



MODELO TRIDIMENSIONAL DE LAS CISTEÍNPROTEASAS NfCPB y NfCPB-L de *Naegleria fowleri*

LEIDY GABRIELA CASTILLO VEGA

MARTHA LUCIA POSADA BUITRAGO Ph.D

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Asesora Interna

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

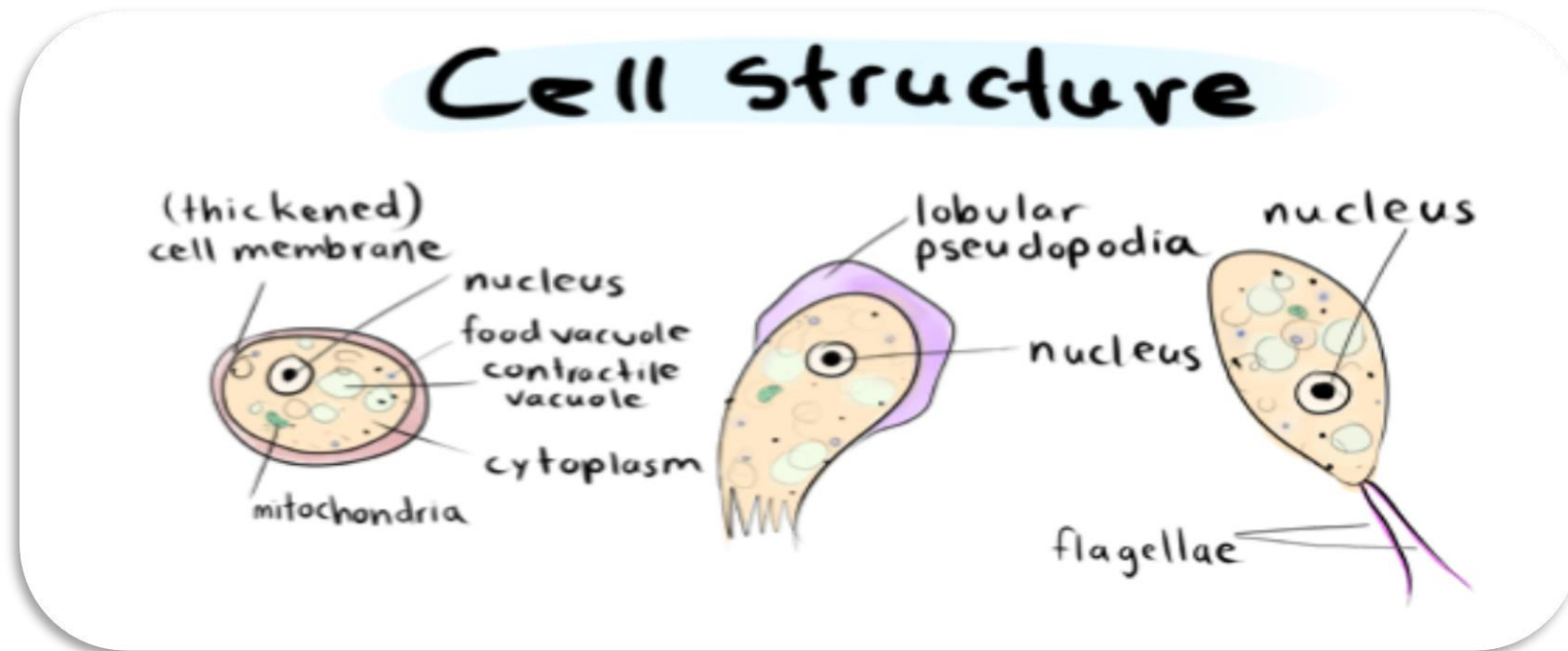
BOGOTÁ D.C, 2019

INTRODUCCIÓN

Termofílica (20-37°C), propias de aguas templadas y ambientes hipersalinos (Page 1967, 1988; Park et al. 2009, 2012; Park 2016, 2017; Rogerson and Patterson 2000)



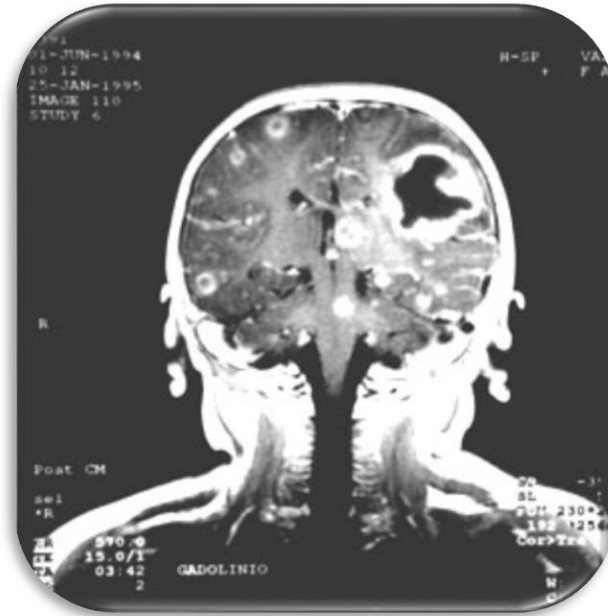
Reino: Protista
Filo: Percolozoa
Clase: Heterolobosea
Orden: Schizopyrenida
Familia: Vahlkampfiidae
Género: *Naegleria*
Especie: *N. fowleri*
Rodney F. Carter (1970)



Disponible en: <https://brainsenemy.wordpress.com/2012/02/20/physical-characteristics/>

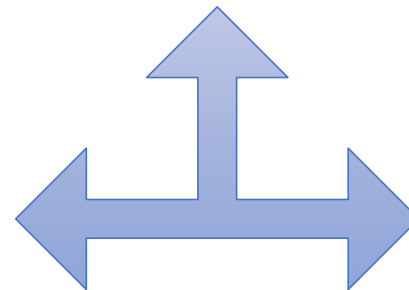
Naegleria fowleri

INTRODUCCIÓN



Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/fbpe/img/rci/v23n3/f17.jpg>

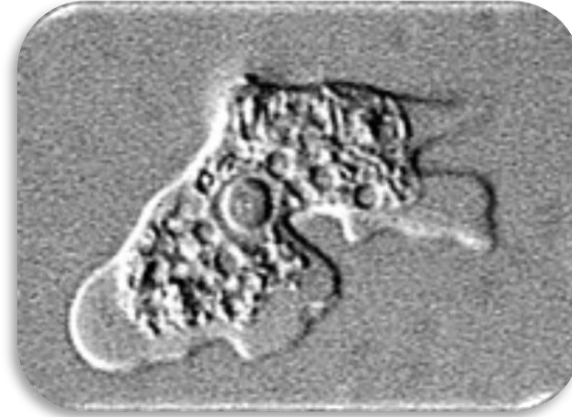
Meningitis agudas causan 241.000 muertes al año a nivel mundial. (WHO 2017) Solo se reportan las meningitis bacterianas y meningitis virales.



Reporte de casos mundiales:

- Estados Unidos: 143 (Texas, Arkansas, Florida, Minnesota, Virginia)(1968-2016)
- Colombia: 5 casos. (Antioquia, Boyacá)
- Pakistan: 25 casos.(2011-2015)
- República Checa, Australia, México, Nueva Zelanda, Nigeria, Inglaterra e India

INTRODUCCIÓN



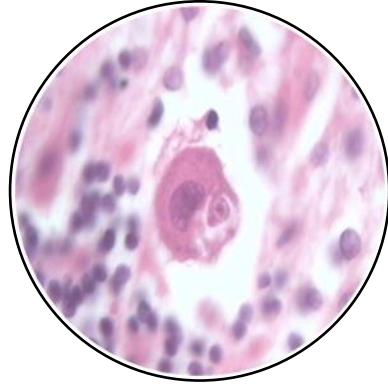
Disponible en:
<http://mediad.publicbroadcasting.net/p/kedm/files/201509/naegleria-troph-tn.jpg>

- ❖ Entrada de los trofozoitos por la mucosa nasal
- ❖ *N. fowleri* se abre paso hasta el cerebro a través del plexo del nervio olfativo llegando al bulbo olfativo del cerebro aproximadamente 24 horas después de la infección.

Logra la desmielinización de las neuronas, degeneración de los procesos de la glía y la inhibición de la acción inmunológica. Se han descrito dos vías de patogenicidad en *N. fowleri*, dependiente y no dependiente de contacto.

PAM

INTRODUCCIÓN



Gran tasa de sub-diagnósticos de meningitis amebianas, se necesita entrenamiento para el reconocimiento de trofozoitos en cortes histológicos.



No hay medicamentos efectivos y específicos para tratar la infección por *N.fowleri*.



INTRODUCCIÓN

Catepsinas implicadas en el proceso de degradación de Inmunoglobulinas

NfCPB y NfCPB –L de 38.42 KDa y 34 KDa respectivamente son fundamentales en la patogenicidad de *N.fowleri*

Evasión inmunológica y la supervivencia intracelular, así como en el reconocimiento e invasión celular

IgG; impide la liberación de productos de lisis celular de células como Neutrófilos, Monocitos, Eosinófilos y NK.

IgM-IgA; impide opsonización.

Implicadas en la degradación de la fibronectina, hemoglobina, colágeno y albúmina.

PREGUNTA PROBLEMA

¿Es posible realizar el modelo tridimensional de las proteínas NfCPB y NfCPB-L de *Naegleria fowleri*?

OBJETIVOS

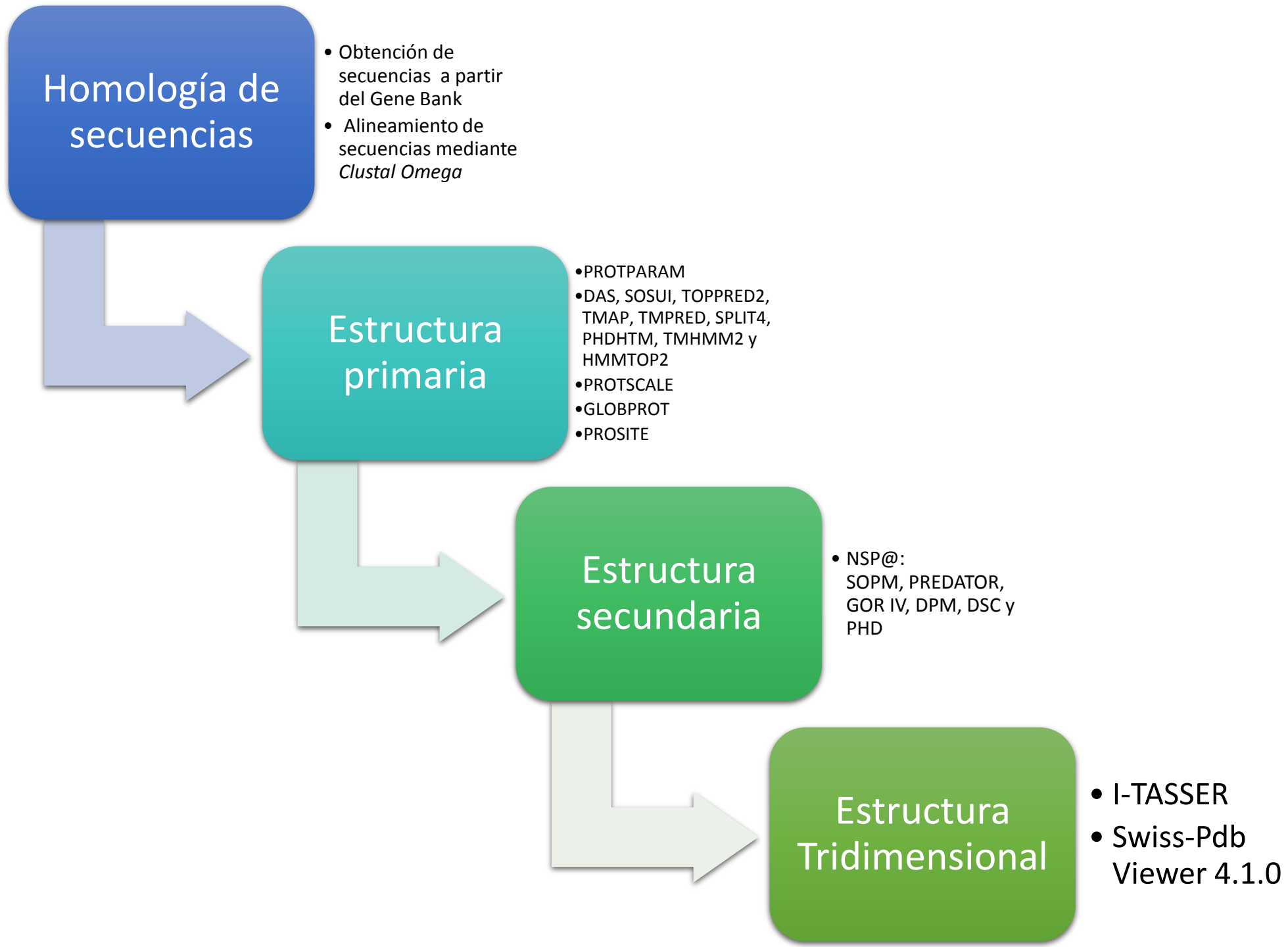
❖ General

Proponer un diseño tridimensional de las proteínas NfCPB y NfCPB-L presentes en la membrana de *Naegleria fowleri*.

❖ Específicos

1. Analizar las proteínas NfCPB y NfCPB-L codificadas en el genoma de *Naegleria fowleri*, mediante herramientas tales como SAPS, ProtParam, ProtScale, TMPRED, PFAM.
2. Identificar los dominios funcionales presentes en la estructura de las proteínas NfCPB y NfCPB-L de *Naegleria fowleri*.
3. Predecir la estructura terciaria de las proteínas NfCPB y NfCPB-L de *Naegleria fowleri* por medio de las herramientas I-TASSER y Swiss-Pdb Viewer 4.1.0

METODOLOGÍA



RESULTADOS

PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS- PROTPARAM

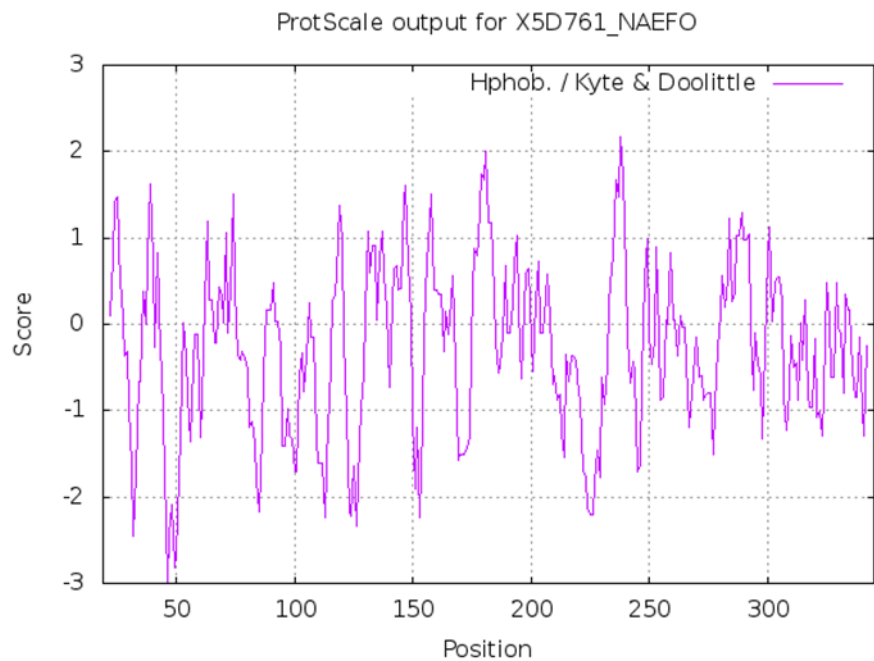
NfCPB		NfCPB-L	
Características	<u>Resultados</u>	Características	<u>Resultados</u>
Número de aminoácidos	345	Número de aminoácidos	313
Fórmula	C ₁₇₂₆ H ₂₆₅₉ N ₄₅₇ O ₄₉₆ S ₁₈	Fórmula	C ₁₅₂₈ H ₂₃₄₁ N ₄₀₈ O ₄₅₁ S ₁₇
Peso Molecular	38404,94	Peso Molecular	34154,82
Punto Isoelectrico	7.66	Punto Isoelectrico	7.73
Número de Átomos	5361	Número de Átomos	4738
Vida Media	30 Horas en reticulocitos de mamífero(in vitro) >20 horas en levaduras (in vivo) >10 en <i>E.coli</i> (in vivo)	Vida Media	30 Horas en reticulocitos de <u>mamífero</u> (in vitro) >20 horas en levaduras (in vivo) >10 en <i>E.coli</i> (in vivo)
Indice de Inestabilidad	34,84	Indice de Inestabilidad	32,2
Indice Alifático	81,96	Indice Alifático	74,29
Promedio de Hidropatía	-0,261	Promedio de Hidropatía	-0,189

Leu: 7,30%
Val:7,30%

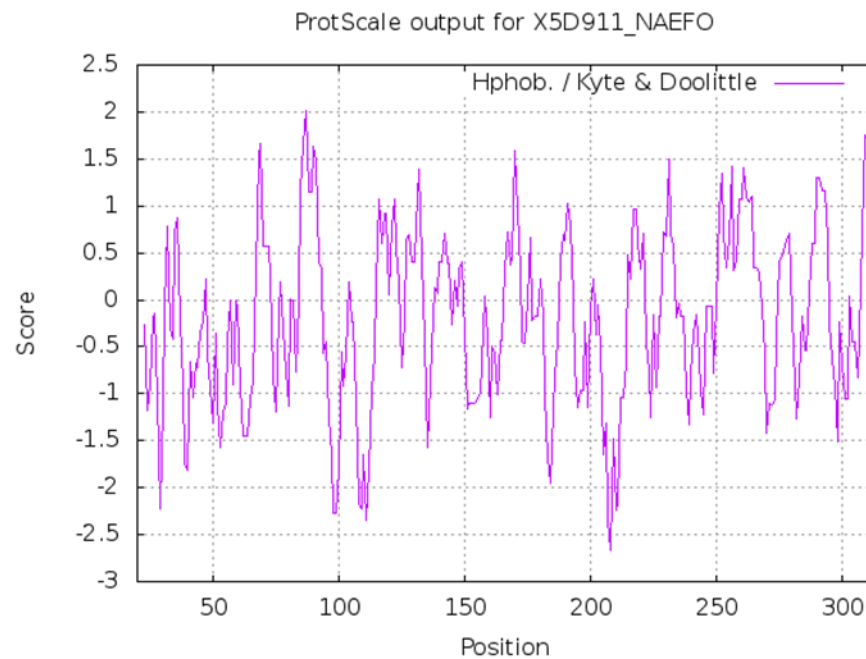
Ala: 7,50%
Val:7,50%

RESULTADOS

NfCPB



NfCPB-L



ÍNDICE DE
HIDROFOBICIDAD

RESULTADOS

GLOBPLOT

4 regiones flexibles:

101-108

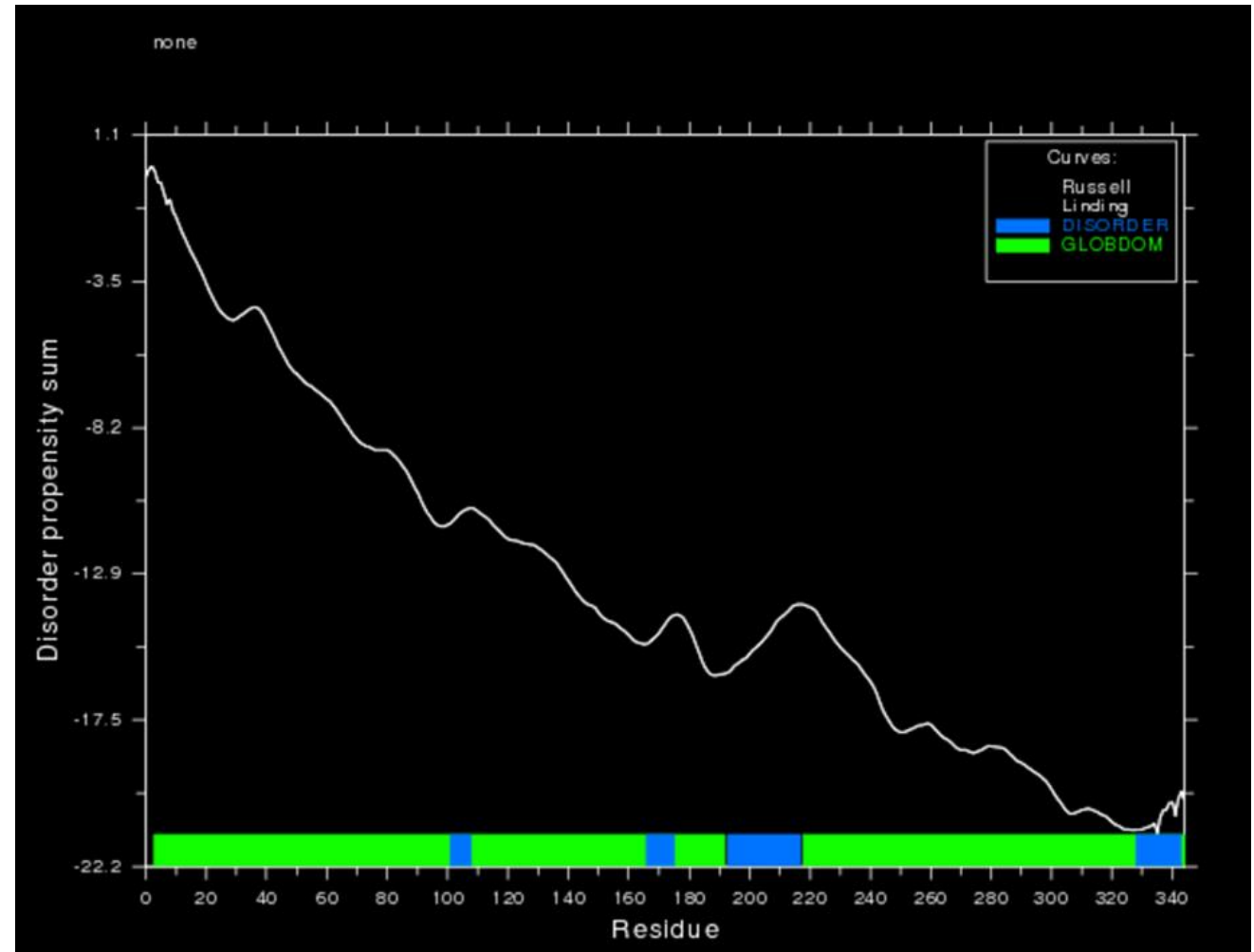
166-175

193-217

328-343

Dominios globulares y
Regiones Desordenadas

NfCPB



RESULTADOS

GLOBPLOT

5 regiones flexibles:

96-100

148-162

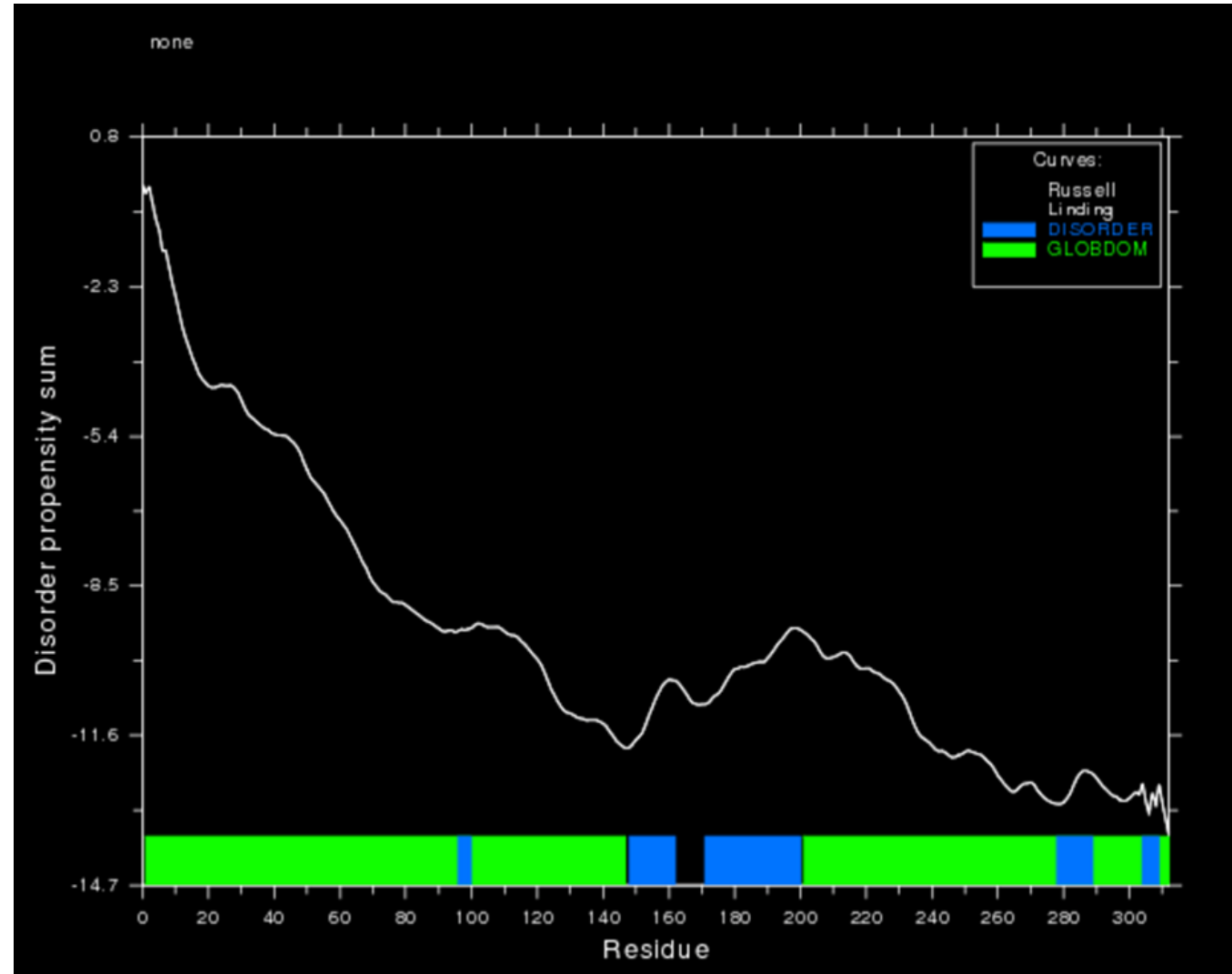
171-200

278-289

304-309

Dominios globulares y
Regiones Desordenadas

NfCPB-L

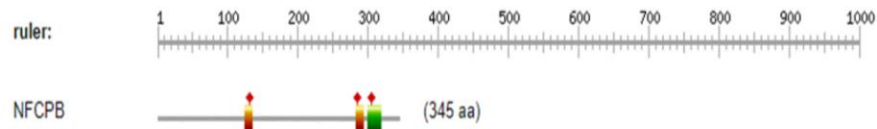


RESULTADOS

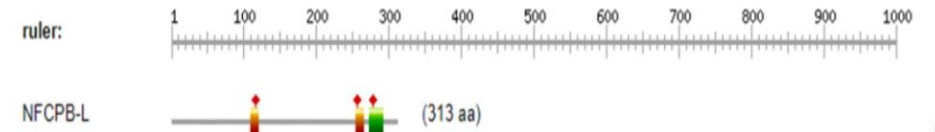
PROTSCALE

3 sitios activos de Tio-
proteasas que contienen
Cisteína, Histidina y
Asparagina

hits by patterns: [3 hits (by 3 distinct patterns) on 1 sequence]



hits by patterns: [3 hits (by 3 distinct patterns) on 1 sequence]



NfCPB

PATRON	ID	NÚMERO DE AA	AMINOÁCIDOS
N-(P)-[ST]-[P]	ASN-GLICOSILACIÓN	305-308	NSWS

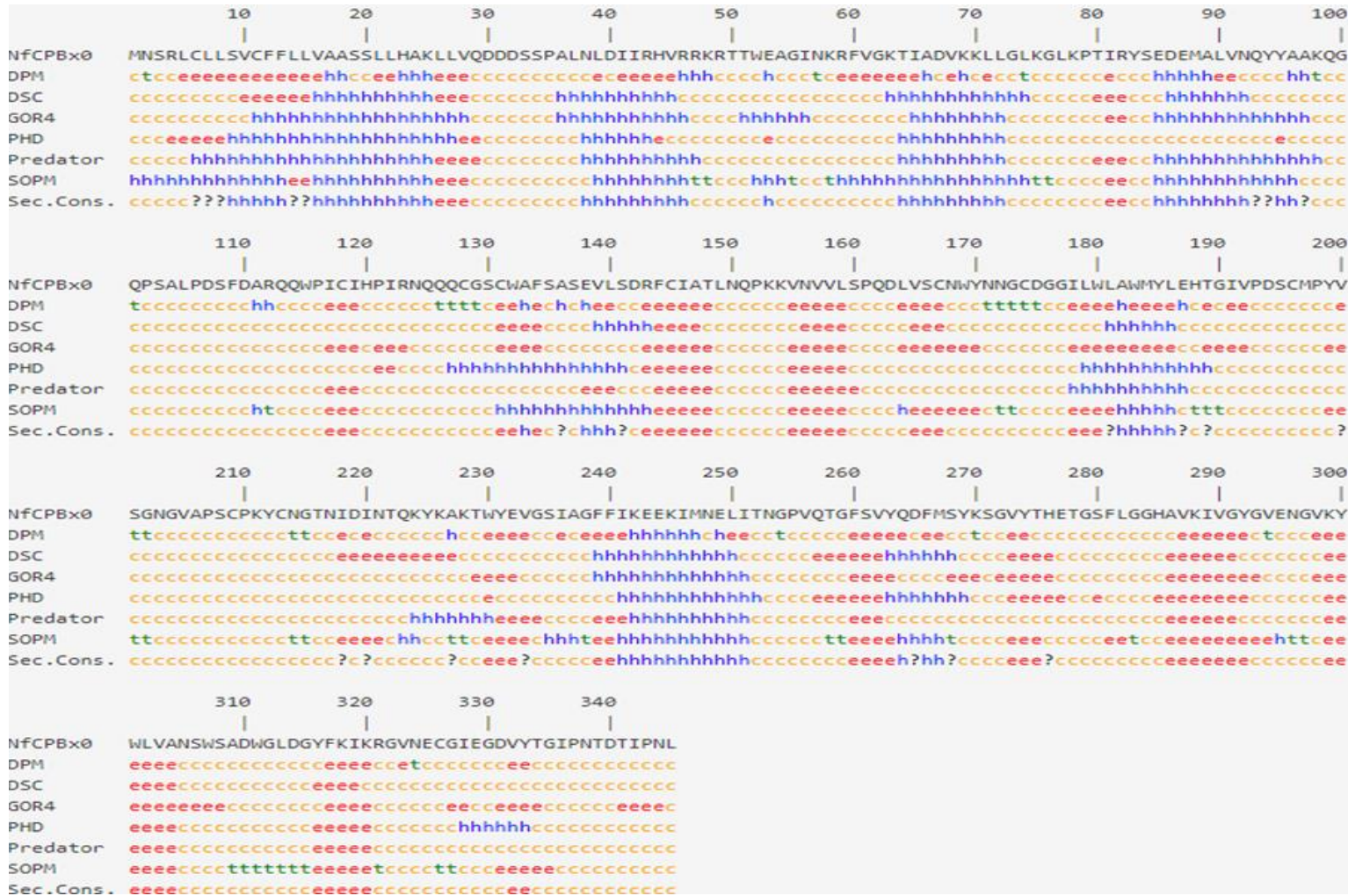
Sitios de N-glicosilación



NfCPB-L

PATRON	ID	NÚMERO DE AA	AMINOÁCIDOS
N-(P)-[ST]-[P]	ASN-GLICOSILACIÓN	279-282	NSWG
		288-291	NGFF

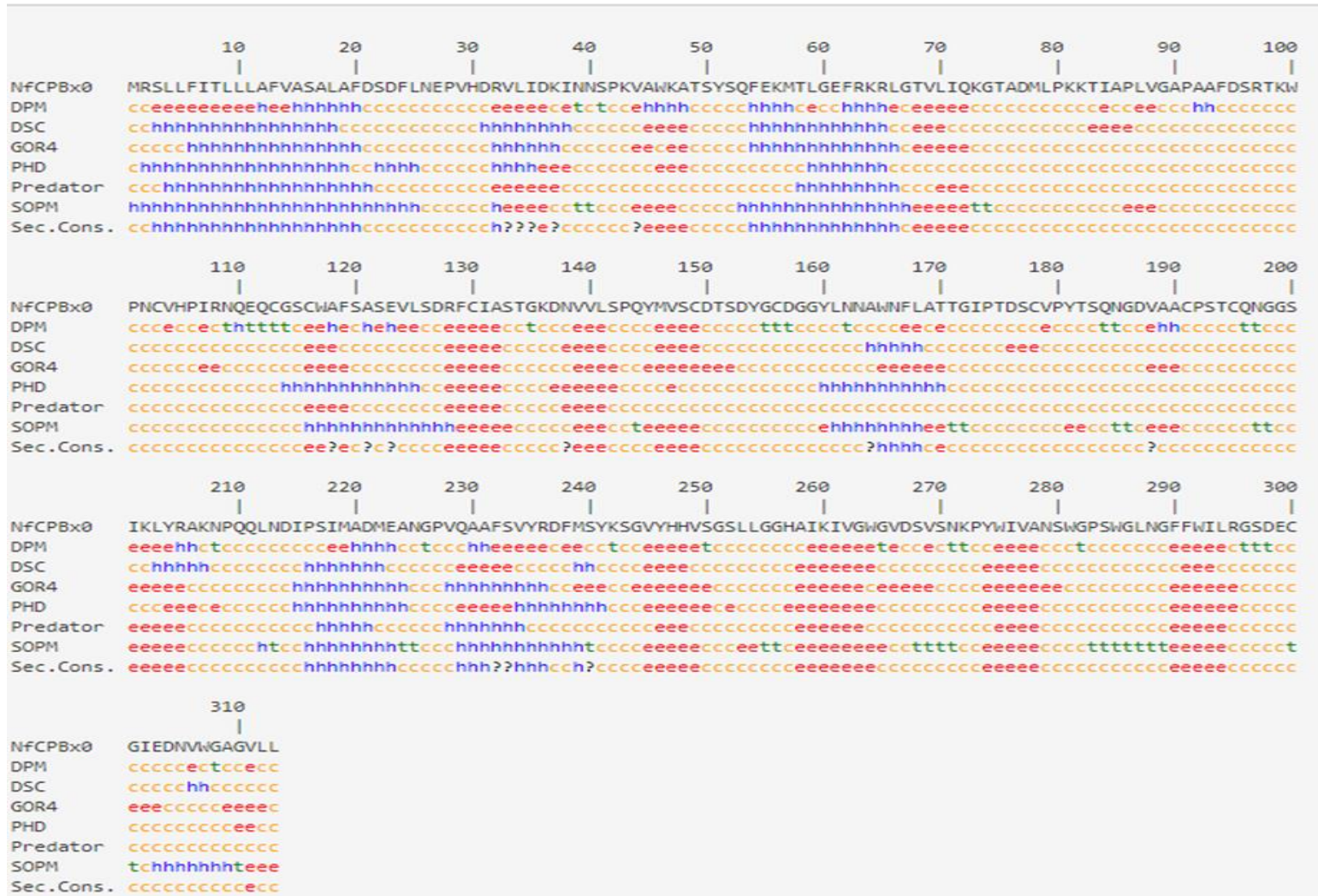
RESULTADOS



5 hélices α entre los aminoácidos 16-52, 38-46, 64-72, 85-92 y 241-251
 5 láminas β entre los aminoácidos 143-148, 155-159, 286-292, 299-304 y 316-320

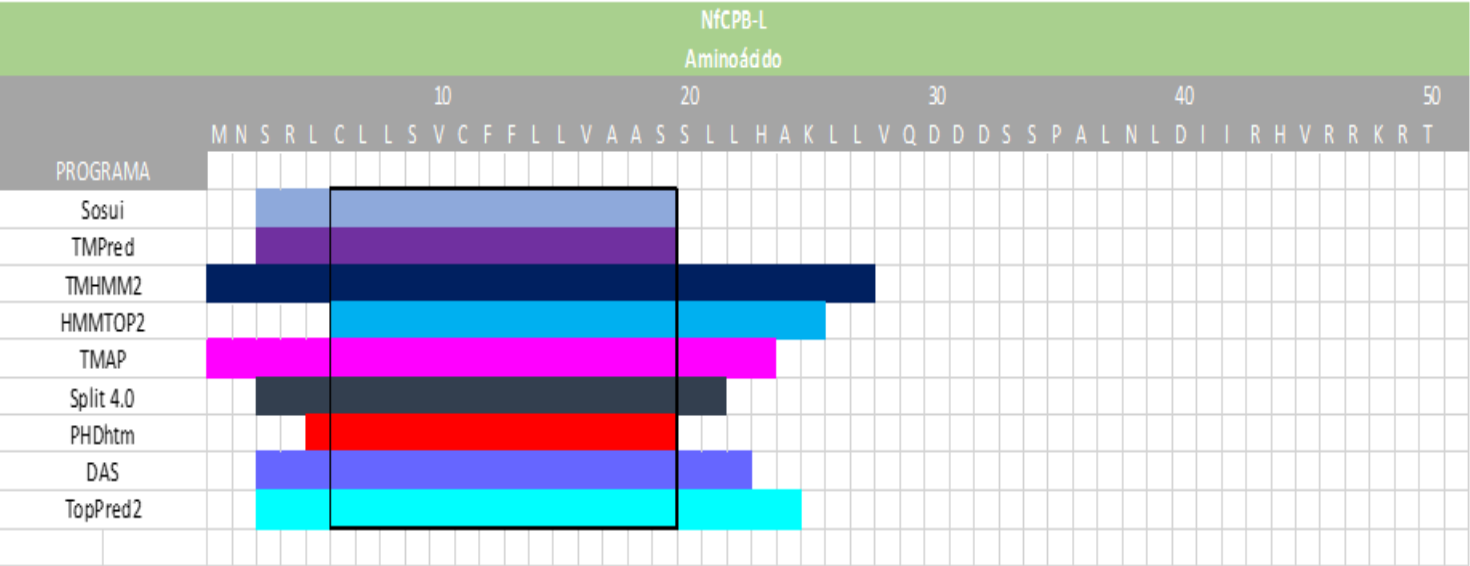
Consenso de la estructura secundaria de la proteína NfCPB de *Naegleria fowleri* generado por NSP@

RESULTADOS



3 hélices α ubicadas entre los aminoácidos 3-19, 54-66 y 216-223
3 láminas β entre los aminoácidos 68-73, 200-205 y 258-265.

RESULTADOS



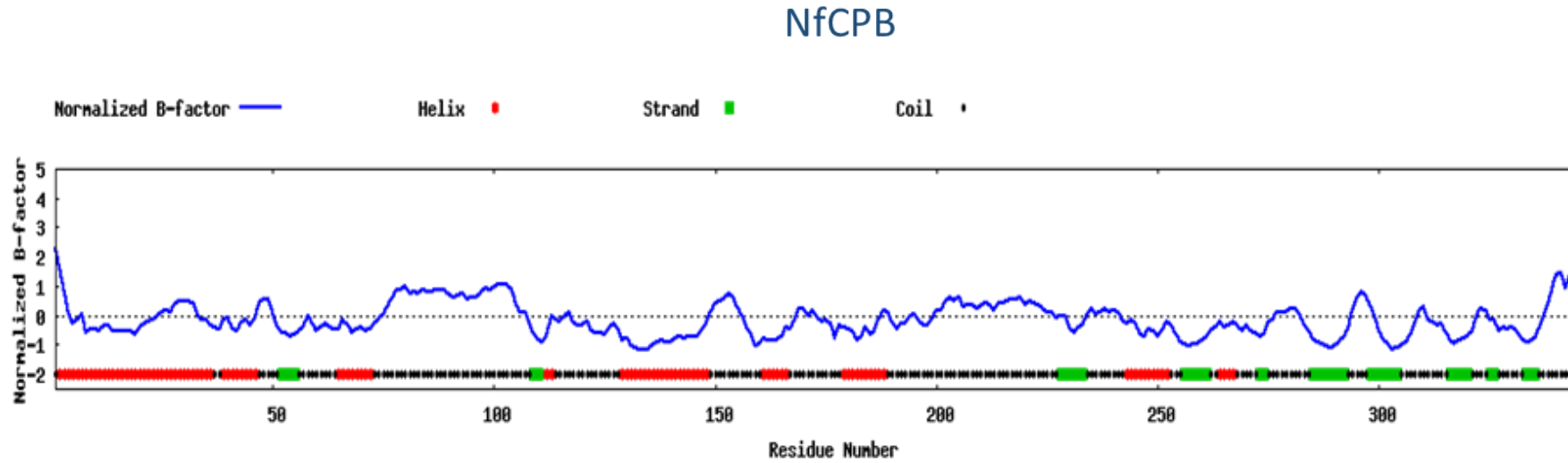
Regiones Ancladas a la parte interna de la membrana:

NfCPB-L: 3-19, Hélice α

CONFORMACIÓN DE LAS HÉLICES:

NfCPB-L: 11-17 Residuos no Polares

RESULTADOS



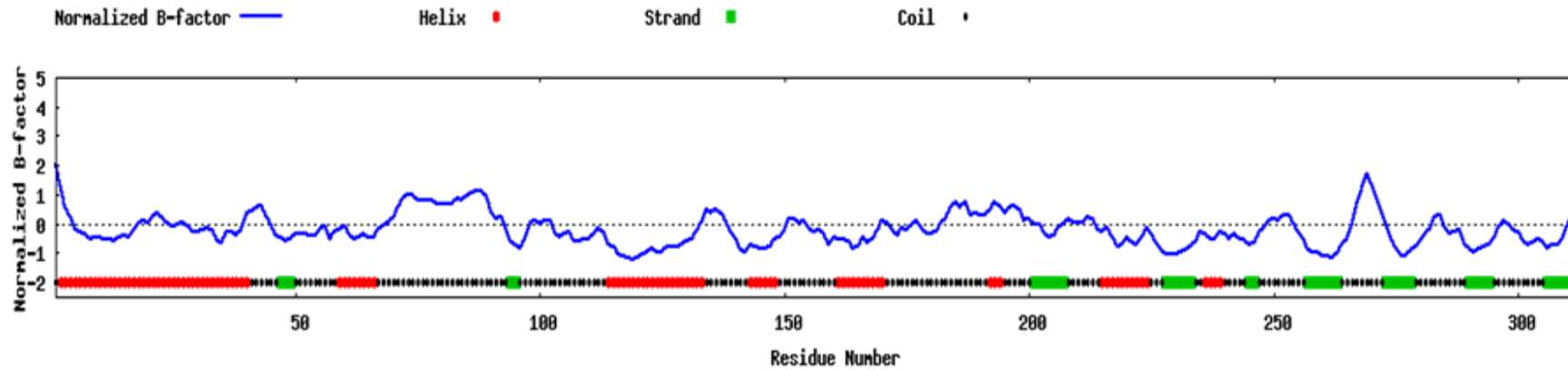
Valores negativos en 2 de las hélices de mayor tamaño, las cuales corresponden a los residuos 3-36 y 129-148

Valores negativos en 3 de las láminas de mayor tamaño, correspondientes a los residuos 228-233, 284-292 y 298-304

Factor β

RESULTADOS

NfCPB-L



Valores negativos en 2 de las hélices de mayor tamaño, las cuales corresponden a los residuos 2-40 y 114-133

Láminas presentaron un valor negativo en los residuos 229-234, 257-263, 273-278

Factor β

RESULTADOS

NfCPB

Rank	PDB Hit	Iden1	Iden2	Cov	Norm. Z-score	Download Align.
1	5fpwA	0.37	0.33	0.83	3.67	Download
2	1pbhA	0.40	0.40	0.82	3.58	Download
3	5fpwA	0.39	0.33	0.82	4.97	Download
4	5fpwA	0.38	0.33	0.83	2.16	Download
5	1bv8A	0.28	0.29	0.86	1.61	Download
6	1pciA	0.28	0.29	0.87	4.19	Download
7	3pdfA	0.38	0.33	0.65	2.35	Download
8	3pbhA	0.43	0.40	0.83	4.50	Download
9	5fpwA	0.38	0.33	0.83	4.01	Download
10	1pbhA	0.42	0.40	0.86	5.61	Download

- ❖ Estructura cristalina de la proteína proCatepsina B S9 de *Trypanosoma congolense*
- ❖ Porcentaje de cobertura es del 83% (alineamiento de 286.4 aminoácidos sobre el total de residuos de NfCPB)

INTRODUCCIÓN DE GAPS EN LA PRIMERA PARTE DE LA SECUENCIA:
Residuos 1-33

ALINEAMIENTO NÚMERO SIETE:
Aminoácidos 2-103.

- ❖ Estructura cristalina de la proteína procaricaína de *Carica papaya*
- ❖ Porcentaje de cobertura fue de 87% (alineamiento de 300.2 aminoácidos sobre el total de residuos de NfCPB)
- ❖ Inició estudios sobre el comportamiento de activación y posible inhibición de las cisteínprotesas

RESULTADOS

NfCPB-L

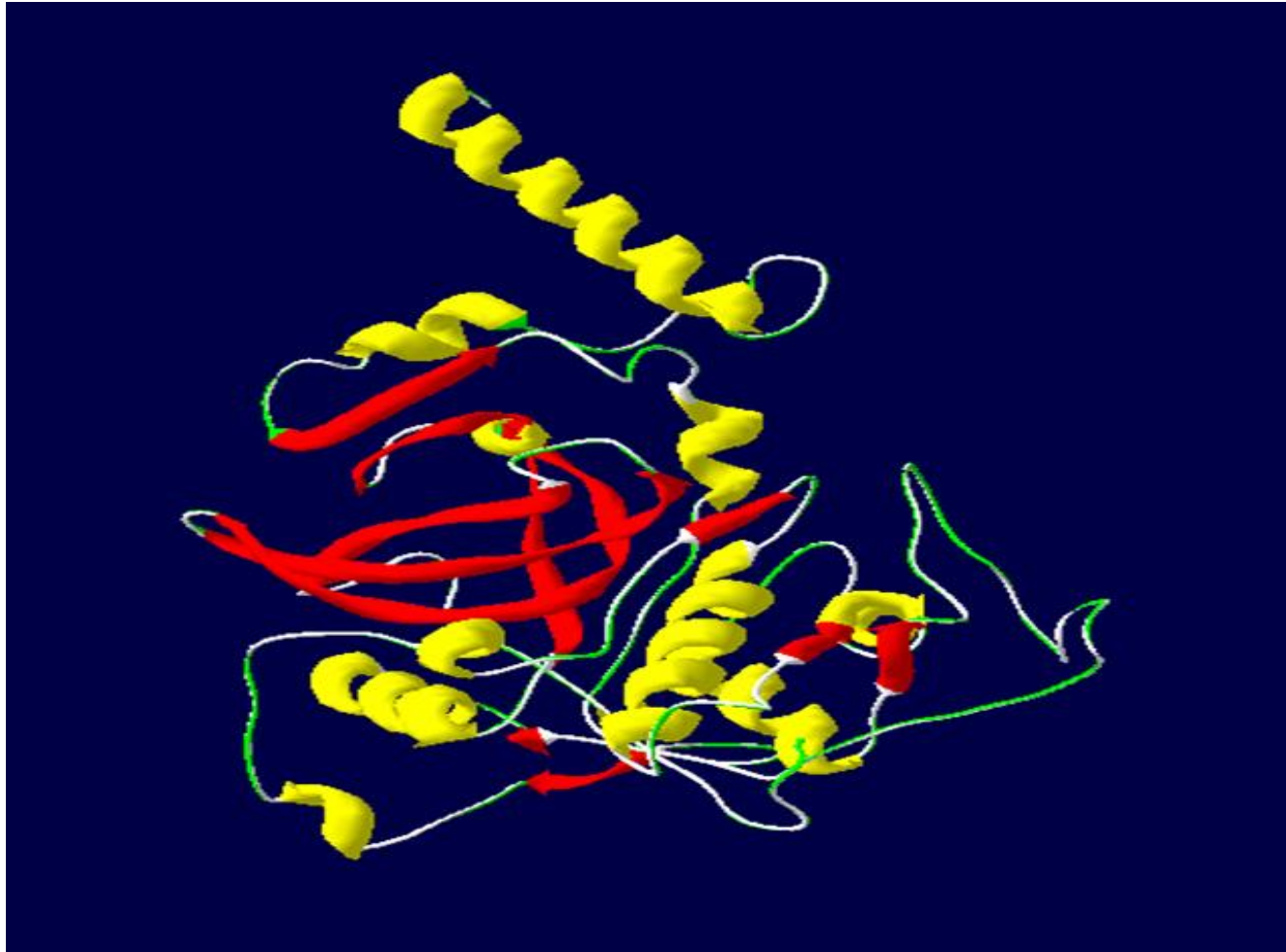
Rank	PDB Hit	Iden1	Iden2	Cov	Norm. Z-score	Download Align.
1	5fpwA	0.32	0.34	0.91	3.93	Download
2	4n4zA	0.36	0.38	0.89	3.55	Download
3	5fpwA	0.34	0.34	0.91	5.17	Download
4	5fpwA	0.35	0.34	0.90	2.16	Download
5	1by8A	0.26	0.28	0.94	1.60	Download
6	3qj3A	0.26	0.33	0.95	3.95	Download
7	3qj3A	0.27	0.33	0.95	2.41	Download
8	4i04A	0.42	0.40	0.87	4.28	Download
9	5fpwA	0.33	0.34	0.91	4.26	Download
10	1by8A	0.26	0.28	0.94	5.24	Download

INTRODUCCIÓN DE GAPS EN LA PRIMERA PARTE DE LA SECUENCIA:
Residuos 1-33

- ❖ Estructura cristalina de la proteína Procatepsina K de *Homo sapiens*
- ❖ Porcentaje de cobertura es del 94% (alineamiento de 295 aminoácidos sobre el total de residuos de NfCPB-L)
- ❖ Está presente en los osteoclastos y que juegan un papel primordial en la reabsorción de los huesos (osteoporosis)

- ❖ Estructura cristalina de la proteína Catepsina L-L que se encuentra en el intestino medio de *Tenebrio molitor*
- ❖ Porcentaje de cobertura fue de 95% (298.3 aminoácidos sobre el total de residuos de NfCPB-L)

RESULTADOS



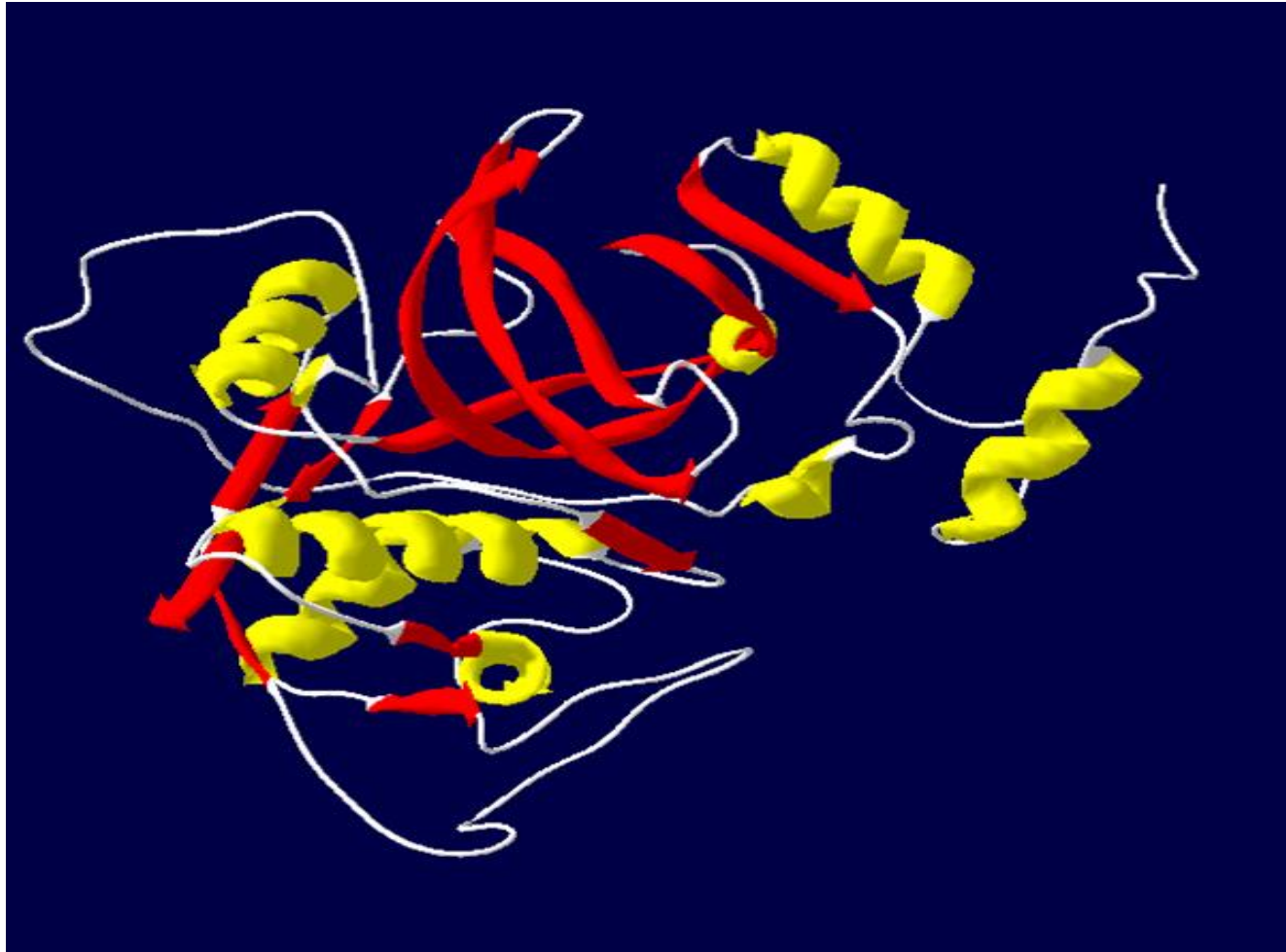
Predicción del modelo tridimensional de la proteína NfCPB de *Naegleria fowleri* generado por I-TASSER y visualizado por Swiss-Pdb. **Hélices α** en color amarillo. **Láminas β** en color rojo. **Bucles y giros** en color blanco.

C SCORE	TM SCORE
0.12	0.74 \pm 0.11

- ❖ **Hélices α** (color amarillo) comprenden los residuos 3-22, 39-44, 65-71, 99-10, 111-114, 131-146, 161-166, 179-188, 243-252, y 265-267
- ❖ **Láminas β** (color rojo) comprenden los residuos 51-55, 91-93, 123-125, 158-160, 192-194, 234-236, 256-264, 268-273, 280-295, 298-308, y 315-321.
- ❖ **Los bucles** (color blanco) comprenden el resto de la estructura.

Puntaje C ideal	Puntaje Tm Ideal
Cercano a 0	>0.5

RESULTADOS



Predicción del modelo tridimensional de la proteína NfCPB-L de *Naegleria fowleri* generado por I-TASSER y visualizado por Swiss-Pdb. **Hélices α** en color amarillo. **Láminas β** en color rojo. **Bucles y giros** en color blanco.

C SCORE	TM SCORE
0.93	0.84 \pm 0.08

- ❖ **Hélices α** (color amarillo) comprenden los residuos 10-19, 32-41, 59-62, 99, 116-131, 143-148, 161-170, 225-224 y 237-239
- ❖ **Láminas β** (color rojo) comprenden los residuos 45-49, 108-110, 140-142, 174-176, 204-206, 209-211, 228-236, 240-245, 252-267, 272-282, 289-295, 306-308 y 310-311
- ❖ **Los bucles** (color blanco) comprenden el resto de la estructura.

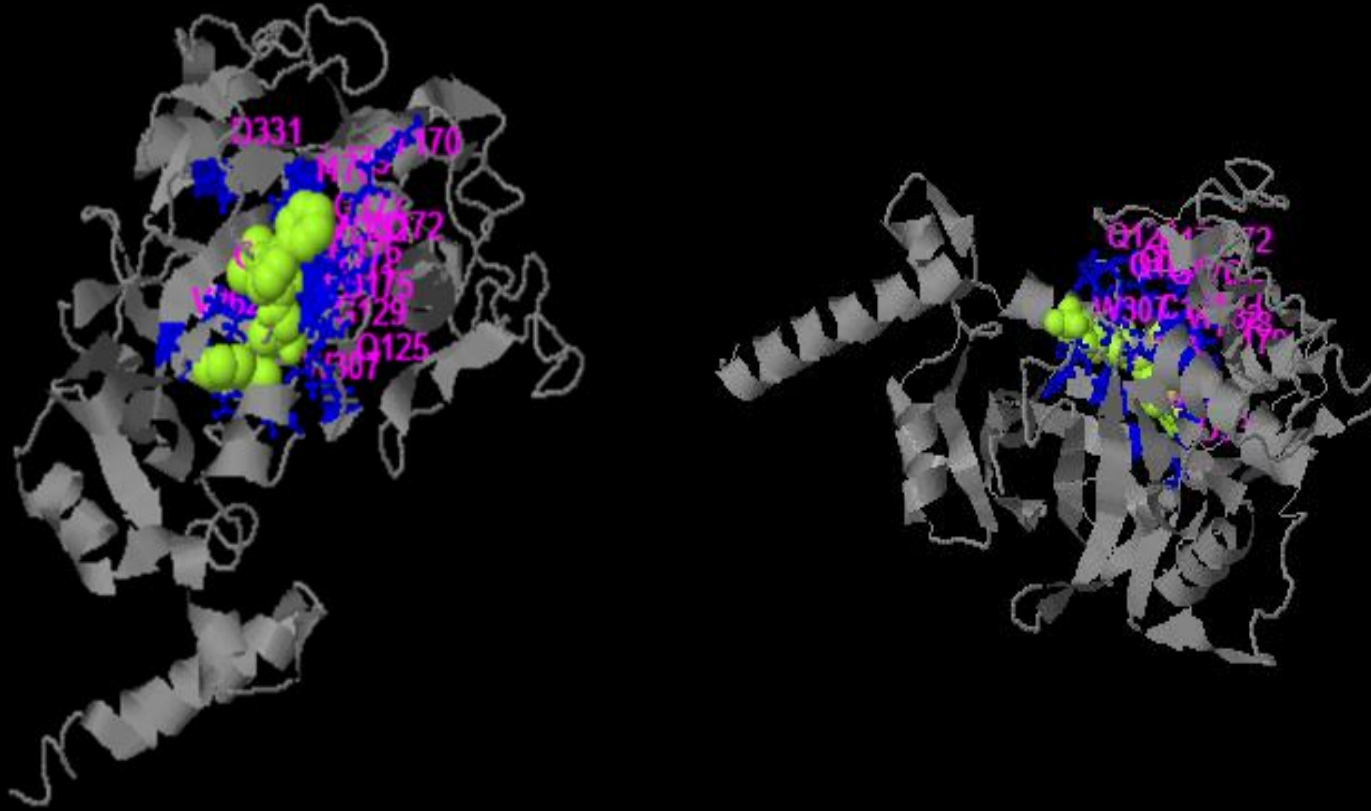
Puntaje C ideal

Cercano a 0

Puntaje Tm Ideal

>0.5

RESULTADOS



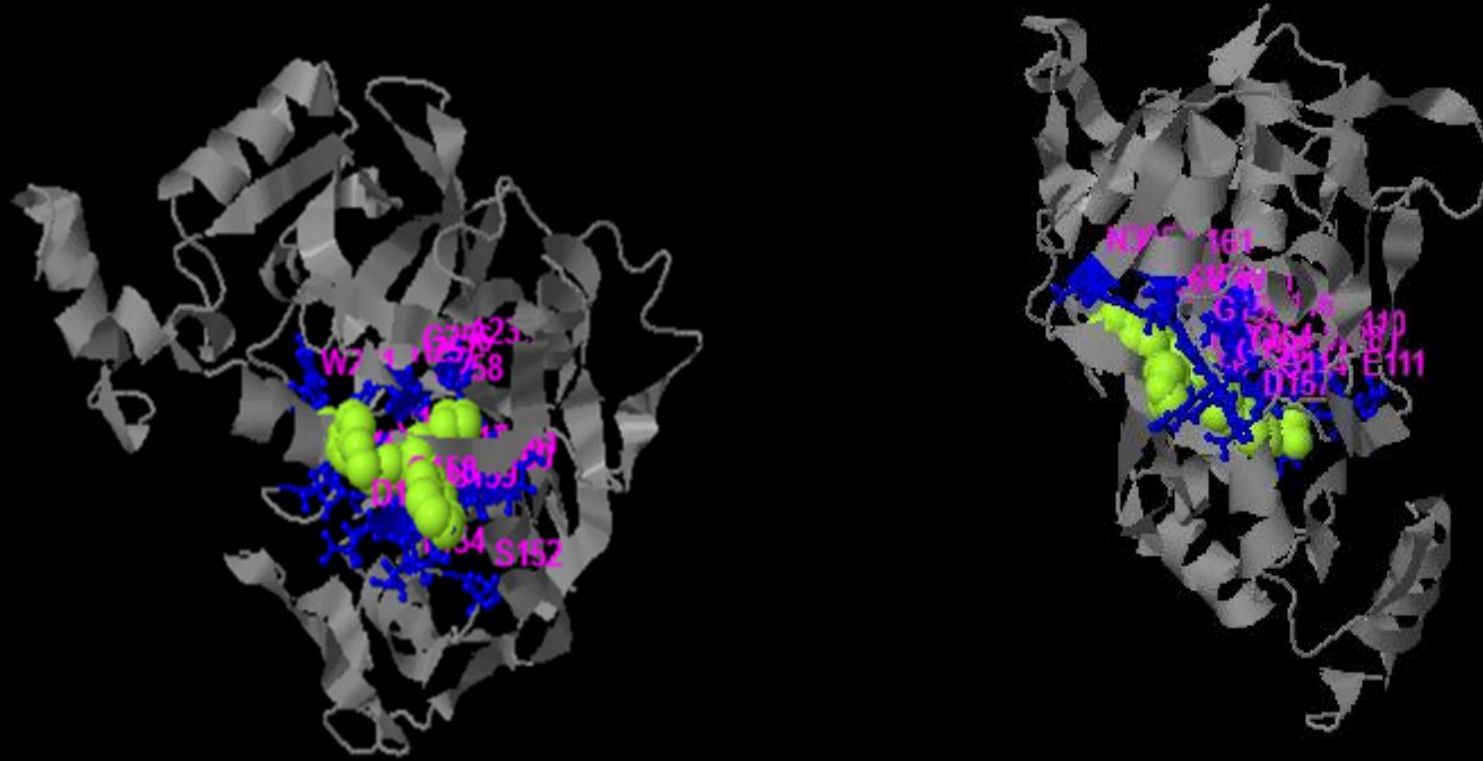
Sitio de unión al ligando comprendido por los residuos Q125, G129, C131, W132, Y170, N172, D175, G176, G177, I178, L179, V262, Y284, T285, H286, W307, D331.

Ligando reportado en la base de datos de BioLip es **1-[2-(3-Bifenil)-4-Metilvaleril]Amino-3-(2-Piridilsulfonil) Amino-2-Propanona.**

Hidrólisis de proteínas tales como el colágeno y la fibronectina, convirtiéndolas en polipéptidos o aminoácidos más pequeños por medio del clivaje de sus enlaces peptídicos

Modelo tridimensional del sitio de unión a ligando de la proteína NfCPB de *Naegleria fowleri* generado por I-TASSER. La región de color azul representa los residuos involucrados en el sitio de unión-ligando. La región de color verde representa el ligando

RESULTADOS



Sitio de unión al ligando comprendido por los residuos Q110, G114, C116, W117, S152, Y154, D157, G158, G159, Y160, L161, A231, G256, H257, A258, W281

Ligando reportado en la base de datos de BioLip es **Arilaminoetil Amida Heterocíclica**

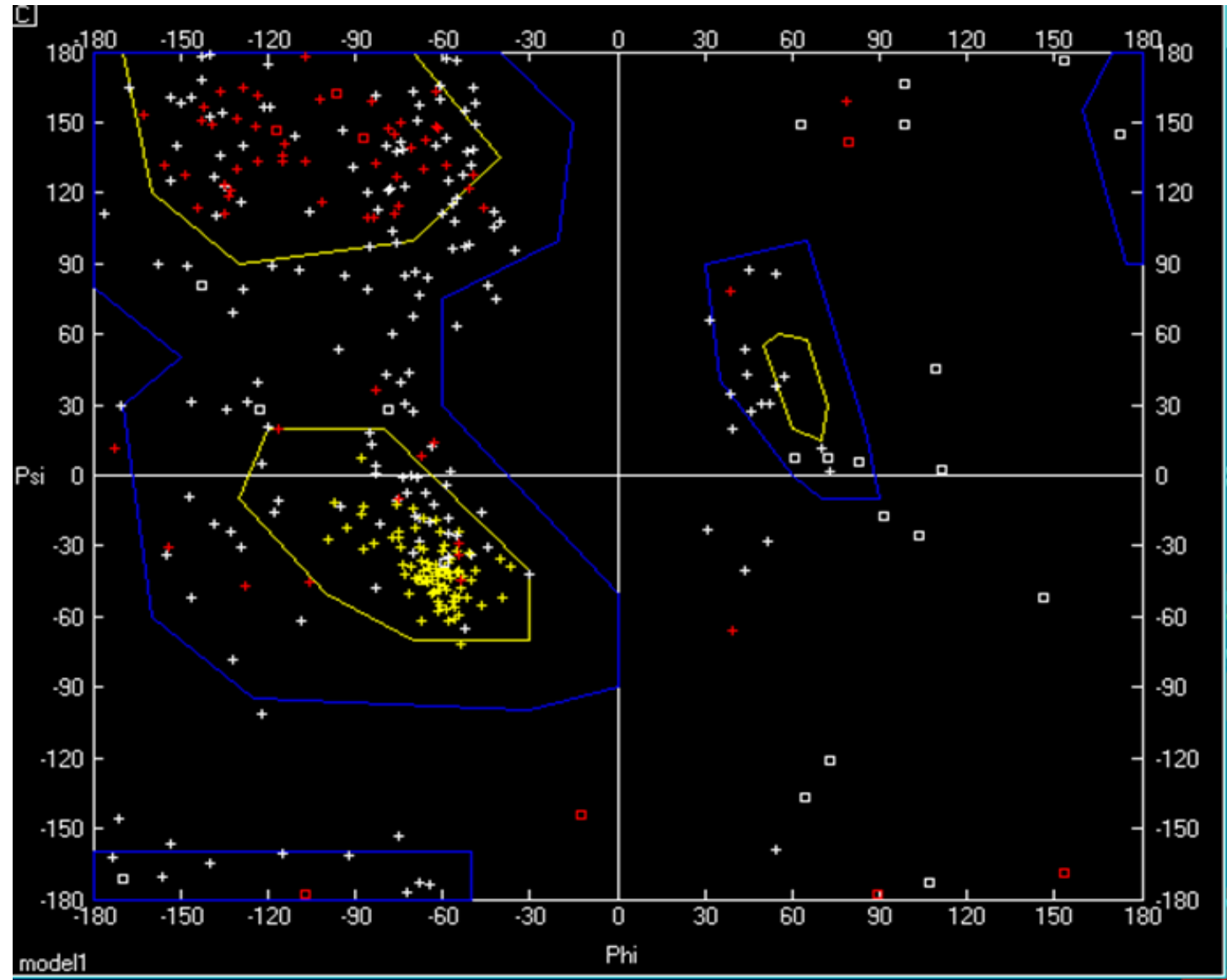
Impide la unión del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (CMH clase II) evitando presentación de antígeno y se une a las glucoproteínas (inmunoglobulinas) para proceder a hacer su respectiva catálisis.

Modelo tridimensional del sitio de unión a ligando de la proteína NfCPB-L de *Naegleria fowleri* generado por I-TASSER. La región de color azul representa los residuos involucrados en el sitio de unión-ligando. La región de color verde representa el ligando

RESULTADOS

Conformación estereoquímica de los ángulos del modelo de la proteína NfCPB de *Naegleria fowleri* según la gráfica de Ramachandran

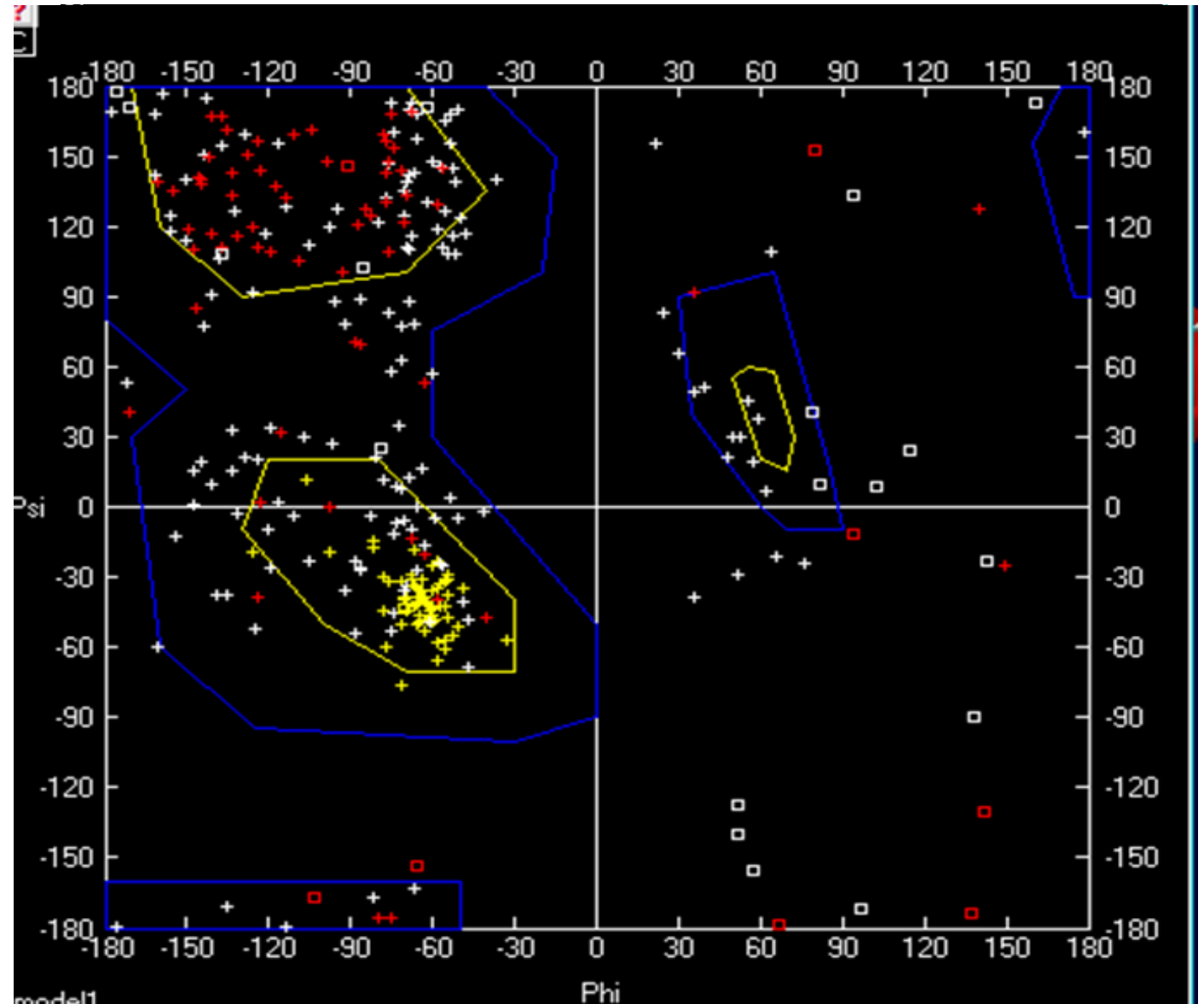
215 aminoácidos (62.4%) están entre la zona favorable, 106 aminoácidos (30.64%) están en la región permitida, y que 24 aminoácidos (6.96%) se encuentran en la región no permitida.



RESULTADOS

Conformación estereoquímica de los ángulos del modelo de la proteína NfCPB-L de *Naegleria fowleri* según la gráfica de Ramachandran.

198 aminoácidos (63.05%) están entre la zona favorable, 91 aminoácidos (30.64%) están en la región permitida, y que 25 aminoácidos (7.96%) se encuentran en la región no permitida.



CONCLUSIONES

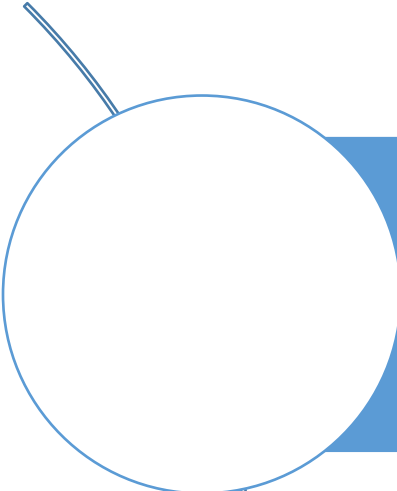
Se analizó el papel de las catepsinas NfCPB y NfCPB-L de *Naegleria fowleri*, logrando dar más entendimiento a la patogénesis de esta ameba de vida libre.

NfCPB podría estar involucrado en la catálisis de la fibronectina y el colágeno, teniendo un papel fundamental de la degradación del colágeno tipo III, el cual es sintetizado por la glía, impidiendo así la protección de las neuronas y dando paso a otras proteínas para lograr la desmielinización.

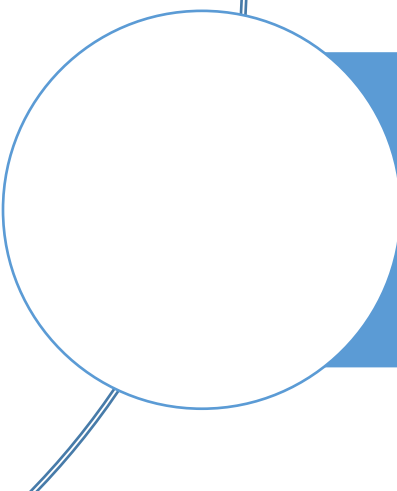
NfCPB-L tendría un rol primordial en la evasión de la respuesta inmune evitando la presentación de antígeno por medio del CMH clase II, y haciendo degradación de las inmunoglobulinas.

El análisis de estructuras tridimensionales es fundamental para entender el comportamiento de las proteínas; gracias a la conformación tridimensional de las mismas.

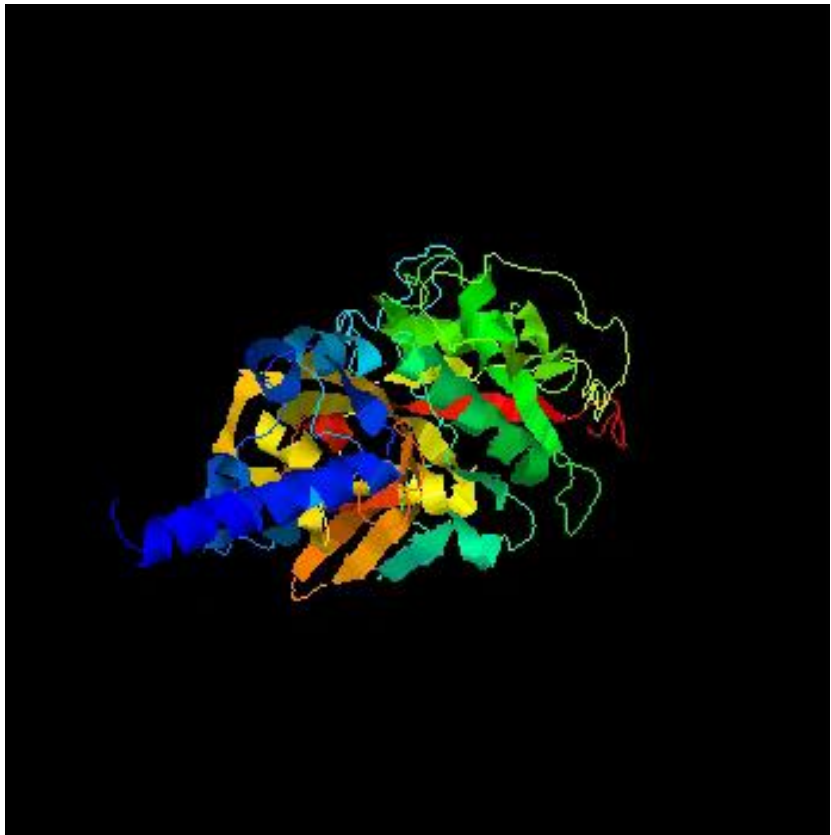
SUGERENCIAS



Es importante considerar a PAM como un posible problema de salud pública, ya que en Colombia tenemos el medio ideal para el óptimo crecimiento de *Naegleria fowleri* y no se cuenta con el entrenamiento necesario.



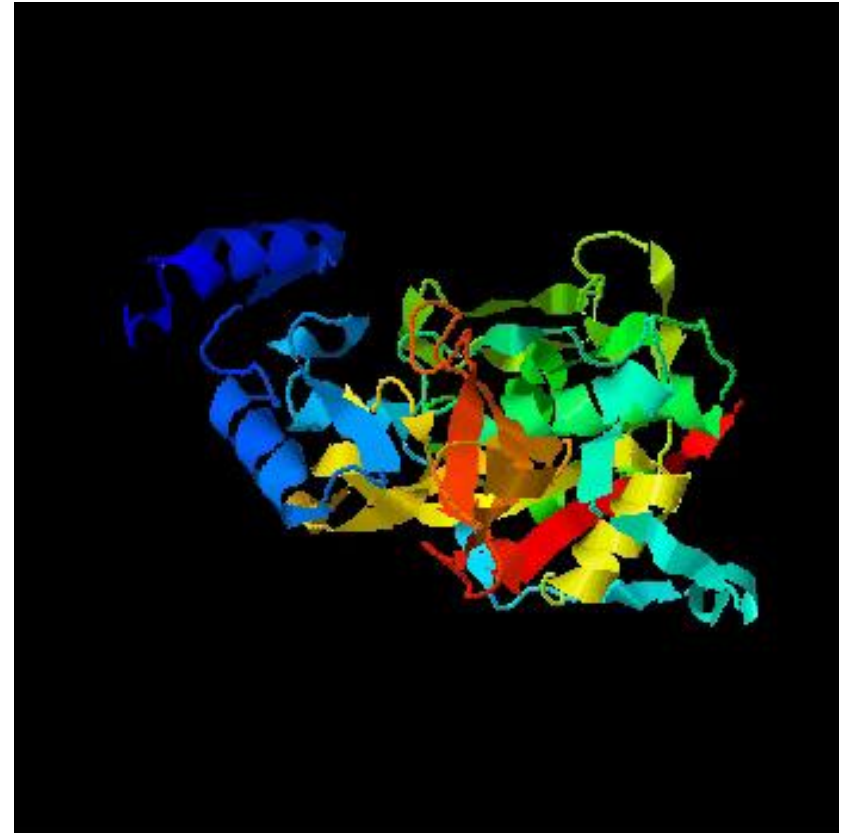
Estudios han logrado detectar la clase de anticuerpos presentes en la infección por *N.fowleri* (Seong,G.S et al, 2017), se podría detectar la infección por medio de pruebas rápidas.



NfCPB

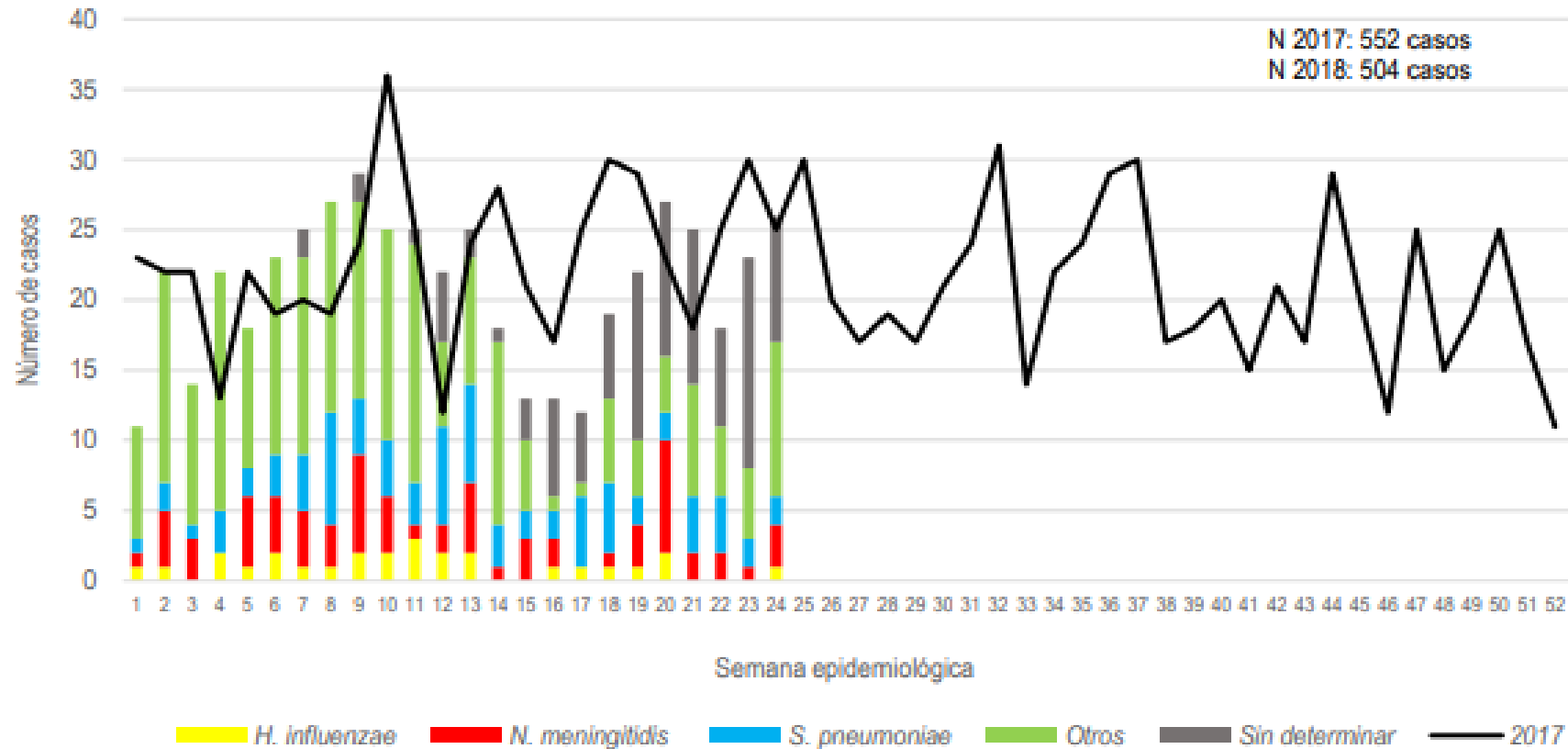
Gracias

NfCPB-L



ESTADO DE LAS MENINGITIS EN COLOMBIA- SIVIGILA

Gráfica N° 1. Casos probables de meningitis bacteriana notificados según agente etiológico, Colombia, semanas epidemiológicas 01 – 24, 2018



Fuente: Sivigila, Instituto Nacional de Salud, Colombia

PREDICCIÓN DE ESTRUCTURAS

Ab initio

- Mide la tendencia relativa de cada aminoácido de pertenecer a un tipo de elemento de estructura secundaria (Hoja, lámina o bucle).

Homología

- Tiene en cuenta las estadísticas de los residuos de una secuencia y también patrones comunes conservados entre las múltiples secuencias homólogas

Plegado

- Se basa en el conocimiento estructural de las proteínas obtenidas de las bases de datos