



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

**Efecto del suero de ternero en la homodimerización del receptor nuclear
Eg2DBD α .1 de *Echinococcus granulosus s.l.***

Manuel Alfonso Sanchez

Tesina de grado
Licenciatura en Bioquímica
Facultad de Ciencias, Universidad de la República (UDELAR)
2023

Tutora: Dra. Gabriela Alvite
Co-tutora: Mag. Valentina Blanco

Dpto. de Biología Celular y Molecular, Sección
Bioquímica

Agradecimientos

Gracias a:

Mis tutoras, Gabriela y Valentina.

Mamá Silvia, papá Vikingo, mis hermanos Diego y Betania.

Abuela Chela.

Duna.

Mis mascotas.

Índice general

Agradecimientos	2
Resumen	5
Abreviaturas	6
1. Introducción	7
1.1 <i>Equinococcus granulosus</i>	7
1.1.1 Ciclo de vida	7
1.1.2 Quiste hidatídico o metacestodo	9
1.1.3 Equinococosis quística (EQ)	9
1.2 Receptores Nucleares	11
1.2.1 Organización estructural modular de los receptores nucleares	12
1.2.2 Clasificación de los NRs	14
1.2.2.1 Subfamilia de receptores nucleares 2DBD	17
1.2.2.2 Receptor nuclear Eg2DBD α .1	18
1.3 Metabolismo de Ácidos Grasos en platelmintos	20
1.4 Suero de ternera de recién nacido (Newborn calf serum NBCS)	21
1.5 Principio de la técnica Doble híbrido de levadura (DHL)	22
1.5.1 Factor de transcripción Gal4	23
1.5.2 Modalidades del DHL	24
1.5.3 Falsos positivos y falsos negativos	26
1.6 Doble híbrido de levadura modificado	26
1.7 Justificación del trabajo	28
1.8 Hipótesis	28
2. Objetivos	29
2.1 Objetivo general	29
2.1.1 Objetivos específicos.	29
3. Materiales y métodos	30
3.1 <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> Y187	30
3.2 Vectores pGBKT7 y pGADT7	32
3.3 Ensayos de co-transformación	32
3.3.1 Cuantificación de ADN	34
3.3.2 Co-transformación mediada por LiAc/PEG/DTT	35
3.3.3 Co-transformación modificada mediada por LiAc/PEG/DTT y DO-Leu-Trp	36
3.3.4 Eficiencia de transformación	37
3.4 Ensayo Doble híbrido de levadura modificado (DHLm)	37
3.4.1 Co-transformación de levaduras e incubación con el ligando	37
3.4.2 Determinación de la actividad β -galactosidasa	39
3.4.3 Cálculo de la actividad de la β -galactosidasa	40
3.5 PCR de colonia	41
3.6 Electroforesis en gel de agarosa 0,8% y 1%	41
4. Resultados y discusión	43
4.1 Co-transformación y eficiencia de transformación	43
4.1.1 Puesta a punto de la Co-transformación	44

4.1.2 Confirmación mediante PCR en colonia	45
4.2 DHLm	47
5. Conclusiones y perspectivas	51
6. Bibliografía	52
7. Anexo	61
7.1 Medio enriquecido YPDA	61
7.2 Medio definido selectivo SD/-Leu/-Trp	61
7.3 Transformación estándar de levadura Y2H	61
7.4 Transformación modificada con DO-Leu-Trp de levadura Y2H	62
7.5 Doble híbrido de levadura modificado	62
7.6 Secuencias	63

Resumen

La equinocosis quística (EQ) es una enfermedad zoonótica parasitaria cosmopolita ocasionada por el cestodo *Echinococcus granulosus sensu lato* que afecta tanto al ganado (hospedero intermediario), como a los cánidos (hospedero definitivo) y accidentalmente a los humanos. Esta patología se caracteriza por la formación de quistes hidatídicos larvarios conteniendo protoescólices, que se desarrollan en los órganos internos de los hospederos.

En busca de moléculas claves para combatir esta enfermedad, se han identificado los receptores nucleares Eg2DBDs que poseen dos dominios de unión al ADN (2DBD). Es interesante que los miembros de esta subfamilia de receptores nucleares sólo se encuentran en algunos invertebrados, no encontrándose en los hospederos del parásito, lo que suscita su relevancia como posibles blancos terapéuticos. Se han identificado a cuatro receptores 2DBD en *E. granulosus* Eg2DBD α , Eg2DBD β y Eg2DBD γ y cuarto Eg2DBD α .1, el cual sería una isoforma de Eg2DBD α .

En este trabajo, se busca arrojar luz sobre las funciones de Eg2DBD α .1 en protoescólices de *Echinococcus granulosus s.l.* Nos propusimos explorar si el suero de ternero recién nacido (NBCS) tiene la capacidad de estimular la homodimerización de este receptor nuclear. Para lograrlo, se emplearon ensayos de doble híbrido de levadura modificado. Estos ensayos se llevaron a cabo luego de co-transformar levadura Y187 con plásmidos que codifican para los dominios E y F de Eg2DBD α .1 y con plásmidos controles positivo y negativo. Después de confirmar la presencia de los plásmidos en las colonias seleccionadas, se evaluó la actividad β -galactosidasa sin y con 5 % de NBCS, la cual es indicativa del grado de homodimerización del receptor.

Aunque los resultados no revelaron un aumento significativo en la actividad enzimática en los ensayos sin y con NBCS, se identificó una tendencia al incremento en las colonias tratadas. Estos indicios sugieren la posibilidad de que algún componente del suero, posiblemente un ácido graso insaturado, estimule la homodimerización de Eg2DBD α .1. Estos hallazgos, si bien tienen que ser confirmados podrían contribuir a la dilucidación de los mecanismos de acción de los receptores Eg2DBDs y a su potencial estudio como blancos para el desarrollo de nuevas drogas antihelmínticas.

Por otra parte, se pudo evaluar una forma de co-transformación de levadura utilizando medio sintético +DO-Leu-Trp que activa la vía endocítica dependiente de TOR1. Se verificó que al adicionar éste medio, aumenta significativamente el número de colonias y la eficiencia de transformación de levaduras, permitiendo hacerlo con menor cantidad de reactivos con respecto al protocolo estándar.

Abreviaturas

AD: activating domain

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARNm: ARN mensajero

Cys: cisteína

DBD: DNA binding domain

DO: densidad óptica

FT: factor de transcripción

H: hélice

Kd: constante de disociación

LBD: ligand binding domain

Leu: leucina

NBCS: new born calf serum

NR: nuclear receptor

PPAR: Peroxisome proliferator activated receptors.

RxR: receptor X retinoide

s: cadena beta

SD/-Leu/-Trp: medio sintético definido sin leucina ni triptofano

SFB: suero fetal bovino

SmRXR: *Schistosoma mansoni* retinoid-X-receptor

Trp: triptófano

YPDA: *Yeast Extract–Peptone–Dextrose–Adenine*

1. Introducción

1.1 *Echinococcus granulosus*

Las tenias de la Familia Taeniida (Filum: Platelmino; Clase: Cestodo; Sub-clase: Eucestoda; Orden: Cyclophyllidae) incluye cuatro generos; *Hydatigera*, *Taenia*, *Versteria* y *Echinococcus* (Thompson, R.C.A., 2017; Nakao et al., 2013).

El género *Echinococcus* es un grupo monofilético que incluye nueve especies dentro del cual está el complejo multi-especie *E. granulosus* en sentido amplio o *sensu lato* (*s.l.*) que abarca cinco especies crípticas (variantes intraespecíficas) que se asocian a nueve genotipos/cepas, basados en secuencias de genes mitocondriales (Vuitton et al., 2020; Lymbery A., 2017). G1-G3 en *E. granulosus sensu stricto* (*s.s.*), G4 en *E. equinus*, G5 en *E. ortleppi* y dentro del grupo *E. canadensis* pueden pasar al estado de especie completo *E. intermedius* para G6/7, *E. borealis* para G8 y *E. canadensis* para G10. G9 no se reconoce como un genotipo distinto, probablemente sea una microvariante de G7. Finalmente *E. felidis* resta por dilucidar el genotipo (Vuitton et al., 2020; Thompson, R., 2017).

1.1.1 Ciclo de vida

Las especies de *Echinococcus granulosus* explotan los sistemas depredador-presa para el mantenimiento de sus ciclos de vida siendo hospederos definitivos miembros del orden Carnivora, principalmente de la familia de los perros, en menor medida los gatos, zorros y hienas. En ellos la larva en la forma adulta se desarrolla y reside en el intestino delgado donde causa parasitosis intestinal pero no enfermedades de los órganos. Los mamíferos presa (generalmente herbívoros) actúan como hospederos intermediarios cubriendo un rango mucho más amplio incluyendo caprinos, porcinos, bovinos, equinos y camellos donde se desarrollan quistes de equinococos (metacestodo) en diversos órganos y tejidos (Roming et al., 2017; Mandal et al., 2012; Bhutani et al, 2018). Los humanos son intermediarios accidentales o huéspedes "sin salida" cuando ingieren alimentos contaminados con heces de perro conteniendo huevos (Thompson, R., 2017). Esta capacidad para infectar y adaptarse a un gran número de especies de mamíferos ha contribuido a su distribución global cosmopolita (Zheng et al., 2013).

En el ciclo de vida típico de *E. granulosus* (Fig. 1), los gusanos viven 5 meses en el intestino del perro y se esparcen millones de huevos de parásitos al defecar (Bhutani et al, 2018).

La infestación por *Echinococcus* en humanos y hospederos intermediarios se da a través de la vía fecal-oral. Después de la ingestión de los huevos, este se convierte en una oncosfera con seis ganchos que ingresa a la circulación portal luego de la penetración en la mucosa intestinal. La oncósfera suele

detenerse en el hígado 60%-70% de los casos, pulmón 20% a 30% de los casos y permanece en circulación sistémica menos del 10%, donde pierde los ganchos (Filippou et al., 2007).

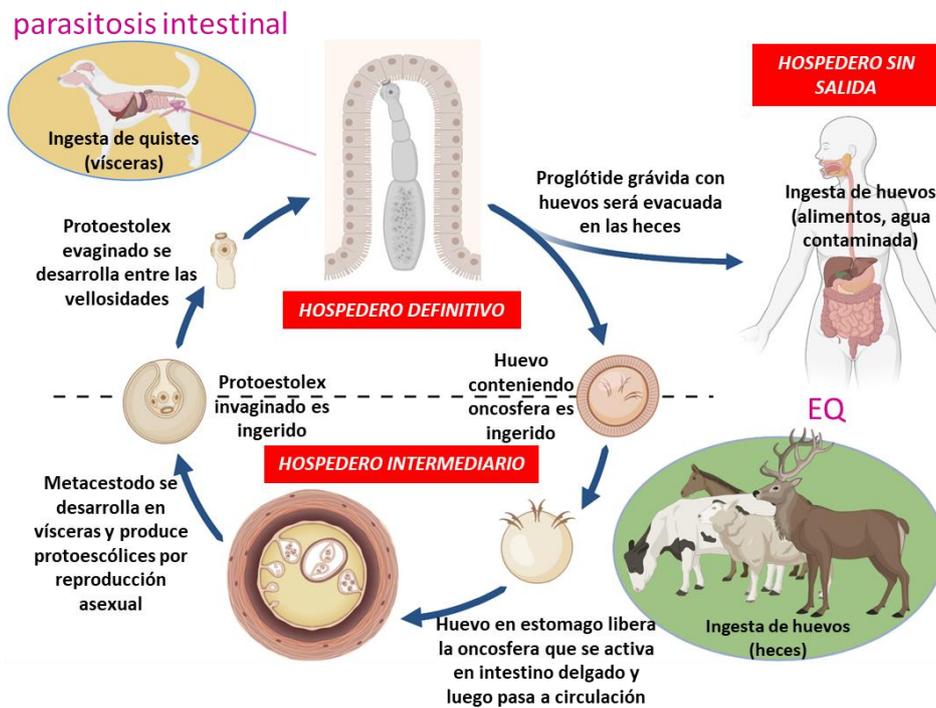


Figura 1. Ciclo de vida de *Echinococcus granulosus*. Los perros son los hospederos definitivos y contienen la tenia adulta en los intestinos. Los mamíferos ungulados son hospederos intermediarios al ingerir los huevos en las heces de los perros, que formarán quistes hidatídicos en las vísceras. Los humanos son intermediarios accidentales o hospederos "sin salida" cuando ingieren alimentos contaminados con heces de perro donde los huevos eclosionan a oncosferas (embriones) en el intestino. Adaptado de Thompson, R., 2017. BioRender.

Habiéndose asentado en el parénquima del órgano afectado, la oncosfera (embrión) se convierte en metacestodo (quiste hidatídico) que crece gradualmente, produciendo protoscólices y quistes hijos que llenan el interior del quiste. El ciclo se completa si el metacestodo con protoescólices fértiles es comido (junto con los órganos que contienen quistes) por un carnívoro. Después de la ingestión, los protoescólices se evaginan, se adhieren a la mucosa intestinal y se desarrollan en etapas adultas en 32 a 80 días. La madurez sexual de *E. granulosus* adulto ocurre en el intestino delgado después de 4 a 5 semanas de la ingestión. Los huevos o proglótides gravídeos se eliminan en las heces y así comienza un nuevo ciclo (Mandal et al., 2012).

Se ha demostrado que moscas, escarabajos y posiblemente otros artrópodos, son importantes en la dispersión de huevos de *Echinococcus spp.* (Benelli et al., 2021).

1.1.2 Quiste hidatídico o metacestodo

El metacestodo consiste en una vesícula unilocular delimitada por la pared del quiste (endoquiste), compuesta por dos capas (Fig. 2). La más externa denominada capa laminar, es acelular y es generada por las células de la capa más interna, denominada capa germinativa compuesta por un sincitio celular (Thompson, R., 2017; Koziol et al., 2014). A su vez, a partir de la capa germinativa se generan por gemación vesículas prolíferas, en las que se generan los protoescólex, que constituyen el estadio infeccioso para el hospedador definitivo. En algunos casos, si el metacestodo es lo suficientemente grande puede contener dentro quistes hijos (Thompson, R., 2017). Por fuera del endoquiste existe una capa perteneciente al hospedador, denominada capa adventicia compuesta por fibras de colágeno. El metacestodo rodeado de la capa adventicia es lo que se conoce como quiste hidatídico (Silva, M. 2014; Koziol et al., 2014).

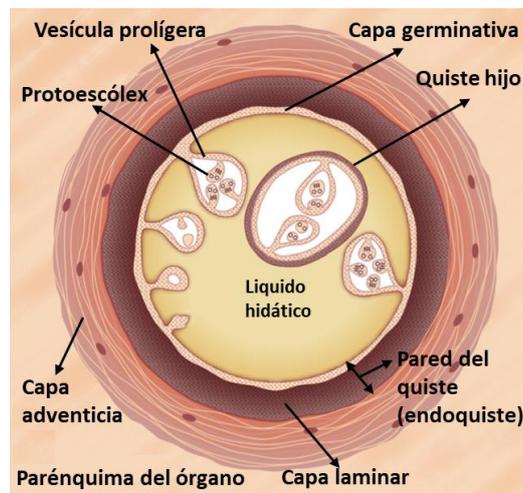


Figura 2. Esquema del metacestodo de *Echinococcus granulosus*. Adaptado de Thompson & Jenkins 2014).

El líquido hidatídico acumula nutrientes como glucosa, aminoácidos y proteínas provenientes de la capa germinal y del hospedero (albúmina sérica, lipoproteínas, hemoglobina e inmunoglobulinas), en concentraciones similares o superiores a los que se encuentran en el suero del huésped. (Bhrem and Koziol, 2017).

Si el líquido hidatídico se derrama en una cavidad como el peritoneo, cada protoscólex es capaz de convertirse en un nuevo quiste (equinococosis secundaria) (Agudelo et al., 2016).

1.1.3 Equinococosis quística (EQ)

La equinococosis quística (EQ) es una zoonosis parasitaria causada por el estadio larvario de las especies de *Echinococcus* (platelminto cestodo) que forman el complejo *Echinococcus granulosus*

sensu lato (s.l.). De los nueve genotipos identificados en el complejo, es *E. granulosus s.s.* (G1-G3) la especie responsable de la mayoría de la EQ humana (88 %) (Vuitton et al., 2020; Woolsey et al., 2021).

Es una de las 17 enfermedades tropicales desatendidas reconocidas por la Organización Mundial de la Salud. *E. granulosus* afecta a más de 1 millón de personas y es responsable de más de \$3 mil millones en gastos cada año (OMS; Agudelo et al., 2016).

Las áreas que presentan EQ endémica incluyen el oeste de China, Asia Central, América del Sur, los países mediterráneos y el este de África donde las tasas de incidencia en humanos pueden llegar a 200 cada 100.000 habitantes. Se diagnostican anualmente cinco mil nuevos casos de EQ en Argentina, Brasil, Chile, Perú y Uruguay (Wen et al., 2019). Según la Organización Mundial de la Salud la prevalencia de la equinocosis quística en los mataderos de las áreas hiperendémicas de América del Sur varía entre el 20 % y el 95 % de los animales sacrificados. Es la zoonosis más importante en Argentina y una de las más importantes en Sudamérica (Fig. 3).

Entre 2009 y 2014 Argentina, Brasil, Perú, Chile y Uruguay presentaron una tasa de letalidad promedio por EQ del 2,9% con una proporción promedio de casos entre niños menores de 15 años de 15%, por lo cual el riesgo ambiental es evidente (Pavletic et al., 2017).

Mediante secuenciación del gen mitocondrial *cox1* de 877 casos de equinocosis quística humana en todo el mundo el genotipo identificado con mayor frecuencia (72,9 %) es el G1. Además, los genotipos G6 y G7 considerados poco infecciosos para los humanos representan el 12,2 % y el 9,6 %, respectivamente. En Sudamérica, sobre 155 casos secuenciados, los genotipos de *E. granulosus s.l.* que infectan con mayor frecuencia a humanos son G1 (72,3%) y G6 (21,3%) (Cucher et al., 2016).

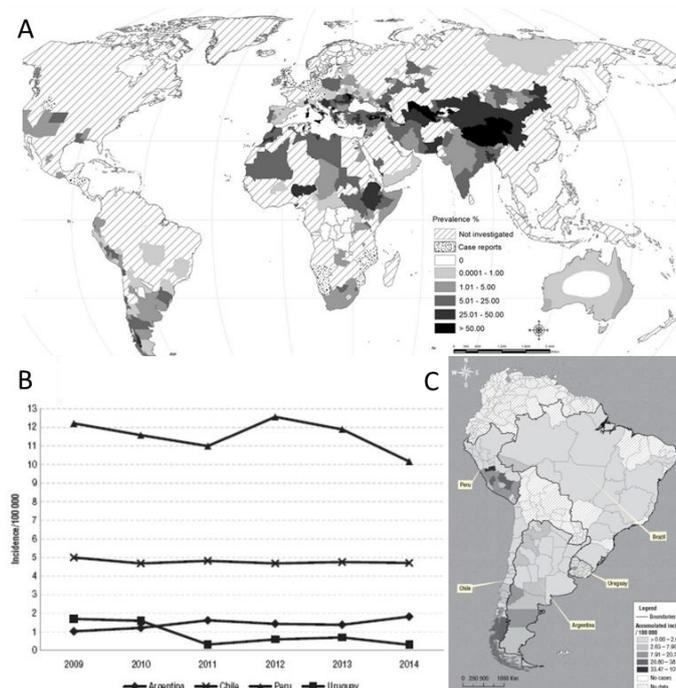


Figura 3. A)- Distribución mundial de Echinococcus granulosus responsable de la equinococosis quística (EQ) en los principales hospederos intermediarios domésticos. Adaptado de Deplazes et al., 2017. B) Incidencia anual de EC en humanos en países de la región. C) Incidencia acumulada cada 100.000 habitantes en Argentina, Chile, Perú y Uruguay, en el período 2009-2014. Tomado de Deplazes et al., 2017.

El control de la equinococosis se basa en interrumpir la transmisión de un hospedero a otro. Los hospederos definitivos cánidos se pueden desparasitar tratándose a intervalos regulares con praziquantel (antihelmintico derivado de la isoquinolona) para eliminar los gusanos adultos de su intestino delgado. La reducción de la población canina, vía sacrificio y castración y la educación sanitaria son herramientas complementarias (Larrieu et al., 2019). Un medio eficaz de control es vacunar a los hospederos intermedios como el ganado, interrumpiendo así la transmisión a los hospederos definitivos. La vacuna recombinante EG95 protege a las ovejas con una eficacia del 95-99% (Korhonen et al., 2022), sin embargo su implementación ha tenido varias dificultades (Labanchi et al., 2022).

Otra droga usada son los benzimidazoles como mebendazol o albendazol tiene una eficacia que varía según el número, tamaño, tipo y localización de los quistes que influyen en la penetración de los fármacos, pero se ha visto que el tratamiento combinado de albendazol y praziquantel resulta superior (Bosco et al. 2021; Velasco et al., 2018).

1.2 Receptores Nucleares

Los receptores nucleares (NR) son específicos de metazoos (esponjas, cnidarios y animales bilaterales) evolucionando a partir de dos duplicaciones de genes (Escriba et al., 1997; Wu y LoVerde 2019), 48 de los cuales se encuentran en humanos (Germain et al., 2006). Son factores de transcripción dependientes de ligandos generalmente lipofílicos que están involucrados en varios procesos biológicos importantes, como el control del desarrollo embrionario, la fisiología de los órganos, la diferenciación celular y la homeostasis (Papageorgiou et al., 2021). No se conocen los ligandos de los receptores huérfanos, pero se piensa que podrían ser intermediarios metabólicos o factores ambientales xenobióticos (p. ej., agentes farmacéuticos, hormonas sintéticas, biocidas), lo que puede explicar su actividad de transactivación aparentemente constitutiva y la dificultad para identificarlos (Evans & Mangelsdorf, 2014; Cheng et al., 2021).

Los receptores nucleares funcionarían como andamios inducibles que coordinan grandes complejos transcripcionales donde diferentes ligandos podrían inducir diferentes conformaciones exponiendo superficies de interacción proteína-proteína únicas accesibles para la unión de proteínas correguladoras (Fig. 4) (Frigo et al., 2021).

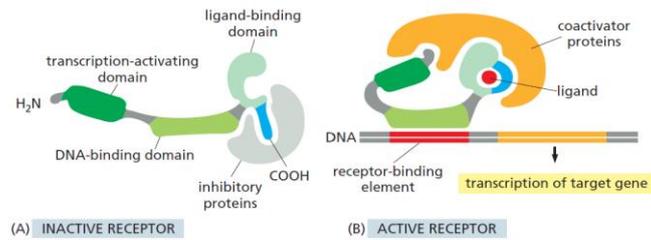


Figura 4. Esquema de NR generico activado por ligando. Tomado de Alberts et al., 2022

Los receptores nucleares están regulados por diversas modificaciones postraduccionales, por ejemplo, la fosforilación regula la translocación y la transcripción, mientras que la ubiquitinación regula la degradación de proteínas (Ishigami-Yuasa & Kagechika, 2020), la transcripción, la reparación del ADN, la progresion del ciclo celular y la organización del genoma (Hickey et al., 2012).

1.2.1 Organización estructural modular de los receptores nucleares

Los NR exhiben una estructura modular que consta de dominios, designados de A a F, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal (Germain et al., 2006) (Fig. 5).

-Dominio A/B o N-terminal (NTD): está pobremente estructurado y tiene un bajo porcentaje de conservación dentro de la familia de NRs, tanto a nivel de tamaño como de secuencia, pudiendo no estar presente en algunos NRs (Weikum et al., 2018). Contiene una región de transactivación 1 (AF-1, *Activation Factor 1*) independiente de ligando, que interactúa mediante contactos proteínas-proteínas con coactivadores y/u otros factores de transcripción de una manera específica de célula y promotor (Cancela et al., 2022; Owen & Zelent, 2000).

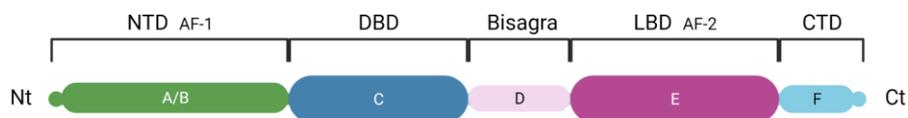


Figura 5. Esquema de la organización modular de los dominios conservados de los NRs.

BioRender.

-Dominio C o de unión al ADN (DBD): es la región más conservada y sello distintivos de los NRs (Cancela et al., 2022). Contiene dos subdominios con motivos de dedos de zinc conservados, cada uno de los cuales contiene cuatro residuos de cisteína que coordinan un ion de zinc para crear el motivo de dedo de zinc de unión al ADN (Fig. 6) (Weikum et al., 2018). Él Zn en sí mismo no interactúa con el ADN sino que estabiliza la estructura del motivo ayudado por las cadenas laterales hidrofóbicas (Nelson & Cox, 2017). El primer dedo de zinc contiene una caja P que es responsable de unirse a la

secuencia reguladora del gen objetivo. El segundo dedo de zinc (CII) contiene un motivo llamado Caja D responsable de la dimerización (Weikum et al., 2018; Wu y LoVerde 2019). El primer subdominio que contiene la caja P contiene la hélice de lectura de ADN, que interactúa con el surco principal para realizar interacciones específicas de base con el ADN. La hélice del segundo subdominio posee la caja D y hace contactos no específicos con la columna de fosfatos del ADN (Weikum et al., 2018).

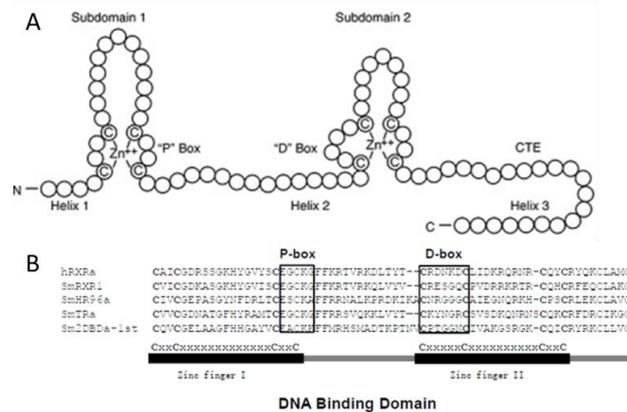


Figura 6. A) dominio C (DBD) . B) Alineación de secuencia que muestran los dos dedos de zinc y los motivos conservados de la caja P y la caja D. hRXRa: RXRa humano, SmRXR1: Schistosoma mansoniRXR1, SmHR96a: S. mansoni HR96a, SmTRa: S. mansoni TRa y Sm2DBDa-1st: primer DBD de S. mansoni 2DBD-NRa. Adaptado de Wu y LoVerde 2019.

-Dominio D o región bisagra: sirve como conector corto y flexible entre el DBD y el LBD, permitiendo la adopción de diferentes posiciones relativas para evitar problemas de impedimento estérico (Frigo et la., 2021). Tiene la menor conservación de secuencia y tamaño entre los NR y, en numerosos casos, alberga señales de localización nuclear (Papageorgiou et al., 2021).

-Domino E o de unión a ligandos LBD (C terminal): El LBD está menos conservado que el DBD (Wurtz et al., 1996), es un dominio que se une a ligandos y generalmente interactúa con proteínas co-reguladoras, co-activadores o co-represores (Weikum et al., 2018). Además, contiene una fuerte interfaz de dimerización (Wurtz et al., 1996). Este dominio conservado estructuralmente contiene 12 hélices α y cuatro hebras β que se pliegan en tres capas paralelas para formar un sándwich de hélice alfa (Weikum et al., 2018) que crea un bolsillo hidrofóbico de unión a ligando (LBP) en la base del receptor (Weikum et al., 2018; Porter et al., 2019).

El dominio de transactivación dependiente de ligando (AF-2), compuesto por las hélices 3, 4 y 12 está modulado por la hélice 12 (Weikum et al., 2018). La unión del ligando al LBP transforma AF-2 en un dominio competente (Mazaira et al., 2018), que coopera con AF-1 en la regulación de la

transcripción reclutando co-activadores (Owen & Zelent, 2000), lo que lo convierte en un objetivo atractivo para posibles inhibidores (Fischer & Smieško, 2020)

-Dominio F: Es una región pobremente conservada, e incluso puede estar ausente. Todos tienen una función común: influir en la actividad del receptor al afectar la activación transcripcional, dimerización, interacciones con otras proteínas y/o la estabilización de conformaciones unidas a ligandos -agonistas o antagonistas- en el LBD (Patel & Skafar, 2015).

1.2.2 Clasificación de los NRs

Los receptores nucleares se clasifican según su mecanismo de acción en cuatro clases establecidas en función del modo de dimerización, los motivos de unión al ADN (repetición directa o repetición invertida), la especificidad del ligando y el sitio subcelular de la unión NR-ligando (Porter et al., 2019; Weikum et al., 2018) (Fig. 7).

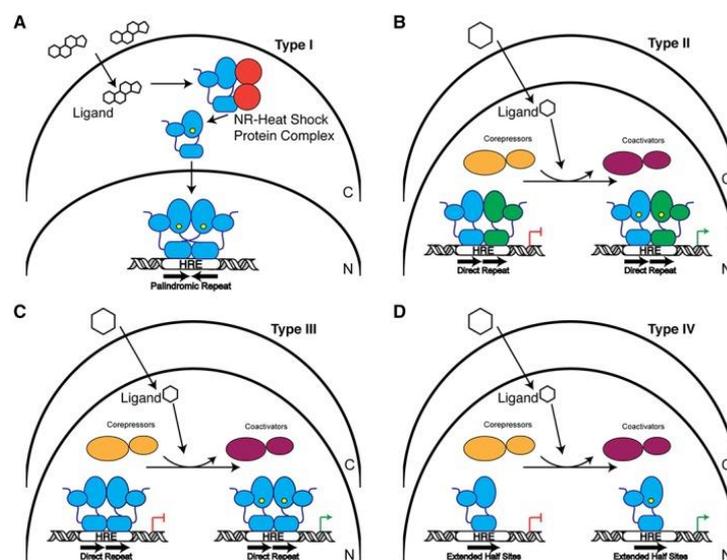


Figura 7. Esquema de los mecanismos de señalización de los NRs. (A) Los receptores de tipo I residen en el citoplasma en complejo con proteínas chaperonas. Tras la unión del ligando, el receptor se libera de este complejo y se transporta al núcleo, donde normalmente se unen a los elementos palindrómicos de respuesta hormonal (HRE) como un homodímero para regular la transcripción. (B) Los receptores de tipo II se localizan en el núcleo. En su estado sin ligando, interactúan con proteínas correpresoras, pero al unirse al ligando se intercambian por coactivadores. Los NR de este grupo generalmente forman complejos heterodiméricos con RXR. (C) Al igual que los receptores de tipo II, los receptores de tipo III residen en el núcleo e intercambian correpresoras y

coactivadores unidos. Estos receptores se unen a los HRE de repetición directa como homodímeros. Tomado de Weikum et al., 2018.

Los NRs tipo I son activados por ligandos como las hormonas esteroides. Estos receptores son secuestrados en el citoplasma por chaperonas, pero tras la activación por el ligando, las chaperonas se liberan, los NRs homodimerizan y traslocan al núcleo (la secuencia exacta de estos dos eventos, aún se debate) y se unen a elementos palindrómicos de respuesta hormonal (HRE) con dos repeticiones AGGACA (o similares) separadas por una región espaciadora variable (Weikum et al., 2018; Frigo et al., 2021). Los NRs tipo II (heterodímeros con RXR) están en el núcleo y tras la unión del ligando, el receptor intercambia los co-represores por coactivadores (Weikum et al., 2018) y se unen a repeticiones directas con dos sitios AGGTCA separados por una secuencia espaciadora de 0 a 5 pb (Fig. 8) (Penvose et al., 2019). Otros miembros de los NRs tipo II, como los receptores activador del proliferadores de peroxisomas (PPARs) requieren heterodimerización con RXR para translocarse al núcleo (Weikum et al., 2018; Porter et al., 2019).

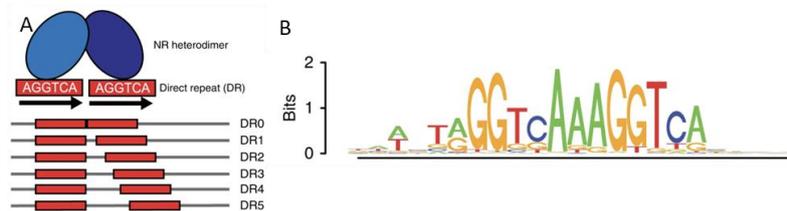


Figura 8. A) Esquema de preferencias de espaciador para NR a repeticiones directas (DR). B) Logotipo de unión a repetición directa de ADN DR1 para PPAR γ :RXR α .

Tomado de Penvose et al., 2019.

Los NRd de tipo III (receptores homodiméricos) son similares a los NR de tipo II, pero forma homodímeros sobre secuencias repetidas directas. Tienen funciones de transactivación y transrepresión altamente constitutivas, lo que sugiere que tal vez no se requiera ningún ligando. Los NR tipo IV (receptores monoméricos): este tipo de NR tiene un mecanismo de acción similar al de los NR de tipo II y III, pero se une al ADN como un monómero y reconoce semisitios extendidos dentro del HRE (Porter et al., 2019; Weikum et al., 2018) con un sitio AGGTCA y una secuencia *upstream* rica en A/T (Weikum et al., 2018; Penvose et al., 2019).

Otra forma de clasificación de los NRs los dividen en siete subfamilias (Weikum et al., 2018), NR1-NR6 basadas en análisis filogenéticos con secuencias del DBD, una subfamilia extra NR0, cuyos miembros contienen solamente el DBD o LBD (Laudet et al., 1999), separadas en dos grupos monofiléticos I-II-IV y III-V-VI (Owen & Zelent 2000).

Subgrupo 0: este grupo incluye los NRs que contienen solo un dominio de unión a ligando (LBD) que se pliega de manera usual e interactúan con otros LBDs de NRs para regular la transcripción.

Subgrupo 1: son NRs regulados por moléculas de señalización lipofílicas que incluyen la hormona tiroidea, ácidos grasos, ácido retinoico, ácidos biliares y esteroides.

Subgrupo 2: todos se unen a los ácidos grasos en estudios estructurales. Sin embargo, no está claro si estos ligandos juegan un papel en la regulación inducida por unión de ligandos. El RXR forma complejos heterodiméricos con muchos NRs y es el único receptor del grupo con un ligando activador conocido, el ácido 9-cis retinoico.

Subgrupo 3: comprende los receptores de esteroides (SR), que son reguladores clave de una serie de procesos metabólicos, reproductivos y de desarrollo.

Subgrupo 4: contiene los receptores nucleares huérfanos necesarios para el desarrollo y mantenimiento de las neuronas.

Subgrupo 5: contiene receptores vitales para el desarrollo y el metabolismo que se clasifican como receptores huérfanos, pero la evidencia sugiere que están reguladas por fosfolípidos.

Subgrupo 6: contiene solo un receptor, el factor nuclear de células germinales (GCNF), un receptor huérfano que tiene un papel fundamental en el desarrollo. Esta proteína permanece en su propia categoría debido a que su LBD no contiene la hélice con función activadora AF-H (Weikum et al., 2018).

1.2.2.1 Subfamilia de receptores nucleares 2DBD

En 2006, se identificó en el platelminto parásito *Schistosoma mansoni* un nuevo grupo de NRs que tiene dos dominios de unión al ADN en tándem y un LBD (Fig. 9) (Wu et al., 2006). Este tipo de proteínas, denominado 2DBD-NRs, ha sido identificado en algunos moluscos y artrópodos, en *Echinococcus granulosus* y otros cestodos (Wu et al., 2007; Alvite et al., 2019), pero no se encuentra en los vertebrados.

Este nuevo grupo aún no ha sido incluido en el sistema de clasificación, sin embargo publicaciones recientes ya lo consideran subfamilia NR7 (Cheng et al., 2021).

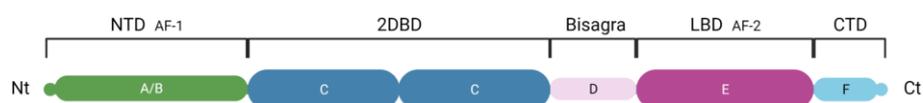


Figura 9. Esquema de la organización modular de los dominios de los 2DBD-NRs.

BioRender.

El análisis realizado por Wu y sus colaboradores (2006) sugiere que 2DBD-NR se sometió a dos rondas de duplicación en un ancestro común de los platelmintos dando lugar a tres genes.

S. mansoni expresa tres 2DBD-NRs (Sm2DBD α , Sm2DBD β , Sm2DBD γ) que tienen la misma secuencia Caja P (CEACKK) en el primer DBD que no está presente en otro NR conocido, sugiriendo una especificidad de unión al ADN nueva (Wu et al., 2006; Wu et al., 2007). Estudios muestran que Sm2DBD α podría interactuar como un homodímero, y no interacciona con SmRXR o SmRXR1, lo que implica que cuatro cajas P podrían estar involucradas en la unión al ADN. Wu y colaboradores (2006) reportaron que los tres Sm2DBD están regulados durante el desarrollo y pueden tener un papel diferencial en las diferentes etapas. Recientemente, nuestro grupo de investigación ha identificado a tres receptores 2DBD en *E. granulosus* (Eg2DBD α , Eg2DBD β and Eg2DBD γ) y en otros cestodos que están filogenéticamente relacionados con los subtipos α , β y γ de los 2DBD-NR de *S. mansoni*, apoyando la relación evolutiva con la subfamilia de NR I sugerida por Wu y cols. (Wu et al., 2006; Alvite et al., 2019). Estas proteínas poseen la arquitectura típica y los motivos conservados de los NRs. La alta similitud entre los DBDs de los Eg2DBDs no nos permite elucidar si podrían tener diferentes blancos, sin embargo probablemente posean mecanismos de activación específicos ya que los LBDs presentan bajo nivel de conservación (Alvite et al., 2019). Aunque las bases de datos de *E. granulosus* (WormBase Parasite) reportan tres Eg2DBD-NRs (Eg2DBD α , Eg2DBD β , Eg2DBD γ), recientemente se ha aislado un cuarto Eg2DBD-NR a partir de protoescólices de *E. granulosus sensu lato*. Este receptor denominado Eg2DBD α .1, posiblemente sea una isoforma de Eg2DBD α producto del procesamiento alternativo del ARNm (Alvite et al., 2019).

1.2.2.2 Receptor nuclear Eg2DBD α .1

El gen de Eg2DBD α .1 contiene nueve intrones y diez exones en un total de 10868 pb, cuya secuencia codificante (CDS) para Eg2DBD α .1 es de 2493 pb correspondiente a 830 aminoácidos. La isoforma Eg2DBD α .1 presenta cuatro sustituciones de aminoácidos respecto a Eg2DBD α (A313T, T649M, S775P y S786P) y posee una delección de 22 residuos en el exón 5 (Fig. 10) (Alvite et al., 2019).

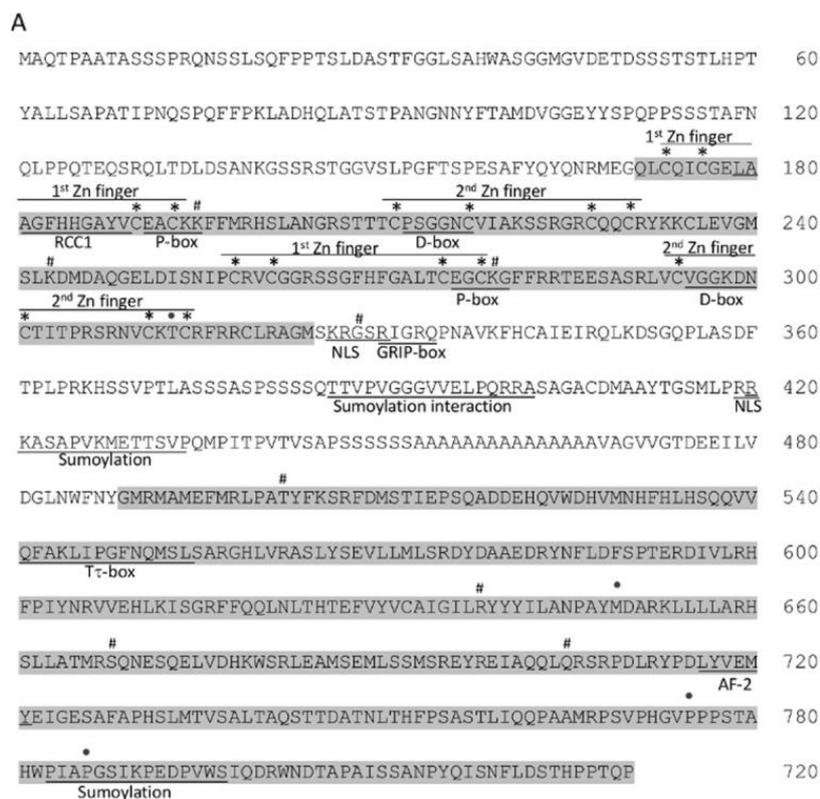
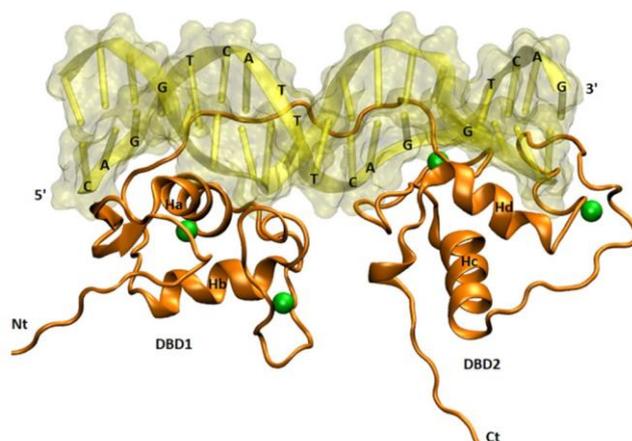


Figura 10. A) Secuencia de aminoácidos de Eg2DBD α .1 Dominio de unión a ADN y el de unión a ligando está sombreado; los motivos de consenso están subrayados. *, # y • indican Cys de los dedos de Zn, sitios de empalme y sustituciones, respectivamente. B) Representación esquemática de la organización intrón-exón. Tomado de Alvite et al., 2019.

Eg2DBD α .1 tiene dos dominios DBD con dos dedos de Zn cada uno, cada uno conteniendo una caja P y una caja D. El DBD I posee dos dedos de zinc con las secuencias conservadas CysX2CysX13CysX2Cys y CysX5CysX9CysX2Cys. A partir de un modelo se sugiere que la primera hélice alfa Ha se podría acoplar al surco mayor del ADN mediante interacciones entre las lisinas 194-195 de la caja P (pertenecientes a la secuencia consenso "EACKK") y dos guaninas en el elemento respuesta del ADN. El DBD II también contiene dos dedos de zinc con similar patrón CysX2Cys13CysX2Cys y CysX6CysX9CysX2Cys e interaccionaría con el ADN pero no a través del Caja P, contribuyendo a la estabilización del complejo (Fig. 11) (Alvite et al., 2019).



*Figura 11. Modelado molecular de los dos DBD de Eg2DBD α .1 en complejo con ADN.
Tomado de Alvite et al., 2019.*

La estructura por modelado molecular de Eg2DBD α .1-LBD presenta 2 cadenas beta y 11 hélices alfa con plegamiento conservado de sandwich alfa-helicoidal de tres capas.

Localizados en la hélice 12 (la hélice 11 es referida como hélice 12 dado que tiene solo 11 hélices) está el AF-2 y el motivo conservado con la secuencia LYVEMY que corresponde a una superficie para la unión de proteínas coactivadoras esenciales para la señalización posterior, lo que lo convierte en un objetivo para posibles inhibidores. La región F (105 aminoácidos) es altamente dinámico lo que sugiere que podría sufrir cambios conformacionales pudiendo influir en la actividad del receptor al afectar la activación transcripcional, la dimerización, las interacciones con otras proteínas y/o la estabilización de uniones a agonistas o antagonistas en el LBD.

El bolsillo hidrofóbico de unión a ligando (LBP) en la base del LBD involucra H3, H5, H6, H10, s2 y bucles que conectan H1-H2, H2-H3, s2-H6, H6-H7 (H: helice; s: cadena beta).

Estudios recientes de anclaje molecular demostraron que los ácidos grasos de cadena larga insaturados, como los ácidos oleico, linoleico y araquidónico, serían los ligandos preferidos por Eg2DBD α .1 con afinidades decrecientes respectivamente (Cancela et al., 2022).

1.3 Metabolismo de Ácidos Grasos en platelmintos

Las tenias tienen un metabolismo que está adaptado para depender de los nutrientes extraídos de sus anfitriones utilizando como principal fuente de energía los carbohidratos, para ser catabolizados por la respiración aeróbica o por dos vías anaeróbicas complementarias: las vías de fermentación del lactato y la dismutación del malato (Tsai et al., 2013).

Análisis de los genomas y estudios metabólicos de *Equinococcus* spp. evidencian la ausencia de genes clave involucrados en la síntesis de novo de lípidos como ácidos grasos y esteroides (Fig. 12) (Zheng et al., 2013; Tsai et al., 2013).

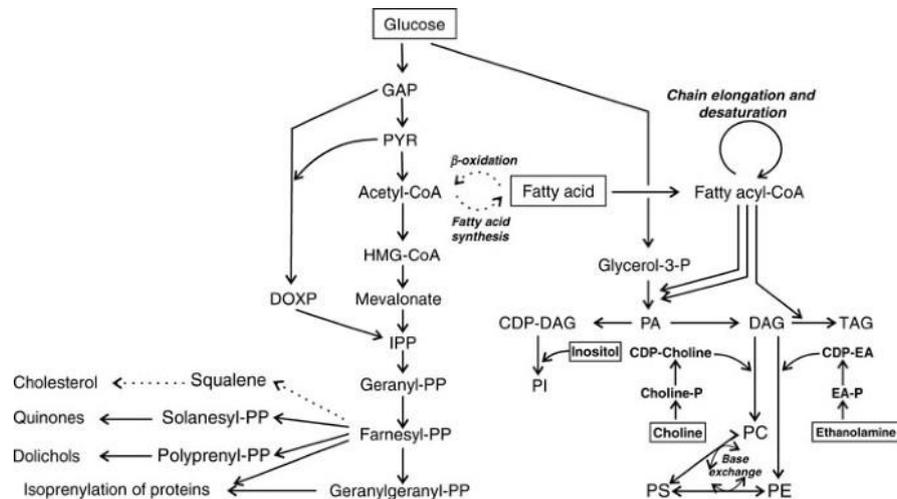


Figura 12. Las principales vías presentes en el metabolismo de lípidos de Cestodos. Las flechas sólidas negras indican la presencia de la vía, mientras que las flechas discontinuas indican su ausencia. Tomado de Mehlhorn, H. (2008).

Los cestodos no hacen β -oxidación para obtener energía de la degradación de los lípidos (Alvite & Esteves, 2011), solo se utilizan en la biosíntesis y renovación de las membranas, incorporándose en fosfolípidos, esteroides y triacilglicéridos (Brouwers et al., 1997).

A pesar de que no pueden sintetizar ácidos grasos de cadena larga como el ácido oleico o el ácido linoleico (ambos predominantes) si pueden alargar los ácidos grasos absorbidos mediante la adición secuencial de acetil Co-A que funciona como dador de dos carbonos (Mondal et al., 2016).

Tres tipos de proteínas podrían estar involucradas en la translocación de ácidos grasos por la membrana plasmática: la translocasa de ácidos grasos (FAT), la proteína de transporte de ácidos grasos (FATP) y la proteína de unión a ácidos grasos de la membrana plasmática (FABPpm) (Alvite & Esteves, 2011).

Estos organismos presentan dos transportadores de ácidos grasos altamente inmunogénicos como la proteína de unión a ácidos grasos (FABP) y proteínas de unión a ligandos hidrofóbicos (HLBP) (Alvite & Esteves, 2012).

La proteína de unión a ácidos grasos EgFABP1 fue localizada en el núcleo, citosol y otros compartimentos subcelulares de células de protoscolec de *E. granulosus* (Alvite & Esteves, 2016), y tiene una preferencia de ligando similar a Eg2DBD α .1 presentando alta afinidad de unión por el ácido oleico, linoleico y araquidónico (Cancela et al 2022). En base a esto, se propone un modelo donde EgFABP1 podría transportar ácidos grasos de cadena larga insaturados provenientes del hospedero, desde el citosol al núcleo y transferirlos a Eg2DBD α .1. De esta forma, Eg2DBD α .1 podría

homodimerizarse o heterodimerizarse con otros NR y unirse a elementos de respuesta de ADN específicos para regular la expresión génica de sus genes diana (Fig. 13) (Esteves & Alvite, 2022).

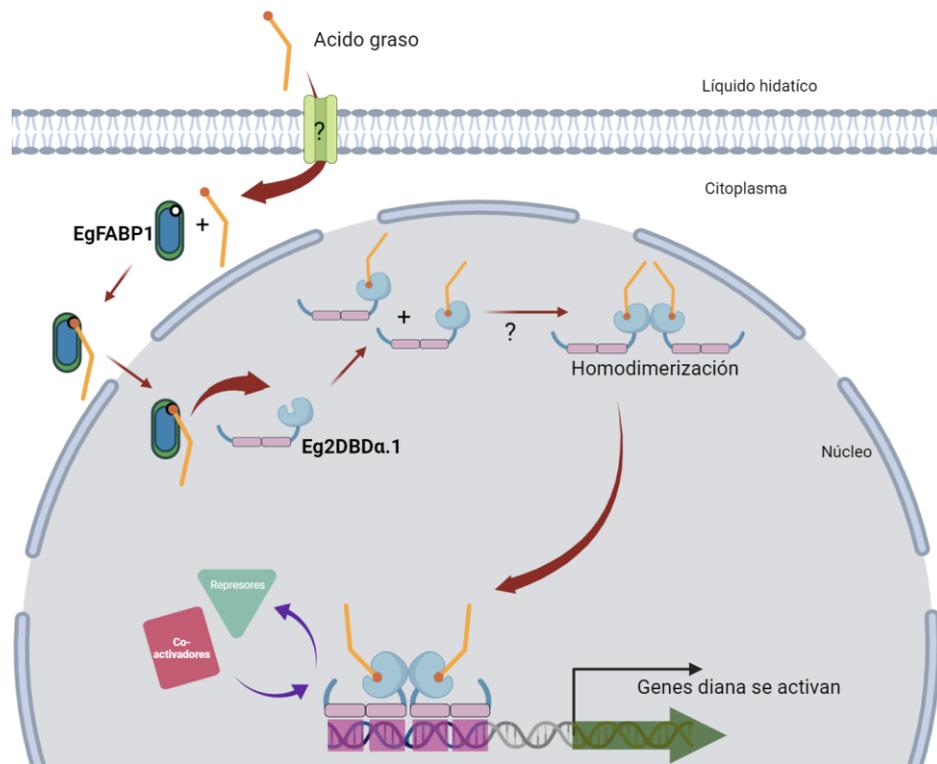


Figura. 13. Modelo propuesto del mecanismo de acción de Eg2DBDα.1. BioRender.

1.4 Suero de ternera de recién nacido (Newborn calf serum NBCS)

El suero de ternera de recién nacido se usa como suplemento en medios de crecimiento de cultivos celulares como una alternativa menos costosa y accesible al suero fetal bovino (SFB).

Este suero es la fracción líquida de la sangre de terneros bovinos menores de 20 días, aptos para consumo humano, obtenida en mataderos bajo inspección de autoridades competentes, sin permitir adiciones ni eliminaciones, e inactivado por calor. Contiene proteínas, lípidos, glucosa, vitaminas, minerales, hormonas y otros factores de crecimiento (Cheever, et al., 2017).

Los niveles de triglicéridos en el NBCS son inferiores en comparación con el SFB, no así en el caso del colesterol y proteínas, donde es mayor su concentración en NBCS (Cheever et al., 2017). Estos valores menores de triglicéridos en NBCS se podrían reflejar en que también las concentraciones de ácidos grasos sean menores.

1.5 Principio de la técnica Doble híbrido de levadura (DHL)

En 1985 Brent & Ptashne en el experimento de intercambio de dominios construyeron un gen híbrido que codifica el extremo C-terminal de Gal4p fusionado al dominio de unión de LexA, un represor de *E. coli* que regula la respuesta SOS al irradiarse con UV. La proteína de fusión LexA-GAL4 se expresó en levadura en un plásmido junto con otro plásmido conteniendo un gen informador GAL1-LacZ. Adyacente a una región operadora LexA, está el promotor UAS-GA. Al activarse con glucosa corroboró la funcionalidad de la proteína quimera (Fig. 14).

Este experimento demuestra que el intercambio de dominios es posible, generando una herramienta valiosa para la biología molecular y que la activación de la transcripción no es mediada solamente por la unión al ADN, sino que el dominio de unión al ADN sirve para “anclar” la región/dominio de activación al promotor para activar la transcripción.

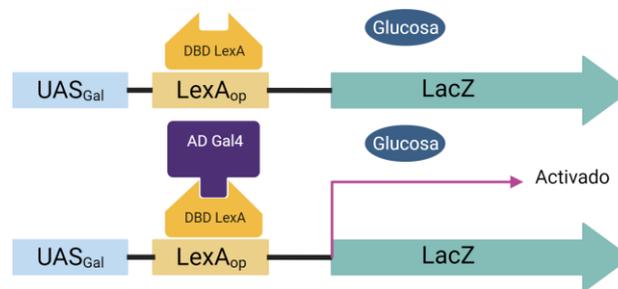


Figura 14. Ensayo de Intercambio de dominios. Adaptado de Watson, JD 2016 y Brent & Ptashne (1985). BioRender.

En 1989 Field y Song explotaron las propiedades modulares de los factores de transcripción eucariotas para el análisis de interacciones proteína-proteína *in vivo* (Paiano et al., 2018).

El ensayo consiste en la fusión de una proteína “X” con la parte N-terminal de GAL4 que tiene el DBD (aminoácidos 1 a 147), llamado híbrido carnada y la fusión de la proteína “Y” con la parte C-terminal de Gal4 que contiene el AD (aa 768 a 881), llamado híbrido presa (Field y Song, 1989; Stynen et al., 2012). La unión de la proteína quimera presa al promotor Gal4-UAS y la interacción entre la carnada y la presa reconstituyen funcionalmente el factor de transcripción Gal4 (Fig. 15). Luego, Gal4 recluta la maquinaria de transcripción, incluida la ARN polimerasa II, que transcribe un gen reportero como por ejemplo LacZ que codifica para la enzima beta-galactosidasa que marca la célula de levadura cuando se usa un sustrato cromogénico como X-Gal (Brückner A, 2009; Paiano et al., 2018).

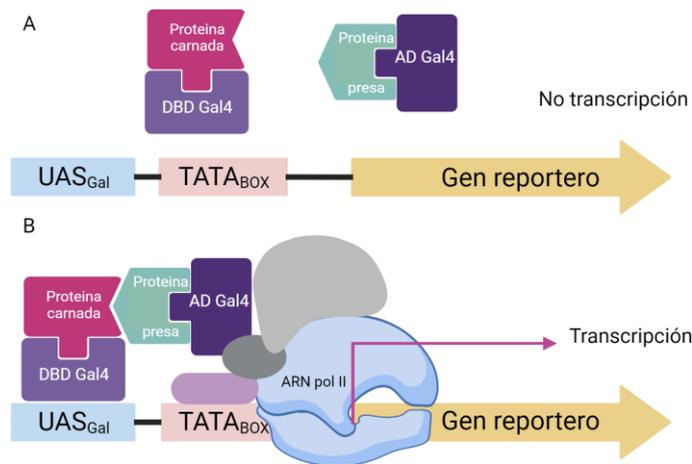


Figura 15. Sistema de doble híbrido de levadura. A) La proteína carnada de interés X se fusiona con el dominio de unión al ADN (DBD), y la proteína presa Y se fusiona con el dominio de activación (AD) B) la proteína de fusión DBD-X, se une al promotor UAS y la interacción con la proteína de fusión AD-Y reconstituye el factor de la transcripción funcional, el que recluta a la ARN polimerasa II y la subsiguiente transcripción de un gen reportero. Adaptado Brückner, 2009. BioRender.

Además de LacZ, algunas cepas contienen genes con mutaciones de auxotrofia. La cepa Y187 de *S. cerevisiae* es auxótrofa para leucina y triptófano, por lo que si estos aminoácidos (AA) no están presentes en el medio de cultivo las levaduras no pueden crecer. Estas levaduras pueden crecer en medio carente de estos AA cuando son co-transformadas con plásmidos que portan los genes de LEU2 y TRP1, como por ej. pGADT7 y pGBKT7 del sistema MATCHMAKER (ver más adelante).

La cepa H109, contiene los genes HIS3 y ADE2 controlados por los promotores GAL1 , GAL2 respectivamente que aumentan la sensibilidad y disminuyen la cantidad de falsos positivos técnicos (Vidalain et al., 2004; Stynen et al., 2012).

1.5.1 Factor de transcripción Gal4

En levaduras Gal4p activa la transcripción del regulón GAL en presencia de galactosa que incluye los genes GAL1, GAL2, GAL3, GAL80, GAL7 y GAL10 , donde Gal1p, Gal7p, Gal10p constituyen la vía enzimática (vía de Leloir) involucrada en el proceso de conversión de galactosa en glucosa-1-fosfato, pero en la cepa Y187 esta vía Leloir se sustituye por el gen reportero LacZ (Fig. 16) (Rajeshkannan et al., 2022).

En levaduras salvajes *S. cerevisiae* los genes GAL están regulados positivamente por Gal4p y negativamente por el represor Gal80p (Johnston et al., 1994). En ausencia de galactosa o presencia de glucosa Gal80p se une a un péptido pequeño (AAs 855 a 870) dentro de Gal4AD formando un complejo que impide la activación del promotor mediada por Gal4p (Egriboz et al., 2013). Además en presencia de glucosa Mig1 reprime la transcripción uniéndose a un motivo consenso aguas arriba del gen GAL1 y del gen GAL4 (Ostergaard et al., 2001).

La galactosa al unirse a la proteína inductora Gal3p, alivia el efecto inhibitor de Gal80p sobre el transactivador Gal4p que además necesita ser fosforilado por Cdk8 (Horvath et al., 2021).

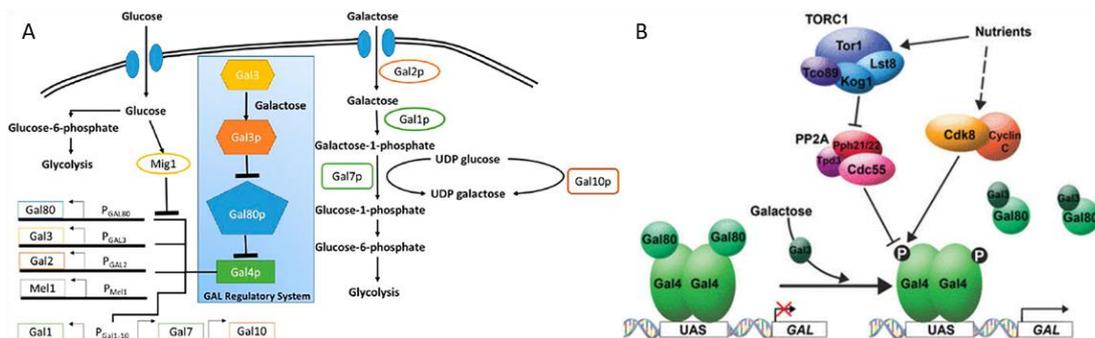


Figura 16. A-Esquema de la vía metabólica de galactosa y glucosa en levadura. El recuadro azul la vía de la red reguladora de los genes GAL. La glucosa suprime los genes GAL a través de la proteína Mig1. En presencia de galactosa y en ausencia de glucosa, la proteína GAL4 activa los genes GAL. Tomado de Rajeshkannan et al., 2022. B- La galactosa induce la expresión del gen GAL al unirse a la proteína inductora Gal3, que alivia el efecto inhibitor de Gal80 sobre el transactivador Gal4. Gal4 se fosforila en S699 por Cdk8 durante la transactivación, que es necesaria para la inducción completa del gen GAL PP2A/Cdc55. Tomado de Horvath et al., 2021.

La cepa Y187 de levadura tiene mutados los genes GAL4 y GAL80 para evitar interferencia por proteínas Gal4p y Gal80p endógenas; por lo tanto, no hay una represión significativa de la glucosa y no se observa inducción a menos que ocurra una interacción de doble híbrido. De esta manera no se producen falsos positivos por la activación de Gal4p, ni falsos negativos por la represión de Gal80p.

1.5.2 Modalidades del DHL

El experimento puede hacerse de dos formas diferentes, transformación secuencial o simultánea de una cepa diploide MATa/α con el plásmido carnada y presa, o la construcción de cepas con apareamiento MATa y MATα con los plásmidos carnada y presa, respectivamente. Los plásmidos presa pueden agruparse en una biblioteca o probarse individualmente para interacciones uno a uno; esto se llama enfoque de matriz (Fig. 17) (Stynen et al., 2012). El apareamiento MATα/a permite la combinación cruzada eficiente de una gran cantidad de pares de cebo y presa pre-transformados, lo que proporciona alto rendimiento y sensibilidad (Striebinger, Koegl, & Bailer, 2013). El enfoque uno a uno de separar los CDS de las presas, conduce automáticamente a la identificación de la proteína que interactúa disminuyendo el número de falsos positivos (Stynen et al., 2012).

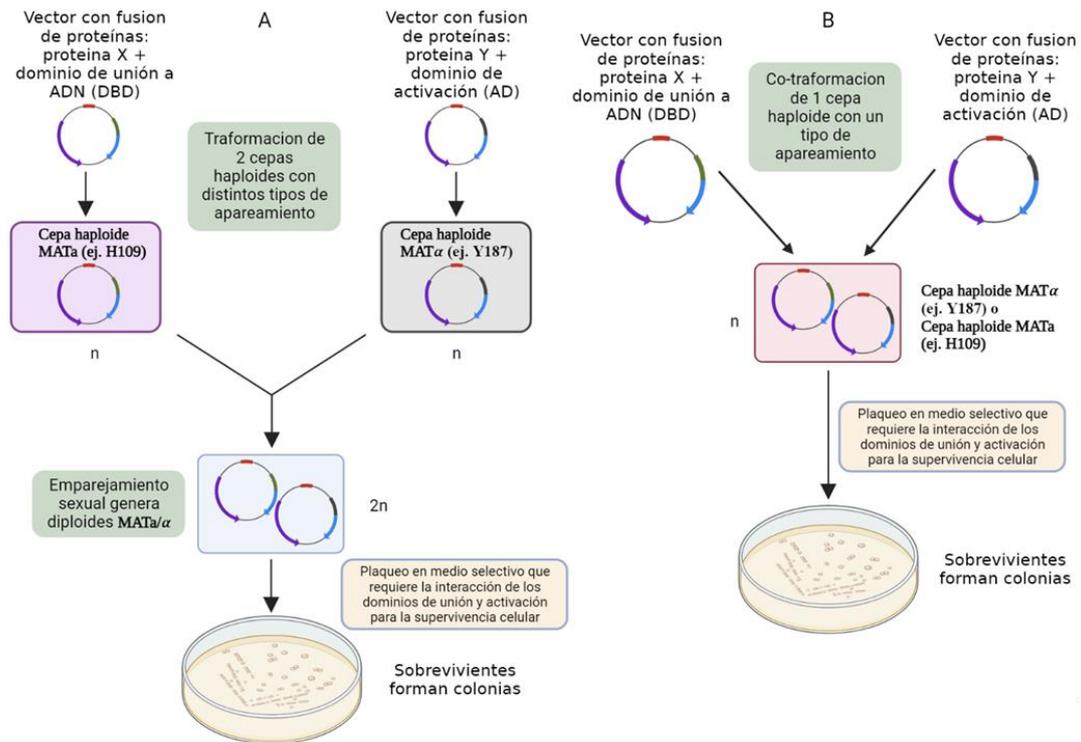


Figura 17. A- Las dos fusiones de genes se introducen en cepas de levadura separadas haploides, que luego se aparean generando una levadura diploide; B- o co-transformando una sola cepa haploide. Se plaquea en un medio en el que la levadura no puede sobrevivir a menos que el gen reportero sea expresado. Por tanto, todas las colonias supervivientes tienen proteínas de fusión que interactúan. BioRender.

Las cepas diploides MAT α /a pueden aparearse asexualmente por mitosis y en condiciones limitantes por meiosis formando esporas α y a, que pueden atraerse vía feromonas y luego fusionarse. En cambio las levaduras haploides MAT α y MATa sólo se reproducen por mitosis y pueden interconvertirse reversiblemente entre sí en un proceso llamado cambio de tipo de apareamiento determinado por el locus del tipo de apareamiento (MAT), que se encuentra en el cromosoma III (Hanson & Wolfe, 2017).

1.5.3 Falsos positivos y falsos negativos

Hay dos categorías principales de falsos positivos. Falsos positivos "biológicos" con interacciones proteína-proteína que se producen en células de levadura, pero que no ocurren en el organismo de estudio (artefacto biológico), porque las dos proteínas no se expresan al mismo tiempo o en los mismos tejidos (Vidalain et al., 2004). Proteínas carnadas ampliamente interactivas ("pegajosas") que pueden tener propiedades intrínsecas de estructura secundaria que

conducen a interacciones frecuentes inespecíficas como por ejemplo con proteínas chaperonas *Heat Shock* (Serebriiskii & Golemis, 2001).

Falsos positivos "técnicos" con interacciones proteína-proteína debido a limitaciones del sistema y que no son reproducibles en condiciones experimentales idénticas (Huang & Bader, 2009). Mutaciones en los genes informadores que conducen a expresiones constitutivas o proteínas que se unen y activan el gen reportero directamente (Vidalain et al., 2004). Autoactivación debido a fusiones con proteínas X que contienen dentro un AD o un AD críptico y/o truncado funcional (Shivhare et al., 2021).

Los falsos negativos pueden tener un origen técnico o biológico. Los falsos negativos técnicos se deben a un muestreo insuficiente de posibles proteínas interactuantes. Los falsos negativos biológicos pueden deberse a requisitos de temperatura, pH, cofactores, proteínas de andamiaje y modificaciones postraduccionales o restricciones estéricas de una proteína que puede imponer al sistema informador Gal4 (Huang & Bader 2009; Striebinger et al., 2013). También podría ocurrir que las fusiones son tóxicas o inestables en levaduras (Mehla et al., 2017)

1.6 Doble híbrido de levadura modificado

El gen reportero bacteriano *lacZ*, codifica la enzima β -galactosidasa (β -gal, EC 3.2.1.23), ampliamente utilizada en análisis de genética, biología celular y molecular, genómica y proteómica debido a que tiene una amplia capacidad de inducción (hasta 10,000 veces), se tolera bien en *Escherichia coli* y otros organismos, siendo un producto funcional y fácil de purificar. Además, tiene una variedad de sustratos y ensayos tanto *in vivo* como *in vitro*. La estructura tetramérica de β -gal (1020 aminoácidos, 500 kDa aprox.) permite la coexpresión de dominios individuales y fusiones con otras proteínas, lo que amplía su utilidad (Serebriiskii & Golemis, 2000).

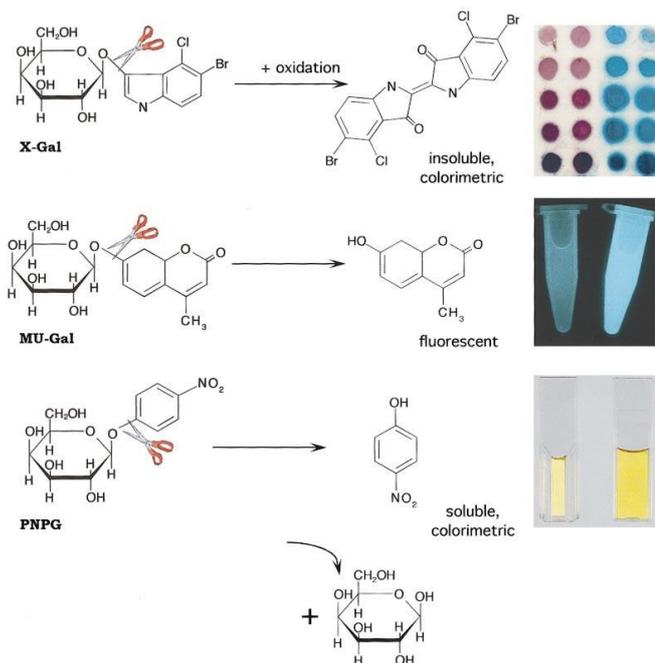


Figura 18. Función enzimática de la β -galactosidasa . β -gal escinde sustratos que contienen b-D-galactósido con una amplia gama de grupos aglicona, apuntando entre el oxígeno glicosil y el carbono anomérico como se indica (tijeras). Los sustratos utilizados pueden ser indicadores cualitativos de función b-gal en placas (X-Gal) o para ensayos líquidos cuantitativos mediante medida de fluorescencia (MU-Gal o MUG) o color en espectrofotometría (ONPG). Tomado de Serebriiskii & Golemis, 2000.

La β -galactosidasa cataliza reacciones en β -d-galactopiranósidos de hidrólisis de enlace O-glicosídico de oxígeno y otros enlaces glicosídicos, como con nitrógeno, azufre y flúor, pero con una eficiencia catalítica muy reducida, requiriendo Na^+ o K^+ y Mg^{2+} para estar completamente activa (Juers et al., 2012).

La hidrólisis de ONPG (orto-nitrofenil- β -galactopiranósido), da como subproducto soluble de color amarillo, o-nitrofenol, que permite la cuantificación de la fuerza de interacción mediante mediciones de absorbancia espectrofotométricas. Por otro lado, X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -d-galactopiranósido), comúnmente utilizado en enfoques de soporte sólido como levantamiento de colonias o ensayos en placas de agar, produce un color intensamente azul (Fig. 18) (Trimborn et al., 2022).

El ensayo de DHL modificado (DHLm) es una estrategia que utiliza el sistema *in vivo* de DHL para evaluar la unión de posibles ligandos mediante un ensayo colorimétrico que cuantifica el producto codificado del gen LacZ, la enzima β -galactosidasa. Se analiza la β -galactosidasa en cultivos líquidos para cuantificar las interacciones de dos híbridos y comparar la relación la fuerza de las interacciones proteína-proteína observadas en transformantes seleccionados. Sin embargo, no existe una correlación directa entre la actividad de la β -galactosidasa y la K_d de una interacción (Estojak et al., 1995)

1.7 Justificación del trabajo

A pesar de los avances en el conocimiento de la biología del parásito, aún existen muchos aspectos que requieren ser investigados para comprender mejor los fundamentos subyacentes de la patogénesis y desarrollar estrategias de control efectivas. Pensamos que los receptores nucleares serían factores de transcripción clave en la regulación de la expresión génica y desempeñan un papel crucial en diversos procesos biológicos.

Los NRs de helmintos parásitos son considerados nuevos posibles blanco de drogas antihelmínticas ya que debido a la ausencia de estrategias terapéuticas eficaces con las drogas existentes y al desarrollo paulatino de la resistencia parasitaria, se requieren nuevas estrategias para tratar estas infecciones (Nari et al., 2003; Wang et al., 2017; Wen et al., 2019). Los benzimidazoles, antiparasitarios de elección para el tratamiento de la EQ, presentan varias contraindicaciones y efectos secundarios. Solamente consiguen la resolución de los quistes humanos en un 30% de casos, con una tasa de recaída importante (25%-60%) (Busto et al., 2016). Cabe destacar que el 13% de las drogas aprobadas por la FDA interaccionan con NRs ya que son blancos atractivos para el desarrollo de drogas de pequeño tamaño, lipofílicas y de uso oral (Evans & Mangelsdorf, 2014). El principio de la utilización de NRs como blancos para el tratamiento de enfermedades parasitarias se basa en el uso de ligandos exógenos que interfieran con sus funciones pero también podrían interaccionar con reguladores corriente arriba o los efectores corriente abajo del NR (Wang et al., 2017).

Por estos motivos es importante dilucidar el mecanismo de acción de los receptores nucleares de *E. granulosus*, más aún de los Eg2DBDs ya que los hospederos del parásito no presentan proteínas similares.

1.8 Hipótesis

Basándonos en los antecedentes previamente expuestos acerca de Eg2DBD α .1, hemos formulado la hipótesis de que su mecanismo de acción implica la formación de homodímeros a través de su dominio de unión a ligandos (LBD), luego de la unión de un ligando específico al mismo. Esto se sustenta en la necesidad de Eg2DBD α .1 de homodimerizarse para llevar a cabo su función biológica, un proceso que se activa en respuesta a ligandos provenientes del hospedero. Estos ligandos podrían encontrarse en el suero de ternero recién nacido (NBCS), lo que sugiere la participación de este receptor en la comunicación entre el hospedero y el parásito.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

En este contexto el objetivo general de este trabajo se centra en contribuir al conocimiento de las funciones de Eg2DBD α .1, en el estadio larvario de protoescolices de *Echinococcus granulosus s.l.*

2.1.1 Objetivos específicos.

Determinar si el suero del ternero recién nacido (NBCS) es capaz de estimular la homodimerización del receptor nuclear Eg2DBD α .1 mediante un ensayo de doble híbrido de levadura modificado (DHLm).

- Evaluar el ensayo estándar y optimizado de co-transformación de levadura con los vectores carnada y presa conteniendo el inserto Eg2DBD α .1-EF.

- Realizar estudios de DHLm para determinar la capacidad de homodimerización de Eg2DBD α .1-EF mediante la medida de actividad β -galactosidasa que es dependiente del grado de dimerización del LBD generado por la unión del ligando presente en el NBCS.

3. Materiales y métodos

Para estudiar la capacidad de estimulación de la homodimerización del receptor nuclear Eg2DBD α .1 se utilizó el dominio de unión a ligandos (LBD) y el dominio F (región E-F), ya que previamente se demostró que esta región era capaz de homodimerizar consigo misma (Blanco et al., 2023). Se realizó un ensayo de doble híbrido modificado donde los dobles transformantes de la cepa de levadura *Sacharomyces cerevisiae* Y187 se incuban con o sin NBCS. Además se realizaron los controles necesarios.

Las secuencias codificantes de la región E-F fue clonada previamente como fusiones a los ADNc de los dominio DBD o al AD (dominio de activación) del factor de transcripción GAL4 presentes en los plásmidos pGBKT7 y pGADT7 respectivamente (Blanco et al., 2023).

Estas construcciones fueron utilizadas para co-transformar levaduras *S. cerevisiae* Y187 para estudiar el nivel de homodimerización de este NR.

3.1 *Saccharomyces Cerevisiae* Y187

Esta cepa posee un gen reportero LacZ bajo el control del promotor UAS_{GAL1}-TATAbox. La secuencia activadora aguas arriba UAS_{GAL1} es un promotor proximal con cuatro secuencias consenso que actúa como potenciador (*enhancer*) transcripcional aditivo al que se une un elemento en trans específico de forma cooperativa: Gal4p (Yeast Protocols Handbook, 2009; Giniger & Ptashne, 1988). Aprox. 25 pb *upstream* en cis al elemento UAS_{GAL1} está el promotor core TATA_{BOX} cuya secuencia consenso TATA(A/T)A(A/T)(A/G) determina el sitio de inicio de la transcripción y la transcripción basal del gen mediante la unión de otros factores de transcripción que actúan en trans. (Basehoar et al., 2004; Cheon et al., 2020; *Yeast Protocols Handbook*, 2009)

Secuencias consenso de UAS_{GAL1}

GAL1-bs1	TAGAAGCCGCCGAGCGG
GAL1-bs2	GACAGCCCTCCGAAGGA
GAL1-bs3	GACTCTCCTCCGTGCGT
GAL1-bs4	CGCACTGCTCCGAACAA

En respuesta a la activación de Gal4p sobre GAL1, Y187 muestra un alto nivel de actividad de β -galactosidasa producto del gen LacZ, que sirve para la identificación en placa de colonias usando el

sustrato cromogénico X-gal y para análisis cuantitativos en cultivos líquidos con sustratos como ONPG. Este último se utilizó en el presente trabajo

Y187 presenta auxotrofia por leucina (Leu⁻) y triptófano (Trp⁻), dado que presenta las mutaciones knockout leu 2-3,112 y Trp1-901, lo cual permite restablecer el fenotipo protótrofo por complementación una vez adquiridos los plásmidos pGADT7 y pGBKT7 que poseen los genes LEU2 y TRP1 respectivamente. El gen LEU2 codifica para la enzima β -isopropilmalato deshidrogenasa que cataliza el tercer paso en la ruta de biosíntesis de leucina y el gen de TRP1 que codifica para la enzima isomerasa de fosforribosilantranilato, la cual cataliza el tercer paso en la biosíntesis de triptófano. Estos genes sirven como genes de selección auxótrofos ya que las levaduras que no sean co-transformadas con ambos plásmidos no podrán crecer en medios carentes de leucina y triptófano (*Yeast Protocols Handbook*, 2009). Además esta cepa posee otras mutaciones que se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Genotipo y fenotipo de la Cepa Y187

Cepa Y187 URA3::GAL1 _{UAS} -GAL1 _{TATA} -lacZ	
Genotipo	Fenotipo
MAT α	MAT α 1/ α 2 Tipo de apareamiento sexual haploide (Oya & Matsuura, 2022)
ura3-52	Ura ⁻ Auxótrofo de uracilo. Requiere uracilo en el medio
his3-20	His ⁻ Auxótrofo de histidina. Requiere histidina en el medio
ade2-101	Ade ⁻ Auxótrofo de adenina. Requiere adenina en el medio
trp1-901	Trp ⁻ Auxótrofo de trp. Requiere triptófano en el medio
leu2-3, 112	Leu ⁻ Auxótrofo de leu. Requiere leucina en el medio
gal4 Δ	Ausencia del gen Gal4 endógeno (regulador positivo), no interfiere con el ensayo DHL
gal80 Δ	Ausencia del gen del represor Gal80 (regulador negativo) permite que genes GAL se expresen constitutivamente
met ⁻	Met ⁻ Auxótrofo de metionina. Requiere metionina en el medio

3.2 Vectores pGBKT7 y pGADT7

Los vectores de fusión *Matchmaker System 3* (Clontech) pGBKT7 y pGADT7, se diseñaron para la expresión de proteínas y confirmación de interacciones con Kd por encima de $\sim 70 \mu\text{M}$. Son

vectores no integrativos porque poseen orígenes de replicación, por lo tanto permanecen circularizados en el núcleo. Cada vector posee dos orígenes de replicación, pUC y 2μ ori (2 micron ori) que promueven la replicación en *E. coli* y *S. cerevisiae* respectivamente.

El plásmido carnada pGBKT7 contiene un sitio de clonado múltiple (MCS) para la clonación de fragmentos de ADN codificantes para una de las proteínas de interés que se expresan fusionadas al extremo N-terminal (AA 1–147) del dominio de unión (DBD) de GAL4. Las proteínas de fusión son expresadas en altos niveles gracias al promotor ADH1 constitutivo (P_{ADH1}). Es un promotor truncado de 700-bp que no se reprime por etanol, subproducto del metabolismo en la fase logarítmica de crecimiento. La transcripción es terminada por señales de terminación de la transcripción T7 y ADH1(T_{ADH1}). Lleva el Gen de resistencia a la kanamicina para la selección en *E. coli* y el gen auxótrofo TRP1 para la selección en levaduras. Además, pGBKT7 también contiene el promotor T7 RNA pol que promueve la transcripción del epítipo c-Myc fusionado a la proteína de interés, sin el GAL4 DNA-BD.

El plásmido presa pGADT7 contiene el MCS para la clonación de fragmentos de ADN codificantes para otra de las proteínas de interés que se expresan fusionadas al extremo N-terminal (AA 768–881) del dominio de activación (AD) de GAL4. Las proteínas de fusión se expresan en altos niveles gracias al promotor constitutivo ADH1 (P_{ADH1}) completo de 1500 pb, pero en cual la transcripción es reprimida en la fase logarítmica tardía por el etanol que se acumula en el medio como subproducto del metabolismo.

Posee la señal de terminación de la transcripción T_{ADH1} y la proteína de fusión se dirige al núcleo por la secuencia de localización nuclear SV40 que está antes del GAL4-AD. El vector lleva el gen de resistencia a la ampicilina para la selección en *E. coli* y el marcador nutricional LEU2 para la selección en levadura. El promotor T7 de la RNA pol, permite la transcripción y traducción de la proteína de interés fusionada con HA sin GAL4 AD (*Yeast Protocols Handbook Clontech, 2009*).

3.3 Ensayos de co-transformación

El kit *Matchmaker Two-Hybrid System 3* provee los plásmidos control negativo y control positivo necesarios para validar el ensayo de DHL, los cuales fueron cedidos por el Dr. Uriel Koziol..

Se realizaron las siguientes co-transformaciones:

Control positivo: co-transformación con el vector carnada pGBKT7-p53 que codifica la fusión entre el DBD de GAL4 y el p53 murino y el vector presa pGADT7-T que codifica para la fusión del AD de GAL4 y el antígeno T largo de SV40. El antígeno T del virus simio 40 (SV40) forma con p53

un complejo que inhibe la función de p53 (gen supresor de tumores) en células infectadas con SV40 y transformadas con SV40 (Sheppard et al., 1999).

Control negativo: co-transformación con el vector carnada pGBKT7-Lam que codifica una fusión del DBD de GAL4 con la proteína lamina C humana y el vector presa pGADT7-T que es el mismo antes mencionado. La Lamina C es un filamento intermedio tipo V que compone la envoltura nuclear (Butin-Israeli et al., 2011). Lamina C no forma complejos ni interactúa con proteínas.

Ensayo de homodimerización “E”: co-transformación con los plásmidos carnada y presa con la secuencia codificante (CDS) para la región E-F de Eg2DBD α .1 (NCBI ID Eg2DBD α .1: MH092994.2) llamados pGBKT7-Eg2DBD α .1-EF y pGADT7-Eg2DBD α .1-EF respectivamente (Fig. 19A).

El plásmido pGBKT7 expresa el dominio de unión al ADN GAL4 (AA1-147) fusionado por el extremo C-terminal al epítipo c-Myc (EEQKLISEEDL) y este último se fusiona a la proteína carnada en estudio. El plásmido pGADT7 expresa una región del dominio de activación de GAL4 (aminoácidos del 768 al 881) fusionado por el extremo C-terminal al epítipo HA (YDVPDYA) y éste fusionado a la proteína presa (Fig. 19B y C).

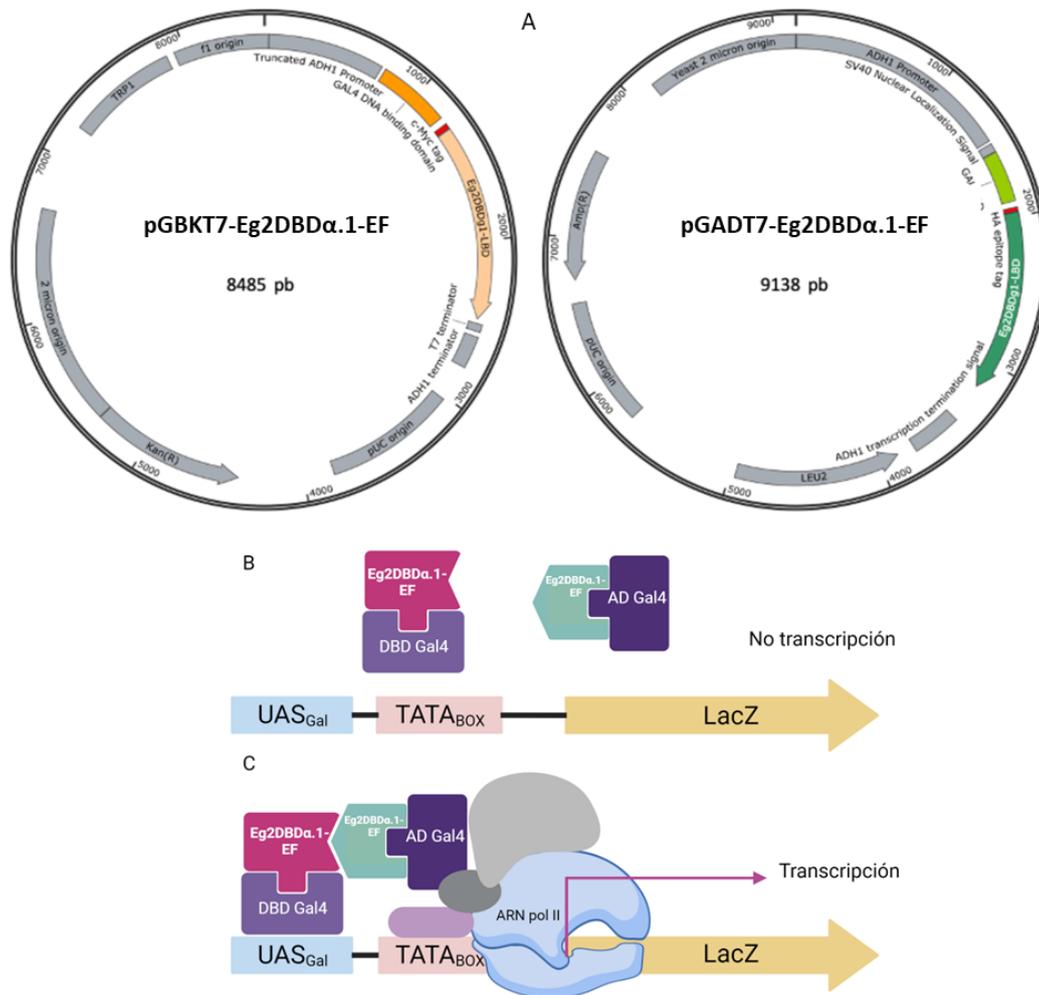


Figura 19. A- Plásmidos carnada pGBKT7 y presa pGADT7 del ensayo con Eg2DBDα.1-EF (“E”). B- El plásmido pGBKT7 expresa el dominio de unión al ADN GAL4 (AA1-147) fusionado por el extremo C-terminal al epítipo c-Myc (EEQKLISEEDL) y este último se fusiona a la proteína carnada en estudio. El plásmido pGADT7 expresa una región del dominio de activación de GAL4 (aminoácidos del 768 al 881) fusionado por el extremo C-terminal al epítipo HA (YDVPDYA) y éste fusionado a la proteína presa.

3.3.1 Cuantificación de ADN

El ADN de los plásmidos presa y carnada se cuantificó previo a la co-transformación mediante espectrofotometría midiendo absorbancia a $\lambda=260$ nm (Abs260) con el equipo NanoDrop Lite (Thermo Fisher) y se estimó su pureza mediante la relación entre la absorbancia a $\lambda=260$ nm y $\lambda=280$ nm (Abs260/Abs280).

3.3.2 Co-transformación mediada por LiAc/PEG/DTT

Para co-transformar levaduras Y187 se utilizaron los plásmidos del control positivo C(+) y del control negativo C(-) del kit Matchmaker Two-Hybrid System 3. Además, se co-transformó con los plásmidos carnada y presa portando la CDS de Eg2DBD α .1 previamente mencionada, a este experimento se les llamó “E” por ensayo. Las co-transformaciones realizadas se describen en la en la Tabla 2.

Tabla 2. Co-transformaciones realizadas en *S. cerevisiae* Y187.

Co-transformación	Vector carnada pGBKT7	Tamaño (pb)	Vector presa pGADT7	Tamaño (pb)
C(+)	pGBKT7-p53	8274	pGADT7-Tag	9972
C(-)	pGBKT7-Lam	7804	pGADT7-Tag	9972
E	pGBKT7-Eg2DBD α .1-EF	8485	pGADT7-Eg2DBD α .1-EF	9138

La co-transformación se hizo mediante el método químico de acetato de litio (LiAc/PEG/DTT). El fundamento de esta técnica se basa en que el LiAc tiene al catión Li⁺ el cual funciona como agente caotrópico de las membranas (Kawai, Hashimoto & Murata, 2010). Esto combinado con el agente reductor ditioneitol (DTT) que reduce -rompe- los enlaces disulfuro alterando la conformación nativa de las proteínas y el choque térmico, desnaturalizan las proteínas de membrana y el ADN, promoviendo el paso del ADN al interior de la célula (Thompson et al., 1998; Alliegro 2000). Además el polietilenglicol (PEG) promueve la asociación del ADN exógeno con la superficie de la célula aumentando la eficiencia de transformación (Tripp et al., 2013).

En primer lugar se realizó un precultivo de levaduras Y187 en medio conteniendo extracto de levadura/peptona/dextrosa, suplementado con adenina hemisulfato (YPDA, *Yeast Extract–Peptone–Dextrose–Adenine*, Anexo 7.1) que fue incubado durante 20 horas a 30°C con agitación a 200 rpm. Este se centrifugó a 700 xg durante 5 minutos y el pellet se resuspendió en 1 mL de buffer One-Step que contiene 0,2 M de acetato de litio, 40 % PEG 3350, 0,1 M de DTT (LiAc/PEG/DTT), el cual permite la permeabilización de las levaduras. Se incubó 100 μ L de esta suspensión de levaduras con 1 μ g de cada uno de los plásmidos (según Tabla 3) y se incubó 30 minutos a 45 °C. Posteriormente se plaqueó en placas de (SD, Sigma) SD/-Leu/-Trp y se incubó durante 72hs a 30 °C. Las placas con medio mínimo sintético definido SD/-Leu/-Trp carecen de leucina y triptófano. Incluye un medio base de levadura sin aminoácidos (Sigma) y DO-Leu-Trp (10X *Dropout System*) que contiene una mezcla de AA menos leucina y triptófano, las bases nitrogenadas adenina y uracilo, inositol y ácido p-aminobenzoico (Anexo 7.2). El procedimiento de transformación mencionado anteriormente se puede ver esquematizado en la Figura 20 y Anexo 7.3.

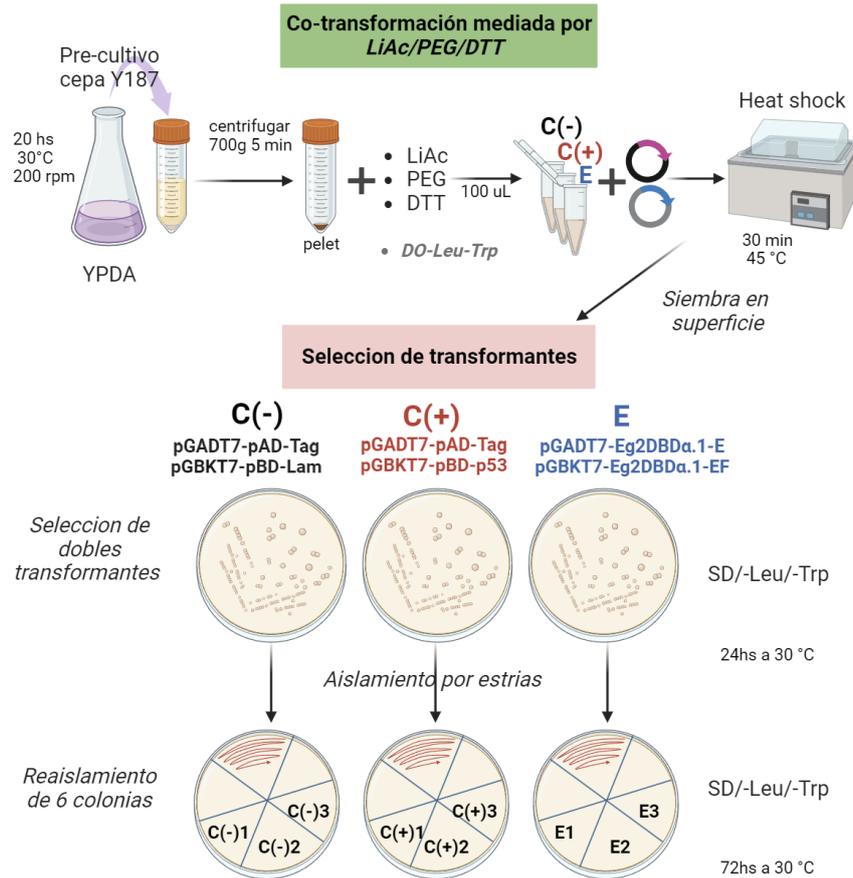


Figura 20. Esquema de Co-transformación estándar y modificado (en gris con DO-Leu-Trp). BioRender.

Se eligieron tres colonias re-aisladas de cada ensayo identificándose como C(-)1, C(-)2, C(-)3; C(+),1, C(+),2, C(+),3; y E1, E2, E3.

3.3.3 Co-transformación modificada mediada por LiAc/PEG/DTT y DO-Leu-Trp

El protocolo es similar al comentado anteriormente pero adicionando +DO-Le-Trp y con cantidades de reactivos menores en el One-Step. Al inicio se realizó un precultivo de levaduras Y187 en medio conteniendo extracto de levadura/peptona/dextrosa, suplementado con adenina hemisulfato (YPDA, *Yeast Extract–Peptone–Dextrose–Adenine*, Anexo 7.1) que fue incubado durante 20 horas a 30°C con agitación a 200 rpm. Este se centrifugó a 700 xg durante 5 minutos y el pellet se resuspendió en 0,5 mL de buffer One-Step que contiene 0,2 M de acetato de litio, 40 % PEG 3350, 0,1 M de DTT (LiAc/PEG/DTT). Se incubó 100 µL de esta suspensión de levaduras con 1 y 0,5 µg de cada uno de los plásmidos (según Tabla 3) y se incubó 30 minutos a 45 °C. Posteriormente se plaqueó en placas de (SD, Sigma) SD/-Leu/-Trp y se incubó durante 72hs a 30 °C (Anexo 7.4).

3.3.4 Eficiencia de transformación

Para calcular la eficiencia de co-transformación se cuentan las colonias que crecen en la placa con 100 uL de suspensión.

El rango de sensibilidad válido abarca las placas donde haya alrededor de 30 a 300 colonias.

El cálculo de eficiencia de transformación se expresa en unidades formadoras de colonias (UFC)/ug de ADN (Ec. 1).

$$\frac{N^{\circ} \text{ colonias} * \text{Vol. resuspensión } (\mu\text{L})}{\text{Vol. plaqueado } (\mu\text{L}) * \text{Fact. dilución} * \# \text{ plásmido } (\mu\text{g})} = \text{UFC /ug de ADN} \quad \text{Ecuación 1}$$

La eficiencia de transformación en general debe ser de al menos 103 ufc/μg para la co-transformación simultánea con dos tipos de plásmidos.

3.4 Ensayo Doble híbrido de levadura modificado (DHLm)

Se mide la actividad catalítica de la β-galactosidasa analizando la tasa de hidrólisis del sustrato cromogénico O-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG) cuyo producto amarillo, el O-nitrofenol absorbe luz a longitud de onda de 420 nm (Fig. 21).

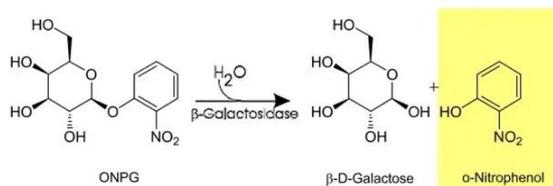


Figura 21. Reacción catalizada por la enzima β-galactosidasa

Como la β-galactosidasa es una enzima intracelular el ensayo se lleva a cabo haciendo lisis celular para liberar la enzima mediante shock térmico con ciclos de congelado y descongelado con nitrógeno líquido y baño termostatizado a 37°C.

En el DHLm las levaduras Y187 co-transformadas se incuban con Newborn Calf Serum (NBCS, *Termo Fisher*), suero de ternero recién nacido que posiblemente posea ácidos grasos en su composición como posibles ligandos. Se mide la actividad β-galactosidasa que es dependiente del grado de dimerización del LBD generado por la unión del ligando.

3.4.1 Co-transformación de levaduras e incubación con el ligando

Para la transformación de Y187 se utilizó el protocolo ya descrito en la Sección 3.3.2. Se realizaron tres co-transformaciones: 1) pGADT7-Eg2DBD α .1-EF/pGBKT7-Eg2DBD α .1-EF, 2) pGADT7-T/pGBKT7-p53 (control positivo) y 3) pGADT7-T/pGBKT7-Lam (control negativo).

Se hicieron duplicados biológicos de las colonias y duplicados técnicos con y sin ligando (Tabla 3).

Tabla 3. Ensayos del DHLm

Ensayo	Colonia	Nº replicados
C(+) pAD-Tag x pBD-p53	C(+) 1	sin ligando x2
		NBCS x2
	C(+) 2	sin ligando x2
		NBCS x2
C(-) pAD-Tag x pBD-Lam	C(-) 1	sin ligando x2
		NBCS x2
	C(-) 2	sin ligando x2
		NBCS x2
E pAD-Eg2DBDα.1-EF x pBD-Eg2DBDα.1-EF	E 1	sin ligando x2
		NBCS x2
	E 2	sin ligando x2
		NBCS x2

Se seleccionaron dos colonias de cada una de las co-transformaciones y se inocularon en un precultivo de 3 mL en SD/-Leu/-Trp para ser incubadas overnight a 30 °C a 250 rpm. Al día siguiente, se vortexeó 0,5-1 min. el precultivo y se transfirió 750 μ L del mismo a dos tubos de ensayo que contenían 3 mL del medio SD/-Leu/-Trp. En uno de los tubos se agregó NBCS 5% (197,4 μ L) y en el otro 197,4 μ L de SD/-Leu/-Trp (control sin ligando).

Se incubó nuevamente a 30 °C con agitación a 250 rpm hasta que el cultivo alcanzó una DO medida a 600nm entre 0,5 y 1,0. Se registró el valor de DO600 (Fig. 22).

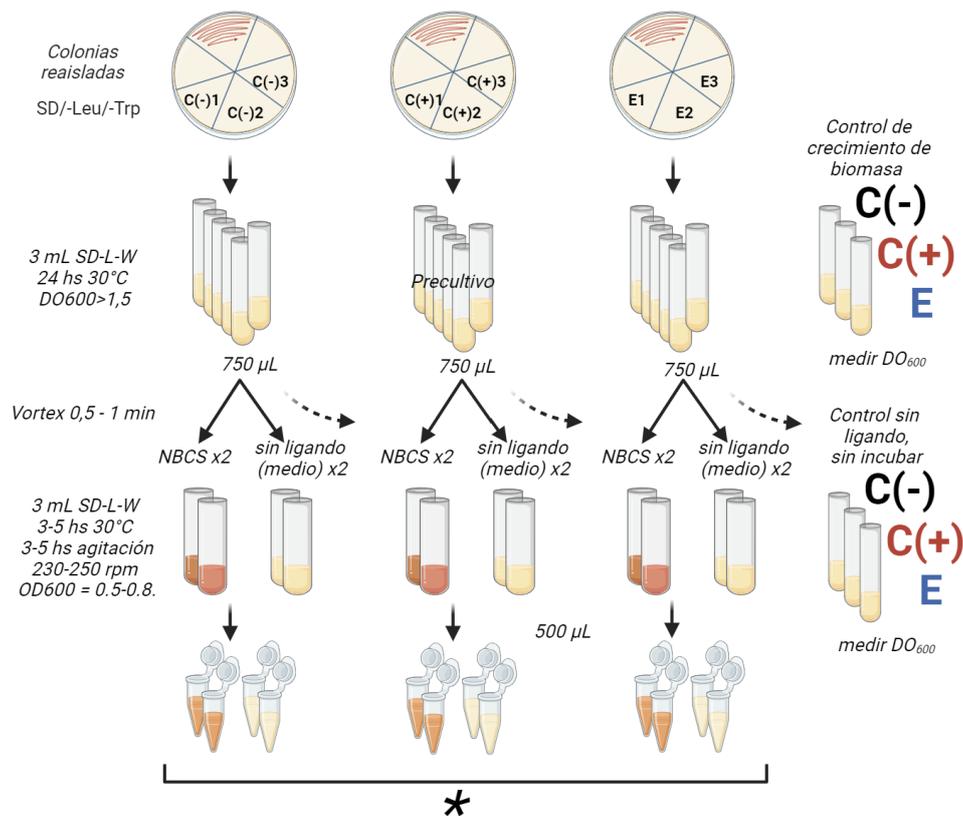


Figura 22. Esquema de los primeros pasos del ensayo DHLm. BioRender.

3.4.2 Determinación de la actividad β -galactosidasa

A continuación se extrajeron tres alícuotas de 500 μL de cada cultivo en tubos de 1,5 mL, se centrifugaron a 14.000 $\times g$ por 30 segundos y se descartó el sobrenadante. A cada pellet se agregó 500 μL de Z-buffer (16,1 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5,50 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,75 g/L KCl; 0,246 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; pH 7,0), se vortexeó y se volvió a centrifugar a 14.000 rpm por 30 segundos. Se descartó el sobrenadante y se agregó 100 μL de Z-buffer, concentrando la muestra 5 veces. Se transfirió 50 μL a un nuevo tubo y se lisó las células mediante shock térmico a través de tres ciclos de congelado de 10s en nitrógeno líquido y descongelado colocando la muestra en baño termostático a 37 °C. Se dejó a -80 °C en nitrógeno por 24hs. Posteriormente se agregó a cada muestra 350 μL de Z-buffer con 1 μL de β -mercaptoetanol y se incubó a 30 °C. Se agregó 80 μL de ONPG (Sigma-Aldrich) 4 mg/mL en Z-Buffer y se contabilizó el tiempo hasta el desarrollo de color amarillo. Se paró la reacción mediante el agregado de 200 μL de Na_2CO_3 1 M y se centrifugó a 14000 $\times g$. Al sobrenadante se le midió la absorbancia a 420 nm con el espectrofotómetro Shimadzu UV-160 (Fig. 23 y Anexo 7.5).

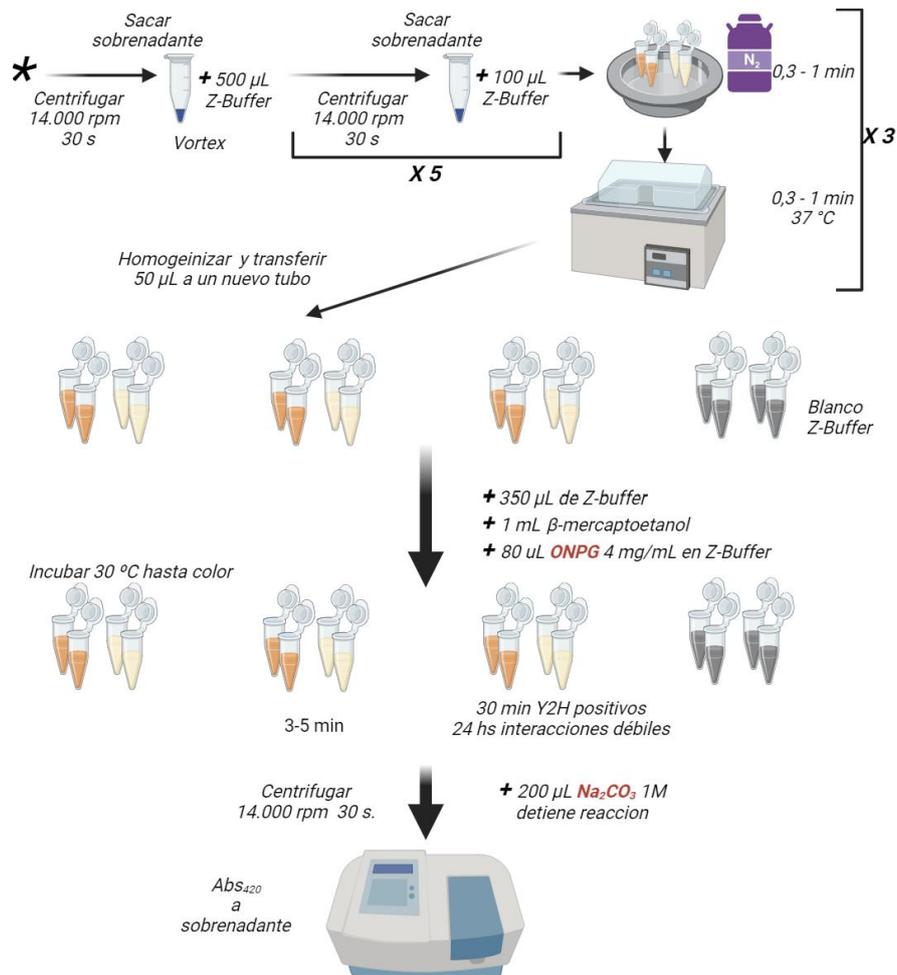


Figura 23. Esquema de los pasos finales del ensayo DHLm. BioRender.

3.4.3 Cálculo de la actividad de la β-galactosidasa

1 unidad de β-galactosidasa se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1 µmol de ONPG a amarillo de O-nitrofenol y D-galactosa por minuto (Ec. 2).

$$U_{\beta\text{-galactosidasa}} = \frac{1000 * Abs_{420}}{t \text{ (min)} * V \text{ (mL)} * DO_{600}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde Abs_{420} es la absorbancia medida a 420 nm; t es el tiempo en minutos que tardó la aparición del color amarillo; V es el volumen de células en mL que se utilizó para realizar la reacción, multiplicado por el factor de dilución; DO_{600} es la densidad optica medida a 600 nm.

Cada ensayo se realizó por duplicado biológico y por duplicados técnicos. Para evaluar el nivel de significancia, se utilizó el Test de Student con datos despareados de dos colas y se estableció la significancia para los datos con un p valor < 0.05.

3.5 PCR de colonia

Se verificó la presencia del inserto en los plásmidos en una PCR en tiempo final, utilizando como único cebador directo a T7-F y como cebador reverso pAD-R o pBD-R en los vectores carnada y presa respectivamente:

T7-F: 5´- taatacgactcactataggg - 3´
pAD-R: 5´- agatggtgcacgatgcacag - 3´
pBD-R: 5´- ttttcgttttaaacctaagagtc - 3´

Se utilizó 2,4 µL de Buffer 10x Complete II KCl, 2 µL de dNTPs 10 mM, 1 µL de primer T7-F 10 µM, 1 µL de primer pAD-R 10 µM o 10 µL de primer pBD-R 10 µM según corresponda, 0,3 µL Taq Bioron 5 U/µL (Bioline), y se completa con H₂O en un volumen final de reacción de 25 µL. Se utilizó el programa mostrado en la Tabla 4 y el termociclador Eppendorf Mastercycler Personal (Eppendorf).

Los productos de PCR así obtenidos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa 1 %.

Tabla 4. Programa de amplificación por PCR

Etapas	Tiempo	Temperatura (°C)	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	5 minutos	94	1
Desnaturalización	20 segundos	94	
Hibridación	30 segundos	55	30
Extensión	2 min. 30 seg.	72	
Extensión final	7 minutos	72	1

3.6 Electroforesis en gel de agarosa 0,8% y 1%

Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa 1 % en buffer TAE 1 X junto con el marcador de peso molecular para ADN GeneRuler 1 kb DNA ladder (Thermo Fisher) (Fig. 24). Los ácidos nucleicos fueron visualizados mediante la incorporación al gel del agente intercalante SYBR SafeDNA Gel Stain (Thermo Fisher) en el equipo Fast Gene Gel Pic LED Box (Genetics).

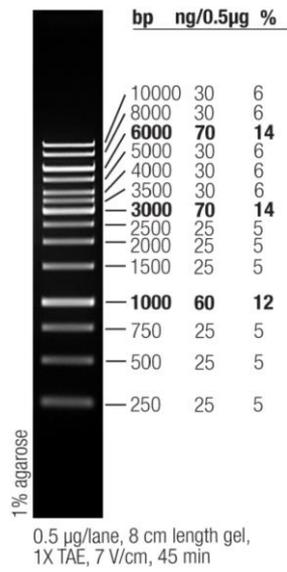


Figura 24. Marcador de peso molecular para ADN GeneRuler 1 kb DNA ladder (Thermo Fisher)

4. Resultados y discusión

4.1 Co-transformación y eficiencia de transformación

En primer lugar evaluamos la concentración y pureza de los plásmidos utilizados para realizar los ensayos de DHLm (Tabla 5).

Tabla 5. Cuantificación y pureza de las soluciones con los plásmidos

Plásmido	Concentración (ng/ μ L)	Abs ₂₆₀ /Abs ₂₈₀
pGADT7-Tag	722,8	1,86
pGBKT7-p53	870,2	1,89
pGBKT7-Lam	1078,1	1,90
pGADT7-Eg2DBD α .1-EF	721,0	1,89
pGBKT7-Eg2DBD α .1-EF	745,1	1,93

Todos los plásmidos de los ensayos, así como los controles fueron purificados y se evaluó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8% (Fig. 25).

Estos resultados nos permitieron verificar que los plásmidos utilizados en el ensayo de DHLm se encontraban con alta concentración e índice de pureza.

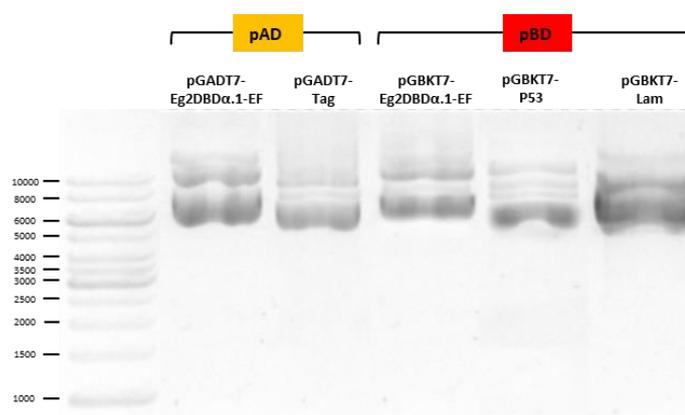


Figura 25. Electroforesis en agarosa 0,8 % de los plásmidos utilizados en los ensayos de co-transformación.

Todos los plásmidos utilizados fueron secuenciados (servicio Macrogen) confirmándose la identidad de los mismos (Anexo 7.6).

4.1.1 Puesta a punto de la Co-transformación

Para realizar el ensayo de DHLm se llevaron a cabo tres co-transformaciones utilizando el protocolo estándar en levaduras *S. cerevisiae* Y187: 1) pGADT7-Tag y pGBKT7-Lam como control negativo 2) pGADT7-Tag y pGBKT7-p53 como control positivo; 3) sin vectores; 4) pGADT7-Eg2DBD α .1-EF y pGBKT7-Eg2DBD α .1-EF siendo el ensayo de interés a validar (Fig. 26A).

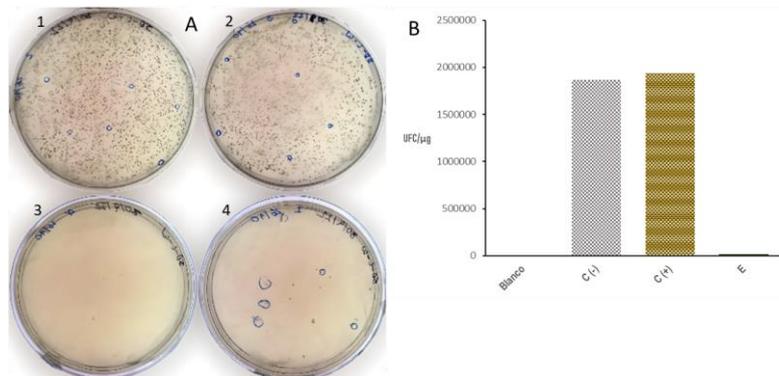


Figura 26. A- Co-transformación en placas SD/-Leu/-Trp: 1) pGADT7-Tag y pGBKT7-p53 como control positivo; 2) pGADT7-Tag y pGBKT7-Lam como control negativo; 3) sin vectores; 4) pGADT7-Eg2DBD α .1-EF y pGBKT7-Eg2DBD α .1-EF (ensayo de interés). B- Gráfica de eficiencia de transformación UFC/ug

Las co-transformaciones controles negativo, positivo y sin vectores fueron exitosas, obteniéndose un alto número de colonias co-transformadas en los controles. Sin embargo, la co-transformación 4 (ensayo 4), con pGADT7-Eg2DBD α .1-EF y pGBKT7-Eg2DBD α .1-EF, denominado E (Fig. 26B), rindió un bajo número de colonias (menor a 30) lo que impidió validar el experimento y tampoco calcular la eficiencia de transformación según el protocolo *Yeast Protocols Handbook*, 2009 .

Dado que una de las posibilidades es que estemos ante una baja eficiencia de transformación donde los plásmidos pGADT7-Eg2DBD α .1-EF y pGBKT7-Eg2DBD α .1-EF no sean bien incorporados, nos propusimos usar un nuevo protocolo de alta eficiencia de transformación basado en lo realizado por Yu y colaboradores en 2016 y 2019 (Yu et al., 2016; Yu et al., 2019). Dicho protocolo se sustenta en que la eficacia de la transformación de la levadura está determinada por la tasa de endocitosis la cual está influida por el complejo de señalización TORC1 que es inducido principalmente por los aminoácidos del medio. Tomando en cuenta esto, se agregó al buffer de transformación One-step el DO-L-W (10X Dropout System) que contiene las bases nitrogenadas adenina y uracilo, inositol y ácido p-aminobenzoico, y todos los aminoácidos menos leucina y triptófano (LiAc/PEG/DTT + DO-L-W). Esta co-transformación se hizo dos veces con 1 y 0,5 uL ADN de cada vector en un volumen final de 500 uL aproximadamente, en paralelo se realizó el protocolo estándar con las mismas cantidades de ADN (Fig. 27A).

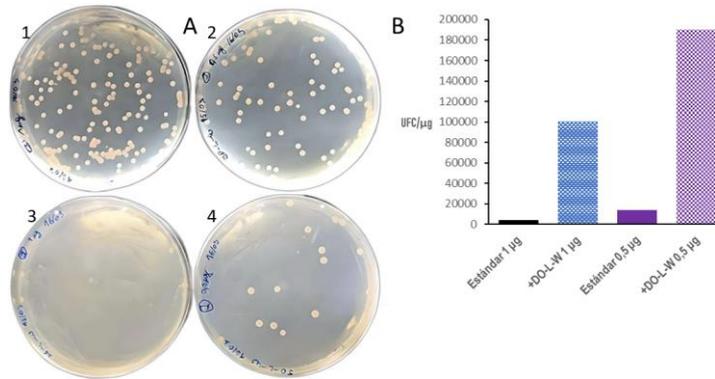


Figura 27. A- Placas de siembra en superficie en medio sintético mínimo SD/-Leu/-Trp. 1 y 2- +DO: con 1 ug de ADN de pGADT7-Eg2DBD α .1-EF y pGBKT7-Eg2DBD α .1-EF, y 0,5 ug de ADN pGADT7-Eg2DBD α .1-EF y pGBKT7-Eg2DBD α .1-EF. 3 y 4- Placas de abajo utilizando protocolo estándar de izquierda a derecha: con 1 ug de ADN y 0,5 ug de ADN. B - Gráficas de eficiencia de transformación UFC/ug de las colonias de las placas individuales +DO-L-W con 1 ug de ADN y 0,5 ug de ADN y estándar con 1 ug de ADN y 0,5 ug de ADN. C- Eficiencia de transformación tomando en conjunto los dos ensayos +DO-L-W con 1 ug de ADN y 0,5 ug de ADN por un lado, y estándar con 1 ug de ADN y 0,5 ug de ADN, por el otro.

Se logro aumentar varios órdenes la eficiencia de transformación de las colonias de las placas individuales +DO-L-W con 1 ug de ADN y 0,5 ug de ADN y estándar con 1 ug de ADN y 0,5 ug de ADN (Fig. 26B). Aumentó significativamente la eficiencia de transformación tomando en conjunto los dos ensayos con +DO-L-W Con 1 ug de ADN y 0,5 ug de ADN y estándar con 1 ug de ADN y 0,5 ug de ADN, siendo 25 veces mayor en el protocolo en medio sintético en presencia de aminoácidos y otros nutrientes que el estándar. Además, se pudo aumentar la eficiencia de transformación con menos cantidad de ADN y de reactivos, siendo la mitad de lo utilizado en el protocolo estandar, conservando la misma concentración.

La baja eficiencia de transformación observada en la placa ensayo (4) de la Figura 26 en relación a la placas control, pudo haberse debido a que la expresión de Eg2DBD α .1-EF resultara ser tóxica para las levaduras.

4.1.2 Confirmación mediante PCR en colonia

Si bien para que las colonias de levaduras puedan crecer en el medio SD/-Leu/-Trp tienen que portar los plásmidos pGADT7 y pGBKT7, nos propusimos confirmar la presencia de los insertos de estos plásmidos en los clones seleccionados para el ensayo de DHLm se realizó PCR de colonia. Se testearon tres colonias aisladas de los aislamientos de la primer co-transformacion (Fig 26A) utilizando cebadores específicos de los plásmidos utilizados según se indica en MyM (sección 3.5) para así

amplificar los fragmentos de ADN clonados en cada caso desde la región 5' del MCS con el primer forward T7-F hasta unos pb después del sitio de multiclonado de los vectores pGBKT7 y pGADT7 de los ensayos con primers reverse pBD-R y pAD-R respectivamente, cuyos tamaños esperados se ven en la Tabla 6.

Los productos de PCR se denominan como los clones seleccionados de cada co-transformación C(-)1, C(-)2 y C(-)3 (control negativo), C(+1), C(+2) y C(+3) (control positivo) y E1, E2 y E3 (ensayo) (Fig. 20 y 26).

Tabla 6. Tamaño esperado de los productos de PCR de colonias.

Co-transf.	Vector carnada pGBKT7	Tamaño (pb)	Vector presa pGADT7	Tamaño (pb)
C(+)	pGBKT7-P53	1369	pGADT7-Tag	2183
C(-)	pGBKT7-Lam	799	pGADT7-Tag	2183
E	pGBKT7-Eg2DBD α .1-EF	1480	pGADT7-Eg2DBD α .1-EF	1349

Los productos de PCR obtenidos se someten a electroforesis en gel de agarosa 1% para separarlos por tamaño.

Se logró amplificar el inserto del plásmido pGADT7-Tag a partir de las colonias C(+1), C(+2), C(+3), C(-1) y C(-2), ya que se obtuvo una banda de ADN mayoritaria de más de 2000 pb (entre 2000 y 2500 pb), siendo el tamaño esperado de 2183 pb (Fig. 27A) y los insertos p53 y Lam en los respectivos vectores carnada de los controles positivos y negativos en los tres casos cada uno.

La figura 28A también muestra la obtención de una banda de ADN cercana a 1500 pb correspondiente a los productos de PCR (pPCR) de pGADT7-Eg2DBD α .1-EF E1 y E2 (tamaño esperado 1349 pb), lo que confirma la presencia de este plásmido en las colonias E1 y E2. Sin embargo, no se visualizó ninguna banda de ADN en la muestra E3 (Fig 28A, muestra E3). Suponemos que pudo haber ocurrido inhibición de la reacción de PCR por exceso de muestra, ya que se observa en el pocillo una gran cantidad de ADN que probablemente venga acompañado de una alta cantidad de proteínas.

Por otro lado, se visualiza una banda de ADN mayor a 1500 pb en los pPCR de pGBKT7-Eg2DBD α .1-EF E1 y E2 (tamaño esperado 1480 pb), mientras que el pPCR de E3 es una banda menor a 1500 pb que confirma la presencia del inserto Eg2DBD α .1-EF en esta colonia (Fig 28B). La banda presente en E1 y E2, de mayor tamaño del esperado puede deberse a que el cebador pBD-R, recomendado por el manual de Matchmaker para secuenciar el plásmido pGBKT7, se une a una región 3' del sitio de policlonado del plásmido pGADT7 (3641-3664 pb) generando un pPCR de pGADT7-Eg2DBD α .1-EF de 1761 pb. Suponemos que no se visualizó la banda esperada de la amplificación de pGBKT7-Eg2DBD α .1-EF en E1 y E2 debido al secuestro de los cebadores para la amplificación de pGADT7-Eg2DBD α .1-EF posiblemente por encontrarse este plásmido en mayor concentración.

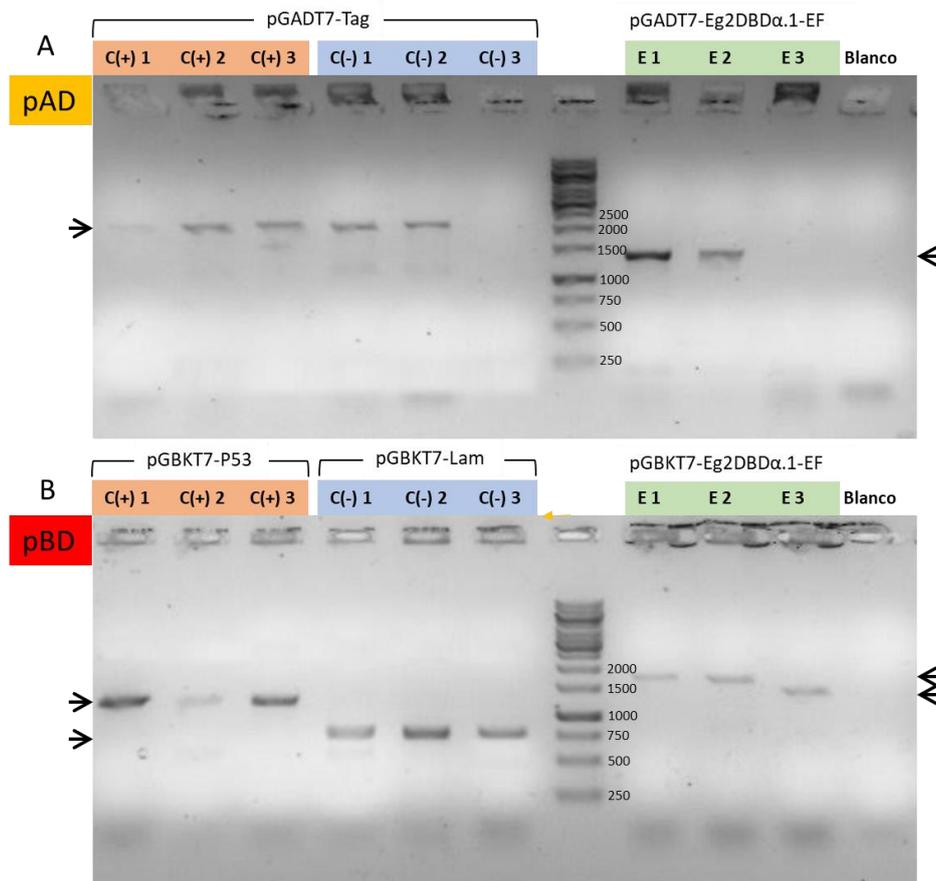


Figura 28. Electroforesis en agarosa 1% de los productos de las PCRs de colonias. A) PCRs con cebadores T7-F y pAD-R, para vectores presa. B) PCRs con cebadores T7-F y pBD-R, para vectores carnada. Las flechas indican las bandas obtenidas en cada amplificación.

También se hizo PCR colony de la co-transformación mejorada con +DO/-Leu/-Trp, pero a pesar de aumentar la eficiencia de co-transformación no fue posible validar el éxito de esta co-transformación con el nuevo protocolo ya que las PCR colony no tuvieron éxito en amplificar.

4.2 DHLm

El sistema in vivo de DHL tiene la ventaja de que es un sistema eucariota representativo del organismo en estudio donde posiblemente las proteínas expresadas se encuentren en sus conformaciones nativas.

A través del ensayo de DHLm nos propusimos evaluar si la homodimerización del receptor nuclear en estudio podría verse inducida por la unión de algún ligando presente en el suero de terneros recién nacidos (hospedero intermediario de *E. granulosus s.l.*), buscando así describir una posible comunicación hospedero-parásito (Fig. 29). Suponemos que la presencia de ácidos grasos

poliinsaturados en el NBCS, como el ácido oleico, linoleico y araquidónico, induce la homodimerización del dominio de unión a ligandos (LBD). Esta interacción activa funcionalmente el factor de transcripción Gal4p, lo que, a su vez, permite la expresión de la β -galactosidasa. Por lo tanto, la medida de la actividad enzimática se convierte en un indicador indirecto de la interacción entre los dos LBDs, aunque no permite la obtención de parámetros de afinidad a partir de los datos obtenidos.

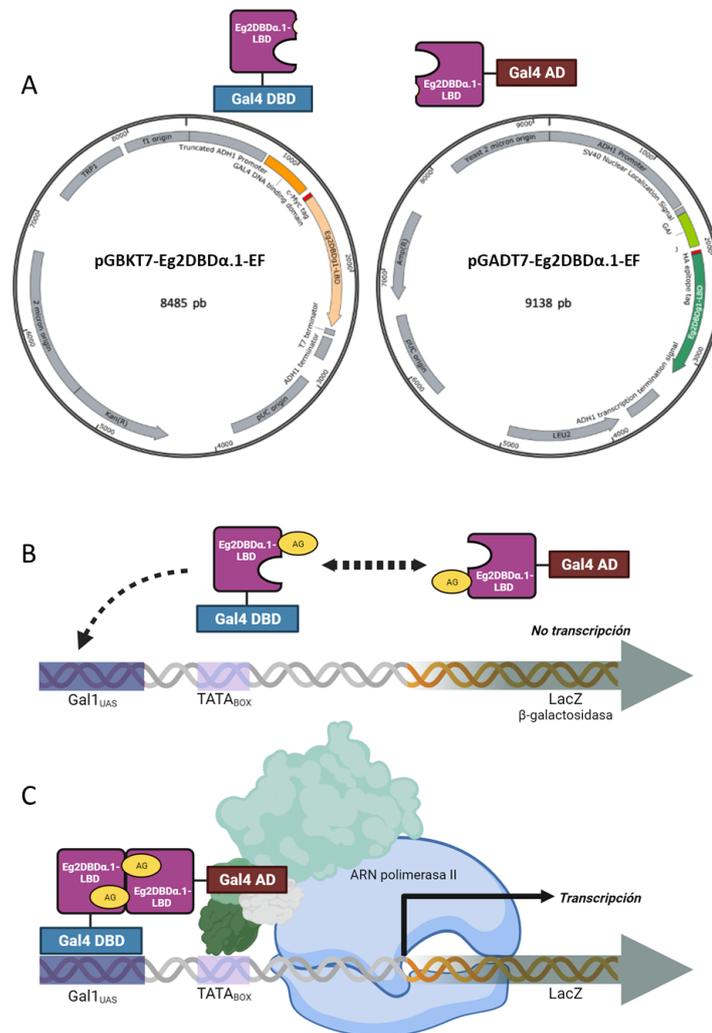


Figura 29. Hipótesis del mecanismo de acción de Eg2DBDα.1. A- Los vectores carnada y presa expresan codifican las proteínas de fusión conteniendo los dominios E-F. B y C) Posiblemente, luego de la unión de un ligando por ej. un ácido graso al bolsillo hidrofóbico de unión a ligando (LBP) del LBD, este sería capaz de interactuar consigo mismo formando homodímeros a través del LBD y activar la transcripción del gen de la β -galactosidasa. BioRender.

En este ensayo se midió la actividad β -galactosidasa producto del gen LacZ mediante una reacción colorimétrica, ya que la misma es dependiente del grado de dimerización. Este ensayo se realizó en presencia y ausencia de NBCS utilizando colonias de levaduras Y187 co-transformadas con:

1) pGADT7-T y pGBKT7-53 como control positivo; 2) pGADT7-T y pGBKT7- Lam como control negativo; 3) pGADT7-Eg2DBD α .1-EF y pGBKT7-Eg2DBD α .1-EF como Ensayo.

Como se puede ver en la Figura 30A, el control positivo mostró una fuerte actividad β -galactosidasa tanto en ausencia como en presencia de NBCS sin diferencia significativa entre ellos. El control negativo, mostró una actividad β -galactosidasa muy baja casi nula en las dos condiciones ensayadas. Tanto el control negativo como el control positivo validan el ensayo de DHLm.

El Ensayo mostró baja actividad tanto en ausencia como en presencia del NBCS sin embargo, la actividad de E es 7 veces mayor que C(-) y la de E-NBCS es 17 veces mayor que C(-)-NBCS (Fig 30B).

A pesar de no detectarse una aumento significativo de la actividad enzimática de E-NBCS respecto a E (Fig 30B), al graficar los resultados de los ensayos de cada colonia (E1 y E2) por separado observamos que hay una clara tendencia al aumento de la actividad en E1-NBCS de 1,6 veces y en E2-NBCS de 1,8 veces respecto a E1 y E2 respectivamente (Fig 30 C y D).

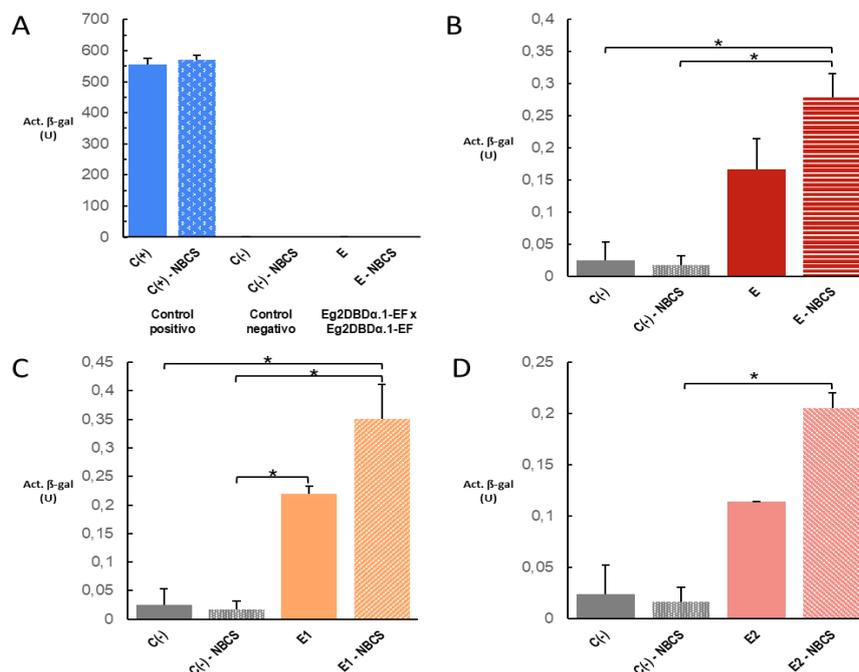


Figura 30. Ensayos de actividad β -galactosidasa de los DHLm. Se grafica la actividad β -galactosidasa (U) para cada ensayo de DHL modificado. * diferencia significativa con un p valor < 0,05. A- Todos los ensayos agrupados : C(+), C(-) y E con y sin NBCS. B- Promedio de las réplicas biológicas del ensayo E con NBCS y sin NBCS comparado con el del C (-). C- El duplicado técnico comparado con C(-). D- El duplicado técnico E2 comparado con C(-).

El bajo nivel de la actividad del E podría deberse a que la interacción de Eg2DBD α .1-EF consigo mismo sea baja en las condiciones ensayadas. También podríamos estar ante un falso negativo

biológico donde las proteínas no pueden plegarse intracelularmente correctamente o no se efectúan las modificaciones postraduccionales necesarias para una dimerización fuerte. Se ha reportado la necesidad de varios NRs de portar modificaciones post-traduccionales para plegarse correctamente (McEwan, 2016). También podría ocurrir que la expresión de las proteínas de fusión sea tóxica o éstas proteínas exógenas sean inestables en levaduras (Mehla et al., 2017).

Nos llama la atención que estudios similares de nuestro grupo mostraron actividad β -galactosidasa 2,3 veces mayor en presencia de 5% de suero fetal bovino (SFB) que en ausencia del mismo (Blanco et al., 2023). Sin embargo en nuestros ensayos se utilizó suero de ternero recién nacido que puede contener una composición lipídica diferente a SFB utilizado previamente. El SFB posiblemente sea más rico en ácidos grasos que el NBS, ya que en el feto se da un crecimiento y proliferación celular muy rápidos, siendo estas moléculas necesarias para la síntesis de membranas celulares y subcelulares. Es necesario repetir el ensayo con más colonias, y hacer en paralelo el ensayo con SFB para confirmar esta última hipótesis. Además, sería interesante realizar el ensayo de DHLm con construcciones plasmídicas conteniendo el ADNc de Eg2DBD α .1 completo, ya que en los DBDs se encuentran las cajas D que participarían en la dimerización de otros NRs (Weikum et al., 2018).

5. Conclusiones y perspectivas

Pudimos llevar a cabo las actividades propuestas para realizar el ensayo de DHLm.

Logramos co-transformaciones de levaduras Y187 y optimización de la eficiencia, indicando que la presencia de medio sintético DO-Leu-Trp y una menor cantidad ADN contribuyeron a aumentar el número de colonias. Se verificó que al adicionar éste medio, aumentó significativamente la eficiencia de transformación de levaduras, haciéndolo con la mitad de reactivos del protocolo estándar..

Los ensayos de DHLm nos muestran una leve estimulación de la homodimerización Eg2DBD α .1 por la presencia de alguna molécula del NBCS que se uniría a este NR. Aunque los resultados del DHLm no fueron los esperados, los mismos nos generan más interrogantes que pueden ser contestadas mediante la realización de este ensayo con SFB y NBCS en paralelo. Por otro lado, cabe recordar que los ácidos oleico, linoleico y araquidónico serían los ligandos preferidos de Eg2DBD α .1 (Cancela et al, 2022), por lo que sería muy interesante realizar este ensayo con estos tres ligandos putativos. De esta forma, determinaremos cuál o cuáles ligandos se unirían a este NR estimulando la homodimerización del mismo en un sistema in vivo, aportando así a la dilucidación del mecanismo de acción de Eg2DBD α .1. El estudio de los Eg2DBDs es muy relevante ya que podrían convertirse en nuevos blancos de drogas antihelmínticas.

De cara al futuro sería interesante realizar el ensayo de DHLm con construcciones plasmídicas conteniendo el ADNc de Eg2DBD α .1 completo, ya que en los DBDs se encuentran las cajas D que participarían en la dimerización de otros NRs. Además sería importante adicionar otros ensayos para tener una mejor caracterización de Eg2DBD α .1, cómo determinar la presencia de la proteína mediante Western Blot, la ubicación subcelular mediante inmunofluorescencia y experimentos para la determinación de la afinidad de los ligandos anteriormente mencionados.

6. Bibliografía

- Agudelo Higueta, N. I., Brunetti, E., & McCloskey, C. (2016). Cystic Echinococcosis. *Journal of clinical microbiology*, 54(3), 518–523. <https://doi.org/10.1128/JCM.02420-15>
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 7th edition. New York : W. W. Norton & Company; 2022.
- Alliegro M. C. (2000). Effects of dithiothreitol on protein activity unrelated to thiol-disulfide exchange: for consideration in the analysis of protein function with Cleland's reagent. *Analytical biochemistry*, 282(1), 102–106. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4557>
- Alvite, G., & Esteves, A. (2012). Lipid binding proteins from parasitic platyhelminthes. *Frontiers in physiology*, 3, 363. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00363>
- Alvite, G., & Esteves, A. (2016). Echinococcus granulosus fatty acid binding proteins subcellular localization. *Experimental parasitology*, 164, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.02.002>
- Alvite, G., Riera, X., Cancela, S., Paulino, M., & Esteves, A. (2019). Bioinformatic analysis of a novel Echinococcus granulosus nuclear receptor with two DNA binding domains. *PloS one*, 14(11), e0224703. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224703>
- Alvite, G and Esteves, A. (2011). *Lipidic metabolism in parasitic platyhelminthes*. Research in Helminths, 2011:000-000 ISBN: 978-81-7895-515-5. Biochemistry Section, Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Sciences UdelaR, Iguá 4225, Montevideo, Uruguay
- Benelli, G., Wassermann, M., & Brattig, N. W. (2021). Insects dispersing taeniid eggs: Who and how?. *Veterinary parasitology*, 295, 109450. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109450>
- Bhutani, N., & Kajal, P. (2018). Hepatic echinococcosis: A review. *Annals of medicine and surgery* (2012), 36, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2018.10.032>
- Blanco, V., Mozzo, B., & Alvite, G. (2023). Dimerization, host-parasite communication and expression studies of an Echinococcus granulosus 2DBD nuclear receptor. *Parasitology research*, 10.1007/s00436-023-07905-4. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s00436-023-07905-4>
- Bosco, A., Alves, L.C., Cocianic, P. et al. (2021). Epidemiology and spatial distribution of Echinococcus granulosus in sheep and goats slaughtered in a hyperendemic European Mediterranean area. *Parasites Vectors* 14, 421 . <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04934-9>
- Brehm, K., & Koziol, U. (2017). Echinococcus-Host Interactions at Cellular and Molecular Levels. *Advances in parasitology*, 95, 147–212. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.09.001>

- Brent, R., & Ptashne, M. (1985). A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell*, 43(3 Pt 2), 729–736. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90246-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90246-6)
- Brouwers, J. F., Smeenk, I. M., van Golde, L. M., & Tielens, A. G. (1997). The incorporation, modification and turnover of fatty acids in adult *Schistosoma mansoni*. *Molecular and biochemical parasitology*, 88(1-2), 175–185. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(97\)00091-1](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(97)00091-1)
- Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D., & Schlattner, U. (2009). Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *International journal of molecular sciences*, 10(6), 2763–2788. <https://doi.org/10.3390/ijms10062763>
- Busto Bea, V., Barrio Andrés, J., & Almohalla Álvarez, C. (2016). Hidatidosis hepática: todavía un problema [Liver hydatid disease: Still a problem]. *Medicina clinica*, 146(8), 367–371. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2015.12.005>
- Butin-Israeli, V., Ben-nun-Shaul, O., Kopatz, I., Adam, S. A., Shimi, T., Goldman, R. D., & Oppenheim, A. (2011). Simian virus 40 induces lamin A/C fluctuations and nuclear envelope deformation during cell entry. *Nucleus (Austin, Tex.)*, 2(4), 320–330. <https://doi.org/10.4161/nucl.2.4.16371>
- Cancela, S., Esteves, A., Alvite, G., & Paulino, M. (2023). Modeling, molecular dynamics and docking studies of a full-length *Echinococcus granulosus* 2DBD nuclear receptor. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, 41(4), 1414–1423. <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.2023641>
- Cheever, M., Master, A., & Versteegen, R. (2017). A method for differentiating fetal bovine serum from newborn calf serum. *BioProcess J*, 16(1).
- Cheng Y, Chen J, Mukhtar I and Chen J (2021) Genome-Wide Characterization of the Nuclear Receptor Gene Family in *Macrostomum lignano* Imply Its Evolutionary Diversification. *Front. Mar. Sci.* 8:653447. doi: 10.3389/fmars.2021.653447
- Cucher, M. A., Macchiaroli, N., Baldi, G., Camicia, F., Prada, L., Maldonado, L., Avila, H. G., Fox, A., Gutiérrez, A., Negro, P., López, R., Jensen, O., Rosenzvit, M., & Kamenetzky, L. (2016). Cystic echinococcosis in South America: systematic review of species and genotypes of *Echinococcus granulosus sensu lato* in humans and natural domestic hosts. *Tropical medicine & international health : TM & IH*, 21(2), 166–175. <https://doi.org/10.1111/tmi.12647>
- Deplazes, P., Rinaldi, L., Alvarez Rojas, C. A., Torgerson, P. R., Harandi, M. F., Romig, T., Antolova, D., Schurer, J. M., Lahmar, S., Cringoli, G., Magambo, J., Thompson, R. C., & Jenkins, E. J. (2017). Global Distribution of Alveolar and Cystic Echinococcosis. *Advances in parasitology*, 95, 315–493. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.11.001>
- Egriboz, O., Goswami, S., Tao, X., Dotts, K., Schaeffer, C., Pilauri, V., & Hopper, J. E. (2013). Self-association of the Gal4 inhibitor protein Gal80 is impaired by Gal3: evidence for a new mechanism in the GAL gene switch. *Molecular and cellular biology*, 33(18), 3667–3674. <https://doi.org/10.1128/MCB.00646-12>

- Escriva, H., Safi, R., Hänni, C., Langlois, M. C., Saumitou-Laprade, P., Stehelin, D., Capron, A., Pierce, R., & 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*, 94(13), 6803–6808. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.13.6803>
- Esteves, A., & Alvite, G. (2022). Perspective Chapter: Parasitic Platyhelminthes Nuclear Receptors as Molecular Crossroads. *Parasitic Helminths and Zoonoses - From Basic to Applied Research*. doi: 10.5772/intechopen.102648
- Estojak, J., Brent, R., & Golemis, E. A. (1995). Correlation of two-hybrid affinity data with in vitro measurements. *Molecular and cellular biology*, 15(10), 5820–5829. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.10.5820>
- Evans, R. M., & Mangelsdorf, D. J. (2014). Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell*, 157(1), 255–266. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.012>
- Fields, S., & Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340(6230), 245–246. <https://doi.org/10.1038/340245a0>
- Filippou, D., Tselepis, D., Filippou, G., & Papadopoulos, V. (2007). Advances in liver echinococcosis: diagnosis and treatment. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 5(2), 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2006.08.017>
- Fischer, A., & Smiesko, M. (2020). Allosteric binding sites on nuclear receptors: Focus on drug efficacy and selectivity. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 534. <https://doi.org/10.3390/ijms21020534>
- Frigo, D. E., Bondesson, M., & Williams, C. (2021). Nuclear receptors: from molecular mechanisms to therapeutics. *Essays in biochemistry*, 65(6), 847–856. <https://doi.org/10.1042/EBC20210020>
- Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., & Laudet, V. (2006). Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacological reviews*, 58(4), 685–704. <https://doi.org/10.1124/pr.58.4.2>
- Giniger, E., & Ptashne, M. (1988). Cooperative DNA binding of the yeast transcriptional activator GAL4. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(2), 382–386. doi:10.1073/pnas.85.2.382
- Hickey, C. M., Wilson, N. R., & Hochstrasser, M. (2012). Function and regulation of SUMO proteases. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(12), 755–766. <https://doi.org/10.1038/nrm3478>
- Horvath, R., Hawe, N., Lam, C., Mestnikov, K., Eji-Lasisi, M., Rohde, J., & Sadowski, I. (2021). TORC1 signaling modulates Cdk8-dependent GAL gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 219(4), iyab168. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyab168>

- Huang, H., & Bader, J. S. (2009). Precision and recall estimates for two-hybrid screens. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 25(3), 372–378. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn640>
- Ishigami-Yuasa, M., & Kagechika, H. (2020). Chemical Screening of Nuclear Receptor Modulators. *International journal of molecular sciences*, 21(15), 5512. <https://doi.org/10.3390/ijms21155512>
- Johnston, M., Flick, J. S., & Pexton, T. (1994). Multiple mechanisms provide rapid and stringent glucose repression of GAL gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 14(6), 3834–3841. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.6.3834-3841.1994>
- Juers, D. H., Matthews, B. W., & Huber, R. E. (2012). LacZ β -galactosidase: structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 21(12), 1792–1807. <https://doi.org/10.1002/pro.2165>
- Kawai, S., Hashimoto, W., & Murata, K. (2010). Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi: methods and possible underlying mechanism. *Bioengineered bugs*, 1(6), 395–403. <https://doi.org/10.4161/bbug.1.6.13257>
- Korhonen, P.K., Kinkar, L., Young, N.D. et al. (2022). Chromosome-scale *Echinococcus granulosus* (genotype G1) genome reveals the Eg95 gene family and conservation of the EG95-vaccine molecule. *Commun Biol* 5, 199 <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03125-1>
- Koziol, L. F., Budding, D., Andreasen, N., D'Arrigo, S., Bulgheroni, S., Imamizu, H., Ito, M., Manto, M., Marvel, C., Parker, K., Pezzulo, G., Ramnani, N., Riva, D., Schmahmann, J., Vandervert, L., & Yamazaki, T. (2014). Consensus paper: the cerebellum's role in movement and cognition. *Cerebellum (London, England)*, 13(1), 151–177. <https://doi.org/10.1007/s12311-013-0511-x>
- Labanchi, J. L., Poggio, T. V., Gutiérrez, A., Mujica, G., Araya, D., Grizmodo, C., Calabro, A., Crowley, P., Arezo, M., Seleiman, M., Herrero, E., Sepulveda, L., Talmon, G., Diaz, O., & Larrieu, E. (2022). Analysis of vaccination strategy against cystic echinococcosis developed in the Province of Río Negro, Argentina: 12 years of work. *Veterinary parasitology*, 310, 109790. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2022.109790>
- Larrieu, E., Gavidia, C. M., & Lightowlers, M. W. (2019). Control of cystic echinococcosis: Background and prospects. *Zoonoses and public health*, 66(8), 889–899. <https://doi.org/10.1111/zph.12649>
- Laudet et al. (1999). Nuclear Receptors Nomenclature Committee . A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*, 97(2), 161–163. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80726-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80726-6)
- Lymbery A. J. (2017). Phylogenetic Pattern, Evolutionary Processes and Species Delimitation in the Genus *Echinococcus*. *Advances in parasitology*, 95, 111–145. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.07.002>

- Mandal, S., & Mandal, M. D. (2012). Human cystic echinococcosis: epidemiologic, zoonotic, clinical, diagnostic and therapeutic aspects. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 5(4), 253–260. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60035-2](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60035-2)
- Manterola, C., Totomoch-Serra, A., Rojas, C., Riffo-Campos, Á. L., & García-Méndez, N. (2021). *Echinococcus granulosus sensu lato* Genotypes in Different Hosts Worldwide: A Systematic Review. *Acta Parasitologica*. doi:10.1007/s11686-021-00439-8
- Mazaira, G. I., Zgajnar, N. R., Lotufo, C. M., Daneri-Becerra, C., Sivils, J. C., Soto, O. B., Cox, M. B., & Galigniana, M. D. (2018). The Nuclear Receptor Field: A Historical Overview and Future Challenges. *Nuclear receptor research*, 5, 101320. <https://doi.org/10.11131/2018/101320>
- Melhorn H. (2008). *Encyclopedia of Parasitology*. 3rd Edition. Springer, Germany.
- Mehla, J., Caufield, J. H., Sakhawalkar, N., & Uetz, P. (2017). A Comparison of Two-Hybrid Approaches for Detecting Protein-Protein Interactions. *Methods in enzymology*, 586, 333–358. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.10.020>
- Mondal, M., Kundu, J. K., & Misra, K. K. (2016). Variation in lipid and fatty acid uptake among nematode and cestode parasites and their host, domestic fowl: host-parasite interaction. *Journal of parasitic diseases : official organ of the Indian Society for Parasitology*, 40(4), 1494–1518. <https://doi.org/10.1007/s12639-015-0718-5>
- Nakao, M., Lavikainen, A., Yanagida, T., & Ito, A. (2013). Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). *International journal for parasitology*, 43(12-13), 1017–1029. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.06.002>
- Nari, A. et al. (2003). Resistencia a los antiparasitarios: Estado actual con énfasis en América Latina. *Estudio FAO Producción y Sanidad Animal* 157. ISBN: 92-5-304967-7
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017). *Lehninger principles of biochemistry* (7th ed.). W.H. Freeman.
- OMS (2020). Echinococcosis: OMS. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/echinococcosis>
- Ostergaard, S., Walløe, K. O., Gomes, S. G., Olsson, L., & Nielsen, J. (2001). The impact of GAL6, GAL80, and MIG1 on glucose control of the GAL system in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research*, 1(1), 47–55. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2001.tb00012.x>
- Owen, G. I., & Zelent *, A. (2000). Origins and evolutionary diversification of the nuclear receptor superfamily. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 57(5), 809–827. doi:10.1007/s000180050043
- Oya, K., & Matsuura, A. (2022). Haploinsufficiency of the sex-determining genes at MAT α restricts genome expansion in *Saccharomyces cerevisiae*. *iScience*, 25(8), 104783. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104783>

- Paiano, A., Margiotta, A., De Luca, M., & Bucci, C. (2019). Yeast Two-Hybrid Assay to Identify Interacting Proteins. *Current protocols in protein science*, 95(1), e70. <https://doi.org/10.1002/cpps.70>
- Papageorgiou, L., Shalzi, L., Efthimiadou, A., Bacopoulou, F., Chrousos, G.P., Eliopoulos, E., & Vlachakis, D. (2021). Conserved functional motifs of the nuclear receptor superfamily as potential pharmacological targets. *International Journal of Epigenetics*, 1, 3. <https://doi.org/10.3892/ije.2021.3>
- Patel, S. R., & Skafar, D. F. (2015). Modulation of nuclear receptor activity by the F domain. *Molecular and cellular endocrinology*, 418 Pt 3, 298–305. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.07.009>
- Pavletic, C. F., Larrieu, E., Guarnera, E. A., Casas, N., Irabedra, P., Ferreira, C., Sayes, J., Gavidia, C. M., Caldas, E., Lise, M. L. Z., Maxwell, M., Arezo, M., Navarro, A. M., Vigilato, M. A. N., Cosivi, O., Espinal, M., & Vilas, V. J. D. R. (2017). Cystic echinococcosis in South America: a call for action. *Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health*, 41, e42. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2017.42>
- Penvose, A., Keenan, J.L., Bray, D. et al. (2019). Comprehensive study of nuclear receptor DNA binding provides a revised framework for understanding receptor specificity. *Nat Commun* 10, 2514. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10264-3>
- Porter, B. A., Ortiz, M. A., Bratslavsky, G., & Kotula, L. (2019). Structure and Function of the Nuclear Receptor Superfamily and Current Targeted Therapies of Prostate Cancer. *Cancers*, 11(12), 1852. <https://doi.org/10.3390/cancers11121852>
- Rajeshkannan, Mahilkar, A., & Saini, S. (2022). GAL Regulon in the Yeast *S. cerevisiae* is Highly Evolvable via Acquisition in the Coding Regions of the Regulatory Elements of the Network. *Frontiers in molecular biosciences*, 9, 801011. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.801011>
- Romig, T., Deplazes, P., Jenkins, D., Giraudoux, P., Massolo, A., Craig, P. S., Wassermann, M., Takahashi, K., & de la Rue, M. (2017). Ecology and Life Cycle Patterns of Echinococcus Species. *Advances in parasitology*, 95, 213–314. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.11.002>
- Serebriiskii, I. G., & Golemis, E. A. (2000). Uses of lacZ to Study Gene Function: Evaluation of β -Galactosidase Assays Employed in the Yeast Two-Hybrid System. *Analytical Biochemistry*, 285(1), 1–15. doi:10.1006/abio.2000.4672
- Serebriiskii, I. G., & Golemis, E. A. (2001). Two-hybrid system and false positives. Approaches to detection and elimination. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 177, 123–134. <https://doi.org/10.1385/1-59259-210-4:123>
- Sheppard, H. M., Corneillie, S. I., Espiritu, C., Gatti, A., & Liu, X. (1999). New insights into the mechanism of inhibition of p53 by simian virus 40 large T antigen. *Molecular and cellular biology*, 19(4), 2746–2753. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.4.2746>

- Shivhare, D., Musialak-Lange, M., Julca, I. et al. (2021). Removing auto-activators from yeast-two-hybrid assays by conditional negative selection. *Sci Rep* 11, 5477. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84608-9>
- Shivhare, D., Musialak-Lange, M., Julca, I. et al. (2021). Removing auto-activators from yeast-two-hybrid assays by conditional negative selection. *Sci Rep* 11, 5477. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84608-9>
- Silva Álvarez, María. Caracterización estructural y funcional del Antígeno B de *Echinococcus granulosus*. (2014). Tesis propuesta para optar por el Título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas en el Área Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de La Plata La Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Striebinger, H., Koegl, M., & Bailer, S. M. (2013). A high-throughput yeast two-hybrid protocol to determine virus-host protein interactions. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1064, 1–15. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-601-6_1
- Striebinger, H., Koegl, M., & Bailer, S. M. (2013). A high-throughput yeast two-hybrid protocol to determine virus-host protein interactions. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1064, 1–15. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-601-6_1
- Stynen, B., Tourneau, H., Tavernier, J., & Van Dijck, P. (2012). Diversity in genetic in vivo methods for protein-protein interaction studies: from the yeast two-hybrid system to the mammalian split-luciferase system. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 76(2), 331–382. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05021-11>
- Thompson, J. R., Register, E., Curotto, J., Kurtz, M., & Kelly, R. (1998). An improved protocol for the preparation of yeast cells for transformation by electroporation. *Yeast* (Chichester, England), 14(6), 565–571. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19980430\)14:6<565::AID-YEA251>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19980430)14:6<565::AID-YEA251>3.0.CO;2-B)
- Thompson, R. C., & Jenkins, D. J. (2014). *Echinococcus* as a model system: biology and epidemiology. *International journal for parasitology*, 44(12), 865–877. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.07.005>
- Thompson, R.C.A. (2017). Biology and Systematics of *Echinococcus*. *Advances in Parasitology*, 95, 65–109. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.07.001>
- Trimborn, L., Hoecker, U., & Ponnu, J. (2022). A Simple Quantitative Assay for Measuring β -Galactosidase Activity Using X-Gal in Yeast-Based Interaction Analyses. *Current protocols*, 2(5), e421. <https://doi.org/10.1002/cpz1.421>
- Tripp, J. D., Lilley, J. L., Wood, W. N., & Lewis, L. K. (2013). Enhancement of plasmid DNA transformation efficiencies in early stationary-phase yeast cell cultures. *Yeast* (Chichester, England), 30(5), 191–200. <https://doi.org/10.1002/yea.2951>
- Tsai, I., Zarowiecki, M., Holroyd, N. et al. (2013). The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature* 496, 57–63 . <https://doi.org/10.1038/nature12031>

- Velasco-Tirado, V., Alonso-Sardón, M., Lopez-Bernus, A., Romero-Alegría, Á., Burguillo, F. J., Muro, A., Carpio-Pérez, A., Muñoz Bellido, J. L., Pardo-Lledias, J., Cordero, M., & Belhassen-García, M. (2018). Medical treatment of cystic echinococcosis: systematic review and meta-analysis. *BMC infectious diseases*, 18(1), 306. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3201-y>
- Vidalain, P. O., Boxem, M., Ge, H., Li, S., & Vidal, M. (2004). Increasing specificity in high-throughput yeast two-hybrid experiments. *Methods (San Diego, Calif.)*, 32(4), 363–370. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2003.10.001>
- Vuitton, D. A., McManus, D. P., Rogan, M. T., Romig, T., Gottstein, B., Naidich, A., Tuxun, T., Wen, H., Menezes da Silva, A., & World Association of Echinococcosis (2020). International consensus on terminology to be used in the field of echinococcoses. *Consensus international sur la terminologie à utiliser dans le domaine des échinococcoses. Parasite (Paris, France)*, 27, 41. <https://doi.org/10.1051/parasite/2020024>
- Wang, Z., Schaffer, N. E., Kliever, S. A., & Mangelsdorf, D. J. (2017). Nuclear receptors: emerging drug targets for parasitic diseases. *The Journal of clinical investigation*, 127(4), 1165–1171. <https://doi.org/10.1172/JCI88890>
- Watson, Baker, Bell, Gann, Levine, Losick. 7th Edición. *Molecular Biology of the Gene*. Editorial Pearson
- Weikum, E. R., Liu, X., & Ortlund, E. A. (2018). The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 27(11), 1876–1892. <https://doi.org/10.1002/pro.3496>
- Wen, H., Vuitton, L., Tuxun, T., Li, J., Vuitton, D. A., Zhang, W., & McManus, D. P. (2019). Echinococcosis: Advances in the 21st Century. *Clinical microbiology reviews*, 32(2), e00075-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00075-18>
- Woolsey, I.D., Miller, A.L.(2021).Echinococcus granulosus sensu lato and Echinococcus multilocularis: A review.Res.Vet.Sci.135,517–522.
- Wu, W., & LoVerde, P. T. (2019). Nuclear hormone receptors in parasitic Platyhelminths. *Molecular and biochemical parasitology*, 233, 111218. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2019.111218>
- Wu, W. et al. (2006).Schistosoma mansoni (Platyhelminthes, Trematoda) nuclear receptors:sixteen new members and a novel subfamily.Gene,366:303–15.
- Wu, W. et al. (2007).Evolution of a novel subfamily of nuclear receptors with members thateach contain two DNA binding domains.BMC.Evol.Biol.,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

- Yu, S. C., Dawson, A., Henderson, A. C., Lockyer, E. J., Read, E., Sritharan, G., Ryan, M., Sgroi, M., Ngou, P. M., Woodruff, R., Zhang, R., Ren Teen Chia, T., Liu, Y., Xiang, Y., & Spanu, P. D. (2016). Nutrient supplements boost yeast transformation efficiency. *Scientific reports*, 6, 35738. <https://doi.org/10.1038/srep35738>
- Yu, S. C., Kuemmel, F., Skoufou-Papoutsaki, M. N., & Spanu, P. D. (2019). Yeast transformation efficiency is enhanced by TORC1- and eisosome-dependent signaling. *MicrobiologyOpen*, 8(5), e00730. <https://doi.org/10.1002/mbo3.730>
- Zheng, H., Zhang, W., Zhang, L. et al. (2013). The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*. *Nat Genet.* 45, 1168–1175. <https://doi.org/10.1038/ng.2757>

7. Anexo

7.1 Medio enriquecido YPDA

1. Preparar para 1 L:
 - 20 g de peptona
 - 20 g de glucosa
 - 10 g de extracto de levadura
 - 15 mL de adenina hemisulfato 0,2% (Sigma)
 - H₂O c.s.p. 1 L
2. Autoclavar durante 15 minutos

7.2 Medio definido selectivo SD/-Leu/-Trp

1. Preparar para 1 L:
 - 6,8 g de base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos (SD, Sigma)
 - 20 g de glucosa
 - 0,64 g de DO/-Leu/-Trp (Sigma)
 - H₂O c.s.p. 1 L

Si se desea preparar medio sólido agregar:

 - 20 g de agar
2. Autoclavar durante 15 minutos

7.3 Transformación estándar de levadura Y2H

Soluciones:

Acetato de litio 1 M, pH 7,5 - Autoclave

60% PEG 3350 (algunos pueden permanecer sin disolver hasta que se esterilizan en autoclave) - Autoclave

1 M TDT (almacenar a – 20°C) - Filtro

DÍA 1

Inocular la cepa de levadura (AH109) en 20 ml de YPDA (YPD + hemisulfato de adenina + glucosa), de una colonia de al menos 2-3 mm de diámetro (o más), de una placa de < 3 meses. viejo.

Dejar crecer durante 16-18 horas a 30 °C, 200-250 RPM (OD₆₀₀ > 1,5)

DIA 2

Recoger las células de levadura por centrifugación 700 g 5 min RT

Resuspender el sedimento en 1 ml de “One-Step-Buffer”, preparado directamente sobre el sedimento de células de levadura de la siguiente manera (preparar a partir de soluciones frescas, << ¡1 año!):

LiCl 1 M - 200 µl (concentración final 0,2 M)

60 % PEG 3350 –670 µl (40 % de concentración final)

1 M de DTT (recién descongelado) – 100 µl (concentración final de 0,1 M)

Añadir 100 µl de las células de levadura resuspendidas a tubos Eppendorf de 1,5 ml que contienen 1 µg de cada plásmido y agitar.

Incubar 30 min a 45°C, mezclando bien cada 5-10 min.

Placa inmediatamente en SD – Leu – Trp e incubar las placas a 30 °C (las colonias tardarán varios días en crecer)

Pruebe la interacción Y2H resuspendiendo 3 colonias independientes en 100 µl de PBS cada una y colocando 10 µl de cada una en:

SD – Leu – Trp (todos deberían crecer)

Incubar las placas a 30 °C 72 h.

7.4 Transformación modificada con DO-Leu-Trp de levadura Y2H

Soluciones:

Acetato de litio 1 M, pH 7,5 - Autoclave

60% PEG 3350 (algunos pueden permanecer sin disolver hasta que se esterilizan en autoclave) - Autoclave

1 M TDT (almacenar a – 20°C) - Filtro

DÍA 1

Inocular la cepa de levadura (AH109) en 20 ml de YPDA (YPD + hemisulfato de adenina + glucosa), de una colonia de al menos 2-3 mm de diámetro (o más), de una placa de < 3 meses. viejo.

Dejar crecer durante 16-18 horas a 30 °C, 200-250 RPM (OD600 > 1,5)

DIA 2

Recoger las células de levadura por centrifugación 700 g 5 min RT

Resuspender el sedimento en 1 ml de “One-Step-Buffer”, preparado directamente sobre el sedimento de células de levadura de la siguiente manera (preparar a partir de soluciones frescas):

LiCl 1 M - 100 µl (concentración final 0,2 M)

60 % PEG 3350 – 335 µl (40 % de concentración final)

1 M de DTT (recién descongelado) – 50 µl (concentración final de 0,1 M)

Añadir 100 µl de las células de levadura resuspendidas a tubos Eppendorf de 1,5 ml que contienen 1 µg de cada plásmido y agitar. A otros 100 µl de las células de levadura resuspendidas a tubos Eppendorf de 1,5 ml que contienen 0,5 de cada plásmido.

Incubar 30 min a 45°C, mezclando bien cada 5-10 min.

Placa inmediatamente en SD – Leu – Trp e incubar las placas a 30 °C (las colonias tardarán varios días en crecer)

Pruebe la interacción Y2H resuspendiendo 3 colonias independientes en 100 µl de PBS cada una y colocando 10 µl de cada una en:

SD – Leu – Trp (todos deberían crecer)

Incubar las placas a 30 °C 72 h.

7.5 Doble híbrido de levadura modificado

Ensayo con 3 colonias separadas y realizar el ensayo en triplicado

Materiales:

- Precultivo 3 mL SD-L-W
- Z-Buffer
- β -mercaptoetanol
- ONPG
- 1M Na₂CO₃

Procedimiento

Día 1

1. Precultivo de 3 mL en SD-L-W a 30°C – DO₆₀₀>1,5

Día 2

1. Vortexear (0.5 a 1 min) el cultivo para dispersar las células y transferir 750 μ L a 3 mL en SD-L W. (2 tubos – una va con ligando otro va con etanol/medio) hacer un tubo mas para seguir OD sin ligando
2. Colocar ligando
 - SFB 5 % (197,4 μ L)
3. Incubar el cultivo a 30°C por 3-5 horas con agitación (230-250 rpm) hasta que OD₆₀₀ = 0.5-0.8. (vortexear bien antes de medir)
4. Colocar 500 μ L de cultivo en 3 Ependorff de 1,5 mL.
5. Centrifugar 14.000 rpm por 30 s.
6. Sacar el sobrenadante. Agregar 500 μ L de Z-Buffer y vortexear.
7. Centrifugar las células a 14.000 rpm por 30 s.
8. Resuspender en 100 μ L de Z-Buffer (concentramos 5 veces).
9. Colocar el tubo en nitrógeno liquido hasta congelar células (30s-1min).
- Gradilla bajita
10. Colocar tubos en baño a 37°C (30s-1min).
11. Repetir ciclo de congelado-descongelado dos veces mas. (Paso 10 y 11).
 - En este paso se puede pasar de nitrógeno al -80 y continuar ensayo otro día. Dia 3
 - 2 horas antes de empezar el ensayo preparar el ONPG: 4mg/mL en Z-Buffer (agitando 1-2 hs) 1. Homoginizar el extracto celular y transferir 50 μ L a un nuevo tubo
 - 2. Realizar 5 blanco con 50 μ L de Z-Buffer (se utiliza un blanco nuevo en cada medida) 3. Agregar 350 μ L de Z-buffer + β -mercaptoetanol a las reacciones (con células y blanco). 4. Incubar a 30°C.
 - 5. Comenzar el timer. Inmediatamente colocar 80 μ L de ONPG en Z-Buffer
 - a. Demora 3-5 min el control + - 30 min Y2H positivos - 24 hs interacciones débiles. b. Color amarillo no es estable, realizar blanco cada vez que se vaya a medir.
 - 6. Parar la reacción con 200 μ L de 1M Na₂CO₃ a las reacciones.
 - 7. Centrifugar los tubos a 14.000 rpm y transferir el sobrenadante en una cubeta limpia. 8. Medir las OD₄₂₀ relativas al blanco (debe ser entre 0.2 – 1)
 - 9. Calcular las unidades de β -galactosidasa.

7.6 Secuencias

```
>H221205-022_A05_pAD-2DBD_AD-R.ab1 1407
CAGAACATGGCGGGGCTTTTCAGTATCTACGATTCATCTGCAGCTCGAGCTCCTACGGTTGCGTGGGCGGGTGGGTGGAGTCTAG
GAAGTTGGAGATTTGGTAGGGATTGGCTGACGAGATAGCGGGAGCGGTGTCATTCAGCGATCTTGAATGGACCACCGGGATCCTCTGGTTTA
ATGCTACCCGGCGGATTTGGCCAGTGTGCTGTAGAAGGGGGGGGACACCATGTGGAACCTGACGGACGCATAGCAGCTGGCTGCTGAATCAACG
TGGAAGCCGATGGAAAATGTGTCAAGTTTGTGGCATCGGTTCGTGGACTGAGCCGTCAGTGCAGAAACAGTCATAAGAGAGTGTGGCGGAAAGC
ACTTTCCCGGATTTTCATACATCTCCACGTAGAGGTCTGGATAGCGCAAATCTGGTCGAGATCTTTGCAATGTTGTGCGATTTCTCGATACTCC
CTACTCATCGATGAAAGCATCTCACTCATGGCTTCTAGACGGCTCCACTTATGGTCAACCCAGTTCTGAGACTCGTTTTGTGAGCGCATAGTTG
```

CGAGAAGGGAGTGCCTGGCCAGGAGCAATAACTTCTCGCGTCCATGTAAGCTGGATTAGCGAGAATATAGTAGTATCTAAGAATCCCGATGCC
GCAGACGTAGACGAATTCGTGTGAGTTAGATTGAGCTGTTGAAAAAATCGACCTGAGATTTTGAGATGTTCAACGACCCGTGTTGATAGTGGG
AAGTGGCGCAGAACGATATCACGTTCCGGTGGGAGAGAAGTCCAAGAAGTTGTAACGATCCCTCAGCAGCGTCGTAATCACGCGACAGCATTAGCA
AAACCTCGGAGTAAAGGCTTGCTCGCACCAAATGACCTCTGCGGGACAACTCATCTGATTGAAACCTGGAATCAGCTTAGCGAATTTGGACGAC
TTGTTGAGAGTGAAGTGGTTCATCAGCTGATCCCATCCATCCGTTGCTGATCGTCAAGCTGTCAGCCTGTGACGGCTCGATGGTCTCATGTCGAAA
CGAGATTTGAAGTACGTGGCTGGAAATCGCATGAACTCCATGGCCATGCGCATTCCGTAATTGAACCAATTTAGTCCATCCACAGAATCTCCTC
AATCGTCCCAACACTCCAGCCACTGCTGCCCCCGCACTGCTGATGCTTCCGCAACAACCTGCGCCCTGACAATAATAAAGGAGGGGGCGGA
AAAGGTACTGTTGGAAAGCCTTTGGGGTCAAACCTCATTGAGCTTCCGGTACCCTATGGGTCCCCGGGGCGGCGCCCTAGGGGGAGA
AAAAAAAATCTTTTGGGTTGGGGTTCCCTCCCAAAAAAATACCCCTTTGGGGGAAACCCCGGTAACGTTATACGTGGCC

>H221205-022_003_pAD-2DBD_T7-F.ab1 1713

TTCCCTGGTAAACTACCACCTTCTTTAGAGGGCCAGCCCGTCCGGATGCTCCCACTCCGCCATGGCAGGCCACGGGCATCTC
TATTAACGGTACCTTCTCGTGTAAAAATTACACCTCAGTTAACTCTTATAATCGAAGCTCAATAAAAAATAACTAAAGGCTACCACGAAATCAT
AATTTTCAGTATGTTTGAAGAGATGGATCCGTACATACGAACAACCTCCTATCAGTGCAGTGCCTGTTCCCTCATATGATGTACCTGAACATC
CCACCTATGAGAGTATATTATGGCACCTAGACCACAAAAGAAATCATTCAAAATGATTTAAAGCTAACGTGCGACTGCTGGGATCAAAGCACAA
AATACACTTGCTGAATTGAGTGTGAGCCTGATTTTTCATCAAACCTAATTATTGACTGGAAAAATCTTGTGATCTCAACTTCCCTCGCTGGCT
TCCGAATCAATCAAAAATCCAACGAAACCCACCCATCGATCGAAAAAACTACATGCAAAAAATCGCCTGAGCCCTTATGAAGCAATTGCAT
TTTTCAGAACGTGATTGAAGATACTGGTCCCCATCCAACACACAAAAAGTTCAATCGAACGACTCCTATACCGATTTCACTATTCTACAGC
CAAGTCTTAAAGCTGCATGTAAGATCCCCAGATGGATGCTTATTACTCCFCGCTCCAATAACACTGATGGAGCTGCCACCCGGATCTGAAGCT
GAATCGCCTGATGTTATTGTACCAATTACCCTAATTGCCATATATCTCTTTGTGACGGGTGAGATCGTTATTAATGCGCGTATTGTGTTGCAAT
CCAACCAAGTCCCATCCAATAAAGGGACGAACCTGTCCATAAGGCGTTACCATTATATAGAGAGAAAAATGGGGTATTTCTTCGGCTGTTATT
ATTTGCTAGACCAAAGATTTAAACCCCATGCCATAAAAGGCTCAACCCGTTTATATAAATCCCTAATGCTGCCCTGATAAGGGAAT
TGGGCTAATTTCCGAGCCCGCAGTCTAAAACAAAAGGTGGCGGATCCATGCGGGGTAATATCAGTCCGTAATTATTTCCCTAATGAGACCTGAAA
AAGGGTTTTACAGATTCTGAGTTTTTATTGAGCCCTGGTCAAATTTGAAATCGGGGAAAAATAACCTGACATGGGATTCCTCCGCCCATAGAA
GAGTGTCTTTGTAAGTAAAGTGGCGAGGGCTGTGAATTTTTTGGTAATTTTCCCGGGCTTTTAGATTTGGAATACCCGACTTGAAAAAAA
AAAAATAGACCCATGCTCTGAAAAAAAATTTTTAGGAAATGTACCCAAATGAGCAGATCCAGATTTTTCCCCCAATGGGTGGGGCCATTTT
TATTTGATGGTGTTTTTGTGAATAATACAAATATGGCATCTTCTAAATTTCCGGTATGTGGCAACCAATAAAAACTGGGCGCCTTATTTGG
GTTTGATAAATAATATGGGGATACTGGAGTCTTAAACACAATAGACATGGGGGAGAACCCTGATAAAAAATTTGTGAGAAGACGTGCGTGTG
CTGCCAATGCACCTCCTCGCCTGAAGGCTGCACCTGATGCAGTGGAAAAACTAATACG
GATGGGCGTGCATTTGTGTGTTTTATTAAAGATGTGTGAAAAAAACCCCTTTTTAAGCGATCG

>H221205-022_005_pBD-2DBD_T7-F.ab1 1516

CGGAAACCTGGGTAGAGCAGAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGCATATGACGTCTGTACCACAGATGCCTATCACACCAGTCACT
GTCTCCGCCCTCCTCATCATCATCGTCAGCGCGGCGAGCTGCTGCGGCGAGCAGCAGCAGCGCGGGCGGCGAGCAGTGGTGGAGTGGTGGGGA
CGGATGAGGAGATTTGGTGGATGGACTAAATGGTTCAATTACGGAATGCGCATGGCCATGGAGTTCATGCGACTTCCAGCCACGTAATTCAG
ATCTCGCTTCGACATGAGCACCATCGAGCCGTACAGGCTGACAGTGAACACCAGGTATGGGATCAGTGTGAACCACTTCCATCTTCACTCT
CAACAAGTCGTCCAATTCCTAAGCTGATTCAGGTTTTCAATCAGATGAGTTTGCCGCCAGAGTCAATTTGGTGGGAGCAAGCCTTTACTCCG
AGGTTTTGCTAATGCTGTGCGGTGATTACGACGCTGCTGAGGATCGTTACAACCTTCTGGACTTCTCTCCACCAGACGTGATATCGTTCTGCG
CCACTTCCCATCTACAACAGGTCGTTGAACATCTCAAAATCTCAGTGCATTTTTTCCAACAGCTCAATCTAATCAACAGAAATTCGTTACT
GTCTGCGCATCGGGATTTAGATACTACTATATTTCTGCTAATCCAGTGTACATGGAGCAGGAAAGTATTGCTCCTGCCAGCAGCCTCC
TTCTCGCAACTATGCGCTCACAAAACGAGTCTCAGGAACCTGGTTGACCATAAGTGGAGCGTCTAGAAGCCATGAGTGTGATGCTTTTCATCGAT
GAGTAGGGAGTATCGAGAAATCGCACAACAATTGCAAAGATCTCGACCAGATTTGCGCTATCCAGACCTTACGTGGAGATGTATGAAATCGGG
GAAAGTGTCTTCGCGCCACTCTCTTATGACTGTTCCGCACTGACGGCTCAGTCCAGCAGCCGATGCCACAACTTGACACATTTTCCATCGG
CTTCCACGTTGATTCAGCAGCCAGCTGCTATGCGTCCGTGAGTTCACATGTTGTTCCCGCTTCTACAGCAGCTGGCAATCGCGCCGGG
TAGCATTAACCAGAGGATCCCGTGTGGTCCATTCAGATCGCTGGAATGACACCCGCCCCGCTATTTGCTCAGCAATCCCTACAAATCTCCAA
CTTCTAAATTCACCACCCGCCACGCAACCGTAGGAATCCGTCAACTGGAGGGGCCAAAACTAGCAAAACCCCTGGGGCCCTAAAAGGGTTT
TGGGGGTTTTTGGCGCCTTGGCCAACAATTCGGCGAATTTTTTATTTTTTTTTTTTTAAAAATTTAAAAAAAAGGGGACAAATTAATGGG
CCTCGGTTTTAAAAAAAATTTTTTTTACTCTTCTTCTGCGGGGTTTTCTTTGTTGGGGGGGTTATTCCCCCCACCCCGCCGGGGGGG
GGGTGGGTGTGTTTTTAC

>H221205-022_E05_pBD-2DBD_BD-R.ab1 1509

CAATTTAATTGGTATAACTTATTTTTTTTATAACTTATTTAATAATAAAAAATCATAAATCATAAGAAATTCGCCCGGAATTAGCTT
GGCTGCAAGCGCGCAAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTAGAGGCCCAAGGGTTATGCTAGTTATGCGGCCGCTGCAGGTCGACGGAGCTCCTA
CGGTTGCGTGGGGGGTGGTGGAGTCTAGAAAGTTGGAGATTTGGTAGGGATTGGCTGACGAGATAGCGGGGGCGGTGTCATTCACGCGATCT
TGAATGGACCACACGGGATCCTCTGGTTAATGCTACCCGGCGGATTTGCCAGTGTGCTGTAGAAGGGGGGGGACACCATGTGGAACGACG
GACGCATAGCAGCTGGTGTGAATCAACGTGGAAGCCGATGGAAAAATGTGTCAAGTTTGTGGCATCGGTCGTGGACTGAGCCGTGAGTGGCGGA
AACAGTCAATAAGAGTGTGGCGGAAAGCACTTCCCGATTTACATACATCCACGTAGAGGCTGGATAGCGCAAACTGCTGAGATCTT
TGCAATTTGTGGGATTTCTCGATACTCCCTACTCATGATGAAAGCACTCAGTACGCTTACGCGCTTAGACGGCTCCACTTATGGTCAACGAT
CCTGAGACTCGTTTTGTGAGCGCATAGTTGCGAGAAGGGAGTGCCTGGCCAGGAGCAATAACTTCTCGCGTCCATGTAAGCTGGATTAGCGAG
AATATAGTAGTATCTAAGAAATCCCGATGGCGCAGACGTAGACGAATCTGTGTGAGTTAGATTGAGCTGTTGAAAAATCGACCTGAGATTTG
AGATGTTCAACGACCCGTGTGTAGATGGGGAAGTGGCGCAGAACGATATCACGTTCCGGTGGGAGAGAAGTCCAAGAAGTTGTAACGATCCTCAG
CAGCGTCTAATCAGCGACAGCATTAGCAAAACCTCGGAGTAAAGGCTGTCTCCACCAAAATGACCTTGGCGGACAAACTCATCTGATTGAA
ACCTGGAATCAGCTTAGCGAATTTGGACGACTTGTGAGAGTGAAGATGGAAGTGGTTCATCACGTGATCCCATACCTGGTGTTCATCGTACGCC
TGTGACGGCTCGATGGTGTCTGTCGAAGCGAGATCTGAAGTCGTGGTGGAAAGTCGCATGAACCTTGGCCATGCCCAATTCGTAATTGAAC
CATTTAGTCAATCAAAAATTTCTTATTCGTCCCACCATCAGCCCTGGTGGCCCGCCTGTTGTTGTTCCACACTCCCCCTACAATAATTAAG

GAGGGGCGAAAATTACTGGGGTAAAGGTCTGGTGGAAAAAATTTACGGGCGCCCCTGAAAACTTTTCCCCCGGGGGCGCCCCAAGAGGA
GATTAATACCGAAAAACGTGTTATTTTTTTTCCCCGAGGCCCTTTTGGTGTGGGGGAGGACCCCCACAAGTGGGGGGTTTTTTTTAAAA
AGGATTTTTGG