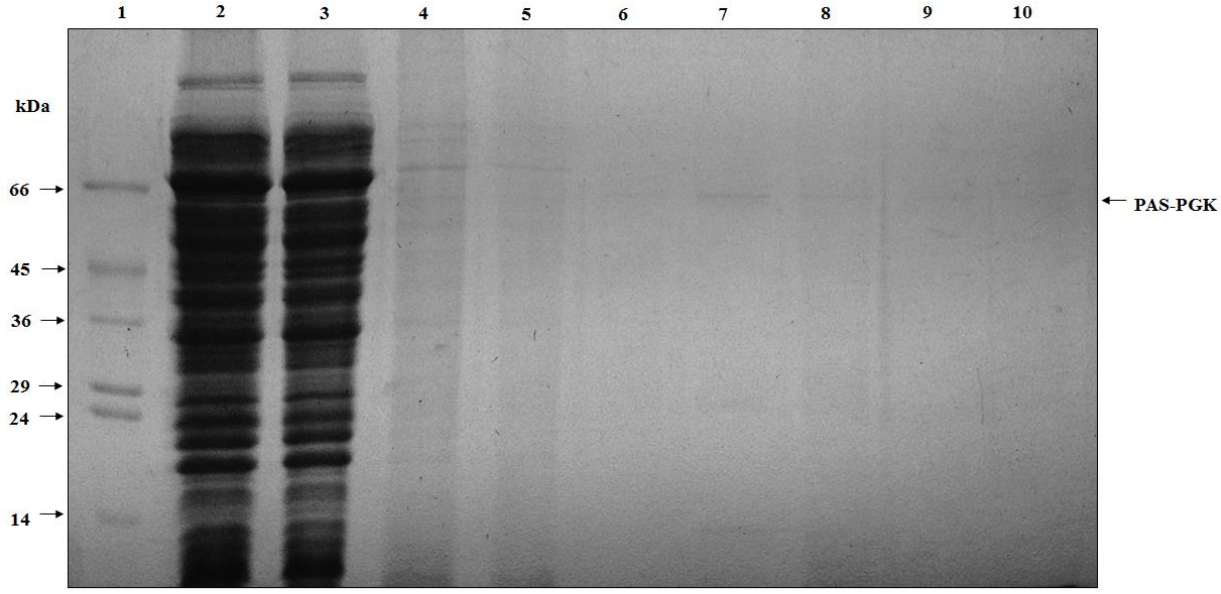


Figura 19. Purificación de la proteína PAS-PGK recombinante. Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE 12%). Línea 1, marcadores de peso molecular (Sigma); línea 2, homogenato soluble; línea 3, proteínas que no se adhieren a la columna; línea 4, lavado con 20 mM de imidazol; línea 5, lavado con 50 mM de imidazol; línea 6 - 10, elución con 250 mM de imidazol (Fracción I - V); respectivamente.

Considerando que la cantidad de proteína que se obtenía utilizando este procedimiento era baja para realizar las mediciones de actividad, se decidió hacer otros ensayos con el fin de aumentar el rendimiento de la purificación y así tener más enzima para las mediciones. Con

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

base en antecedentes de la purificación de la proteína PAS-PGK recombinante de *Leshmania major* (Adhikari *et al*., 2019), el cual lograba u obtenía un buen rendimiento, se decidió hacer un ensayo siguiendo este protocolo. El resultado de este ensayo, figura 20, muestra que la proteína eluye a una concentración de 250 mM de imidazol, la cual se colectó en un pool de 3 ml (línea 7), pero a pesar de salir más enriquecida también sale con una mayor cantidad de contaminantes, los cuales son más notorios al momento de concentrar la muestra diez veces (línea 9); la presencia de contaminantes puede ser causa de no lavar lo suficiente la columna antes de eluir la proteína. Por otra parte, se observa como la gran mayoría de proteínas de la bacteria no se adhieren a la columna (línea 4), pero se nota que gran parte de la proteína recombinante tampoco se une a la columna.

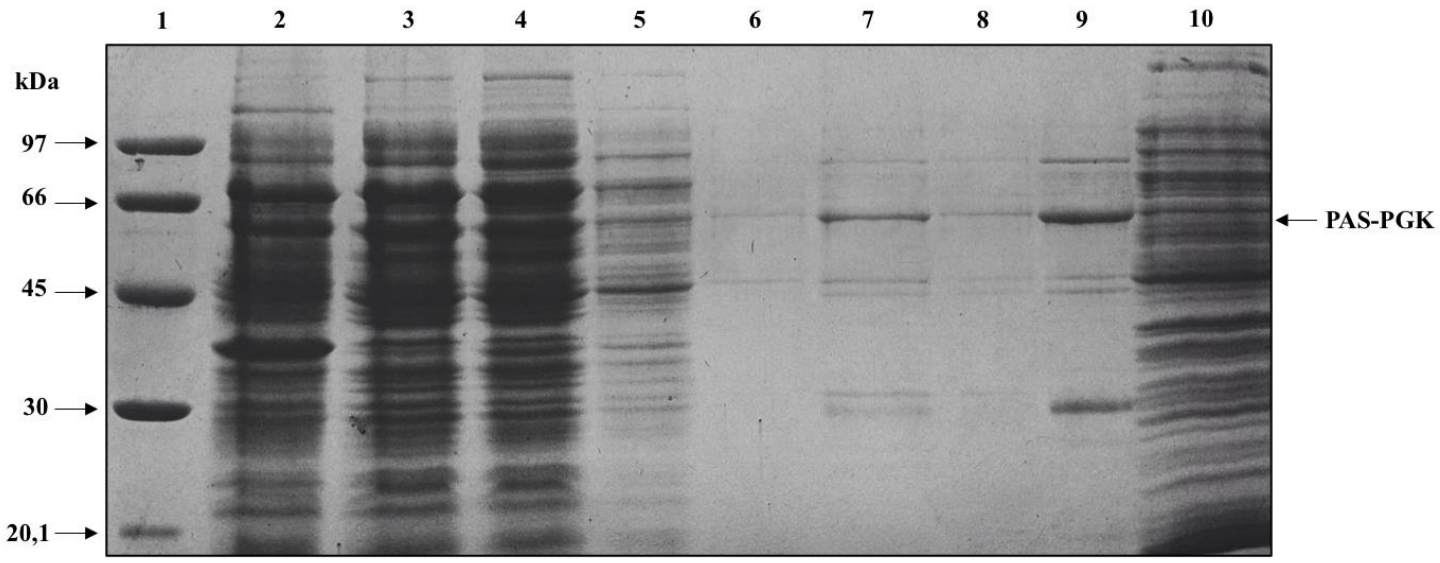


Figura 20. Purificación de la proteína PAS-PGK recombinante bajo las condiciones propuestas por Adhikari *et al.* (2019). Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE 12%). Línea 1, marcadores de peso molecular (Roche); línea 2, fracción no soluble; línea 3, homogenato soluble; línea 4, proteínas que no se adhieren a la columna; línea 5, lavado con 20 mM de imidazol; línea 6, lavado con 50 mM de imidazol; línea 7-8, elución con 250 mM de imidazol (Fracción I - II); línea 9 proteína purificada concentrada, línea 10; lisado de E. coli antes de inducir (control de inducción).

Aunque el método previamente descrito logra mejorar el rendimiento de proteína purificada, también aumentó la proporción de contaminantes en la fracción purificada y además como se puede observar en el gel, la proteína no se estaba reteniendo en la columna.

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

Con la idea de hacer más eficiente el proceso, se hizo un ensayo de purificación utilizando un gradiente líneal de imidazol, que abarcaba un rango de 50 – 300 mM, obteniéndose un mejor rendimiento, con una mayor cantidad de proteína y prácticamente pura a homogeneidad (figura 21). Esta sale enriquecida en las fracciones del rango de concentración entre 125 – 175 mM de imidazol (Figura 22.B), las cuales corresponden a las líneas 7, 8, 9, 10 y 12 del SDS-PAGE al 12% (figura 21), y a las líneas 6, 7, 8 y 9 de la Figura 22.A. Se cargaron fracciones intercaladas del gradiente, se decidió hacer un pool con las fracciones donde la proteína salió más enriquecida.

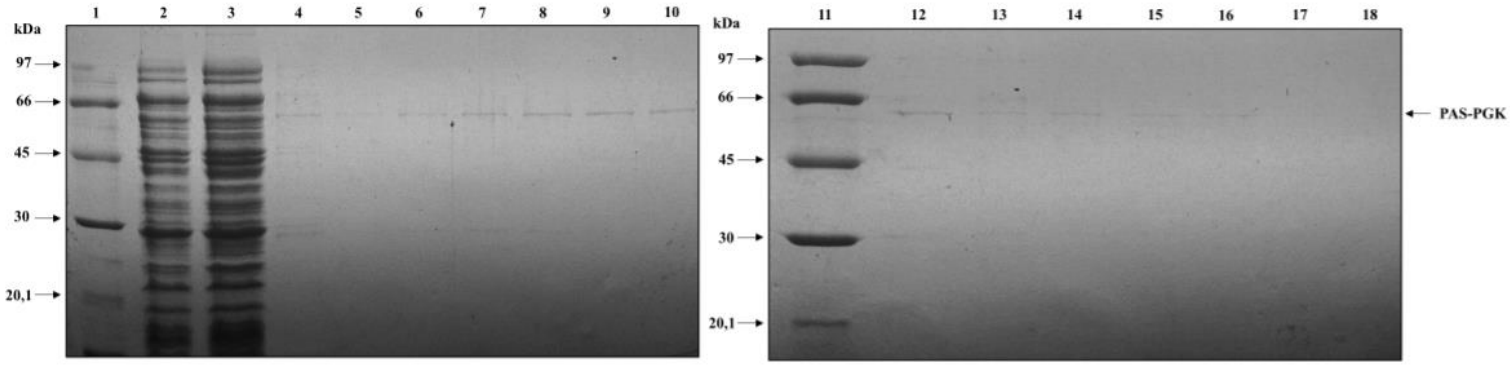


Figura 21. Purificación de la proteína PAS-PGK recombinante utilizando un gradiente lineal con concentraciones entre 50 – 300 mM de imidazol (Todas las fracciones). Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE 12%). Línea 1 y 11, marcadores de peso molecular (Roche); línea 2, homogenato soluble; línea 3, proteínas que no se adhieren a la columna; línea 4, lavado con 50 mM de imidazol; línea 5-12 gradiente lineal entre 50-300 mM de imidazol; línea 13-18, elución con 500 mM de imidazol.

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

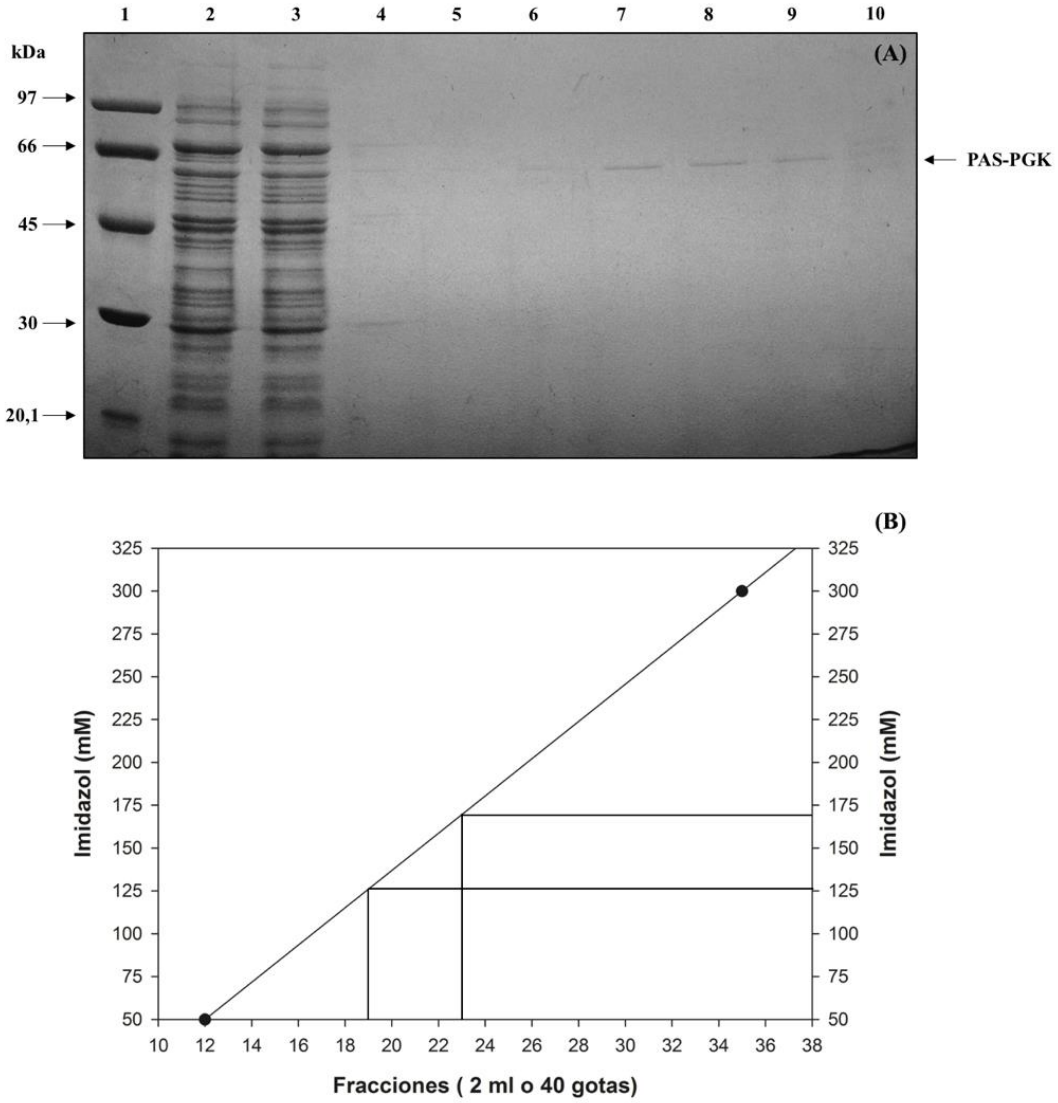


Figura 22. Purificación de la proteína PAS-PGK recombinante utilizando un gradiente lineal con concentraciones entre 50 – 300 mM de imidazol. (A) Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE 12%) de las fracciones purificadas. Línea 1, marcadores de peso molecular (Roche); línea 2, homogenato soluble; línea 3, proteínas que no se adhieren a la columna; línea 4-8 fracciones eluidas con el gradiente lineal entre 50-300 mM de imidazol; línea 9-10, fracciones eluidas con 500 mM de imidazol. (B) Gradiente de imidazol utilizado para la elución de la proteína recombinante.

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

5.4. Identificación de la proteína purificada mediante análisis de Western blot

Para verificar la identidad de la proteína purificada, se hicieron ensayos de inmunodetección mediante Western blot, utilizando como anticuerpos primarios los sueros anti-PGKA, anti-PGKC y anti-PAS, para así confirmar que eventualmente la proteína expresada y purificada era una PGK que contiene un dominio PAS.

Primeramente, para verificar que la proteína recombinante era una PGK, se hizo un revelado utilizando el suero anti-PGKC (figura 23.A) y se nota que a pesar de que no hubo reconocimiento de la proteína purificada, si se reconoció la sobreexpresión en el lisado de *E. coli*, y esta banda a su vez no aparecía en el control de inducción (lisado de *E. coli* antes de agregar el IPTG). Como control se utilizó un lisado de *Trypanosoma cruzi*, donde se espera que el anticuerpo reconozca alguna de las tres isoenzimas PGK del parásito. En este caso, hubo reconocimiento de una banda de aproximadamente 58 kDa y otra más tenue ubicada entre el marcador de 42,5 y 58 kDa, que pueden corresponder a las isoenzimas PGKA o PAS-PGK (ya que hay que recordar que ambas tienen un peso molecular similar de 56-58 kDa) y la PGKB (47 kDa) respectivamente, indicando que el anticuerpo si es funcional. Por el contrario, al revelar con el anticuerpo anti-PGKA (figura 23.B) hubo un reconocimiento de la proteína purificada, sin embargo, el anticuerpo también reconoció una banda, en el mismo peso molecular, tanto en el lisado de *E. coli* antes (control de inducción) y después de la sobreexpresión de la proteína y a su vez, no hubo reconocimiento alguno en el lisado de *T. cruzi*, por lo que se consideró que este anticuerpo no es funcional.

El anticuerpo anti-PAS reconoce la proteína recombinante purificada y la sobreexpresión de la proteína en el lisado de *E. coli*, lo cual no se observó en el control de inducción (figura 23.C). Además, el anticuerpo también reconoce en el lisado de *T. cruzi*, algo de peso molecular similar a las PAS-PGK. Estos resultados indican que la proteína que se está expresando y purificando contiene un dominio PAS y que su peso molecular coincide con el de una proteína con dominio PAS presente en el parásito, que posiblemente sea la PAS-PGK.

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

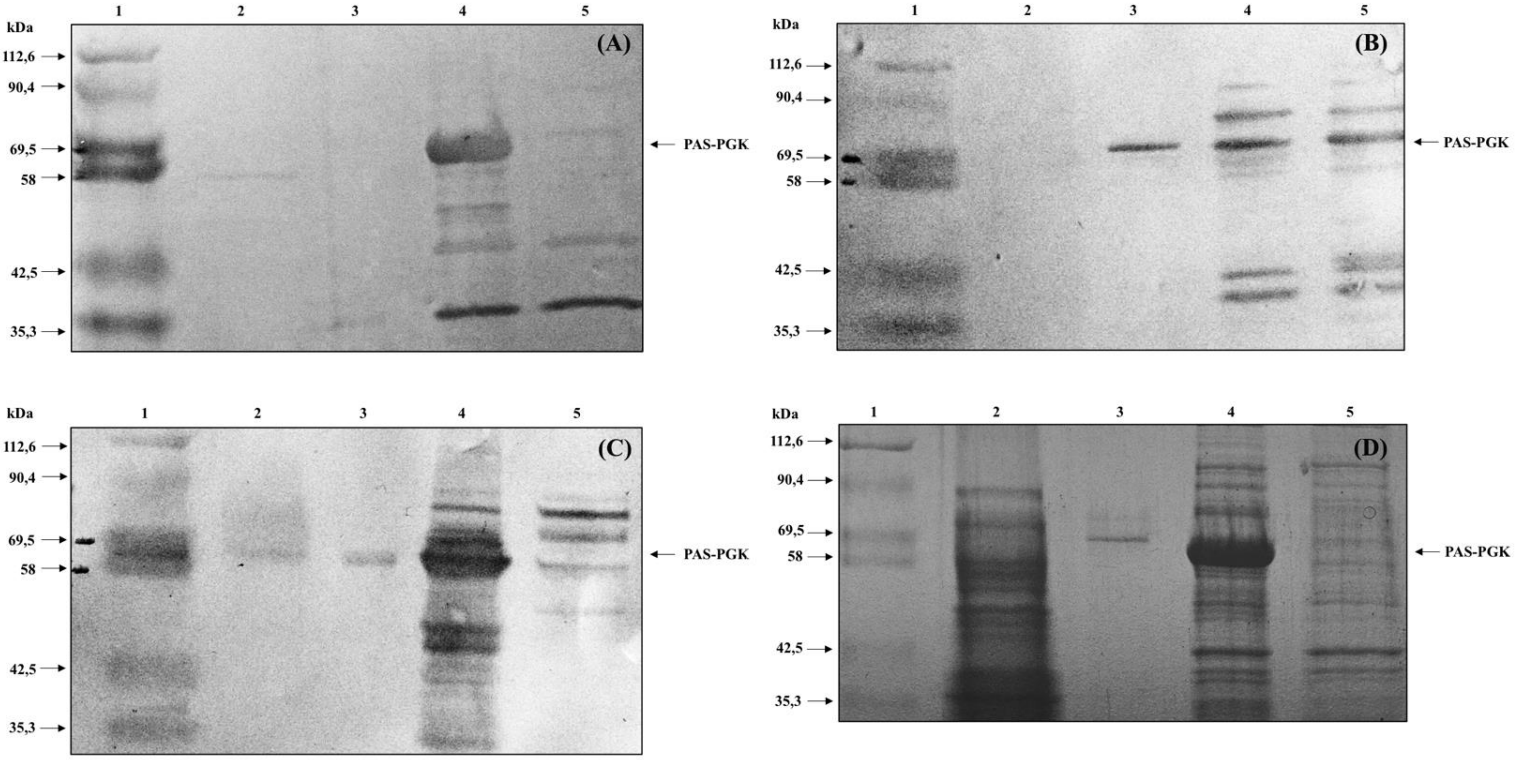


Figura 23. Evaluación de la expresión y purificación de la proteína PAS-PGK recombinante por Western blot. Línea 1; marcadores de peso molecular pre teñidos Sigma-Aldrich; línea 2, lisado de *Trypanosoma cruzi* (80 µg de proteína); línea 3, PAS-PGK recombinante purificada; línea 4, Sobreexpresión de la proteína en el lisado de *E. coli*; línea 5, control de inducción (sin inducir) en un lisado de *E. coli* BL21 DE3. (A) Anticuerpo primario α-PGKC de *Trypanosoma brucei* (dilución 1/250). (B) Anticuerpo primario α-PGKA (dilución 1/50). (C) Anticuerpo primario α-PAS y (D) Gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de coomasie, donde se cargaron las muestras transferidas a la membrana de nitrocelulosa.

Como una prueba para verificar la funcionalidad de los anticuerpos primarios utilizados (anti-PGKA, anti-PGKC y anti-PAS) y a su vez, para comprobar que la proteína recombinante con la que se estaba trabajando era PAS-PGK, se hizo un Western blot en donde se evaluó simultáneamente la muestra de la proteína PAS-PGK recombinante purificada, y un lisado de *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania braziliensis*, organismos en donde se ha reportado la presencia de la proteína PAS-PGK. En la figura 24 se nota que el anticuerpo anti-PAS reconoce la proteína recombinante y la nativa en ambos lisados de

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

parásitos, además, el peso molecular de la banda concuerda con el reportado para la proteína nativa (58 kDa) y se aprecia una pequeña diferencia con el tamaño de la proteína recombinante que tiene un peso molecular un poco más alto (62 kDa) gracias a la cola de polihistina. Por otra parte, el anticuerpo anti-PGKC solo reconoció una banda ténue en el lisado de *L. braziliensis* que correspondería a la PGKC del parásito, mientras que no hubo reconocimiento alguno en el lisado de *T. cruzi* y en la muestra de la proteína PAS-PGK purificada. Lo contrario ocurrió al revelar con el anticuerpo anti-PGKA, donde solo hubo reconocimiento de la proteína recombinante purificada, mientras que en los lisados de los parásitos no se llegó a observar señal.

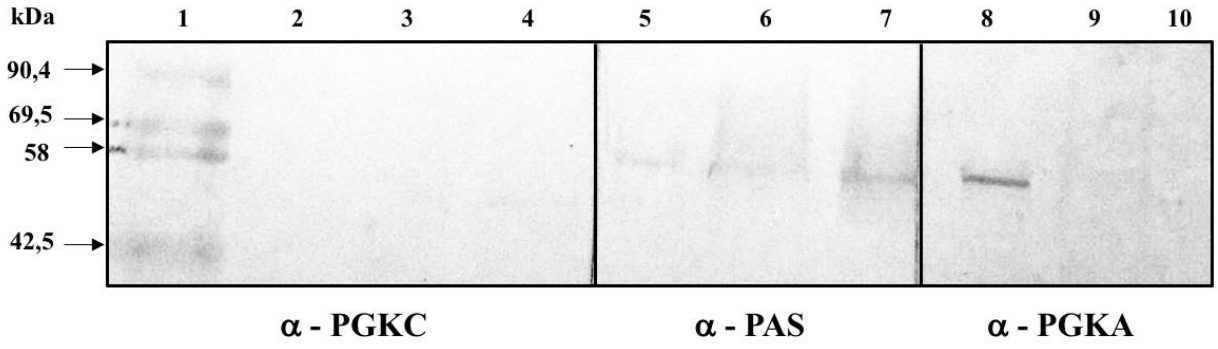


Figura 24. Análisis de la identidad de la proteína PAS-PGK recombinante por Western blot. Línea 1; marcadores de peso molecular pre teñidos Sigma-Aldrich; línea 2, 5 y 8 PAS-PGK recombinante purificada; línea 3, 6 y 9, lisado de *Trypanosoma cruzi* (70 µg de proteína); línea 4, 7 y 10, lisado de *Leshmania braziliensis* (70 µg de proteína) Se empleó el anticuerpo primario α-PGKC de *Trypanosoma brucei* (dilución 1/250), α-PAS (dilución 1/50) y α-PGKA (dilución 1/50).

5.5. Ensayos enzimáticos de la proteína PAS-PGK recombinante de *Trypanosoma cruzi*

Debido a que existían dificultades al momento de medir la actividad de la enzima PAS-PGK recombinante se decidió realizar una serie de ensayos evaluando ciertas condiciones que pudiesen estar afectando la actividad de la proteína (ver sección 4.9.3). Los resultados (figura 25) muestran que independientemente de las diferentes condiciones evaluadas, las velocidades ($\mu mol.min^{-1}$), generalmente se encuentran dentro del mismo rango y orden de magnitud de la descomposición de NADH (líneas trazadas en azul), lo que significa que, bajo

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

las condiciones evaluadas, posiblemente la enzima PAS-PGK recombinante no tiene actividad y en el caso de tenerla, esta es tan baja que no se puede medir con el sistema utilizado.

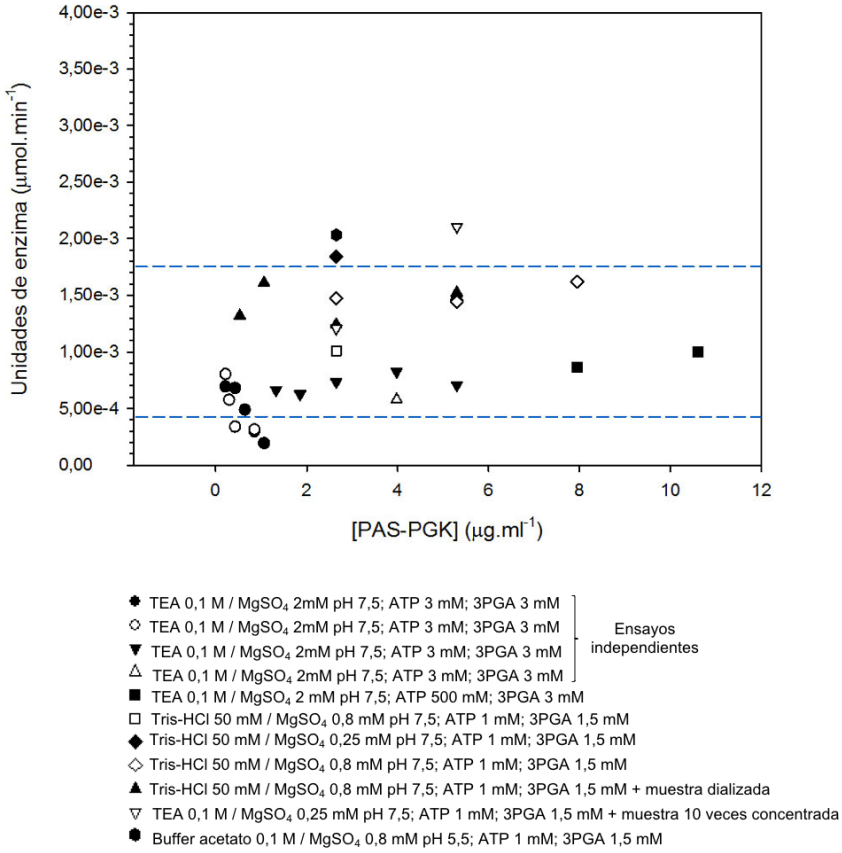


Figura 25. Variación de velocidad con respecto a la concentración de enzima PAS-PGK recombinante de *Trypanosoma cruzi* bajo distintas condiciones. Para cada ensayo se utilizaron concentraciones crecientes de la enzima purificada y se mantuvo una concentración constante para ambos sustratos. Se variaron parámetros como concentración de $MgSO_4$, buffer de medición y concentraciones de ATP y 3-PGA. Las líneas trazadas en azul (---) indican el rango de descomposición de NADH, mientras que cada figura del gráfico representa un ensayo.

ww .ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

6. DISCUSIÓN

6.1. Análisis de la secuencia aminoacídica de la proteína PAS-PGK

La clasificación y comparación de las secuencias proteícas ha sido de gran importancia en el desarrollo de las ciencias ómicas, donde trabajando con técnicas como genómica o proteómica se busca realizar predicciones a gran escala de las funciones de las proteínas. El uso de herramientas computacionales para la anotación de secuencias proteicas ha sido de utilidad, en especial para investigaciones donde se trabaja con proteínas nuevas o poco estudiadas (Mulder y Apweiler., 2007).

Al analizar la secuencia codificante de la proteína PAS-PGK de *Trypanosoma cruzi* con InterPro, se encontró que esta es una proteína multidominio, donde los primeros 113 residuos de aminoácidos de la secuencia corresponden al dominio PAS ubicado en la región N-terminal y los residuos restantes corresponden al dominio PGK (Figura 5). InterPro integra las principales bases de datos para la identificación de los rasgos característicos de la proteína (*protein signatures*). Esto se logra mediante el software InterProScan que utiliza las bases de datos miembros de InterPro, que son: Pfam, PROSITE, PRINTS, ProDom, SMART, TIGRFAMs, PIRSF, SUPERFAMILY, Gene3D y PANTHER. InterProScan integra los algoritmos de esos paquetes en un simple software, generando resultados en un formato unificado (Mulder y Apweiler., 2007).

www.bdigital.ula.ve

Los resultados obtenidos concuerdan con los presentados por Rojas-Pirela *et al*., 2018, utilizando solo las bases de datos Pfam, SMART y ExPaSy.

6.2. Modelado molecular del péptido dominio PAS, dominio PGK y la proteína PAS-PGK de *T. cruzi*

El descubrimiento y caracterización de patrones estructurales en moléculas biológicas es un importante tópico de investigación, ya que es una herramienta que puede dar información fundamental acerca de la función de una proteína, en especial para descifrar la función de proteínas nuevas o poco estudiadas (Angles *et al*., 2020). En ausencia de estructuras resueltas experimentalmente, ya sea por cristalografía de rayos X o RMN, los modelos

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

computacionales o *in silico* representan una aproximación que ayuda al conocimiento de la estructura y función de una proteína.

Los dominios PAS adoptan un plegamiento similar a un guante (*glove like-fold*), dominado por una estructura central compuesta por láminas beta. Dos esquemas han sido desarrollados para describir las características estructurales de estos dominios. El primero está basado en la estructura original de la proteína PYP (*Photoactive Yellow Protein*) y consiste en: (1) un capuchón en la región N-terminal, (2) un núcleo PAS, compuesto por dos láminas beta que forman parte de la región N-terminal y tres hélices alfa, (3) un conector helicoidal, compuesto por una larga hélice alfa que cruza de manera diagonal las láminas beta, y (4) un andamio beta (*β-scaffold*) compuesto por tres láminas betas de gran longitud, que componen la otra mitad del núcleo central de láminas beta antiparalelas (Pellequer *et al*., 1998; Zhong *et al*., 2003). El segundo esquema, se basa en los arreglos secuencialmente conservados de los elementos de la estructura secundaria del plegamiento PAS (Gong *et al*., 1998). En este caso, las hélices alfa y las láminas beta se designan secuencialmente de manera alfabética como A_β, B_β, C_α, D_α, E_α, F_α, G_β, H_β, I_β; por otra parte, los *loops* o giros son llamados en base a las estructuras secundarias que los flanquean. Por ejemplo, la región entre la hélice F_α y la lámina G_β se llama giro FG (*FG loop*). Este sistema facilita la discusión de los residuos que se encuentran conservados en varios dominios PAS y, utilizando esta nomenclatura estos dominios pueden ser descritos como una estructura similar a la de un guante izquierdo, donde el pulgar estaría formado por las láminas G_β y H_β, las hélices C_α, D_α, E_α y F_α formarían la palma y finalmente, las láminas H_β, I_β, A_β y B_β serían los dedos (Zhong *et al*., 2003).

La figura 27 muestra la estructura de distintos dominios PAS, pertenecientes a proteínas de diferentes organismos. Al comparar estos modelos con la estructura predicha en este trabajo para el dominio PAS de la proteína PAS-PGK de *T. cruzi* (figura 6) notamos que tienen regiones que son similares, especialmente en la posición de las hélices alfa y la presencia del capuchón N-terminal; sin embargo, es notoria la diferencia en la región que corresponde al núcleo de láminas beta antiparalelas, característico de estos dominios, donde en vez de cinco láminas el modelo predicho solo muestra dos de ellas, que forman lo que sería el *PAS core*, mientras que el resto de la estructura central del núcleo la compondrían

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

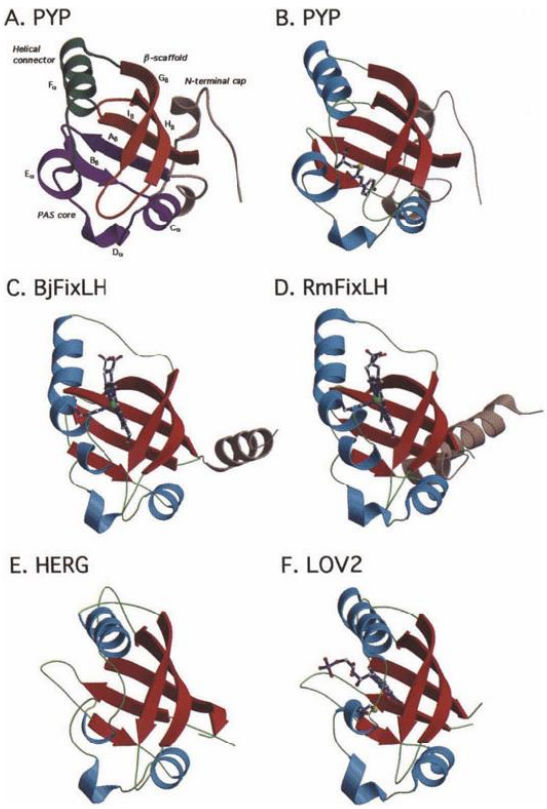
solamente giros o *loops*, en vez del andamio beta ya reportado (figura 26. A). Al evaluar la estructura de la proteína PAS-PGK completa (figura 8), se observa que en el dominio PAS aparecen las láminas del andamio beta, que se encontraban ausentes en la estructura individual, lo cual se asemeja o concuerda con la estructura reportada para los dominios de otros organismos (Zhong *et al*., 2003; Möglich *et al*., 2009).

Esto muestra que el modelo del dominio PAS de la proteína PAS-PGK de *T. cruzi*, presenta teóricamente todas las características estructurales conocidas para estos dominios, sugiriendo que su función sería similar a lo reportado en otros organismos, donde resalta su propiedad de unirse a ligandos. Sin embargo, dos grandes obstáculos dificultan predecir el tipo de ligando que se une al dominio PAS. En primer lugar, aunque los dominios PAS se caracterizan por un pliegue tridimensional conservado (Möglich *et al*., 2009), estos a menudo comparten poca identidad de secuencia primaria, por lo que el investigador sólo dispone de unas pocas pistas sobre el reconocimiento de sustratos basándose únicamente en los datos de la secuencia de la proteína. En segundo lugar, los dominios PAS parecen no tener casi ninguna restricción en cuanto a la clase de sustrato que pueden unir (Henry y Crosson, 2011).

www.bdigital.ula.ve

Se sabe que, a lo largo de la evolución, los dominios PAS han sido seleccionados para unir una gran cantidad de cofactores y ligandos. Dependiendo del sistema, la unión de pequeñas moléculas puede servir como una señal directa o proporcionar un cofactor que permite la percepción de señales como gases disueltos, potencial redox o luz visible (Henry y Crosson, 2011).

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual



www.pgigital.ula.ve

Figura 26. Estructura de los dominios PAS. (A) Proteína PYP de *E. halopila*, coloreada de acuerdo a la nomenclatura clásica PYP, en la cual se resalta el capuchón N-terminal (marrón), el núcleo PAS (violeta), el conector helicoidal (verde) y el andamio beta (rojo). Las estructuras restantes (B-D) fueron coloreadas en base a los elementos de la estructura secundaria: hélices alfa en azul, láminas beta en rojo y la disposición helicoidal (*random coil*) en verde. (B) Estructura de la proteína PYP; (C) dominio PAS que contiene un grupo hemo, perteneciente a la proteína FixL de *B. japonicum*; (D) una subunidad de la estructura de la proteína FixL de *R. meliloti*; (E) el dominio PAS perteneciente a la proteína HERG; (F) el dominio LOV2 del módulo de fototropina de *Adiantu,* phy3. (Modificado de Zhong *et al*., 2003).

Estudios de alineamiento de secuencias, análisis de mutaciones y estructuras resueltas por cristalografía de rayos X de varias PGK, indican que los residuos que conforman el sitio activo de la proteína son altamente conservados (Bernstein *et al*.,1997; Cliff *et al*., 2010). Esta enzima tiene dos dominios del mismo tamaño que presentan una topología de plegamiento de Rossman y una región interdominio de bisagra flexible. En la región N-terminal de la proteína se ubica el sitio de unión a 3-fosfoglicerato/1,3-bifosfoglicerato y hacia la región C-terminal se ubica el sitio de unión a nucleótidos (ADP/ATP) (Biwas *et al*.,

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

2020). Similarmente, trabajos realizados en la secuencia codificante para la proteína PAS-PGK de *T. cruzi*, señalan que esta es una proteína PGK activa, con los sitios de unión a los sustratos, una región catalítica y una región asociada a bisagra flexible, además de presentar un dominio PAS en la región N-terminal (Rojas-Pirela *et al*., 2018). Todo lo anterior concuerda con la estructura predicha en esta investigación para la proteína PAS-PGK truncada (figura 7), demostrando que, en ausencia del dominio PAS, esta proteína estructuralmente es una PGK clásica, similar a la PGKC de *Trypanosoma brucei*.

6.3. Estudios de unión a ligandos por acoplamiento o *docking* molecular

Las interacciones de proteínas con ligandos, con otras proteínas o con superficies, son controladas por arreglos complejos de interacciones intermoleculares. Estas dependen tanto de interacciones específicas con el sitio de unión, como de fuerzas no específicas a las afueras del bolsillo de unión (Datta, 2002). El acoplamiento o *docking* molecular, es una herramienta computacional que predice la energía de interacción entre dos moléculas, buscando encontrar la mejor orientación que un ligando podría lograr para formar el complejo más estable o con menor energía libre.

www.bdigital.ula.ve

El acoplamiento molecular por lo general emplea dos algoritmos por separado. Un primer algoritmo de muestreo que predice todas las configuraciones o conformaciones estructurales (posiciones) que el ligando puede asumir dentro de un dominio o sitio activo en el receptor, y un segundo algoritmo con una función de puntuación (*scoring*) que predice las energías de unión entre el ligando y el receptor para cada una de las configuraciones establecidas por el primer algoritmo. Luego, con base en la función de estos dos algoritmos, todas las configuraciones de unión del ligando y su receptor son clasificadas de acuerdo a sus energías de unión (Ballón *et al*., 2019).

6.3.1. Unión a glucosa

En el acoplamiento de prueba realizado entre el sustrato ADP y la proteína PAS-PGK truncada (dominio PGK) se encontró un ajuste energéticamente favorable entre ligando (ADP) con una región del dominio PGK de la proteína cercana al sitio de unión donde están

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

presentes los residuos de aminoácidos (Ala 342, Ala 422, Asn 446, Pro 448, Gly 450, Val 451, Phe 452, Glu 453, Gly 481, Thr 483), aunque solo se encontró interacción mediante puentes de hidrógeno con la Gly 481. Estos residuos ya habían sido identificados experimentalmente como participantes en la unión del sustrato ADP con una PGK de *Trypanosoma brucei* (Bernstein et al., 1997). Esto confirma que las PGK son estructuralmente conservadas aunque la ubicación aproximada del ADP al sitio de unión posiblemente se explique porque este es un docking de cuerpo rígido, es decir tanto el receptor como el ligando son tratados como estructuras rígidas (Mohan *et al*., 2005) y se conoce que las PGK tienen un mecanismo dinámico de bisagra flexible donde luego que se unen ambos sustratos, aumenta la proximidad entre los dos dominios pasando de una conformación abierta (en ausencia de sustrato) a una cerrada (cuando hay unión de sustrato) para la catálisis (Bernstein *et al*., 1997). El acoplamiento molecular presenta algunas debilidades, puesto que no toma en cuenta la naturaleza dinámica del blanco proteíco (receptor), considerándolo erróneamente como una estructura estática, cuando sabemos que la dinámica y flexibilidad son características esenciales de las proteínas para el proceso de reconocimiento molecular (Lill, 2011).

www.bdigital.ula.ve

Una vez ensayado el acoplamiento molecular con ADP y evidenciando que el mismo fue predicho con un grado de confianza por la metodología empleada, se procedió a evaluar el acoplamiento molecular entre la glucosa y la proteína PAS-PGK truncada, los resultados muestran que la interacción más favorable tenía un ΔG= -6,68 kcal/mol y el ligando forma puentes de hidrógeno con el receptor, resaltando la interacción con el residuo Glu 352, que es el residuo catalítico de la proteína y que a su vez se encuentra muy cercano al sitio de unión a ADP (figura 11); si esto es así, significa que existe una interferencia provocada por el ligando que limita la unión a uno de los sustratos, en este caso ADP, lo que evitaría en presencia de glucosa la unión del ADP e interfiriendo de esta forma en la catálisis, causando la inhibición de la proteína. Esto no está de acuerdo o contradice estudios experimentales que han evidenciado que la actividad específica de la PAS-PGK truncada de *T. cruzi* no es afectada por la presencia de glucosa (Rojas-Pirela, 2018). Al evaluar los posibles sitios de unión a carbohidratos en distintas secuencias aminoacídicas para varias PGK de tripanosomatides (figura 15) se encontró que los residuos GGE y GGA son conservados en todas las secuencias, y si existiera la interacción mostrada en el modelo estas enzimas serían

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

inhibidas, comportamiento que no ha sido reportado en las PGK, lo que podría ser un indicio de que estos residuos realmente no participarían en la unión de glucosa en la proteína. Por otra parte, la interacción entre el ADP y la proteína truncada tiene un ΔG = -12,17 kcal/mol, que en teoría, es una interacción mucho más estable o más favorable que la que presenta esta proteína con la glucosa (ΔG= -6,68 kcal/mol), lo que sugiere que el ADP va a ser el sustrato preferencial debido a una interacción termodinámicamente más favorable con la proteína. El hecho de que ninguna PGK presenta inhibición en presencia de glucosa, a pesar de tener esos posibles sitios conservados de unión a carbohidratos, nos hace pensar que de existir la interacción entre este ligando y la proteína PAS-PGK esta ocurriría a través del dominio PAS, o que la presencia del dominio PAS, favorecería la interacción entre la glucosa y estos sitios de unión a carbohidratos.

A diferencia de los docking ya presentados donde siempre existía coincidencia entre el modelo que presentaba la mayor variación de energía libre con el modelo que presentaba la mayor formación de puentes de hidrógeno, el docking molecular entre la glucosa y la proteína PAS-PGK completa muestra dos resultados diferentes según el parámetro o criterio utilizado (Tabla 5). El modelo que presenta la mayor variación de energía libre (ΔG= –6,73 kcal/mol) indica que la interacción se da en la región PGK de la proteína, formando el ligando uniones mediante puentes de hidrógeno con los residuos de aminoácidos Leu 213 y Ser 212, que no han sido reportados como sitios de unión de carbohidratos. Por otra parte, la interacción que presenta una mayor formación de puentes de hidrógeno (ΔG= –6,17 kcal/mol, muy similar al anterior), se da en la región N-terminal de la proteína, que corresponde al dominio PAS, interactuando con los residuos Arg 15 y Ser 33, los cuales no forman parte del sitio activo putativo ni del bolsillo de unión química. Este resultado estaría indicando que la presencia del dominio PAS podría permitir la unión de la glucosa en dos sitios no relacionados estructuralmente y esto estaría causando la pérdida de actividad reportada para esta enzima en presencia de concentraciones superiores a 70 μM (Rojas-Pirela, 2018).

Hasta los momentos no se han definido residuos de unión que sean específicos para la glucosa en la estructura de los dominios PAS conocidos, pero si se sabe que la interacción con metabolitos pequeños es a través del núcleo hidrofóbico (Amezcua *et al*., 2002). Existen

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

reportes de proteínas quinasas asociadas a dominios PAS (PASKIN) cuya función está relacionada en la homeostasis de glucosa en levaduras y mamíferos (Grose y Rutter, 2010).

6.3.2. Unión a FAD^+

El acoplamiento molecular entre el FAD^+ y el dominio PAS de la proteína PAS-PGK de *T. cruzi* predice una interacción energéticamente favorable entre el ligando y el dominio PAS la proteína (figura 13), presentando un valor de variación de energía libre (ΔG) de -12,28 kcal/mol, y los residuos que posiblemente están interactuando mediante la formación de puentes de hidrógenos con el FAD^+ son aspartato 8 (Asp 8), aspartato 29 (Asp 29), metionina 30 (Met 30) y arginina 32 (Arg 32), ubicándose en la región N-terminal de la proteína. Se destaca la interacción con el residuo Met 30, que es uno de los residuos que se reporta como parte del sitio activo putativo, también conocido como el sitio de unión a ligandos en el dominio PAS (Rojas-Pirela, 2018). Existe un gran número de proteínas PAS que unen cofactores FAD^+ y sirven como sensores redox a nivel celular. Dentro de esta familia de proteínas, una de las más estudiadas es el receptor de aerotaxis transmembranal (Aer) de *E. coli* (Taylor y Zhulin, 1999), proteína que contiene un dominio PAS con un sitio específico de unión a FAD^+ que funciona como sensor del transporte de electrones y determina el estado energético de la célula (Bibikov *et al*., 1997). Mediante estudios de mutagénesis se identificaron los aminoácidos esenciales involucrados en la unión al FAD^+, encontrándose que ocurre por medio de interacciones polares que implican a los residuos de asparagina y lisina/arginina. Además, un triptófano conservado forma interacciones de apilamiento aromático con la adenina del FAD^+ (Henry y Crosson, 2011). Estudios de unión a ligando en la proteína PAS-PGK de *T. cruzi* indican que el FAD^+ tiene un efecto estimulatorio en la proteína, aumentando su actividad un 50% en presencia de este cofactor, fenómeno que no se observó al trabajar con la proteína PAS-PGK truncada (Rojas-Pirela, 2018) por lo tanto, es posible que el cofactor interactúe con la proteína a través del dominio PAS actuando este como un sensor redox; sin embargo, este efecto no se observa en la proteína PAS-PGK de *L. major* (LmPAS-PGK) , ya que al medir la actividad PGK en presencia de este ligando esta no se vió afectada, a su vez, esto se complementa con el hecho de que el espectro de UV-visible de la proteína LmPAS-PGK no mostraba ninguna banda de absorción en la región

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

del espectro visible indicando que es poco probable que grupos prostéticos cromofóricos como el hemo, FAD y FMN funcionen como ligandos de esta proteína (Adhikari *et al*., 2019).

6.4. Expresión y purificación de la proteína PAS-PGK recombinante

Partiéndose del gen *pas-pgk* que fue clonado, parcialmente secuenciado y sobreexpresado en *E. coli* Rosetta, se hicieron ensayos de expresión para posteriormente purificar y medir la actividad de la enzima recombinante, siguiendo el protocolo propuesto por Rojas-Pirela (resultados no publicados), quien a su vez hizo la caracterización molecular y bioquímica de esta enzima.

Como el objetivo inicial de esta investigación era evaluar el efecto que tenía la glucosa en la actividad de la proteína recombinante, lo primero que se debía hacer era expresarla y purificarla con un buen rendimiento, sin embargo al repetir el protocolo estandarizado por Rojas-Pirela la proteína se purificó parcialmente y con bajo rendimiento. Con la intención de mejorar o remediar esta situación, se realizó la inducción en presencia de etanol, siguiendo un protocolo propuesto por Chhetri *et al.* (2015) en donde se utiliza etanol para incrementar la expresión de proteína recombinante. Ellos sugieren que el etanol es una molécula anfipática que altera el ambiente celular causando cambios en la fluidez, transporte, composición de lípidos y en el ensamblaje de proteínas de membrana, variaciones que pueden afectar los fenómenos asociados tal como es la replicación del ADN, llevando a un aumento en la síntesis de ADN que puede aumentar la síntesis de proteínas recombinantes/inducibles. En nuestro caso se observó un aumento de la expresión de la proteína a medida que se aumenta la concentración de etanol, tanto en la fracción soluble como en la no soluble (figura 16), sin embargo, debido principalmente a factores ajenos al protocolo, como problemas de electricidad, el rendimiento de expresión por este método empezó a decaer. Este fue el principal motivo por el cual se decidió modificar dos parámetros: (1) cambiar la cepa de expresión y (2) cambiar el medio de inducción.

Se decidió transformar la cepa de *E. coli* BL21 (DE3), que a diferencia de Rosetta (que se estaba utilizando con anterioridad), es una de las cepas de expresión por excelencia siendo conocida por producir grandes cantidades de proteína recombinante (Rosano y Ceccarelli, 2014). A diferencia con la cepa BL21 DE3, la cepa Rosetta tiene un plásmido pRARE que

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

codifica varios ARNt para codones raros, lo que es una ventaja si el gen de interés tiene gran proporción de codones raros (como parecía ser el caso de la PAS-PGK, es por eso que originalmente se utilizó como cepa de expresión (Rojas-Pirela, 2018)), sin embargo un plásmido adicional en la cepa tienen un costo que puede aumentar la carga metabólica en la célula. Otro de los factores que llevó a transformar en esta cepa (BL21 DE3) fue el antecedente que se tiene de la PAS-PGK recombinante de *L. major* (Adhikari *et al*., 2019; Biswas *et al*., 2020) donde se usa BL21 como sistema de expresión y tiene un buen rendimiento para la obtención de proteína soluble.

El mayor obstáculo al momento de expresar la proteína PAS-PGK recombinante era obtenerla en la fracción soluble, ya que esta tiende a agregarse y formar cuerpos de inclusión. Esto es una limitante que es común al utilizar sistemas heterólogos para la expresión de proteínas recombinantes y su vez es impredecible saber con antelación que tan propensa es una proteína a formar agregados; desde un punto de vista molecular los cuerpos de inclusión se forman a través de interacciones hidrofóbicas inespecíficas resultando en la formación de estos precipitados desordenados intracelulares. Por otra parte, la combinación de distintos parámetros pueden afectar la formación de agregados proteícos en sistemas experimentales *in vitro*, dentro de los que se incluye la composición del medio de cultivo, la temperatura de crecimiento, la tasa de producción y la disponibilidad de chaperonas de choque térmico (Ventura y Villaverde, 2006).

www.bdigital.ula.ve

Se ensayaron varias técnicas de expresión utilizando diferentes condiciones, la que mejor funcionó consistió en inducir grandes cantidades de cultivo (500 ml) con IPTG en medio TB a 25 ºC. La fracción soluble se utilizó para purificar la proteína en condiciones nativas y de las condiciones evaluadas (ver tabla 2), fue la purificación con un gradiente lineal de imidazol (50 – 300 mM) la que permitió obtener la proteína con un mayor rendimiento y grado de pureza (figura 21 y 22). En adición del gradiente, el éxito de la purificación bajo estas condiciones posiblemente se deba a que en el buffer se agregaron otros componentes como ß-mercaptoetanol y glicerol; el ß-mercaptoetanol es un agente reductor, el cual reduciría los residuos de cisteína rompiendo así los puentes disulfuro que se pueden formar entre contaminantes y la proteína de interés, además también ayuda a que la cola de polihistidina de la proteína se exponga mejor y por ende interactúe mejor con el niquel de la columna de afinidad (Kumar *et al*., 2012). Por otra parte, el glicerol favorece la estabilidad de las

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

proteínas en solución acuosa ayudando a inhibir o disminuir la formación de agregados (Vagenende *et al*., 2009), permitiendo a la proteína de interés interactuar mejor con la columna y a su vez a mantenerse más estable al momento de medir su actividad catalítica.

6.5. Identificación de la proteína PAS-PGK recombinante

Una de las principales preocupaciones de esta investigación era la posibilidad de lo que se estuviese expresando y purificando no fuera una PGK, y por ende la nula actividad que se tenía al momento de medir. Para confirmar la identidad de esta proteína se hizo una inmunodetección por Western blot, cuyos resultados (figura 23) indican que la proteína que se está expresando y purificando tiene un dominio PAS, ya que el anticuerpo anti-PAS la reconoce tanto en el lisado de inducción, como en la muestra purificada y corresponde con el peso molecular de 62 kDa de la proteína. Es de destacar que este es un anticuerpo policlonal producido a partir del péptido dominio PAS recombinante purificado (Rondón, 2018) y previamente se ha utilizado en estudios de ubicación subcelular en el parásito, mostrando un reconocimiento de la proteína nativa (Delgado, 2020). Por otra parte, identificar la proteína como una PGK fue más complejo. Se utilizaron dos anticuerpos anti-PGK, (1) el anti-PGKA de *T. cruzi* y (2) el anti-PGKC de *T. brucei*; la idea inicial era trabajar sólo con el anticuerpo anti-PGKA de *T. cruzi*, pero al realizar los ensayos se encontró que el anticuerpo reconocía la proteína en la fracción purificada, en la sobreexpresión en un lisado de *E. coli* e incongruentemente en el control (lisado de *E. coli* antes de inducir), esto no debería ocurrir ya que la PAS-PGK es una proteína que no está presente en la bacteria. Esto nos llevó a pensar que tal vez lo que se estuviese purificando fuera otra proteína de la bacteria, para confirmarlo primero había que verificar el buen funcionamiento del anticuerpo evaluando un lisado de *T. cruzi*, ya que si funciona eficientemente, en el Western blot se observarían las bandas que corresponden a las isoenzimas PGK del parásito especialmente la PGKB y la PGKA, hecho que no sucedió (figura 23.B) lo que indicaría que los títulos del anticuerpo habían decaído producto de continuos procesos de congelamiento y descongelamiento.

Por ello se decidió probar con el anticuerpo anti-PGKC de *T. brucei*, el resultado del Western blot utilizando el suero anti-PGKC (figura 23) muestra un reconocimiento en el lisado de sobreexpresión, que no fue apreciable en el control; en adición también hay un

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

reconocimiento en el lisado de *T. cruzi*, lo que indicaría el buen funcionamiento del anticuerpo. Sin embargo, no se detectó la banda que corresponde a la proteína PAS-PGK purificada (figura 23.A, línea 2) lo que lleva a considerar dos posibilidades: (1) la proteína purificada no es la recombinante o (2) debido a la baja cantidad de proteína purificada no se pudo visualizar empleando este anticuerpo. La primera opción es difícil de considerar, ya que el anticuerpo anti-PAS reconoce una banda con el mismo peso molecular de la proteína recombinante y a su vez, da señal en los lisados de *T. cruzi* y *L. braziliensis* (figura 24; líneas 5, 6 y 7) en un peso molecular muy similar al teórico reportado para la proteína nativa (58 kDa), por lo que es más probable que esté ocurriendo la segunda opción planteada. Adicionalmente la secuencia parcial del plásmido pGEM-T/ inserto *pas-pgk* presentada por Rojas-Pirela (2018), indica que la proteína que se está expresando tiene una región PGK. Al alinear esta secuencia con la de la base de datos (utilizada en esta investigación para realizar los estudios *in silico*), se observa una gran similitud (90 % según protein-BLAST) tanto en estructura como en la secuencia entre la proteína de la base de datos y la que se está expresando (ver Anexo 2), lo que lleva a inferir que existe gran posibilidad que la construcción contenga un dominio PGK.

www.bdigital.ula.ve

Para concluir, se puede afirmar que en base a los ensayos de inmunodetección la proteína sobreexpresada es una PAS-PGK, ya que es reconocida por los anticuerpo anti-PAS y anti-PGKC (en los lisados evaluados). Por otra parte, la proteína purificada solo es reconocida por el anticuerpo anti-PAS, lo que indica que esta proteína contiene un dominio PAS y posiblemente sea la PAS-PGK ya que su peso molecular concuerda con el reportado de 62 kDa como se observa en los geles SDS-PAGE 12% (figura 23.D).

6.6. Ensayos enzimáticos

El propósito original de esta investigación era determinar el efecto de la glucosa en la actividad de la enzima PAS-PGK recombinante basándose en los resultados reportado por Rojas-Pirela (2018), donde se muestra que a concentraciones mayores de 70 µM de glucosa la actividad de la enzima disminuye. A partir de esta premisa se iniciaron los ensayos de actividad, como prueba preliminar se evaluó el efecto que tenía la concentración de enzima en la actividad específica de la proteína, con la idea de luego seleccionar la concentración

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

óptima para los experimentos posteriores. Se encontró que a medida que aumenta la concentración de enzima disminuye la actividad, lo cual llevó a pensar en la posibilidad de que existiera un proceso de asociación y disociación, principalmente porque los dominios PAS promueven la formación de dímeros u oligomeros en muchas proteínas (Huang *et al.*, 1993; Pongratz *et al*., 1998; Taylor y Zhulin, 1999; Moglich *et al*., 2009). Sin embargo, cuando se iniciaron las mediciones en presencia de glucosa, se notó que existía una gran inconsistencia al momento de medir (resultados no mostrados), principalmente porque los valores de las mediciones de velocidad con la muestra estaban dentro del mismo orden de magnitud que la de descomposición de NADH que actúa como sustrato de la enzima acoplante utilizada para monitorear o seguir la reacción mediante mediciones espectrofotométricas. Para determinar si realmente la enzima no tenía actividad o esto se debía a que existía alguna interferencia debido a algún contaminante, ya que la enzima no se encontraba pura a homogeneidad (figura 19), se realizaron ensayos adicionales de inducción, sobreexpresión y purificación.

Una vez que se logró purificar a homogeneidad la proteína y además aumentar el rendimiento de purificación (ver sección 5.3), se retomaron nuevamente los ensayos enzimáticos para verificar su actividad.

www.bdigital.ula.ve

Inicialmente para comprobar el sistema de medición y verificar que los sustratos y enzima acoplante se encontraran en buen funcionamiento, se midió actividad de la enzima PGK comercial y de un extracto de *T. cruzi*; por otra parte, también se comprobó que factores como el imidazol y las sales del buffer donde se encuentra la proteína no afectaran la descomposición de NADH. Comprobado que el sistema de medición funcionaba correctamente, se intentó medir actividad de la proteína, en muestras sin concentrar y concentradas hasta diez veces para asegurar la presencia de suficiente cantidad de enzima en la cubeta, ensayando distintas condiciones dentro de las que se incluyen la diálisis de la muestra para eliminar el imidazol y las sales, diferentes tampones de medición con distintos pH y variando concentraciones de sustratos (ATP y 3-PGA) y concentraciones de magnesio. El resultado para todos estos ensayos fue el mismo, obteniéndose valores de velocidades ($\mu mol.min^{-1}$) para la enzima muy cercanos o similares a los de descomposición de NADH (figura 25). Para confirmar estos resultados se hicieron mediciones en tiempo real, que consiste en medir en una misma cubeta durante 600 seg, donde los primeros 200-300 seg se

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

medía la cubeta sin muestra, luego se agregaba la muestra y transcurrido el tiempo se comparaban las pendientes antes y después, notándose que no existían cambios significativos. En base a los resultados obtenidos se puede inferir que la proteína PAS-PGK recombinante no muestra o presenta una actividad apreciable, ya que todas las medidas realizadas están dentro del mismo orden de magnitud que la descomposición de NADH. Adicionalmente no se puede descartar que la tasa de descomposición del NADH enmascare la baja actividad de la enzima, para esto se debe emplear un reactivo de reciente adquisición y que no haya sido sujeto previamente a variaciones de temperatura de almacenamiento. En la PAS-PGK de *Leishmania major* se ha reportado una actividad en el orden de centi unidades de enzima, por lo que no es de descartar que la enzima de *T. cruzi* tenga valores similares que no pudieron ser detectados bajo las condiciones empleadas en este estudio.

Otras posibilidades pueden ser planteadas para explicar la falta de actividad de la PAS-PGK recombinante: (1) un problema en el plegamiento de la proteína debido al sistema de expresión, (2) la proteína puede sufrir modificaciones post-traduccionales en el organismo original que puede estar ausente en el sistema heterólogo y (3) la proteína forma cuerpos de inclusión o agregados y no es lo suficientemente soluble en el sistema recombinante (Tokmakov *et al*., 2012). También es posible que la construcción con la que se está trabajando tenga una mutación en el sitio activo, lo que podría evitar la unión correcta de los sustratos y por ende afectar el mecanismo catalítico de la proteína.

Los resultados obtenidos en este trabajo (figura 25) difieren de los estudios previos realizados con las otras proteínas PGK recombinante de *T. cruzi* tales como la PGKA (Barros-Álvarez, 2006; Quiñones, 2008), PGKB, PGKC (Quiñones, 2008) y en especial con el de la PAS-PGK (Rojas-Pirela, 2018). También es importante mencionar que en datos reportados por Adhikari *et a*l., 2019, trabajando con la proteína PAS-PGK presente en *Leshmania major* (LmPAS-PGK), tiene actividad catalítica que disminuye significativamente al cambiar el pH desde 5,5 a 7,5. Ellos sugieren que a un pH de 7,5 el dominio PAS de la proteína tiene un papel autoinhibitorio, efecto que no se manifiesta a un pH ácido de 5,5 debido a una posible protonación en los residuos de histidina en una región crítica del dominio PAS, funcionando este como un interruptor conformacional que activa o estimula la actividad catalítica de la proteína. En adición, Biswas *et al*. (2020) indican que la proteína LmPAS-PGK, es regulada por iones divalentes como el magnesio, ya que

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

mostraba inhibición con concentraciones mayores a 1 mM en Mg^{2+} a pH de 7,5 fenómeno que no se observa a pH 5,5. Con la idea de que la enzima PAS-PGK de *T. cruzi* (TcPAS-PGK) sigue el mismo comportamiento de LmPAS-PGK, esta podría estar inhibida debido a que la concentración de Mg^{2+} que se estaba utilizando en estos ensayos era 2 mM y el pH de trabajo era 7,5; tomando eso en consideración se hicieron mediciones con un rango de concentración entre 0,25-2 mM de $MgSO_4$ pero no se pudo detectar actividad enzimática. Biswas *et al*., (2020) indican que el efecto del magnesio en LmPAS-PGK es debido a una interacción que ocurre con el residuo His 57 que se ubica cercano a la región de bisagra flexible, específicamente en la α5-hélice del dominio PAS, que contiene una parche acídico Asp 60 y Asp 63 donde pueden unirse iones divalentes que podrían formar puentes entre el dominio PAS y el PGK, esta interacción ocurriría a pH 7,5 provocando una rigidez estructural que dificultaría la catálisis. Los mayores valores de actividad de esta enzima se obtienen a pH 5,5, valor de pH al cual los residuos de histina se encuentran protonados, lo que sugiere que la protonación de este residuo en una región crítica del dominio PAS actúa como un interruptor conformacional asociado con la activación de la proteína.

www.bdigital.ula.ve

Al analizar la secuencia de la proteína PAS-PGK de *T. cruzi*, se encontró que el residuo His 57 está ausente, en su defecto hay un residuo Tyr 57 (figura 14), por lo que es posible que en esta proteína no haya un cambio significativo de la actividad ante la presencia de magnesio.

Adicionalmente, debido a la localización subcelular propuesta para la enzima de *T. cruzi* en glicosoma y posiblemente mitocondria (Delgado, 2020) es poco probable su funcionamiento a un pH de 5,5.

Por otra parte, existe una diferencia entre los vectores seleccionados para la expresión de la proteína PAS-PGK recombinante de *L. major* y *T. cruzi.* La secuencia de la proteína LmPAS-PGK fue clonada en el vector pTrcHisA (Adhikari *et al*., 2019) que utiliza el promotor *trc* de la bacteria aumentando la eficiencia para la traducción y expresión de genes eucariotas en *E. coli*, facilitando el plegamiento correcto de la proteína. Contrariamente, la proteína TcPAS-PGK fue clonada en el vector pET28A (Rojas-Pirela, 2018) que utiliza el promotor T7 que no es propio de la bacteria y permite aumenta la velocidad de traducción y

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

cantidad de expresión de la proteína, sacrificando el plegamiento correcto de la proteína, más si se trata de estructuras con dominios hidrofóbicos, que se traduce en una proteína inactiva.

A pesar de ser secuencias muy similares, una posible explicación en la diferencia de actividad entre la PAS-PGK de *L. major* con la de *T. cruzi* puede recaer en que fisiológicamente son organismos distintos, con ciclos de vida y vectores distintos. Algo muy importante es que *L. major* solo tiene tres isoenzimas PGK (PGKB, PGKC y PAS-PGK) a diferencia de *T. cruzi* que tiene cuatro, de las cuales tres (PGKC, PGKA y PAS-PGK) se ubican en el glicosoma (Barros-Álvares, 2006; Quiñones, 2008; Delgado, 2020) por lo que es posible que la PAS-PGK no necesariamente tiene que cumplir la misma función en ambos organismos. De la misma manera, la isoenzima PAS-PGK no necesariamente debe ser activa, puede ser que cumpla un papel de señalización a través de ligandos, tales como glucosa, FAD^+ o grupos hemo, sin estar involucrada directamente en el metabolismo glicolítico o gluconeogénico del parásito. Teniendo esto en cuenta se recomienda realizar estudios de la proteína nativa en el parásito, que permitirían aclarar si la proteína PAS-PGK de *T. cruzi* es o no es catalíticamente activa.

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

7. CONCLUSIONES

- Estudios *in silico* de la proteína PAS-PGK recombinante de *Trypanosoma cruzi*, muestra que estructuralmente esta enzima contiene un dominio PGK clásico conservado unido a un dominio PAS, que se encuentra ubicado en la región N-terminal.
- Los ensayos de acoplamiento o *docking* molecular entre los ligandos glucosa y FAD^{+}, con la proteína PAS-PGK, muestran que existe una interacción energéticamente favorable entre estos ligandos y la proteína a través del dominio PAS.
- La proteína PAS-PGK recombinante se expresa mayoritariamente en forma de cuerpos de inclusión, pero un pequeño porcentaje (alrededor del 15%) se obtiene de manera soluble al inducir utilizando medio TB a una temperatura de 25 ºC.
- La proteína PAS-PGK recombinante se logró purificar a homogeneidad, empleando un gradiente de imidazol entre 50 a 300 mM.
- Los anticuerpos IgG α-PAS y α-PGKC reconocen la proteína sobreexpresada y en un lisado de *T. cruzi* respectivamente, lo que indica que efectivamente esta es una PAS-PGK.
- Ensayos enzimáticos muestran que la proteína PAS-PGK recombinante no es activa bajo las condiciones evaluadas en esta investigación.

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

8. PERSPECTIVAS

- Para confirmar si la proteína PAS-PGK del *T. cruzi* tiene o no tiene actividad, se recomienda realizar estudios de la proteína nativa en el parásito.
- Se sugiere purificar la enzima natural de *Trypanosoma cruzi* empleando una columna de afinidad, asociada a anticuerpos contra el dominio PAS exclusivo de la PAS-PGK.
- De confirmarse la actividad de la proteína, se propone realizar estudios cinéticos y de unión a ligandos detallados en la proteína nativa.
- Evaluar otros sistemas de expresión, preferiblemente eucariotas, que faciliten la expresión de proteína recombinante soluble.
- Determinar la estructura de cristalografía de la proteína PAS-PGK, para facilitar el estudio de la proteína e inferir en su función y rol dentro del parásito.

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

9. REFERENCIAS

1. Abrahamian, M., Kagda, M., Ah-Fong, A., Judelson, H. (2017). Rethinking the evolution of eukaryotic metabolism: novel cellular partitioning of enzymes in stramenopiles links serine biosynthesis to glycolysis in mitochondria. BCM Evolutionary Biology, 241: 1-16.

2. Acosta, H., Dubourdieu, M., Quiñones, W., Cáceres, A., Bringaud, F., Concepción, J. L. (2004). Pyruvate phosphate dikinase and pyrophosphate metabolism in the glycosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Comparative Biochemistry and Physiology, 138:347-356.

3. Acosta, H., Cáceres, A., Gónzalez-Marcano, E., Quiñones, W., Avilán, L., Dubourdieu, M., Concepción, J.L. (2015). Hysteresis and positive cooperativity as possible regulatory mechanisms of *Trypanosoma cruzi* hexokinase activity. Molecular and Biochemical Parasitology, 198 (2): 82-91.

4. Acosta, H., Burchmore, R., Naula, C., Gualdrón-López, M., Quintero-Troconis, E., Cáceres, A., Michels, P., Concepción, J.L., Quiñones, W. (2019). Proteomic analysis of glycosomes from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Molecular and Biochemical Parasitology, 229: 62-74.

5. Adhikari, A., Biswas, S., Mukherjee, A., Das, S., Adak, S. (2019). PAS domain containing phosphoglycerate kinase deficiency in *Leishmania major* results in increased autophagosome formation and cell death. Biochemical Journal, 476: 1303 - 1321

6. Amezcua, C., Harper, S., Rutter, J., Gardner, K. (2002). Structure and interactions of PAS kinase N-Terminal PAS domain: model for intramolecular kinase regulation. Structure, 10: 1349 – 1361.

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

7. Angles, R., Arenas-Salinas, M., García, R., Reyes-Suárez, J., Pohl, E. (2020). GSP4PDB: a web tool to visualize, search and explore protein-ligand structural patterns. BMC Bioinformatics, 21 (85): 1-15.

8. Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. (1989). Current protocols in molecular biology. New York: John Wiley & Sons, Inc.

9. Avilán, L., Gualdrón-López, M., Quiñones, W., González-González, L., Hannaert, V., Michels, P., Concepción, J.L. (2011). Enolase: A key player in the metabolism and a probable virulence factor of trypanosomatid parasites perspectives for its use as a therapeutic target. Enzyme Research, 2011: 1-14.

10. Ballón, P., Grados-Torrez, W., Enrique, R. (2019). Acomplamiento molecular: criterios prácticos para la selección de ligandos biológicamente activos e identificación de nuevos blancos terapéuticos. Revista CON-CIENCIA, 2 (7): 55-72.

11. Barisón, M., Rapado, N., Merino, E., Furusho Pral, E., Mantilla, B., Marchese, L., Nowicki, C., Silber, A., Cassera, M. (2017) Metabolomic profiling reveals a finely tuned, starvation-induced metabolic switch in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Journal of Biological Chemistry, 292 (21): 8964-8977.

12. Barros-Álvares, X. (2006). Caracterización bioquímica y estudios sobre el papel de la fosfoglicerato quinasa A (PGKA) en el metabolismo intermediario de *Trypanosoma cruzi.* Trabajo Especial de Grado. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela.

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

13. Barros-Álvarez, X., Cáceres, A., Michels, P., Concepción, J., Quiñones, W. (2014). The phosphoglycerate kinase isoenzymes have distinct roles in the regulation of carbohydrate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. Experimental Parasitology, 143: 39-47.

14. Barros-Álvarez, X., Cáceres, A., Ruiz, M., Michels, P., Concepción, J.L., Quiñones, W. (2015). The glycosomal-membrane associated phosphoglycerate kinase isoenzyme A plays a role in sustaining the glucose flux in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Molecular and Biochemical Parasitology, 200 (1-2) :5-8.

15. Bentahir, M., Feller, G., Aittaleb, M., Lamotte-Brasseur, J., Himri, T., Chessa, J.P., Gerday, C. (2000). Structural, Kinetic, and Calorimetric Characterization of the Cold-active Phosphoglycerate Kinase from the Antarctic *Pseudomonas* sp. TACII18. The Journal of Biological Chemistry, 275: 11147-11153.

www.bdigital.ula.ve

16. Bernstein, B., Michels, P., Hol, W. (1997). Synergistic effects of substrate-induced conformational changes in phosphoglycerate kinase activation. Nature, 385:275-278.

17. Bibikov, S., Biran, R., Rudd K., Parkinson, J. (1997). A signal transducer for aerotaxis in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 179:4075–79

18. Biwas, S., Adhikari, A., Mukherjee, A., Das, S., Adak, S. (2020). Regulation of *Leishmania major* PAS domain-containing phosphoglycerate kinase by cofactor Mg2+ ion at neutral pH. The FEBS Journal, 2020: 1- 13.

19. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

20. Bringaud, F., Riviere, L., Coustou, V. (2006). Energy metabolism of Trypanosomatids: Adaptation to available carbon sources. Molecular Biochemical Parasitology, 149: 1-9.

21. Brinkmann H., Martin, W. (1996). Higher-plant chloroplast and cytosolic 3-phosphoglycerate kinases: a case of endosymbiotic gene replacement. Plant. Plant Molecular Biology, 30 (1): 65-75.

22. Cazzulo, J. J. (1992). Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. FASEB Journal, 6: 3153-3161.

23. Cazzulo, J. J. (1994). Intermediate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 26: 157-165.

www.bdigital.ula.ve

24. Chhetri, G., Kalita, P., Tripathi, T. (2015). An efficient protocol to enhance recombinant protein expression using ethanol in *Escherichia coli*. MethodsX, 2 (2015): 385 – 391.

25. Cliff, M., Bowler, M., Varga, A., Marston, J., Szabo, J., Hounslow, A., Baxter, N., Blackburn, G., Vas, M., Waltho, J. (2010). Transition state analogue structures of human phosphoglycerate kinase establish the importance of charge balance in catalysis. Journal of the American Chemical Society, 132: 6507–6516.

26. Concepción, J.L., Adjé, C., Quiñones, W., Chevalier, N., Dubourdieu, M., Michels, P. (2001). The expression and intracellular distribution of phosphoglycerate kinase isoenzymes in *Trypanosoma cruzi*. Molecular and Biochemical Parasitology, 118 (1): 111-21.

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

27. Conteh, L., Engels, T., Molyneux, D. (2010). Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. Lancet, 375: 239–47.

28. Datta, D. (2003). Protein-Ligand Interactions: Docking, Design and Conformation Change. (Tesis doctoral), California Institute of Technology. Disponible en: https://resolver.caltech.edu/CaltechETD:etd-03242003-111426

29. Delgado, A. (2020). Ubicación subcellular de la proteína PER-ARNT-SIM Fosfoglicerato quinasa *like* (PAS-PGK *like*) en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. (Tesis de licenciatura no publicada), Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.

30. DeMille, D., Grose, J. (2013). PAS kinase: A nutrient sensing regulator of glucose homeostasis. Biochemistry and Molecular Biology International, 65(11): 921-929.

31. De Souza, W. U. (2010). Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. International Journal of Cell Biology, 2010: 1-18.

32. De Souza, W. (2002). From the cell biology to the development of new chemotherapeuticapproaches against trypanosomatids: dreams and reality. Kinetoplastid Biology and Disease, 1(1):3-24.

33. DNDi. (2015). Drugs for neglected diseases initiative. Disponible en: http://www.dndi.org [Consulta: 28 de febrero, 2019]

34. Edgar, R. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research, 32 (5): 1792-1797.

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

35. El Sayed, N., Myler, P., Bartholome, D., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A. (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, ethiologic agent of Chagas disease. Science, 309(5733): 409-415.

36. Fernandes, A., Nelson, K., Beverley, S. (1993). Evolution of nuclear ribosomal RNAs in the kinetoplastid protozoa: Perspectives on the age and origins of parasitism. Proceedings of the National Academy of Sciences, 90: 11608-11612.

37. Garcia, E., Ratcliffe, N., Whitten, M., Gonzalez, S., Azambuja, P. (2007). Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi-Rhodnius prolixus* interactions. Journal of Insect Physiology, 53(1): 11–21.

38. Gong, W., Hao, B., Mansy, S., Gonzalez, G., Gilles-Gonzales., Chan, M. (1998). Structure of a biological oxygen sensor: A new mechanism for heme-driven signal transduction. Proceedings of the National Academy of Sciences, 95 (26): 15177–15182.

39. González-Marcano, E., Mijares, A., Quiñones, W., Cáceres, A., Concepción, J.L. (2014). Post-translational modification of the pyruvate phosphate dikinase from *Trypanosoma cruzi*. Parasitology International, 63 (1): 80 – 86.

40. Grosdidier, A., Zoete, V., Michielin, O. (2011). SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. Nucleic Acid Research, 39: 270 – 277.

41. Grose, J., Rutter, J. (2010). The Role of PAS kinase in PASsing the Glucose Signal. Sensors, 10: 5668-5682.

42. Gualdrón-López, M., Brennand, A., Hannaert, V., Quiñones, W., Cáceres, A.J., Bringaud, F. (2012). When, how and why glycolysis became compartmentalised in the

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

Kinetoplastea. A new look at an ancient organelle. International Journal Parasitology, 42 (1):1-20.

43. Haanstra, J., González- Marcano, E., Gualdrón- López, M., Michels, P. (2016). Biogenesis, maintenance and dynamics of glycosomes in trypanosomatid parasites. Biochimica et Biophysica Acta, 1863 (5): 1038-1048.

44. Hao, H., Rutter, J (2008). The Role of PAS Kinase in Regulating Energy Metabolism. Life, 60 (4): 204-209.

45. Herrera, L. (2010). Una revisión sobre reservorios de *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico de la Enfermedad de Chagas. Boletín de Malariología y Salud Ambiental, 50(1): 3-15.

www.bdigital.ula.ve

46. Herrmann, S., Ma, Q., Johnson, M., Repik, A., Taylor, B. (2004). PAS domain of the Aer redox sensor requires C-terminal residues for native-fold formation and flavin adenine dinucleotide binding. Journal of Bacteriology, 186 (20): 6782-6791.

47. Henry, J., Crosson, S. (2011). Function, structure and mechanism of bacterial photosensory LOV proteins. Microbiology, 9 (10):713-723.

48. Huang, Z., Edery, I., Rosbash, M. (1993). PAS is a dimerization domain common to Drosophila period and several transcription factors. Nature, 364: 259–262.

49. Irwin, J., Sterling, T., Mysinger, M., Bolstad, E., Coleman, R. (2012). ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. Journal of Chemical Information and Modelling, 52: 1757 – 1768.

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

50. Kelley, L., Mezulis, S., Yates, C., Wass, M, Sternberg, M. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling prediction and analysis. Nature Protocols, 10 (6): 845 – 858.

51. Ko, J., Park, H., Heo, L., Seok, C. (2012). GalaxyWEB server for protein structure prediction and refinement. Nucleic Acids Research, 40 (1): 294 – 297.

52. Kumar, A., Tiwari, S., Thavaselvam, D., Sathyaseelan, K., Prakash, A., Barua, A., Arora, S., Kameswara-Rao, K. (2012). Optimization and efficient purification of recombinant Omp28 protein of *Brucella melitensis* using Triton X-100 and ß-mercaptoethanol. Protein Expression and Purification, 83(2): 226-232.

53. Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680 - 685.

www.bdigital.ula.ve

54. Lee, B., Bacon, K., Bottazzi, M., Hotez P (2010). Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. The Lancet Infectious Diseases, 13 (4): 342–48.

55. Li, Y., Shah-Simpson, S., Okrah, K., Belew, A., Choi, J., Caradonna, K. (2016). Transcriptome Remodeling in *Trypanosoma cruzi* and Human Cells during Intrecellular Infection. PLoS Pathogens, 12 (4): 1-30.

56. Lill, M. (2011). Efficient Incorporation of Protein Flexibility and Dynamics into Molecular Docking Simulations. Biochemistry, 2011 (50): 6157-6169.

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

57. Lowell, S., Davis, W., Arendall, W., de Bakker, P., Word, J., Prisant, M., Richardson, J., Richardson, D. (2002). Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. Proteins: Structure, Function & Genetics, 50: 437-450.

58. Manchola, N., Rapado, L., Barisón, M., Silber A. (2016). Biochemical Characterization of Branched Chain Amino Acids Uptake in *Trypanosoma cruzi*. The Journal of Eukaryotic Microbiology, 63 (3): 299-308.

59. Maslov, D., Podlipaev, S., Lukes, J. (2001). Phylogeny of the Kinetoplastida: Taxonomic Problems and Insights into the Evolution of Parasitism. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 96:397-402.

60. Maugeri, D., Cannata, J., Cazzulo, J.J. (2011). Glucose metabolism in *Trypanosoma cruzi*. Essays in Biochemistry, 51: 15-30.

www.bdigital.ula.ve

61. Mitchell, A., Attwood, T., Babbitt, P., Blum, M., Bork, P., Bridge, A., Brown, S., Chang, H., El-Gebali, S., Fraser, M., Gough, J., Haft, D., Huang, H., Letunic, I., Lopez, R., Luciani, A., Madeira, F., Marchler-Bauer, A., Mi, H., Natale, D., Necci, M., Nuka, G., Orengo, C., Pandurangan, A., Paysan-Lafosse, T., Pesseat, S., Potter, S., Qureshi, M., Rawlings, N., Redaschi, N., Richardson, L., Rivoire, C., Salazar, G., Sagrador-Vegas, A., Sigrist, C., Sillitoe, I., Sutton, G., Thanki, N., Thomas, P., Tosatto, S., Yong, S., Finn, R. (2019). InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. Nucleic Acids Research, 47: 351-360.

62. Möglich, A., Ayers, R., Moffat, K. (2009). Structure and Signaling Mechanism of Per-ARNT-Sim Domains. Cell Press, Structure, 17: 1282-1292.

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

63. Mohan, V., Gibbs, A., Cummings, M., Jaeger, E., DesJarlais, R. (2005). Docking: Successes and Challenges. Current Pharmaceutical Desing, 2005 (11): 323-333.

64. MPPS. (2007). Vigilancia de Enfermedad de Chagas: Guía para el diagnóstico, manejo y tratamiento de enfermedad de Chagas en fase aguda a nivel de los establecimientos de salud. 1ª ed. Ministerio del Poder Popular para la salud.

65. Mulder, N., Apweiler, R. (2007). InterPro and InterProScan. Bergman, N.H. (eds). Comparative Genomics. Methods in Molecular Biology, 396: 59-70.

66. Nambu, J.R., Lewis, O., Wharton, K., Crews, S. (1991). The *Drosophila* single-minded gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. Cell, 67: 1157–1167.

www.bdigital.ula.ve

67. Nogueira, N., Saraiva, F., Sultano P., Cunha P., Laranja G., Justo G. (2015). Proliferation and Differentiation of *Trypanosoma cruzi* inside Its Vector Have a New Trigger: Redox Status. PLoS ONE, 10 (2): 1-16.

68. Opperdoes, F., Michels, P. (2001). Enzymes of carbohydrate metabolism as potential drug targets. International Journal for Parasitology, 31: 482-490.

69. Osuna, A., Adroher, F.J., Lupiañez, J.A. (1990). Influence of electrolytes and nonelectrolytes on growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. Cell Diferentiation and Development, 30 (2): 89-95.

70. Papadopoulos, J., Agarwala, R. (2007). COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. Bioinformatics, 23 (9): 1073-1079.

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

71. Pellequer, J., Karen, A., Smith, W., Kay, S., Getzoff, D. (1998). Photoactive yellow protein: A structural prototype for the three-dimensional fold of the PAS domain superfamily. Proceedings of the National Academy of Sciences, 95: 5884-5890.

72. Pérez-Molina, J., Molina, I. (2018). Chagas disease. The Lancet, 391 (10115): 82–94.

73. Pettersen, E., Goddard, T., Huang, C., Couch, G., Greenblatt, D., Meng E., Ferrin, T. (2004). UCSF Chimera -A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. Journal of Computational Chemistry, 25 (13): 1605-1612.

74. Quijano, I., Dumonteil, E. (2011). Advances and challenges toward a vaccine against Chagas disease. Human Vaccines, 7 (11): 1184-1191.

www.bdigital.ula.ve

75. Rao, F., Ji, Q., Soehano, I., Liang, Z. (2011). Unusual heme-binding PAS domain from YybT family proteins. Journal. Bacteriology, 193 (7): 1543-1551.

76. Rojas-Pirela, M., Rigden, D., Michels, P., Cáceres, A., Concepción, J., Quiñones, W. (2018). Structure and function of Per-ARNT-Sim domains and their possible role in the life-cycle biology of *Trypanosoma cruzi*. Molecular & Biochemical Parasitology, 219 (2018): 52-66.

77. Rojas-Pirela. (2018). Caracterización molecular y bioquímica de la PAS-PGK like recombinante de *T. cruzi.* (Tesis doctoral no publicada). Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

78. Rosano, G., Ceccarelli, E. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. Frontiers in microbiology, 5: 1-17.

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

79. Schmunis, G., Yadon, Z. (2010). Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. Acta Tropica, 115 (1-2): 14–21.

80. Silber, A., Colli, W., Ulrich, H., Manso, M., Pereira, A. (2005). Amino Acid Metabolic Routes in *Trypanosoma cruzi*: Possible Therapeutic Targets Against Chagas Disease. Current Drug Targets-Infectious Disorders, 5: 53-64.

81. Silber, A., Tonelli, R., Lopes, C., Cunha-e-Silva, N., Torrencilhas, A. (2009). Glucose uptake in the mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. Molecular Biochemistry Parasitology, 168: 102-108.

82. Shah-Simpson, S., Lentini, G., Dumoulin, P., Burleigh, B. (2017). Modulation of host central carbon metabolism an *in situ* glucose uptake by intracellular *Trypanosoma cruzi* amastigotes. PLoS Pathogens, 13 (11): 1-23.

www.bdigital.ula.ve

83. Shimizu, T. (2013). The Heme-based oxygen sensor phosphodiesterase Ec-Dos (DosP): Structure-function relationships. Biosensors, 3 (2): 211-237.

84. Souza, R., Damasceno, F., Marsiccobetre, S., Biran, M; Murata, G., Curi, R., Bringaud, F., Silber, M. (2021). Fatty acid oxidation participates in resistance to nutrient-depleted environments in the insect stages of *Trypanosoma cruzi*. PLoS Pathogens, 17 (4): 1-25.

85. Studier, W. F. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. Protein Expression and Purification, 41: 207-234.

86. Taylor, B., Zhulin, B. (1999). PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 63: 479–506.

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

87. Tokmakov, A., Kurotani, A., Takagi, T., Toyama, M., Shirouzu, M., Fukami, Y., & Yokoyama, S. (2012). Multiple Post-translational Modifications Affect Heterologous Protein Synthesis. The Journal of Biological Chemistry, 287 (32): 27106–27116.

88. The Uniprot Consortium (2019). UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. Nucleic Acids Research, 47: 506-515.

89. Uchida, T., Sato, E., Sato, A., Sagami, I., Shimizu, T., Kitagawa, T. (2005). CO-dependent activity-controlling mechanism of heme-containing CO-sensor protein, neuronal PAS domain protein 2. The Journal of Biological Chemistry, 280: 21358-21368.

90. Urbina, J. A. (1994). Intermediary Metabolism of *Trypanosoma cruzi*. Parasitology Today, 10: 107-110.

www.bdigital.ula.ve

91. Vagenende, V., Yap, M., Trout, B. (2009). Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. Biochemistry, 48: 11084-11096.

92. Ventura, S., Villaverde, A. (2006). Protein quality in bacterial inclusion bodies. Trends in Biotechnology, 24 (4): 179-185.

93. Verlinde, C., Hannaert, V., Blonski, C., Wilson, M., Périé, J., Fothergill-Gilmore, L., Opperdoes, F., Gelb, M., Hol, W., Michels, P. (2001). Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. Drug Resistance Updates, 4: 50-65.

94. Voet, D., Voet, J. (2007). Bioquímica. 3ª ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Pág: 616-617.

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

95. Vreede, J., van der Horst, M., Hellingwerf, K., Crielaard, W., van Aalten, D. (2003). PAS Domains: Common structure a common flexibility. The Journal of Biological Chemistry, 278 (20): 18434-18439.

96. Waterhouse, A., Procter, J., Martin, D., Clamp, M., Barton, G. (2009). Jalview Version 2 – a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. Bioinformatics, 25 (9): 1189 – 1191.

97. WHO. (2012). Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. Geneva. WHO Press: 100-pp.

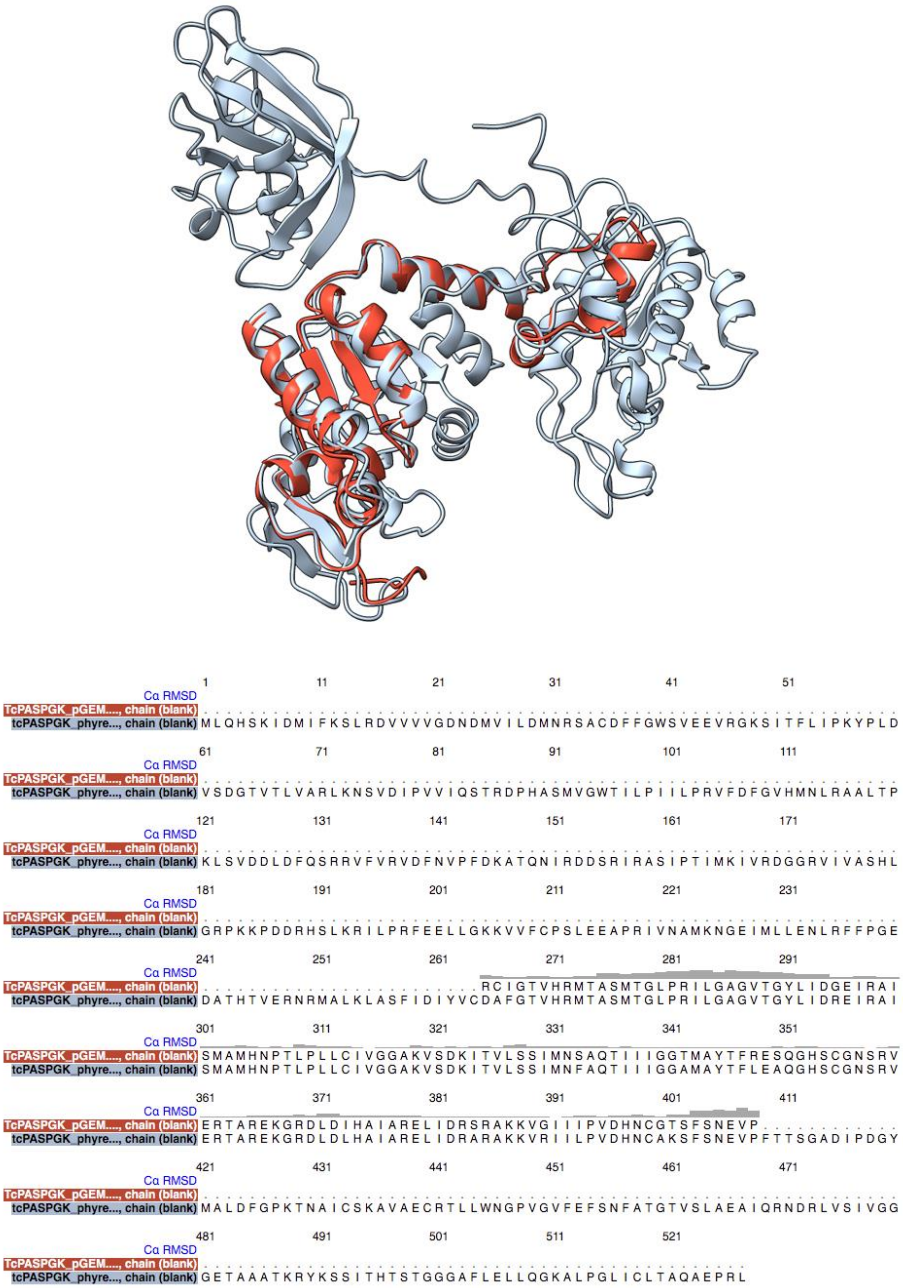
98. WHO. (2015). Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases, Third WHO Report on Neglected Tropical Diseases, World Health Organization. Disponible en: http://www.who.int/neglected_diseases/9789241564861/en/ [Consulta: 28 de febrero, 2019].

99. Xu, D., Zhang, Y. (2012). Ab initio protein structure assembly using continuous structure fragments and optimized knowledge-based force field. Proteins, 2012 (80): 1715-1735.

100. Zhong, X., Hao, B., Chan, M (2003). Structure of the PAS fold and signal transduction mechanisms. Pp. 1-14, in Stephen T. Crews (ed). PAS Proteins: Regulators and Sensors of Development and Physiology. 1a ed. Springer Science + Business Media, LLC. Estados Unidos. 263-pp.

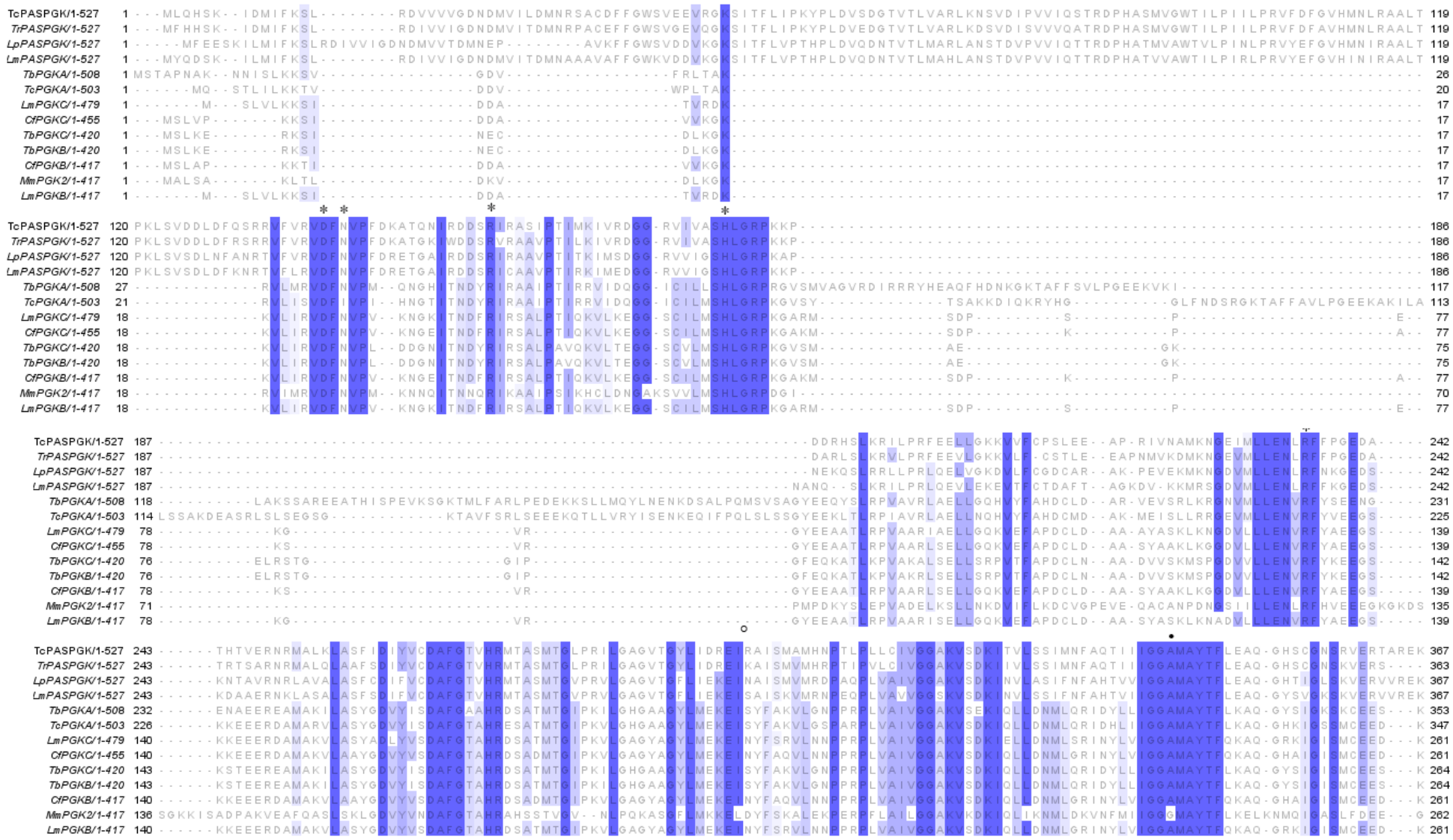
www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual



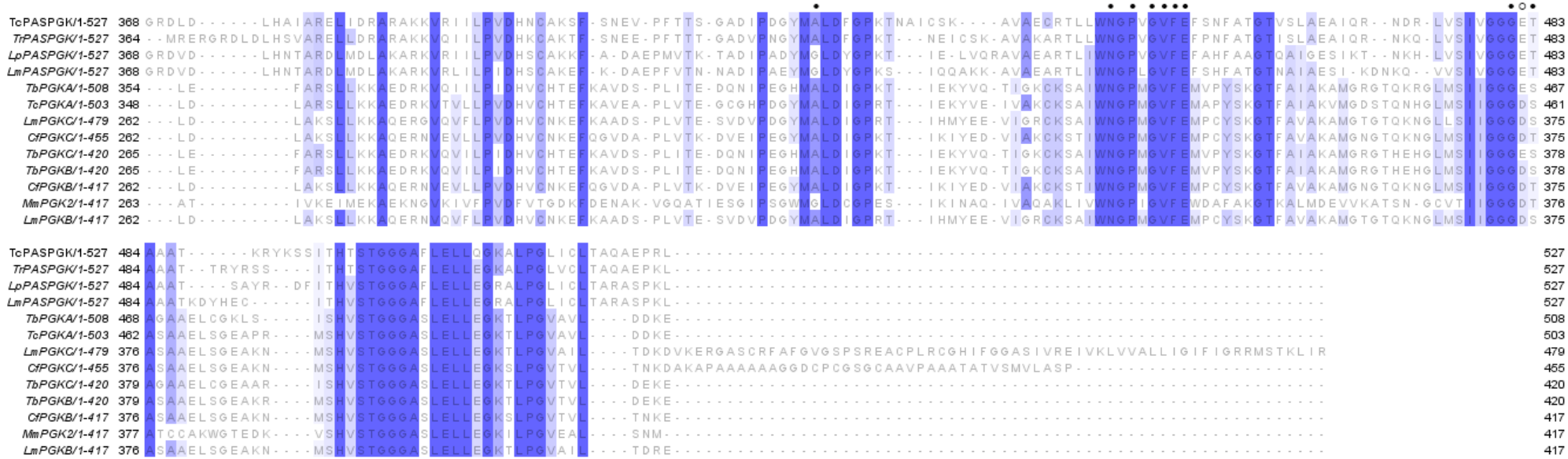
Anexo 1. Evaluación la secuencia de la proteína PAS-PGK de *T. cruzi* de la cepas CL Brener y EP. Comparación entre la secuencia aminoacídica y estructura de la proteína PAS-PGK de *T.cruzi* CL Brener (azul claro) y la secuencia parcial del constructo pGEM-T/ inserto *pas-pgk* de *T.cruzi* EP (rojo).

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual



Anexo 2. Alineamiento de la secuencia aminoácidos de la proteína PAS-PGK de *Trypanosoma cruzi* con otras secuencias PGK. Resultado del alineamiento de secuencias entre la proteína PAS-PGK de *T, cruzi* con proteínas PGK de otros organismos. Tc, *Trypanosoma cruzi*; Tr, *Trypanosoma rangeli*; Tb; *Trypanosoma brucei*; Lm, *Leshmania major*; Lp, *Leptomonas pyrrhocoris*; Cf, *Crithidia fasciculata*; Mm, *Mus musculus*. Los asteriscos (*) indican el sitio de unión a 1,3 PGA; los círculos negros (•) el sitio de unión a ADP y el círculo blanco (°) señala el residuo catalítico. Los recuadros indican que al menos dos secuencias comparten aminoácidos idénticos o altamente conservados.

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual



Anexo 2 (Continuación). Alineamiento de la secuencia aminoácidos de la proteína PAS-PGK de *Trypanosoma cruzi* con otras secuencias PGK. Resultado del alineamiento de secuencias entre la proteína PAS-PGK de *T, cruzi* con proteínas PGK de otros organismos. Tc, *Trypanosoma cruzi*; Tr, *Trypanosoma rangeli*; Tb; *Trypanosoma brucei*; Lm, *Leshmania major*; Lp, *Leptomonas pyrrhocoris*; Cf, *Crithidia fasciculata*; Mm, *Mus musculus*. Los asteriscos (*) indican el sitio de unión a 1,3 PGA; los círculos negros (•) el sitio de unión a ADP y el círculo blanco (°) señala el residuo catalítico. Los recuadros indican que al menos dos secuencias comparten aminoácidos idénticos o altamente conservado.

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual