



Tesis de Grado, Licenciatura en Bioquímica

Identificación y producción de un receptor nuclear perteneciente a una nueva subfamilia en Echinococcus granulosus

Ximena Riera Nikicer

Orientadora: Dra. Gabriela Alvite

Sección Bioquímica

Facultad de Ciencias

Febrero 2018

Agradecimientos

A Gabriela, por brindarme la posibilidad de realizar esta pasantía. Compartir conmigo su conocimiento, dedicarme su tiempo, y alentarme siempre.

A Adriana, por incluirme en su equipo junto a Gabriela y por todas sus enseñanzas.

A las compañeras del laboratorio 304, Mariana, Cecilia, María, Cora y Mailén, por recibirme tan cálidamente y llenar este proceso de buenos momentos.

A todos los integrantes de la Sección Bioquímica por la buena onda y disposición.

A mis padres quienes con el ejemplo me enseñaron a siempre salir adelante.

A Gonzalo, por acompañarme en todas y sacar lo mejor de mí.

A mis amigos, por inspirarme y aprender conmigo.

A todos, ¡¡muchas gracias por hacer este trabajo posible!!

Resumen

La forma larvaria del platelminto parásito *E. granulosus*, es el agente causante de la Echinococcosis quística (EQ), una zoonosis de distribución global. Pese a representar un problema de salud pública mayor y generar un importante impacto socioeconómico, la EQ continúa siendo considerada por la OMS como una enfermedad zoonótica desatendida. Su tratamiento permanece hoy día siendo costoso y complejo, y las estrategias de erradicación planteadas han tenido escasos éxitos.

Recientemente, se han propuesto como posibles blancos de drogas antihelmínticas a un grupo de proteínas conocidas como receptores nucleares (NR), proporcionando una estrategia terapéutica nueva, distinta de las drogas antihelmínticas conocidas. Los NRs representan una gran superfamilia de factores de transcripción, capaces de unirse al ADN y modular diversos procesos fisiológicos en animales. Comparten una estructura modular con diferentes dominios funcionales, presentando algunos muy conservados, como el de unión al ADN (DBD) y otros más variables, que permiten la interacción con diversas moléculas generando así un amplio abanico de funcionalidades.

Una nueva subfamilia de NRs, presenta una atípica e interesante estructura modular, con dos DBDs en lugar de uno, por lo cual han sido denominados como 2DBD-NRs. Todos los 2DBD-NRs poseen una secuencia P-box –CEACKK– en el primer DBD, la cual es única para este grupo de receptores. Sus funciones, si bien han comenzado a ser investigadas, permanecen aún como grandes interrogantes. En cestodos, los NRs son un grupo de proteínas poco estudiado y nada conocemos con respecto a los 2DBD-NRs en *E. granulosus*. Moléculas con un interesante potencial desde el punto de vista terapéutico, ya que miembros de esta subfamilia no han sido identificados en los hospederos del parásito en estudio.

El presente trabajo, propone iniciar el estudio de los 2DBD-NRs en *E. granulosus*. En este sentido, hemos analizado las secuencias de tres 2DBD-NRs de *E. granulosus*, siendo uno de ellos –Eg2DBDg1– identificado en la etapa larval de protoescólices. El ADNc para Eg2DBDg1, desde el segundo DBD hasta el codón de terminación, fue clonado y expresado en *E. coli*, purificándose la proteína recombinante rEg2DBDg1. Producto de ello, se obtuvo un suero policlonal capaz de reconocer a rEg2DBDg1, que será de gran utilidad en futuros ensayos para analizar su posible interacción con la proteína de unión a ácidos grasos EgFABP1. De todas formas, se deberá ahondar en nuevas estrategias hacia la producción de rEg2DBDg1 soluble, para su utilización en ensayos funcionales que así lo requieran.

Índice

1.	Introducción	7
1.1.	Echinococcus granulosus.....	7
1.1.1.	Clasificación	7
1.1.2.	Ciclo de vida	8
1.1.3.	Echinococcosis quística	9
1.1.4.	Metabolismo lipídico y FABPs	11
1.2.	Receptores Nucleares	13
1.2.1.	Clasificación	13
1.2.2.	Estructura modular	14
1.2.3.	Mecanismo de acción	16
1.2.4.	Receptores nucleares en platelmintos parásitos.....	17
1.2.5.	Subfamilia 2DBD-NR	18
1.2.6.	Receptores nucleares como emergentes blancos de drogas antihelmínticas	20
2.	Objetivos	21
2.1.	Objetivo general.....	21
2.2.	Objetivos específicos	21
3.	Materiales y métodos.....	22
3.1.	Análisis bioinformático de receptores nucleares	22
3.2.	Clonado de Eg2DBDg1 de Echinococcus granulosus	22
3.2.1.	Amplificación mediante RT-PCR.....	22
3.2.2.	Ligación y transformación de células competentes	24
3.2.3.	Selección de clones recombinantes	25
3.2.4.	Subclonado en el vector de expresión	25
3.3.	Expresión de la proteína recombinante rEg2DBDg1	27
3.4.	Purificación de la proteína recombinante rEg2DBDg1	29
3.5.	Generación de un suero contra rEg2DBDg1	29
4.	Resultados.....	30
4.1.	Análisis bioinformático de receptores nucleares 2DBD de <i>Echinococcus granulosus</i>	30
4.2.	Clonado del receptor nuclear 2DBD Eg2DBDg1.....	33
4.2.1.	Amplificación mediante RT-PCR.....	33
4.2.2.	Clonado en el vector pGM-T.....	34

4.2.3. Subclonado en el vector de expresión pET-22b(+)	34
4.3. Análisis de la secuencia de rEg2DBDg1 y estructura génica de Eg2DBDg1	35
4.4. Expresión y purificación de la proteína recombinante rEg2DBDg1	37
4.4.1. Ensayos en <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	37
4.4.2. Análisis del uso de codones	38
4.4.3. Ensayos en <i>E. coli</i> Rosetta(DE3)	40
4.5. Generación de un suero policlonal contra rEg2DBDg1	42
5. Discusión	43
6. Conclusión y perspectivas	48
7. Referencias	50
8. Anexos	57
8.1. Cebadores	57
8.2. Medios de Cultivo	57
8.3. Complemento de Resultados	58

1. Introducción

1.1. Echinococcus granulosus

1.1.1. Clasificación

Los Helmintos constituyen un grupo polifilético que incluye gusanos parásitos de dos phylum: Platelmintos (gusanos planos) y Nematodos (gusanos redondeados). *Echinococcus granulosus* es un platelminto parásito que según Thompson (1995) puede clasificarse de la siguiente manera (Thompson, 1995):

Phylum: *Platyhelminthes*.

Superclase: *Eucestoda*.

Clase: *Cestoidea*.

Subclase: *Cestoda*.

Orden: *Cyclophyllidea*.

Familia: *Taeniidae*.

Género: *Echinococcus*.

La clase *Cestoidea* incluye endoparásitos que no poseen tracto digestivo y presentan órganos adhesivos en la extremidad anterior (ventosas). Los organismos eucestodos poseen cuerpo segmentado y unidades reproductivas (proglótides) conteniendo órganos masculinos y femeninos. La familia *Taeniidae* es muy relevante desde el punto de vista sanitario y económico, ya que incluye parásitos de animales domésticos dentro de los géneros *Taenia* y *Echinococcus* (Thompson, 1995).

Originalmente el género *Echinococcus* fue dividido en varias especies según características como, la especificidad de hospederos, geografía, morfología y aspectos del desarrollo (Romig et al., 2015). Actualmente el análisis filogenético de diferentes cepas subdivide al género en especies y subespecies utilizando una nomenclatura basada en el fenotipo y genotipo (G1-10), que solo reemplaza parcialmente los nombres anteriores de las especies. De esta manera, el género *Echinococcus* puede subdividirse en: *E. granulosus* (G1/G2/G3), *E. equinus* (G4), *E. ortleppi* (G5), *E. intermedius* (G6/G7), *E. canadensis* (G8/G10), *E. felidis*, *E. multilocularis*, *E. shiquicus*, *E. vogeli* y *E. oligarthrus* (Romig, et al., 2015; Thompson y Jenkins, 2014). Si bien estas especies

poseen diferente especificidad de hospederos intermediarios, la mayoría son potencialmente infectivas para el ser humano.

1.1.2. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *E. granulosus* comprende tres etapas. Habitualmente la forma adulta hermafrodita vive en el intestino del perro (hospedero definitivo) y si bien no se manifiesta en una patología evidente, produce una gran cantidad de huevos. A través de las heces los huevos pasan a contaminar el suelo y el agua y pueden mantenerse infectivos por meses o hasta por un año dependiendo de las condiciones ambientales. Los humanos y otros mamíferos ungulados (hospedero intermediario) pueden infectarse tras la ingesta de huevos, por contacto directo con animales infectados o, indirectamente vía agua o alimentos contaminados. Una vez en el hospedero intermediario, la oncósfera eclosiona del huevo, penetra en la mucosa intestinal y migra a través del torrente sanguíneo hacia órganos internos como el hígado. En el órgano afectado (usualmente vísceras) se desarrolla la forma larvaria o quiste hidático (Eckert, et al., 2001).

La figura 1 ilustra el ciclo de vida de *E. granulosus*, comenzando por el hospedero definitivo y continuando en el hospedero intermediario donde se desarrolla la forma larvaria.

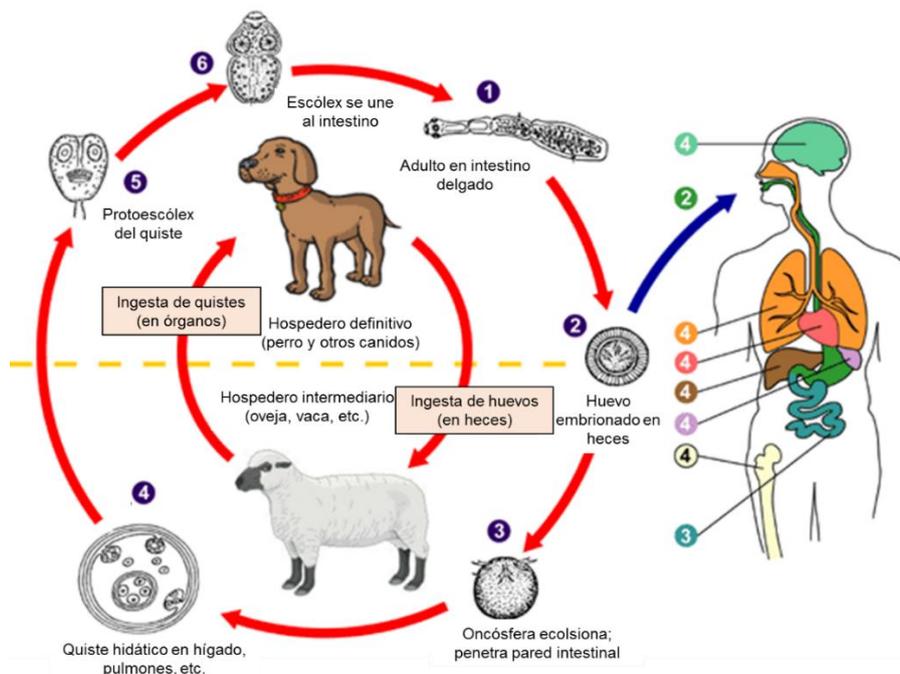


Figura 1. Ciclo de vida de *E. granulosus*. Figura tomada y adaptada de: <https://www.cdc.gov/dpdx>

La larva metacestode o quiste hidático de *E. granulosus*, representada en la figura 2, está formada por una serie de capas, a partir de la capa germinativa se desarrollan directa o indirectamente todos los elementos de la hidátide. En el interior del quiste se encuentra una gran cantidad de líquido, junto con vesículas prolíferas, protoescólices y quistes hijos (Thompson, 1995). Un solo quiste hidático puede contener miles de protoescólices y cada una de ellos es capaz de desarrollarse en su forma adulta de ser ingerido por un hospedero definitivo o, en un nuevo quiste si el fluido quístico es derramado en una cavidad como el peritoneo (echinococcosis secundaria) (Eckert, et al., 2001).

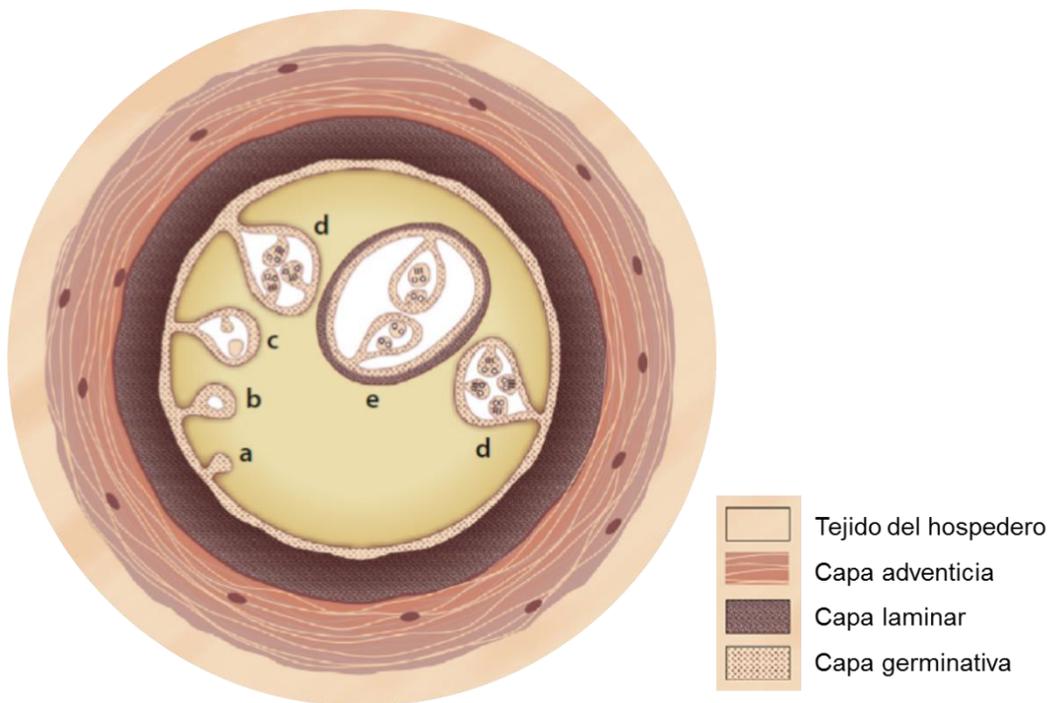


Figura 2. Diagrama de la larva metacestode de *E. granulosus*. a – d: etapas en el desarrollo de las vesículas que dan lugar a los protoescólices; e: quiste hijo. Figura tomada y adaptada de Thompson y Jenkins, 2014.

1.1.3. Echinococcosis quística

Echinococcosis quística (EQ) es una zoonosis de distribución global (figura 3) que representa un problema de salud pública mayor y es causa de importantes pérdidas económicas (Deplazes, et al., 2017). La relevancia clínica y económica de *E. granulosus* se limita al desarrollo de EQ. Esta enfermedad es considerada endémica en zonas como Perú, Chile, Argentina, Uruguay, el sur de Brasil, la región Mediterránea, Asia central, China occidental, y el este de África (Deplazes, et al., 2017).

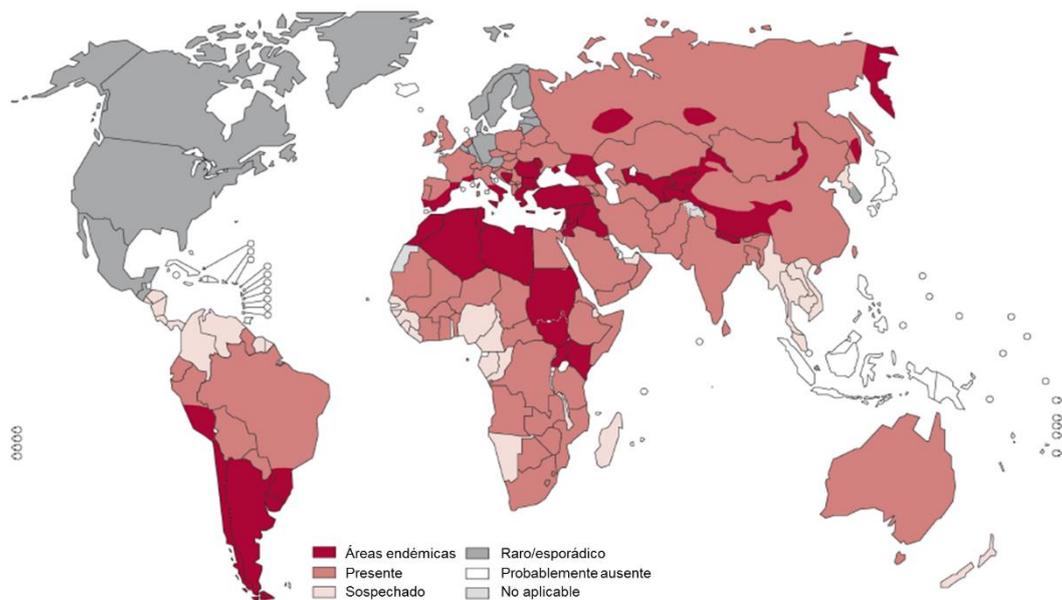


Figura 3. Distribución global de EQ. Figura tomada y adaptada de: <http://www.who.int>

El peso de la EQ sobre la salud humana puede ser expresado en términos de años de vida ajustados por discapacidad, *DALYs* (del inglés, *disability adjusted life years*), que representa la suma de los años de vida perdidos debido a problemas de salud, discapacidad o muerte prematura. Globalmente, cada año la equinocosis es responsable de la muerte de 19300 personas y 871000 *DALYs*. Alrededor de 1 millón de personas son afectadas por la enfermedad en cualquier momento dado. Los gastos generados por la enfermedad a nivel mundial son de aproximadamente 3 billones de dólares al año atribuibles mayormente al tratamiento y a pérdidas relacionadas con la producción ganadera (WHO, 2017). En el periodo 2009-2014, los países más afectados de América del sur, Argentina, Brasil, Chile, Perú y Uruguay, reportaron 29.556 casos humanos de EQ, con una letalidad media del 2,9%, se calcula que la EQ causó la muerte de más de 820 personas en estos países (Navarro, et al., 2015; Pavletic, et al., 2017).

Pese al considerable impacto socioeconómico la EQ sigue siendo una enfermedad zoonótica desatendida. Al respecto, la Organización Mundial de la Salud ha sugerido el “aumento de las intervenciones en países seleccionados en Asia Central, Norte de África y América Latina para el control y eliminación como problema de salud pública para el 2020”. En función de ello, la Organización Pan Americana de la Salud incluyó la EQ como una prioridad dentro del marco “Atención de las enfermedades desatendidas en las poblaciones postergadas” (WHO, 2017; Navarro, et al., 2015).

El tratamiento de la EQ suele ser costoso y complejo, pudiendo requerir de cirugía importante y/o tratamiento farmacológico prolongado (Busto Bea, et al., 2016; WHO, 2017). Si bien se han desarrollado estrategias de erradicación, los éxitos son escasos, los programas de control latinoamericanos aún no producen los resultados esperados y sin lugar a dudas es necesario intensificar los esfuerzos hacia el control de la EQ (Pavletic, et al., 2017).

1.1.4. Metabolismo lipídico y FABPs

Si bien el conocimiento del metabolismo lipídico en los platelmintos parásitos es escaso, dos paradigmas han gobernado los estudios por décadas: la incapacidad de sintetizar *de novo* los ácidos grasos y esteroides (Meyer, et al., 1966; Jacobsen y Fairbairn, 1967; Smyth y McManus, 1989) y la ausencia de oxidación de ácidos grasos (Ward y Fairbairn, 1970; Barrett y Körting, 1976).

Los lípidos representan un grupo heterogéneo de compuestos con roles cruciales en la estructura celular y en el metabolismo energético, además de actuar como moléculas reguladoras y de señalización. En platelmintos son especialmente necesarios para la biosíntesis de membranas y renovación debido al crecimiento continuo y reproducción asexual. Pese a ser incapaces de sintetizar *de novo* ácidos grasos y esteroides, pueden absorber precursores (ácidos grasos, glicerol, colina, fosocolina, etanolamina, fosfoetanolamina, inositol, y fosfoinositol) e incorporarlos en fosfolípidos, triacilglicéridos y esteroides (Young y Podesta, 1982).

En vista de su restringido metabolismo lipídico, los platelmintos parásitos dependen del secuestro y utilización de los lípidos del hospedero durante la infección. Por lo tanto, es esencial la presencia de un sistema de unión de lípidos eficiente para capturar y transportar moléculas hidrofóbicas claves. En este sentido, las proteínas de unión a lípidos han sido extensamente estudiadas en estos organismos, entre ellas se encuentran las proteínas de unión de ligandos hidrofóbicos (HLBPs) y las proteínas de unión de ácidos grasos (FABPs). Las HLBPs y las FABPs comparten la habilidad de unir lípidos, pero difieren en la especificidad de unión de ligandos, en la estructura y organización molecular, en la localización intra/extracelular, en la distribución filogenética, en la evolución y en sus posibles funciones (Alvite y Esteves, 2012).

Las FABPs son principalmente proteínas intracelulares que pertenecen a una familia multigenica de proteínas de bajo peso molecular (14-15 kDa), con una amplia distribución filogenética (Esteves y Ehrlich, 2006; Storch y Thumser, 2010). Son capaces

de unir ácidos grasos de cadena larga (AGs) no covalentemente y otros ligandos hidrofóbicos. Han sido nombradas de acuerdo con el tejido en que fueron identificadas por primera vez o que se expresan predominantemente (Storch y Thumser, 2010), i.e. H-FABP para proteína de unión a ácidos grasos del corazón (del inglés, *Heart*). Los miembros de la familia FABP presentan baja similitud en términos de estructura primaria, pero poseen una estructura tridimensional altamente conservada (Storch y Thumser, 2010). Si bien están implicadas en la captura y transporte intracelular de AGs, la función específica de cada FABP aún está bajo investigación. Estudios recientes indican que podrían estar involucradas en la regulación de la expresión génica (Hostetler, et al., 2009) y la regulación de metabolismo lipídico (Smith, et al., 2007).

Varias FABP han sido aisladas y caracterizadas en platelmintos parásitos (Zheng, et al., 2013). Nuestro grupo de investigación ha identificado y caracterizado dos proteínas de unión a ácidos grasos en *E. granulosus*, EgFABP1 y EgFABP2, que comparten 76% de residuos idénticos y presentan 96% de similitud (Esteves, et al., 1993; Alvite, et al., 2001; Esteves, et al., 2003). Asimismo, ambas presentan una importante similitud de secuencia con la H-FABP de vertebrados (Esteves y Ehrlich, 2006). La estructura cristalográfica de rEgFABP1 reveló la estructura característica de la familia consistente en un barril beta (Figura 4), indicando como posible ligando un AG saturado de 16C y espacio suficiente para ligandos mayores (Jakobsson, et al., 2003).

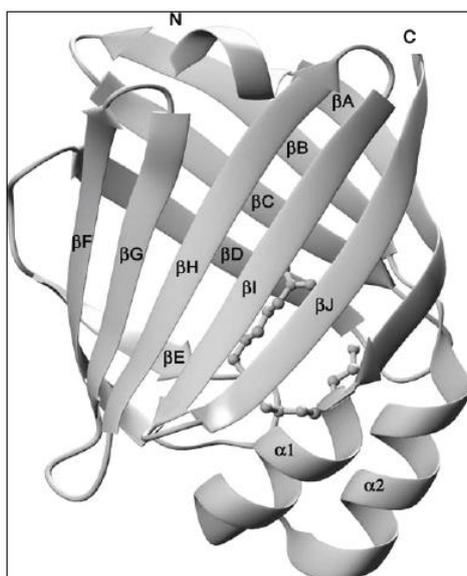


Figura 4. Estructura tridimensional de EgFABP1 recombinante de *E. granulosus*. Se muestra el ligando unido (ácido palmítico). Los elementos de estructura secundaria se marcan con los nombres convencionales (β A- β J, α 1 y α 2). Figura tomada de Jakobsson et al., 2003.

La presencia de EgFABP1 ha sido demostrada en la fracción nuclear, mitocondrial, microsomal y citosólica de células de larvas de *E. granulosus* (Alvite, 2014; Alvite y Esteves, 2016). A su vez, se ha determinado que el mecanismo de transferencia de ligandos desde EgFABP1 hacia membranas artificiales involucra interacciones directas proteína-membrana (Porfido, et al., 2012; Alvite, 2014). Por lo cual, EgFABP1 podría estar involucrada en el intercambio y transporte de AGs entre diferentes compartimentos intracelulares. La identificación de EgFABP1 en fracciones nucleares sugiere un posible rol en la síntesis de lípidos nucleares, en la formación de gotas lipídicas o en la regulación de la expresión génica (Alvite y Esteves, 2016).

Diferentes enfoques experimentales demuestran que varias FABP son dirigidas al núcleo (Börchers, et al., 1989; Hostetler, et al., 2009), y que son capaces de interactuar directa o indirectamente con receptores nucleares: A-FABP y K-FABP con PPAR γ/β (Tan, et al., 2002; Helledie, et al., 2000); H-FABP con PPAR α (Tan, et al., 2002); L-FABP con PPAR α (Hostetler, et al., 2009); A-FABP con LXR α (Shu, et al., 2017); L-FABP con HNF4 α (McIntosh, et al., 2013). Su interacción con factores de transcripción pone en evidencia un nuevo rol para las FABPs como importantes moléculas de señalización, convirtiéndolas en interesantes dianas terapéuticas, potencialmente útiles a la hora de evaluar nutrientes y xenobióticos capaces de afectar la transcripción de genes.

1.2. Receptores Nucleares

1.2.1. Clasificación

Los receptores nucleares (NRs) son miembros de una gran superfamilia de factores de transcripción relacionados evolutivamente. Participan en la modulación de diversos procesos fisiológicos en animales, tales como desarrollo, reproducción, homeostasis y metabolismo (Laudet y Gronemeyer, 2002; Evans, 2005). En la década de los 80 fueron aislados los primeros cDNAs de NRs, primero el receptor glucocorticoide humano (GR) y luego el receptor de estrógenos (ER) (Hollenberg, et al., 1985; Green, et al., 1985). Desde entonces el campo de investigación en NRs se ha desarrollado rápidamente, desde el análisis estructural y funcional hasta los mecanismos moleculares reguladores de la transcripción (Evans y Mangelsdorf, 2014; Gustafsson, 2016).

El análisis filogenético del conjunto de NRs ha llevado a su clasificación en seis subfamilias de diferente tamaño (NR1-NR6) y a una correspondiente nomenclatura formal (Laudet, 1997; Nuclear Receptor Nomenclature Committee, 1999). Se considera una subfamilia extra NR0, cuyos miembros contienen solo el DBD (NR0A, identificados en artrópodos y nematodos) o solo LBD (NR0B, presentes en algunos vertebrados).

La primera gran subfamilia (NR1) contiene los receptores para hormonas tiroideas (TRs), receptores para ácido retinoico (RARs), receptor de vitamina D (VDR), receptor de ecdisoma (EcR) y receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs), así como un gran número de receptores huérfanos. La segunda subfamilia (NR2) contiene al receptor retinoide X (RXR), el factor de transcripción para el promotor de la ovoalbúmina de pollo (COUP-TF) y el factor nuclear 4 del hepatocito (HNF4). La tercera subfamilia (NR3) engloba la subfamilia de receptores esteroideos, incluyendo ER, GR, el receptor mineralocorticoide (MR), receptor de progesterona (PR) y el receptor de andrógenos (AR), así como los receptores huérfanos relacionados a los receptores de estrógenos (ERR). Una cuarta subfamilia (NR4) contiene el grupo de receptores huérfanos NGFI-B (factor inducible I-B de crecimiento nervioso). SF1 (factor esteroideogénico 1) y FTZ-F1 de *Drosophila* ('fushi tarazu' factor 1) componen la quinta subfamilia (NR5). Por último, una sexta subfamilia pequeña (NR6) contiene únicamente el factor nuclear 1 de células germinales (GCNF1) (Germain, et al., 2006; Laudet, 1997).

Recientemente, un nuevo grupo de NRs con 2 dominios de unión al ADN (DBD) y un dominio de unión al ligando (LBD) (2DBD-RNs) ha sido identificado en el platelminto parásito *Schistosoma mansoni* (trematodo) (Wu, et al., 2006) y luego en moluscos y artrópodos (Wu, et al., 2007). Este grupo nuevo de NRs aún no ha sido incluido en este sistema de clasificación (Wu y LoVerde, 2011).

1.2.2. Estructura modular

Al igual que otros reguladores transcripcionales los NRs poseen una estructura modular con diferentes dominios funcionales autónomos. La figura 5 es una representación esquemática que ilustra los dominios componentes de un NR típico.

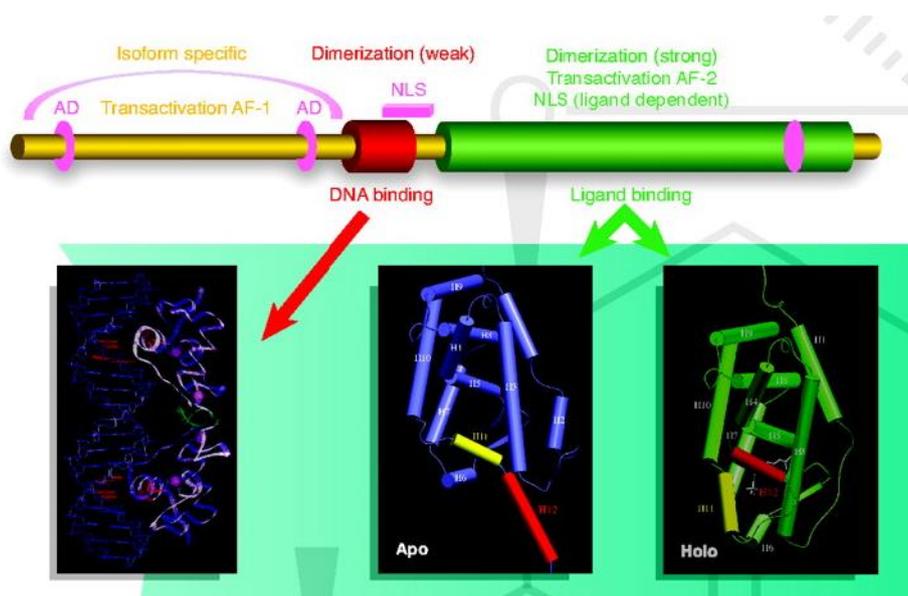


Figura 5. Estructura modular de un NR típico. Figura tomada y modificada de Robinson-Rechavi et al. 2003.

La región N-terminal (dominio A/B) es muy variable y contiene al menos una región activa de transactivación (AF-1) y varios dominios de transactivación autónomos (AD). La región más conservada es el dominio de unión al ADN (DBD, dominio C), compuesto por dos dedos de zinc y dos α -hélices, en cada dedo de zinc cuatro cisteínas coordinan un ion Zn^{2+} (Lee, et al., 1994; Luisi, et al., 1991; Schwabe, et al., 1993). En esta región se encuentran las secuencias aminoacídicas conservadas “D-box” y “P-box”. La secuencia D-box participa en la dimerización del receptor, mientras que la secuencia P-box, presente en el primer dedo de zinc, es responsable de la especificidad de unión entre el receptor y los elementos respuesta en el ADN, la mayoría de los NRs presentan gran afinidad por uno de dos motivos: 5'-AGAACA-3' o 5'-AGGTCA-3' (Laudet, 1997; Zilliacus, et al., 1994). El dominio D, una región poco conservada, se comporta como una bisagra flexible entre los dominios C y E y contiene una señal de localización nuclear (NLS) que puede en parte superponerse con el dominio C. La región más extensa y moderadamente conservada es el dominio de unión al ligando (LBD, dominio E). El LBD es un dominio multifuncional que, además de la unión al ligando, media la homo- y heterodimerización, la transactivación ligando dependiente (motivo COOH-terminal AF-2) y en algunos casos la represión transcripcional. Típicamente el LBD consiste de una estructura 3D formada por 12 α -hélices rodeando una cavidad o bolsillo hidrofóbico central (LBP) (Bourguet, et al., 2000; Bourguet, et al., 1995; Moras y Gronemeyer, 1998). La estructura 3D del LBD unido al ligando (holo) y sin unirlo (apo) son diferentes entre la mayoría de los NRs (Moras y Gronemeyer, 1998; Nagy y Schwabe, 2004; Wurtz, et al., 1996). Mientras la arquitectura general de los LBDs puede parecer muy similar, los

LBP's son muy variables en tamaño y carácter, con una composición aminoacídica diversa (Rastinejad, et al., 2013). Algunos NRs pueden contener un dominio final (dominio F) en el extremo C- terminal del dominio E, de función desconocida y cuya secuencia es extremadamente variable.

1.2.3. Mecanismo de acción

Los NRs son capaces de modular el proceso de transcripción a través de diversos mecanismos incluyendo actividades de represión y de activación. Estas actividades pueden ser directas o indirectas, ligando dependiente o independiente y pueden mediar la activación, represión o transrepresión de genes. A su vez pueden ser también blanco de otras vías de señalización que modifican al NR post traduccionalmente afectando su función (Germain, et al., 2006).

Como factores de transcripción, los NRs dependen de la unión al ADN a través de secuencias específicas para la transactivación de los genes blanco. Las secuencias específicas en el ADN se conocen como elementos de respuesta a hormonas (HREs) y generalmente se ubican en la región promotora de los genes blanco. Los receptores esteroideos clásicos (GR, PR, AR, y ER) se unen generalmente como homodímeros a elementos de respuesta configurados como palíndromos compuestos por dos secuencias de hexanucléotidos separadas por 3 pb (Beato, 1991). Por el contrario, los receptores no esteroideos (RAR, VDR y TR), se unen al ADN como heterodímeros con RXR (receptor X retinoide) y preferencialmente reconocen elementos de respuesta configurados como palíndromos repetidos directos (DRs) y en menor medida palíndromos invertidos (IRs) (Aranda y Pascual, 2001). La especificidad de cada interacción receptor-ADN está dada por el espaciamiento y secuencia de nucleótidos entre los dos hemi sitios del DR, variando de 3 a 5 nucleótidos (Evans y Mangelsdorf, 2014).

Los NRs clásicos actúan como factores de transcripción ligando dependientes, a través de la unión con pequeñas moléculas lipofílicas como hormonas (tiroideas, esteroideas), morfógenos (ácido retinoico) o componentes de la dieta (ácidos grasos). La unión al ligando en general desencadena cambios en el comportamiento conformacional del receptor reclutando complejos correguladores de la transcripción (Bourguet, et al., 2000; Kojetin y Burris, 2013).

Para la mayoría de los NRs la unión de un ligando agonista resulta en un cambio conformacional que lleva al reclutamiento de proteínas coactivadoras generando un

aumento en la transcripción de genes específicos. Un ligando antagonista clásico, bloquea la unión del agonista, evitando el cambio conformacional y la subsecuente estimulación de la transcripción. Sin embargo, muchos antagonistas exhiben una función agonista inversa, especialmente relevante para NRs con actividad basal, en este caso la unión del ligando resulta en un cambio conformacional que recluta proteínas correpressoras y activamente reprime la transcripción (Burris, et al., 2013).

1.2.4. Receptores nucleares en platelmintos parásitos

Los primeros NRs de platelmintos fueron identificados en *S. mansoni* (trematodo) (Escriva, et al., 1997). Actualmente han sido reportados 21 NRs en *S. mansoni* (Wu, et al., 2006), mientras que 14 han sido caracterizados con respecto a sus patrones de expresión a través del ciclo de vida, la formación de homo y heterodímeros y sus capacidades de unión al ADN (Wu y LoVerde, 2011). Entre los NRs identificados en este parásito se encuentran los dos primeros homólogos del receptor de hormonas tiroideas (THR) identificados en un protostomado. Así mismo, se han hallado también homólogos de varios genes que median respuestas a ecdisona en insectos, incluidos los genes de respuesta a ecdisona E78 y FTZ-F1 y el compañero heterodimérico de EcR, RXR, aunque aún se desconocen homólogos de EcR (Wu y LoVerde, 2011). La mayoría de los NRs de *S. mansoni* presenta ortólogos ya sea en Deuterostomados, en artrópodos o en ambos. Exceptuando esta afirmación se encuentran interesantemente tres NRs con una novedosa estructura modular llamados 2DBD-NRs, los cuales poseen dos DBD en tándem y un LBD (Sm2DBD-RN α , Sm2DBD-RN β , Sm2DBD-RN γ) (Wu, et al., 2006). El estudio de los NRs en *S. japonicum* revela que esta especie expresa prácticamente el mismo conjunto de NRs que *S. mansoni* pero contiene dos miembros adicionales de la subfamilia de 2DBD-NR (Wu y LoVerde, 2011).

Los NRs en cestodos han sido menos explorados que en sus parientes trematodos. En los genomas de *E. multilocularis* y *E. granulosus* fueron identificados mediante análisis informáticos 17 NRs, similares al conjunto de NRs expresados por schistosomas (Förster, et al., 2011).

En 2011 es caracterizado por primera vez un NR en cestodos, el receptor de *E. multilocularis* EmNHR1, homólogo a los NRs de la subfamilia DAF-12/HR96 que en metazoarios regulan la homeostasis del colesterol y la longevidad (Förster, et al., 2011). El gen codificante para EmNHR1 es expresado en todas las etapas larvales del parásito involucradas en la infección del hospedero intermediario. Sin embargo, presenta una

expresión aumentada en el estadio de metocestodo y de protoescólice durmiente (previo a la infección), por lo cual EmNHR1 podría ser necesario para el desarrollo en el hospedero intermediario. Por otra parte, en este mismo estudio se demuestra la comunicación cruzada entre EmNHR1 y vías de señalización TGF- β , así como la presencia de un ligando en el suero de mamífero que induce la homodimerización del LBD del receptor. Estos resultados apuntan a que este receptor podría jugar un rol en los mecanismos de comunicación cruzada hospedero-parásito durante la infección (Förster, et al., 2011).

En octubre 2017, Yang y colaboradores clonan y caracterizan un NR de *E. granulosus*, similar al receptor hormonal 3 (EgHR3). HR3 pertenece a la ruta de señalización ecdisteroide y modula ciertas respuestas del desarrollo específicas a pulsos ecdisteroides en insectos (Yang, et al., 2017). EgHR3 es expresado en etapas larvianas, pero presenta una expresión significativamente mayor en el adulto, advirtiendo un posible rol en el desarrollo temprano del adulto y en el mantenimiento de los procesos biológicos en dicha etapa (Yang, et al., 2017).

1.2.5. Subfamilia 2DBD-NR

Inicialmente identificados en *S. mansoni*, 2DBD-NRs forman una nueva subfamilia de NRs, con una novedosa estructura modular: A/B-DBD-DBD-bisagra-LBD (Wu, et al., 2006) (Figura 6). Genes correspondientes a 2DBD-NRs han sido identificados en otras especies de gusanos planos (*Schmidtea mediterranea* y *Dugesia japonica*), como también en moluscos (*Lottia gigantean*) y artrópodos (*Daphnia pulex*), no así en vertebrados (Wu, et al., 2007).

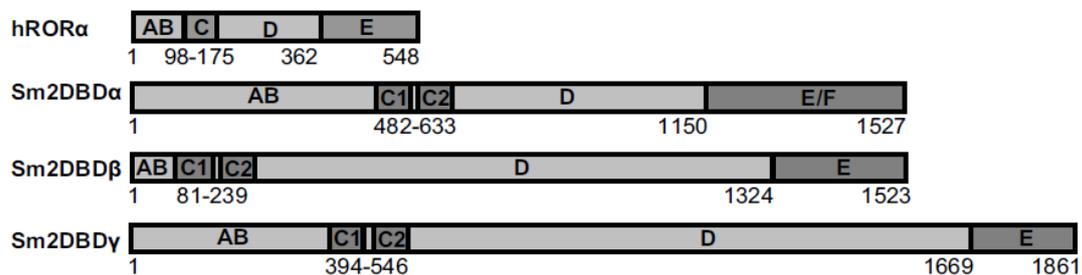


Figura 6. Estructura modular de 2DBD-NRs de *S. mansoni*. hROR α como ejemplo de la estructura modular típica de NRs, conteniendo un dominio A/B, un dominio C (DBD), un dominio D y un dominio E (LBD). Tres Sm2DBD NRs exhiben una novedosa estructura modular que incluye dos DBDs en tándem (C1 y C2). Figura tomada de Wu et al. 2007.

El análisis filogenético indica que los miembros de la familia 2DBD-NRs comparten un ancestro común cuyo gen poseía un DBD adicional, probablemente resultado de un evento de recombinación. Tanto el primer como el segundo DBD son grupos hermanos de miembros en la subfamilia NR1, lo cual sugiere una cercanía entre el gen ancestral común de 2DBD-NRs y el gen ancestral común de los NRs en la subfamilia NR1 (Wu, et al., 2007).

Todos los 2DBD-NRs poseen una misma secuencia P-box correspondiente a -CEACKK- en el primer DBD, la cual es única para este grupo de receptores. A su vez, en el segundo DBD puede encontrarse una secuencia P-box correspondiente a -CEGCKG- seguida por los aminoácidos FFRR, presente en la mayoría de los NRs de la subfamilia NR1, evocando una posible relación funcional o evolutiva con receptores en la subfamilia NR1 (Wu, et al., 2007).

En la figura 7 puede observarse una representación esquemática de la estructura de los dos DBD en tándem de Sm2DBD α .

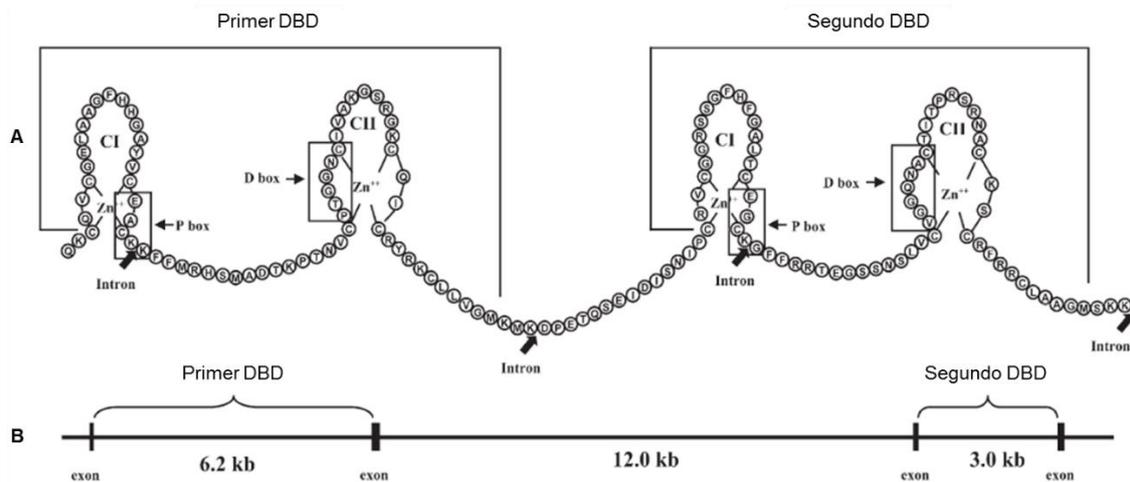


Figura 7. Dominio DBD del receptor nuclear de *S. mansoni* Sm2DBD α . A: Representación de los dos DBDs en tándem. B: Organización génica del dominio. Figura tomada y modificada de Wu et al. 2006.

Cuando los NRs se unen al ADN en forma de dímeros dos P-boxes interactúan con los hemi sitios en el ADN. Ensayos *in vitro* e *in vivo* demuestran que Sm2DBD-NR α puede interactuar como homodímero pero no interactúa con SmRXR1 o SmRXR2. La formación del homodímero implica que cuatro P-boxes pueden estar involucrados en la unión al ADN, pudiendo representar un nuevo mecanismo de unión al ADN (Wu y LoVerde, 2011; Wu, et al., 2007).

Las funciones de los Sm2DBD-NRs en *S. mansoni* permanecen aún desconocidas, sin embargo se ha demostrado su expresión diferencial en varias etapas de desarrollo, lo cual sugiere un posible rol en la regulación del desarrollo del parásito (Wu, et al., 2007).

En la planaria *Schmidtea mediterranea* se ha identificado un receptor nuclear denominado NHR-1 que pertenece a la subfamilia 2DBD-NR y es homólogo a Sm2DBD-NR γ . Estudios en planarias sexuales y asexuales muestran que NHR-1 es necesario para el desarrollo de los órganos reproductores accesorios y es además importante para la diferenciación y maduración de las células germinales en ovarios y testículos (Tharp, et al., 2014).

Dado que esta familia de receptores no parece estar presente en mamíferos, y existen indicios de que puedan cumplir una función relacionada al desarrollo, un mayor entendimiento de este grupo de receptores en platelmintos parásitos podría aportar nuevas rutas de intervención terapéutica.

1.2.6. Receptores nucleares como emergentes blancos de drogas antihelmínticas

Los NRs son una de las cuatro familias proteicas responsables del 70% de los efectos terapéuticos de drogas pequeñas, junto con receptores acoplados a proteína G similar a rodopsina (GPCRs), canales iónicos y proteínas quinasa. En particular, el 16% de los fármacos aprobados por la FDA (del inglés, *U.S. Food and Drug Administration*) actúan a través NRs (Santos, et al., 2017).

Estos factores de transcripción se han transformado en blancos atractivos para el desarrollo de drogas de pequeño tamaño molecular y de uso oral, debido a la naturaleza lipofílica de sus ligandos y a su habilidad de modular la expresión de múltiples genes en una misma vía (Evans y Mangelsdorf, 2014). Si bien han sido mayormente estudiados en gusanos de vida libre, han sido identificados en todas las categorías de helmintos. En este sentido, los NRs de helmintos parásitos emergen como posibles blancos de drogas antihelmínticas, proporcionando una estrategia terapéutica nueva, distinta de las drogas antihelmínticas conocidas, como los bencimidazoles cuyo blanco son las tubulinas (Wang, et al., 2017). Los bencimidazoles, antiparasitarios de elección para el tratamiento de la infección por *E. granulosus*, presentan varias contraindicaciones y efectos secundarios (Busto Bea, et al., 2016).

El principio de la utilización de NRs como blancos para el tratamiento de enfermedades parasíticas se basa en el uso de ligandos exógenos que interfieran con las funciones fisiológicas del NR. Sin embargo, también sería posible elegir como blanco los reguladores corriente arriba o los efectores corriente abajo del NR, una vez que la vía haya sido completamente elucidada (Wang, et al., 2017).

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Este trabajo se enmarca en una línea de investigación basada en el estudio a nivel molecular de la biología del parásito *Echinococcus granulosus*. Nuestro grupo de investigación ha trabajado en Echinococcosis quística por más de 20 años, a través de la caracterización a nivel génico, estructural y funcional de las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FABPs). La evidencia creciente que demuestra la interacción entre las FABPs y los receptores nucleares (NRs) en modelos vertebrados propone un interesante escenario para las FABPs en platelmintos parásitos. A su vez, los NRs en cestodos representan un grupo de proteínas muy poco estudiado con un gran potencial para su utilización como blancos de drogas anti-helmínticas.

En este sentido, se propone aportar al conocimiento de los receptores nucleares en cestodos, en particular estudiar la subfamilia de receptores 2DBD-NRs, de función desconocida, en *E. granulosus*.

2.2. Objetivos específicos

- Analizar preliminarmente las secuencias del conjunto de 2DBD-NRs en *E. granulosus*.
- Clonar un receptor nuclear 2DBD-NR de *E. granulosus* en un vector de expresión.
- Expresar y purificar un receptor nuclear recombinante perteneciente a la subfamilia 2DBD-NR en *E. coli*.
- Generar un suero policlonal contra un 2DBD-NR de *E. granulosus* para evaluar su posible interacción con EgFABP1.

3. Materiales y métodos

3.1. Análisis bioinformático de receptores nucleares

En primer lugar se empleó la secuencia aminoácidica del DBD correspondiente al PPAR α de *Mus musculus* (desde el aminoácido 101 al 184) para realizar una búsqueda de similitudes en la base de EST de *E. granulosus* (Sanger) (<http://www.genedb.org>) mediante la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Se eligieron tres secuencias con alto score correspondientes a tres receptores nucleares de la subfamilia 2DBD-NR. Los dominios funcionales de cada una se analizaron mediante Motifscan (https://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan). Para el estudio del dominio LBD se realizó una búsqueda mediante la herramienta BLAST utilizando las regiones aminoácidas correspondientes al LBD de cada receptor en la base de proteínas del Protein Data Bank. Los alineamientos se realizaron mediante Clustal Omega. Para la edición de secuencias y/o alineamientos se utilizó el software BioEdit 7.2.5.

3.2. Clonado de Eg2DBDg1 de *Echinococcus granulosus*

3.2.1. Amplificación mediante RT-PCR

Se extrajo ARN total de protoescolices de *E. granulosus* utilizando Trizol (Thermo) y se sintetizó ADNc utilizando cebadores al azar y RT SuperScript III (Invitrogen).

Inicialmente se diseñó una batería de cebadores para amplificar por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la región codificante de ADNc desde el segundo DBD hasta el codón de terminación de los tres 2DBD-NRs identificados en la base de datos. Para cada NR se diseñaron los siguientes cebadores directo y reverso: Eg2DBDg1: 37FwDBD1 y 37UTR1-rev; Eg2DBDg2: 24DBD1fw y 24RevStop; Eg2DBDg3: 45DBD1fw y 45RevStop (ver anexo 8.1.). Se ensayaron varias condiciones de amplificación, variando la temperatura de hibridación de los cebadores, la concentración del molde y el tiempo de las etapas del ciclo. Las condiciones utilizadas en la reacción en la cual se obtuvo amplificación de la región de ADNc buscada para uno de los NRs identificados, se describen a continuación.

Para la amplificación por PCR del gen EgrG_000379600.1 de *E. granulosus*, se utilizaron los siguientes cebadores: 37FwDBD1 (directo) y 37UTR-rev1 (reverso) (ver anexo 8.1.), amplificando la región de ADNc desde el segundo DBD hasta el codón de terminación, a la cual se denominó Eg2DBDg1cl. La reacción de PCR se realizó con la enzima ADN polimerasa KAPA HiFi (Biosystems) y los cebadores mencionados (0.4 μ M), siguiendo las indicaciones del fabricante y utilizando 1.0 μ L de ADNc (1000 ng/ μ L). Las condiciones de reacción se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones utilizadas en la reacción de PCR de Eg2DBDg1cl.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (segundos)	Ciclos
<i>Desnaturalización inicial</i>	95	180	1
<i>Desnaturalización</i>	98	20	35
<i>Empalme</i>	66	30	35
<i>Extensión</i>	72	120	35
<i>Extensión final</i>	72	240	1

El producto de PCR obtenido (Eg2DBDg1cl) fue visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, teñido con SYBR Safe (Thermo Fisher Scientific) y purificado mediante el kit comercial (Universal DNA Purification Kit, TianGen). Se realizó la re-amplificación de Eg2DBDg1cl por PCR utilizando la enzima ADN polimerasa RANGER (RANGER Mix Bioline), de acuerdo a las sugerencias del fabricante. Las condiciones de re-amplificación se muestran en la tabla 2. Luego de ser purificado utilizando iguales protocolos, se confirmó la secuencia del fragmento obtenido (Servicio de secuenciación, Instituto Pasteur de Montevideo).

Tabla 2. Condiciones de la reacción de PCR (re-amplificación de Eg2DBDg1cl).

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (segundos)	Ciclos
<i>Desnaturalización inicial</i>	95	180	1
<i>Desnaturalización</i>	98	20	30
<i>Empalme</i>	63	30	30
<i>Extensión</i>	72	120	30
<i>Extensión final</i>	72	300	1

3.2.2. Ligación y transformación de células competentes

Posteriormente se procedió a clonar la región de ADNc (Eg2DBDg1cl) en el vector pGM-T (pGM-T ligation Kit TianGen) (Figura 8). Este vector posee extremos con una única Timidina 3'-terminal desapareada, complementarios con los extremos con Adenina 3'-terminal desapareada del fragmento de ADN amplificado por la ADN polimerasa RANGER (Bioline), por lo que no es necesario la utilización de enzimas de restricción.

El sitio de inserción del fragmento de ADN se encuentra interrumpiendo el péptido α del gen de la enzima β -galactosidasa, que cataliza la hidrólisis de galactósidos a monosacáridos. La actividad β -galactosidasa puede ser detectada por un indicador como X-GAL, que al ser hidrolizado por esta enzima genera un compuesto azul insoluble. Tras la inducción con IPTG, los clones recombinantes producirán una enzima inactiva incapaz de hidrolizar el sustrato X-GAL, generándose así colonias blancas.

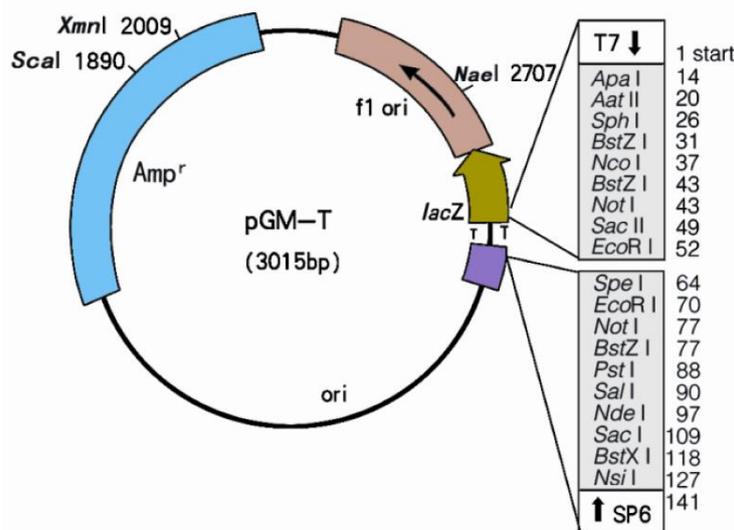


Figura 8. Vector pGM-T.

La reacción de ligación se llevó a cabo con 50 ng de vector y 155 ng de producto de PCR manteniendo una relación 5:1 (inserto:plásmido). En paralelo se realizó un control de la reacción utilizando un fragmento control proporcionado por el kit de clonado. Se utilizó el kit de clonado conteniendo la enzima T4 ADN ligasa siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación se transformaron 50 μ l de células competentes TOP10 (Thermo Fisher Scientific), con 5 μ l de reacción de ligación y 1 μ l de ligación control, por el método de shock térmico. Las células se incubaron con la mezcla de ligación durante

30 minutos en hielo, seguido de 90 segundos a 42°C y se volvieron a incubar en hielo durante 3 minutos. Luego se agregó a cada tubo 250 µl de medio de cultivo LB y se mantuvieron 45 minutos a 37°C con agitación a 150 rpm. Por último, se sembraron 100 y 200 µl de cada transformación en placas de medio LB-Agar conteniendo 100 µg/ml de Ampicilina, 20 mg/µl de IPTG y 20 mg/µl de X-GAL, y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

3.2.3. Selección de clones recombinantes

Para la purificación de los plásmidos se seleccionaron 5 colonias blancas y 1 colonia azul de la placa control, con las cuales se inocularon 3 ml de LB con 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron toda la noche a 37°C, 200 rpm. La extracción de los plásmidos se realizó mediante mini purificaciones de ADN plasmídico por lisis alcalina utilizando el kit GeneJET (Thermo Fisher Scientific). Se verificó la presencia del inserto en los plásmidos purificados mediante PCR, utilizando cebadores internos (37UTR-rev1, 37PDLrev, 37AVTfw y 37DBD2fw, ver anexo 8.1.), junto con el Ranger Mix utilizado previamente. Las condiciones de reacción se muestran en la tabla 2, variando la temperatura de hibridación de los cebadores según el caso. Mediante electroforesis en gel de agarosa 1% se visualizaron los productos de PCR. Se seleccionó uno de los clones que resultó positivo y se confirmó la secuencia del ADN clonado (Eg2DBDg1cl) mediante secuenciación (Macrogen, Corea).

3.2.4. Subclonado en el vector de expresión

Para el subclonado en el vector de expresión, se realizó la amplificación por PCR de Eg2DBDg1cl clonado previamente en pGM-T. Con el fin de llevar a cabo el clonado direccional en pET-22b(+) (Novagen) se generaron dos cebadores conteniendo los sitios de restricción de las enzimas NdeI y XhoI, llamados NdeI-Eg37f y XhoI-Eg37r (ver anexo 8.1.). Se utilizó el Ranger Mix (Bioline), el programa de amplificación descrito en la tabla 3 y 1.5 ng de la construcción pGM-T/Eg2DBDg1cl.

El vector de expresión pET-22b(+) y el producto de PCR fueron sometidos a digestión doble con las enzimas de restricción NdeI (Fermentas) y XhoI (Invitrogen), para ser luego ligados entre sí. Los vectores pET son diseñados especialmente para el clonado y la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. El plásmido pET-22b(+), mostrado

en la figura 9, le confiere a las células transformadas resistencia a ampicilina y además, posee en su secuencia una región que codifica un trecho de 6 histidinas, las cuales serán adicionadas a la proteína recombinante en la región C-terminal, facilitando su posterior purificación.

Tabla 3. Condiciones de la reacción de PCR.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (segundos)	Ciclos
<i>Desnaturalización inicial</i>	95	180	1
<i>Desnaturalización</i>	98	20	30
<i>Empalme</i>	68	30	30
<i>Extensión</i>	72	120	30
<i>Extensión final</i>	72	300	1

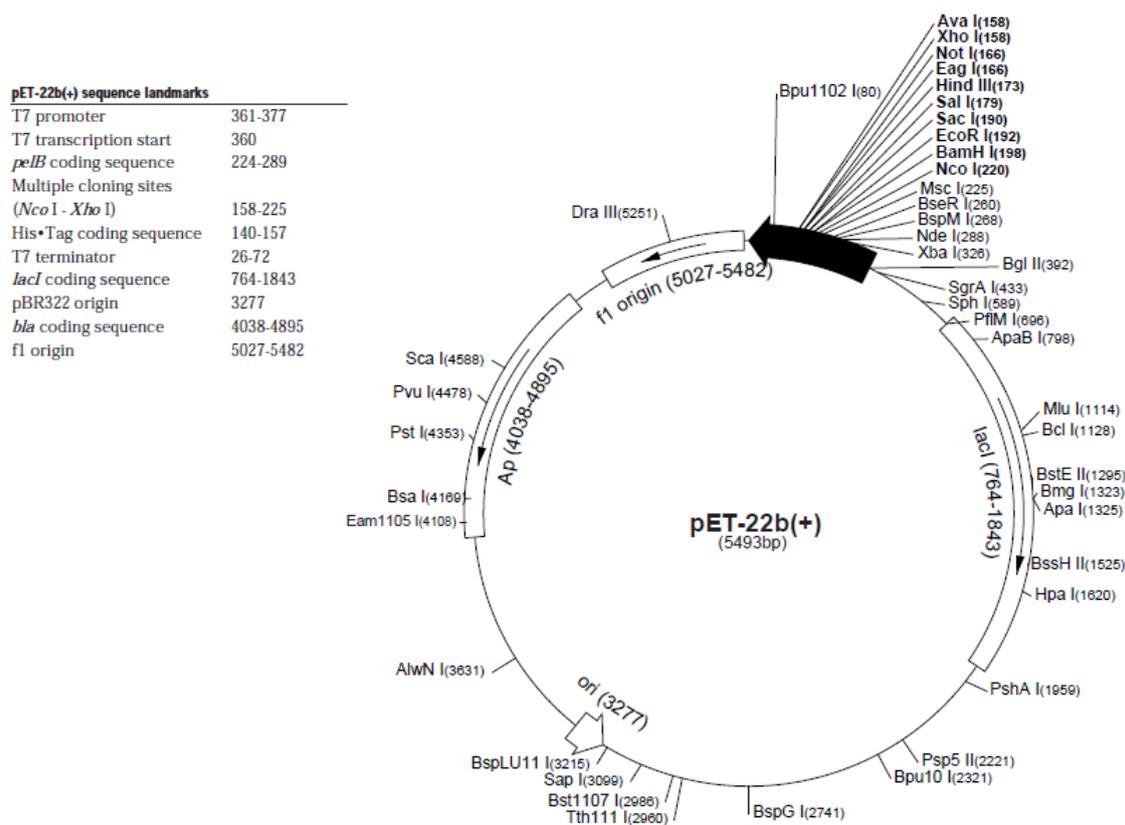


Figura 9. Vector de expresión pET-22b(+).

El producto de PCR y el vector digerido fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa 1% y purificados mediante kit comercial (Universal DNA Purification Kit,

Tiagen). La reacción de ligación se llevó a cabo manteniendo una relación 3:1 (inserto:vector), con 50.4 ng de inserto, 49.88 ng de vector y la enzima T4 DNA ligasa, siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación se transformaron células TOP10 mediante el método de shock térmico. Se eligieron al azar 5 colonias y los clones recombinantes fueron verificados mediante PCR en iguales condiciones a las mostradas en la tabla 2. El plásmido purificado fue secuenciado, verificándose la identidad del mismo (Macrogen, Corea).

Fueron transformadas con el plásmido recombinante verificado, células *E. coli* competentes BL21(DE3)pLysS (Promega) y Rosetta(DE3) (Novagen), por la técnica de shock térmico. Las cepas DE3 contienen el gen para la enzima T7 ARN polimerasa bajo el control del promotor lacUV5. La cepa BL21(DE3)pLysS contiene el plásmido pLysS, expresando constitutivamente bajos niveles de lisozima T7, lo cual reduce la expresión basal de los genes recombinantes mediante la inhibición de los niveles basales de la T7 ARN polimerasa. Por otro lado, la cepa Rosetta(DE3) está diseñada para aumentar la expresión de proteínas eucariotas que contienen codones poco frecuentes en *E. coli*. Los tRNAs para codones poco frecuentes se encuentran en un plásmido que además confiere a las células resistencia a cloranfenicol.

El análisis de la presencia de codones de uso poco frecuente en *E. coli* en la secuencia de Eg2DBDg1cl se realizó mediante la herramienta *Graphical Codon Usage Analyser 2.0* (gcua; <http://gcua.schoedl.de/>).

3.3. Expresión de la proteína recombinante rEg2DBDg1

Con las dos cepas de *E. coli* transformadas se ensayaron diferentes condiciones de inducción, con el fin de optimizar el proceso de producción de la proteína recombinante.

Los ensayos de inducción en *E. coli* BL21(DE3)pLysS se comenzaron inoculando 1 mL de cultivo de bacterias transformadas crecidas toda la noche (ON) a 37°C cada 50 mL de medio con una concentración final de 100 µg/mL de ampicilina. Para el caso de la inducción en *E. coli* Rosetta(DE3), se inoculó 3.75 mL de cultivo ON cada 50 mL de medio TB con una concentración final de 100 µg/mL de ampicilina y 34 µg/mL de cloranfenicol. Se mantuvo el cultivo a 37°C, 200 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de aproximadamente 0.8 y a continuación se le adicionó la correspondiente concentración de IPTG, a excepción del ensayo utilizando medio ZYM auto inductor,

que no se le agrega inductor (ver anexo 8.2.). El cultivo fue incubado a la temperatura y durante el tiempo especificado para cada caso en la tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de expresión ensayadas.

Cepa de <i>E. coli</i>	Inductor [IPTG] (mM)	Temperatura (°C)	Medio de cultivo	Tiempo de inducción
<i>BL21(DE3)pLysS</i>	0.5	17	LB	ON
	-	20	ZYM	20hrs
	1.0	25	2TY	ON
	1.0	37	2TY	3hrs
<i>Rosetta (DE3)</i>	0.5	20	TB	ON
	1.0	18	TB	ON
	1.0	20	TB	ON
	1.0	37	TB	3hrs

Tras el tiempo de inducción, las muestras recuperadas fueron centrifugadas a 4°C durante 10 minutos a 4420 xg. Los residuos de células fueron re-suspendidos en 1.5 mL de tampón de sonicación (fosfato de sodio 50 mM, pH 7.4, NaCl 300 mM) por cada 50 mL de medio utilizado. La lisis celular se realizó mediante tres ciclos de congelado y descongelado, seguido de 15 minutos de sonicación a potencia 40 w y pulsador a 60% en homogeneizador de ultrasonido (Sonic ruptor 250, OMNI International). Se centrifugó el lisado celular a 4°C durante 30 minutos a 15000 xg, separando la fracción proteica soluble en el sobrenadante. El residuo fue re-suspendido en tampón de sonicación con 8 M de urea y se centrifugó durante 30 minutos a 14000 xg, obteniéndose la fracción proteica insoluble en el sobrenadante. Todas las fracciones fueron visualizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) al 12%.

Las fracciones relevantes fueron sometidas a *Western Blot*, utilizando un anticuerpo contra His (GE Healthcare) producido en conejo y un anticuerpo contra IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina producido en cabra (SIGMA ALDRICH) utilizado como secundario. Los geles productos de SDS-PAGE fueron electrotransferidos a membranas de PVDF Hybond-P (Amersham Biosciences), mediante un dispositivo de transferencia húmeda miniVE (Amersham Biosciences) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las membranas fueron bloqueadas durante toda la noche a 4°C, en agitación, con solución de bloqueo (TBST – 25 mM Tris, 8 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 0.05% Tween20 – 5% de leche descremada y 2% de glicina). Posteriormente, las mismas se incubaron dos

horas a temperatura ambiente con el anticuerpo primario en solución de bloqueo. Luego de tres lavados de 15 min con TBST las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario, durante una hora. Luego de tres lavados en las mismas condiciones, se realizó el revelado utilizando los reactivos NBT y BCIP (SIGMA), deteniendo la reacción con agua.

3.4. Purificación de la proteína recombinante rEg2DBDg1

Para la cromatografía de afinidad se utilizaron columnas comerciales HisTrap HP 5 mL (GE Healthcare, Life Sciences). Estas columnas cromatográficas están especialmente diseñadas para la purificación de proteínas recombinantes con trechos de histidina. Poseen una matriz de sepharosa con iones níquel los cuales interactúan con los residuos de histidina.

Previo a la purificación se agregó a las diferentes fracciones imidazol 20 mM, la misma concentración utilizada en el tampón de unión a la columna, y fueron centrifugadas 15 minutos a 17400 xg. Tras el lavado de la columna con 5 volúmenes de agua destilada se procedió a equilibrar la misma con 5 o más volúmenes de tampón de unión (tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7.4, NaCl 300 mM, 20 mM imidazol y 8 M de urea en el caso de la fracción insoluble). Se sembró la totalidad de la muestra y luego se continuó lavando con tampón de unión hasta que la densidad óptica a 280 nm alcanzó un valor igual o cercano a cero. La elución se llevó adelante mediante un gradiente discontinuo, con concentraciones crecientes de imidazol (100 mM, 200 mM, 500 mM). Las muestras eluidas fueron analizadas por SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 12%. Las alícuotas relevantes fueron sometidas a *Western Blot*, utilizando un anticuerpo contra His (GE Healthcare) producido en conejo y un anticuerpo contra IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina producido en cabra (SIGMA ALDRICH) utilizado como secundario. Por último, mediante espectrometría de masa se verificó la identidad de la proteína Eg2DBDg1 recombinante purificada (rEg2DBDg1) (Instituto Pasteur de Montevideo).

3.5. Generación de un suero contra rEg2DBDg1

La obtención del suero contra rEg2DBDg1 fue llevada a cabo por la Dra. Lucía Canclini en el Departamento de Genética del IIBCE. Se utilizó un ratón de la cepa CD1 de 2-3 meses de edad. El día 0, previo a la inoculación, se extrajeron 150 µl de sangre de la

vena de la cola. Se realizó una primera inoculación del producto (*priming*) por vía subcutánea, conteniendo 25 µl de rEg2DBDg1 con 4 µg/µl de concentración (100 µg de proteína). El inmunógeno se preparó en partes iguales con adyuvante completo de Freund, cuidando de formar una emulsión homogénea. A los 15 días se realizó un refuerzo (*booster*), siguiendo esencialmente los mismos procedimientos que para la inmunización inicial pero utilizando el adyuvante incompleto de Freund y una cantidad total de proteína de 50 µg. A los 25 días de la inoculación inicial se realizó el sangrado final. Para ello, el ratón se anestesia con una combinación de 35 mg/kg de ketamina y 5 mg/kg de xilazina. Una vez confirmada la anestesia profunda, se realizó una punción intra cardíaca y se extrajo la sangre. El ratón fue sacrificado inmediatamente mediante dislocación cervical. La sangre extraída se incubó a 37°C durante 1 hora, luego se mantuvo a 4°C durante toda la noche para que se forme el coagulo y se separe el suero. Por último, el suero se aspiró con una pipeta pasteur de vidrio cuidando que no se rompa el coagulo. El suero obtenido fue analizado mediante *Western Blot*, para ello se utilizó una dilución 1/2000 del suero policlonal y fue revelado mediante reacción de fosfatasa alcalina, siguiendo el mismo protocolo explicado anteriormente.

4. Resultados

4.1. Análisis bioinformático de receptores nucleares 2DBD de *Echinococcus granulosus*

En primer lugar, empleando la secuencia aminoácídica del DBD correspondiente al PPAR α de *Mus musculus* y la herramienta BLAST, se realizó una búsqueda de secuencias similares en la base de EST de *E. granulosus* del Instituto Sanger (<http://www.genedb.org>). De esta manera se obtuvieron 15 secuencias correspondientes a NRs con un score mayor a 130 y una probabilidad menor a 4.0e-09. Tres de las secuencias predichas, denominadas como EgrG_00379600.1.pep (Eg2DBDg1), EgrG_00240200.1.pep (Eg2DBDg2) y EgrG_00458200.1.pep (Eg2DBDg3), resultaron contener dos dominios de unión al ADN (2DBD). El análisis con el programa Motif Scan ubica la posición de los 2DBD en tándem entre los residuos 170-331 para Eg2DBDg1, 241-403 para Eg2DBDg2 y 147-325 para Eg2DBDg3. El alineamiento de los dominios DBD muestra que en el segundo DBD los tres NRs poseen una secuencia conservada P-box –CEGCKG–, seguida por los aminoácidos FFRR,

presente en la mayoría de los miembros de la subfamilia NR1 (Figura 10). Eg2DBDg1 y Eg2DBDg2 poseen la secuencia conservada P-box –CEACKK–, característica de la subfamilia 2DBD-NR en el primer DBD (Figura 10). Si bien la secuencia anotada para Eg2DBDg3, no contiene la P-box característica de la subfamilia 2DBD-NR, tras analizar la secuencia génica completa se encontró que esta región sí está presente en el DBD, por lo cual esta discrepancia parece responder a un error de anotación.

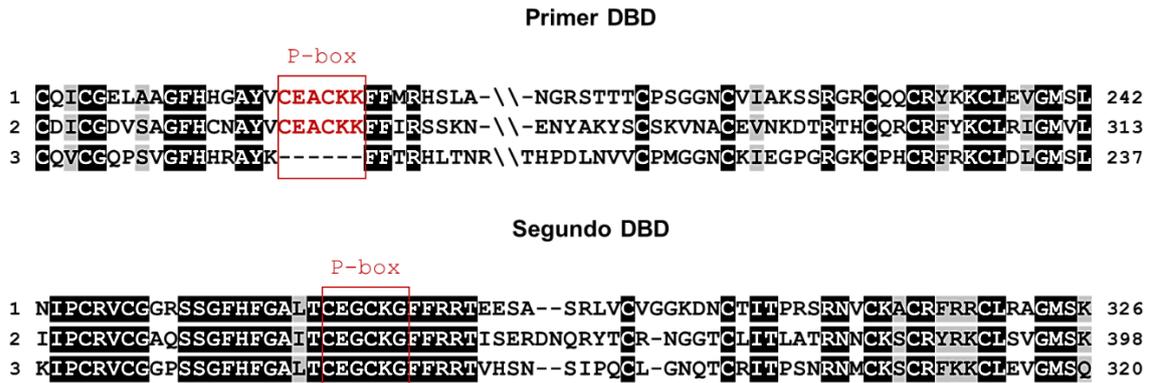


Figura 10. Comparación de secuencias de los dominios de unión al ADN de NRs 2DBD de *E. granulosus*. Alineamientos realizados mediante Clustal O. 1:Eg2DBDg1, 2:Eg2DBDg2, 3:Eg2DBDg3. Se muestran residuos idénticos (sombreado negro) y similares (sombreado gris). Letras rojas: secuencia característica de la subfamilia 2DBD-NR. Recuadros rojos: secuencias conservadas P-box.

Se analizó la conservación de la secuencia del LBD mediante el alineamiento con NRs pertenecientes a la subfamilia 1, con estructura secundaria conocida (Figura 11). Si bien el LBD respresenta una región con moderada variabilidad de secuencia, se encontraron residuos conservados para la mayoría de las helices α (H3 – H12). En particular se indican las regiones donde pueden encontrarse dos motivos consenso del LBD: el motivo I, o característico del LBD (LxxxVE(W,F)AKxIPGFxxLxxxDQxxLLKxxWxELxxLxxAxR) ubicado entre las helices 3 – 5 y el motivo consenso II, entre las helices 7 – 9, (EFxxxLxxLxLDxxExALLKAlxLFSxDRxGLxxxxxVExLQExxxxALxxY) (Wang, et al., 1989; Wurtz, et al., 1996; Zhang, et al., 2004)

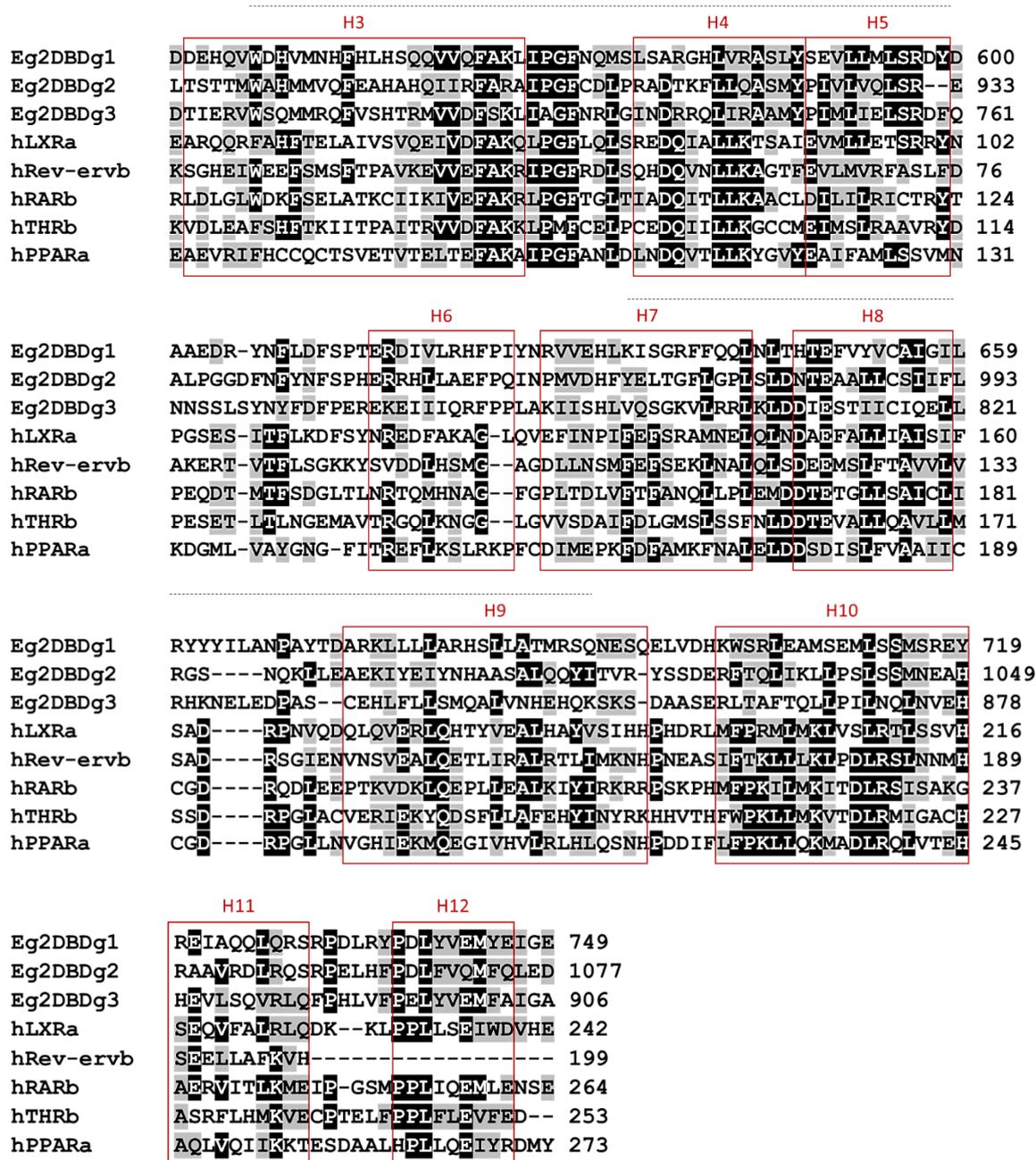


Figura 11. Comparación de Dominios de unión al Ligando. Alineamientos realizados mediante Clustal O. Alineamiento de las secuencias de las Hélices 3-12 del LBD de NRs de la subfamilia 1 con el LBD de los tres 2DBD-NRs de *E. granulosus*. Se muestran residuos idénticos (sombreado negro) y similares (sombreado gris). En rojo se recuadran las Hélices 3-12. Las líneas punteadas indican los motivos I (H3-5) y II (H7-9). Números al final de cada línea indican posición del residuo en la secuencia original. Entradas PDB de LBDs utilizados: hLXRa (1UHL_B), hRev-ervb (4N73_A), hRARb (1XAP_A), hTHRb (1Q4X_A), hPPARa (3VI8_A).

4.2. Clonado del receptor nuclear 2DBD Eg2DBDg1

4.2.1. Amplificación mediante RT-PCR

En una primera instancia se intentó amplificar la región de ADNc desde el segundo DBD hasta el codón de terminación para los tres NRs identificados previamente (Eg2DBDg1, Eg2DBDg2 y Eg2DBDg3). Si bien se ensayaron varias condiciones de amplificación, variando la temperatura de hibridación de los cebadores, la concentración del molde y el tiempo de las etapas del ciclo, solo fue posible evidenciar la amplificación para uno de los NRs buscados, Eg2DBDg1 (ver sección 3.2.1.).

La región de ADN codificante para Eg2DBDg1, desde el segundo DBD hasta el codón de terminación (Eg2DBDg1cl), fue amplificada y re-amplificada por PCR (ver tabla 1 y 2 de sección 3.2.1). En la figura 12 se muestran los productos de PCR obtenidos, de un tamaño aproximado de 1800 pb, coincidente con el tamaño esperado (1746 pb) dada la posición de los cebadores utilizados (37FwDBD1 y 37UTR-rev1, ver anexo 8.1.). El producto de re-amplificación fue purificado, obteniéndose una concentración de 47.7 ng/μl, la identidad del mismo fue confirmada por secuenciación de ADN.

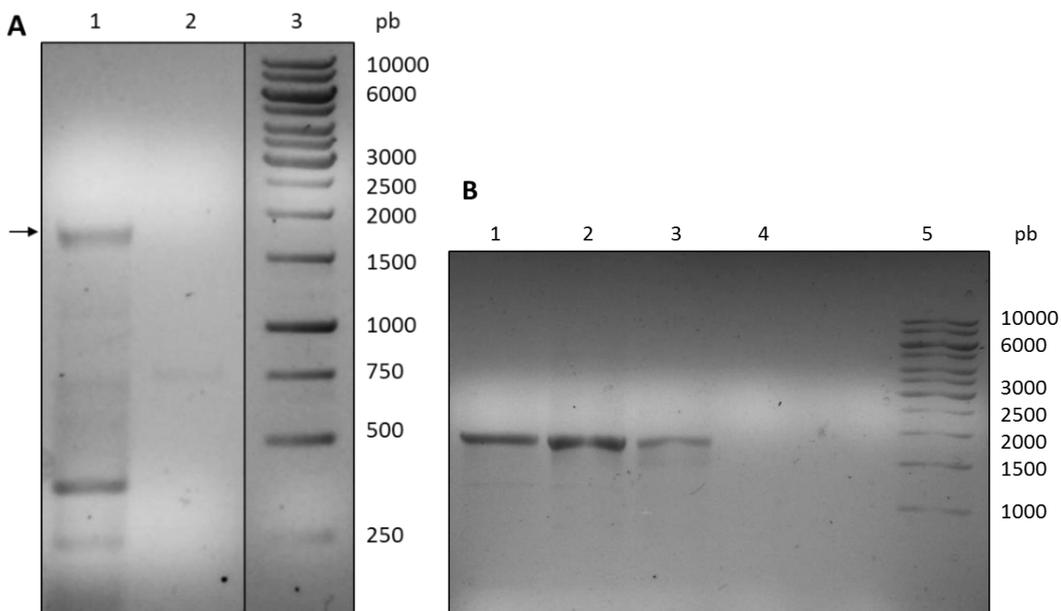


Figura 12. Amplificación por PCR de Eg2DBDg1cl. Electroforesis en Agarosa 1% teñido con SYBR Safe. A) 1) Amplificación de Eg2DBDg1cl desde el 2do DBD al C-terminal. La flecha indica el fragmento de interés; 2) Control negativo de la reacción; 3) MWM. B) 1-3) Re-amplificación de Eg2DBDg1cl desde el 2do DBD al C-t; 4) Control negativo de la reacción; 5) MWM. MWM: Marcador de masa molecular (GeneRuler 1Kb, Fermentas).

4.2.2. Clonado en el vector pGM-T

El producto de re-amplificación purificado fue clonado en el vector pGM-T, como se indica anteriormente. Se purificaron los plásmidos de cinco clones recombinantes y se rastreó la presencia del inserto mediante PCR utilizando cebadores internos (37UTR-rev1, 37PDLrev, 37AVTfw y 37DBD2fw, ver anexo 8.1.). En la figura 13 se muestra el plásmido purificado mediante mini purificaciones por lisis alcalina, con una concentración de 102 ng/μl (13.A), así como la verificación de la presencia del inserto a través de la amplificación del ADN plasmídico del clon elegido (13.B).

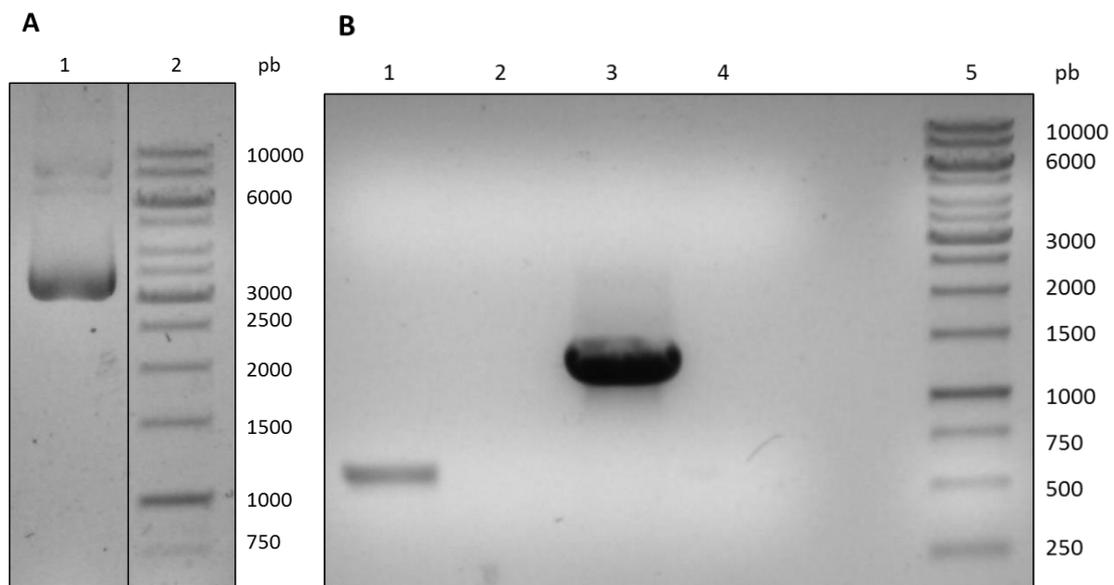


Figura 13. Clonado de Eg2DBDg1cl en el vector pGM-T. Electroforesis en Agarosa 1% teñido con SYBR Safe. A) 1) Plásmido purificado conteniendo el inserto; 2) MWM. B) Verificación del clonado en el vector pGM-T mediante PCR; 1) PCR utilizando los cebadores 37UTR-rev1 y 37AVTfw; 3) PCR utilizando los cebadores 37PDLrev y 37DBD2fw; 2 y 4) controles negativos; 5) MWM. MWM: Marcador de masa molecular (GeneRuler 1Kb, Fermentas).

4.2.3. Subclonado en el vector de expresión pET-22b(+)

El plásmido purificado (pGM-T/Eg2DBDg1cl) fue sometido a PCR utilizando dos cebadores conteniendo los sitios de restricción de las enzimas NdeI y XhoI, necesarias para llevar a cabo el clonado direccional en el vector de expresión pET-22b(+). Por un lado, el producto de PCR visualizado por electroforesis en agarosa fue escindido del gel y purificado para ser digerido por dichas enzimas de restricción. Por otro lado, el vector

de expresión fue purificado mediante lisis alcalina y digerido con el mismo par de enzimas.

El vector de expresión y el producto de PCR digeridos fueron purificados y ligados entre sí, generándose la construcción pET22b(+)/Eg2DBDg1cl, con la cual se transformaron inicialmente células *E. coli* BL21(DE3)pLysS y luego *E. coli* Rosetta(DE3). Los clones recombinantes fueron verificados mediante PCR (Figura 14).

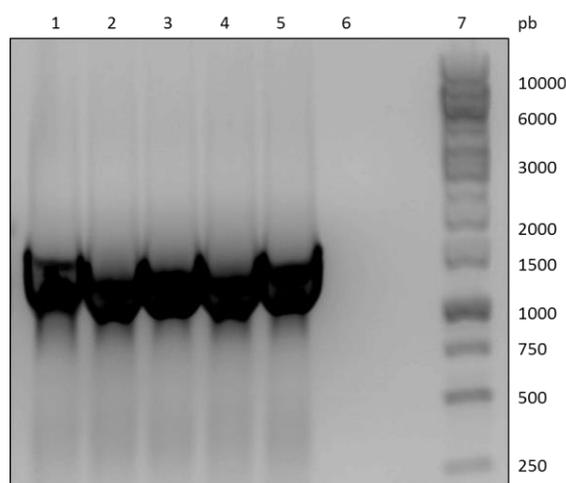


Figura 14. Subclonado en el vector de expresión pET-22b(+). Electroforesis en Agarosa 1% teñido con GelRed. 1-5) Productos de PCR de colonia de 5 clones recombinantes de *E. coli* BL21(DE3)pLysS; 6) Control negativo; 7) MWM. MWM: Marcador de masa molecular (GeneRuler 1Kb, Fermentas).

El plásmido recombinante fue purificado y su identidad fue confirmada mediante secuenciación, así como la correcta inserción del fragmento de ADN Eg2DBDg1cl codificante para la proteína rEg2DBDg1 (ver anexo 8.3.).

4.3. Análisis de la secuencia de rEg2DBDg1 y estructura génica de Eg2DBDg1

La secuencia de la región del ADN clonado mostró algunas diferencias con respecto a la secuencia anotada para Eg2DBDg1 en la base de datos, sin producirse un cambio en el marco de lectura (figura 15). En cuatro posiciones se observó un cambio de aminoácido: 313 A por T, 671 T por M, 797 S por P y 808 S por P. Mientras que entre

las posiciones 502 – 525 el inserto clonado carece de 22 residuos. En la tabla 5 se indica la ubicación de cada discrepancia dentro de los dominios funcionales de Eg2DBDg1.

rEg2DBDg1	CTITPRSRNVCKT <small>CR</small> FRRCLRAGMSKRGSRIGRQPNVAVKHFCAIEIRQLKDSGQPLASDF	104
Eg2DBDg1	CTITPRSRNVCKA <small>CR</small> FRRCLRAGMSKRGSRIGRQPNVAVKHFCAIEIRQLKDSGQPLASDF	360
rEg2DBDg1	DGLNWFNYGMRMAMEFMRLPAT-----YFKSRFDMSTIEPSQA	262
Eg2DBDg1	DGLNWFNYGMRMAMEFMRLPATVSSSSSSTSASSTISACLFYQQYFKSRFDMSTIEPSQA	540
rEg2DBDg1	YYYILANPAYMDARKLLLLARHSLLATMRSQNESQELVDHKWSRLEAMSEMLSSMSREYR	452
Eg2DBDg1	YYYILANPAYTDARKLLLLARHSLLATMRSQNESQELVDHKWSRLEAMSEMLSSMSREYR	720
rEg2DBDg1	LIQQPAAMRPSVPHGVPPSTAHWPIAPGSIKPEDPVWSIQDRWNTAPAISSANPYQIS	572
Eg2DBDg1	LIQQPAAMRPSVPHGVSPSTAHWPIASGSIKPEDPVWSIQDRWNTAPAISSANPYQIS	840

Figura 15. Alineamiento de las secuencias proteicas de rEg2DBDg1 con Eg2DBDg1 presente en la base de datos (EgrG_00379600.1.pep). Alineamiento realizado mediante Clustal O. Las diferencias entre las secuencias se muestran sombreadas en gris. Números al final de cada línea indican posición del residuo en la secuencia original.

Tabla 5. Discrepancias entre las secuencias de rEg2DBDg1 con Eg2DBDg1

Posición del residuo	Modificación	Dominio
313	A → T	Bisagra
502	22 residuos ausentes	Bisagra
671	T → M	LBD
797	S → P	C-terminal
808	S → P	C-terminal

Con el objetivo de estudiar la modificación hallada en la posición 502, correspondiente con la ausencia de 22 residuos, se procedió a analizar la estructura del gen que codifica para Eg2DBDg1 presente en la base de datos de *E. granulosus* del Instituto Sanger (<http://www.genedb.org/>). En la figura 16 se muestra una representación esquemática del ordenamiento de exones e intrones donde se indica la ubicación del tramo comprendido entre los residuos 502 – 525 de Eg2DBDg1. Se encontró que el tramo de 22 aminoácidos coincide con el extremo 3' del quinto exón, manteniéndose el motivo consenso GT-AG del sitio de empalme.

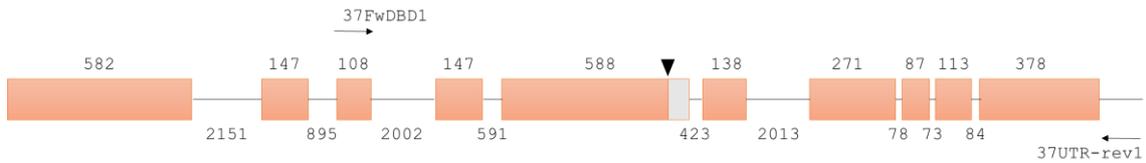


Figura 16. Estructura génica de Eg2DBDg1. Se representan los exones (rectángulos sombreados en anaranjado) e intrones (líneas) que componen el gen que codifica para Eg2DBDg1. Los números superiores e inferiores indican los de pares de bases de cada exón e intrón respectivamente. Se indica con un triángulo y sombreada en gris la región ausente en rEg2DBDg1 que codifica los residuos comprendidos entre las posiciones 502 – 525. Las flechas señalan la ubicación de los cebadores utilizados para amplificar la región codificante de Eg2DBDg1 correspondiente con rEg2DBDg1.

Utilizando la herramienta ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) fue posible obtener información teórica sobre los parámetros de la proteína recombinante rEg2DBDg1. Se obtuvo un valor de masa molecular teórica de 64,577 kDa y un punto isoeléctrico teórico de 8.75.

4.4. Expresión y purificación de la proteína recombinante rEg2DBDg1

4.4.1. Ensayos en *E. coli* BL21(DE3)pLysS

Inicialmente los ensayos de inducción se realizaron utilizando la cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS. A pesar de que se modificaron varios parámetros del protocolo de expresión, como las condiciones de cultivo (tiempo, temperatura y medio) y las concentraciones de inductor (tabla 6), no fue posible identificar la expresión de la proteína de interés en este sistema. En ninguna de las condiciones ensayadas (tabla 6) fue observable por SDS-PAGE una clara expresión de una proteína del tamaño esperado (65 kDa). Esto puede apreciarse en la figura 17, donde se muestra la electroforesis de las fracciones proteicas inducidas a 37 °C. De todas formas, las fracciones proteicas inducidas soluble e insoluble fueron analizadas por *Western Blot* utilizando un anticuerpo comercial contra histidinas (ver sección 3.3.), sin obtenerse resultados positivos (no se muestra).

Tabla 6. Ensayos en *E. coli*. BL21(DE3)pLysS

Condición	[IPTG] (mM)	Temp. (°C)	Medio	t. de Inducción
1	0.5	17	LB	ON
2	-	20	ZYM	20hrs
3	1.0	25	2TY	ON
4	1.0	37	2TY	3hrs

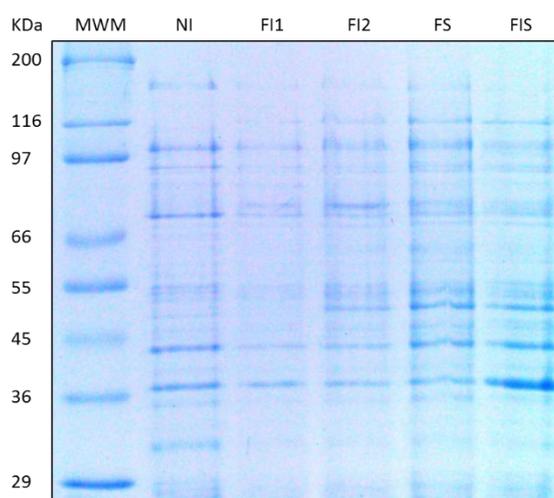


Figura 17. Análisis de la expresión de rEg2DBDg1. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida 12%, teñido con azul de Coomassie. Fracciones proteicas (F) de células *E. coli* BL21(DE3)pLysS inducidas con IPTG (1mM), 3hrs a 37 °C. NI F. no inducida; FI. 1 y 2) F. inducida total luego de una hora y dos horas de inducción, respectivamente; FS) F. inducida soluble; FIS) F. inducida insoluble. MWM: Sigma Marker Wide Range (Sigma).

4.4.2. Análisis del uso de codones

En base a estos resultados, habiendo ensayado múltiples condiciones de inducción sin éxito, se analizó en la secuencia de Eg2DBDg1cl la presencia de codones raros o de uso poco frecuente en *E. coli*, con el fin de evaluar un cambio de cepa o la optimización de la secuencia para su expresión en *E. coli*. La presencia de codones en la secuencia del fragmento de ADN clonado de uso poco frecuente por la cepa elegida puede afectar la eficiencia de la traducción. Frente a la falta de ARNs de transferencia pueden provocarse errores de sustitución aminoacídica, enlentecimiento de la traducción o incluso la terminación prematura de la síntesis proteica (Gustafsson, et al., 2004).

En la figura 18 se muestra la distribución de la frecuencia del uso de codones y la adaptabilidad relativa a lo largo de una porción de la secuencia del ADN clonado

Eg2DBDg1cl, analizada mediante el programa *Graphical Codon Usage Analyzer 2.0*. En la figura 18.A puede apreciarse la presencia de varios codones con una baja frecuencia de uso en *E. coli*. En particular se encontró que el 23% y el 5% de los codones presentan una frecuencia de uso menor al 20% y al 10% respectivamente, de los cuales AGG (7%) y CTA (6%) son los menos frecuentes. La relación entre la frecuencia de uso observada para un codón y la frecuencia del codón más abundante para el mismo aminoácido se conoce como adaptabilidad relativa. Al analizar esta relación (Figura 18.B) se encontró que los dos codones con menor adaptabilidad relativa fueron AGG (23%) y CTA (16%).

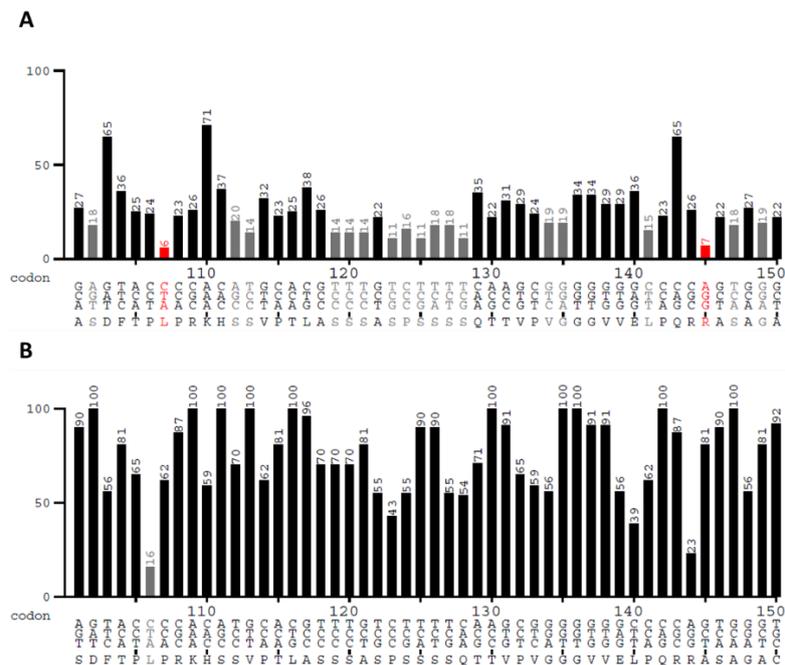


Figura 18. Distribución de la frecuencia del uso de codones (A) y de la adaptabilidad relativa (B) a lo largo del fragmento de ADNc clonado Eg2DBDg1cl. Se muestra un fragmento de la región clonada. Análisis realizados mediante el programa gcua 2.0. Valores <20% en gris, <10% en rojo. Análisis completos en anexo 8.3.

La cepa de *E. coli* Rosetta (DE3) está enriquecida en ARNts para los codones AGG, AGA, AUA, CUA, CCC y GGA, utilizados poco frecuentemente en *E. coli*. Considerando que los dos codones con menor frecuencia y menor adaptabilidad relativa (AGG y CTA) presentes el fragmento de ADN clonado, se encuentran dentro del conjunto suplementado en la cepa de *E. coli* Rosetta (DE3) se decidió continuar los ensayos de expresión en esta cepa.

4.4.3. Ensayos en *E. coli* Rosetta(DE3)

Se realizó un primer ensayo de inducción en *E. coli* Rosetta(DE3) transformada con pET22b(+)/Eg2DBDg1cl, a 20°C, ON, utilizando dos concentraciones diferentes de IPTG (0.5 mM y 1.0 mM). En paralelo se llevó a cabo un control negativo con la misma cepa transformada con el plásmido pET-22b(+) sin el inserto codificante para rEg2DBDg1 (no se muestra). No se apreciaron diferencias entre las fracciones proteicas inducidas y no inducidas sometidas a electroforesis.

En segunda instancia, tras modificar las condiciones de inducción a 37°C durante 3 hrs con 1mM de IPTG, se visualizó mediante electroforesis una banda del tamaño esperado (64 kDa) en la fracción proteica insoluble, no presente en la fracción no inducida (Figura 19 A). Si bien no fue apreciable una evidente inducción, se continuó con la purificación de la fracción proteica insoluble por IMAC empleando un gradiente discontinuo de imidazol (100 mM, 200 mM, 500 mM), como se describe en materiales y métodos sección 3.4. El análisis electroforético de las fracciones eluídas durante la cromatografía indicó la presencia de una proteína en el rango de masa molecular esperado (64 kDa), eluída a una concentración de 100 mM de imidazol (Figura 19 B). Esta proteína fue identificada como rEg2DBDg1 mediante espectrometría de masas MALDI/TOF-TOF (Servicio UByPA del Instituto Pasteur de Montevideo).

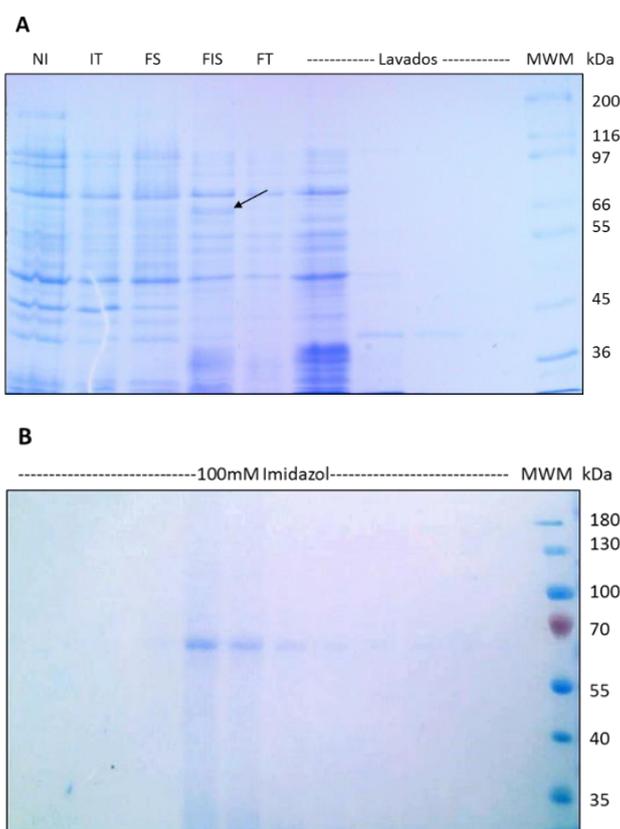


Figura 19. Análisis de la expresión y purificación de rEg2DBDg1 en fracciones proteicas de células *E. coli* Rosetta(DE3) inducidas con IPTG a 37°C. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida 12%, teñido con azul de coomassie. A) NI) fracción no inducida; IT) fracción inducida total; FS) fracción inducida soluble; FIS) fracción inducida insoluble; FT) fracción no unida; a la derecha fracciones obtenidas durante la etapa de lavado de la cromatografía de afinidad. MWM: Sigma Marker Wide Range (Sigma). B) Fracciones eluidas a partir de la cromatografía de afinidad de la fracción insoluble. En la parte superior se indica la concentración de imidazol correspondiente a las fracciones sembradas. MWM: Page Ruler Prestained (Thermo Fisher).

Una vez confirmada la expresión de rEg2DBDg1 en el sistema empleado (*E. coli* Rosetta(DE3)), se decidió realizar un nuevo protocolo de inducción a una temperatura de 18°C, *ON* con 1.0 mM de IPTG, con el objetivo de mejorar la solubilidad de la proteína recombinante. La fracción soluble fue purificada por IMAC utilizando un gradiente discontinuo de imidazol (100 mM, 200 mM, 500 mM). Las alícuotas obtenidas fueron analizadas por electroforesis apreciándose la presencia de una proteína de masa molecular similar a rEg2DBDg1, que fue eluída a igual concentración de imidazol (100 mM) (Figura 20). Lamentablemente, el análisis por espectrometría de masas mostró que no se trataba de rEg2DBDg1 sino de una proteína perteneciente a *E. coli* reportada como “Molecular chaperon GroEL”.

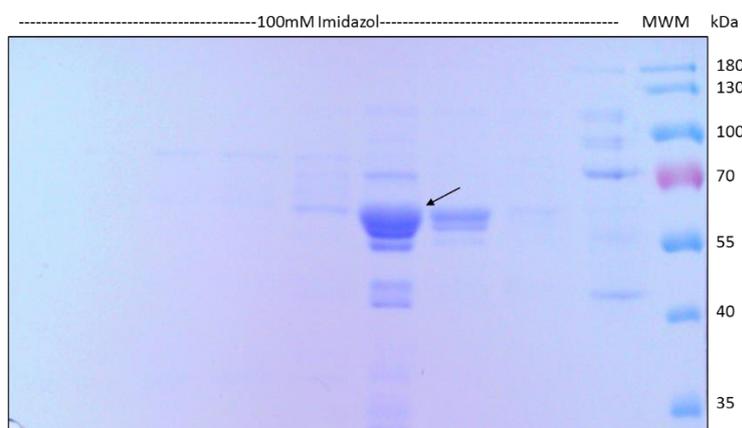


Figura 20. Análisis de la expresión de rEg2DBDg1 a 18°C en la fracción proteica soluble de células *E. coli* Rosetta(DE3) inducidas con IPTG. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida 12%, teñido con azul de coomassie. Se muestra la purificación por IMAC de la fracción proteica soluble. En la parte superior se indica la concentración de imidazol correspondiente a las fracciones sembradas. La flecha señala la proteína de *E. coli* identificada. MWM: Page Ruler Prestained (Thermo Fisher).

En la tabla 7 se resumen las condiciones de expresión ensayas en células de *E. coli* Rosetta(DE3), se distingue en negrita la única condición en la que fue posible identificar la expresión de rEg2DBDg1.

Tabla 7. Ensayos en *E. coli* Rosetta (DE3)

Condición	[IPTG] (mM)	Temp. (°C)	Medio	t. de Inducción
1	0.5	20	TB	ON
2	1.0	20	TB	ON
3	1.0	18	TB	ON
4	1.0	37	TB	3hrs

4.5. Generación de un suero policlonal contra rEg2DBDg1

La proteína rEg2DBDg1 purificada a partir de la fracción insoluble fue utilizada para generar un suero policlonal contra dicha proteína en ratón, como se describe en la sección 3.5. de materiales y métodos. El protocolo de inmunización se llevó a cabo con la colaboración de la Dra. L. Canclini en el Departamento de Genética (IIBCE). El suero obtenido fue analizado mediante *Western Blot* (Figura 21), el mismo reconoce a la proteína recombinante de 64,6 kDa aproximadamente, pero también marca proteínas de menor masa molecular que se encuentran contaminando la preparación de rEg2DBDg1 purificada.

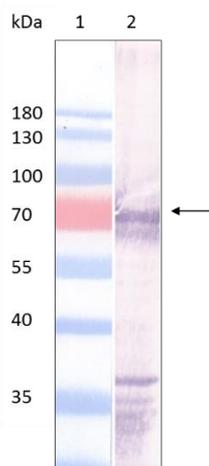


Figura 21. *Western Blot* con suero policlonal contra rEg2DBDg1 a partir de SDS-PAGE 12%. Dilución suero 1/2000, revelado mediante reacción de fosfatasa alcalina. 1) MMM: Page Ruler Prestained (Thermo Fisher), 2) 8 μ g rEg2DBDg1.

5. Discusión

El propósito del presente trabajo fue el estudio de los receptores nucleares (NRs) pertenecientes a la subfamilia 2DBD-NR en *E. granulosus*. A continuación, se discuten los resultados obtenidos en función de los objetivos planteados, y de qué manera estos contribuirán a la construcción del conocimiento sobre los 2DBD-NRs de *E. granulosus*.

En primera instancia el análisis informático del conjunto de 2DBD-NRs en el organismo de estudio reveló la presencia de tres receptores con dos dominios de unión al ADN (DBD). En un principio solo dos de ellos, Eg2DBDg1 y Eg2DBDg2, parecían presentar un primer DBD característico de la subfamilia 2DBD-NR conteniendo la secuencia conservada P-box específica. Sin embargo, al analizar en detalle la secuencia génica del tercer receptor, Eg2DBDg3, se encontró que este también presenta la secuencia P-box característica de la subfamilia 2DBD-NR. Esta discrepancia parecería ser entonces un error de anotación de la secuencia en la base de datos. A su vez, los tres receptores identificados comparten con la mayoría de los miembros de la subfamilia NR1 una segunda secuencia conservada P-box en el segundo DBD, sugiriendo una posible relación funcional o evolutiva con receptores de la subfamilia NR1 (Wu, et al., 2007). Con respecto al dominio de unión al ligando (LBD), los tres receptores presentan mayor conservación de secuencia a nivel del motivo I característico del LBD, que a nivel del motivo II. Estos resultados en conjunto son concordantes con los encontrados para otros receptores de la subfamilia 2DBD-NR (Wu y LoVerde, 2011).

De los tres NRs identificados, únicamente se logró amplificar la región de interés (desde el segundo DBD hasta el codón de terminación) para el receptor Eg2DBDg1. Si bien es posible que existan errores en las secuencias anotadas de Eg2DBDg2 y Eg2DBDg3 que dificultaran la hibridación de los cebadores diseñados, resultan también razonables otros escenarios. Por un lado, considerando que el ADNc sintetizado representa el conjunto de genes transcritos, es posible que estos receptores no estén siendo transcritos y, por lo tanto, no sean expresados en la etapa larval de protoescólices, a partir de la cual fue extraído el material de partida. Por otro lado, ha sido reportado para *E. granulosus* que en la etapa de protoescólices el 33% de los genes son objeto de empalme alternativo (Liu, et al., 2017), por lo cual también es factible que los genes correspondientes a Eg2DBDg2 y Eg2DBDg3 sufran un proceso de este tipo, en cuyo caso las regiones para las cuales fueron diseñados los cebadores podrían encontrarse ausentes.

Asimismo, la secuencia del fragmento de ADNc amplificado, que codifica para rEg2DBDg1 desde el segundo DBD hasta el codón de terminación, presentó algunas diferencias con respecto a la secuencia anotada en la base de datos para Eg2DBDg1. Dado que la ADN polimerasa utilizada en esta etapa es una enzima de alta fidelidad por su actividad correctora de pruebas, es poco probable que estos cambios sean atribuibles a un error de la enzima, consideramos entonces que pueden deberse a la presencia de una isoforma de Eg2DBDg1. Entre estas diferencias, cuatro representan un cambio de aminoácido, T313M, M671T, P797S y P808S, mientras que en la posición 502 se observó la ausencia de 22 aminoácidos. Esta última modificación, así como la ubicada en la posición 313, se encuentran en la región bisagra. Por otro lado, 671 se ubica en el LBD, mientras que 797 junto con 808 se hallan en el dominio C-terminal, luego del LBD. Tras el análisis de la estructura génica de Eg2DBDg1, se identificó que los 22 aminoácidos ausentes desde la posición aminoácida 502 son codificados por el extremo 3' del quinto exón, representando un empalme con la utilización de un sitio 5' alternativo. Los eventos de empalme alternativo pueden ser comúnmente clasificados en siete tipos: retención de intrón (RI), omisión de exón (OE), sitio 3' alternativo (3'A), sitio 5' alternativo (5'A), primer exón alternativo (PEA), último exón alternativo (UEA) y exón mutuamente exclusivo (EME) (Black, 2003). A su vez, se ha estudiado que los patrones generales de empalme alternativo varían entre especies, tejidos y etapas del desarrollo (Gibilisco, et al., 2016; Wang, et al., 2008). Para *E. granulosus*, en la etapa larval de protoescolices, la proporción de los siete eventos de empalme alternativo es la que sigue: RI 39%, 5'A 21%, 3'A 17%, OE 16%, PEA 4%, UEA 2% y EME 1% (Liu, et al., 2017). Con lo cual, el tipo de evento de empalme alternativo (5'A) que podría estar ocurriendo en la posición 502 de Eg2DBDg1 es uno de los más frecuentes en esta etapa del desarrollo del parásito en estudio.

Con respecto al clonado del ADNc para rEg2DBDg1 en el vector de expresión pET-22b(+), los resultados obtenidos por el servicio de secuenciación permitieron verificar su inserción en el plásmido manteniendo el marco de lectura correcto para su posterior traducción, así como la secuencia del fragmento clonado.

Frente al objetivo de producir una proteína recombinante, uno de los primeros aspectos a considerar es la elección del sistema de expresión a utilizar. Uno de los sistemas de expresión mayormente utilizados para la expresión de proteínas heterólogas es *Escherichia coli*. Presenta numerosas ventajas, como su rápida cinética de crecimiento (Sezonov, et al., 2007), medios de cultivo con bajo costo, amplio conocimiento sobre su genética y fisiología (Sorensen y Mortensen, 2005), así como una gran variedad de vectores de expresión con diferentes características (Rosano y Ceccarelli, 2014). Los

vectores pET son especialmente diseñados para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. Particularmente, el vector utilizado en este trabajo, pET-22b(+), posee un fuerte promotor transcripcional inducible (T7), junto al cual es clonado el gen de interés. Además, incluye un gen de resistencia a ampicilina y una secuencia codificante para un trecho de Histidinas que puede ser utilizado para purificar la proteína recombinante por IMAC. La expresión con el sistema pET se realiza en una cepa huésped lisogeno DE3 que contienen el gen para la enzima T7 ARN polimerasa bajo el control del promotor inducible por IPTG lacUV5. Algunas cepas de *E. coli* contienen además el plásmido pLysS, que mediante la expresión de lisozima T7 inhibe la T7 ARN polimerasa basal, con lo cual se reduce la expresión basal de los genes recombinantes.

Si bien no existe una estrategia consenso que asegure la expresión exitosa de una proteína recombinante, el ajuste de parámetros como la concentración de inductor, la temperatura y tiempos de inducción han demostrado variar significativamente los niveles de expresión (Rosano y Ceccarelli, 2014). En base a ello, como primera estrategia, se realizaron varios ensayos de expresión utilizando la cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformada con el plásmido recombinante pET-22b(+)/Eg2DBDg1cl. Sin embargo, como fue descrito anteriormente, bajo ninguna de las condiciones ensayadas fue posible expresar eficazmente rEg2DBDg1 en este sistema.

No obstante a la robustez general del sistema elegido, existen una variedad de factores relacionados a la eficiencia del proceso de expresión del gen de interés que pueden impedir la obtención de una proteína recombinante. La degradación del ARNm transcrito es uno de los factores que afecta los niveles de expresión génica, aunque su estabilidad puede ser mejorada mediante la adición de secuencias 5' 0 3' protectoras de exonucleasas (Sorensen y Mortensen, 2005). A su vez, la expresión de proteínas eucariotas en sistemas procariotas presenta el potencial problema del diferente uso de codones. El uso de codones en *E. coli* se refleja en el nivel de tRNAs análogos disponibles en el citoplasma. En este sentido, pueden producirse errores en la traducción del gen recombinante resultado del estancamiento ribosomal que se produce en posiciones que requieren la incorporación de aminoácidos con tRNAs escasos (McNulty, et al., 2003; Novoa y Ribas de Pouplana, 2012). Esta deficiencia puede llevar a la incorporación errónea de aminoácidos, cambios en el marco de lectura o incluso la terminación prematura de la traducción (Gustafsson, et al., 2004). La solución a este inconveniente sigue habitualmente dos estrategias: la optimización de los codones de la secuencia del ADNc clonado o el aumento de la disponibilidad de los tRNAs sub-representados por modificación del hospedero (Rosano y Ceccarelli, 2014).

Por consiguiente, se analizó la presencia de codones raros en *E. coli* a lo largo del fragmento de ADNc clonado (Eg2DBDg1cl) en el vector de expresión. Se encontró la presencia de dos codones raros AGG y CTA, con frecuencias de 7% y 6%, respectivamente. A su vez, se evaluó la adaptabilidad relativa, encontrándose que los dos codones con menor adaptabilidad relativa fueron AGG (23%) y CTA (16%). De manera que, se decidió abordar una segunda estrategia de expresión mediante la utilización de la cepa Rosetta(DE3) de *E. coli* que suplementa, a través del plásmido pRARE, tRNAs para los codones AGG, AGA, AUA, CUA, CCC y GGA.

En relación al sistema de expresión pET-22b(+)/Eg2DBDg1cl – Rosetta(DE3), en este caso fue posible expresar la proteína de interés, rEg2DBDg1, aunque solamente en forma insoluble. El desequilibrio entre la agregación proteica y la solubilización lleva a la formación de cuerpos de inclusión, a partir de los cuales puede purificarse la proteína de interés. Sin embargo, las proteínas en cuerpos de inclusión deben ser completamente desnaturalizadas (por ej., mediante el agregado de urea), lo cual implica que, para ser funcionales, deben ser re-plegadas tras la remoción del desnaturalizante, representando un proceso potencialmente complejo y que depende de la proteína en cuestión (Singh y Panda, 2005). En este sentido, es preferida la expresión de la proteína soluble en el citoplasma por sobre su expresión en cuerpos de inclusión. Una estrategia para minimizar la formación de cuerpos de inclusión es disminuir la tasa de producción proteica, permitiendo que el plegamiento ocurra a un ritmo más apropiado al aparato de plegamiento bacteriano (Rosano y Ceccarelli, 2014). Ha sido demostrado que la variación en las condiciones de cultivo, especialmente la incubación a bajas temperaturas, entre 15 – 25°C, mejora notoriamente el correcto plegamiento de la proteína recombinante y reduce su agregación (Vera, et al., 2007). Lamentablemente, los resultados obtenidos para los ensayos de inducción de pET-22b(+)/Eg2DBDg1cl – Rosetta(DE3) realizados a bajas temperaturas (18 y 20°C) no fueron exitosos, no pudiéndose detectar la expresión de rEg2DBDg1 soluble.

El análisis de la purificación de la fracción proteica soluble inducida a 18°C reveló la expresión de una proteína de *E. coli* identificada como la chaperona GroEL. Perteneciente a la familia de las chaperonas Hsp60, GroEL posee actividad ATPasa y participa en el proceso de plegamiento proteico (Hayer-Hartl, et al., 2016). Esta proteína no solo es retenida por la columna de purificación His-Trap, sino que eluye a igual concentración de imidazol (100 mM) que rEg2DBDg1 y posee un patrón de migración electroforético similar. Por este motivo, en el caso de que rEg2DBDg1 fuera expresada soluble, rastrear su expresión mediante SDS-PAGE presenta un desafío. De todas maneras, si rEg2DBDg1 fuera co-purificada junto con GroEL, algunos métodos podrían

aplicarse para su remoción, como por ejemplo, la utilización durante la cromatografía de afinidad de una solución tampón de lavado suplementada con ATP (Rohman y Harrison-Lavoie, 2000; Thain, et al., 1996).

Si bien la utilización de cepas de *E. coli*, como Rosetta (DE3), diseñadas para subsanar la deficiencia de tRNAs en el hospedero, a menudo mejora los niveles de expresión de muchas proteínas recombinantes y es una herramienta sencilla y rápida, no deja de tener sus contrapartidas. En el caso de algunas proteínas, su uso ha sido relacionado a una disminución en la solubilidad de la proteína recombinante (Rosano y Ceccarelli, 2009). A su vez, este sistema no corrige otros factores que también pueden afectar la producción proteica como la estabilidad del ARNm.

En este sentido, pueden continuarse varios caminos que permitan mejorar la expresión de rEg2DBDg1 en el futuro. Por un lado, existen plataformas comerciales que ofrecen la optimización de la secuencia del gen de interés para su expresión en *E. coli*. Estos servicios optimizan una mayor cantidad de parámetros críticos involucrados en la expresión proteica, como ser: el sesgo en el uso de codones del hospedero, contenido GC de la secuencia, estructura secundaria del ARNm y su estabilidad, elementos cis-reguladores y sitios de pausas traduccionales, entre otros. Por otro lado, los receptores nucleares son proteínas que pueden ser objeto de diversas modificaciones postraduccionales, lo cual se relaciona con su correcta funcionalidad y puede afectar la solubilidad de la proteína recombinante. De modo que, la expresión en un hospedero eucariota, capaz de realizar algunas de estas modificaciones, es una estrategia que no debería descartarse.

No obstante, la proteína recombinante obtenida en esta instancia, rEg2DBDg1, purificada a partir de la fracción insoluble, fue utilizada para la elaboración de un suero policlonal contra dicha proteína. El suero policlonal obtenido reconoce eficazmente a rEg2DBDg1, sin embargo también reconoce otras proteínas de *E. coli* de menor tamaño molecular, que probablemente se encuentran contaminando la preparación de rEg2DBDg1. El reconocimiento de proteínas de *E. coli* puede ser minimizado purificando el suero policlonal mediante la depleción de anticuerpos contra proteínas de *E. coli* (Alvite, 2014). Adicionalmente, la pureza del suero policlonal obtenido puede ser mejorada a través de la precipitación de IgGs (Oppermann, 1992). En este sentido, también es posible mejorar la estrategia de purificación de rEg2DBDg1 realizando por ejemplo cromatografía de gel filtración posteriormente a la de afinidad para así obtener rEg2DBDg1 con mayor grado de pureza.

6. Conclusión y perspectivas

Con respecto a los ensayos realizados y resultados obtenidos puede concluirse que se avanzó en el camino hacia la caracterización de los receptores nucleares pertenecientes a la subfamilia 2DBD-NR en *E. granulosus*. Siendo uno de ellos, Eg2DBDg1, identificado en la etapa larval de protoesclólices. El ADNc codificante para Eg2DBDg1, desde el segundo DBD hasta el codón de terminación, fue clonado y expresado en *E. coli*. Producto de ello, se obtuvo un suero policlonal capaz de reconocer la proteína recombinante rEg2DBDg1, que será de gran utilidad en futuros ensayos de interacción de proteínas. Resulta claro que se deberá ahondar en nuevas estrategias hacia la producción de rEg2DBDg1 soluble, para su utilización en ensayos funcionales que así lo requieran. El receptor nuclear Eg2DBDg1 identificado en este trabajo representa el primer NR 2DBD de *E. granulosus* purificado hasta el momento.

Cabe destacar que los conocimientos y herramientas generadas en este trabajo nos permitirán abordar preguntas más complejas relacionadas a la función biológica de este nuevo grupo de NRs en *E. granulosus*. Nos proponemos en un futuro llevar adelante la caracterización del receptor nuclear Eg2DBDg1, perteneciente a la subfamilia 2DBD-NR, mediante diferentes estrategias que describiré brevemente a continuación.

En primer lugar, es de nuestro interés identificar a las proteínas que interactúan con Eg2DBDg1 y comenzar a definir la estructura cuaternaria de esta proteína. Para lograr este cometido, pensamos utilizar el sistema híbrido de levadura y el sistema *in vitro* de ensayos de captura de ligandos para analizar la capacidad de interacción, ya sea para formar homodímeros o heterodímeros (Wu, et al., 2007). Además, el suero generado nos permitirá analizar la posible interacción Eg2DBDg1-EgFABP1 a nivel nuclear mediante inmunohistoquímicas electrónicas de transmisión dobles. Para esto, contamos con un anticuerpo policlonal específico contra rEgFABP1 generado en conejo y podrían utilizarse anticuerpos secundarios contra IgG de conejo y ratón acoplados a partículas de oro de diferente tamaño. A su vez, otra estrategia que podría abordarse para analizar la interacción de estas proteínas es la resonancia plasmónica de superficie (Biacore).

El segundo punto a abordar implica la búsqueda de posibles ligandos de Eg2DBDg1 mediante dos aproximaciones diferentes. La primera contempla estudios *in silico* donde planeamos realizar simulaciones dinámicas de las distintas estructuras que adoptaría dicho NR al acoplarse a diversos ligandos y medir las energías de interacción respectivas (Esteves et Paulino, 2013). La segunda estrategia involucra un sistema *in vivo* de doble híbrido de levadura modificado, donde los transformantes dobles se

incubarán en presencia de ligandos potenciales (Kakizawa et al., 1997; Oftedal, et al., 2005) incluyendo al suero bovino (Förster et al., 2011).

El tercer aspecto a estudiar involucra la descripción de la capacidad de unión de Eg2DBDg1 al ADN a través de ensayos de cambio de movilidad electroforética en gel (EMSA) utilizando oligonucleótidos marcados de manera no radioactiva con moléculas de emisión en el infrarrojo (Guggeri, 2012).

Por último, nos proponemos profundizar con respecto a la expresión en protoescólices de los tres receptores nucleares 2DBD encontrados en la base de datos de *E. granulosus* (Eg2DBDg1, Eg2DBDg2 y Eg2DBDg3). Así pues, nos planteamos cuantificar y comparar sus niveles de expresión mediante RT-PCR en tiempo real.

De esta manera queremos aproximarnos a la respuesta de la gran pregunta que interroga las posibles funciones biológicas de Eg2DBDg1, comenzando a descifrar la vía regulatoria donde interviene. A su vez, la información recabada a partir de estos estudios futuros generará las bases para la evaluación de Eg2DBDg1 como candidato a blanco terapéutico, ya que del conocimiento de las proteínas con que interacciona, de sus ligandos, de sus reguladores y efectores, podrían surgir estrategias terapéuticas nuevas para combatir la Echinococcosis quística.

7. Referencias

- Alvite, G. (2014). FABPs de cestodos: interacciones y destinos. *Tesis de Doctorado, PEDECIBA, UDELAR*. Uruguay.
- Alvite, G., & Esteves, A. (2012). Lipid binding proteins from parasitic platyhelminthes. *Frontiers in Physiology*, 3, 363. doi:10.3389/fphys.2012.00363
- Alvite, G., & Esteves, A. (2016). Echinococcus granulosus fatty acid binding proteins subcellular localization. *Experimental Parasitology*, 1641-4. doi:10.1016/j.exppara.2016.02.002
- Alvite, G., Di Pietro, S. M., Santome, J. A., Ehrlich, R., & Esteves, A. (2001). Binding properties of Echinococcus granulosus fatty acid binding protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1533(3), 293-302. doi:10.1016/S1388-1981(01)00164-0
- Aranda, A., & Pascual, A. (2001). Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiological Reviews*, 81(3), 1269-304.
- Barrett, J., & Körting, W. (1976). Studies on beta-oxidation in the adult liver fluke Fasciola hepatica. *International Journal for Parasitology*, 6(2), 155-157. doi:10.1016/0020-7519(76)90073-4
- Beato, M. (1991). Transcriptional control by nuclear receptors. *The Official Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 5(7), 2044–2051.
- Black, D. L. (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annual Review of Biochemistry*, 72, 291–336. doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161720
- Börchers, T., Unterberg, C., Rüdell, H., Robenek, H., & Spener, F. (1989). Subcellular distribution of cardiac fatty acid-binding protein in bovine heart muscle and quantitation with an enzyme-linked immunosorbent assay. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1002, 54-61. doi:10.1016/0005-2760(89)90063-5
- Bourguet, W., Germain, P., & Gronemeyer, H. (2000). Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends In Pharmacological Sciences*, 21(10), 381-388. doi:10.1016/S0165-6147(00)01548-0
- Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H., & Moras, D. (1995). Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. *Nature*, 375(6530), 377-382. doi:10.1038/375377a0
- Burris, T. P., Solt, L. A., Wang, Y., Crumbley, C., Banerjee, S., Griffett, K., & Kojetin, D. J. (2013). Nuclear receptors and their selective pharmacologic modulators. *Pharmacological Reviews*, 65(2), 710-778. doi:10.1124/pr.112.006833
- Busto Bea, V., Barrio Andrés, J., & Almohalla Álvarez, C. (2016). Liver hydatid disease: Still a problem. *Medicina Clinica*, 146(8), 367-371. doi:10.1016/j.medcli.2015.12.005

- Deplazes, P., Rinaldi, L., Alvarez Rojas, C. A., Torgerson, P. R., Harandi, M. F., Romig, T., . . . Jenkins, E. (2017). Chapter Six - Global Distribution of Alveolar and Cystic Echinococcosis. *Advances in Parasitology*, *95*, 315-493. doi:org/10.1016/bs.apar.2016.11.001
- Eckert, J., Gemmell, M. A., Meslin, F., & Pawłowski, Z. S. (2001). *WHO/OIE manual on echinococcosis in humans and animals : a public health problem of global concern*. Paris, France: World Organisation for Animal Health.
- Escriva, H., Safi, R., Hänni, C., Langlois, M. C., Saumitou-Laprade, P., Stehelin, D., & Laudet, V. (1997). Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, *93*(13), 6803-6808.
- Esteves, A., & Ehrlich, R. (2006). Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins. *Comparative Biochemistry And Physiology, Part C*, *142*(3-4), 262-274. doi:10.1016/j.cbpc.2005.11.006
- Esteves, A., & Paulino, M. (2013). In silico studies of Echinococcus granulosus FABPs. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *31*(2), 224-239. doi:10.1080/07391102.2012.698246
- Esteves, A., Dallagiovanna, B., & Ehrlich, R. (1993). A developmentally regulated gene of Echinococcus granulosus codes for a 15.5-kilodalton polypeptide related to fatty acid binding proteins. *Molecular & Biochemical Parasitology*, *58*(2), 215-222. doi:10.1016/0166-6851(93)90043-W
- Esteves, A., Portillo, V., & Ehrlich, R. (2003). Genomic structure and expression of a gene coding for a new fatty acid binding protein from Echinococcus granulosus. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1631*(1), 26-34. doi:10.1016/S1388-1981(02)00321-9
- Evans, R. (2005). The nuclear receptor superfamily: A Rosetta stone for physiology. *Molecular Endocrinology*, *19*(6), 1429-1438. doi:10.1210/me.2005-0046
- Evans, R. M., & Mangelsdorf, D. J. (2014). Nuclear receptors, RXR, and the big bang. *Cell*, *157*(1), 255-266. doi:10.1016/j.cell.2014.03.012
- Förster, S., Günthel, D., Kiss, F., & Brehm, K. (2011). Molecular characterisation of a serum-responsive, DAF-12-like nuclear hormone receptor of the fox-tapeworm Echinococcus multilocularis. *Journal of Cellular Biochemistry*, *112*(6), 1630-1642. doi:10.1002/jcb.23073
- Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., & Laudet, V. (2006). Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors. *Pharmacological Reviews*, *58*(4), 685-704. doi:10.1124/pr.58.4.2
- Gibilisco, L., Zhou, Q., Mahajan, S., & Bachtrog, D. (2016). Alternative splicing within and between Drosophila species, sexes, tissues, and developmental stages. *PLoS Genetics*, *12*(12), e1006464. doi:10.1371/journal.pgen.1006464
- Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J., Argos, P., & Chambon, P. (1985). Human oestrogen receptor cDNA: Sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*, *320*(6058), 134-139. doi:10.1038/320134a0

- Guggeri, L. (2012). Estudio de los repetidos (TG) como elementos en cis en *Trypanosoma cruzi*. *Tesis de Maestria, PEDECIBA, UDELAR*. Uruguay.
- Gustafsson, C., Govindarajan, S., & Minshull, J. (2004). Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology*, 22, 346-353. doi:10.1016/j.tibtech.2004.04.006
- Gustafsson, J. A. (2016). Historical overview of nuclear receptors. *Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology*, 1573-6. doi:10.1016/j.jsbmb.2015.03.004
- Hayer-Hartl, M., Bracher, A., & Hartl, F. U. (2016). The GroEL–GroES Chaperonin Machine: A Nano-Cage for Protein Folding. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(1), 62-76. doi:10.1016/j.tibs.2015.07.009
- Helledie, T., Antonius, M., Sorensen, R. V., Hertzelt, A. V., Bernlohr, D. A., Kølvrå, S., & Mandrup, S. (2000). Lipid-binding proteins modulate ligand-dependent transactivation by peroxisome proliferator-activated receptors and localize to the nucleus as well as the cytoplasm. *Journal Of Lipid Research*, 41(11), 1740-1751.
- Hollenberg, S., Weinberger, C., Ong, E., Cerelli, G., Oro, A., Evans, R., & Brad Thompson, E. (1985). Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature*, 318(6047), 635-641. doi:10.1038/318635a0
- Hostetler, H. A., McIntosh, A. L., Atshaves, B. P., Storey, S. M., Payne, H. R., Kier, A. B., & Schroeder, F. (2009). L-FABP directly interacts with PPARalpha in cultured primary hepatocytes. *Journal Of Lipid Research*, 50(8), 1663-1675. doi:10.1194/jlr.M900058-JLR200
- Jacobsen, N. S., & Fairbairn, D. (1967). Lipid metabolism in helminth parasites. III. Biosynthesis and interconversion of fatty acids by *Hymenolepis diminuta* (Cestoda). *Journal of Parasitology*, 53(2), 355-361.
- Jakobsson, E., Alvite, G., Bergfors, T., Esteves, A., & Kleywegt, G. J. (2003). The crystal structure of *Echinococcus granulosus* fatty-acid-binding protein 1. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1649(1), 40-50. doi:10.1016/S1570-9639(03)00151-1
- Kakizawa, T., Miyamoto, T., Kaneko, A., Yajima, H., Ichikawa, K., & Hashizume, K. (1997). Ligand-dependent heterodimerization of Thyroid Hormone Receptor and Retinoid X Receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 23799-23804. doi:10.1074/jbc.272.38.23799
- Kojetin, D. J., & Burris, T. P. (2013). Small molecule modulation of nuclear receptor conformational dynamics: implications for function and drug discovery. *Molecular Pharmacology*, 83(1), 1-8. doi:10.1124/mol.112.079285
- Laudet, V. (1997). Evolution of the nuclear receptor superfamily: Early diversification from an ancestral orphan receptor. *Journal Of Molecular Endocrinology*, 19(3), 207-226. doi:10.1677/jme.0.0190207
- Laudet, V., & Gronemeyer, H. (2002). *The Nuclear Receptor FactsBook*. San Diego: Academic Press.

- Lee, M., Sem, D., Wright, P., Kliewer, S., Provencal, J., & Evans, R. (1994). NMR Assignments and Secondary Structure of the Retinoid X Receptor α DNA-binding Domain: Evidence for the Novel C-terminal Helix. *European Journal Of Biochemistry*, 224(2), 639-650. doi:10.1111/j.1432-1033.1994.00639.x
- Liu, S., Zhou, X., Hao, L., Piao, X., Hou, N., & Chen, Q. (2017). Genome-Wide Transcriptome Analysis Reveals Extensive Alternative Splicing Events in the Protoscoleces of *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 929. doi:10.3389/fmicb.2017.00929
- Luisi, B., Xu, W., Otwinowski, Z., Sigler, P., Freedman, L., & Yamamoto, K. (1991). Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature*, 352(6335), 497-505. doi:10.1038/352497a0
- McIntosh, A., Petrescu, A., Hostetler, H., Kier, A., & Schroeder, F. (2013). Liver-type fatty acid binding protein interacts with hepatocyte nuclear factor 4 α . *FEBS Letters*, 587(23), 3787-3791. doi:10.1016/j.febslet.2013.09.043
- McNulty, D., Claffee, B., Huddleston, M., & Kane, J. (2003). Mistranslational errors associated with the rare arginine codon CGG in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 27(2), 365–374. doi:10.1016/S1046-5928(02)00610-1
- Meyer, F., Kimura, S., & Mueller, J. L. (1966). Lipid metabolism in the larval and adult forms of the tapeworm *Spirometra mansonioides*. *The Journal of Biological Chemistry*, 241(18), 4224-4232.
- Moras, D., & Gronemeyer, H. (1998). The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Current Opinion In Cell Biology*, 10(3), 384-391. doi:10.1016/S0955-0674(98)80015-X
- Nagy, L., & Schwabe, J. (2004). Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends In Biochemical Sciences*, 29(6), 317-324. doi:10.1016/j.tibs.2004.04.006
- Navarro, A., Pavletic, C., Gavidia, C., Ferreira, C., Caldas, E., Guarnera, E., . . . Del Rio, V. (2015). *Equinococosis Quística: Informe Epidemiológico en la Región de América del Sur - 2009-2014*. Veterinary Public Health - PANAFTOSA - PHAO/WHO.
- Novoa, E. M., & Ribas de Pouplana, L. (2012). Speeding with control: codon usage, tRNAs, and ribosomes. *Trends in Genetics*, 28(11), 574-581. doi:10.1016/j.tig.2012.07.006.
- Nuclear Receptor Nomenclature Committee. (1999). A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*, 97(2), 161–163.
- Oftedal, B. E., Ladstein, S., Telle, W., & Male, R. (2005). Ligand-Dependent Protein Interactions of the Estrogen Receptors Using the Yeast Two-Hybrid System. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1040(1), 420–425. doi:10.1196/annals.1327.079
- Oppermann, M. (1992). Purified monoclonal antibodies and producing antibody fragments. In J. H. Peters, & H. Baumgarten (Eds.), *Monoclonal Antibodies* (pp. 258-261). Berlin: Springer Verlag.

- Pavletic, C. F., Larrieu, E., Guarnera, E. A., Casas, N., Irabedra, P., Ferreira, C., & et., a. (2017). Cystic echinococcosis in South America: a call for action. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 41:e42.
- Porfido, J. L., Alvite, G., Silva, V., Kennedy, M. W., Esteves, A., & Corsico, B. (2012). Direct interaction between EgFABP1, a fatty acid binding protein from *Echinococcus granulosus*, and phospholipid membranes. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 6(11), e1893. doi:10.1371/journal.pntd.0001893
- Rastinejad, F., Huang, P., Chandra, V., & Khorasanizadeh, S. (2013). Understanding nuclear receptor form and function using structural biology. *Journal Of Molecular Endocrinology*, 51(3), T1-T21. doi:10.1530/JME-13-0173
- Rohman, M., & Harrison-Lavoie, K. J. (2000). Separation of Copurifying GroEL from Glutathione-S-Transferase Fusion Proteins. *Academic Press*, 20(1), 45-47. doi:1046-5928/00
- Romig, T., Ebi, D., & Wassermann, M. (2015). Taxonomy and molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus sensu lato*. *Veterinary Parasitology*, 213(3–4), 76–84.
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2009). Rare codon content affects the solubility of recombinant proteins in a codon bias-adjusted *Escherichiacoli* strain. *Microbial Cell Factories*, 8, 41. doi:10.1186/1475-2859-8-41
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5, 172. doi: 10.3389/fmicb.2014.00172
- Santos, R., Ursu, O., Gaulton, A., Bento, A. P., Donadi, R. S., Bologa, C. G., & Overington, J. P. (2017). A comprehensive map of molecular drug targets. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 16(1), 19-34. doi:10.1038/nrd.2016.230
- Schwabe, J., Chapman, L., Finch, J., & Rhodes, D. (1993). The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: How receptors discriminate between their response elements. *Cell*, 75(3), 567-578. doi:10.1016/0092-8674(93)90390-C
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., & D'Ari, R. (2007). *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *Journal of Bacteriology*, 189(23), 8746–8749. doi:10.1128/JB.01368-07
- Shu, L., Hoo, R. L., Wu, X., Pan, Y., Lee, I. P., Cheong, L. Y., & Xu, A. (2017). A-FABP mediates adaptive thermogenesis by promoting intracellular activation of thyroid hormones in brown adipocytes. *Nature Communications*, 8, 14147. doi:10.1038/ncomms14147
- Singh, S. M., & Panda, A. K. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Biosciences and Bioengineering*, 99(4), 303-310. doi:10.1263/jbb.99.303
- Smith, B., Thompson, B., Sanders, M., & Bernlohr, D. (2007). Interaction of the adipocyte fatty acid-binding protein with the hormone-sensitive lipase: Regulation by fatty acids and phosphorylation. *Journal Of Biological Chemistry*, 282(44), 32424-32432. doi:10.1074/jbc.M703730200

- Smyth, J. D., & McManus, D. P. (1989). The adult: general metabolism and chemical composition. In *The Physiology and Biochemistry of Cestodes* (p. 53e76). Cambridge: Cambridge University Press.
- Sorensen, H. P., & Mortensen, K. K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, *115*(2), 113–128. doi:10.1016/j.jbiotec.2004.08.004
- Storch, J., & Thumser, A. E. (2010). Tissue-specific functions in the fatty acid-binding protein family. *The Journal Of Biological Chemistry*, *285*(43), 32679-83. doi:10.1074/jbc.R110.135210
- Tan, N., Shaw, N., Vinckenbosch, N., Liu, P., Yasmin, R., Desvergne, B., . . . Noy, N. (2002). *Molecular and Cellular Biology*, *22*(14), 5114-5127. doi:10.1128/MCB.22.14.5114-5127.2002
- Thain, A., Gaston, K., Jenkins, O., & Clarkie, A. R. (1996). A method for the separation of GST fusion proteins from co-purifying GroEL. *Trends in genetics*, *12*(6), 209-210. doi:10.1016/S0168-9525(96)90022-0
- Tharp, M. E., Collins, J. J., & Newmark, P. A. (2014). A lophotrochozoan-specific nuclear hormone receptor is required for reproductive system development in the planarian. *Developmental Biology*, *396*(1), 150-157. doi:10.1016/j.ydbio.2014.09.024
- Thompson, R. C. (1995). *Biology and systematic of Echinococcus and Hydatid disease*. UK: Thompson R.C.A and Laymbery, A.J. (eds). CAB International Wallingford, Oxen.
- Thompson, R. C., & Jenkins, D. J. (2014). Echinococcus as a model system: biology and epidemiology. *International Journal for Parasitology*, *44*(12), 865-877. doi:10.1016/j.ijpara.2014.07.005
- Vera, A., Gonzalez-Montalban, N., Aris, A., & Villaverde, A. (2007). The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures. *Biotechnology and Bioengineering*, *96*(6), 1101–1106. doi:10.1002/bit.21218
- Wang, E. T., Sandberg, R., Luo, S., Khrebtkova, I., Zhang, L., Mayr, C., . . . Burge, C. B. (2008). Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*, *456*(7221), 470–476. doi:doi.org/10.1038/nature07509
- Wang, L. H., Tsai, S. Y., Cook, R. G., Beattie, W. G., Tsai, M. J., & O'Malley, B. W. (1989). COUP transcription factor is a member of the steroid receptor superfamily. *Nature*, *340*(6229), 163-166. doi:10.1038/340163a0
- Wang, Z., Schaffer, N. E., Kliewer, S. A., & Mangelsdorf, D. J. (2017). Nuclear receptors: emerging drug targets for parasitic diseases. *Journal Of Clinical Investigation*, *127*(4), 1165-1171. doi:10.1172/JCI88890
- Ward, C., & Fairbairn, D. (1970). Enzymes of beta-oxidation and the tricarboxylic acid cycle in adult *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) and *Ascaris lumbricoides* (Nematoda). *The Journal of Parasitology*, *56*(5), 1009-1012.
- WHO. (2017). *Echinococcosis Fact Sheet*. From World Health Organization: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs377/en/>

- Wu, W., & LoVerde, P. T. (2011). Review: Nuclear hormone receptors in parasitic helminths. *Molecular And Cellular Endocrinology*, 334(1), 56-66. doi:10.1016/j.mce.2010.06.011
- Wu, W., Niles, E. G., El-Sayed, N., Berriman, M., & LoVerde, P. T. (2006). *Schistosoma mansoni* (Platyhelminthes, Trematoda) nuclear receptors: Sixteen new members and a novel subfamily. *Gene*, 366(2), 303-315. doi:10.1016/j.gene.2005.09.013
- Wu, W., Niles, E., LoVerde, P., & Hirai, H. (2007). Evolution of a novel subfamily of nuclear receptors with members that each contain two DNA binding domains. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 727-41. doi:10.1186/1471-2148-7-27
- Wurtz, J. M., Bourguet, W., Renaud, J. P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D., & Gronemeyer, H. (1996). A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nature Structural Biology*, 3(1), 87-94. doi:10.1038/nsb0196-87
- Yang, M., Li, J., Wu, J., Wang, H., Guo, B., Wu, C., . . . Zhang, W. (2017). Cloning and characterization of an *Echinococcus granulosus* ecdysteroid hormone nuclear receptor HR3-like gene. *Parasite*, 24, 36. doi:10.1051/parasite/2017037
- Young, B. W., & Podesta, R. B. (1982). Major phospholipids and phosphatidylcholine synthesis in adult *Schistosoma mansoni*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 5(3), 165-172. doi:10.1016/0166-6851(82)90018-4
- Zhang, Z., Burch, P. E., Cooney, A. J., Lanz, R. B., Pereira, F. A., Wu, J., . . . Wheeler, D. A. (2004). Genomic analysis of the nuclear receptor family: new insights into structure, regulation, and evolution from the rat genome. *Genome Research*, 14, 580–590. doi:10.1101/gr.2160004
- Zheng, Y., Blair, D., & Bradley, J. E. (2013). Phyletic distribution of fatty acid-binding protein genes. *Plos One*, 8(10), e77636. doi:10.1371/journal.pone.0077636
- Zilliacus, J., Carlstedt-Duke, J., Gustafsson, J., & Wright, A. P. (1994). Evolution of Distinct DNA-Binding Specificities within the Nuclear Receptor Family of Transcription Factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(10), 4175-4179.

8. Anexos

8.1. Cebadores

Blanco	Nombre	Secuencia	Tm (°C)
	37_PDL_rev	5'-AGCCGTCAGTGCGGAAACAGTCAT-3'	67.0
	37_AVT_Fw	5'-CAGCTTACACGGACGCGAGGA-3'	66.3
	37_UTR-Rev1	5'-CGAGGACGTCAACCATCTACG-3'	63.3
Eg2DBDg1	37_DBD1_Fw	5'-TGTCGGGTCTGCGGTGGACG-3'	66.6
	37_DBD2_Fw	5'-CGTCGGTGGGAAGGACTGCACAAT-3'	73.0
	NdeI_Eg37f	5'-CGCCATATGTGTCTGCGGTGGA-3'	74.4
	XhoI_Eg37r	5'-CCGCTCGAGCGGTTGCGTGGGCGGGTC-3'	80.4
Eg2DBDg2	24_DBD1_Fw	5'-TGCCGCGTTTTGTGGCGCGCA-3'	66.6
	24_REVSTOP	5'-TCACTCGCTCGAATTAACCAA-3'	60.0
Eg2DBDg3	45_DBD1_Fw	5'-ACGACAACCTTTGCACATGTT-3'	60.0
	45_REVSTOP	5'-AAGTCATTCCTGTTGGAATCGTTCC-3'	64.2

8.2. Medios de Cultivo

Medio de cultivo LB: Para 1L – Disolver 15.5 g de Luria Broth, 4.5 g NaCl. Autoclavar.

Medio de cultivo TB: Para 400 mL – 4.8 g de triptona, 9.6 g de extracto de levadura, 1.6 mL de glicerol, disolver en 330 mL de H₂O miliRo. Autoclavar. En condiciones de esterilidad, agregar 40 mL de solución amortiguadora fosfato de potasio KH₂PO₄:K₂HPO₄ (0.17:0.72) M; 200 µL de ampicilina 100 mg/mL, 400 µL de cloranfenicol 34 mg/mL.

Medio de cultivo ZYM: Para 200 mL – Disolver 2 g de triptona, 1 g de extracto de levadura en 187 mL de H₂O miliRo. Agregar 400 µL MgSO₄ 1 M y 40 µL oligoelementos 1000x. Esterilizar en autoclave y enfriar. Agregar en cámara de flujo: 8 mL de solución 5052 25x, 8 mL de solución M 25x, 100 µL ampicilina 100 mg/mL.

Solución 5052 25x: (para 100 mL) pesar y disolver 12.5 g de glicerol, 1.25 g de glucosa, 5 g de lactosa. Disolver en 80 mL de H₂O miliQ, enrazar a 100 mL y autoclavar.

Solución M 25x: (para 100 mL) pesar 8.88 g de Na₂HPO₄, 8.51 g de KH₂PO₄, 1.25 g de NH₄Cl, y 1.77 g de Na₂SO₄. Disolver en 80 mL de agua, enrazar a 100 mL y autoclavar.

8.3. Complemento de Resultados

Alineamiento de las secuencias de ADN de Eg2DBDg1c1 y Eg2DBDg1

```

Eg2DBDg1c1 -----CATATGTCGCGGTC
Eg2DBDg1      AGTCTTAAAGATATGGATGCTCAAGCGAGTTGGACATCTCCAATATTCCATGTCGCGGTC
                *      *
Eg2DBDg1c1      TCGGGTGGACGCTCCTCCGGCTTCCACTTTGGTGTCTCACCTGTGAAGGCTGCAAGGGC
Eg2DBDg1      TCGGGTGGACGCTCCTCCGGCTTCCACTTTGGTGTCTCACCTGTGAAGGCTGCAAGGGC
                *****
Eg2DBDg1c1      TTTTTCGACGAACAGAGGAGTCAAGGCTCGAGACTGGTATGCGTCGGTGGGAAGGACAAC
Eg2DBDg1      TTTTTCGACGAACAGAGGAGTCAAGGCTCGAGACTGGTATGCGTCGGTGGGAAGGACAAC
                *****
Eg2DBDg1c1      TGCACAATCACCCACGTCAGCCGCAATGTCTGCAAGACCTGCAGATTCCGTCGGTGCCTT
Eg2DBDg1      TGCACAATCACCCACGTCAGCCGCAATGTCTGCAAGACCTGCAGATTCCGTCGGTGCCTT
                *****
Eg2DBDg1c1      CGTGCCGGCATGTCCAAACGCGGAAGTCGGATAGGACGTCACCGAACCGCTCAAATTC
Eg2DBDg1      CGTGCCGGCATGTCCAAACGCGGAAGTCGGATAGGACGTCACCGAACCGCTCAAATTC
                *****
Eg2DBDg1c1      CATGTGCCATTGAGATTCGCCAGCTAAAGGACAGTGGACAACCGCTGGCAAGTGATTTTC
Eg2DBDg1      CATGTGCCATTGAGATTCGCCAGCTAAAGGACAGTGGACAACCGCTGGCAAGTGATTTTC
                *****
Eg2DBDg1c1      ACACCTCTACCACGCAAACACAGCTCCGTTCCAACACTGGCCTCCTCCTCCGCTTCGCCC
Eg2DBDg1      ACACCTCTACCACGCAAACACAGCTCCGTTCCAACACTGGCCTCCTCCTCCGCTTCGCCC
                *****
Eg2DBDg1c1      TCGTCATCTTCGCAAACGACCGTGCCTGTTCGGAGGTGGTGTGGTGGAGCTTCCACAGCGC
Eg2DBDg1      TCGTCATCTTCGCAAACGACCGTGCCTGTTCGGAGGTGGTGTGGTGGAGCTTCCACAGCGC
                *****
Eg2DBDg1c1      AGGGCTTCAGCAGGAGCTTTCGACATGGCTGCCTATACTGGGTCAATGCTTCCACGGCGC
Eg2DBDg1      AGGGCTTCAGCAGGAGCTTTCGACATGGCTGCCTATACTGGGTCAATGCTTCCACGGCGC
                *****
Eg2DBDg1c1      AAAGCCTCAGCTCCTGTGAAATGGAGACCAGTCTGTACCACAGATGCCTATCACACCA
Eg2DBDg1      AAAGCCTCAGCTCCTGTGAAATGGAGACTACGCTGTACCACAGATGCCTATCACACCA
                *****
Eg2DBDg1c1      GTCACTGTCTCCGCCCTCCTCATCATCATCGTCAGCGGCGGCAGCTGCTGCGGCAGCA
Eg2DBDg1      GTCACTGTCTCCGCCCTCCTCATCATCATCGTCAGCGGCGGCAGCTGCTGCGGCAGCA
                *****
Eg2DBDg1c1      GCAGCAGCGGCGGCGGCAGCAGTGGCTGGAGTGGTGGGACGGATGAGGAGATTCTGGTG
Eg2DBDg1      GCAGCAGCGGCGGCGGCAGCAGTGGCTGGAGTGGTGGGACGGATGAGGAGATTCTGGTG
                *****
Eg2DBDg1c1      GATGGACTAAATTGGTTCAATTACGGAATGCGCATGGCCATGGAGTTCATGCGACTTCCA
Eg2DBDg1      GATGGACTAAATTGGTTCAATTACGGAATGCGCATGGCCATGGAGTTCATGCGACTTCCA
                *****
Eg2DBDg1c1      GCCAC-----
Eg2DBDg1      GCCACGGTATCTTCGTCCTCATCTCCACCTCAGCCTCCTCAACCATTCTGCATGCCTC
                *****
Eg2DBDg1c1      -----GTACTTCAAATCTCGCTTCGACATGAGCACCATCGAGCCGTACAGGCT
Eg2DBDg1      TTTTATCAACAGTACTTCAAATCTCGCTTCGACATGAGCACCATCGAGCCGTACAGGCT
                *****
Eg2DBDg1c1      GACGATGAACACCAGGTATGGGATCACGTGATGAACCACTTCCATCTTCACTCTCAACAA
Eg2DBDg1      GACGATGAACACCAGGTATGGGATCACGTGATGAACCACTTCCATCTTCACTCTCAACAA
                *****
Eg2DBDg1c1      GTCGTCCAATTCGCTAAGCTGATTCAGGTTTCAATCAGATGAGTTTGTCCGCCAGAGGT
Eg2DBDg1      GTCGTCCAATTCGCTAAGCTGATTCAGGTTTCAATCAGATGAGTTTGTCCGCCAGAGGT
                *****

```

```

Eg2DBDg1c1      CATTGGTGGCAGCAAGCCTTTACTCCGAGGTTTGGCTAATGCTGTCGGGTGATTACGAC
Eg2DBDg1        CATTGGTGGCAGCAAGCCTTTACTCCGAGGTTTGGCTAATGCTGTCGGGTGATTACGAC
*****

Eg2DBDg1c1      GCTGCTGAGGATCGTTACAACCTTCTGGACTTCTCTCCACCGAACGTGATATCGTTCTG
Eg2DBDg1        GCTGCTGAGGATCGTTACAACCTTCTGGACTTCTCTCCACCGAACGTGATATCGTTCTG
*****

Eg2DBDg1c1      CGCCACTTCCCCATCTACAACAGGGTCGTTGAACATCTCAAAATCTCAGGTCGATTTTTTC
Eg2DBDg1        CGCCACTTCCCCATCTACAACAGGGTCGTTGAACATCTCAAAATCTCAGGTCGATTTTTTC
*****

Eg2DBDg1c1      CAACAGCTCAATCTAACTCACACAGAATTCGTCTACGTCTGCGCCATCGGGATTCTTAGA
Eg2DBDg1        CAACAGCTCAATCTAACTCACACAGAATTCGTCTACGTCTGCGCCATCGGGATTCTTAGA
*****

Eg2DBDg1c1      TACTACTATATTCTCGTAAATCCAGCTTACATGGACGCGAGGAAGTTATTGCTCCTGGCC
Eg2DBDg1        TACTACTATATTCTCGTAAATCCAGCTTACATGGACGCGAGGAAGTTATTGCTCCTGGCC
*****

Eg2DBDg1c1      AGGCACTCCCTTCTCGCAACTATGCGCTCACAAAACGAGTCTCAGGAACGGTTGACCAT
Eg2DBDg1        AGGCACTCCCTTCTCGCAACTATGCGCTCACAAAACGAGTCTCAGGAACGGTTGACCAT
*****

Eg2DBDg1c1      AAGTGGAGCCGTCTAGAAGCCATGAGTGAGATGCTTTCATCGATGAGTAGGGAGTATCGA
Eg2DBDg1        AAGTGGAGCCGTCTAGAAGCCATGAGTGAGATGCTTTCATCGATGAGTAGGGAGTATCGA
*****

Eg2DBDg1c1      GAAATCGCACACAATTGCAAAGATCTCGACCAGATTTGCGCTATCCAGACCTCTACGTG
Eg2DBDg1        GAAATCGCACACAATTGCAAAGATCTCGACCAGATTTGCGCTATCCAGACCTCTACGTG
*****

Eg2DBDg1c1      GAGATGTATGAAATCGGGGAAAGTGCTTTCGCGCCACACTCTCTTATGACTGTTTCCGCA
Eg2DBDg1        GAGATGTATGAAATCGGGGAAAGTGCTTTCGCGCCACACTCTCTTATGACTGTTTCCGCA
*****

Eg2DBDg1c1      CTGACGGCTCAGTCCACGACCGATGCCACAACTTGACACATTTTCCATCGGCTTCCACG
Eg2DBDg1        CTGACGGCTCAGTCCACGACCGATGCCACAACTTGACACATTTTCCATCGGCTTCCACG
*****

Eg2DBDg1c1      TTGATTGAGCAGCCAGCTGCTATGCGTCCGTCAGTTCACATGGTGTCCCCCCCCCTTCT
Eg2DBDg1        TTGATTGAGCAGCCAGCTGCTATGCGTCCGTCAGTTCACATGGTGTCCCCCCCCCTTCT
*****

Eg2DBDg1c1      ACAGCACACTGGCCAATCGCGCCGGGTAGCATTAAACCAGAGGATCCCGTGTGGTCCATT
Eg2DBDg1        ACAGCACACTGGCCAATCGCGCCGGGTAGCATTAAACCAGAGGATCCCGTGTGGTCCATT
*****

Eg2DBDg1c1      CAAGATCGCTGGAATGACACCGCCCCGCTATCTCGTCAGCCAATCCCTACCAAATCTCC
Eg2DBDg1        CAAGATCGCTGGAATGACACCGCCCCGCTATCTCGTCAGCCAATCCCTACCAAATCTCC
*****

Eg2DBDg1c1      AACTTTCTAGACTCCACCCACCGCCACGCAACCGCTCGAGCACCACCACCACCACCAC
Eg2DBDg1        AACTTTCTAGACTCCACCCACCGCCACGCAACCGCTCGAGCACCACCACCACCACCAC
*****

```

Figura 22. Se muestran con sombreado en celeste y rosado los sitios de restricción de las enzimas NdeI y XhoI respectivamente, así como el tramo terminal de histidinas en amarillo.

Análisis del uso de codones

Se muestra el estudio completo de adaptabilidad relativa de Eg2DBDg1cl, realizado mediante el programa *gcua 2.0*.

