

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas
PEDECIBA-Biología

Caracterización primaria de Eg2DBD α .1 de *Echinococcus* *granulosus s.l.*: miembro de una nueva subfamilia de receptores nucleares

Lic. Valentina Blanco

Orientadora:

Dra. Gabriela Alvite

Tribunal:

Dra. Estela Castillo

Dra. Verónica Fernández

Dr. Uriel Koziol

Montevideo, Uruguay

2021



ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1 Organismo en estudio: <i>Echinococcus granulosus</i>	2
2.1.1 Clasificación y ciclo de vida	2
2.1.2 Equinococosis quística.....	4
2.2 Receptores Nucleares.....	7
2.2.1 Estructura de los receptores nucleares.....	7
2.2.2 Clasificación de receptores nucleares	11
2.2.3 Subfamilia 2DBD-NR.....	12
2.2.4 Receptores nucleares como blancos de drogas	16
3. HIPÓTESIS	18
4. OBJETIVOS	18
4.1 Objetivo general	18
4.2 Objetivos específicos	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
5.1 Clonado de receptores nucleares de <i>Echinococcus granulosus s.l.</i>	19
5.1.1 Extracción de ARN y obtención de ADNc	19
5.1.2 Amplificación mediante PCR	20
5.1.3 Electroforesis y purificación de ADN	21
5.1.4 Ligación y transformación de células competentes	22
5.1.5 Selección de clones recombinantes	22
5.1.6 Análisis de secuencias	23
5.2 Ensayos de doble híbrido de levadura (DHL).....	23
5.2.1 Fundamentos del ensayo de DHL.....	23
5.2.2 Clonado de Eg2DBD α .1-LBD y EgRXR β -LBD en plásmidos del sistema	24
5.2.3 Co-transformación de <i>S. cerevisiae</i>	27
5.2.4 Selección de transformantes.....	29
5.2.5 Ensayos de Western Blot.....	30
5.3 Ensayos de co-inmunoprecipitación (Co-IP) a partir de cultivo celular	31
5.3.1 Clonado en plásmido pcDNA3.1/V5-His	31
5.3.2 Transfección de células HeLa	33
5.3.3 Ensayos de inmunoprecipitación	35
5.3.4 Detección de proteínas co-inmunoprecipitadas	35

5.4 Ensayos de entrecruzamiento químico en cultivo celular (EQ)	36
5.4.1 Entrecruzamiento químico con distintos agentes	36
5.4.2 Detección de proteínas entrecruzadas.....	37
5.4.3 Co-inmunoprecipitación de proteínas entrecruzadas	37
5.5 Ensayos de co-inmunoprecipitación con proteínas traducidas <i>in vitro</i>	38
5.5.1 Transcripción <i>in vitro</i>	38
5.5.2 Traducción <i>in vitro</i>	39
5.5.3 Inmunoprecipitación	39
5.5.4 Detección de proteínas co-inmunoprecipitadas	39
5.6 Ensayos de doble híbrido de levadura modificado (DHL _m)	40
5.6.1 Co-transformación de levaduras e incubación con el ligando.....	40
5.6.2 Determinación de la actividad β-galactosidasa	40
5.6.3 Cálculo de la actividad de la β-galactosidasa	41
6. RESULTADOS.....	42
6.1 Aislamiento de receptores nucleares	42
6.1.1 Clonado de Eg2DBDα.1	43
6.1.2 Clonado de EgRXRβ-LBD.....	48
6.2 Estructura cuaternaria de Eg2DBDα.1	50
6.2.1 Análisis de la dimerización: DHL.....	50
6.2.2 Análisis de la dimerización: Co-IP	56
6.2.3 Análisis de la dimerización: EQ.....	66
6.2.4 Análisis de la dimerización: EQ y Co-IP.....	71
6.2.5 Análisis de la dimerización: Co-IP de proteínas traducidas <i>in vitro</i>	72
6.3 Interacción con ligandos	74
6.3.1 Análisis del DHL _m con SFB.....	74
7. DISCUSIÓN	76
7.1 Estructura primaria de Eg2DBDα.1	76
7.2 Estructura cuaternaria de Eg2DBDα.1	78
7.3 Dimerización dependiente de ligandos de Eg2DBDα.1	83
8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	86
9. BIBLIOGRAFÍA	89
10. ANEXO	106
Anexo 10.1 Plásmidos.....	106
Anexo 10.2 Medios de cultivo	107
Anexo 10.3 Cebadores universales.....	109
Anexo 10.4 Genotipo de cepas de levadura	109

Anexo 10.5 Soluciones de ensayos de SDS-PAGE	109
Anexo 10.6 Soluciones de ensayos de <i>Western Blot</i>	110
Anexo 10.7 Anticuerpos de ensayos de <i>Western Blot</i>	111
Anexo 10.8 Anticuerpos de ensayos de inmunocitoquímica	111
Anexo 10.9 Secuencias	112
11. GLOSARIO	117

Palabras claves: Equinocosis quística, *Echinococcus granulosus*, receptores nucleares, 2DBD, dimerización, unión de ligandos.

1. RESUMEN

La forma larvaria del platelminto parásito *Echinococcus granulosus* (Cestoda) es el agente causante de la Equinococosis quística, una zoonosis cosmopolita que constituye un problema de salud pública mayor y una causa de importantes pérdidas económicas. Se han identificado hace algunos años, receptores nucleares (NRs) con dos dominios de unión al ADN (2DBD), que curiosamente solamente se encuentran en algunos platelmintos, moluscos y artrópodos. Los NRs son reguladores transcripcionales de importantes procesos biológicos, sin embargo, son poco estudiados en cestodos y poco se conoce respecto a los 2DBD-NRs. En particular los 2DBD-NRs son interesantes desde el punto de vista terapéutico, ya que miembros de esta subfamilia se encuentran presentes en *E. granulosus*, pero ausentes en sus hospederos. Nuestro equipo de investigación ha identificado en el ADNc obtenido de protoescólices de *E. granulosus*, un transcripto que codifica para un receptor nuclear 2DBD denominado Eg2DBD α .1. Teniendo en cuenta que estas proteínas podrían ser blancos interesantes de nuevos fármacos contra esta parasitosis, nos propusimos comenzar con la caracterización del receptor nuclear Eg2DBD α .1. En primer lugar, analizamos la estructura cuaternaria de esta proteína, mediante el estudio de la formación de homodímeros o heterodímeros con el Receptor X Retinoide (EgRXR β). A través de ensayos de doble híbrido de levadura, demostramos que Eg2DBD α .1 formaría homodímeros a través del dominio de unión a ligandos (LBD) y no interacciona con EgRXR β -LBD. Este modo de interacción fue confirmado mediante ensayos de co-inmunoprecipitación a partir de los dominios proteicos traducidos *in vitro*. Este tipo de interacción podría depender de la unión de ligandos específicos, y lo que es más interesante aún, de ligandos provenientes del hospedero. Siguiendo en esta línea, estudiamos el efecto del suero fetal bovino sobre la homodimerización de Eg2DBD α .1-LBD mediante un ensayo de doble híbrido de levadura modificado. Nuestros resultados indican que el suero del hospedero podría ser una fuente de ligandos para Eg2DBD α .1, sugiriendo una posible comunicación hospedero-parásito mediada por este NR. Los resultados obtenidos en esta tesis son el primer paso para la dilucidación de la función biológica de Eg2DBD α .1 de *E. granulosus*.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Organismo en estudio: *Echinococcus granulosus*

2.1.1 Clasificación y ciclo de vida

El género *Echinococcus* pertenece al filo Platyhelminthes, clase Cestoda, subclase Eucestoda, orden Cyclophyllidea (R.C.A. Thompson, 2017) y forma parte de la familia Taeniidae junto con los géneros *Hydatigera*, *Taenia* y *Versteria* (Nakao et al., 2013). El género *Echinococcus* puede subdividirse en diez especies: *E. granulosus sensu stricto* (s.s.), *E. equinus*, *E. ortleppi*, *E. canadensis*, *E. intermedius*, *E. felidis*, *E. multilocularis*, *E. shiquicus*, *E. vogeli* y *E. oligarthra* (R. C. Andrew Thompson, 2020). Las primeras seis especies se asocian en el complejo multi-especie denominado *E. granulosus sensu lato* (s.l.). Dentro de este complejo se han identificado ocho genotipos, basados en diferencias nucleotídicas de genes mitocondriales: genotipos G1-G3 en *E. granulosus s.s.*, G4 en *E. equinus*, G5 en *E. ortleppi*, G6-G7 en *E. intermedius* y G8 y G10 *E. canadensis* (Vuitton et al., 2020).

Las especies de *Echinococcus* requieren de dos hospederos mamíferos para completar su ciclo de vida. Habitualmente la forma adulta, hermafrodita, habita en el intestino de cánidos, el hospedero definitivo. Una vez allí, si bien no se manifiesta como una patología evidente, produce una gran cantidad de huevos que son eliminados por las heces. A través de estas, los huevos pasan a contaminar el ambiente y pueden mantenerse infectivos por largos períodos de tiempo. Una vez que el hospedero intermediario ingiere los huevos, estos eclosionan liberando las oncósferas, que penetran en la mucosa intestinal y migran a través del torrente sanguíneo hacia órganos internos, como hígado y pulmón. En el órgano afectado se desarrolla la forma larvaria o metacestodo (R.C.A. Thompson, 2017). Los metacestodos de *E. granulosus* son quistes de tamaño variable llenos de líquido transparente, denominados "hidátidos" o quistes hidáticos (Eckert & Thompson, 2017). Un solo quiste puede tener miles de protoescolices, y cada protoescolix es capaz de convertirse en un gusano adulto si es ingerido por su hospedero definitivo (Eckert et al., 2001).

Los hospederos definitivos de *E. granulosus s.l.* suelen ser carnívoros y los hospederos intermediarios herbívoros u omnívoros, por ejemplo bovinos, ovinos y caprinos. Eventualmente el humano también puede ser infectado tras la ingestión accidental de huevos del parásito, a través de alimentos contaminados o por el contacto estrecho con perros parasitados. Así, los humanos actúan como un hospedero intermediario aberrante, dado que el parásito no puede culminar su desarrollo en condiciones naturales (R.C.A. Thompson, 2017).

En la figura 2.1 se puede ver ilustrado el ciclo de vida de *E. granulosus s.l.* incluyendo al humano como hospedero intermediario accidental.

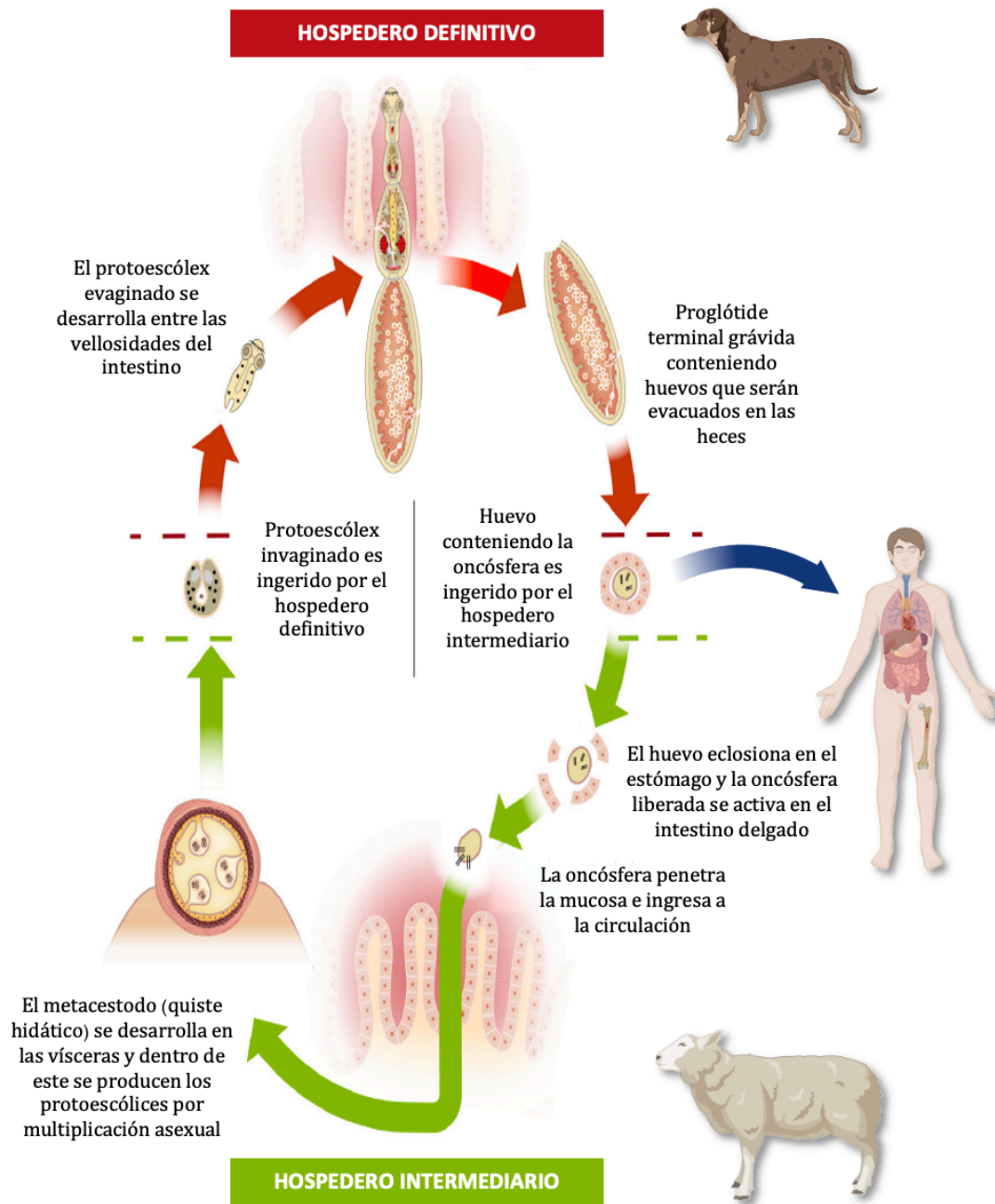


Figura 2.1. Ciclo de vida de *Echinococcus granulosus*.

Figura tomada y modificada de Thompson, 2017.

E. granulosus s.l. se distribuye universalmente causando un importante problema de salud pública dado que es uno de los agentes causantes de la equinococosis quística (R.C.A. Thompson, 2017).

2.1.2 Equinococosis quística

La equinococosis quística, también llamada hidatidosis, es una zoonosis causada por el estadio larvario de *E. granulosus* s.s., *E. equinus*, *E. ortleppi* y *E. canadensis* (Higuita et al., 2016). Sin embargo, la especie de *E. granulosus* s.s. tiene la distribución más cosmopolita y es responsable de la gran mayoría de la equinococosis quística humana (casi el 90%). La segunda especie más común causante de la equinococosis quística humana es *E. canadensis*, aunque con un porcentaje considerablemente menor (7%) (Rojas et al., 2014; Deplazes et al., 2017).

La equinococosis quística se caracteriza por la formación de quistes en órganos internos del hospedero intermediario, siendo estos generalmente hígado y pulmón. El quiste hidático está compuesto por una capa adventicia, formada por tejido del hospedero, la cual recubre el endoquiste de origen larvario. El endoquiste está formado por una capa laminar acelular externa y una capa germinativa que da lugar a las vesículas prolíferas y protoescólices cuando el quiste es fértil (Figura 2.2) (Díaz et al., 2011). Si el líquido hidático conteniendo protoescólices es derramado en el peritoneo, estos son capaces de generar nuevos quistes ocasionando una equinococosis secundaria (Eckert et al., 2001; Díaz et al., 2011). En los seres humanos, la equinococosis quística a menudo permanece asintomática, hasta que el quiste se rompe o se vuelve lo suficientemente grande como para ejercer presión sobre los tejidos circundantes (Brunetti et al., 2011).

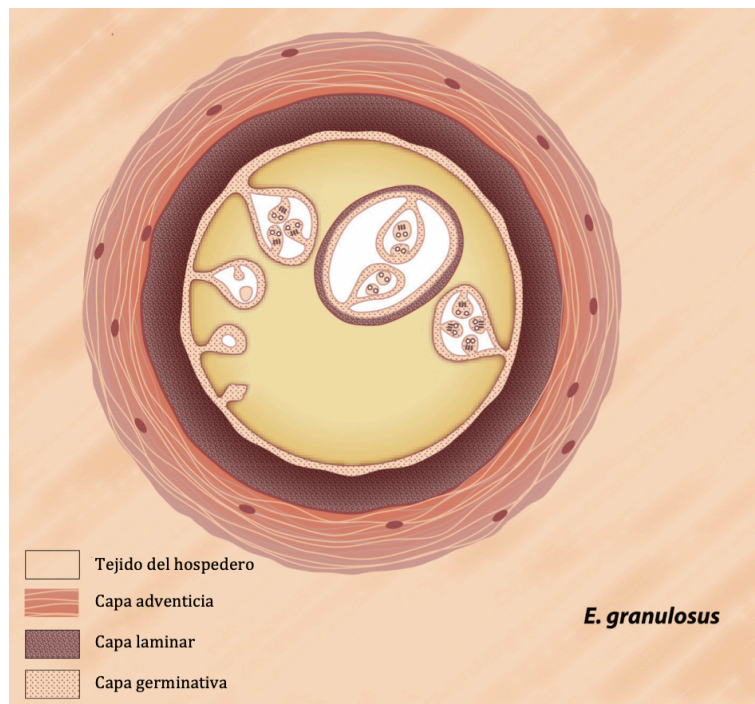


Figura 2.2. Quiste hidático de *E. granulosus* sensu lato.

Figura tomada y modificada de Thompson & Jenkins, 2014.

La transmisión de *E. granulosus* s.s. entre el ganado doméstico y los perros se da predominantemente en zonas rurales (Craig et al., 2017), donde la cría de ovinos asociada a la presencia de un gran número de perros, y el hábito de sacrificar ovinos adultos para consumo doméstico y la alimentación de perros con vísceras, generan las condiciones ideales para el ciclo del parásito (Carmena & Cardona, 2013; Otero-Abad & Torgerson, 2013; Craig et al., 2017).

Aunque la equinococosis quística tiene una larga historia que se remonta a la antigüedad, actualmente sigue siendo una zoonosis relevante a nivel mundial. Como muestra la Figura 2.3, su distribución es global y es una de las zoonosis parasitarias más importante en América del Sur (Deplazes et al., 2017; Eckert & Thompson, 2017).

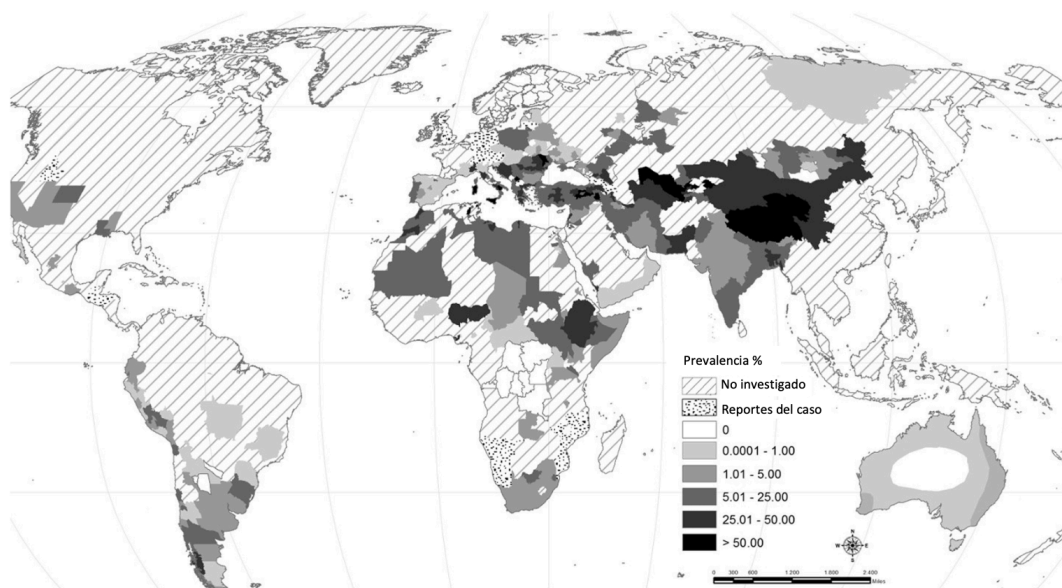


Figura 2.3. Distribución mundial de *Echinococcus* spp.

Distribución mundial de *Echinococcus* spp. responsables de la equinococosis quística en los principales hospederos intermediarios domésticos. Ilustración tomada y modificada de Deplazes et al., 2017.

El tratamiento de la equinococosis quística suele ser costoso y a veces requiere cirugía importante y/o tratamientos farmacológicos prolongados (Busto-Bea et al., 2016).

Afortunadamente, en Uruguay, la incidencia de la infección en humanos ha disminuido en los últimos años de 6,5 por 1.000 habitantes en 2008 a 2,8 en 2013, según estudios ecográficos realizados en zonas de riesgo (Irabedra et al., 2016), siendo el país de la región con menor incidencia en el período 2011 a 2014 (Pavletic et al., 2017). Sin embargo, no contamos con datos actualizados en nuestro país sobre esta parasitosis, desconociéndose la evolución de la misma desde el 2014.

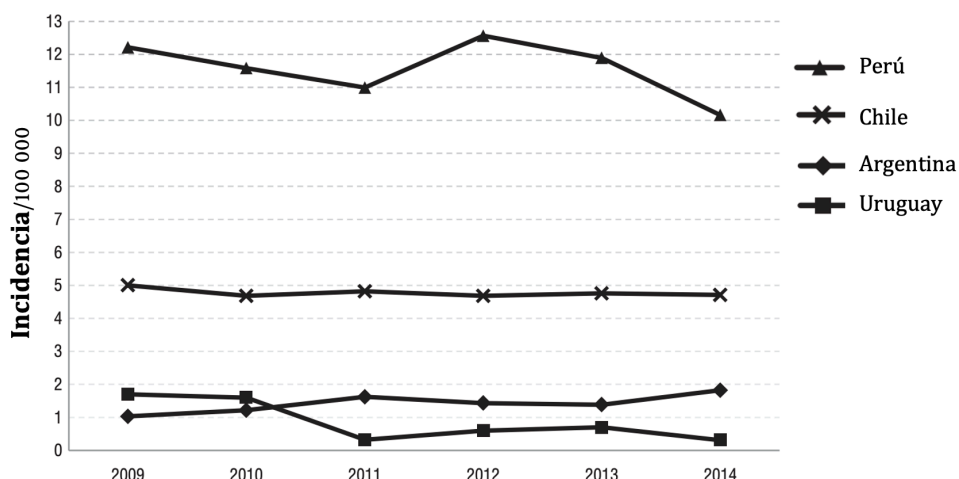


Figura 2.4. Incidencia anual de equinocosis quística en humanos en países de la región.

Incidenca calculada cada 100.000 habitantes en Argentina, Chile, Perú y Uruguay, en el período 2009-2014. Imagen obtenida y adaptada de Pavletic et al., 2017.

Si bien se han desarrollado estrategias para su erradicación en la región, estas no han sido exitosas, probablemente debido a que las políticas que se adoptaron no han sido persistentes ni eficaces. Los primeros programas de control en América del Sur se basaron en la desparasitación de perros con un tenicida no ovicida (praziquantel) contra el estadio adulto de *E. granulosus* (Craig et al., 2017; Pavletic et al., 2017; Larrieu et al., 2019). Sin embargo, el tratamiento con antihelmínticos no previene de la reinfección una vez que el perro vuelve a estar en contacto con el parásito y desafortunadamente, ocurre un desarrollo paulatino de la resistencia parasitaria (Nari et al., 2003). Estos, entre otros motivos, determinaron que estos programas de control no produzcan los resultados esperados, sugiriéndose un rediseño de los mismos, contemplando las realidades locales (Ferreira et Irabedra, 2007; Pavletic et al., 2017; Larrieu, 2019).

El costo económico de la equinocosis quística no solo se manifiesta en el control de la enfermedad, si no que surge de su impacto en la salud de las personas y las pérdidas en la productividad del ganado (Budke et al., 2006; Bingham et al., 2016). Si bien existen pérdidas económicas asociados a la enfermedad, la equinocosis quística debe considerarse principalmente un problema de salud pública.

A pesar del considerable impacto socioeconómico, la equinocosis quística sigue siendo una enfermedad zoonótica desatendida. Al respecto, la Organización Mundial de la Salud incluyó a la Equinocosis en el Plan de Acción para el control de las enfermedades infecciosas desatendidas para el periodo 2019-2022, recomendando su eliminación (OMS, 2020)

2.2 Receptores Nucleares

Los receptores nucleares (NRs) son factores de transcripción que regulan diversos procesos biológicos, como el metabolismo, el desarrollo y la reproducción (Evans & Mangelsdorf, 2014; Gustafsson, 2016). Dichas proteínas pueden unirse a elementos respuesta de ADN específicos, actuando como moduladores de la transcripción de sus genes diana. A diferencia de otros factores de transcripción, la actividad de los receptores nucleares se puede modular por unión de ligandos específicos, siendo estos principalmente pequeñas moléculas lipofílicas que penetran fácilmente en las membranas biológicas (Novac & Heinzl, 2004), proporcionando un vínculo directo entre las señales celulares y las respuestas transcripcionales de una célula.

Se han identificado más de 900 genes de receptores nucleares a lo largo de todo el reino animal (Sladek, 2011; Mazaira et al., 2018). Los NRs presentan un origen ancestral común y una alta tasa de conservación en todos los taxones animales y por ello son considerados fuertes marcadores filogenéticos de la evolución animal. (Escrivá et al., 2003). Los avances en la secuenciación masiva, han facilitado la identificación de los distintos miembros de la familia de NRs y se han caracterizado en diferentes linajes con un patrón claro dependiente de especie. Existe una complejidad evolutiva diferente en la familia de NR entre los distintos animales, ya que se han identificado desde dos miembros en esponjas, 48 en mamíferos y hasta más de 250 en nematodos (Bertrand et al., 2004; Bridgham et al., 2010; Y.-Y. Cheng et al., 2015; Yang et al., 2020), complejidad impulsada probablemente por la duplicación y pérdida de genes (Fonseca et al., 2020).

2.2.1 Estructura de los receptores nucleares

A pesar de la diversidad de funciones que presentan los distintos NR, estos comparten una estructura modular común. Un receptor nuclear canónico contiene una región A/B o dominio N-terminal (NTD, *N-Terminal domain*), una región C constituida por el dominio de unión al ADN (DBD, *DNA binding domain*), una región D o bisagra, una región E constituida por el dominio de unión al ligando (LBD, *ligand binding domain*) y una región F o C-terminal (CTD, *C-Terminal domain*) (Weikum et al., 2018; Wu & LoVerde, 2019). La figura 2.5 ilustra de forma esquemática los distintos dominios de un NR típico.



Figura 2.5. Esquema de la estructura básica modular de los NRs.

NTD: dominio N-terminal. DBD: dominio de unión al ADN. LBD: dominio de unión al ligando. CTD: dominio C-terminal.

Dominio A/B – N-terminal

El dominio A/B o NTD, es un dominio poco estructurado lo que ha dificultado la obtención de su estructura cristalográfica hasta el momento. Además se caracteriza por presentar 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 (Figura 2.6) (Weikum et al., 2018).

El dominio A/B contiene una región de transactivación 1 (AF-1, *Activation Factor 1*) autónoma, independiente de la unión de ligandos. Sin embargo este dominio es regulado por la interacción con proteínas co-reguladoras, influyendo así en la respuesta promotor-específica (R. Kumar & Thompson, 2003).

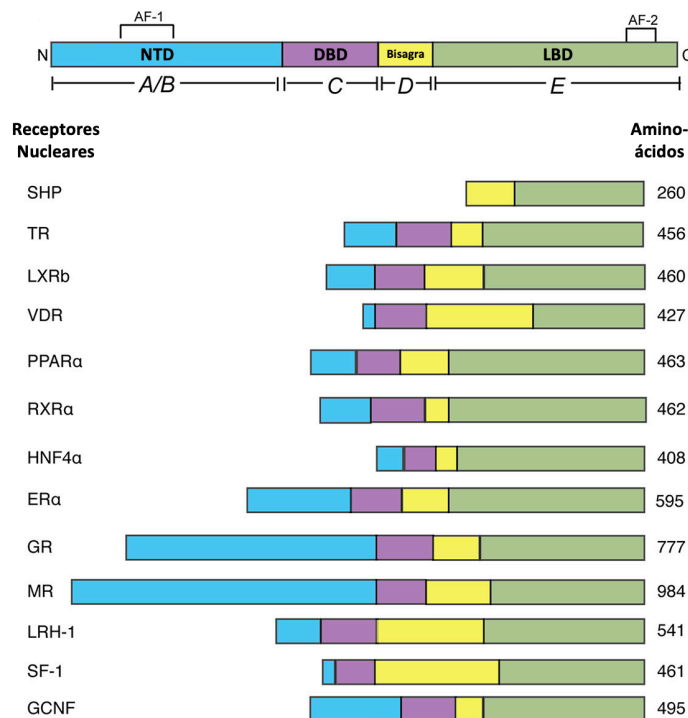


Figura 2.6. Variabilidad de distintos NR en cuanto al tamaño de sus dominios.

NTD: región N-terminal. DBD: dominio de unión al ADN. LBD: dominio de unión al ligando. Imagen obtenida y adaptada de Weikum et al., 2018.

Dominio C –Dominio de unión al ADN

La región C corresponde al dominio de unión al ADN (DBD) siendo la región más conservada en comparación con el resto de los dominios de los NRs (Danielsen, 2001). A través de este dominio, los NRs se unen a secuencias de ADN específicas, denominadas elementos de respuesta hormonal (HRE) (V. Kumar et al., 1986).

Estudios cristalográficos y de resonancia magnética nuclear, donde se pudo elucidar la estructura del DBD aislado o en complejo con el ADN, permitieron estudiar la interacción proteína-ADN. Las estructuras del receptor de glucocorticoides (GR) y del receptor de estrógenos (ER) en complejo con el ADN, fueron las primeras estructuras cristalográficas en ser reportadas (Luisi et al., 1991; Schwabe et al., 1993). Estos estudios revelaron que el DBD consiste en un núcleo de 66 residuos, altamente conservado, formado por dos motivos típicos de dedos de zinc, dos hélices alfa y una región C-terminal (CTE) (Figura 2.7).

Cada motivo de dedos de zinc, contiene cuatro cisteínas que coordinan un ion zinc para crear el motivo canónico de unión al ADN (Hard et al., 1990; Helsen et al., 2012). El primer motivo contiene la hélice de lectura, la cual interactúa de forma base-específica con el surco mayor en el ADN (Schwabe et al., 1993). En este motivo se encuentra la caja proximal o caja P, que contiene los aminoácidos esenciales para la unión al HRE en las regiones promotoras de los genes diana (Umesono & Evans, 1989). En cambio, el segundo motivo hace contactos no específicos con el esqueleto del ADN. En el bucle peptídico de este segundo motivo se encuentra la caja distal o caja D, que contiene residuos involucrados en la dimerización del receptor (Luisi et al., 1991; Khorasanizadeh & Rastinejad, 2001; Watson et al., 2013).

La región CTE tiene otros dos motivos conservados, la caja T y la caja A, implicados en el reconocimiento del ADN y la dimerización, respectivamente (Vincent Laudet & Adelmant, 1995). Las secuencias CTE no son conservadas entre los NR y pueden adoptar diferentes estructuras. Sin embargo, estas estructuras divergentes comparten una función común: extender la interfaz de interacción proteína-ADN a nivel del surco menor, más allá de los contactos específicos establecidos en el surco mayor, estabilizando así la unión del receptor al ADN (Bain et al., 2007).

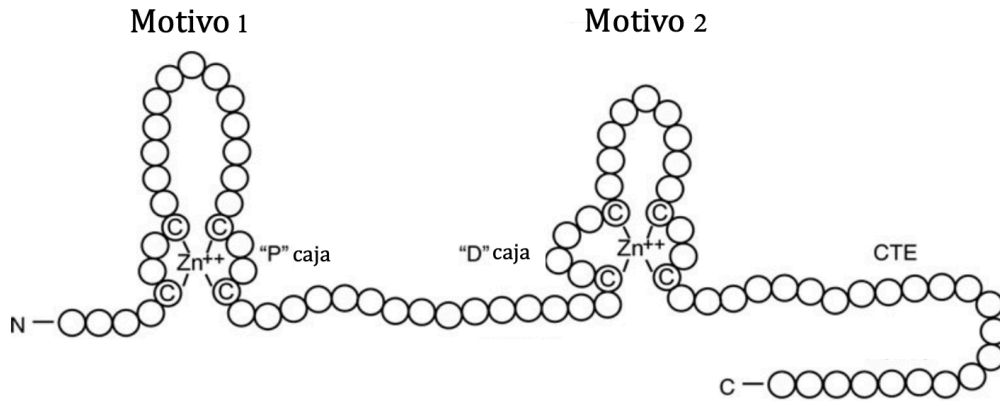


Figura 2.7. Esquema del dominio de unión al ADN de los NRs.

Se muestran los dos motivos de dedos de zinc con la caja P, caja D y la CTE. Imagen tomada y adaptada de Weikum et al., 2018.

Dominio D – Bisagra

La región bisagra es un conector flexible entre el DBD y el dominio de unión a ligandos (Pawlak et al., 2012). Es la región de menor conservación de secuencia y tamaño dentro de los receptores nucleares. Esta región le brinda flexibilidad al NR otorgándole a los dominios que conecta cierta movilidad independiente (Aggarwal & Bhavesh, 2021). Además de brindar movilidad, la bisagra también puede contener una señal de localización nuclear, encargada de la translocación del receptor al núcleo (Haelens et al., 2007; Anbalagan et al., 2012). La región C-terminal de la bisagra puede contener un motivo involucrado en interacciones con proteínas co-reguladoras dependientes de la unión de ligando, especialmente aquellas que ejercen efectos represivos sobre la transcripción (Céraline et al., 2004).

Dominio E – Dominio de unión a ligandos

El dominio de unión a ligandos es un dominio que regula la actividad del receptor mediante la unión de ligandos e interacción directa con proteínas co-reguladoras (Moras & Gronemeyer, 1998; Weatherman et al., 1999). El LBD contiene superficies de interacción estructuralmente distintas pero relacionadas funcionalmente: una superficie de dimerización, que media la interacción con otro LBD asociado (Wurtz et al., 1996); un bolsillo hidrofóbico de unión al ligando (LBP, *Ligand Binding Pocket*) que interactúa con diversas moléculas pequeñas lipófilicas (Wu & LoVerde, 2019); y una superficie de función de activación denominada AF-2 (*Activation Function 2*), esencial para la activación de la transcripción dependiente de ligando (Barettino et al., 1994; Bourguet et al., 1995; Weikum et al., 2018). La especificidad de la unión al ligando del LBD, está determinada por la forma, el volumen y los diferentes aminoácidos que recubren el

LBP. La unión del ligando al LBD, induce cambios conformacionales en el receptor que pueden conducir a la disociación de proteínas co-represoras, permitiendo la asociación de proteínas co-activadoras a la región AF-2 (Bourguet, Germain, et al., 2000; Y. Li et al., 2003).

Dominio F – C-terminal

El dominio F, ubicado en el extremo C-terminal de los NR, es una de las regiones poco conservadas de los receptores nucleares, de hecho muchos miembros de la familia carecen de este dominio. Sin embargo, cuando está presente, la eliminación o mutación del mismo altera la transactivación, la dimerización y la respuesta del receptor a la unión del ligando (Patel & Skafar, 2015)

2.2.2 Clasificación de receptores nucleares

Por un lado, los receptores nucleares pueden clasificarse según su mecanismo de acción en cuatro tipos (I-IV). Esta clasificación los agrupa en base al sitio subcelular en donde ocurre la unión receptor-ligando (citosol o núcleo) y a la forma en la que se unen al ADN (homodímero, heterodímero, o monómero) (Weikum et al., 2018). El tipo I de NR, abarca los receptores nucleares que se encuentran en el citoplasma unido a proteínas chaperonas, que tras la unión del ligando, se libera de la chaperona y experimentan una translocación nuclear. En el núcleo, generalmente se unen como homodímeros a los elementos respuesta de ADN (O'Malley & Tsai, 1992; Pratt et al., 2004). El tipo II de NR se encuentra retenido en el núcleo unido a proteínas represoras (Tata, 2002), tras la unión del ligando el receptor se libera del complejo represor y se une a proteínas activadoras activando así la maquinaria transcripcional de su gen blanco. Estos receptores comúnmente forman heterodímeros con el receptor X retinoide (RXR) (Mangelsdorf et al., 1995). El tipo III, tiene un mecanismo de acción similar a los NR de tipo II, pero forman homodímeros en lugar de heterodímeros (Gronemeyer & Moras, 1995). Y por último, el tipo IV, al igual que los NR de tipo II, se une al ligando en el núcleo pero en cambio se une al ADN como monómero (Little et al., 2006; Weikum et al., 2016).

A pesar de que el campo de los NR ha experimentado una evolución asombrosa desde la identificación bioquímica del primer receptor nuclear a principios de la década de 1960 (Jensen, 1962), aún queda mucho por conocer y este es el caso de los llamados receptores huérfanos. Los receptores huérfanos son aquellos NR para los cuales aún no se conocen sus ligandos reguladores (Benoit et al., 2006).

Existe otra clasificación de los NR basada en relaciones filogenéticas, generadas a partir del alineamiento de secuencias y en la construcción de árboles filogenéticos. Esta clasificación dio origen a la nomenclatura utilizada actualmente para nombrar a los NRs, la cual fue aprobada

por el Comité de Nomenclatura de Receptores Nucleares en 1999 (Vincent Laudet et al., 1999). Esta clasificación subdivide a la familia de receptores nucleares en 6 subfamilias (NR1-NR6) (V Laudet, 1997). A partir del análisis de esta clasificación, Germain y colaboradores describen una correlación directa entre la capacidad de unión al ADN y dimerización con la posición filogenética de cada NR; pero no observan una correlación con la capacidad de unión al ligando (Germain et al., 2006). La subfamilia NR1 agrupa receptores de hormonas tiroideas, de ácido retinoico y receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR), entre otros. Estos receptores están regulados por una variedad de moléculas de señalización lipofílica que incluyen hormona tiroidea, ácidos grasos, ácidos biliares y esteroides. La subfamilia NR2 contiene el receptor X retinoides (RXR) y a los receptores huérfanos COUP-TF y HNF-4 (V Laudet, 1997; Weikum et al., 2018). El receptor RXR es de particular importancia ya que forma complejos heterodiméricos con muchos NR y es el único receptor en el grupo con un ligando activador conocido, el ácido 9-cis retinoico (Mangelsdorf & Evans, 1995). La subfamilia NR3 contiene receptores de esteroides incluyendo el receptor de andrógenos, de progesterona, de glucocorticoides. La subfamilia NR4 contiene los receptores huérfanos relacionados con el desarrollo y el mantenimiento de las neuronas, como el factor de crecimiento nervioso 1B. La subfamilia NR5 contiene los receptores SF-1 y LRH-1, que aunque todavía se clasifican como receptores huérfanos, la evidencia sugiere que son regulados por fosfolípidos. Finalmente, la subfamilia NR6 contiene el factor nuclear de células germinales, un receptor huérfano que tiene un papel en el desarrollo (V Laudet, 1997; Weikum et al., 2018). Posteriormente, esta nomenclatura también incluyó una subfamilia NR0, formada por receptores nucleares que contienen solo el DBD (NR0A, identificados en artrópodos y nematodos) o solo el LBD (NR0B, presentes en algunos vertebrados) (Vincent Laudet et al., 1999).

Adicionalmente, en las últimas décadas, se evidenció la existencia de un nuevo subgrupo de NR llamado 2DBD-NR, cuyos integrantes presentan dos DBD y un LBD (Wu et al., 2007). Si bien este nuevo grupo aun no ha sido incluido en el sistema de clasificación descrito por el Comité de Nomenclatura de Receptores Nucleares (Vincent Laudet et al., 1999; Wu & LoVerde, 2019), publicaciones recientes ya lo clasifican como subfamilia NR7 (Y. Cheng et al., 2021).

2.2.3 Subfamilia 2DBD-NR.

Los receptores nucleares con dos dominios de unión al ADN fueron reportados por primera vez por el grupo de LoVerde en 2006. En este estudio, identificaron 16 receptores nucleares nuevos en el platelminto parásito *Schistosoma mansoni*, mediante secuenciación completa por *shotgun*, pero lo que más les llamó la atención fue la identificación de tres receptores nucleares que presentan dos DBDs (Sm2DBD α , Sm2DBD β and Sm2DBD γ). Si bien estas proteínas comparten

en gran parte la estructura modular de los NRs, poseen una característica única, la presencia de dos DBDs en tándem, adquiriendo así una estructura modular específica de este tipo de receptores (Figura 2.8). A partir de este hallazgo los investigadores sugirieron agregar una nueva subfamilia a la familia de receptores nucleares, que contenga los receptores nucleares con dos DBDs, la subfamilia NR7 (Wu et al., 2006).

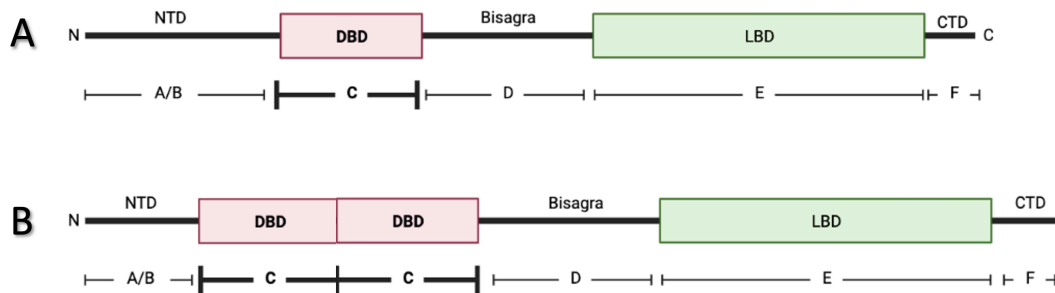


Figura 2.8. Esquema de la estructura modular de los 2DBD-NR.

(A) Estructura de los NRs clásicos. **(B)** Estructura de los 2DBD-NRs. NTD: dominio N terminal.

DBD: dominio de unión al ADN. LBD: dominio de unión al ligando. CTD: dominio C terminal.

A su vez, los autores describen en el segundo DBD una secuencia de caja P típica de los receptores nucleares de la subfamilia NR1 (CEGCKG), no obstante el primer DBD posee una secuencia de caja P diferente (CEACKK) exclusiva de esta subfamilia (Figura 2.9). Adicionalmente, Wu y colaboradores identificaron secuencias homólogas a 2DBD-NRs en dos especies de planarias de agua dulce pertenecientes a la clase Turbellaria: *Dugesia japonica* y *Schmidtea mediterranea*. Dichos organismos junto con *S. mansoni*, pertenecen al filo Platelminfos, por lo que los investigadores sugieren que los 2DBD-NRs existían en su antepasado común (Wu et al., 2006).

Este hallazgo despertó la curiosidad de los investigadores, que continuaron con el estudio de los 2DBD-NRs. En 2007, identificaron por *data mining*, este tipo de receptores también en especies de moluscos y artrópodos, sin embargo no encontraron evidencia de los 2DBD-NR, ni de ninguna secuencia que codifique para la caja P exclusiva de este tipo de receptores, en esponjas, cnidarios, insectos artrópodos, erizos de mar ni en vertebrados (Wu et al., 2007) (Figura 2.9)

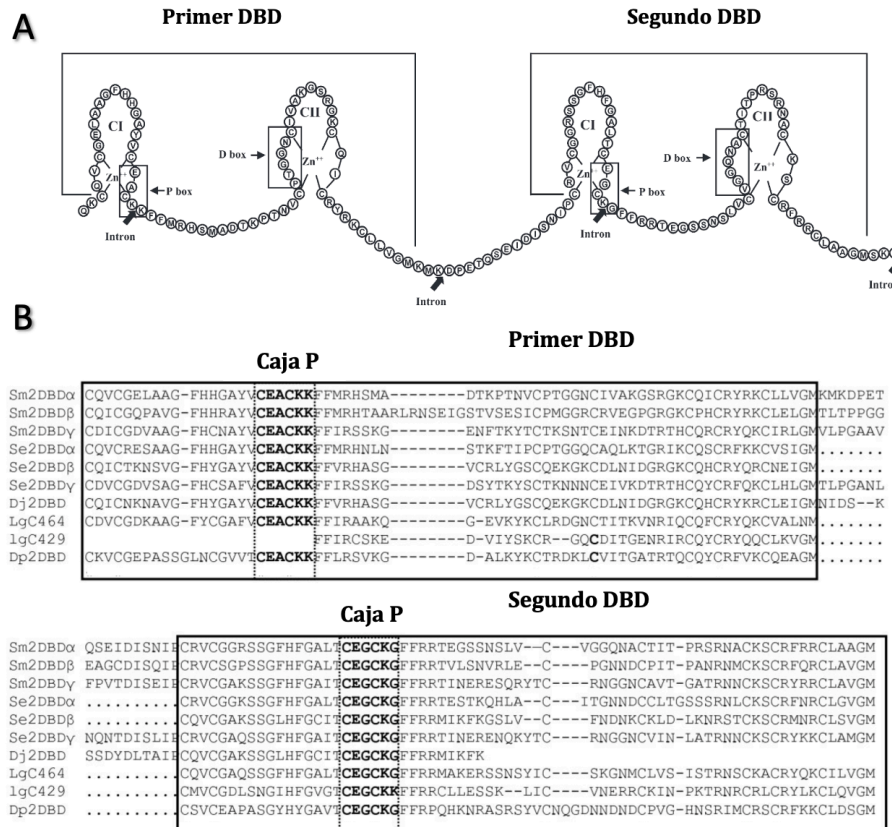


Figura 2.9. Dominios de unión al ADN de los receptores 2DBD.

(A) Ilustración de los 2 DBDs de Sm2DBDα. (B) Alineamiento de los dominios de unión al ADN de 2DBD-NRs. Cada DBD está encuadrado con una línea continua, las secuencias de las cajas P-box (letras en negrita) están encuadradas con una línea discontinua. Sm: *Schistosoma mansoni*, Se: *Schmidtea mediterranea*, Dj: *Dugesia japonica*, Lg: *Lottia gigantea*, Dp: *Daphnia pulex*. Imágenes tomadas y modificadas de Wu et al., 2007.

Recientemente, Wu y LoVerde demostraron a partir de la construcción de árboles filogenéticos con la secuencia de aminoácidos del segundo DBD que los 2DBD-NRs de platelmintos parásitos se agruparon en tres grupos: 2DBDa (ortólogos de *Schistosoma mansoni* 2DBDα), 2DBDb (ortólogos de *S. mansoni* 2DBDβ) y 2DBDg (ortólogos de *S. mansoni* 2DBDγ). Resultados similares fueron obtenidos por nuestro grupo de investigación a partir del análisis de los receptores 2DBDs de algunos cestodos (Alvite et al., 2019). A su vez, Wu y LoVerde observaron que 2DBD-NRg está presente en las cuatro clases de platelmintos analizadas y en algunos moluscos, mientras que 2DBD-NRa y 2DBD-NRb se encuentran únicamente en las tres clases de platelmintos parásitos (Monogenea, Cestoda y Trematoda) (Wu & LoVerde, 2021).

En cuanto a la estructura, se determinó que la región LBD desde la hélice 3 a la 12 es relativamente conservada en las tres proteínas 2DBD de *S. mansoni*. Además, los tres receptores

poseen la firma $\tau\tau$, conservada dentro de este dominio y Sm2DBD α junto con Sm2DBD β poseen el sitio de activación dependiente de ligando AF-2 típico ($\Phi\Phi X E \Phi\Phi$, donde Φ representa un aminoácido hidrofóbico), mientras que Sm2DBD γ posee una glutamina en el sitio donde generalmente se encuentra un ácido glutámico ($\Phi\Phi X Q \Phi\Phi$). Los tres 2DBD-NRs de *S. mansoni* poseen el dominio bisagra inusualmente extenso. Se analizó también la estructura cuaternaria de Sm2DBD α , mediante ensayos de doble híbrido de levadura y de GST *pull down*, determinado que éste forma homodímeros sugiriéndose que habría cuatro cajas P involucradas en la unión al ADN. (Wu et al., 2007).

Posteriormente, se identificaron tres 2DBD-NRs en el genoma de *E. multilocularis* con gran homología a los tres receptores encontrados en *S. mansoni* (Förster et al., 2011).

Unos años mas adelante, Tharp y colaboradores, clonaron y caracterizaron un receptor de la familia 2DBD-NR en *Schmidtea mediterranea*, denominado nhr-1, homólogo al receptor nuclear Sm2DBD γ de *S. mansoni*. Los investigadores demostraron que dicho factor se expresa en órganos reproductores accesorios y cumple un rol clave en la regulación del desarrollo sexual de las planarias, siendo esencial para su reproducción (Tharp et al., 2014).

La base de datos de WormBase Parasite reporta tres receptores nucleares pertenecientes a la familia 2DBD-NR en *E. granulosus* s.s. G1. A pesar de esto, nuestro grupo de investigación sólo logro amplificar uno de ellos a partir de ADNc de protoescolices de quiste hidático de origen bovino, correspondiente a una isoforma del gen EgrG000379600.1 (Eg37) de WormBase Parasite. La secuencia obtenida se depositó en GenBank con el número de acceso MH092994.2 y la proteína codificante como AZM65758.2 (Eg2DBD α .1). Dicha secuencia posee una longitud completa de 2493 pb y codifica para una proteína de 830 aminoácidos. La comparación de esta secuencia con la secuencia de la base de datos Eg37, reveló algunos cambios de aminoácidos (A313T, T649M; S775P y S786P) y la ausencia de 22 residuos (Riera, 2018; Alvite et al., 2019). El análisis de la estructura génica de la secuencia mostró que la región eliminada está codificada por el extremo 3' del quinto exón, lo que representa un empalme con el uso de un sitio 5' alternativo. A través de análisis bioinformáticos se han descrito regiones consenso de los dominios, posibles señales NLS y de modificaciones post-traduccionales, y se generó un modelo 3D de los dos dominios de unión al ADN (Alvite et al., 2019). Como se menciona la proteína Eg2DBD α .1 tiene dos DBDs, donde el primer DBD estaría compuesto por 68 residuos y que posee dos dedos de zinc (CysX₂CysX₁₃CysX₂Cys y CysX₅CysX₉CysX₂Cys). Se identificó la caja P consenso "EACKK", característica de los 2DBD-NR como fue descrita por Wu y colaboradores (Wu et al., 2006). El segundo dominio, compuesto por 67 residuos y también contiene dos dedos de zinc (CysX₂CysX₁₃CysX₂Cys y CysX₆CysX₉CysX₂Cys). Se estima que la longitud de la bisagra en

Eg2DBD α 1 es de 163 aminoácidos y en dicha región se identificaron dos señales de localización nuclear putativas (Alvite et al., 2019). Mediante modelado 3D, se postula que la hélice alfa Ha del primer DBD engancha el surco mayor del ADN, haciendo interacciones base-específicas a través de su caja P. En particular, Lys194 y Lys195 son los residuos que establecen los enlaces de hidrógeno con las bases del ADN. El modelo tridimensional sugiere que solamente el primer DBD sería capaz de reconocer específicamente al elemento respuesta del ADN, mediante la caja P exclusiva de los 2DBD-NRs. El segundo DBD podría estar contribuyendo a la estabilización del complejo ADN-proteína (Alvite et al., 2019) (Figura 2.10).

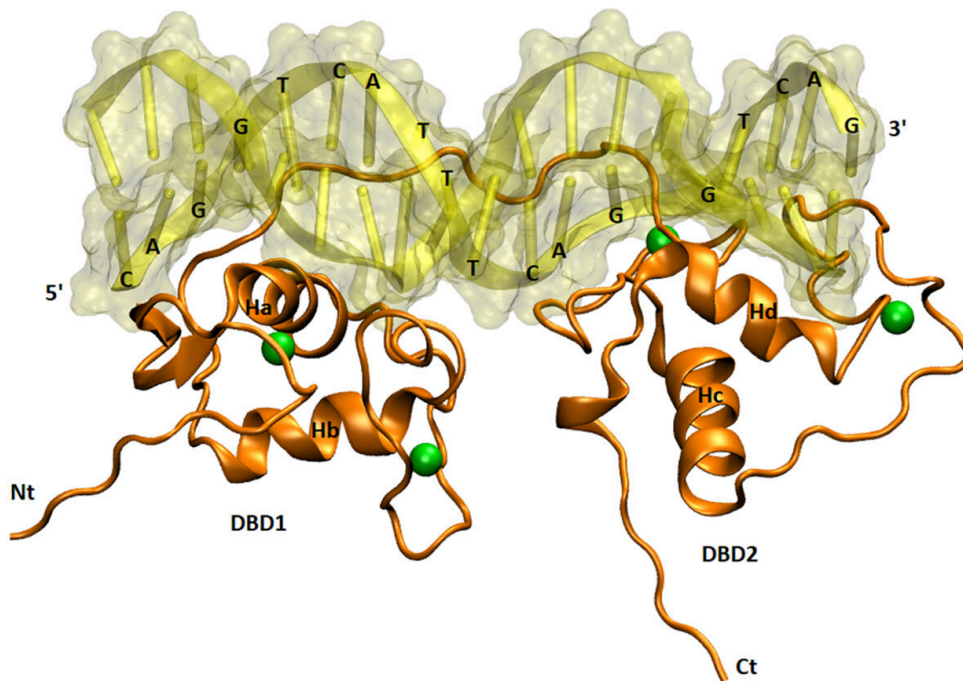


Figura 2.10. Modelado molecular de los dos DBD de Eg2DBD α .1 en complejo con ADN.

Figura obtenida de (Alvite et al., 2019).

2.2.4 Receptores nucleares como blancos de drogas

Desafortunadamente, existen pocas drogas para tratar las infecciones helmínticas y la larga historia del uso extensivo de medicamentos antihelmínticos ha resultado en una tasa creciente de resistencia que se extiende y persiste en las poblaciones parasitarias (Prichard, 1994; Nari et al., 2003). Los benzimidazoles, que son los antiparasitarios de elección para el tratamiento de la infección por *E. granulosus* presentan varias contraindicaciones y efectos secundarios. Se ha descrito que consiguen la resolución de los quistes humanos en un 30 % o menos de casos, con una tasa de recaída del 25 % en tratamientos iniciales y del 60 % en re-tratamientos (Busto-Bea et al., 2016).

Debido a la ausencia de estrategias terapéuticas alternativas eficaces contra infecciones helmíntica, se necesita con urgencia nuevos medicamentos para tratar estas parasitosis. Debido a esto los receptores nucleares se han vuelto dianas farmacológicas prometedoras para el tratamiento de enfermedades parasitarias (Wang et al., 2017). Los NRs se han transformado en blancos atractivos para el desarrollo de drogas de pequeño tamaño molecular y de uso oral, debido a la naturaleza lipofílica de sus ligandos y a su habilidad de modular la expresión de múltiples genes en una misma vía (Evans & Mangelsdorf, 2014). Además, cabe destacar que en el 2006 aproximadamente el 13% de las drogas aprobadas por la FDA interaccionaban con NRs (Overington et al., 2006). Sumado a esto, el hecho de que los miembros de la subfamilia de receptores 2DBDs estén ausentes en los hospederos del parásito, convierte a estas proteínas en blancos terapéuticos prometedores

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

Debido a la necesidad de encontrar nuevas terapias alternativas para tratar la equinocosis quística, se hace fundamental identificar blancos específicos del parásito y a la vez vitales para su supervivencia. Estando en la mira los receptores nucleares como blancos atractivos para drogas contra las enfermedades parasitarias, los 2DBD-NRs particularmente parecen ser blancos prometedores, dado que están presentes en el parásito pero no es sus hospederos.

3. HIPÓTESIS

En base a los antecedentes presentados de los receptores nucleares de la familia 2DBD, nos planteamos la hipótesis de que el mecanismo de acción del receptor nuclear Eg2DBD α .1 de *E. granulosus* involucra la formación de homodímeros a través del dominio de unión a ligandos y no forma heterodímeros con el Receptor X Retinoide. Dado que para llevar a cabo su función biológica, es necesaria la unión de ligandos específicos, la dimerización de Eg2DBD α .1 se verá inducida frente a la presencia de ligandos pertenecientes al hospedero, involucrando al receptor en la comunicación hospedero-parásito.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Debido a la necesidad de encontrar nuevas terapias alternativas para tratar la equinococosis quística, se hace fundamental la identificación de nuevos blancos específicos del parásito y a la vez vitales para su supervivencia, como podrían ser los 2DBD-NRs dado que están ausentes en los hospederos del parásito. En este contexto, el objetivo general de esta tesis se centra dilucidar el mecanismo de acción del receptor nuclear Eg2DBD α .1 perteneciente a la familia de 2DBD-NRs de *Echinococcus granulosus s.l.* comenzando por su caracterización molecular.

4.2 Objetivos específicos

1. Clonar la región codificante completa del receptor nuclear Eg2DBD α .1 de *E. granulosus s.l.* completo.
2. Determinar si Eg2DBD α .1 interacciona consigo mismo formando homodímeros o con EgRXR β formando heterodímeros.
3. Determinar si la dimerización de Eg2DBD α .1 es estimulada por ligandos presentes en el suero del hospedero intermediario del parásito.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Clonado de receptores nucleares de *Echinococcus granulosus s.l.*

5.1.1 Extracción de ARN y obtención de ADNc

Se realizó la extracción del ARN total de 80 μL de protoescolices (PE) de *E. granulosus s.l.* conservados en 300 μL de TRizol (Invitrogen). Los PE se obtuvieron a partir de quistes hidáticos de vaca y fueron conservados en TRizol a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso, los mismos fueron amablemente cedidos por la Dra. Verónica Fernández del Departamento de Inmunología del Instituto de Higiene (UdeLaR). La extracción de ARN, se realizó utilizando el kit comercial Direct-zol RNA Miniprep Plus (ZymoResearch), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. El ARN extraído se cuantificó mediante espectrofotometría por absorbancia a $\lambda=260\text{ nm}$ (Abs_{260}) con el equipo NanoDrop Lite (Thermo Fisher) y se estimó su pureza mediante la relación entre la absorbancia $\lambda=260\text{ nm}$ y $\lambda=280\text{ nm}$ ($\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$).

Para sintetizar el ADN copia (ADNc) se realizó la reacción de retrotranscripción del ARN extraído, utilizando oligonucleótidos de deoxitimidina (oligo dT) y la enzima transcriptasa reversa SuperScript III (Invitrogen). Para ello, 11 μL de ARN molde fue incubado durante 5 minutos a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ con 1 μL de oligo dT 50 μM , 1 μL de dNTPs 10 mM. Luego se agregó 4 μL de *buffer* de reacción 5 X First-Strand Buffer, 1 μL de ditiotreitolo 0,1 M, 1 μL del inhibidor RNaseOUT, y 1 μL de la transcriptasa reversa Superscript III (200 UE/ μL). La mezcla se incubó durante 50 minutos a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. A continuación, se inactivó la enzima incubando por 15 minutos a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalmente se agregó 1 μL de RNasa H para la degradación del ARN utilizado como molde. El ADNc sintetizado se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

Para confirmar la ausencia de ADN genómico en el ADNc sintetizado, realizamos una amplificación por PCR del transcripto de *EgFABP1*. El gen de *EgFABP1* tiene un largo de 474 pb (ID: AF321119.1) y posee un único intrón de 72 pb, por lo que el transcripto maduro tiene un largo de 402 pb. Los cebadores utilizados amplifican desde el codón de inicio del transcripto (*EgFABP1*-D: 5'- GGA TCC ATG GAG GCA TTC CTT G -3') hasta el codón de finalización (*EgFABP1*-R: 5'- CGC CAC CTT TGA GTA GGT TCG -3'). Para la amplificación de *EgFABP1* se utilizó 1 μL de ADNc, 3 μM de cada cebador y 12.5 μL RangerMix 2 X (Bioline) en un volumen final de reacción de 25 μL . Se utilizó el programa mostrado en la Tabla 5.1 y el termociclador Eppendorf Mastercycler Personal (Eppendorf).

Tabla 5.1. Ciclado utilizado en reacciones de PCR para amplificar *EgFABP1*.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	N° de ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 minutos	1
Desnaturalización	98	20 segundos	30
Hibridación	54	30 segundos	
Extensión	72	30 segundos	
Extensión final	72	3 minutos	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) y fueron visualizados mediante tinción con SYBR SafeDNA Gel Stain (Thermo Fisher) en el equipo Fast Gene Gel Pic LED Box (Genetics)

5.1.2 Amplificación mediante PCR

Para amplificar el receptor *Eg2DBD α .1*, nos basamos en la secuencia del receptor *Eg2DBD α* que se encuentra en la base de datos de WormBase Parasite (<https://parasite.wormbase.org/>, *Eg2DBD α* ID: EgrG_000379600). A partir de esta secuencia, se diseñaron cebadores específicos para amplificar una región del ADNc que contuviera los dos DBDs y la región de 66 nt característica por estar presente en *Eg2DBD α* pero ausente en *Eg2DBD α .1*, para diferenciar las isoformas. Se diseñó un cebador directo que amplificara desde el codón de inicio de la traducción (*Eg2DBD α .1-D*) y un cebador reverso que alinea en una zona interna del receptor, incluyendo las regiones anteriormente mencionadas (*Eg2DBD α .1-MSL-R*). Así mismo, se diseñó un cebador reverso que nos permitiera amplificar el ADNc completo de *Eg2DBD α .1* (*Eg2DBD α .1-R*) (Tabla 5.2).

Adicionalmente, de la base de datos de WormBase Parasite se obtuvo la secuencia nucleotídica del ARNm del *EgRXR β* (ID: EgrG_000434500) y se diseñaron cebadores específicos para amplificar la región LBD del receptor de *EgRXR β* (*EgRXR β -LBD*) que incluyeran sitios de corte de enzimas de restricción para una posterior clonación direccional.

Los datos de la temperatura de fusión (T_m), el contenido GC y la probabilidad de formación de horquillas, homo- y hetero-dímeros de cada cebador se evaluaron a partir de la herramienta informática OligoAnalyzer de IDT DNA (<https://www.idtdna.com/>).

En la Tabla 5.2 se pueden observar los cebadores diseñados junto con el dato de la T_m .

Tabla 5.2. Cebadores utilizados para amplificar los ADNc de *Eg2DBDα.1* y de *EgRXRβ-LBD*.

NR	Nombre	Secuencia	T _m (°C)
<i>Eg2DBDα.1</i>	Eg2DBDα.1-D	5' – ATG GCA CAA ACA CCT GCA GCC ACA G – 3'	64,2
	Eg2DBDα.1-MSL-R	5' – CTC TGG CGG ACA AAC TCA TC – 3'	55,8
	Eg2DBDα.1-R	5' – CTA CGG TTG CGT GGG CGG GTG – 3'	65,6
<i>EgRXRβ</i>	EgRXRβ-LBD-EcoRI-D	5' – CCG GAA TTC GCC TCA TCA ATA TGT TCT CAT G – 3'	60,6
	EgRXRβ-BamHI-R	5' – CGC GGA TCC TCA GGT ACT CGA TTC TG – 3'	62,1

NR: receptor nuclear. D: directo; R: reverso. En rojo se marcan lo sitios de corte para las enzimas de restricción.

Para la amplificación de cada receptor, se utilizó 2 µL de ADNc, 3 µM de cada cebador y 12,5 µL RangerMix 2X (Bioline) en un volumen final de reacción de 25 µL. Los pares de cebadores utilizados fueron: Eg2DBDα.1-D/Eg2DBDα.1-R, Eg2DBDα.1-D/Eg2DBDα.1-MSL-R y EgRXRβ-LBD-EcoRI-D/EgRXRβ-BamHI-R.

Se utilizó el programa mostrado en la Tabla 5.3 y el termociclador Eppendorf Mastercycler Personal (Eppendorf).

Tabla 5.3. Ciclado utilizado en la reacción de PCR para amplificar *Eg2DBDα.1* y *EgRXRβ-LBD*.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 minutos	1
Desnaturalización	98	20 segundos	30
Hibridación	54	30 segundos	
Extensión	72	2 / 3 minutos*	
Extensión final	72	3 minutos	1

*Se utilizó 2 minutos para los cebadores de Eg2DBDα.1-D/Eg2DBDα.1-MSL-R y EgRXRβ-LBD-EcoRI-D/EgRXRβ-BamHI-R. Se utilizó 3 minutos para el par Eg2DBDα.1-D/Eg2DBDα.1-R.

5.1.3 Electroforesis y purificación de ADN

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) y visualizados mediante tinción con SYBR SafeDNA Gel Stain (Thermo Fisher) en el equipo Fast Gene Gel Pic LED Box (Genetics). Utilizando el kit comercial Universal DNA Purification Kit (TianGen) se purificó los productos a partir del gel, siguiendo las instrucciones del fabricante. En los casos en que la intensidad de la banda fue baja (cantidad de ADN insuficiente para proseguir

con el siguiente paso), se realizó una reamplificación como se mencionó en la Sección anterior, pero utilizando como ADN molde un 1 μ L de una dilución 1/10 de la reacción de PCR.

5.1.4 Ligación y transformación de células competentes

Una vez obtenido el producto de PCR puro se confirmó la secuencia de los fragmentos mediante secuenciación Sanger (Servicio de secuenciación, Instituto Pasteur de Montevideo).

Una vez identificados los productos amplificados por PCR se clonaron en el vector pGM-T (TianGen) (Anexo 10.1). La reacción de ligación se llevó a cabo utilizando 50 ng de plásmido y la cantidad de inserto necesaria para mantener una relación molar inserto:plásmido de 10:1. Para la ligación se utilizó 5 UE de la enzima T4 ADN ligasa (Thermo Fisher) y 2 μ L del *buffer* 10 X T4 DNA Ligase Buffer (Thermo Fisher) en un volumen final de 20 μ L. La mezcla se incubó durante toda la noche a 4 °C.

Se utilizó 10 μ L de la reacción de ligación para transformar 50 μ L de células de *E. coli* DH5 α competentes. Para su transformación se utilizó el método de *shock* térmico, en el cual se incubó células con la mezcla de ligación durante 30 minutos en hielo, seguido de 90 segundos a 42 °C y se volvieron a incubar en hielo durante 2 minutos. Luego se agregó 500 μ L de medio de cultivo Luria-Bertani (LB, Anexo 10.2) y se mantuvieron 60 minutos a 37 °C con agitación a 200 rpm. Por último, se sembró 100 y 200 μ L de cada transformación en placas de medio LB agar conteniendo 100 μ g/mL de ampicilina, 20 mg/ μ L de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y 20 mg/ μ L de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-GAL). Las placas se incubaron a 37 °C durante toda la noche.

5.1.5 Selección de clones recombinantes

Para la purificación de los plásmidos se seleccionó entre 3 y 5 colonias blancas y se utilizaron para inocular 3 mL de LB con 100 μ g/mL de ampicilina y se incubaron toda la noche a 37 °C a 200 rpm. La extracción de los plásmidos se realizó mediante mini purificaciones de ADN plasmídico por lisis alcalina utilizando el kit comercial ZymoPURE™ II Plasmid Miniprep Kit (ZymoResearch) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se verificó la presencia del inserto en los plásmidos purificados mediante PCR utilizando como cebador directo el cebador universal T7, presente en el plásmido (Anexo 10.3), y un cebador reverso específico del fragmento clonado (Tabla 5.1). La reacción se llevó a cabo como se mencionó en la Sección 5.1.2. Se seleccionó uno de los clones que resultó positivo y se confirmó la secuencia del ADN clonado mediante secuenciación Sanger (Servicio de secuenciación MacroGen, Corea).

5.1.6 Análisis de secuencias

Los electroferogramas producto de las secuenciaciones de ADN se analizaron mediante el programa SnapGene Viewer y se corrigieron manualmente cuando fue necesario.

Se realizó un alineamiento de la secuencia de *Eg2DBD α .1*, *Eg2DBD α* (ID: EgrG_000379600) y de una región del receptor *Eg2DBD α .1* previamente obtenida por nuestro grupo de investigación denominada en esta tesis *Eg2DBD α .1ct*, la cual abarca desde el segundo DBD hasta el codón de terminación (originalmente denominada *Eg2DBDg1cl* (Riera, 2018)). El alineamiento se realizó con el programa CLC Sequence Viewer versión 8.0 (QIAGEN Aarhus).

5.2 Ensayos de doble híbrido de levadura (DHL)

Para estudiar la dimerización de *Eg2DBD α .1* nos planteamos dos escenarios: la interacción de *Eg2DBD α .1* consigo mismo o con el receptor *EgRXR β* . Con el fin de disminuir la complejidad del sistema, nos centramos en el estudio del dominio de unión a ligandos (LBD) de ambos receptores. El primer abordaje que nos propusimos realizar para estudiar la dimerización del receptor nuclear *Eg2DBD α .1*, fue realizar ensayos de doble híbrido de levadura para estudiar la interacción proteína-proteína en un sistema *in vivo*.

5.2.1 Fundamentos del ensayo de DHL

El estudio de la interacción proteína-proteína mediante el ensayo de doble híbrido de levadura (DHL) consiste en fusionar la proteína en estudio (proteína carnada) al dominio de unión al ADN GAL4 y la proteína que se quiere estudiar la interacción (proteína presa) al dominio de activación de GAL4 (Fields & Song, 1989; Chien et al., 1991). Si existe interacción entre ambas proteínas, el dominio de unión al ADN y el de activación entran en proximidad y ocurre la expresión de genes reporteros (ver esquema Figura 5.1).

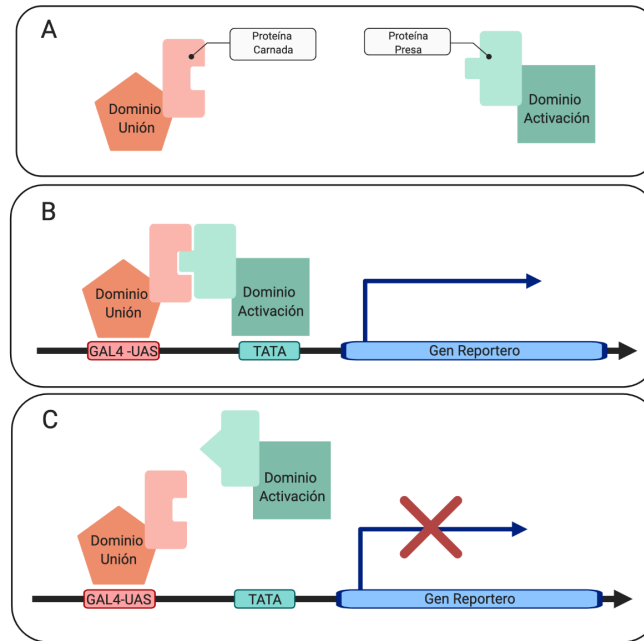


Figura 5.1. Esquema del sistema de doble híbrido de levadura.

(A) Dominio de unión al ADN y de activación, acoplados a la proteína carnada y presa respectivamente. (B) Activación del gen reportero por la interacción entre las proteínas presa y carnada. (C) No hay activación del gen reportero dado que las proteínas no interactúan. Imagen creada en BioRender.com

Para realizar el ensayo de DHL, se utilizó el sistema Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3 (Clontech) y la cepa de *S. cerevisiae* AH109 (Anexo 10.4). Este sistema utiliza tres genes reporteros: el gen *HIS3* que codifica para la enzima imidazolglicerol-fosfato deshidratasa la cual cataliza el sexto paso en la biosíntesis de histidina; *ADE2* que codifica para la enzima fosforribosilaminoimidazol carboxilasa, que participa en la ruta de biosíntesis de purinas *de novo*; y *MEL1* el cual codifica para la enzima alfa-galactosidasa. Los genes *HIS3*, *ADE2* y *MEL1* se encuentran bajo el control de tres elementos promotores diferentes corriente arriba (UAS - *upstream activating sequences*) los promotores GAL1, GAL2 y MEL1, respectivamente, que responden a GAL4. El gen reportero *ADE2* por sí solo proporciona una fuerte selección nutricional, mientras que la selección mediada por *HIS3* permite controlar el rigor de la selección siendo posible la detección de proteínas con interacción débil (James et al., 1996).

5.2.2 Clonado de *Eg2DBDα.1-LBD* y *EgRXRβ-LBD* en plásmidos del sistema

Para el ensayo de DHL fueron utilizados los plásmidos pGBKT7 y pGADT7 (Clontech), los cuales fueron cedidos muy amablemente por el Dr. Uriel Koziol de la Sección Biología Celular, Facultad de Ciencias (UdelaR). El plásmido pGBKT7 expresa el dominio de unión al ADN GAL4 (aminoácidos del 1 al 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 (Figura 5.2).

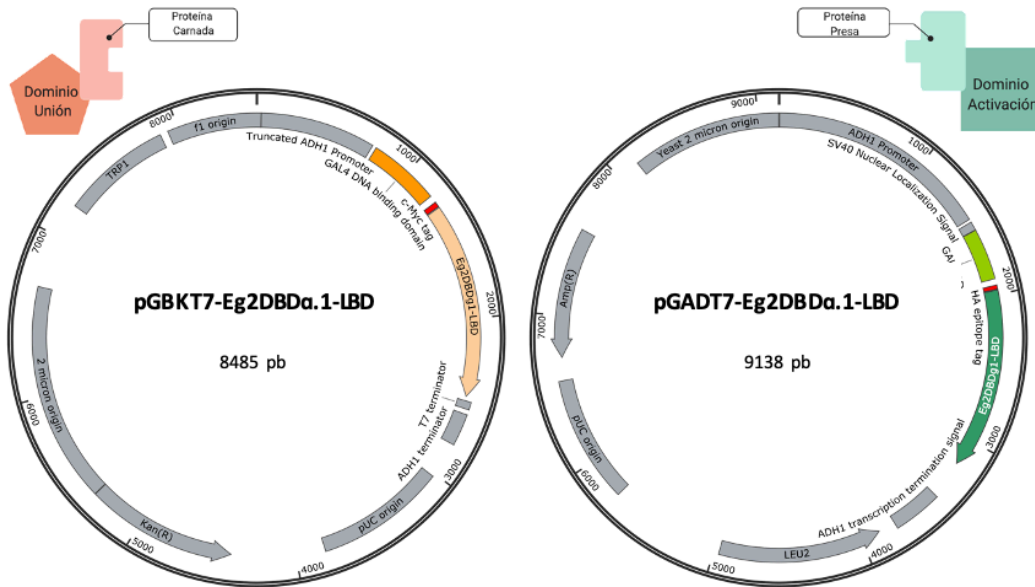


Figura 5.2. Plásmidos utilizados para generar las proteínas de fusión a GAL4-BD y a GAL-AD

Plásmidos pGBKT7 y pGADT7 utilizados en el sistema de DHL con el inserto Eg2DBD α .1-LBD. Imagen generada con SnapGene Viewer.

5.2.2.1 Amplificación de las regiones de interés mediante PCR

Para realizar los ensayos de DHL se diseñó cebadores específicos para amplificar las regiones de ADNc correspondientes a los LBDs de Eg2DBD α .1 y de EgRXR β . A estos cebadores se les incluyó sitios de corte de enzimas de restricción para permitir la clonación direccional, verificando previamente que los sitios de restricción seleccionados no estuvieran presentes en los insertos a clonar. Los datos de las T_m , el contenido GC y la probabilidad de formación de horquillas, homo- y heterodímeros para cada cebador se analizó a partir de la herramienta informática OligoAnalyzer de IDT DNA. Las secuencias y las temperaturas de fusión de los cebadores utilizados para amplificar *Eg2DBD α .1-LBD* se pueden observar en la Tabla 5.4 y los utilizados para amplificar *EgRXR β -LBD* en la Tabla 5.2.

Tabla 5.4. Cebadores utilizados para la amplificación de la región del LBD de *Eg2DBD α .1*.

Nombre	Secuencia	T_m
Eg2DBD α .1-LBD-NdeI-D	5'– CGCCAT ATG GCA CAA ACA CCT GCA GCC ACA GCC TC – 3'	70.0°C
Eg2DBD α .1-SacI-Sall-R	5'–GTC GAC GAG CTC CTA CGG TTG CGT GGG CGG G – 3'	71.0°C

D: directo. R: reverso. En rojo se marcan los sitios de corte para las enzimas de restricción.

Se realizó entonces la amplificación por PCR del LBD de *Eg2DBD α .1* a partir de 10 ng del plásmido recombinante pGM-T-Eg2DBD α .1ct, previamente obtenido por nuestro grupo de investigación (denominado originalmente pGM-T/Eg2DBDg1cl (Riera, 2018)) y la amplificación del LBD de *EgRXR β* a partir de 10 ng del plásmido pGM-T-EgRXR β -LBD generado en esta tesis. Las reacciones se realizaron como se indicó en la sección 5.1.2 utilizando el programa de ciclado de la tabla 5.5 y los cebadores de la Tabla 5.2 y 5.4 para EgRXR β -LBD y Eg2DBD α .1-LBD, respectivamente.

Tabla 5.5. Ciclado utilizado en la reacción de PCR para amplificar los LBDs de *Eg2DBD α .1* y de *EgRXR β* .

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	N° de repeticiones
Pre- desnaturalización	95	3 minutos	1
Desnaturalización	98	20 segundos	30
Hibridación	54	30 segundos	
Extensión	72	2 minutos	
Extensión final	72	3 minutos	1

Los productos de PCR así obtenidos fueron purificados como se indicó en la Sección 5.1.3 y se confirmó la secuencia de los fragmentos obtenidos mediante secuenciación Sanger (Servicio de secuenciación, Instituto Pasteur de Montevideo).

5.2.2.2 Digestión con enzimas de restricción y ligación en los plásmidos de levadura

Para poder clonar los productos de PCR purificados, se realizó la digestión de los productos de PCR y de los plásmidos de levadura con dos enzimas de restricción. Dichas digestiones se llevaron a cabo de acuerdo a la Tabla 5.6. Las enzimas de restricción utilizadas formaban parte del sistema Anza Restriction Enzyme Cloning System (Invitrogen) que utiliza un único *buffer* para todas las digestiones, por lo que pudieron ser realizadas en un único paso.

Tabla 5.6. Enzimas utilizadas para el clonado de *Eg2DBD α .1*-LBD y *EgRXR β* -LBD en los plásmidos de levadura.

		Plásmido	
		pGADT7	pGBKT7
Inserto	Eg2DBD α .1-LBD	NdeI/SacI	NdeI/Sall
	EgRXR β -LBD	EcoRI/BamHI	EcoRI/BamHI

Todas las digestiones se realizaron utilizando 1 μ g de ADN, 1 μ L de cada enzima de restricción y 2 μ L de *buffer* Anza 10 X en un volumen final de reacción de 20 μ L. Las reacciones se incubaron

durante 30 minutos a 37 °C, y luego 20 minutos a 80 °C para inactivar las enzimas. La purificación de los ADNs digeridos se realizó como se indicó en la Sección 5.1.3.

Una vez obtenidos los insertos y los plásmidos digeridos y purificados, se realizaron las ligaciones y se utilizaron para transformar células de *E. coli* DH5 α competentes como se indica en la Sección 5.1.4.

Se sembró 100 y 200 μ L de cada transformación en placas con medio LB-Agar conteniendo 100 μ g/mL de ampicilina para aquellas bacterias transformadas con el plásmido pGADT7, y en placas con medio LB-Agar conteniendo 50 μ g/mL de kanamicina para las bacterias transformadas con el plásmido pGBKT7. Las placas se incubaron a 37 °C durante toda la noche.

5.2.2.3 Selección de clones recombinantes y purificación de los plásmidos

Se seleccionó entre 5 y 10 colonias de cada una de las transformaciones (pGADT7-Eg2DBD α .1-LBD, pGBKT7-Eg2DBD α .1-LBD, pGADT7-EgRXR β -LBD y pGBKT7-EgRXR β -LBD) para verificar la presencia del inserto en los plásmidos mediante PCR a partir de colonia, utilizando las condiciones que se indican en la Sección 5.2.2.1. Una vez seleccionadas las colonias que contenía los plásmidos con los insertos de interés, se inocularon en 50 mL LB con 100 μ g/mL de ampicilina y 50 μ g/mL de kanamicina para los plásmidos pGADT7 y pGBKT7, respectivamente, y se incubaron durante toda la noche a 37 °C a 200 rpm. Para la extracción de los plásmidos se utilizó el kit ZymoPURE™ II PlasmidMidiprep Kit (ZymoResearch) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se verificó la presencia del inserto en los plásmidos purificados mediante PCR, utilizando como cebador directo el cebador universal T7 y un cebador reverso específico para cada inserto (Tabla 5.2 y 5.4). Las condiciones de la reacción fueron las mismas que se mencionaron en la Sección 5.1.2 y la purificación de los mismos se realizó como se indica en la Sección 5.1.3. Se confirmó la secuencia de los insertos clonados mediante secuenciación Sanger (Servicio de secuenciación, Macrogen, Corea).

De esta misma forma, se realizó midi purificaciones de ADN plasmídico de los plásmidos para los controles positivos y negativos aconsejados en el kit Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3 (Clontech), los plásmidos pGBKT7-53, pGADT7-T y pGBKT7-Lam y de los plásmidos pGADT7 y pGBKT7 no recombinantes, los cuales fueron cedidos amablemente por el Dr. Uriel Koziol.

5.2.3 Co-transformación de *S. cerevisiae*

Una vez obtenidos los plásmidos purificados, se utilizaron para co-transformar la cepa AH109 de *S. cerevisiae*. Dicha cepa presenta auxotrofia por leucina y triptófano, dado que presenta las mutaciones leu2-3,112 y Trp1-901, las cuales se complementan en *cis* con los plásmidos pGADT7

y pGBKT7, respectivamente. El plásmido pGADT7 contiene el gen *LEU2* el cual codifica para la enzima β -isopropilmalato deshidrogenasa que cataliza el tercer paso en la ruta de biosíntesis de leucina. El plásmido pGBKT7 contiene el gen de *TRP1* que codifica para la enzima isomerasa de fosforribosilantranilato, la cual cataliza el tercer paso en la biosíntesis de triptófano. Las levaduras que no sean co-transformadas con ambos plásmidos no podrán crecer en medios carentes de leucina y triptófano. Las co-transformaciones realizadas se pueden observar en la Tabla 5.7.

Tabla 5.7. Co-transformaciones realizadas en cepa AH109 de *S. cerevisiae*.

N°	pGADT7	pGBKT7
1	pGADT7-T	pGBKT7-53
2	pGADT7-T	pGBKT7-Lam
3	pGADT7-Eg2DBD α .1-LBD	pGBKT7
4	pGADT7	pGBKT7-Eg2DBD α .1-LBD
5	pGADT7-EgRXR β -LBD	pGBKT7
6	pGADT7	pGBKT7-EgRXR β -LBD
7	pGADT7-Eg2DBD α .1-LBD	pGBKT7-Eg2DBD α .1-LBD
8	pGADT7-Eg2DBD α .1-LBD	pGBKT7-EgRXR β -LBD
9	pGADT7-EgRXR β -LBD	pGBKT7-Eg2DBD α .1-LBD

Para generar las placas con medio carente de leucina y triptófano se utiliza un medio definido sintético (SD) que incluye una base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos (Sigma), el cual se complementa con suplementos que contienen una mezcla de aminoácidos y nucleósidos específicos (DO, *dropouts*), en este caso se utilizó un DO carente de leucina y de triptófano (Clontech). A este medio le llamamos SD/-Leu/-Trp (Anexo 10.2).

Para realizar la co-transformación de levaduras *S. cerevisiae* AH109 se partió de un precultivo en medio extracto de levadura/peptona/dextrosa, suplementado con adenina hemisulfato (YPDA, *Yeast Extract–Peptone–Dextrose–Adenine*, Anexo 10.2) incubado durante 16 horas a 30 °C con agitación a 250 rpm. Este se centrifugó a 700 xg durante 5 minutos y el residuo se resuspendió en 1 mL de *buffer* 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 5.7) y se incubó 30 minutos a 42 °C. Posteriormente se plaqueó en placas de SD/-Leu/-Trp y se incubó durante 72 hs a 30 °C. El procedimiento de transformación mencionado anteriormente se puede ver esquematizado en la Figura 5.3.

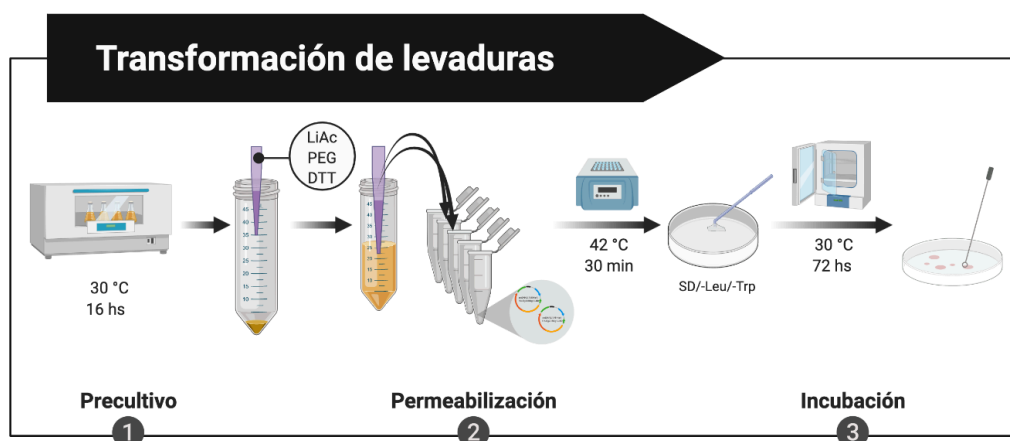


Figura 5.3. Esquema del proceso de transformación de levaduras.

Imagen generada en Biorender.com

5.2.4 Selección de transformantes

Luego de las 72 horas de crecimiento de las levaduras co-transformadas en medio SD/-Leu/-Trp, se seleccionó tres colonias de cada una de las transformaciones y se colocaron en suspensión en 100 μ L de PBS. Se sembró por goteo 10 μ L de la suspensión en tres placas de selección diferentes: una placa de baja rigurosidad (SD/-Leu/-Trp) que permite el crecimiento de levaduras doblemente transformadas con pGBKT7 y pGADT7; una placa de rigurosidad media carente de leucina, triptófano y de histidina (SD/-Leu/-Trp/-His) que permite evidenciar interacciones débiles entre proteínas; y por último una placa de alta rigurosidad que adicionalmente es carente de adenina (SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade) y permite evidenciar interacciones fuertes entre proteínas (Anexo 10.2). Dichas placas se incubaron por 72 horas a 30 °C (Figura 5.4). Este ensayo se realizó por quintuplicado, testeando en totalidad 15 colonias distintas de cada una de las co-transformaciones.

Para el medio SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade se utilizó el medio definido SD con un DO carente de leucina, triptófano, histidina y adenina (-Leu/-Trp/-His/-Ade DO, Sigma) y se adicionó adenina hemisulfato (Sigma) al 0,03% para generar el medio SD/-Leu/-Trp/-His.

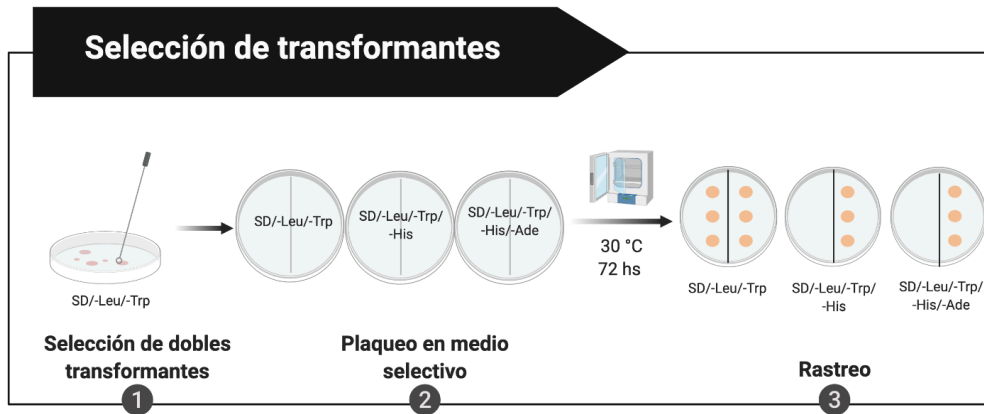


Figura 5.4. Esquema del proceso de selección de levaduras transformadas.

Imagen generada en Biorender.com

Se testeó la necesidad de utilizar 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT, MP Biomedicals) en las placas de rigurosidad media (SD/-Leu/-Trp/-His) para eliminar falsos positivos. Para ello se co-transformaron levaduras con pGADT7/pGBKT7-EgRXR β -LBD y con pGADT7/pGADT7-Eg2DBD α .1-LBD y se plaquearon en placas de medio SD/-Leu/-Trp/-His con distintas concentraciones de 3-AT: 2,5 mM, 5 mM, 7,5 mM, 10 mM y en ausencia. Se incubaron durante 8 días a 30 °C.

5.2.5 Ensayos de Western Blot

Para confirmar la presencia de las proteínas recombinantes se realizaron ensayos de *Western Blot* (WB). Para ello, se realizaron precultivos de 3 mL de medio SD/-Leu/-Trp de las co-transformaciones 7, 8 y 9 de la Tabla 5.7, los cuales se incubaron durante toda la noche a 30 °C a 250 rpm. Se centrifugó los precultivos a 700 xg durante 5 minutos, y el residuo se resuspendió en 100 μ L de *buffer* Laemmli SDS 1 X (Anexo 10.5). Las muestras se hirvieron durante 5 minutos y se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) al 8 % (Anexo 10.5).

Una vez finalizadas las electroforesis, las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de PVDF Hybond-P (Amersham Biosciences) en *buffer* de transferencia (Anexo 10.6). Las membranas se bloquearon durante toda la noche a 4 °C con solución de bloqueo (Anexo 10.6). Posteriormente, se incubaron dos horas a temperatura ambiente con los anticuerpos primarios anti-c-Myc y anti-HA, ambos a una concentración final de 0,5 μ g/mL en solución de bloqueo y luego se realizaron tres lavados de 15 min con *buffer* TBS-T (Anexo 10.6). Posteriormente, las membranas fueron incubadas durante una hora con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados a fosfatasa alcalina, ambos diluidos 1/30000 en TBS-T, y se lavaron

nuevamente en las condiciones mencionadas anteriormente. Detalles de los anticuerpos utilizados se pueden observar en el Anexo 10.7.

Para el revelado, se utilizó el reactivo nitro azul de tetrazolio (NBT, Sigma) y el reactivo 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP, Sigma), deteniendo la reacción con agua.

5.3 Ensayos de co-inmunoprecipitación (Co-IP) a partir de cultivo celular

Para confirmar los resultados obtenidos mediante el ensayo de DHL, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación (Co-IP) a partir de extractos proteicos obtenidos de cultivos de células epiteliales de adenocarcinoma de cérvix humanas (HeLa) co-transfectadas.

5.3.1 Clonado en plásmido pcDNA3.1/V5-His

Para llevar a cabo este ensayo se utilizó el plásmido pcDNA3.1/V5-His A (pcDNA, Anexo 10.1), el cual está diseñado para la expresión de un alto nivel de proteínas recombinantes en células de mamífero. A partir del mismo, fueron generados dos plásmidos pcDNA recombinantes cada uno expresando la fusión de Eg2DBD α .1-LBD a dos epítopos distintos (HA o c-Myc).

5.3.1.1 Amplificación de las regiones de interés mediante PCR

Por PCR se amplificó la región que codifica para HA-Eg2DBD α .1-LBD a partir del plásmido pGADT7-Eg2DBD α .1-LBD y la región que codifica para c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD a partir del plásmido pGBKT7-Eg2DBD α .1-LBD. Se utilizó como cebador directo el cebador universal T7 y como cebador reverso se utilizaron los cebadores pAD-R y pBD-R para pGADT7-Eg2DBD α .1-LBD y para pGBKT7-Eg2DBD α .1-LBD, respectivamente (Anexo 10.3). Las condiciones de la reacción fueron las indicadas en la Sección 5.1.2 utilizando el ciclado de la Tabla 5.5.

5.3.1.2 Ligación de los insertos en pcDNA

Para el clonado en pcDNA, se digirió 1 μ g del plásmido con 1 μ L de la enzima de restricción Eco321 (Thermo Fisher), 2 μ L de *buffer* R 10 X en un volumen final de reacción de 20 μ L. Para obtener la cantidad necesaria del plásmido digerido para la posterior ligación, se realizó dicha reacción por quintuplicado. Las digestiones se realizaron incubando durante 60 minutos a 37 °C y luego 20 minutos a 80 °C para inactivar la enzima. Para la purificación del plásmido digerido, se realizó el protocolo mencionado en la Sección 5.1.3.

Dado que la enzima Eco321 genera extremos romos en los sitios de corte, para el clonado de HA-Eg2DBD α .1-LBD y c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD se clivó la adenina (dA) desapareada en el extremo 3' de los productos de PCR utilizando la enzima DNA Blunting (Thermo Fisher), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la ligación y transformación de células competentes, se siguió

el protocolo mencionado en la Sección 5.1.4. Por último, se sembró 100 μL de cada transformación en placas de medio LB-Agar conteniendo 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina. Las placas se incubaron a 37 °C durante toda la noche.

5.3.1.3 Selección de clones recombinantes y purificación de los plásmidos

Se seleccionó entre 5 y 10 colonias transformantes para rastrear mediante PCR de colonia la presencia del inserto en el plásmido. Para ello se utilizó como cebador directo el cebador universal T7-F y como cebadores reversos pAD-R y pBD-R para los insertos pcDNA-HA-Eg2DBD α .1-LBD y pcDNA-c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD, respectivamente. Las condiciones de la reacción de PCR fueron las indicadas en la Sección 5.1.2.

Dado que la ligación de los insertos en el plásmido pcDNA se realizó mediante ligación de extremos romos, además de evaluar la presencia del inserto, fue necesario evaluar la direccionalidad del mismo. Para ello, se realizó una reacción de PCR utilizando únicamente el cebador T7-F, a partir de la cual se detectará amplificación solamente si el inserto está clonado en la dirección inversa, como se explica en la Figura 5.5.



Figura 5.5. Esquema de las posibles formas de ligación de c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD en pcDNA.

(A) Dirección deseada. **(B)** Dirección inversa.

Una vez seleccionadas las colonias que contenían los plásmidos con los insertos de interés en el sentido correcto, se inocularon en 50 mL LB con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina y se incubaron toda la noche a 37 °C a 200 rpm. La extracción de los plásmidos y su purificación se explican en la Sección 5.1.5. Se verificó la presencia del inserto en los plásmidos purificados mediante PCR, utilizando como cebador directo T7-F y como cebador reverso pAD-R o pBD-R según corresponda, utilizando las condiciones de ciclado ya descritas. Los productos de PCR así obtenidos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa 1 %. Se confirmó la secuencia de los insertos en los plásmidos purificados mediante secuenciación Sanger (Servicio de secuenciación, Instituto Pasteur de Montevideo).

5.3.2 Transfección de células HeLa

Una vez obtenidos los plásmidos recombinantes pcDNA-HA-Eg2DBD α .1-LBD y pcDNA-c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD, se utilizaron para transfectar células HeLa (ATCC[®] CCL2[™]). Las transfecciones fueron realizadas en el Departamento de Genética del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) bajo la orientación de la Dra. Lucia Canclini en el marco de una pasantía del PEDECIBA Biología.

5.3.2.1 Cultivo de células HeLa

Para el cultivo de HeLa se utilizó como medio de cultivo DMEM High Glucose (Capricorn) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB, Gibco) y se incubaron a 37 °C, atmósfera de 5 % de CO₂. Como medio de congelamiento para preservar la línea celular se utilizó 70 % medio de cultivo DMEM, 20 % de SFB y 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO) en ampollas para criopreservación. Las ampollas se mantuvieron a -80 °C en el caso de congelamientos por periodos cortos (hasta un mes) o en crioreservorios de nitrógeno líquido por periodos más prolongados.

5.3.2.2 Puesta a punto del ensayo de transfección

Todos los experimentos de transfección se hicieron en placas de 6 pocillos, sembrando 5 x 10⁵ células por pocillo (en un volumen total de medio de 2,5 mL) y se incubó a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂ por espacio de 24 horas para permitir que las células se adhiriesen al sustrato. Posteriormente, se realizaron los ensayos de transfección de las células HeLa utilizando un método basado en el uso de lípidos catiónicos, utilizando Lipofectamine[®] 2000 Reagent (Invitrogen).

Se determinó las condiciones óptimas de transfección poniendo a punto la relación ADN/lipofectamina y el tiempo de cultivo post-transfección en el cual se realizaron los extractos proteicos. En una primera instancia se evaluó la relación plásmido/lipofectamina a utilizar determinado la eficiencia de transfección de forma cualitativa utilizando el plásmido pEX-EGFP-Lv01 (Anexo 10.1), que codifica para una variante mejorada de la proteína fluorescente verde (EGFP, *enhanced green fluorescent protein*). Se utilizó 4 μ g del plásmido pEX-EGFP-Lv01 y distintas cantidades de lipofectamina: 6, 9, 12 y 15 μ L. Las células se mantuvieron en cultivo en medio DMEM suplementado con 10 % de SFB y fueron observadas mediante microscopía confocal a las 12, 18, 24 y 36 horas post-transfección utilizando los equipos Olympus BX61-Fluoview FV300 y Zeiss LSM800.

Para evaluar el tiempo de incubación luego de la transfección en el cuál la expresión de HA-Eg2DBD α .1-LBD y c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD fuera máxima, se realizaron ensayos de

inmunocitoquímica observando los preparados mediante microscopia confocal. Para ello, se utilizaron placas de 6 pocillos con cubreobjetos de 16 mm² colocados en el fondo de cada pocillo. La transfección se realizó utilizando 2 µg de cada uno de los plásmidos (pcDNA-HA-Eg2DBDα.1-LBD y pcDNA3-c-Myc-Eg2DBDα.1-LBD), 9 µL de lipofectamina (condición óptima previamente establecida) y se incubaron por 12, 18, 24 y 36 horas. Las células transfectadas se lavaron con PBS a 37 °C y fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4 % durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados de 5 minutos a temperatura ambiente con PBS en agitación, y luego las células se permeabilizaron y bloquearon con 500 µL de *buffer* de bloqueo (1 % BSA, 0,05 % tritón X-100 en PBS) durante 40 minutos a temperatura ambiente en agitación. Luego se incubó con los anticuerpos anti-HA y anti-c-Myc (Anexo 10.8), ambos en una concentración final de 5 µg/mL en *buffer* de bloqueo, durante 2 horas a temperatura ambiente. Se realizó tres lavados de 5 minutos con *buffer* de bloqueo a temperatura ambiente en agitación y posteriormente se incubó con los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón conjugado a AlexaFluor 488 (Invitrogen) y anti-IgG de conejo conjugado a AlexaFluor 555 (Invitrogen) ambos en una concentración final de 2 µg/mL (Anexo 10.8). Además se incorporó 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride (DAPI – Invitrogen) en una concentración final de 2 µg/mL para la contratinción nuclear y faloidina conjugada a AlexaFluor 647 (Invitrogen) en una dilución 1/100 para la contratinción del citoesqueleto de actina. Dicha mezcla se realizó en *buffer* de bloqueo y se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente. Una vez culminada la incubación, se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS para finalmente retirar los vidrios de los pocillos y montarlos sobre un portaobjetos con medio de montaje ProLong Gold Antifade (Invitrogen). Los preparados se visualizaron mediante microscopía confocal utilizando los equipos Olympus BX61-Fluoview FV300 y Zeiss LSM800 y la eficiencia de transfección para los distintos tiempos de incubación se calculó según la Ecuación 5.1.

$$\text{Eficiencia de transfección (\%)} = \frac{n^{\circ} \text{ de células transfectadas}}{n^{\circ} \text{ de células totales}} \times 100$$

Ecuación 5.1

Para corroborar que estas condiciones fueran también favorables al ser reveladas HA-Eg2DBDα.1-LBD y c-Myc-Eg2DBDα.1-LBD mediante *Western Blot*, se realizó la transfección de células HeLa utilizando 2 µg de cada uno de los plásmidos, distintas cantidades de lipofectamina (6, 9, 12 y 15 µL) y a las 18 horas post-transfección se obtuvieron los extractos proteicos como se menciona más adelante en la sección 5.3.2.4. Una vez obtenidos los extractos, se realizaron los ensayos de *Western Blot* como se menciona en la Sección 5.2.5

5.3.2.3 Ensayos de transfección de células HeLa

Finalmente se optó por realizar las transfecciones con 9 μ L de lipofectamina y 4 μ g de plásmido total, con un tiempo de incubación de 18 horas. Se realizaron cuatro transfecciones distintas: 1) pcDNA-HA-Eg2DBD α .1-LBD y pcDNA3-c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD; 2) pcDNA-HA-Eg2DBD α .1-LBD y pcDNA no recombinante; 3) pcDNA-c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y pcDNA no recombinante y 4) únicamente con pcDNA no recombinante.

5.3.2.4 Obtención de extractos proteicos

Para obtener los extractos proteicos de las células HeLa transfectadas, se procedió a realizar la lisis celular. Para ello, los pocillos se lavaron con 3 mL PBS a 37 °C para luego lisar las células en 300 μ L de *buffer* de lisis (PBS, 0,5 % NP40 *substitute*, 10 % glicerol, 1 % cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich)), utilizando un *scraper* para desprender las células del pocillo, manteniendo siempre la muestra a 4 °C. Posteriormente, el extracto fue congelado en nitrógeno líquido y guardado a -80 °C hasta su uso. Los extractos fueron centrifugados a 14.000 xg por 20 minutos a 4 °C y se conservó el sobrenadante en un nuevo tubo, los cuales se utilizaron inmediatamente o fueron conservados a -80 °C hasta su utilización.

5.3.3 Ensayos de inmunoprecipitación

Se obtuvo así cuatro extractos proteicos diferentes que se utilizaron para realizar los ensayos de co-inmunoprecipitación. Para ello, se añadió 3 μ g de anti-c-Myc (Invitrogen) a 250 μ L de cada extracto proteico y se incubó durante toda la noche a 4 °C con agitación suave. Posteriormente, se agregó 10 μ L de Protein A/G PLUS-Agarose (Santa Cruz Biotechnology) y se volvió a incubar durante toda la noche a 4 °C con agitación suave. Luego, los preparados se centrifugaron a 1000 xg por 5 minutos a 4 °C y se retiró el sobrenadante (este se almacena para posterior análisis). Se realizaron cuatro lavados de la resina con 1 mL de PBS con el mismo cóctel de inhibidores de proteasa utilizado previamente, centrifugando a 1000 xg por 5 minutos a 4 °C y descartando el sobrenadante. Finalmente en el último lavado, se descartó el sobrenadante y se resuspendió la resina en 40 μ L de *buffer* Laemmli SDS 2 X. Se hirvió 5 minutos a 100 °C para liberar las proteínas de la resina de agarosa y se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

5.3.4 Detección de proteínas co-inmunoprecipitadas

Las muestras se sometieron a electroforesis SDS-PAGE al 8 %. Una vez finalizada la electroforesis se procedió a realizar el *Western Blot* como se mencionó en la Sección 5.2.5. A su vez, para el revelado del WB también se utilizó anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano (Anexo 10.7) en una concentración de 0,5 μ g/mL final en TBS-T. La visualización se realizó

mediante quimioluminiscencia incubando la membrana con el reactivo ECL (Thermo Fisher) durante un minuto y colocándola en el equipo GBox Chemi XT4 (Syngene) para su detección.

En la Figura 5.6 se puede ver en forma esquematizada el proceso completo del ensayo de co-inmunoprecipitación.

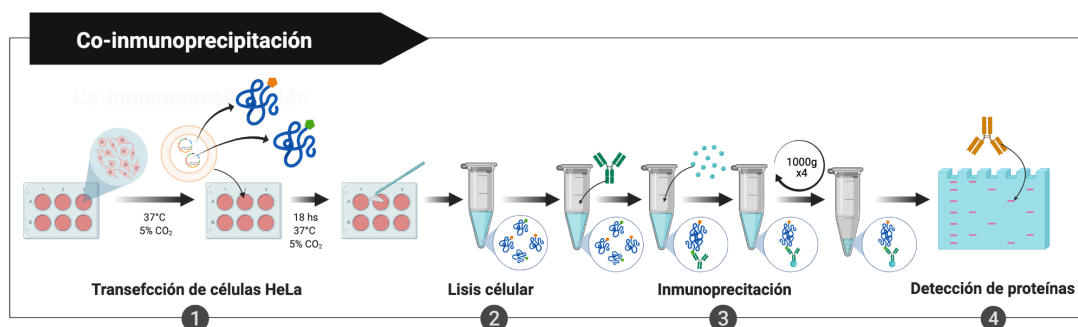


Figura 5.6. Esquema del ensayo de co-inmunoprecipitación a partir de extractos proteicos generados de cultivos celulares transfectados.

Imagen generada en Biorender.com

5.4 Ensayos de entrecruzamiento químico en cultivo celular (EQ)

Para estabilizar las interacciones entre los monómeros del dímero, realizamos ensayos de entrecruzamiento químico de los extractos proteicos.

5.4.1 Entrecruzamiento químico con distintos agentes

Para realizar los ensayos de entrecruzamiento químico, se partió de células HeLa transfectadas como se indicó en la Sección 5.3.2.3. Luego de las 18 horas de transfección, las células se lavaron con PBS a 37 °C para retirar restos del medio de cultivo y se agregó 300 µL de PBS conteniendo el agente entrecruzante.

Se probaron tres agentes entrecruzantes diferentes, permeables a la membrana celular. En una primera instancia, se probó el agente entrecruzante comercial bis[2-(succinimidyl)oxycarbonyloxy]ethyl]sulfone (BSOCOES, Thermo Fisher) en una concentración final de 1 mM incubándolo durante 30, 60 o 120 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. El segundo agente entrecruzante utilizado fue el dimetilpimelimidato, (DMP, Thermo Fisher) en tres concentraciones finales distintas (1, 2 y 5 mM) y se incubó durante espacios de 30, 60 o 120 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Los reactivos BSOCOES y DMP fueron amablemente cedidos por la Dra. Andrea Villarino, de la Sección Bioquímica de Facultad de Ciencias, UdelaR. El tercer agente entrecruzante utilizado fue el paraformaldehído

(PFA) en concentraciones finales de 0,4 %, 0,8 %, 1,0 %, 1,2 %, 1,6 % y 2,0 % e incubándolo durante 5 o 10 minutos.

Una vez finalizado el tiempo de incubación, se retiró la solución con el agente entrecruzante para adicionar 300 μL de PBS y 15 μL de Tris-HCl 1M pH 7,5 y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación suave para finalizar la reacción de entrecruzamiento. Finalmente se realizó la lisis celular como se menciona en la Sección 5.3.2.4.

5.4.2 Detección de proteínas entrecruzadas

Para la detección de las proteínas entrecruzadas se añadió a las muestras *buffer* Laemmli SDS a una concentración final 1 X, se calentaron a 65 °C durante 5 minutos y se sometieron a SDS-PAGE al 8 % (Anexo 10.5). Se optó por no hervir las muestras previo a la electroforesis debido a que se ha reportado que el entrecruzamiento realizado con PFA puede romperse cuando las muestras se calientan a 99 °C (Klockenbusch & Kast, 2010). Una vez finalizada la electroforesis se realizaron ensayos de *Western Blot* utilizando los anticuerpos primarios anti-c-Myc, anti-HA (como se explica en la Sección 5.2.5) y el anticuerpo primario anti- β -Tubulina en una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ diluido en *buffer* de bloqueo (Anexo 10.7). Los anticuerpos secundarios y los reactivos utilizados para la visualización fueron los mismos que se mencionaron en la Sección 5.3.4.

En la Figura 5.7 se observa esquematizado el protocolo de entrecruzamiento químico de extractos proteicos de cultivos celulares transfectados.

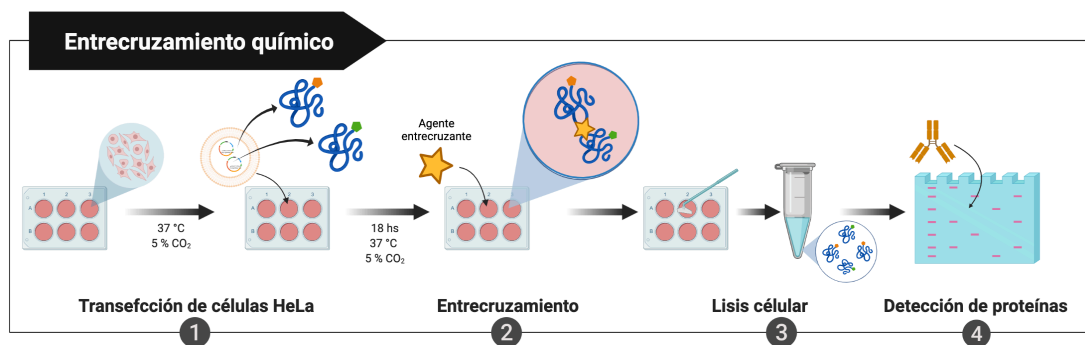


Figura 5.7. Esquema del ensayo de entrecruzamiento químico de extractos proteicos generados de cultivos celulares transfectados.

Imagen generada en Biorender.com

5.4.3 Co-inmunoprecipitación de proteínas entrecruzadas

A partir de los extractos proteicos entrecruzados generados como se mencionó en la Sección anterior se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación.

Los ensayos de inmunoprecipitación se realizaron como se describió en la Sección 5.3.3 y la detección como se describe en la Sección 5.3.4.

En la Figura 5.8 se observa esquematizado el protocolo de entrecruzamiento químico de extractos proteicos de cultivos celulares transfectados y su posterior inmunoprecipitación.

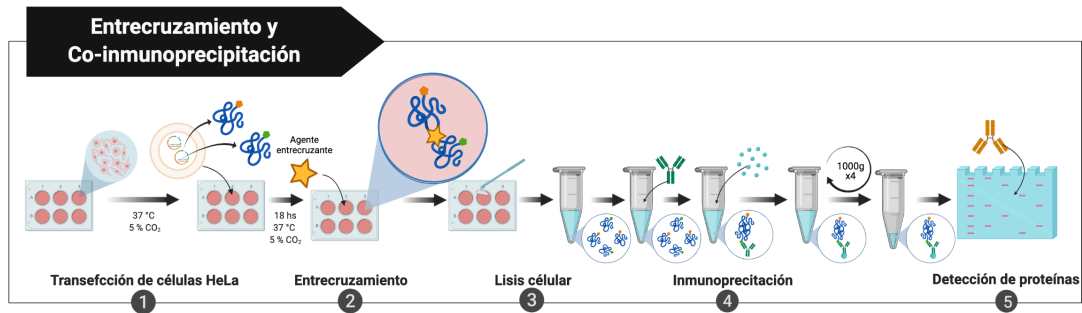


Figura 5.8. Esquema del ensayo de entrecruzamiento químico de extractos proteicos generados de cultivos celulares transfectados y posterior inmunoprecipitación.

Imagen generada en Biorender.com

5.5 Ensayos de co-inmunoprecipitación con proteínas traducidas *in vitro*

5.5.1 Transcripción *in vitro*

Para obtener los transcritos de c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y HA-Eg2DBD α .1-LBD se utilizó como ADN molde los plásmidos pcDNA-c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y pcDNA-HA-Eg2DBD α .1-LBD.

Para linealizar los plásmidos pcDNA-c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD, pcDNA-HA-Eg2DBD α .1-LBD y pcDNA sin inserto, se utilizó una enzima de restricción que deja extremos romos en los sitios de corte, para evitar la religación del plásmido. Se utilizó 1 μ g de plásmido, 20 U de la enzima SmaI (Thermo Fisher) y 2 μ L de *buffer* tango 10 X en un volumen final de reacción de 20 μ L. Se incubó la mezcla durante 2 horas a 30 °C y se inactivó la enzima calentando a 65 °C durante 20 minutos. Dicha reacción se realizó por quintuplicado para cada uno de los plásmidos. Una vez digeridos los plásmidos, se purificó el plásmido lineal mediante electroforesis en gel de agarosa 1 % en *buffer* TAE 1 X utilizando el kit comercial "Zymoclean Gel DNA Recovery Kit" (ZymoResearch).

Para realizar la transcripción *in vitro* de los plásmidos linealizados se utilizó la enzima T7 ARN polimerasa (Thermo Fisher). Para ello, se utilizó 1 μ g de cada plásmido lineal, 10 μ L de *buffer* de transcripción 5 X, 2 mM de cada ribonucleótido (ATP, GTP, CTP y UTP; Thermo Scientific), 50 U de inhibidor de ARNasas (RiboLock RNase Inhibitor, Thermo Scientific) y 30 U de T7 ARN polimerasa en un volumen final de 50 μ L. Se incubó durante 2 horas a 37 °C y se conservó a -80 °C hasta su utilización.

5.5.2 Traducción *in vitro*

Se realizó la traducción *in vitro* de c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y HA-Eg2DBD α .1-LBD utilizando el kit comercial The ReticLysate IVT™ (Invitrogen). Para llevar a cabo dicha reacción, se utilizó 4 μ L del ARN generado por transcripción *in vitro* como se mencionó anteriormente, 1,25 μ L de *buffer* de traducción 20 X, 1,25 μ L de metionina 1 mM y 17 μ L del lisado de reticulocitos en un volumen final de 25 μ L por reacción. Además, se realizó un control negativo en ausencia de ARN. Dichas mezclas se incubaron durante 90 minutos a 30 °C y se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

5.5.3 Inmunoprecipitación

Para realizar los ensayos de co-inmunoprecipitación se mezcló tres reacciones de traducción *in vitro* de c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD junto con tres reacciones de HA-Eg2DBD α .1-LBD. Se realizaron además dos controles. Por un lado una inmunoprecipitación utilizando tres reacciones de traducción *in vitro* de c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD junto con tres reacciones de traducción *in vitro* sin ARN. Y por otro lado, una inmunoprecipitación utilizando 6 reacciones de traducción *in vitro* sin ARN. A todas estas mezclas se les agregó 300 μ L de PBS y se realizó la inmunoprecipitación al igual que en la Sección 5.3.3.

5.5.4 Detección de proteínas co-inmunoprecipitadas

Las muestras se analizaron por SDS-PAGE al 8 % y *Western Blot* tal como se describió en la Sección 5.3.4.

En paralelo se realizó una SDS-PAGE al 8 % únicamente con la inmunoprecipitación de c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD junto con HA-Eg2DBD α .1-LBD para ser teñido mediante tinción con Azul de Coomassie coloidal. El gel se fijó durante 30 minutos en una solución 10 % ácido acético y 40 % etanol. Luego se retiró dicha solución y se incubó el gel en Azul de Coomassie coloidal durante 48 horas a temperatura ambiente. Finalmente se realizó sucesivos lavados con agua y se cortó la banda correspondiente al tamaño de las proteínas HA-Eg2DBD α .1-LBD y c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD para su posterior análisis por cromatografía líquida a nanoescala acoplada a espectrometría de masa (nano-LC-MS/MS, servicio UByPA del Instituto Pasteur de Montevideo).

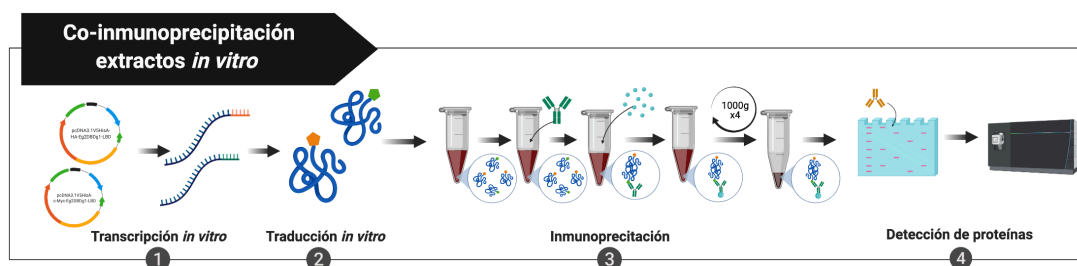


Figura 5.9. Esquema del ensayo de entrecruzamiento químico de extractos proteicos generados de cultivos celulares transfectados y posterior inmunoprecipitación.

Imagen generada en Biorender.com

5.6 Ensayos de doble híbrido de levadura modificado (DHL_m)

El ensayo de DHL_m es una estrategia que involucra un sistema *in vivo* de DHL que se utiliza para evaluar la unión de posibles ligandos.

5.6.1 Co-transformación de levaduras e incubación con el ligando

En este ensayo se utilizó la cepa de *S. cerevisiae* Y187 (Anexo 10.4), la cual posee auxotrofia por leucina y por triptófano y utiliza como gen reportero *LacZ* bajo el control de GAL1 UAS.

Para la transformación de Y187 se utilizó el protocolo descrito en la Sección 5.2.3 utilizado para transformar AH109. Se realizaron tres co-transformaciones: 1) pGADT7-Eg2DBD α .1-LBD/pGBKT7-Eg2DBD α .1-LBD, 2) pGADT7-T/pGBKT7-53 (control positivo) y 3) pGADT7-T/pGBKT7-Lam (control negativo).

Se seleccionó tres colonias de cada una de las co-transformaciones y se inocularon en un precultivo de 3 mL en SD/-Leu/-Trp para ser incubadas durante toda la noche a 30 °C con agitación a 250 rpm. Al día siguiente, se vortexeó 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 le agregó 5 % de SFB (187,5 μ L, Gibco) o 187,5 μ L adicionales de SD/-Leu/-Trp (control sin ligando). Se incubó nuevamente a 30 °C con agitación a 250 rpm hasta que el cultivo alcanzara un DO₆₀₀ entre 0,5 y 1,0. Se registró el valor de la DO₆₀₀.

5.6.2 Determinación de la actividad β -galactosidasa

Se extrajo tres alícuotas de 500 μ L de cada cultivo en tubos de 1,5 mL, se centrifugaron a 14.000 xg por 30 segundos y se descartó el sobrenadante. Se agregó 500 μ L de Z-buffer (16,1 g/L Na₂HPO₄-7H₂O; 5,50 g/L NaH₂PO₄-H₂O; 0,75 g/L KCl; 0,246 g/L MgSO₄-7H₂O; pH 7,0) y se volvió a centrifugar a 14.000 rpm por 30 segundos. Se descartó el sobrenadante y se agregó 100 μ L de Z-buffer, concentrando la muestra 5 veces. Se transfirió 50 μ L a un nuevo tubo y se lisó las células

mediante *shock* térmico a través de tres ciclos de congelado en nitrógeno líquido y descongelado colocando la muestra en baño termostatzado a 37 °C. 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 o-nitrophenyl β-D-galactopyranoside (ONPG, Sigma-Aldrich) 4 mg/mL en Z-Buffer y se contabilizó el tiempo hasta el desarrollo de color amarillo. Las levaduras que expresan proteínas de fusión que interaccionan activan la expresión del gen reportero de la β-galactosidasa, la cual al lisar las células será liberada e hidrolizará el compuesto ONPG generando un color amarillo. Una vez que se desarrolló el color amarillo, se paró la reacción agregando 200 µL de carbonato de sodio 1 M e inmediatamente se midió la absorbancia a 420 nm (Abs_{420}) con el espectrofotómetro Shimadzu UV-160a.

5.6.3 Cálculo de la actividad de la β-galactosidasa

Para el cálculo de la actividad de la β-galactosidasa se utilizó la ecuación 5.2 (Miller, 1972).

$$Unidades_{\beta-galactosidasa} = \frac{1000 \times Abs_{420}}{t \times V \times DO_{600}}$$

Ecuación 5.2

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 óptica medida a 600 nm. Cada ensayo se realizó por duplicado biológico, realizando cada una de las réplicas en días distintos y por triplicados técnicos. Para evaluar el nivel de significancia, se utilizó el Test de *Student* con datos desapareados de dos colas y se estableció la significancia para los datos con un p valor < 0.01.

6. RESULTADOS

6.1 Aislamiento de receptores nucleares

Previamente, nuestro grupo de investigación clonó y expresó de forma insoluble la región correspondiente a 573 aminoácidos desde el extremo C-terminal del receptor Eg2DBD α .1 (Riera, 2018). Este fragmento, originalmente fue denominado Eg2DBDg1cl, pero en esta tesis se denominará Eg2DBD α .1ct. En esta instancia nos planteamos clonar la región del extremo N-terminal conteniendo los dos DBDs y que nos permita a futuro poder llevar a cabo estudios estructurales y funcionales sobre estos dominios tan particulares. Además, nos propusimos clonar la región codificante para el LBD del receptor nuclear tipo RXR β de *E. granulosus* para investigar si este dimeriza con Eg2DBD α .1.

Para iniciar el clonado de los receptores nucleares, se comenzó extrayendo el ARN total a partir de protoescólicas (PE) de *E. granulosus s.l.*, y se cuantificó mediante la medida de Abs_{260nm}. Obtuvimos 50 μ L de ARN con una concentración de 103,6 ng/ μ L y un óptimo nivel de pureza (Abs₂₆₀/Abs₂₈₀=1,93). Posteriormente se realizó la síntesis *in vitro* de ADN copia (ADNc) a partir de 1129,6 ng de ARN total previamente purificado. Como control de la ausencia de ADN genómico en el ADNc sintetizado, se realizó una PCR utilizando cebadores que amplifican *EgFABP1* ya que este gen presenta un solo intrón de 72 pb. Como se puede visualizar en la Figura 6.1 indicado con una flecha negra, la amplificación de *EgFABP1* dio una única banda del tamaño esperado para este transcripto maduro (402 pb aproximadamente). La ausencia de una banda de un producto de amplificación de 472 pb, sugiere que la muestra de ADNc no presenta contaminación con ADN genómico.

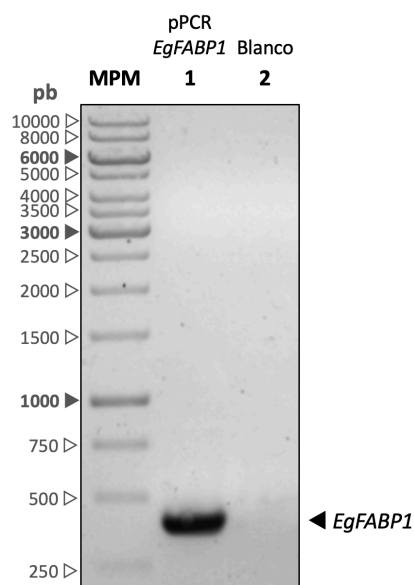


Figura 6.1. Verificación de la ausencia de ADN genómico en el ADNc sintetizado.

Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de amplificación de *EgFABP1* a partir de ADNc. **MPM:** marcador de peso molecular (pb). **1:** producto de PCR (pPCR) de *EgFABP1* indicado con una flecha negra a la derecha del gel. **2:** blanco de la PCR.

Una vez obtenido el ADNc y evaluado la ausencia de ADN genómico procedimos a realizar el clonado de los receptores nucleares de interés.

6.1.1 Clonado de *Eg2DBDα.1*

Se diseñó cebadores específicos para amplificar una región N-terminal del receptor *Eg2DBDα.1* a partir ADNc, la cual incluía los dos DBDs y la región de 66 nucleótidos ausentes en *Eg2DBDα.1* que la diferencia de *Eg2DBDα*. En este sentido, se utilizó un cebador directo que hibrida con el ATG de inicio del transcripto maduro (*Eg2DBDα.1-D*) y un cebador interno reverso (*Eg2DBDα.1-MSL-R*), logrando amplificar una región del receptor *Eg2DBDα.1* de un tamaño de 1637 pb, el cual nombramos *Eg2DBDα.1nt*. Dicho producto de PCR fue clonado en pGM-T seleccionándose dos clones recombinantes mediante PCR de colonia (Figura 6.2). Se seleccionó una colonia para purificar el plásmido recombinante, obteniéndose el plásmido en una concentración de 1020,5 ng/μL con un índice $Ab_{S_{260}}/Ab_{S_{280}}$ de 1,89. Finalmente, se confirmó la identidad del inserto mediante secuenciación, confirmando ser un fragmento del ADNc de *Eg2DBDα.1* de 1637 pb que cubre el 66% de este receptor desde su extremo 5' (ID: MH092994.2, GeneBank) y que posee la delección de 66 nucleótidos característica de este receptor (Alvite et al., 2019).

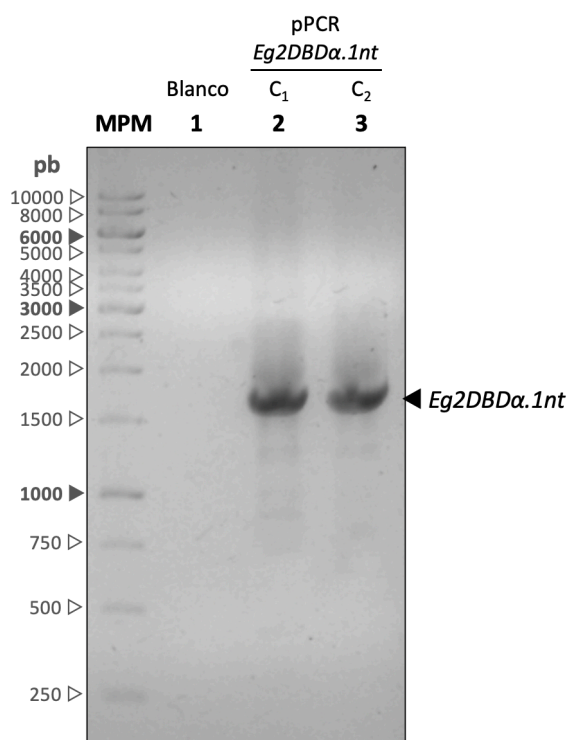


Figura 6.2. Rastreo de clones recombinantes (*Eg2DBDα.1nt*) mediante PCR de colonia.

Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de amplificación de *Eg2DBDα.1nt* a partir de colonias de *E. coli* transformadas con pGM-T-*Eg2DBDα.1nt*. **MPM**: marcador de peso molecular (pb). **1**: blanco de la PCR. **2 y 3**: producto de PCR (pPCR) de *Eg2DBDα.1nt* (indicado con una flecha negra a la derecha del gel) de las colonias 1 y 2.

Una vez confirmada la secuencia de *Eg2DBDα.1nt*, realizamos un alineamiento con el fragmento *Eg2DBDα.1ct*. El alineamiento reveló que ambos fragmentos se solapan por 915 pb. Analizando esta región solapante y su alineamiento con la secuencia *Eg2DBDα* (WormBase Parasite ID: EgG_000379600), encontramos cuatro diferencias nucleotídicas entre las dos secuencias *Eg2DBDα.1* (*Eg2DBDα.1nt* y *Eg2DBDα.1ct*) (Figura 6.3, flechas rojas). Tres de ellas son nucleótidos idénticos en *Eg2DBDα.1nt* y *Eg2DBDα*, que difieren en *Eg2DBDα.1ct*: los cambios A937G, G1044A y C1390T en *Eg2DBDα.1ct*. La cuarta diferencia entre *Eg2DBDα.1nt* y *Eg2DBDα.1ct* corresponde a un nucleótido idéntico entre *Eg2DBDα.1ct* y *Eg2DBDα* pero que es diferente en *Eg2DBDα.1nt*, el cambio G1155A.

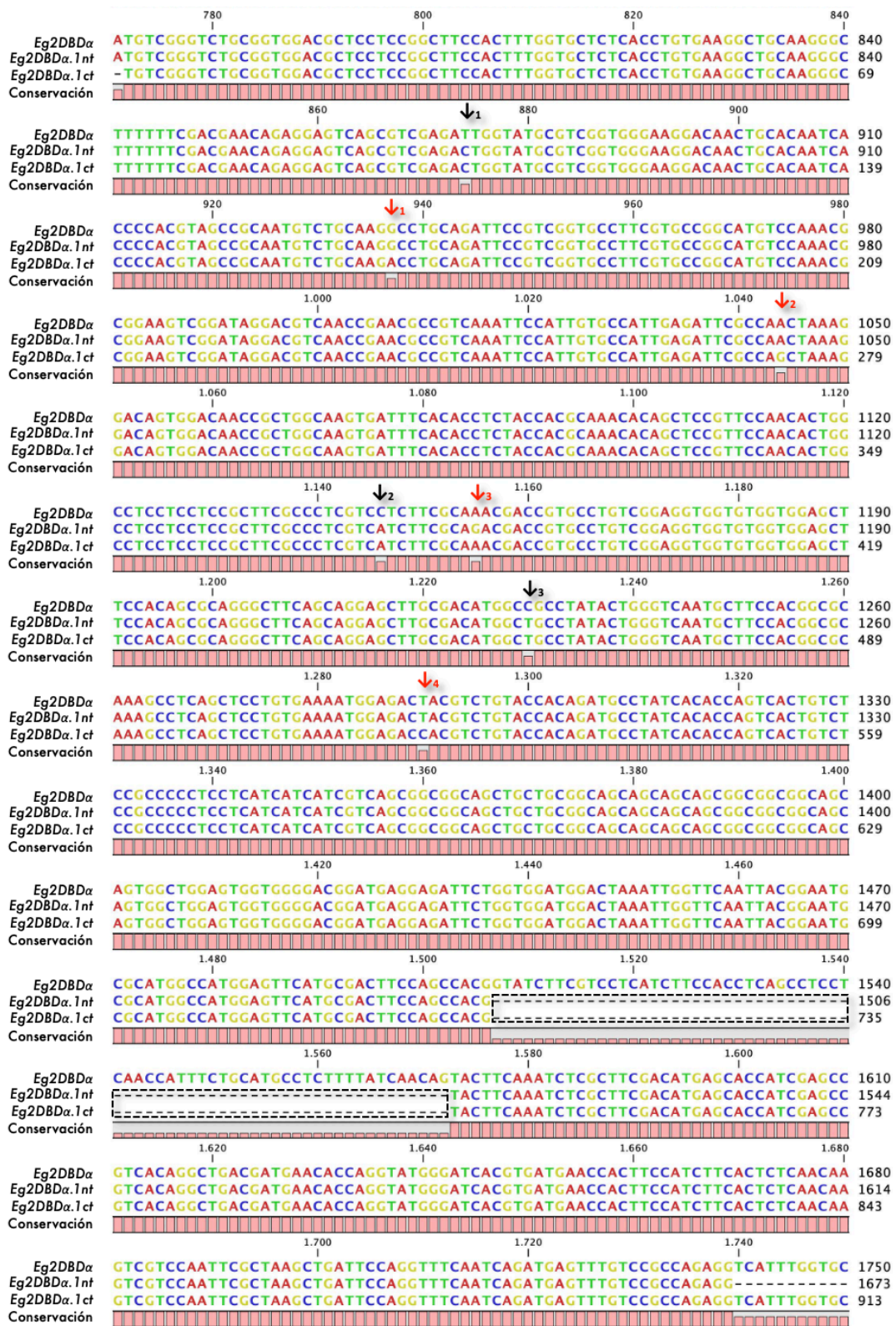


Figura 6.3. Región solapante de las secuencias nucleotídicas *Eg2DBDα.1nt*, *Eg2DBDα.1ct* y *Eg2DBDα* alineadas.

↓ indica nucleótidos iguales entre las dos secuencias *Eg2DBDα.1* pero diferentes a *Eg2DBDα*. ↓ indica discrepancias entre las dos secuencias *Eg2DBDα.1*. Alineamiento completo en Anexo 10.9.

Sin embargo, también observamos diferencias nucleotídicas entre ambas secuencias de *Eg2DBDα.1* y la *Eg2DBDα*. Se observaron cuatro cambios nucleotídicos puntuales entre *Eg2DBDα.1* y *Eg2DBDα*, siendo estos los cambios A106G, C874T, A1645C y T1230C (flechas negras, Figura 6.3 y 6.4) y además la delección de 66 nucleótidos, característica del receptor *Eg2DBDα.1* (Alvite et al., 2019)

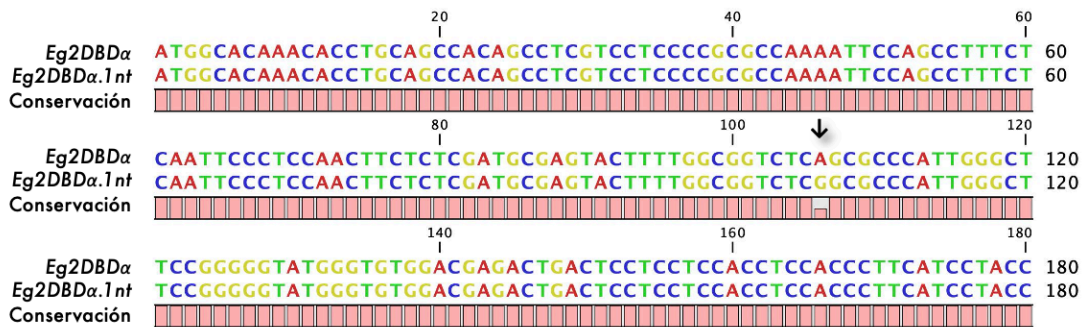


Figura 6.4. Región 5' de las secuencias *Eg2DBDα.1nt* y *Eg2DBDα* alineadas.

↓ indica cambio de nucleótidos entre *Eg2DBDα.1nt* y *Eg2DBDα*. Alineamiento completo en Anexo 10.9.

No todos los cambios nucleotídicos mencionados anteriormente generan un cambio a nivel de la proteína. La ausencia de 66 nt en *Eg2DBDα.1* con respecto a *Eg2DBDα*, genera la ausencia de 22 aminoácidos en *Eg2DBDα.1*, que están presentes en *Eg2DBDα*. Además de esta región ausente, identificamos únicamente dos cambios aminoacídicos puntuales entre las secuencias proteicas de *Eg2DBDα*, *Eg2DBDα.1nt* y *Eg2DBDα.1ct* (Figura 6.5). Uno de los cambios aminoacídicos es entre *Eg2DBDα.1nt* y *Eg2DBDα.1ct*, este cambio corresponde al cambio T313A reportado previamente como una diferencia entre las isoformas *Eg2DBDα.1* y *Eg2DBDα*, sin embargo no se encontró en *Eg2DBDα.1nt* (Figura 6.5, flecha roja), este cambio corresponde al cambio nucleotídico A937G mencionado anteriormente. Y por último, identificamos un cambio aminoacídico entre *Eg2DBDα.1nt* y *Eg2DBDα* que involucra el cambio G36S en *Eg2DBDα.1nt* (Figura 6.5, flecha negra).

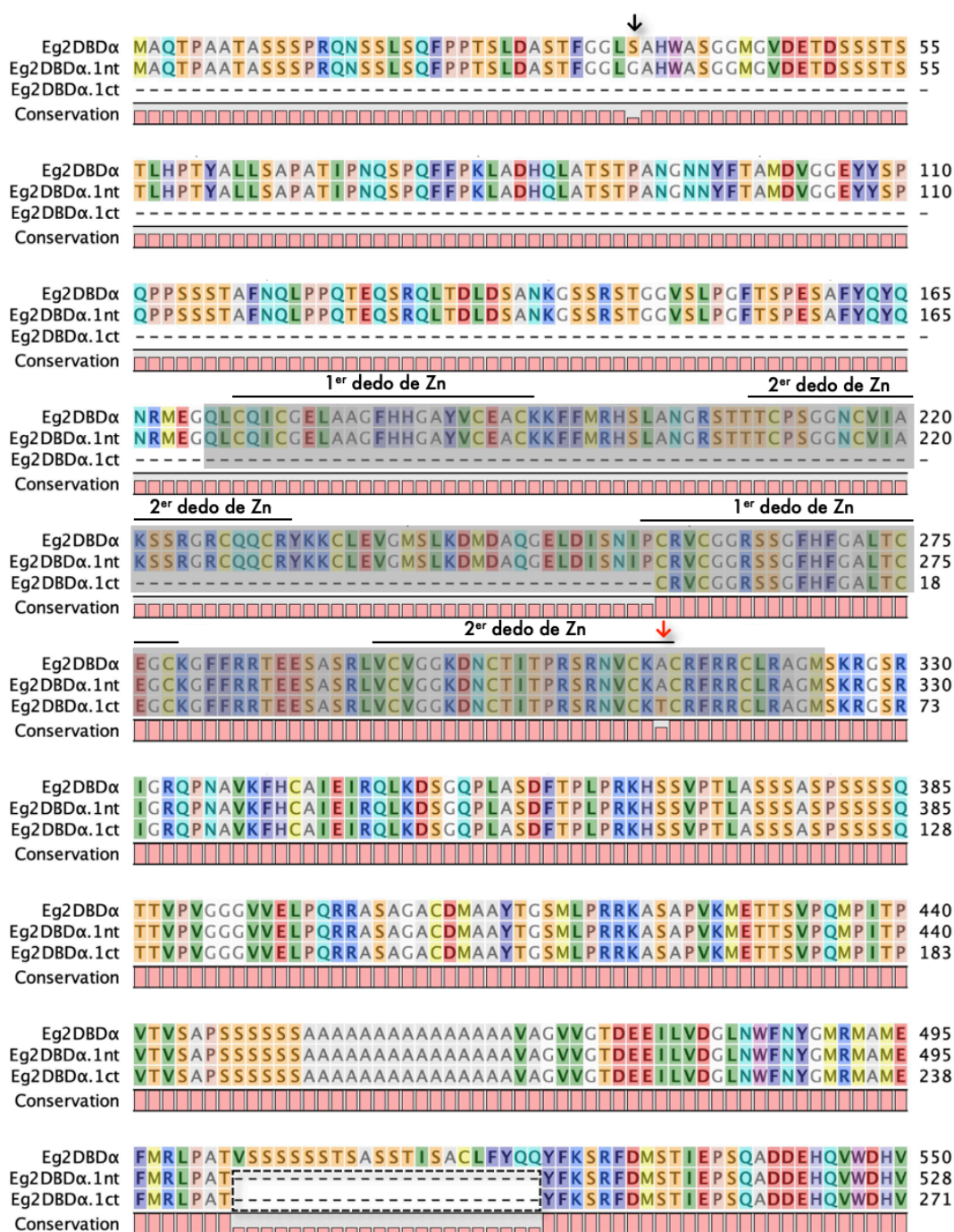


Figura 6.5. Región solapante de las secuencias proteicas de Eg2DBDα.1nt, Eg2DBDα.1ct y Eg2DBDα.

↓ indica aminoácidos diferentes entre Eg2DBDα.1nt y Eg2DBDα. ↓ indica discrepancias entre las dos secuencias Eg2DBDα.1. En sombreado se indican los DBDs y el subrayado los motivos consenso de dedos de zinc (Alvite et al., 2019). Alineamiento completo en Anexo 10.9.

Estos alineamientos nos permitieron determinar que logramos clonar una región N-terminal de receptor Eg2DBDα.1 que posee los dos dominios de unión al ADN característico de los

receptores nucleares de la subfamilia 2DBD-NRs y la ausencia de 22 aminoácidos característica de *Eg2DBD α .1* (Alvite et al., 2019).

Adicionalmente, nos preguntamos si el receptor nuclear *Eg2DBD α .1* se expresa completo a nivel de transcripto en el estadio larvario de *E. granulosus s.l.*. Para estudiar esto, amplificamos el ADNc de PE utilizando cebadores que abarcan desde el ATG de inicio hasta el codón de terminación. Se obtuvieron tres productos de amplificación de aproximadamente 2500, 1100 y 700 pb (Figura 6.6). Dado que el transcripto maduro completo de *Eg2DBD α .1* tiene un largo esperado de 2493 pb (ID: MH092994.2, GeneBank), se purificó y analizó la banda de 2500 pb aproximadamente, indicada con una flecha en la Figura 6.6. Mediante secuenciación confirmamos que este producto de PCR (pPCR) corresponde a las secuencias codificantes completas de *Eg2DBD α .1* y *Eg2DBD α* . Verificamos así que la secuencia de *Eg2DBD α .1* contiene la delección de 66 nucleótidos característica de este receptor (Alvite et al., 2019).

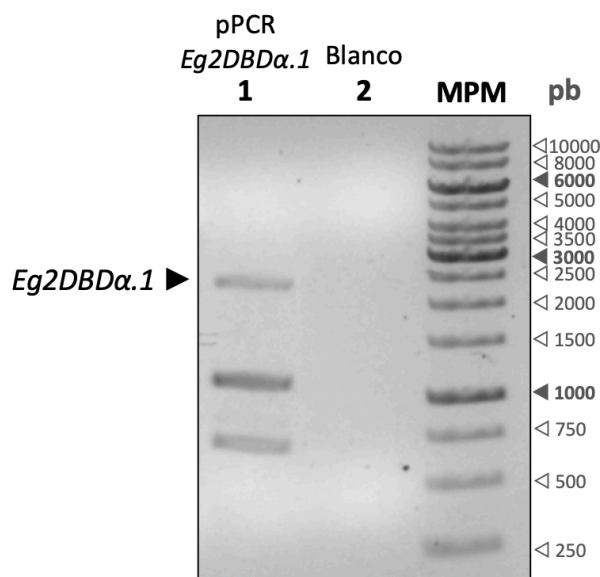


Figura 6.6. Amplificación del transcripto completo de *Eg2DDB α .1*.

Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de amplificación de *Eg2DDB α .1* a partir de ADNc. **1:** producto de PCR (pPCR) de *Eg2DDB α .1*. **2:** blanco de la PCR. **MPM:** marcador de peso molecular (pb). **►** indica el amplicón del tamaño esperado para *Eg2DDB α .1*.

Estos resultados nos permitieron confirmar que el transcripto completo de *Eg2DBD α .1* y *Eg2DBD α* se expresan en el estadio larvario de PE de *E. granulosus s.l.*.

6.1.2 Clonado de *EgRXR β -LBD*

Varios estudios han mostrado que los receptores nucleares pueden tener como pareja en común al receptor X retinoide (RXR) para la formación de heterodímeros (Yu et al., 1991; Bugge et al.,

1992; Kliewer et al., 1992; Leid et al., 1992; Marks et al., 1992; Zhang et al., 1992; Mangelsdorf et al., 1995). Nos planteamos clonar el receptor RXR *E. granulosus s.l.* para evaluar la posible heterodimerización con Eg2DBD α .1. Debido a que los receptores nucleares presentan una fuerte interfaz de dimerización en la región LBD (Bourguet, Vivat, et al., 2000; Gampe et al., 2000), es el dominio utilizado habitualmente para determinar el modo de dimerización de los receptores nucleares, por lo que decidimos realizar nuestros estudios de dimerización únicamente con este dominio.

La búsqueda en la base de datos WormBase Parasite nos permitió identificar un único receptor nuclear de este tipo, el receptor *EgRXR β* (ID: EgrG_000434500). A partir de esa secuencia se diseñó cebadores específicos y se realizó la amplificación de la región LBD del receptor *EgRXR β* a partir del ADNc sintetizado, la cual abarca del aminoácido 321 al 670 (ID: A0A068WN10, Uniprot). Como se puede observar en la Figura 6.7, indicado con una flecha negra a la derecha del gel, se amplificó mediante RT-PCR un único producto del tamaño esperado de 1053 pb.

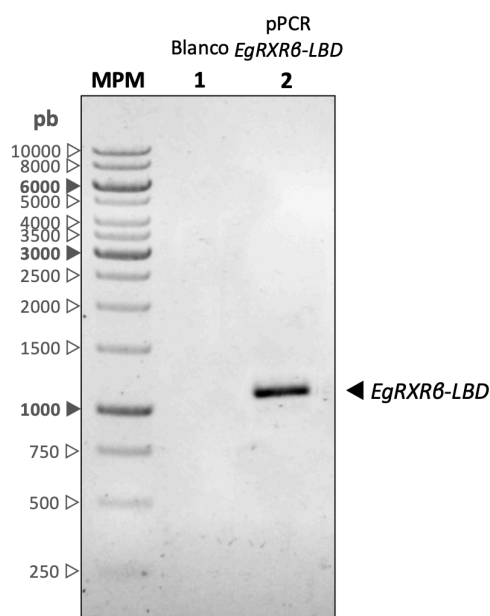


Figura 6.7. Amplificación de *EgRXR β -LBD* a partir de ADNc.

Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de amplificación de *EgRXR β -LBD*. **MPM:** marcador de peso molecular (pb). **1:** blanco de la PCR. **2:** producto de PCR (pPCR) de *EgRXR β -LBD*, indicado con una flecha negra a la derecha del gel.

Dicho producto de PCR fue re-amplificado y secuenciado, confirmándose que el producto amplificado correspondía a *EgRXR β -LBD* (ID: EgrG_000434500, WormBase Parasite). Posteriormente, se ligó en el vector pGM-T, se clonó en *E. coli* y se rastrearón 5 colonias transformantes mediante PCR de colonia con cebadores específicos. Todos los clones analizados

resultaron contener el plásmido recombinante dado que se obtuvo un pPCR del tamaño esperado (Figura 6.8).

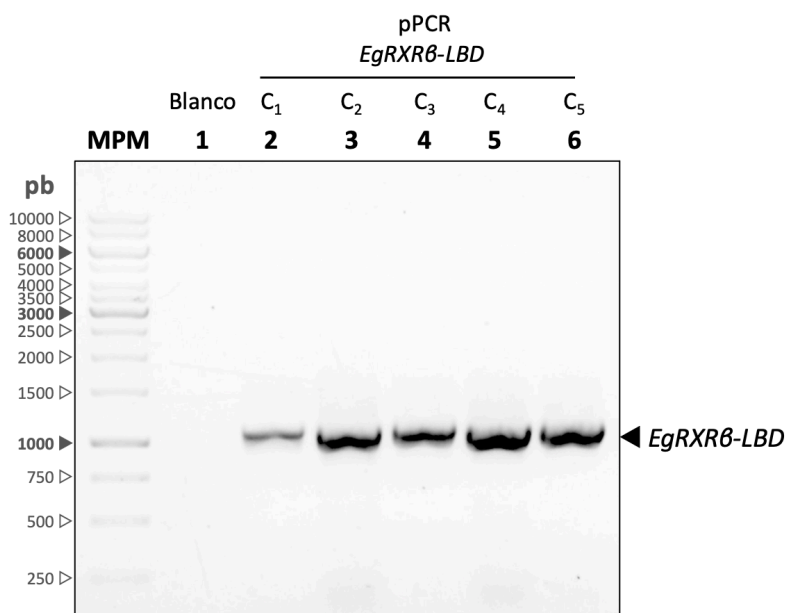


Figura 6.8. Rastreo de clones recombinantes (*EgRXRβ-LBD*) mediante PCR de colonia. Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de amplificación de *EgRXRβ-LBD* a partir de colonias de *E. coli* transformadas con pGM-T-*EgRXRβ-LBD*. **MPM:** marcador de peso molecular (pb). **1:** blanco de la PCR. **2-6:** producto de PCR de *EgRXRβ-LBD* (indicado con flecha negra a la derecha del gel) de las colonias 1 al 5.

Se seleccionó la colonia número 4 y se purificó el plásmido con inserto, obteniéndose un buen nivel de concentración y pureza (concentración 1539,5 ng/μL e índice Abs_{260}/Abs_{280} de 1,96). Finalmente, se confirmó la identidad del inserto mediante secuenciación del plásmido pGM-T-*EgRXRβ-LBD* obtenido.

6.2 Estructura cuaternaria de *Eg2DBDα.1*

Con el propósito de comenzar a comprender el mecanismo de acción de *Eg2DBDα.1*, lo primero que nos propusimos fue estudiar la estructura cuaternaria del receptor. En este sentido analizamos la capacidad de *Eg2DBDα.1-LBD* de interactuar consigo mismo o con el LBD del receptor *EgRXRβ*.

6.2.1 Análisis de la dimerización: DHL

La primera aproximación que realizamos para estudiar la interacción de *Eg2DBDα.1-LBD* consigo mismo o con *EgRXRβ-LBD*, fue el sistema de doble híbrido de levadura (DHL). Como se menciona previamente, el sistema de DHL tiene la ventaja de que a pesar de ser un sistema heterólogo, es

un sistema eucariota representativo del organismo en estudio donde posiblemente las proteínas expresadas se encuentren en sus conformaciones nativas.

6.2.1.1 Generación de construcciones del DHL

A partir de los plásmidos recombinantes pGM-T-EgRXR β -LBD y pGM-T-Eg2DBD α .1ct se amplificó los insertos EgRXR β -LBD y Eg2DBD α .1-LBD, respectivamente. Estos productos de PCR fueron digeridos con las enzimas de restricción necesarias para el clonado direccional en pGADT7 y pGBKT7 (ver sección 5.2.2.2, Materiales y Métodos).

Los plásmidos pGADT7-Eg2DBD α .1-LBD, pGADT7-EgRXR β -LBD, pGBKT7-Eg2DBD α .1-LBD y pGBKT7-EgRXR β -LBD, así como aquellos necesarios para los controles (pGADT7-T, pGBKT7-53, pGBKT7-Lam, pGADT7 y pGBKT7) fueron purificados, cuantificados y se evaluó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa (Tabla 6.1 y Figura 6.9). Estos resultados nos permitieron verificar que los plásmidos utilizados en el ensayo de DHL se encontraban íntegros, con alta concentración e índice de pureza.

Tabla 6.1. Cuantificación de preparaciones plasmídicas utilizadas en los ensayos de DHL.

Plásmido	Concentración (ng/ μ L)	Abs ₂₆₀ /Abs ₂₈₀
pGADT7	1654,4	1,92
pGBKT7	2778,1	1,86
pGADT7-T	903,3	1,79
pGBKT7-53	926,3	1,91
pGBKT7-Lam	2757,9	1,83
pGADT7-Eg2DBD α .1-LBD	1746,1	1,94
pGBKT7-Eg2DBD α .1-LBD	2645,8	1,92
pGADT7-EgRXR β -LBD	2668,8	1.85
pGBKT7-EgRXR β -LBD	2659,0	1,91

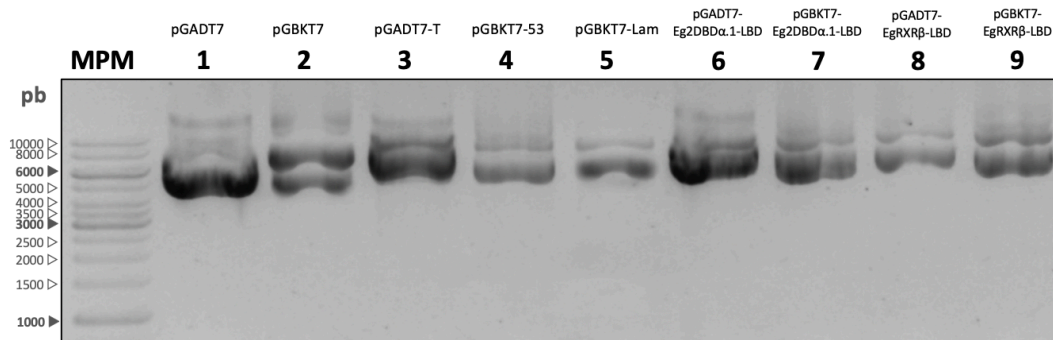


Figura 6.9. Evaluación de la integridad de los plásmidos utilizados en los ensayos de DHL.

Electroforesis en agarosa 0,8 % de 1 μ g de los plásmidos indicados a continuación. **MPM:** marcador de peso molecular. **1:** pGADT7. **2:** pGBKT7. **3:** pGADT7-T. **4:** pGBKT7-53. **5:** pGBKT7-Lam. **6:** pGADT7-Eg2DBD α .1-LBD. **7:** pGBKT7-Eg2DBD α .1-LBD. **8:** pGADT7-EgRXR β -LBD. **9:** pGBKT7-EgRXR β -LBD.

Adicionalmente, la secuenciación de los plásmidos pGADT7-Eg2DBD α .1-LBD, pGBKT7-Eg2DBD α .1-LBD, pGADT7-EgRXR β -LBD y pGBKT7-EgRXR β -LBD nos permitió confirmar la ausencia de mutaciones en los insertos, y que las mismas coinciden con las secuencias de la base de datos (ID *Eg2DBD α .1*: MH092994.2, ID *EgRXR β* : EgrG_000434500).

Por último, nos pareció relevante verificar si las construcciones plasmídicas generadas expresaban las proteínas recombinantes en levaduras. Para ello, realizamos ensayos de *Western Blot* a partir de extractos de levaduras co-transformadas con pGADT7-Eg2DBD α .1-LBD/pGBKT7-Eg2DBD α .1-LBD, pGADT7-Eg2DBD α .1-LBD/pGBKT7-EgRXR β -LBD y con pGADT7-EgRXR β -LBD/pGBKT7-Eg2DBD α .1-LBD y de levaduras AH109 sin transformar. Como se puede observar en la Figura 6.10, se evidenció la presencia de una proteína de un tamaño similar al esperado para DNA-BD-c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD (64,9 kDa) y para DNA-BD-c-Myc-EgRXR β -LBD (59,2 kDa) (Figura 6.10 A, flecha verde y violeta, respectivamente), así como para DNA-AD-HA-Eg2DBD α .1-LBD (62,5 kDa) y para DNA-AD-HA-EgRXR β -LBD (56,9 kDa) (Figura 6.10 B, flecha naranja y amarilla, respectivamente).

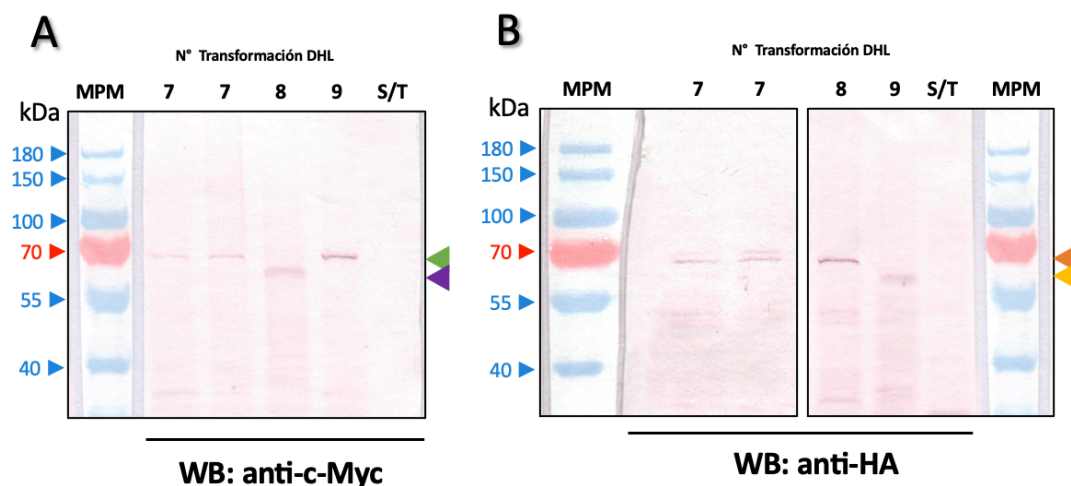


Figura 6.10. Análisis de la expresión las proteínas recombinantes en levadura.

Western Blot de extractos proteicos de levaduras co-transformadas con 1 μ g de cada plásmido, según corresponda. **(A)** anticuerpo primario anti-c-Myc. **(B)** anticuerpo primario anti-HA. Se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados a fosfatasa alcalina y el sustrato BCIP/NBT para el revelado. Los números representan las co-tranformaciones según Tabla 5.7. **MPM:** marcador de peso molecular (kDa). **7:** pGADT7-Eg2DBD α .1-LBD/pGBKT7-Eg2DBD α .1-LBD. **8:** pGADT7-Eg2DBD α .1-LBD/pGBKT7-EgRXR β -LBD. **9:** pGADT7-EgRXR β -LBD/pGBKT7-Eg2DBD α .1-LBD. **S/T:** AH109 sin transformar. Flecha verde y violeta indican el LBD de Eg2DBD α .1 y EgRXR β fusionado al DNA-BD (BD), respectivamente. Flecha naranja y amarilla indican el LBD de Eg2DBD α .1 y EgRXR β fusionado a DNA-AD (AD), respectivamente.

A partir de estos resultados evidenciamos que las levaduras co-transformada expresan las proteínas heterólogas de interés, permitiéndonos así continuar con los ensayos de DHL.

6.2.1.2 Ensayo de doble híbrido de levadura

Una vez generadas las construcciones plasmídicas y determinada la expresión de las proteínas recombinantes en estudio, realizamos los ensayos de DHL. Cabe recordar que para validar una interacción mediante DHL, es necesario realizar una serie de controles. Estos incluyen un control positivo, donde se utilizan los plásmidos pGBKT7-53 y pGADT7-T que codifican para el DNA-BD fusionado a p53 murina y el DNA-AD fusionado al antígeno T largo de SV40, respectivamente. En este sentido, observamos que las levaduras co-transformadas con pGBKT7-53 y pGADT7-T (Figura 6.11, sector 1) crecieron tanto en el medio de baja rigurosidad, como en los de rigurosidad media y alta, evidenciando la interacción entre la proteína p53 y el antígeno T. Por otro lado, también se realizó un control negativo, para ello se utilizaron los plásmidos pGADT7-T y pGBKT7-Lam, este último codifica una fusión del ADN-BD con la Lamina C humana. Las levaduras co-transformadas con pGADT7-T y pGBKT7-Lam crecieron únicamente en el medio de

rigurosidad baja (Figura 6.11, sector 2), no detectándose la interacción entre Lamina C y antígeno T. Estos resultados se muestran en la Tabla 6.2 y confirman el correcto funcionamiento del ensayo de DHL.

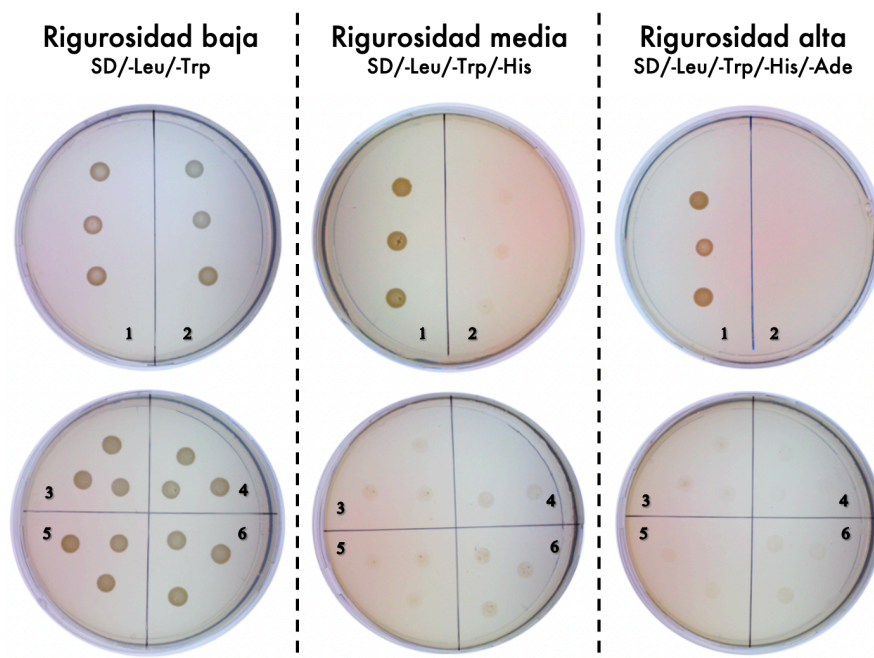


Figura 6.11. Controles del ensayo de doble híbrido de levadura.

(1) control positivo, plásmidos pGADT7-T/pGBKT7-53. **(2)** control negativo, plásmidos pGADT7-T/pGBKT7-Lam. **(3)** pGADT7-Eg2DBD α .1-LBD/pGBKT7. **(4)** pGADT7/pGBKT7-Eg2DBD α .1-LBD. **(5)** pGADT7-EgRXR β -LBD/pGBKT7. **(6)** pGADT7/pGBKT7-EgRXR β -LBD. Las levaduras transformadas se sembraron en medio de rigurosidad baja (SD/-trp/-leu), media (SD/-trp/-leu/-his/) y alta (SD/-trp/-leu/-his/-ade).

Tabla 6.2. Análisis de los controles del ensayo de doble híbrido de levadura.

			Fusión con GAL4-AD	
			Antígeno T	
Fusión con GAL4-BD	p53	+		
	Laminina C	-		

(-) ausencia de crecimiento en placas de rigurosidad media y alta. **(+)** presencia de crecimiento en medio de rigurosidad media y alta.

En segundo lugar, para descartar una posible interacción fortuita en el sistema de doble híbrido de levadura, fue necesario realizar controles que verifiquen que cada construcción por sí sola es

incapaz de activar el gen reportero y que la activación depende únicamente de la interacción entre las proteínas en estudio. Para ello, se realizaron cuatro controles en los cuales las levaduras fueron co-transformadas con el plásmido pGADT7 recombinante (expresa la proteína de interés) junto con pGBKT7 no recombinante y viceversa (co-transformaciones 3 al 6, Tabla 5.6, Materiales y Métodos). Como se observa en la Figura 6.11, ninguno de estos co-transformantes crecieron en las placas de rigurosidad media y alta. Estos controles descartan una posible interacción basal cuando las levaduras expresan solamente una de las proteínas a analizar, validando así los resultados del ensayo de DHL.

Adicionalmente, se testó la necesidad de utilizar 3-AT en las placas de rigurosidad media. 3-AT es un inhibidor competitivo de la proteína His3 (enzima involucrada en la biosíntesis de histidina) que suprime el crecimiento de fondo en medios carentes de histidina, eliminando así falsos positivos (Durfee et al., 1993). Para ello las levaduras co-transformadas con pGADT7/pGBKT7-EgRXR β -LBD y con pGADT7/pGBKT7-Eg2DBD α .1-LBD, fueron plaqueadas en placas de medio SD/-Leu/-Trp/-His con distintas concentraciones de 3-AT. El crecimiento de las levaduras al cabo de 8 días de incubación fue mínimo observándose pocas colonias y de un tamaño menor a 1mm de diámetro en todas las concentraciones de 3-AT testeadas, por lo que se descartó la necesidad de utilizar este inhibidor en las placas de rigurosidad media.

Al realizar los ensayos de DHL para evaluar la dimerización Eg2DBD α .1-LBD observamos que las levaduras co-transformadas con pGADT7-Eg2DBD α .1-LBD/pGBKT7-Eg2DBD α .1-LBD crecen en los tres medios analizados (sector 7, Figura 6.12). Sin embargo, las levaduras co-transformadas con pGADT7-Eg2DBD α .1-LBD/pGBKT7-EgRXR β -LBD o con pGADT7-EgRXR β -LBD/pGBKT7-Eg2DBD α .1-LBD (Figura 6.12, sector 8 y 9, respectivamente) no crecen en los medios de rigurosidad media ni alta.

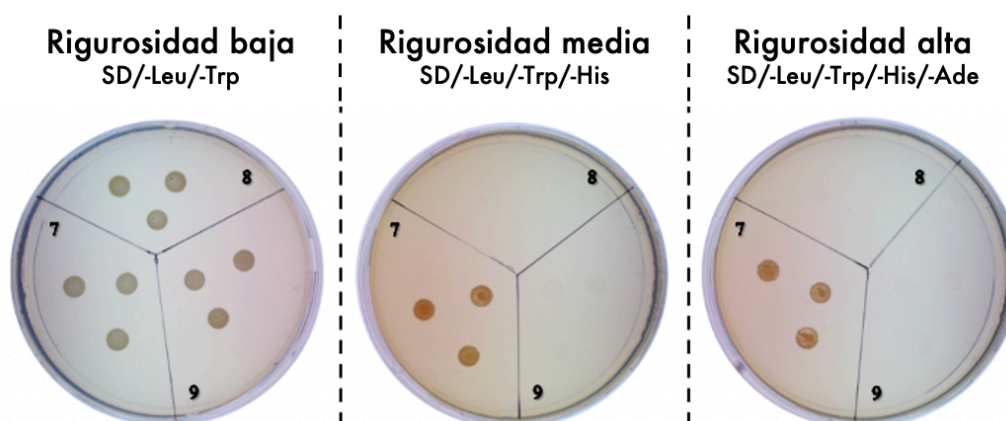


Figura 6.12. Ensayo de doble híbrido de levadura.

Las levaduras transformadas se sembraron en medio de rigurosidad baja (SD/-Trp/-Leu), media (SD/-Trp/-Leu/-His/) y alta (SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade). **(7)** pGADT7-Eg2DBD α .1-LBD/pGBKT7-Eg2DBD α .1-LBD. **(8)** pGADT7-Eg2DBD α .1-LBD/pGBKT7-RXR β -LBD. **(9)** pGADT7-EgRXR β -LBD/pGBKT7-Eg2DBD α .1-LBD.

Estos resultados, junto con el resultado de los controles con los plásmidos sin inserto, pueden verse resumidos en la Tabla 6.3.

Tabla 6.3. Análisis de las interacciones de Eg2DBD α .1-LBD consigo mismo y con EgRXR β -LBD mediante ensayos de DHL.

		Fusión con GAL4-AD		
		Eg2DBD α .1-LBD	EgRXR β -LBD	pGADT7
Fusión con GAL4-BD	Eg2DBD α .1-LBD	+	-	-
	EgRXR β -LBD	-	n.d.	-
	pGBKT7	-	-	n.d.

(-) ausencia de crecimiento en placas de rigurosidad media y alta. (+) presencia de crecimiento en medio de rigurosidad media y alta. (n.d.) no determinado.

Estos resultados muestran que Eg2DBD α .1-LBD interaccionaría consigo mismo sugiriendo la homodimerización del receptor y no interacciona con el LBD del receptor EgRXR β .

6.2.2 Análisis de la dimerización: Co-IP

Para verificar el modo de dimerización de Eg2DBD α .1-LBD, realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación a partir de extractos proteicos de células HeLa que sobreexpresan

Eg2DBD α .1-LBD fusionado por su extremo N-terminal a los péptidos cMyc o HA, generando así las proteínas recombinantes c-Myc-Eg2DBD α -LBD y HA-Eg2DBD α -LBD.

6.2.2.1 Puesta a punto de la transfección de células HeLa

Para realizar la transfección de las células se generaron y purificaron los constructos pcDNA-HA-Eg2DBD α -LBD y pcDNA-c-Myc-Eg2DBD α -LBD, obteniéndose los mismos con alto grado de pureza y una concentración de 1509,2 ng/ μ L ($Abs_{260}/Abs_{280}= 1,91$) y 1730,9 ng/ μ L ($Abs_{260}/Abs_{280}= 1,92$), respectivamente. La Figura 6.13 muestra la electroforesis en gel de agarosa para evaluar la integridad de los mismos, siendo esta óptima.

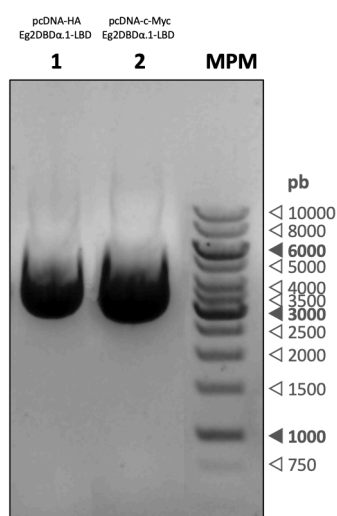


Figura 6.13. Evaluación de la integridad de los plásmidos utilizadas en las transfecciones.

Electroforesis en agarosa 0,8% utilizando 2 μ g de los plásmidos utilizados en los ensayos de transfección celular. **1:** pcDNA-HA-Eg2DBD α .1. **2:** pcDNA-c-Myc-Eg2DBD α .1. **MPM:** marcador de peso molecular (pb).

Para llevar a cabo la transfección del cultivo de células HeLa se realizó la puesta a punto de los ensayos variando la cantidad de lipofectamina y el tiempo de incubación del cultivo luego de la transfección.

Puesta a punto de la transfección: expresión de EGFP

Para determinar las condiciones óptimas de transfección, como primer abordaje utilizamos el plásmido pEX-EGFP-Lv01 que codifica para EGFP. Se utilizaron 4 μ g de plásmido y diferentes cantidades de lipofectamina (6, 9, 12 y 15 μ L) para transformar células HeLa y se mantuvieron en cultivo para ser observadas a las 12, 18, 24 y 36 hs mediante microscopía confocal. A partir de este ensayo, pudimos observar que a mayor cantidad de lipofectamina y a mayor tiempo de incubación, la expresión de EGFP aumentaba (Figura 6.14). Sin embargo, cuando se utilizó 12 y

15 μL de lipofectamina, se observaron cambios en la monocapa celular indicativos de efectos de la lipofectamina sobre la viabilidad celular (Figura 6.14 y Figura 6.15). En la Figura 6.15 se observa con mayor detalle el aumento del número de células redondeadas y poco refringentes, así como la presencia de pequeños cuerpos celulares que podrían representar cuerpos apoptóticos, indicadas con flechas blancas en la Figura 6.14 y 6.15. Cuando comparamos los ensayos utilizando 6 y 9 μL de lipofectamina, se observó una mayor eficiencia de transfección con 9 μL de este reactivo a las 12 y 18 horas post-transfección (Figura 6.14).

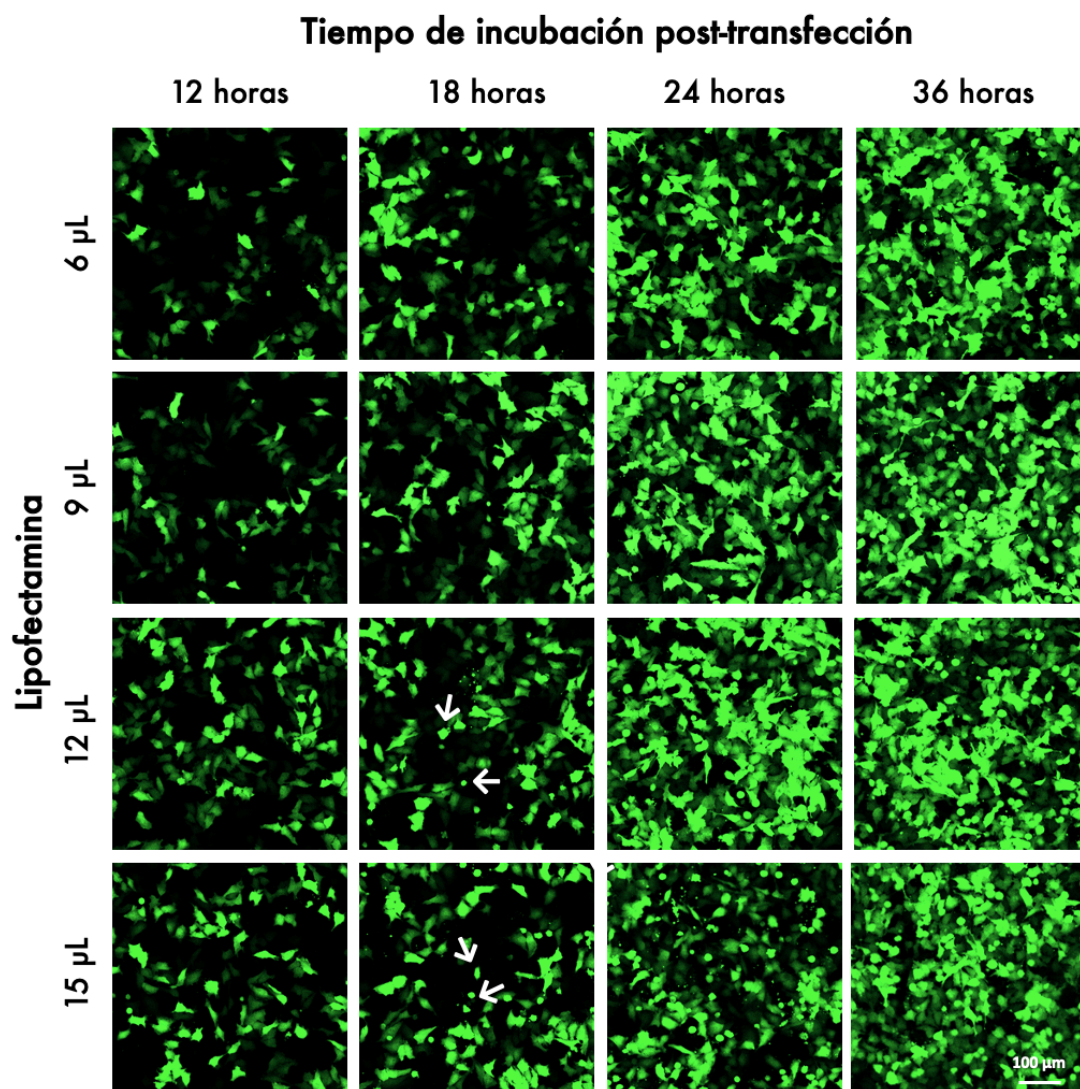


Figura 6.14. Evaluación de la eficiencia de transfección de células utilizando distintas cantidades de lipofectamina y tiempos de incubación post-transfección.

Imágenes representativas de planos focales únicos de células transfectadas con 4 μg del plásmido pEX-EGFP-Lv01 y 6, 9, 12 o 15 μL de lipofectamina. EL cultivo fue observado a las 12, 18, 24 y 36 horas post-transfección. Verde: EGFP. Flechas blancas indican células redondeadas y poco refringentes. Barra 100 μm .

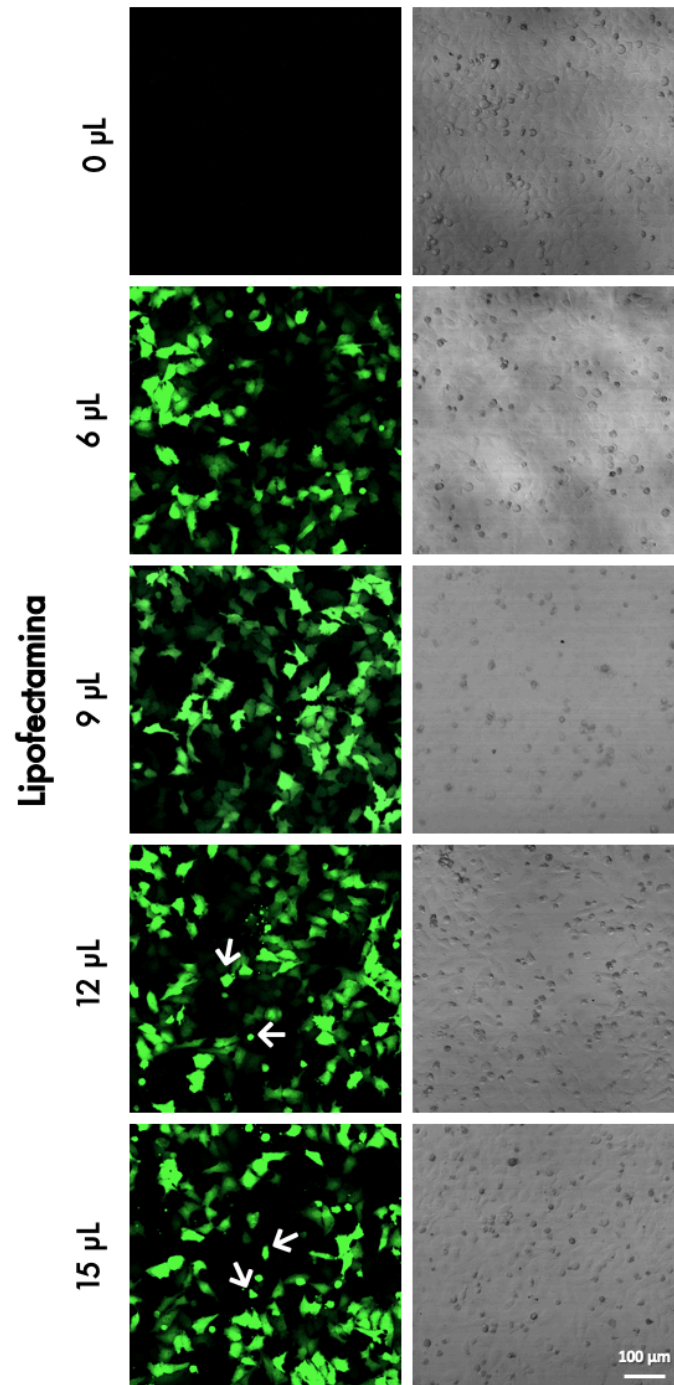


Figura 6.15. Evaluación de cambios morfológicos dependiente de la concentración de lipofectamina.

Imágenes representativas de planos focales únicos de células transfectadas con 4 μg de plásmido pEX-EGFP-Lv01 utilizando 0, 6, 9, 12 y 15 μL lipofectamina y observando el cultivo a las 18 horas post-transfección. En los paneles de la izquierda se muestra en verde a EGFP y en los de la derecha se observa el campo claro. Flechas blancas indican células redondeadas y poco refringentes. Barra 100 μm .

En base a estos resultados, y con el objetivo de tener la mejor relación entre la cantidad de células transfectadas y la viabilidad celular, es que optamos por utilizar 9 μ L de lipofectamina para llevar a cabo las transfecciones.

Puesta a punto de la transfección: expresión de las proteínas de interés

En una segunda instancia, nos interesó determinar el tiempo óptimo de incubación de las células post-transfección, en base al nivel de expresión de las proteínas de interés. Para ello, determinamos de forma cuantitativa la eficiencia de transfección de los plásmidos pcDNA-HA-Eg2DBD α .1-LBD y pcDNA3-c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD utilizados para expresar HA-Eg2DBD α .1-LBD y c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD, respectivamente. utilizando 2 μ g de cada uno de ellos y 9 μ L de lipofectamina. Luego de las 12, 18, 24 y 36 horas post-transfección se realizaron ensayos de inmunocitoquímica. El porcentaje de células transfectadas con cada una de los plásmidos se calculó como se indica en la Sección 5.3.2.2 de Materiales y Métodos, donde las células totales fueron cuantificadas por tinción con DAPI.

Como se puede observar en la Tabla 6.4, el porcentaje de células transfectadas para el plásmido que codifica para c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD, es mayor que el porcentaje para el plásmido que codifica para HA-Eg2DBD α .1-LBD, en los cuatro períodos de incubación estudiados. Se obtuvo un mayor porcentaje de células transfectadas a las 24 horas post-transfección para ambas construcciones, siendo éste de 33,4 y 21,6 % para c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y HA-Eg2DBD α .1-LBD, respectivamente. El porcentaje de células transfectadas disminuyó notoriamente a las 36 hs, pasando a ser de 1,4 y 1,6 % para c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y HA-Eg2DBD α .1-LBD, respectivamente. La disminución del porcentaje de células transfectadas a las 36 horas fue concomitante a la disminución del número de células en cultivo, como se indica la Tabla 6.4. Al observar la tinción con DAPI en la Figura 6.16, se puede evidenciar que la cantidad de células totales a las 36 horas es menor que para el resto de los intervalos de tiempo, mostrando la menor viabilidad celular en este período.

Tabla 6.4. Porcentajes de células transfectadas a distintos tiempos post-transfección.

Horas	Número total de células	% células transfectadas c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD	% células transfectadas HA-Eg2DBD α .1-LBD
12	714	10,8	6,4
18	568	28,9	18,8
24	596	33,4	21,6
36	370	1,4	1,6

En la Figura 6.16 se observa la expresión de las proteínas heterólogas cMyc-Eg2DBD α .1-LBD y HA-Eg2DBD α .1-LBD indicadas con verde y naranja, respectivamente. En esta misma imagen se aprecia el aumento paulatino de la expresión de las proteínas heterólogas entre los intervalos de 12 hs a 24 hs post-transfección, observándose el mayor cambio de expresión de 12 a 18 hs. Si bien se obtuvo el mayor porcentaje de células transfectadas a las 24 horas, el cultivo mostró características morfológicas consistentes con muerte celular, como es el aumento de la presencia de células no adheridas y con la cromatina condensada (Figura 6.16, flechas blancas).

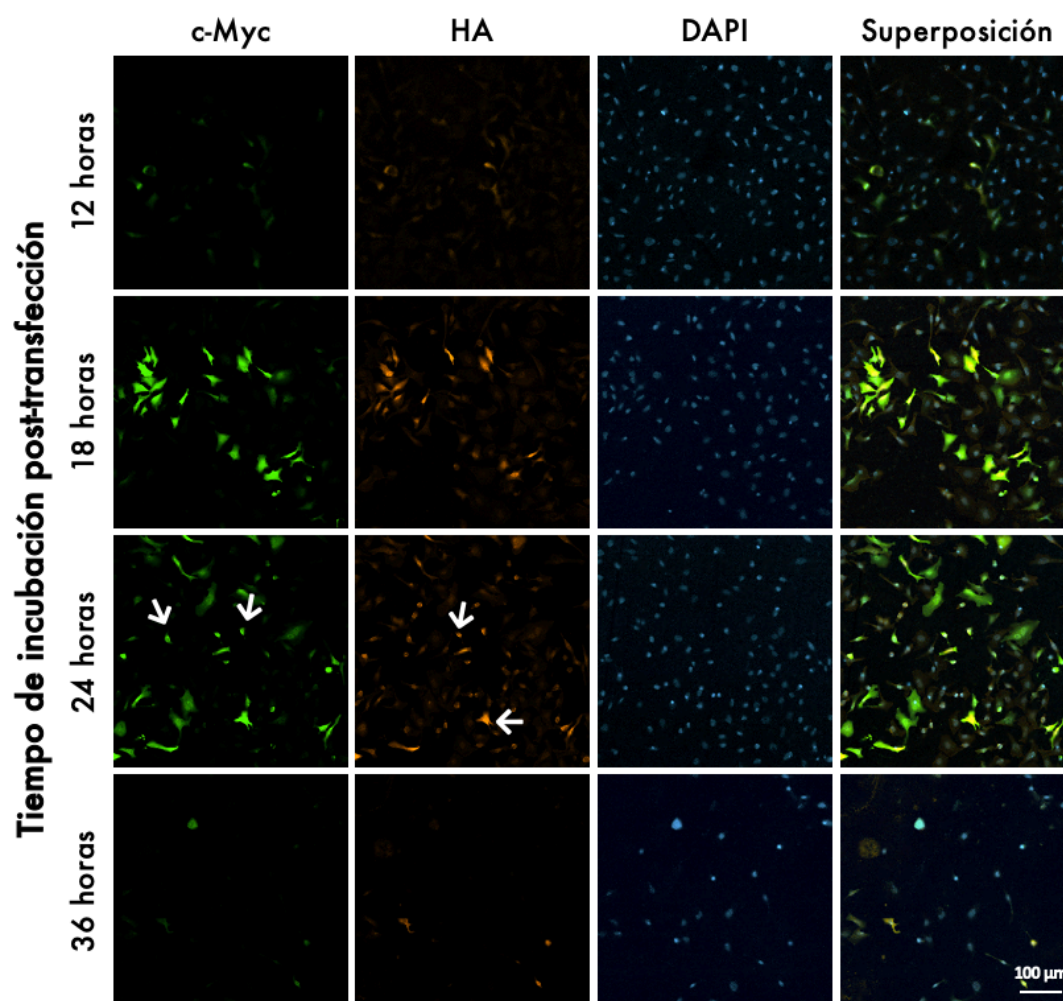


Figura 6.16. Evaluación de la eficiencia de transfección del cultivo celular en función de la expresión de las proteínas de interés a diferentes tiempos post-transfección.

Imágenes representativas de planos focales únicos de células transfectadas con 2 μ g de cada plásmido (pcDNA3.1-c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y pcDNA3.1-HA-Eg2DBD α .1-LBD) y 9 μ L de lipofectamina, realizando los preparados para inmunocitoquímica a las 12, 18, 24 y 36 horas post-transfección. Verde: *tag* c-Myc. Naranja: *tag* HA. Azul: DAPI. Flechas blancas indican células redondeadas y poco refringentes Barra 100 μ m.

Los resultados obtenidos nos indican que el tiempo post-transfección donde hay mayor expresión de las proteínas heterólogas es a las 18 hs post-transfección. En este período de tiempo se observó que las células presentan una morfología adecuada y la expresión de las proteínas recombinantes es óptima.

A partir de este ensayo, además de determinar la eficiencia de la transfección, pudimos evidenciar que una misma célula era capaz de incorporar los dos plásmidos y producir ambas proteínas recombinantes, como se puede observar en las micrografías con mayor aumento en la Figura 6.17. Asimismo, esta figura muestra la localización de ambas proteínas mayoritariamente en el citosol (visualizado con faloidina) en relación a el núcleo de las células.

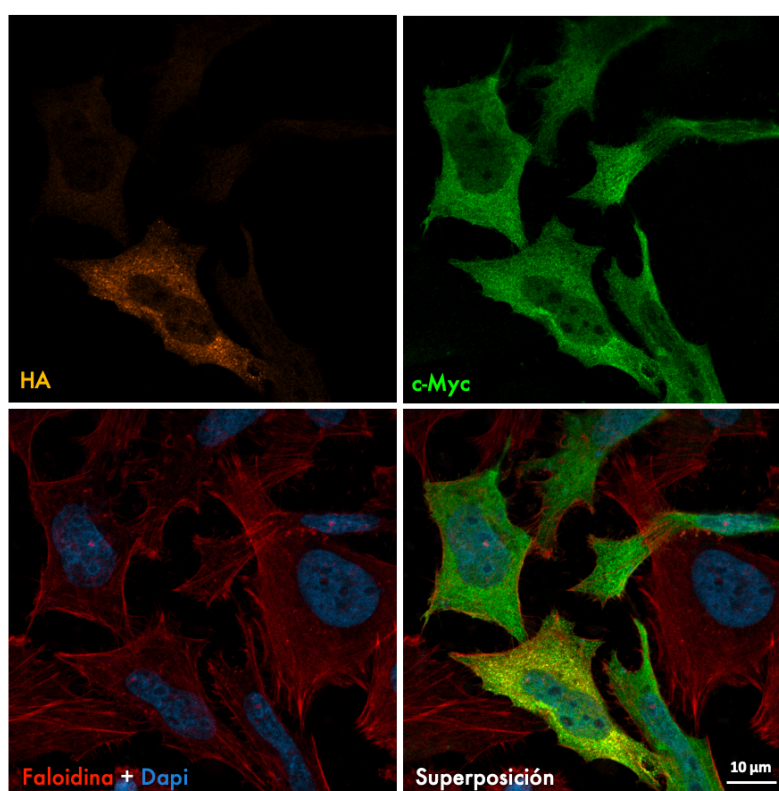


Figura 6.17. Análisis de la co-expresión de las proteínas recombinantes en células HeLa.

Imágenes representativas de planos focales únicos de células transfectadas con 2 µg de cada plásmido (pcDNA3.1-c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y pcDNA3.1-HA-Eg2DBD α .1-LBD) y 9 µL de lipofectamina. Intervalo de incubación de 18 horas post-transfección. Verde: tag c-Myc. Naranja: tag HA. Rojo: faloidina. Azul: DAPI. Barra 10 µm.

Previo a la realización de los ensayos de co-inmunoprecipitación, evaluamos mediante WB la presencia de las proteínas recombinantes en los extractos proteicos generado a partir de las co-transfecciones utilizando diferentes cantidades de lipofectamina. Como se muestra en la Figura 6.18, el ensayo de WB reveló que efectivamente los extractos proteicos contenían ambas

proteínas de expresión, ya que se observa una única banda que coincide con el peso molecular teórico de c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y HA-Eg2DBD α .1-LBD (Figura 6.18, flecha verde y naranja, respectivamente). Estos resultados también nos permitieron confirmar la especificidad de los anticuerpos comerciales contra c-Myc y HA utilizados.

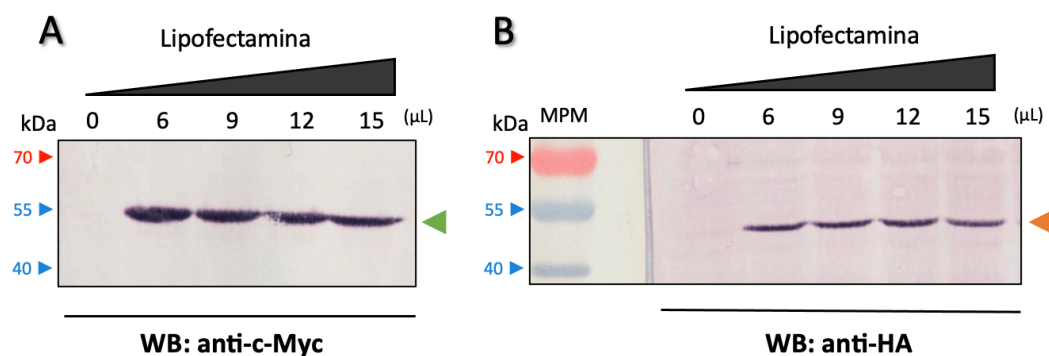


Figura 6.18. Evaluación mediante *Western Blot* de la transfección del cultivo celular utilizando diferentes cantidades de lipofectamina.

Western Blot de extractos proteicos de células transfectadas con 2 μ g de cada plásmido (pcDNA3.1-c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y pcDNA3.1-HA-Eg2DBD α .1-LBD) utilizando 0, 6, 9, 12 y 15 μ L de lipofectamina, realizados a las 18 horas pos-transfección. **(A)** anticuerpo primario anti-c-Myc. **(B)** anticuerpo primario anti-HA. Se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados a fosfatasa alcalina y el sustrato BCIP/NBT para el revelado. **MPM:** marcador de peso molecular (kDa). Flechas verde y naranja indican c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y HA-Eg2DBD α .1-LBD, respectivamente.

Todos estos ensayos en su conjunto nos permitieron determinar que 4 μ g de ADN plasmídico, 9 μ L de lipofectamina y la obtención de los extractos proteicos a las 18 horas post-transfección, son las condiciones más favorables para realizar las transfecciones del cultivo y la generación de los extractos.

6.2.2.2 Ensayos de co-inmunoprecipitación

Una vez puesta a punto la transfección de las células HeLa y la obtención de los extractos proteicos conteniendo c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y HA-Eg2DBD α .1-LBD, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación utilizando el anticuerpo primario anti-c-Myc para luego llevar a cabo ensayos de WB.

En una primera instancia, para el revelado de los WB se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados a fosfatasa alcalina. Como se puede observar en la Figura 6.19 (carril 3A y 3B, MH) confirmamos la presencia de las proteínas recombinantes c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y HA-Eg2DBD α .1-LBD (Figura 6.19, flecha verde y naranja, respectivamente) en los extractos proteicos

utilizados para los ensayos de co-inmunoprecipitación. Vale la pena señalar, que la intensidad de las bandas de la proteína de fusión con c-Myc es más fuerte que las de fusión con HA utilizando este sistema de detección.

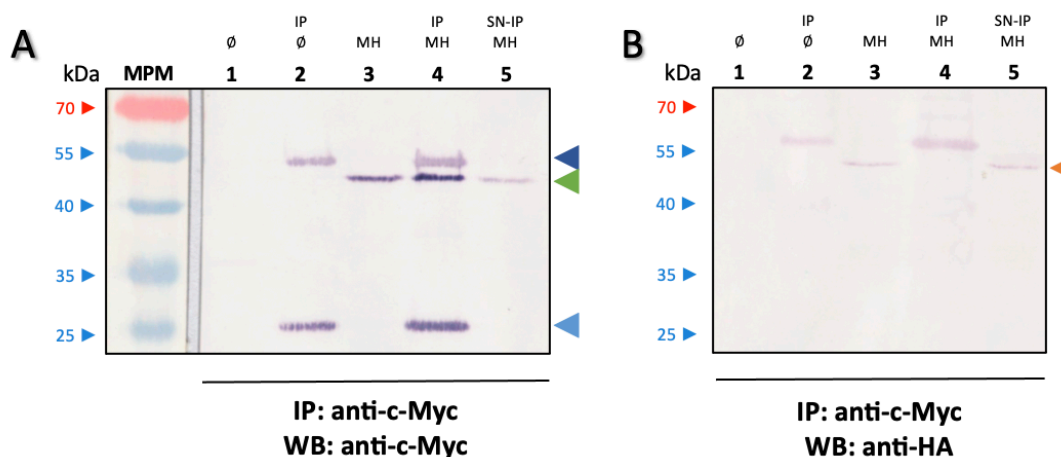


Figura 6.19. Ensayos de Co-IP para verificar el modo de dimerización de Eg2DBD α .1.

Western Blot del ensayo de co-inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-c-Myc. **(A)** anticuerpo primario anti-c-Myc. **(B)** anticuerpo primario anti-HA. Se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados a fosfatasa alcalina y BCIP/NBT para el revelado. **MPM:** marcador de peso molecular. **1:** extracto de células transfectadas con pcDNA3.1 sin inserto (\emptyset). **2:** inmunoprecipitado del extracto \emptyset (IP \emptyset). **3:** extracto de células transfectadas con pcDNA3.1-c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y pcDNA3.1-HA-Eg2DBD α .1-LBD (MH). **4:** inmunoprecipitado del extracto MH (IP MH). **5:** sobrenadante de la IP MH (SN-IP MH). Flecha azul y celeste indican la cadena pesada y liviana del anticuerpo utilizado para la IP, respectivamente. Flecha verde y naranja indican c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y HA-Eg2DBD α .1-LBD, respectivamente.

En el carril 4 de la Figura 6.19 A (IP MH) se puede observar una banda de tamaño similar al de c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD (46,5 kDa, Figura 6.19, flecha verde), evidenciando que la inmunoprecipitación fue exitosa. En ese mismo carril, así como también en el carril 2, se aprecian dos bandas que posiblemente correspondan a la cadena pesada (50 kDa) y liviana (25 kDa) del anticuerpo α -c-Myc utilizado para realizar la inmunoprecipitación, indicadas en la Figura 6.19 con una flecha azul y celeste respectivamente. Como se menciona previamente, se verificó la presencia HA-Eg2DBD α .1-LBD en el extracto MH, sin embargo la misma no pudo ser visualizada en el inmunoprecipitado de este extracto proteico, sino que se detectó en el sobrenadante de la inmunoprecipitación (Figura 6.19 B, flecha naranja).

Tal vez no pudimos visualizar la co-inmunoprecipitación de HA-Eg2DBD α .1-LBD al inmunoprecipitar c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD debido a la baja sensibilidad del método de revelado

con BCIP/NBT. Esto nos motivo a cambiar el anticuerpo secundario y el método de revelado, realizando un nuevo WB utilizando anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano y el sustrato quimioluminiscente ECL (Figura 6.20).

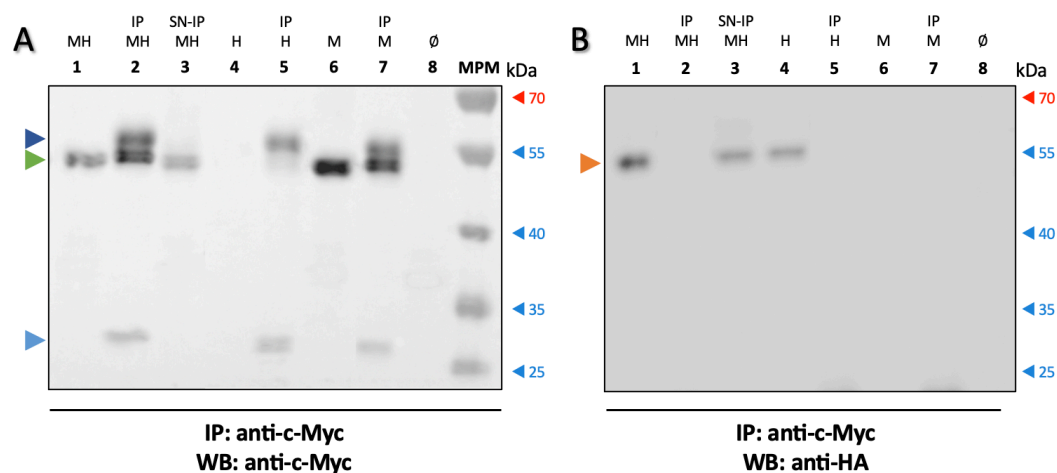


Figura 6.20. Ensayos de Co-IP para verificar el modo de dimerización de Eg2DBD α .1 (detección quimioluminiscente)

Western Blot del ensayo de inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-c-Myc. **(A)** anticuerpo primario anti-c-Myc. **(B)** anticuerpo primario anti-HA. Se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados peroxidasa de rábano y el sustrato ECL para el revelado. **1:** extracto de células transfectadas con pcDNA3.1-c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y pcDNA3.1-HA-Eg2DBD α .1-LBD (MH). **2:** inmunoprecipitado del extracto MH (IP MH). **3:** sobrenadante de la IP MH (SN-IP MH). **4:** extracto de células transfectadas con pcDNA3.1-HA-Eg2DBD α .1-LBD (H). **5:** inmunoprecipitado del extracto H (IP H). **6:** extracto de células transfectadas con pcDNA3.1-c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD (M). **7:** inmunoprecipitado del extracto M (IP M). **8:** extracto de células transfectadas con pcDNA3.1 sin inserto (\emptyset). **MPM:** marcador de peso molecular. Flecha azul y celeste indican la cadena pesada y liviana del anticuerpo utilizado para la IP, respectivamente. Flecha verde y naranja indican c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y HA-Eg2DBD α .1-LBD, respectivamente.

Al igual que en el caso anterior, el resultado de este WB revelado con un método más sensible, indica que la inmunoprecipitación funcionó de forma correcta al observarse una banda correspondiente al tamaño de c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD en el IP MH (Figura 6.20 A, carril 2, flecha verde). Además, se detectó la presencia de HA-Eg2DBD α .1-LBD en el extracto proteico MH y en el sobrenadante de la inmunoprecipitación (Figura 6.20 B, carril 1 y 3 respectivamente, flecha naranja), pero no se observó la presencia de HA-Eg2DBD α .1-LBD en el extracto MH inmunoprecipitado. Estos resultados indican que aún utilizando este método de revelado más sensible, no pudimos detectar la co-inmunoprecipitación de ambas proteínas de fusión.

6.2.3 Análisis de la dimerización: EQ

Los resultados hasta el momento podrían indicar que la interacción entre los monómeros que conformarían el homodímero de Eg2DBD α .1-LBD sea débil y no sostenerse al realizar los ensayos de inmunoprecipitación, es que nos propusimos realizar un método alternativo, en donde las células HeLa transfectadas se incubaban con un agente entrecruzante previo a la lisis celular. En este ensayo de entrecruzamiento químico (EQ), se transfectaron células HeLa de igual forma que para los ensayos de inmunoprecipitación, pero en esta ocasión luego de las 18 horas pos-transfección las células son tratadas con tres agentes entrecruzantes diferentes.

En una primera instancia, las células se incubaron durante tres intervalos de tiempo con el reactivo entrecruzante BSOCOES. Como se muestra en la Figura 6.21 A (carriles 4, 5 y 6) se observa una banda correspondiente al monómero c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD en los tres tiempos de incubación, indicada con una flecha verde. Sin embargo, no se observa ninguna banda de mayor peso molecular que pudiera corresponderse con el dímero. Adicionalmente sobre estas mismas muestras, realizamos un WB utilizando el anticuerpo anti- β -Tubulina (Figura 6.21 B) para evaluar el tratamiento con el agente entrecruzante mediante la visualización de dímeros de esta proteína. En este WB también se observa una única banda del tamaño esperado del monómero de β -Tubulina (55 kDa aproximadamente), en los tres tiempos de incubación ensayados (Figura 6.21 B), siendo esta banda del mismo tamaño que la visualizada sin tratamiento (carril 7), indicada con una flecha negra..

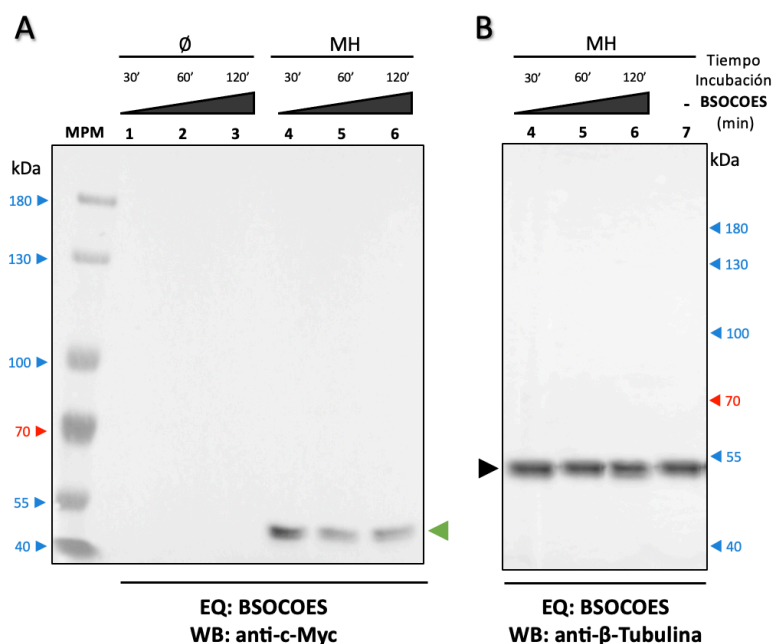


Figura 6.21. Ensayo de entrecruzamiento químico con el reactivo BSOCOES.

Western Blot de extractos de células tratadas con BSOCOES. **(A)** anticuerpo primario anti-c-Myc. **(B)** anticuerpo primario anti-β-Tubulina. Se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano y el sustrato ECL para el revelado. **MPM:** marcador de peso molecular (kDa). **1-3:** extracto de células transfectadas con el plásmido pcDNA3.1 sin inserto (∅), incubadas con BSOCOES durante 30, 60 y 120 minutos, respectivamente. **4-6:** extracto de células transfectadas con pcDNA3.1-c-Myc-Eg2DBDα.1-LBD y pcDNA3.1-HA-Eg2DBDα.1-LBD (MH), incubadas con BSOCOES durante 30, 60 y 120 minutos, respectivamente. **7:** extracto de células MH sin tratamiento con el agente entrecruzante. Flecha negra y verde indican los monómeros de β-Tubulina y c-Myc-Eg2DBDα.1-LBD, respectivamente.

En una segunda instancia, evaluamos un segundo agente entrecruzante DMP, incubando las células durante 30, 60 y 120 minutos y utilizando tres concentraciones del reactivo distintas (1, 2 y 5 mM). Este ensayo presentó resultados similares a los obtenidos con el reactivo BSOCOES, donde el WB con anticuerpo anti-c-Myc mostró una única banda correspondiente al monómero de c-Myc-Eg2DBDα.1-LBD (Figura 6.22 B, flecha verde) en las tres concentraciones ensayadas y en los tres intervalos de incubación realizados. Asimismo, el WB utilizando anticuerpo anti-β-Tubulina (Figura 6.22 B, flecha negra) también se observó una única banda en las tres concentraciones de DMP utilizadas y en los tres tiempos de incubación ensayados. Esta única banda correspondiente al monómero de β-Tubulina no visualizándose dímeros de esta proteína.

Estos resultados demuestran que los tratamientos con los agentes de entrecruzamiento BSOCOES y DMP no fueron exitosos en las condiciones ensayadas, ya que no se detectó la formación de dímeros o multímeros de c-Myc-Eg2DBDα.1 ni de β-Tubulina.

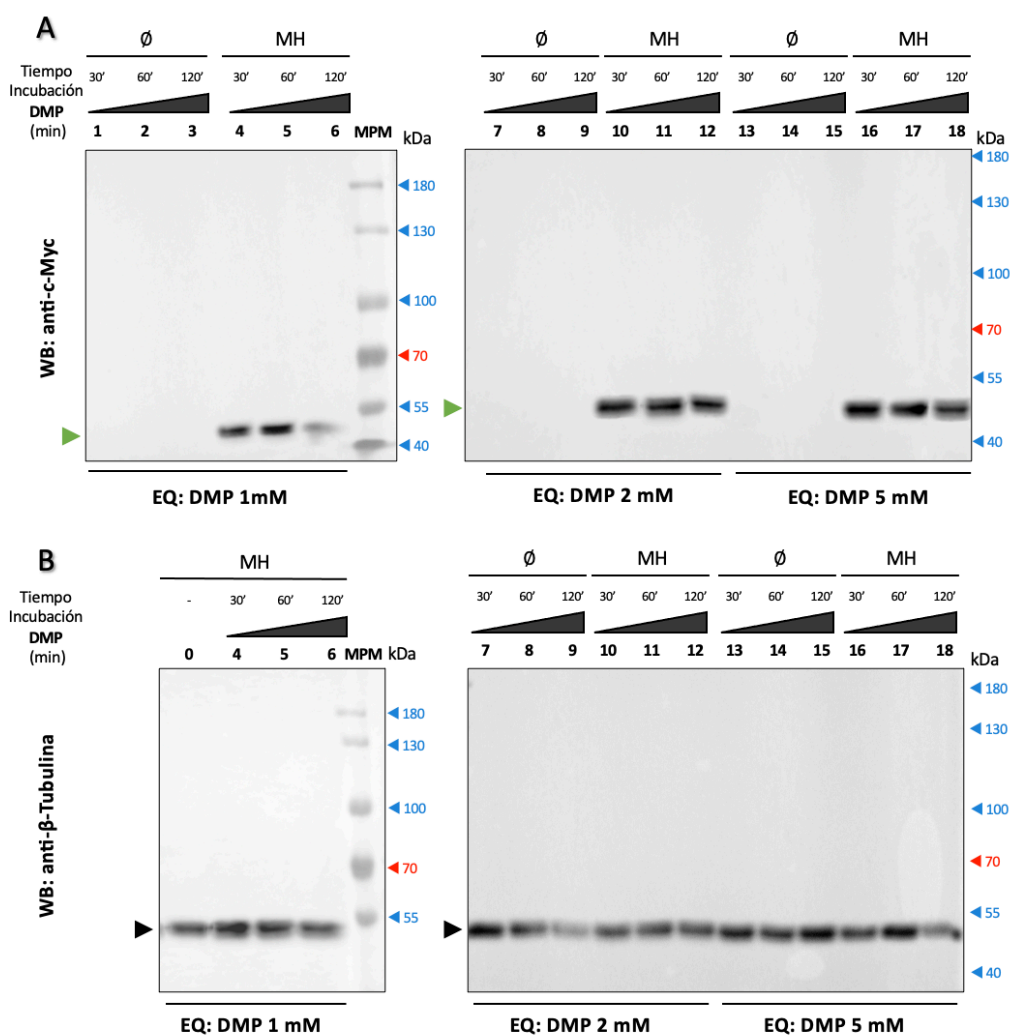


Figura 6.22. Ensayo de entrecruzamiento químico con el reactivo DMP.

Western Blot del ensayo de entrecruzamiento químico con el reactivo DMP **(A)** anticuerpo primario anti-c-Myc. **(B)** anticuerpo primario anti- β -Tubulina. Se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano y el sustrato ECL para el revelado. **0**: extracto de células transfectadas con pcDNA3.1-c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y pcDNA3.1-HA-Eg2DBD α .1-LBD (MH) sin agente entrecruzante. **1-3**: extracto de células transfectadas con pcDNA3.1 sin inserto (\emptyset) incubado con DMP 1 mM, durante 30, 60 y 120 minutos, respectivamente. **4-6**: extracto de células MH incubadas con DMP 1 mM durante 30, 60 y 120 minutos, respectivamente. **7-9**: extracto de células \emptyset incubadas con DMP 2 mM, durante 30, 60 y 120 minutos, respectivamente. **10-12**: extracto de células MH incubadas con DMP 2 mM durante 30, 60 y 120 minutos, respectivamente. **13-15**: extracto de células \emptyset incubadas con DMP 5 mM, durante 30, 60 y 120 minutos, respectivamente. **16-18**: extracto de células MH incubadas con DMP 5 mM durante 30, 60 y 120 minutos, respectivamente. **MPM**: marcador de peso molecular (kDa). Flecha negra y verde indican los monómeros de β -Tubulina y c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD, respectivamente.

Finalmente se utilizó como agente entrecruzante paraformaldehído (PFA), reactivo ampliamente utilizado en histología para fijar células y tejidos, pero que en concentraciones bajas y tiempos de incubación cortos, funciona como agente de entrecruzamiento (Klockenbusch & Kast, 2010).

En esta oportunidad, las células fueron transfectadas con pcDNA3.1-c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y pcDNA3.1-HA-Eg2DBD α .1-LBD o con pcDNA3.1 sin inserto para ser incubadas con PFA al 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1 y 2 % durante 5 o 10 minutos. Los WB de estos extractos utilizando el anticuerpo primario anti-c-Myc, nuevamente reveló una única banda correspondiente al monómero c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD (Figura 6.23, flecha verde). Como podemos observar en la Figura 6.23 A, al incubar 5 minutos con PFA, apreciamos una disminución en la cantidad de proteína detectada a medida que aumenta la concentración de PFA. Este efecto se observa de forma más notoria al incubar 10 minutos, donde se pierde la detección de la proteína al utilizar 2 % de PFA (Figura 6.23B).

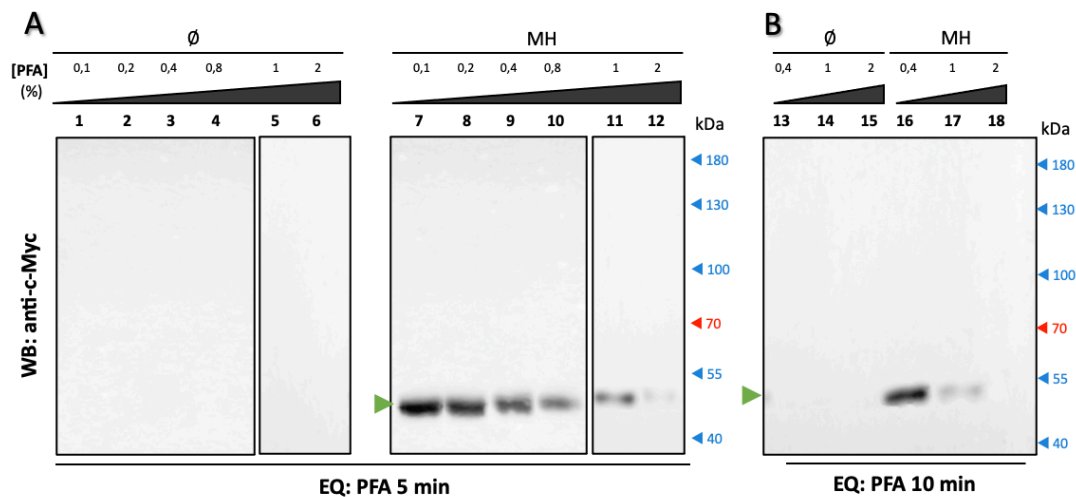


Figura 6.23. Ensayo de entrecruzamiento químico con PFA.

Western Blot del ensayo de entrecruzamiento químico con PFA **(A)** incubación con PFA durante 5 minutos. **(B)** incubación con PFA durante 10 minutos. Se utilizó el anticuerpo primario anti-c-Myc, un anticuerpo secundario acoplado peroxidasa de rábano y el sustrato ECL para el revelado. **1-6:** extracto de células transfectadas con pcDNA3.1 sin inserto (\emptyset) incubadas con PFA durante 5 minutos a una concentración final de 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1 y 2%, respectivamente **7-12:** extracto de células transfectadas con pcDNA3.1-c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y pcDNA3.1-HA-Eg2DBD α .1-LBD (MH) incubadas con PFA durante 5 minutos a una concentración final de 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1 y 2%, respectivamente. **13-15:** extracto de células \emptyset incubadas con PFA durante 10 minutos a una concentración final de 0,4, 1 y 2%, respectivamente. **16-18:** extracto de células MH incubadas con PFA durante 10 minutos a una concentración final de 0,4, 1 y 2%, respectivamente. Flecha verde indica monómero de c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD.

Debido a la gran disminución en la cantidad de proteína recombinante presente en los extractos incubados con 1 y 2 % de PFA, decidimos continuar trabajando con concentraciones más bajas (0,1, 0,2 0,4 y 0,8 %) de PFA e incubar las células durante 5 minutos. En los WB con los anticuerpos anti-c-Myc y anti-HA se marcó una única banda a la misma altura que la banda observada en la muestra sin entrecruzante (Figura 6.24 A y B, flecha verde y naranja, respectivamente), no observándose bandas de mayor tamaño. Por otro lado, en el WB realizado con el anticuerpo anti- β -Tubulina se detectaron bandas correspondientes al monómero de β -Tubulina (55 kDa aprox., figura 6.24 A, flecha negra), pero además se marcaron bandas de mayor peso molecular que aumentan su intensidad a medida que aumenta la concentración de PFA (Figura 6.24 C, carriles 2-5). Estas bandas de alto peso molecular (mayores a los 130 kDa) no se encuentran presentes en las muestras sin entrecruzar (Figura 6.24 C, carril 1), sugiriéndonos que podrían ser multímeros de α/β -Tubulina.

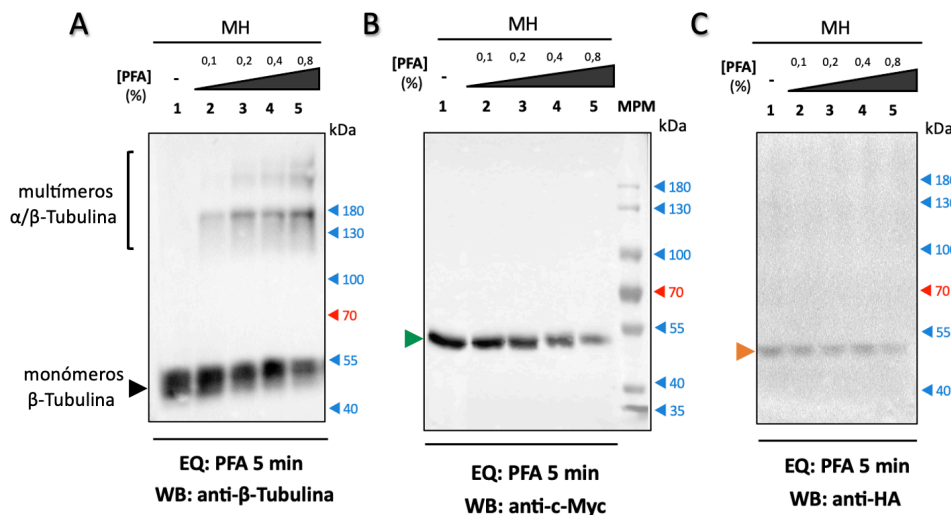


Figura 6.24. Ensayo de entrecruzamiento químico con PFA de 0,1 a 0,8 %.

Western Blot del ensayo de entrecruzamiento químico con PFA durante 5 minutos. **(A)** anticuerpo primario anti- β -Tubulina. **(B)** anticuerpo primario anti-c-Myc. **(C)** anticuerpo primario anti-HA. Se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados peroxidasa de rábano y el sustrato ECL para el revelado. **1:** extracto de células transfectadas con pcDNA3.1-c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y pcDNA3.1-HA-Eg2DBD α .1-LBD (MH) sin agente entrecruzante. **2-5:** extracto de células MH incubadas con PFA a una concentración final de 0,1, 0,2, 0,4 y 0,8%, respectivamente. **MPM:** marcador de peso molecular (kDa). Flechas negra, verde y naranja indican los monómeros de β -Tubulina, c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y HA-Eg2DBD α .1-LBD, respectivamente.

Este ensayo nos permitió demostrar que es posible el entrecruzamiento de la β -Tubulina utilizando PFA, estableciendo que la mejor condición para realizar los ensayos incubar las células co-transfectadas con PFA al 0,8 % durante 5 minutos.

6.2.4 Análisis de la dimerización: EQ y Co-IP

Debido a que no fue posible visualizar directamente la formación de dímeros de Eg2DBD α .1 con el tratamiento de EQ, llevamos a cabo ensayos de inmunoprecipitación a partir de los extractos de células co-transfectadas e incubadas con PFA 0,8 % durante 5 minutos. Los resultados observados en la Figura 6.25 nos permitieron determinar que el ensayo de inmunoprecipitación funcionó de forma correcta, al observarse una banda correspondiente al tamaño de c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD (Figura 6.25 A, carril 3, flecha verde). Además, se observó la presencia de HA-Eg2DBD α .1-LBD en el extracto proteico MH (Figura 6.25 B, carril 2, flecha naranja). En el inmunoprecipitado del extracto MH generado a partir del tratamiento con PFA se observa un marcado tipo *smear*, pero no una banda definida del tamaño esperado para HA-Eg2DBD α .1-LBD. Sin embargo, este mismo patrón también se aprecia en el inmunoprecipitado del extracto celular transfectado con el plásmido sin inserto (Figura 6.25 B, carril 5), sugiriendo un marcado inespecífico.

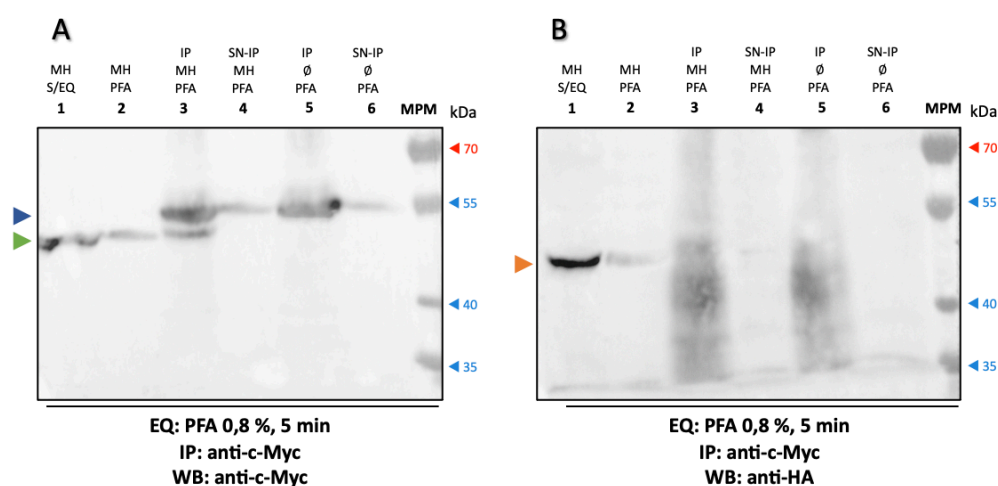


Figura 6.25. Ensayo de inmunoprecipitación post-tratamiento con PFA.

Western Blot del ensayo de inmunoprecipitación luego del tratamiento de células con PFA 0,8 % durante 5 minutos. **(A)** anticuerpo primario anti-c-Myc. **(B)** anticuerpo primario anti-HA. Se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano y el sustrato ECL para el revelado. **1:** extracto de células transfectadas con pcDNA3.1-c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y pcDNA3.1-HA-Eg2DBD α .1-LBD (MH) sin agente entrecruzante (S/EQ). **2:** extracto de células MH incubadas con PFA (MH PFA). **3:** Inmunoprecipitado de MH PFA (IP MH PFA). **4:** Sobrenadante de la inmunoprecipitación IP MH PFA (SN-IP MH PFA). **5:** Inmunoprecipitado del extracto de células transfectadas con pcDNA3.1 sin inserto incubadas con PFA (IP Ø PFA). **6:** Sobrenadante de la inmunoprecipitación IP Ø PFA (SN-IP Ø PFA). **MPM:** marcador de peso molecular (kDa). Flecha azul indica la cadena pesada del anticuerpo utilizado para la IP. Flecha verde y naranja indican c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y HA-Eg2DBD α .1-LBD, respectivamente.

A pesar que el tratamiento con PFA como agente entrecruzante previo al ensayo de inmunoprecipitación parecía alentador, estos resultados tampoco nos permitieron confirmar el modo de interacción determinado mediante los ensayos de DHL.

6.2.5 Análisis de la dimerización: Co-IP de proteínas traducidas *in vitro*

Como última estrategia llevamos a cabo ensayos de inmunoprecipitación con las proteínas c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y HA-Eg2DBD α .1-LBD traducidas *in vitro* utilizando un kit comercial de extractos de reticulocito de conejo y los transcritos generados a partir de los plásmidos pcDNA-c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y pcDNA-HA-Eg2DBD α .1-LBD, respectivamente.

En un primer paso, realizamos ensayos de WB con los extractos de la traducción *in vitro* de cada proteína. Dichos ensayos mostraron que las traducciones fueron exitosas, generándose las proteínas recombinantes Myc-Eg2DBD α .1-LBD y HA-Eg2DBD α .1-LBD del tamaño esperado (Figura 6.26).

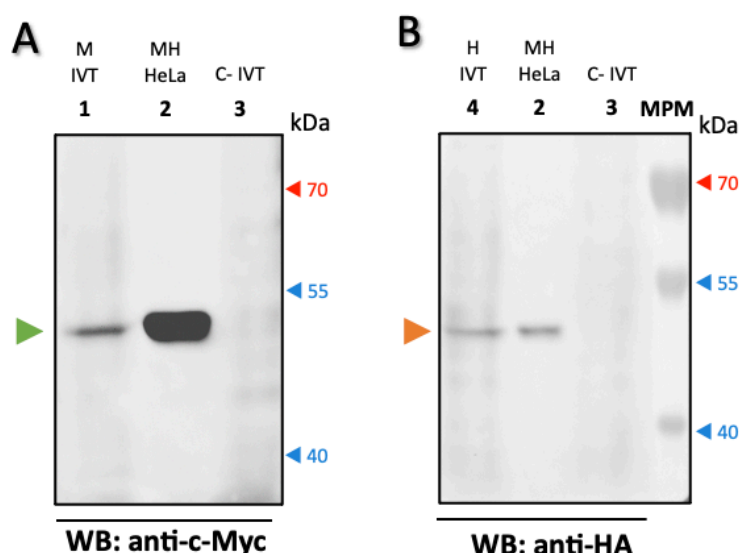


Figura 6.26. Evaluación de la traducción *in vitro* de Myc-Eg2DBD α .1-LBD y HA-Eg2DBD α .1-LBD. (A) anticuerpo primario anti-c-Myc. (B) anticuerpo primario anti-HA. Se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano y el sustrato ECL para el revelado. **1:** extracto de traducción *in vitro* de Myc-Eg2DBD α .1-LBD (M IVT). **2:** extracto de células HeLa transfectadas con pcDNA3.1-c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y pcDNA3.1-HA-Eg2DBD α .1-LBD (MH HeLa). **3:** control negativo de la traducción *in vitro* (sin ARN, C- IVT). **4:** extracto de traducción *in vitro* de HA-Eg2DBD α .1-LBD (H IVT). **MPM:** marcador de peso molecular. Flecha verde y naranja indican c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y HA-Eg2DBD α .1-LBD, respectivamente.

En un segundo paso, inmunoprecipitamos la mezcla de los extractos de c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y de HA-Eg2DBD α .1-LBD utilizando el anticuerpo anti-c-Myc. Nuestros resultados muestran la

presencia de c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y HA-Eg2DBD α .1-LBD en el inmunoprecipitado (Figura 6.27, carriles 1), aunque esta última banda proteica es más tenue. Ambas bandas presentan el tamaño esperado de 46,5 kDa y 46,4 kDa para c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y HA-Eg2DBD α .1-LBD, respectivamente. Como control de especificidad de la Co-IP, se realizó la inmunoprecipitación del extracto de traducción *in vitro* c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD con el anticuerpo anti-c-Myc. En el WB revelado con anti-c-Myc se detectó en el inmunoprecipitado la presencia de dicha proteína recombinante (Figura 6.27 A, carril 3), sin embargo al utilizar el anticuerpo anti-HA no se detecta ninguna proteína (Figura 6.27 B, carril 3). De esta manera confirmamos que el anticuerpo anti-HA no reconoce a otra proteína de los extractos de traducción *in vitro*. Esto nos permite afirmar que la marca tenue obtenida en el inmunoprecipitado MH es producto del reconocimiento específico de HA-Eg2DBD α .1-LBD (Figura 27 B, carril 1).

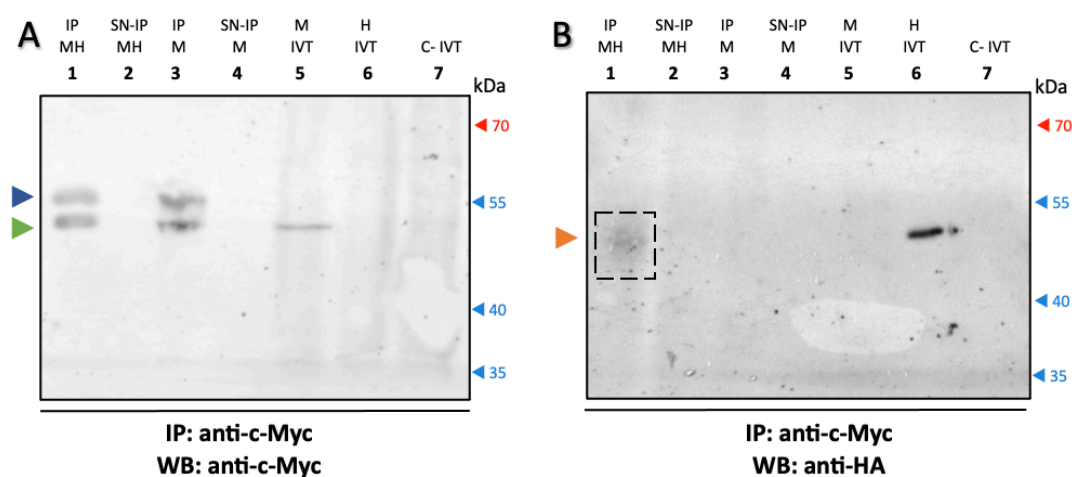


Figura 6.27. Ensayos de inmunoprecipitación con proteínas traducidas *in vitro*.

Western Blot del ensayo de inmunoprecipitación de los extractos de traducción *in vitro* utilizando el anticuerpo anti-c-Myc. **(A)** anticuerpo primario anti-c-Myc. **(B)** anticuerpo primario anti-HA. Se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano y el sustrato ECL para el revelado. **1:** inmunoprecipitado del extracto de traducción *in vitro* de c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y HA-Eg2DBD α .1-LBD (IP MH). **2:** sobrenadante de la IP MH (SN-IP MH). **3:** inmunoprecipitado del extracto de traducción *in vitro* de c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD (IP M). **4:** sobrenadante de la IP M (SN-IP M). **5:** extracto de traducción *in vitro* de c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD (M IVT). **6:** extracto de traducción *in vitro* de HA-Eg2DBD α .1-LBD (H IVT). **7:** Control negativo de la traducción *in vitro* (sin ARN, C- IVT). Flecha azul indica la cadena pesada del anticuerpo utilizado para la IP. Flecha verde y naranja indican c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y HA-Eg2DBD α .1-LBD, respectivamente.

Nuestros resultados también indican que en las condiciones ensayadas sería una baja proporción de HA-Eg2DBD α .1-LBD la que interacciona con c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD (Figura 27 B, carriles 1 y 6).

Para verificar la presencia de HA-Eg2DBD α .1-LBD y c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD en el inmunoprecipitado, se analizó una banda proteica de alrededor de 46 kDa por espectrometría de masa nano-LC-MS/MS. Este resultado nos permitió determinar la presencia de Eg2DBD α .1-LBD, sin embargo, no pudimos identificar los *tags* HA o c-Myc en esta muestra.

El resultado obtenido en el ensayo de co-inmunoprecipitación con las proteínas traducidas *in vitro* apoya los resultados obtenidos en el ensayo de doble híbrido de levadura, en los cuales identificamos la interacción de Eg2DBD α .1-LBD consigo mismo.

6.3 Interacción con ligandos

6.3.1 Análisis del DHL_m con SFB

Una vez definida la interacción de Eg2DBD α .1-LBD consigo mismo, nos resultó de gran interés evaluar si la dimerización del receptor podría verse inducida por la unión de ligandos pertenecientes al hospedero intermediario de *E. granulosus s.l.*. Para esto realizamos ensayos de DHL modificado (DHL_m), en donde las levaduras Y187 co-transformadas se incubaron con 5 % de SFB y se midió la actividad β -galactosidasa dependiente del grado de dimerización. Este ensayo se realizó en presencia y ausencia de SFB y las levaduras se co-transformaron con: 1) pGADT7-T y pGBKT7-53 como control positivo; 2) utilizando los plásmidos pGADT7-T y pGBKT7-Lam como control negativo; 3) pGADT7-Eg2DBD α .1-LBD y pGBKT7-Eg2DBD α .1-LBD. En primera instancia pusimos a punto la técnica de DHL_m para utilizar volúmenes menores a los utilizados por otros investigadores (Lezzi et al., 2002; Oftedal et al., 2005).

Como se puede ver en la Tabla 6.5 y en la Figura 6.28, el control positivo mostró actividad β -galactosidasa tanto en ausencia como en presencia de SFB (columnas en violeta), si bien se observa una pequeña diferencia en el control positivo con SFB en comparación con el control sin SFB, esta diferencia no es significativa. El control negativo, mostró una actividad β -galactosidasa casi nula.

Las levaduras co-transformadas con pGADT7-Eg2DBD α .1-LBD y pGBKT7-Eg2DBD α .1-LBD (Eg2DBD α .1 x Eg2DBD α .1) mostraron actividad β -galactosidasa tanto en ausencia como en presencia de suero. Sin embargo, la presencia del SFB aumentó 2,3 veces la actividad del gen reportero con respecto al ensayo suero, dando valores similares a los obtenidos en el control

positivo. Este aumento de la actividad de β -galactosidasa es significativo con un valor-p menor a 0,001.

Tabla 6.5. Actividad β -galactosidasa obtenida en los ensayos DHL_m.

Ensayo	Ligando	Actividad β -galactosidasa (\bar{U})	Desvío estándar
Control positivo (+)	Sin Ligando	329	26
	SFB	359	30
Control negativo (-)	Sin Ligando	0,129	0,041
	SFB	0,136	0,034
Eg2DBD α .1 x Eg2DBD α .1	Sin Ligando	138	42
	SFB	328	30

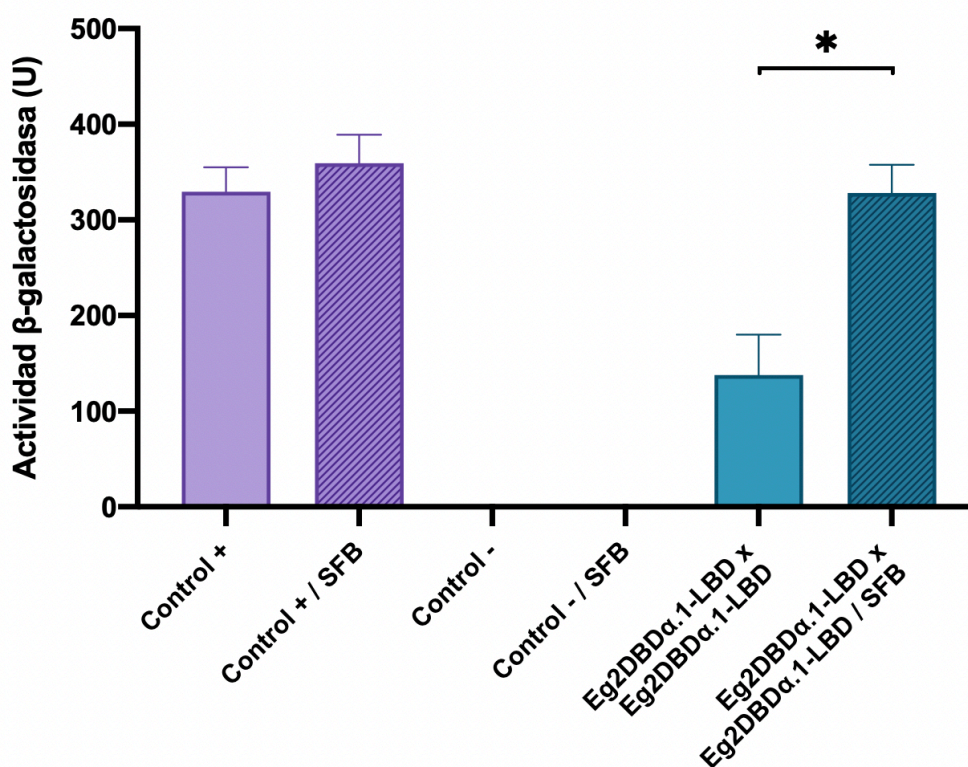


Figura 6.28. Ensayos de actividad β -galactosidasa de los DHL_m.

Se grafica la actividad β -galactosidasa (U) para cada ensayo de DHL modificado. * diferencia significativa con un p valor < 0,001.

Estos resultados indicarían que el suero del hospedero intermediario (bovino) contiene al menos un ligando que se une a Eg2DBD α .1-LBD estimulando su dimerización.

7. DISCUSIÓN

7.1 Estructura primaria de Eg2DBD α .1

A través de la búsqueda de receptores nucleares que puedan interactuar con las FABPs de *E. granulosus s.l.*, hace algunos años nuestro grupo de investigación clonó una región de ADNc a partir de protoesclótes, que codifica para un receptor nuclear con dos DBDs. Este receptor resultó ser una isoforma del receptor Eg2DBD α la cual denominamos Eg2DBD α .1. Esta región abarca 1772 nucleótidos desde el extremo 3' del transcripto de *Eg2DBD α .1*, y en esta tesis es denominada *Eg2DBD α .1ct*. La misma incluye casi por completo al segundo DBD, la región bisagra, el LBD y culmina en el codón de terminación de la traducción (Riera, 2018). Dado que el primer DBD es exclusivo de la subfamilia 2DBD-NRs, en esta instancia clonamos un fragmento que lo incluyera. De esta manera obtuvimos una región de 1673 nucleótidos desde el ATG inicial del transcripto denominado *Eg2DBD α .1nt*. La secuencia *Eg2DBD α .1nt* se solapa con la secuencia *Eg2DBD α .1ct* por 903 nucleótidos.

El alineamiento de *Eg2DBD α .1nt*, con *Eg2DBD α .1ct* y con la secuencia *Eg2DBD α* depositada en la base de datos de WormBase Parasite (*Eg2DBD α* ID: EgG_000379600) nos permitió confirmar algunos de los cambios nucleotídicos entre *Eg2DBD α .1* y *Eg2DBD α* reportados previamente por nuestro grupo (Alvite et al., 2019). A partir de este análisis confirmamos la delección de 66 nucleótidos que implica la ausencia de 22 aminoácidos en el dominio de unión a ligando de Eg2DBD α .1, la cual comprende a los aminoácidos 502 al 523 del receptor Eg2DBD α . Recientemente, nuestro grupo de investigación generó un modelo 3D validado del receptor Eg2DBD α .1 completo que está siendo evaluado para su publicación, en donde se determinó la posible estructura terciaria del LBD. En este trabajo identificaron los 21 residuos aminoacídicos que formarían parte del bolsillo hidrofóbico de unión a ligandos (LBP, *ligand binding pocket*), dos de ellos son los residuos de metionina en la posición 492 (Met492) y fenilalanina en la posición 508 (Phe508). Ensayos de *docking* molecular utilizando este modelo, mostraron que Eg2DBD α .1 une con alta afinidad al ácido oleico y al ácido linoleico interactuando directamente con el residuo Phe508 a través de su cabeza polar (artículo en revisión). Resulta interesante destacar que la región de 22 aminoácidos adicionales en el receptor Eg2DBD α (desde Thr502 hasta Gln523) se localizaría a nivel del LBP, encontrándose el residuo de fenilalanina involucrado en la interacción en la posición 530 (Phe530). Esto podría implicar que Eg2DBD α y Eg2DBD α .1 tuvieran LBPs diferentes, donde la estructura en sí del bolsillo o los

aminoácidos implicados en la interacción con el ligando sean distintos, pudiendo llegar a tener afinidades diferenciales por sus ligandos.

Además, a partir del análisis del alineamiento mencionado identificamos cuatro nucleótidos diferentes entre las secuencias *Eg2DBDα.1nt* y *Eg2DBDα.1ct*, de los cuales tres fueron descritos como diferencias entre *Eg2DBDα.1* y *Eg2DBDα* (Alvite et al., 2019) que no están presentes en *Eg2DBDα.1nt*. Estos cambios son A937G, G1044A, C1290T, pero únicamente A937G implica un cambio aminoacídico en la secuencia *Eg2DBDα.1* respecto a *Eg2DBDα.1nt*, correspondiente al cambio T313A. Este cambio fue identificado en *Eg2DBDα.1ct* por Riera 2018 y fue descrita como un cambio en la región bisagra del receptor. Sin embargo, estudios recientes de modelado 3D del receptor *Eg2DBDα.1* realizados por nuestro grupo, localizan el cambio T313A en el segundo dominio de unión al ADN (Alvite et al., 2019). En este trabajo se describe la posible interacción de este segundo DBD con el ADN, la misma no se daría a través de su caja P, sino que este dominio participaría estabilizando el complejo proteína-ADN. Si bien es una sustitución a confirmar en el receptor *Eg2DBDα.1*, la misma podría implicar diferencias en la estabilidad de unión al ADN entre las isoformas *Eg2DBDα* y *Eg2DBDα.1*.

Los cambios nucleotídicos observados entre las secuencias *Eg2DBDα.1nt* y *Eg2DBDα.1ct* nos llamaron la atención. Una posible explicación es que estas diferencias podrían ser mutaciones introducidas por la ADN polimerasa al amplificar el fragmento *Eg2DBDα.1nt* o *Eg2DBDα.1ct*. Si bien la enzima utilizada tiene actividad 3'→5' exonucleasa ofreciendo gran fidelidad, no es de las enzimas recomendada por el fabricante para la obtención de amplicones con baja tasa de error, por lo que una forma de confirmar estos cambios sería utilizando una enzima con una actividad correctora superior. Otra posibilidad, es que dado que se partió de ARN obtenido de protoescolices de distinto origen para obtener los fragmentos *Eg2DBDα.1ct* y *Eg2DBDα.1nt*, estas discrepancias podrían deberse a diferencias genéticas propias de los parásitos. Si bien siempre se utilizaron protoescolices de quistes de origen bovino, éstos fueron extraídos de vacas distintas, en años diferentes y no fueron genotipados, pudiendo ser de *E. granulosus* s.s (genotipo G1) o *E. ortleppi* (genotipo G5). Además, también cabe la posibilidad de que los cambios descritos se deban a la existencia de diferentes alelos de este gen. Repetir la amplificación, utilizando una polimerasa de alta fidelidad y un ADNc de un nuevo *batch* de protoescolices genotipado, nos permitirá aclarar el origen de estas discrepancias.

Por otra parte, en la región hacia el extremo 5' de *Eg2DBDα.1nt*, en donde no existe solapamiento con *Eg2DBDα.1ct*, encontramos que la secuencia *Eg2DBDα.1nt* presenta un cambio con respecto a *Eg2DBDα* (A106T), correspondiente a un cambio aminoacídico de serina por glicina en la posición 36 de la secuencia proteica (S36G). Esta modificación está localizada

en el dominio A/B N-terminal del receptor, el cual contiene la región de transactivación independiente de ligandos AF-1. Estudios de otros receptores nucleares han demostrado que el estado de fosforilación de residuos de serina específicos en la región AF-1 afecta la actividad transcripcional (Kato et al., 1995; Thomas et al., 2008). Incluso la actividad del receptor PPAR α , receptor estrechamente emparentado con Eg2DBD α .1, está modulada por la fosforilación de dos residuos de serina en la secuencia AF-1, los cuales deben ser fosforilados para activar el receptor (Juge-Aubry et al., 1999; Fujimoto et al., 2010). Hace décadas atrás se determinó que los primeros 44 aminoácidos de PPAR α eran necesarios para la transactivación máxima del receptor, y la región mínima esencial se delimitó entre los aminoácidos 15-44, encontrándose allí la secuencia de AF-1 (Hi et al., 1999). Si bien no está definida la secuencia de AF-1 en el receptor Eg2DBD α .1 ni en Eg2DBD α , la homología con el receptor PPAR α nos sugiere que el cambio S36G se podría localizar en la región AF-1, pudiendo llegar a ser un blanco de fosforilación en Eg2DBD α . La ausencia de la Ser36 en el receptor Eg2DBD α .1 con respecto a Eg2DBD α podría implicar diferencias en las modificaciones postraduccionales, generando actividades transcripcionales diferenciales.

Por último, cabe mencionar que obtuvimos el ADNc completo de *Eg2DBD α* y de *Eg2DBD α .1* (desde el codón de inicio al de terminación), confirmando la expresión de ambos receptores en el estadio larvario de PE de *E. granulosus s.l.*

7.2 Estructura cuaternaria de Eg2DBD α .1

Para estudiar la estructura cuaternaria del receptor Eg2DBD α .1 abordamos el estudio de la dimerización del LBD del receptor, dado que este dominio posee una fuerte interfaz de dimerización (Bourguet, Vivat, et al., 2000; Gampe et al., 2000) siendo ampliamente utilizado para investigar el modo de dimerización de los receptores nucleares (Bourguet, Vivat, et al., 2000; Gampe et al., 2000; Wu et al., 2007). Nos propusimos analizar su interacción como homodímero o como heterodímero con el LBD de EgRXR β , dado que RXR suele formar heterodímeros con otros receptores nucleares (Weikum et al., 2018).

En primer lugar, abordamos este estudio a través de ensayos de doble híbrido de levadura. Este sistema, tiene la ventaja de ser un método sensible que permite detectar interacciones proteicas relativamente débiles y transitorias, las cuales pueden no ser detectables bioquímicamente (Guarente, 1993; Estojak et al., 1995). Los controles positivos y negativos nos permitieron validar los resultados de los ensayos de doble híbrido de levadura realizados. Por un lado, un control positivo con proteínas cuya interacción es conocida, como son el antígeno T y p53 (B. Li & Fields, 1993; Iwabuchi et al., 1993) y por otro lado, un control negativo con proteínas que no

interaccionan como la lamina C y el antígeno T (Bartel et al., 1993; Ye & Worman, 1995). Además, tanto los ensayos realizados con los pares de vectores sin insertos, como las combinaciones de un vector sin inserto con un vector codificante para un NR (Eg2DBD α .1-LBD o EgRXR β -LBD), se comportaron según lo esperado, validando los resultados obtenidos por este ensayo. Estos últimos controles indican que la interacción entre las proteínas de fusión analizadas no es el resultado de interacciones inespecíficas entre los dominios de activación y de unión al ADN de GAL4, ni entre estos dominios y los receptores nucleares en estudio. Asimismo, nos permite confirmar que el reclutamiento de la ARN polimerasa para la expresión de los genes reporteros, se da exclusivamente cuando existe interacción entre las proteínas en estudio y no a través de los LBDs de los NRs analizados

Los experimentos de DHL nos permitieron evidenciar mediante un sistema *in vivo*, que Eg2DBD α .1 interacciona consigo mismo a través del LBD, y que Eg2DBD α .1-LBD no interacciona con EgRXR β -LBD. Cabe destacar que verificamos que todas las proteínas de fusión ensayadas se expresan correctamente en levaduras, por lo que la falta de interacción entre Eg2DBD α .1-LBD y EgRXR β -LBD no es debida a una deficiencia en la expresión de estos dominios en el sistema de DHL. La interacción del receptor nuclear Eg2DBD α .1 consigo mismo, sugiere la homodimerización del receptor. Resultados similares han sido obtenidos para el Sm2DBD α de *S. mansoni* (Wu et al., 2007). Este tipo de interacción clasifica al receptor Eg2DBD α .1 dentro del grupo de NR de tipo I o III, los cuales se caracterizan por formar homodímeros para llevar a cabo su función (Weikum et al., 2018).

Una característica interesante a destacar es que la homodimerización de Eg2DBD α .1-LBD ocurre sin la presencia de otros motivos del receptor que forman parte de una interfaz de dimerización más débil en otros receptores nucleares, como lo son la caja D y la caja A ubicadas en el DBD (Umesono & Evans, 1989; Hsieh et al., 1995), pero que no parecerían ser necesarios para la dimerización de Eg2DBD α .1. Las cajas D de Eg2DBD α .1 fueron descrita previamente, siendo identificadas como 212PSGGNC217 y como 295VGGKDN300 del primer y segundo DBD, respectivamente (Alvite et al., 2019).

La interacción de Eg2DBD α .1 consigo mismo formando homodímeros implica que cuatro dominios de unión al ADN podrían estar involucrados en el reconocimiento específico del ADN. Resultados obtenidos *in silico* por nuestro grupo de investigación, sugieren que la primer alfa-hélice del primer DBD contacta el surco mayor del ADN estableciendo interacciones con el elemento respuesta a través de su caja P, mientras que el segundo DBD contribuiría a la estabilización del complejo (Alvite et al., 2019). En ese sentido, el homodímero Eg2DBD α .1 podría reconocer el elemento respuesta del ADN a través del reconocimiento específico de la

caja P del DBDI de cada monómero, mientras que los dos DBDII del homodímero podrían participar de la estabilización del complejo formado.

Para verificar la interacción de Eg2DBD α .1-LBD consigo mismo realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación a partir de extractos proteicos de células HeLa que sobreexpresan las proteínas recombinantes c-Myc-Eg2DBD α -LBD y HA-Eg2DBD α -LBD. En una primera instancia, pusimos a punto las condiciones de transfección del cultivo y el tiempo post-transfección para obtener el máximo de expresión. Determinamos la concentración de lipofectamina óptima para estos ensayos a través de la expresión de la proteína EGFP y seguimiento de la evolución del cultivo por microscopía confocal (determinación cualitativa de la transfección). Si bien resultaba interesante determinar el porcentaje de transfección de forma cuantitativa, debido a que se mantuvieron las células en cultivo por largos períodos (hasta 36 horas), no fue posible utilizar marcadores de ADN fluorescentes con permeabilidad celular para visualizar la cromatina *in vivo* y determinar el número total de células. Marcadores de este tipo, como Hoechst, generan gran toxicidad si se mantienen en cultivo por tiempos prolongados ya que causan daño al ADN, particularmente durante su replicación, alterando el comportamiento de las células bajo observación (Durand & Olive, 1982; Purschke et al., 2010). Nuestros resultados indicaron que altas cantidades de lipofectamina generan un aumento de la muerte celular, resultados similares han sido reportados anteriormente (Fischer-Kierzkowska et al., 2011). A partir de este ensayo determinamos que la cantidad óptima de lipofectamina a utilizar era de 9 μ L por pocillo de 9,5 cm² en base a un balance entre la cantidad de células transfectadas y la muerte celular. Como parte de esta puesta a punto también determinamos el tiempo de cultivo post-transfección utilizando los plásmidos que expresan las proteínas de interés, a través de ensayos de inmunocitoquímica. De este modo obtuvimos de forma cuantitativa el porcentaje de células transfectadas para cada uno de los plásmidos utilizados, siendo este mayor para el plásmido que codifica para c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD que para el que codifica para HA-Eg2DBD α .1-LBD, en todos los intervalos de tiempo analizados. Asimismo, la intensidad de fluorescencia de las células transfectadas es mayor para Myc-Eg2DBD α .1-LBD que para HA-Eg2DBD α .1-LBD concordante con los resultados *Western Blot*. Dado que se utilizó el mismo plásmido para ambas construcciones y que además ambos constructos comparten más del 97 % de la secuencia nucleotídica, no creemos atribuible la diferencia en el porcentaje de transfección y en el nivel de expresión a diferencias en la tasa de transcripción o traducción de cada uno de los plásmidos. Estas diferencias entonces podrían ser consecuencia del método de detección, en donde los anticuerpos primarios o secundarios utilizados identifiquen con diferente afinidad a los epítomos respectivos y esto conlleve a la detección diferencial.

Por otro lado, a las 36 horas post-transfección se detecta una disminución notoria del número de células y sobre todo una disminución abrupta del porcentaje de células transfectadas, sugiriendo que la mayoría de las células que mueren correspondían a células que expresaban c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y HA-Eg2DBD α .1-LBD. Esto puede deberse a que la sobreexpresión de estas proteínas heterólogas genere toxicidad celular o un secuestro de la maquinaria traduccional desencadenando la muerte celular.

Asimismo, se evidenció que tanto HA-Eg2DBD α .1-LBD como c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD presentan una localización predominantemente citoplasmática. Recientemente, Alvite y colaboradores identificaron dos señales putativas de localización nuclear (NLS) para Eg2DBD α .1 (326KRX₂R329 y 419RRK421) ubicados en la región bisagra del receptor (Alvite et al., 2019). La ausencia de una señal NLS en el LBD (desde el residuo 431 hasta el 830), podría explicar porque Eg2DBD α .1-LBD no se encuentre a nivel nuclear ya que no podría translocarse al núcleo.

Los ensayos de inmunoprecipitación realizados a partir de los extractos proteicos mencionados, fueron exitosos ya que el anticuerpo anti-c-Myc fue capaz de unir e inmunoprecipitar a c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD. Sin embargo, no logramos observar la co-inmunoprecipitación de HA-Eg2DBD α .1-LBD producto de la interacción de ambos monómeros. En un principio pensamos que la ausencia de detección de HA-Eg2DBD α .1-LBD se debía a la baja sensibilidad de la técnica del revelado del *Western Blot* con BCIP/NBT como sustrato, no obstante la utilización de un método más sensible, como la quimioluminiscencia, no mejoró el resultado. Vale la pena recordar, que en los ensayos de WB del extracto proteico que contiene ambas proteínas, la banda proteica correspondiente a HA-Eg2DBD α .1-LBD es menos intensa que la de c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD. Para solucionar este problema, podríamos aumentar la sensibilidad del método expresando a Eg2DBD α .1-LBD fusionado a más de un *tag* HA y c-Myc respectivamente, ya que en este trabajo las proteínas se expresaron fusionadas solamente a uno. Esta estrategia ya ha sido utilizada exitosamente en ensayos similares (Lehtreck et al., 2009). De esta manera buscamos que el reconocimiento antígeno-anticuerpo, tanto en la inmunoprecipitación como en el *Western Blot*, sea mayor.

De todas formas, es importante notar que la dificultad en la detección de la homodimerización no se debe únicamente al método empleado, sino que también depende del tipo de interacción de las proteínas en estudio. La dimerización de un monómero consigo mismo fusionado a dos *tags* distintos, implica interacciones entre moléculas con un mismo *tag* (c-Myc- Eg2DBD α .1-LBD/c-Myc- Eg2DBD α .1-LBD o de HA-Eg2DBD α .1-LBD/HA-Eg2DBD α .1-LBD) que no son detectables por esta técnica. La cantidad de proteína interaccionando que podemos detectar

por co-inmunoprecipitación/WB no refleja la cantidad real de proteína que forma homodímeros en un momento dado.

En vista de los resultados obtenidos mediante los ensayos de co-inmunoprecipitación y las desventajas que presenta este método, realizamos un ensayo alternativo teniendo presente la hipótesis de que la interacción entre monómeros de Eg2DBD α .1-LBD podría ser débil perdiéndose proteína en los lavados de la inmunoprecipitación. Con esto en mente, realizamos entrecruzamientos químicos de las muestras de forma de estabilizar covalentemente los dímeros. Desafortunadamente, ninguno de los tres ensayos con agentes entrecruzantes, ni la inmunoprecipitación post-tratamiento, nos permitieron confirmar nuestra hipótesis. En particular, los agentes entrecruzantes BSOE y DMP no funcionaron debido a que no fue posible visualizar dímeros ni oligómeros de Tubulina (Kravitz et al., 1984). Dado que tanto la técnica de inmunoprecipitación como de entrecruzamiento químico, dependen de la expresión y plegamiento adecuado de las proteínas c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y HA-Eg2DBD α .1-LBD por un sistema heterólogo (células HeLa), podría estar ocurriendo un plegamiento diferencial en *Homo sapiens* con respecto a *E. granulosus s.l.*. Asimismo, podrían existir diferencias en el patrón de modificaciones post-traduccionales de estas proteínas entre estos dos organismos. Ambos escenarios podrían estar afectando las interacciones entre los monómeros a nivel de los LBDs. Nuestro grupo de investigación ha sugerido varios sitios consenso de modificaciones post-traduccionales en Eg2DBD α .1-LBD (Alvite et al., 2019), algunos de las cuales han sido descritos como fundamentales para la función/dimerización de otros NRs (Venteclef et al., 2010; Treuter & Venteclef, 2011). La adición de diferentes grupos químicos a los NRs (fosforilación, sumoilación, entre otros) puede regular la estabilidad del receptor, su localización intracelular y sus propiedades de unión al ADN, modulando así procesos de transducción de señales (McEwan, 2016).

En resumen, pensamos que las interacciones de Eg2DBD α .1-LBD consigo mismo podrían estar afectadas por un plegamiento proteico incorrecto o por un patrón de modificaciones post-traduccionales distinto al nativo.

Dado que los ensayos de doble híbrido de levadura demostraron con gran robustez y reproducibilidad la homodimerización de Eg2DBD α .1-LBD, decidimos utilizar otro método alternativo para confirmar esta interacción. A través de un sistema de traducción *in vitro* optimizado para obtener un alto nivel de proteínas con un plegamiento adecuado y modificaciones post-traduccionales expresamos las proteínas de fusión en estudio (c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y HA-Eg2DBD α .1-LBD). Mediante la inmunoprecipitación de los extractos que expresan c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD y HA-Eg2DBD α .1-LBD detectamos mediante WB la presencia

de HA-Eg2DBD α .1-LBD en el inmunoprecipitado con anti-c-Myc. Lamentablemente, no fue posible identificar mediante espectrometría de masa a los *tags* HA y c-Myc pero sí a Eg2DBD α .1-LBD. Esto probablemente se deba a que ambas proteínas de fusión poseen la región del LBD en común, siendo esta más representada que los *tags*. Si bien la banda detectada es tenue, este resultado junto con los resultados de DHL, nos permiten afirmar que Eg2DBD α .1 interactúa consigo mismo a través de su LBD. Probablemente la proteína HA-Eg2DBD α .1-LBD co-inmunoprecipitada se pueda detectar con mayor intensidad al utilizar mayor cantidad de los extractos de traducción en el ensayo de Co-IP. Incluso se podría repetir este ensayo utilizando mayor proporción del extracto HA-Eg2DBD α .1-LBD que del c-Myc-Eg2DBD α .1-LBD. Además, como se discutió previamente, la señal detectada en el WB sería más intensa si las proteínas en estudio se expresan fusionadas a más de un *tag*.

7.3 Dimerización dependiente de ligandos de Eg2DBD α .1

Una de las características que distingue a los receptores nucleares de otros factores de transcripción, es su dependencia de la unión de ligandos para ejercer su función de moduladores transcripcionales (Xu & Lambert, 2003). La unión del ligando induce cambios conformacionales en el receptor que favorecen su unión a secuencias específicas de ADN, regulando así su actividad (Y. Li et al., 2003; Nagy & Schwabe, 2004). La mayoría de los ligandos son moléculas lipofílicas como esteroides, retinoides y ácidos grasos (Evans & Mangelsdorf, 2014; Weikum et al., 2018).

Para abordar el estudio de posibles ligandos que se unan al receptor Eg2DBD α .1-LBD, realizamos ensayos de doble híbrido de levadura modificado. Este ensayo ha sido utilizado en varias oportunidades para estudiar la unión de ligandos a otros NRs (Lezzi et al., 2002; Oftedal et al., 2005; Förster et al., 2011). En este ensayo, de manera similar al ensayo tradicional de DHL, las levaduras dobles transformadas se incuban en presencia de ligandos potenciales. Como primera aproximación, nos preguntamos si moléculas pertenecientes al hospedero intermediario podrían unirse a Eg2DBD α .1-LBD induciendo su homodimerización, para encontrar esta respuesta realizamos estos ensayos con suero fetal bovino (SFB).

A partir de estos experimentos, hemos demostrado que la presencia de 5 % de SFB en el medio de cultivo aumenta más de 2 veces la actividad β -galactosidasa de levaduras que co-expresan Gal4-AD-Eg2DBD α .1-LBD y Gal4-DBD-Eg2DBD α .1-LBD. Además, la incubación del control positivo con SFB no alteró la actividad β -galactosidasa, indicando que el SFB induce de manera específica la interacción entre los monómeros del receptor en estudio. Este resultado indica que el suero del hospedero intermediario (bovino) contiene al menos un ligando que se uniría a

Eg2DBD α .1-LBD estimulando la interacción entre los monómeros. Esto sugiere dos escenarios posibles: 1) la unión del ligando al monómero de Eg2DBD α .1 genera cambios conformacionales en el receptor y estimula su dimerización; 2) la unión del ligando al dímero ya formado estabiliza la interacción entre los monómeros (Weikum et al., 2018). Hace décadas que se sabe que el suero del hospedero es necesario para la supervivencia de las larvas del parásito, ya que varios estudios han evidenciado que se requiere de la presencia de suero de mamíferos para que el cultivo de metacestodos de *Echinococcus spp.* sea exitoso (Rausch & Jentoft, 1957; Hemphill & Gottstein, 1995; Jura et al., 1996; Spiliotis et al., 2004, 2008). El requisito del suero en los medios de cultivo sugiere la ocurrencia de un diálogo molecular entre la larva metacestodo y el hospedero, donde este último proporciona señales moleculares que son utilizadas por el parásito para promover y regular el desarrollo del metacestodo (Brehm & Koziol, 2017).

El resultado obtenido en este trabajo que evidencia inducción de la homodimerización de Eg2DBD α .1-LBD por ligandos presentes en el SFB, podría indicar que este receptor nuclear participaría de este diálogo tan importante para el parásito. La identificación del/de los ligando/s específico/s de Eg2DBD α .1 del SFB nos permitirá acercarnos a la comprensión de la función biológica de este NR. Cabe mencionar que algunas proteínas del hospedero atraviesan las capas del quiste hidático, siendo una de ellas la seroalbúmina (Aziz et al., 2011) que es una proteína abundante del suero sanguíneo responsable del transporte de ácidos grasos por la sangre (Vusse, 2009). Este hecho resulta particularmente interesante dado que estudios *in silico* de anclaje molecular realizados por nuestro grupo mostraron que los ligandos preferenciales de Eg2DBD α .1 serían ácidos grasos, principalmente el ácido oleico y el ácido linoleico (artículo en revisión). Por otro lado, nuestro grupo de investigación también ha demostrado que las larvas tetratiridios de *Mesocestoides corti* (cestodo modelo) son capaces de incorporar análogos de ácidos grasos del medio de cultivo y éstos ser distribuidos a nivel celular y subcelular (Alvite et al., 2014). En este proceso de captura y transporte de ácidos grasos podrían participar las proteínas de unión de ligandos hidrofóbicos (HLBPs) y las proteínas de unión de ácidos grasos (FABPs) de platelmintos parásitos, siendo las HLBPs más asociadas a la captura y las FABPs al transporte intracelular (Alvite & Esteves, 2012). Estas proteínas son consideradas como moléculas claves para estos organismos ya que son incapaces de sintetizar ácidos grasos de novo (Meyer et al., 1966; Jacobsen & Fairbairn, 1967) y además, son proteínas de alta expresión en el estadio larvario de *Echinococcus spp.* (Tsai et al., 2013). Asimismo, nuestro grupo ha reportado la presencia de EgFABP1 de *E. granulosus s.l.* y de MvFABPa y MvFABPb de *M. corti*, en la fracción nuclear de las larvas respectivas, y ha descrito la co-localización de ambas MvFABPs con un análogo de ácido graso (incorporado del medio) en núcleos de células de tetratiridios (Alvite et

al., 2014; Alvite & Esteves, 2016). Además, la interacción FABP-NR ha sido descrito para algunos tipos de FABPs y receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR) de vertebrados, reportándose que las FABPs podrían llevar sus ligandos al núcleo y promover la activación de estos PPARs (Schroeder et al., 2008; Hostetler et al., 2009; Armstrong et al., 2014; Hughes et al., 2015). Cabe recordar que a través de la búsqueda de NRs tipo PPAR es que nuestro grupo clonó el receptor nuclear Eg2DBD α .1 (Alvite et al., 2019). Vale la pena resaltar que Eg2DBD α .1-LBD presentaría las mismas preferencias de ligandos que EgFABP1 (Alvite et al., 2001), teniendo más afinidad por ácidos grasos largos e insaturados.

En base a nuestros resultados y estudios previos nos planteamos una modelo en donde los ácidos grasos presentes en el suero del hospedero intermediario podrían ser transportados unidos a la seroalbúmina hasta el interior del quiste, y ser incorporados por los protoescólices. Una vez en las células larvarias, EgFABP1 podría transportar ácidos grasos de cadena larga e insaturados hacia el núcleo, e interaccionar con Eg2DBD α .1 para cederle el ligando. La unión del ligando estimularía la homodimerización de Eg2DBD α .1 y finalmente este receptor así activado se uniría a regiones específicas del ADN regulando la expresión de sus genes blanco.

8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El presente contribuyó con los primeros resultados para comenzar a dilucidar el mecanismo de acción de los receptores nucleares con dos dominios de unión al ADN de *Echinococcus granulosus sensu lato*, a través de la caracterización primaria de Eg2DBD α .1. En particular, abordamos el estudio de la estructura cuaternaria de Eg2DBD α .1 y de sus posibles ligandos.

En una primera instancia, pudimos concluir que el receptor Eg2DBD α .1 se expresa en el estadio larvario de protoesclóticos de *E. granulosus s.l.* a nivel del transcripto. El análisis de una región 5' del transcripto, así como del ADNc completo, nos permitió confirmar la delección de 66 nucleótidos que diferencia a Eg2DBD α .1 de Eg2DBD α (Alvite et al., 2019). Esta delección ubicada en la región LBD, afecta al LBP pudiendo implicar diferencias en la afinidad de unión a sus ligandos entre ambas isoformas que posiblemente conlleve a actividades transcripcionales diferenciales entre estos dos receptores nucleares. Planeamos en un futuro cercano amplificar el ADNc completo de Eg2DBD α .1, a partir de muestras distintas de ARN de PE con una ADN polimerasa de alta fidelidad, para poder resolver las discrepancias puntuales que surgieron del análisis de la estructura primaria.

Asimismo, determinamos que el receptor Eg2DBD α .1 es capaz de interactuar consigo mismo formando homodímeros a través del dominio de unión a ligandos, tanto en un sistema *in vitro* como *in vivo*. Esta forma de dimerización resulta interesante dado que involucra cuatro DBDs implicados en la unión al ADN. Estudios *in silico* realizados por nuestro equipo, determinaron que el primer DBD estaría implicado en el reconocimiento secuencia-específico, mientras que el segundo estaría contribuyendo a estabilizar el complejo NR-ADN. Para confirmar estos estudios bioinformáticos nos planteamos como perspectiva estudiar los posibles sitios de unión al ADN del receptor Eg2DBD α .1 *in vitro*. Abordaremos este análisis a través de un método sensible de ensayos de cambio de movilidad electroforética en gel (EMSA) con doble marcado fluorescente utilizando sondas de ADN marcadas con el fluoróforo Texas-red y los dominios proteicos DBD fusionados a GFP (Hellman & Fried, 2007; Dey et al., 2012; Campos-Ferraz et al., 2021). Planeamos evaluar la unión del DBDI, DBDII y DBDI-DBDII y oligonucleótidos conteniendo distintas combinaciones de elementos respuestas canónicos. De esta manera buscamos establecer si es necesario que ambos DBDs estén presentes para la unión del receptor y/o describir los sitios de unión de cada dominio.

Por otro lado, determinamos que la homodimerización de Eg2DBD α .1-LBD se ve inducida por la presencia de ligandos del suero del hospedero intermediario, en particular de bovinos. Cabe

destacar que la puesta a punto del ensayo de doble híbrido de levadura realizado en este trabajo, nos permitirá fácilmente intercambiar el ligando en estudio para identificar el o los ligando/s que se unen específicamente al receptor. Planeamos llevar a cabo estos ensayos en un futuro cercano para evaluar distintos ácidos grasos, comenzando con aquellos que la proteína une *in silico* con mayor afinidad como son el ácido oleico, linoleico y araquidónico (artículo en revisión). Asimismo, analizaremos la unión de otros ácidos grasos, como el ácido palmítico y el esteárico que son ácidos grasos saturados abundantes en el parásito (Smyth & McManus, 1989). Además nos interesa evaluar si el líquido hidático de quistes de *E. granulosus* s.l. es capaz de inducir la homodimerización de Eg2DBD α .1 de manera similar que el SFB. Las hormonas lipídicas testosterona, estradiol, progesterona y cortisona son descartadas para su análisis, debido a la baja energía de unión que presentó Eg2DBD α .1 por estos ligando cuando fueron evaluados *in silico*. De igual manera, sería interesante analizar la unión del receptor Eg2DBD α a ácidos grasos para evaluar si la región adicional de 22 aminoácidos presente en el LBD de este receptor afecta la unión del ligando. Por último, también nos proponemos determinar si se requiere la región LBD completa para la homodimerización dependiente de ligando, llevando a cabo el mismo tipo de ensayo pero utilizando construcciones con el LBD trunco, las cuales ya han sido generadas.

Como perspectiva también nos proponemos analizar la localización tisular y celular de Eg2DBD α .1 y de los otros Eg2DBD-NRs (α , β y γ), tanto a nivel de los transcriptos como de proteínas. Pensamos llevar a cabo hibridaciones *in situ* con sondas específicas y marcadores específicos de diferentes tejidos y tipos celulares, para determinar cuáles células y tejidos de PE expresan estos transcriptos. Asimismo, planeamos evaluar la expresión y localización de los cuatro Eg2DBDs a nivel proteico mediante inmunomicroscopía de fluorescencia, siendo un desafío poder discriminar entre Eg2DBD α .1 y Eg2DBD α debido a su alta similitud. Buscamos así poder encontrar patrones de expresión diferenciales de los distintos Eg2DBDs.

La investigación de nuestro grupo de investigación se ha centrado en el estudio de la estructura y función de las FABPs de cestodos. Estudios previos han demostrado que algunas FABPs de vertebrados podrían llevar sus ligandos al núcleo y ser cedidos a distintos PPARs promoviendo así su activación (Hughes et al., 2015). Dado la similitud de los receptores tipo PPAR con Eg2DBD α .1 (Alvite et al., 2019), la localización nuclear EgFABP1 en células de PEs (Alvite & Esteves, 2016) y que EgFABP1 y Eg2DBD α .1 poseen alta afinidad por el mismo tipo de ligando, nos planteamos la hipótesis de que EgFABP1 podría cederle el ligando a Eg2DBD α .1, en el citoplasma si Eg2DBD α .1 es un NR tipo I o en el núcleo si es un NR tipo III (Weikum et al., 2018), regulando así su actividad de modulador transcripcional (Figura 8.1). Para comenzar a abordar

esta hipótesis es que nos planteamos analizar a futuro la posible interacción entre EgFABP1 y Eg2DBD α .1-LBD a través de ensayos de doble híbrido de levadura, en los cuales hemos obtenido una gran experiencia a partir de este trabajo de maestría.

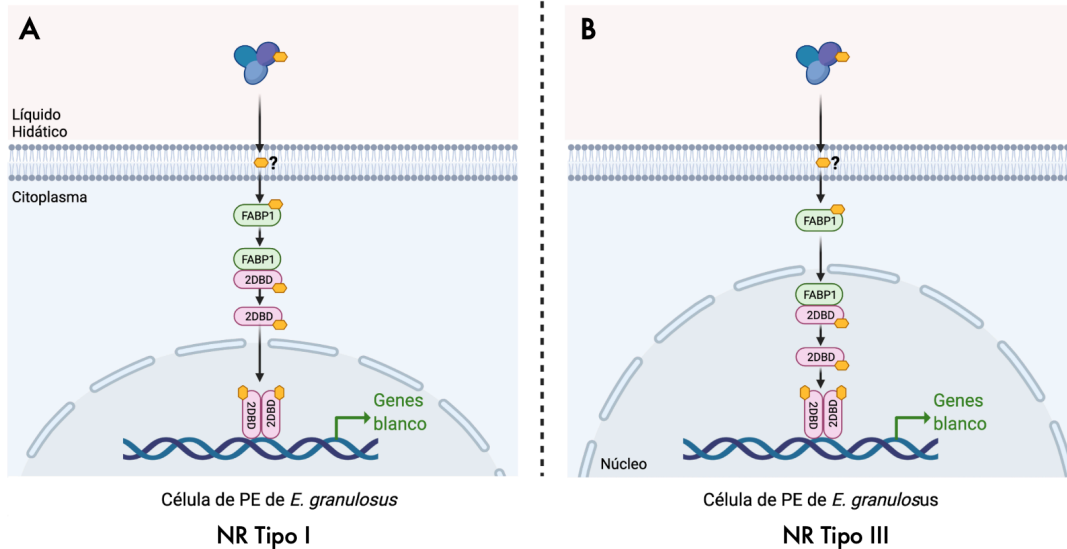


Figura 8.1. Modelo propuesto del mecanismo de acción de Eg2DBD α .1.

Los ácidos grasos presentes en el suero del hospedero intermediario podrían ser transportados unidos a la seroalbúmina hasta el interior del quiste y ser incorporados por los protoesclóces. Una vez en las células del protoesclóces, EgFABP1 podría transportar ácidos grasos de cadena larga e insaturados e interactuar con Eg2DBD α .1 para cederle el ligando. **(A)** EgFABP1 le cede el ligando a Eg2DBD α .1 en el citoplasma y este último se transloca al núcleo (NR tipo I). **(B)** EgFABP1 se transloca al núcleo y una vez allí le cede el ligando a Eg2DBD α .1 (NR tipo III). La unión del ligando estimularía la homodimerización de Eg2DBD α .1 y finalmente este receptor regularía la expresión de los genes blanco.

De esta manera queremos aproximarnos a la respuesta de la gran pregunta que interroga las posibles funciones biológicas de Eg2DBD α .1, comenzando a descifrar la vía regulatoria donde interviene. Eg2DBD α .1 podría ser considerado como un nuevo candidato a blanco de drogas para combatir la equinocosis quística, dado que los receptores nucleares 2DBD no han sido identificados en vertebrados y además los NRs han sido ampliamente utilizados como dianas de fármacos contra varias enfermedades (Fischer & Smieško, 2020). También sería posible elegir como blanco los reguladores corriente arriba o los efectores corriente abajo de Eg2DBD α .1, una vez que la vía haya sido completamente elucidada (Wang et al., 2017).

9. BIBLIOGRAFÍA

- Aggarwal, P., & Bhavesh, N. S. (2021). Hinge like domain motion facilitates human RBMS1 protein binding to proto-oncogene c-myc promoter. *Nucleic Acids Research*, *49*(10), 5943–5955. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab363>
- 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., Garrido, N., Kun, A., Paulino, M., & Esteves, A. (2014). Towards an Understanding of Mesocestoides vogae Fatty Acid Binding Proteins' Roles. *PLoS ONE*, *9*(10), e111204. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111204>
- Alvite, G., Pietro, S. M. D., Santomé, J. A., Ehrlich, R., & Esteves, A. (2001). Binding properties of Echinococcus granulosus fatty acid binding protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1533*(3), 293–302. [https://doi.org/10.1016/s1388-1981\(01\)00164-0](https://doi.org/10.1016/s1388-1981(01)00164-0)
- 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>
- Anbalagan, M., Huderson, B., Murphy, L., & Rowan, B. G. (2012). Post-Translational Modifications of Nuclear Receptors and Human Disease. *Nuclear Receptor Signaling*, *10*(1), nrs.10001. <https://doi.org/10.1621/nrs.10001>
- Armstrong, E. H., Goswami, D., Griffin, P. R., Noy, N., & Ortlund, E. A. (2014). Structural Basis for Ligand Regulation of the Fatty Acid-binding Protein 5, Peroxisome Proliferator-activated Receptor β/δ (FABP5-PPAR β/δ) Signaling Pathway*. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(21), 14941–14954. <https://doi.org/10.1074/jbc.m113.514646>

- Aziz, A., Zhang, W., Li, J., Loukas, A., McManus, D. P., & Mulvenna, J. (2011). Proteomic characterisation of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid from sheep, cattle and humans. *Journal of Proteomics*, *74*(9), 1560–1572.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.02.021>
- Bain, D. L., Heneghan, A. F., Connaghan-Jones, K. D., & Miura, M. T. (2007). Nuclear Receptor Structure: Implications for Function. *Physiology*, *69*(1), 201–220.
<https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.031905.160308>
- Barettino, D., Ruiz, M. M. V., & Stunnenberg, H. G. (1994). Characterization of the ligand-dependent transactivation domain of thyroid hormone receptor. *The EMBO Journal*, *13*(13), 3039–3049. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06603.x>
- Bartel, P., Chien, C. T., Sternglanz, R., & Fields, S. (1993). Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *BioTechniques*, *14*(6), 920–924.
- Benoit, G., Cooney, A., Giguere, V., Ingraham, H., Lazar, M., Muscat, G., Perlmann, T., Renaud, J.-P., Schwabe, J., Sladek, F., Tsai, M.-J., & Laudet, V. (2006). International Union of Pharmacology. LXVI. Orphan Nuclear Receptors. *Pharmacological Reviews*, *58*(4), 798–836.
<https://doi.org/10.1124/pr.58.4.10>
- Bertrand, S., Brunet, F. G., Escriva, H., Parmentier, G., Laudet, V., & Robinson-Rechavi, M. (2004). Evolutionary Genomics of Nuclear Receptors: From Twenty-Five Ancestral Genes to Derived Endocrine Systems. *Molecular Biology and Evolution*, *21*(10), 1923–1937.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msh200>
- Bingham, G. M., Larrieu, E., Uchiumi, L., Mercapide, C., Mujica, G., Carpio, M. D., Hererro, E., Salvitti, J. C., Norby, B., & Budke, C. M. (2016). The Economic Impact of Cystic *Echinococcosis* in Rio Negro Province, Argentina. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *94*(3), 615–625. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0304>
- Bourguet, W., Germain, P., & Gronemeyer, H. (2000). Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends in Pharmacological Sciences*, *21*(10), 381–388.
[https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(00\)01548-0](https://doi.org/10.1016/s0165-6147(00)01548-0)

- Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H., & Moras, D. (1995). Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- α . *Nature*, *375*(6530), 377–382. <https://doi.org/10.1038/375377a0>
- Bourguet, W., Vivat, V., Wurtz, J.-M., Chambon, P., Gronemeyer, H., & Moras, D. (2000). Crystal Structure of a Heterodimeric Complex of RAR and RXR Ligand-Binding Domains. *Molecular Cell*, *5*(2), 289–298. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80424-4](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80424-4)
- 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>
- Bridgham, J. T., Eick, G. N., Larroux, C., Deshpande, K., Harms, M. J., Gauthier, M. E. A., Ortlund, E. A., Degnan, B. M., & Thornton, J. W. (2010). Protein Evolution by Molecular Tinkering: Diversification of the Nuclear Receptor Superfamily from a Ligand-Dependent Ancestor. *PLoS Biology*, *8*(10), e1000497. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000497>
- Brunetti, E., Garcia, H. H., & Junghanss, T. (2011). Cystic Echinococcosis: Chronic, Complex, and Still Neglected. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *5*(7), e1146. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001146>
- Budke, C. M., Deplazes, P., & Torgerson, P. R. (2006). Global Socioeconomic Impact of Cystic Echinococcosis - Volume 12, Number 2—February 2006 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. *Emerging Infectious Diseases*, *12*(2), 296–303. <https://doi.org/10.3201/eid1202.050499>
- Bugge, T. H., Pohl, J., Lonnoy, O., & Stunnenberg, H. G. (1992). RXR alpha, a promiscuous partner of retinoic acid and thyroid hormone receptors. *The EMBO Journal*, *11*(4), 1409–1418.
- Busto-Bea, V., Andrés, J. B., & Álvarez, C. A. (2016). Hidatidosis hepática: todavía un problema. *Medicina Clínica*, *146*(8), 367–371. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2015.12.005>
- Campos-Ferraz, R. A., Lopes, A. L. G., Silva, J. A. F. da, Moreira, D. F. V., Ferreira, M. J. N., & Coimbra, S. V. de A. (2021). DNA–protein interaction studies: a historical and comparative analysis. *Plant Methods*, *17*(1), 82. <https://doi.org/10.1186/s13007-021-00780-z>

- Carmena, D., & Cardona, G. A. (2013). Canine echinococcosis: Global epidemiology and genotypic diversity. *Acta Tropica*, *128*(3), 441–460.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.08.002>
- Céraline, J., Cruchant, M. D., Erdmann, E., Erbs, P., Kurtz, J., Duclos, B., Jacqmin, D., Chopin, D., & Bergerat, J. (2004). Constitutive activation of the androgen receptor by a point mutation in the hinge region: A new mechanism for androgen-independent growth in prostate cancer. *International Journal of Cancer*, *108*(1), 152–157. <https://doi.org/10.1002/ijc.11404>
- Cheng, Y., Chen, J., Mukhtar, I., & Chen, J. (2021). Genome-Wide Characterization of the Nuclear Receptor Gene Family in *Macrostomum lignano* Imply Its Evolutionary Diversification. *Frontiers in Marine Science*, *8*, 653447.
<https://doi.org/10.3389/fmars.2021.653447>
- Cheng, Y.-Y., Tao, W.-J., Chen, J.-L., Sun, L.-N., Zhou, L.-Y., Song, Q., & Wang, D.-S. (2015). Genome-wide identification, evolution and expression analysis of nuclear receptor superfamily in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Gene*, *569*(1), 141–152.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.05.057>
- Chien, C. T., Bartel, P. L., Sternglanz, R., & Fields, S. (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *88*(21), 9578–9582.
<https://doi.org/10.1073/pnas.88.21.9578>
- Craig, P. S., Hegglin, D., Lightowers, M. W., Torgerson, P. R., & Wang, Q. (2017). Chapter Two Echinococcosis Control and Prevention. *Advances in Parasitology*, *96*, 55–158.
<https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.09.002>
- Danielsen, M. (2001). Bioinformatics of Nuclear Receptors. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *176*, 3–22. <https://doi.org/10.1385/1-59259-115-9:3>
- Deplazes, P., Rinaldi, L., Rojas, C. A. A., Torgerson, P. R., Harandi, M. F., Romig, T., Antolova, D., Schurer, J. M., Lahmar, S., Cringoli, G., Magambo, J., Thompson, R. C. A., & 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>

- Dey, B., Thukral, S., Krishnan, S., Chakrobarty, M., Gupta, S., Manghani, C., & Rani, V. (2012). DNA–protein interactions: methods for detection and analysis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 365(1–2), 279–299. <https://doi.org/10.1007/s11010-012-1269-z>
- Díaz, A., Casaravilla, C., Allen, J. E., Sim, R. B., & Ferreira, A. M. (2011). Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* II: immunology. *Trends in Parasitology*, 27(6), 264–273. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.01.008>
- Durand, R. E., & Olive, P. L. (1982). Cytotoxicity, Mutagenicity and DNA damage by Hoechst 33342. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 30(2), 111–116. <https://doi.org/10.1177/30.2.7061816>
- Durfee, T., Becherer, K., Chen, P. L., Yeh, S. H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W. H., & Elledge, S. J. (1993). The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes & Development*, 7(4), 555–569. <https://doi.org/10.1101/gad.7.4.555>
- Eckert, J., Gemmell, M. A., Meslin, F.-X., & Pawłowski, Z. S. (2001). WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern. *World Organisation for Animal Health*.
- Eckert, J., & Thompson, R. C. A. (2017). Historical Aspects of Echinococcosis. *Advances in Parasitology*, 95, 1–64. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.07.003>
- Escrivá, H., Laudet, V., & Robinson-Rechavi, M. (2003). Nuclear receptors are markers of animal genome evolution. *Journal of Structural and Functional Genomics*, 3(1–4), 177–184. <https://doi.org/10.1023/a:1022638706822>
- 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>

- Fischer, A., & Smieško, 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>
- Fiszler-Kierzkowska, A., Vydra, N., Wysocka-Wycisk, A., Kronekova, Z., Jarzab, M., Lisowska, K. M., & Krawczyk, Z. (2011). Liposome-based DNA carriers may induce cellular stress response and change gene expression pattern in transfected cells. *BMC Molecular Biology*, 12(1), 27. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-12-27>
- Fonseca, E., Machado, A. M., Vilas-Arrondo, N., Gomes-dos-Santos, A., Veríssimo, A., Esteves, P., Almeida, T., Themudo, G., Ruivo, R., Pérez, M., Fonseca, R. da, Santos, M. M., Froufe, E., Román-Marcote, E., Venkatesh, B., & Castro, L. F. C. (2020). Cartilaginous fishes offer unique insights into the evolution of the nuclear receptor gene repertoire in gnathostomes. *General and Comparative Endocrinology*, 295, 113527.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113527>
- Förster, S., Günthel, D., Kiss, F., & Brehm, K. (2011). Molecular characterisation of a serum-responsive, DAF-12-like nuclear hormone receptor of the fox-tapeworm *Echinococcus multilocularis*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(6), 1630–1642.
<https://doi.org/10.1002/jcb.23073>
- Fujimoto, Y., Shiraki, T., Horiuchi, Y., Waku, T., Shigenaga, A., Otaka, A., Ikura, T., Igarashi, K., Aimoto, S., Tate, S., & Morikawa, K. (2010). Proline cis/trans-Isomerase Pin1 Regulates Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Activity through the Direct Binding to the Activation Function-1 Domain*. *Journal of Biological Chemistry*, 285(5), 3126–3132.
<https://doi.org/10.1074/jbc.m109.055095>
- Gampe, R. T., Montana, V. G., Lambert, M. H., Miller, A. B., Bledsoe, R. K., Milburn, M. V., Kliewer, S. A., Willson, T. M., & Xu, H. E. (2000). Asymmetry in the PPAR γ /RXR α Crystal Structure Reveals the Molecular Basis of Heterodimerization among Nuclear Receptors. *Molecular Cell*, 5(3), 545–555. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80448-7](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80448-7)
- 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>

- Gronemeyer, H., & Moras, D. (1995). How to finger DNA. *Nature*, *375*(6528), 190–191.
<https://doi.org/10.1038/375190a0>
- Guarente, L. (1993). Strategies for the identification of interacting proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *90*(5), 1639–1641. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.5.1639>
- Gustafsson, J.-A. (2016). Historical overview of nuclear receptors. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *157*, 3–6.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.03.004>
- Haelens, A., Tanner, T., Denayer, S., Callewaert, L., & Claessens, F. (2007). The Hinge Region Regulates DNA Binding, Nuclear Translocation, and Transactivation of the Androgen Receptor. *Cancer Research*, *67*(9), 4514–4523. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-06-1701>
- Hard, T., Kellenbach, E., Boelens, R., Maler, B., Dahlman, K., Freedman, L., Carlstedt-Duke, J., Yamamoto, K., Gustafsson, J., & Kaptein, R. (1990). Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Science*, *249*(4965), 157–160.
<https://doi.org/10.1126/science.2115209>
- Hellman, L. M., & Fried, M. G. (2007). Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein–nucleic acid interactions. *Nature Protocols*, *2*(8), 1849–1861.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.249>
- Helsen, C., Kerkhofs, S., Clinckemalie, L., Spans, L., Laurent, M., Boonen, S., Vanderschueren, D., & Claessens, F. (2012). Structural basis for nuclear hormone receptor DNA binding. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *348*(2), 411–417.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.07.025>
- Hemphill, A., & Gottstein, B. (1995). Immunology and morphology studies on the proliferation of in vitro cultivated *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Parasitology Research*, *81*(7), 605–614. <https://doi.org/10.1007/bf00932028>
- Hi, R., Osada, S., Yumoto, N., & Osumi, T. (1999). Characterization of the Amino-terminal Activation Domain of Peroxisome Proliferator-activated Receptor α IMPORTANCE OF α -HELICAL STRUCTURE IN THE TRANSACTIVATING FUNCTION*. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(49), 35152–35158. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.49.35152>

- Higuera, N. I. A., Brunetti, E., & McCloskey, C. (2016). Cystic Echinococcosis. *Journal of Clinical Microbiology*, *54*(3), 518–523. <https://doi.org/10.1128/jcm.02420-15>
- Hostetler, H. A., McIntosh, A. L., Atshaves, B. P., Storey, S. M., Payne, H. R., Kier, A. B., & Schroeder, F. (2009). L-FABP directly interacts with PPAR α in cultured primary hepatocytes. *Journal of Lipid Research*, *50*(8), 1663–1675. <https://doi.org/10.1194/jlr.m900058-jlr200>
- Hsieh, J. C., Jurutka, P. W., Selznick, S. H., Reeder, M. C., Haussler, C. A., Whitfield, G. K., & Haussler, M. R. (1995). The T-Box near the Zinc Fingers of the Human Vitamin D Receptor Is Required for Heterodimeric DNA Binding and Transactivation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *215*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2426>
- Hughes, M. L. R., Liu, B., Halls, M. L., Wagstaff, K. M., Patil, R., Velkov, T., Jans, D. A., Bunnett, N. W., Scanlon, M. J., & Porter, C. J. H. (2015). Fatty Acid-binding Proteins 1 and 2 Differentially Modulate the Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor α in a Ligand-selective Manner*. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(22), 13895–13906. <https://doi.org/10.1074/jbc.m114.605998>
- Irabedra, P., Ferreira, C., Sayes, J., Elola, S., Rodríguez, M., Morel, N., Segura, S., Santos, E. dos, & Guisantes, J. A. (2016). Control programme for cystic echinococcosis in Uruguay. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *111*(6), 372–377. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160070>
- Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P., & Fields, S. (1993). Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene*, *8*(6), 1693–1696.
- Jacobsen, N. S., & Fairbairn, D. (1967). Lipid metabolism in helminth parasites. 3. Biosynthesis and interconversion of fatty acids by *Hymenolepis diminuta* (Cestoda). *The Journal of Parasitology*, *53*(2), 355–361.
- James, P., Halladay, J., & Craig, E. A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, *144*(4), 1425–1436.
- Jensen, E. V. (1962). On the Mechanism of Estrogen Action. *Perspectives in Biology and Medicine*, *6*(1), 47–60. <https://doi.org/10.1353/pbm.1963.0005>

- Juge-Aubry, C. E., Hammar, E., Siegrist-Kaiser, C., Pernin, A., Takeshita, A., Chin, W. W., Burger, A. G., & Meier, C. A. (1999). Regulation of the Transcriptional Activity of the Peroxisome Proliferator-activated Receptor α by Phosphorylation of a Ligand-independent trans-Activating Domain*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(15), 10505–10510. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.15.10505>
- Jura, H., Bader, A., Hartmann, M., Maschek, H., & Frosch, M. (1996). Hepatic tissue culture model for study of host-parasite interactions in alveolar echinococcosis. *Infection and Immunity*, 64(9), 3484–3490.
- Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., Metzger, D., & Chambon, P. (1995). Activation of the Estrogen Receptor Through Phosphorylation by Mitogen-Activated Protein Kinase. *Science*, 270(5241), 1491–1494. <https://doi.org/10.1126/science.270.5241.1491>
- Khorasanizadeh, S., & Rastinejad, F. (2001). Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(6), 384–390. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(01\)01800-x](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(01)01800-x)
- Kliewer, S. A., Umesono, K., Noonan, D. J., Heyman, R. A., & Evans, R. M. (1992). Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature*, 358(6389), 771–774. <https://doi.org/10.1038/358771a0>
- Klockenbusch, C., & Kast, J. (2010). Optimization of Formaldehyde Cross-Linking for Protein Interaction Analysis of Non-Tagged Integrin β 1. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 927585. <https://doi.org/10.1155/2010/927585>
- Kravit, N. G., Regula, C. S., & Berlin, R. D. (1984). A reevaluation of the structure of purified tubulin in solution: evidence for the prevalence of oligomers over dimers at room temperature. *The Journal of Cell Biology*, 99(1), 188–198. <https://doi.org/10.1083/jcb.99.1.188>
- Kumar, R., & Thompson, E. B. (2003). Transactivation Functions of the N-Terminal Domains of Nuclear Hormone Receptors: Protein Folding and Coactivator Interactions. *Molecular Endocrinology*, 17(1), 1–10. <https://doi.org/10.1210/me.2002-0258>

- Kumar, V., Green, S., Staub, A., & Chambon, P. (1986). Localisation of the oestradiol-binding and putative DNA-binding domains of the human oestrogen receptor. *The EMBO Journal*, 5(9), 2231–2236. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04489.x>
- Larrieu, E., Gavidia, C. M., & Lightowers, 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, V. (1997). Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *Journal of Molecular Endocrinology*, 19(3), 207–226. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0190207>
- Laudet, Vincent, & Adelmant, G. (1995). Nuclear Receptors: Lonesome orphans. *Current Biology*, 5(2), 124–127. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(95\)00031-5](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(95)00031-5)
- Laudet, Vincent, Auwerx, J., Gustafsson, J., & Wahli., W. (1999). 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)
- Lechtreck, K., Luro, S., Awata, J., & Witman, G. B. (2009). HA-tagging of putative flagellar proteins in *Chlamydomonas reinhardtii* identifies a novel protein of intraflagellar transport complex B. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 66(8), 469–482. <https://doi.org/10.1002/cm.20369>
- Leid, M., Kastner, P., Lyons, R., Nakshatri, H., Saunders, M., Zacharewski, T., Chen, J.-Y., Staub, A., Garnier, J.-M., Mader, S., & Chambon, P. (1992). Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell*, 68(2), 377–395. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90478-u](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90478-u)
- Lezzi, M., Bergman, T., Henrich, V. C., Vögtli, M., Frömel, C., Grebe, M., Przibilla, S., & Spindler-Barth, M. (2002). Ligand-induced heterodimerization between the ligand binding domains of the *Drosophila* ecdysteroid receptor and ultraspiracle. *European Journal of Biochemistry*, 269(13), 3237–3245. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03001.x>
- Li, B., & Fields, S. (1993). Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *The FASEB Journal*, 7(10), 957–963. <https://doi.org/10.1096/fasebj.7.10.8344494>

- Li, Y., Lambert, M. H., & Xu, H. E. (2003). Activation of Nuclear Receptors A Perspective from Structural Genomics. *Structure*, *11*(7), 741–746. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(03\)00133-3](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(03)00133-3)
- Little, T. H., Zhang, Y., Matulis, C. K., Weck, J., Zhang, Z., Ramachandran, A., Mayo, K. E., & Radhakrishnan, I. (2006). Sequence-Specific Deoxyribonucleic Acid (DNA) Recognition by Steroidogenic Factor 1: A Helix at the Carboxy Terminus of the DNA Binding Domain Is Necessary for Complex Stability. *Molecular Endocrinology*, *20*(4), 831–843. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0384>
- Luisi, B. F., Xu, W. X., Otwinowski, Z., Freedman, L. P., Yamamoto, K. R., & Sigler, P. B. (1991). Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature*, *352*(6335), 497–505. <https://doi.org/10.1038/352497a0>
- Mangelsdorf, D. J., & Evans, R. M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*, *83*(6), 841–850. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90200-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90200-7)
- Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., & Evans, R. M. (1995). The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell*, *83*(6), 835–839. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90199-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90199-x)
- Marks, M. S., Hallenbeck, P. L., Nagata, T., Segars, J. H., Appella, E., Nikodem, V. M., & Ozato, K. (1992). H-2RIIBP (RXR beta) heterodimerization provides a mechanism for combinatorial diversity in the regulation of retinoic acid and thyroid hormone responsive genes. *The EMBO Journal*, *11*(4), 1419–1435.
- 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*. <https://doi.org/10.11131/2018/101320>
- McEwan, I. J. (2016). The Nuclear Receptor Superfamily, Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*, *1443*, 3–9. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3724-0_1
- Meyer, F., Kimura, S., & Mueller, J. F. (1966). Lipid Metabolism in the Larval and Adult Forms of the Tapeworm *Spirometra mansonioides*. *Journal of Biological Chemistry*, *241*(18), 4224–4232. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)99773-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)99773-5)

- Miller, J. H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor NY.
- Moras, D., & Gronemeyer, H. (1998). The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Current Opinion in Cell Biology*, 10(3), 384–391.
[https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(98\)80015-x](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(98)80015-x)
- Nagy, L., & Schwabe, J. W. R. (2004). Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(6), 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.04.006>
- Nakao, M., Lavikainen, A., Iwaki, T., Haukisalmi, V., Konyaev, S., Oku, Y., Okamoto, M., & Ito, A. (2013). Molecular phylogeny of the genus *Taenia* (Cestoda: Taeniidae): Proposals for the resurrection of *Hydatigera* Lamarck, 1816 and the creation of a new genus *Versteria*. *International Journal for Parasitology*, 43(6), 427–437.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.11.014>
- Nari, A., Eddi, C., Martins, J., & Benavides, E. (2003). *Resistencia a los antiparasitarios: Estado actual con énfasis en América Latina. Estudio FAO Producción y Sanidad Animal 157*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Novac, N., & Heinzl, T. (2004). Nuclear Receptors: Overview and Classification. *Current Drug Target -Inflammation & Allergy*, 3(4), 335–346.
<https://doi.org/10.2174/1568010042634541>
- Oftedal, B. E., Ladstein, S., TELLE, W., & Male, R. (2005). Ligand-Dependent Protein Interactions of the Estrogen Receptors Using the Yeast Two-Hybrid System. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1040(1), 420–425. <https://doi.org/10.1196/annals.1327.079>
- O'Malley, B. W., & Tsai, M.-J. (1992). Molecular Pathways of Steroid Receptor Action. *Biology of Reproduction*, 46(2), 163–167. <https://doi.org/10.1095/biolreprod46.2.163>
- OMS. (2020). *Informe Echinococosis Organización Mundial de la Salud*.
<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/echinococcosis>
- Otero-Abad, B., & Torgerson, P. R. (2013). A Systematic Review of the Epidemiology of Echinococcosis in Domestic and Wild Animals. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(6), e2249. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002249>

- Overington, J. P., Al-Lazikani, B., & Hopkins, A. L. (2006). How many drug targets are there? *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(12), 993–996. <https://doi.org/10.1038/nrd2199>
- Patel, S. R., & Skafar, D. F. (2015). Modulation of nuclear receptor activity by the F domain. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 418, 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 Pública*, 41, 1. <https://doi.org/10.26633/rpsp.2017.42>
- Pawlak, M., Lefebvre, P., & Staels, B. (2012). General Molecular Biology and Architecture of Nuclear Receptors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 12(6), 486–504. <https://doi.org/10.2174/156802612799436641>
- Pratt, W. B., Galigniana, M. D., Morishima, Y., & Murphy, P. J. M. (2004). Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays in Biochemistry*, 40, 41–58. <https://doi.org/10.1042/bse0400041>
- Prichard, R. (1994). Anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, 54(1–3), 259–268. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)90094-9](https://doi.org/10.1016/0304-4017(94)90094-9)
- Purschke, M., Rubio, N., Held, K. D., & Redmond, R. W. (2010). Phototoxicity of Hoechst 33342 in time-lapse fluorescence microscopy. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 9(12), 1634–1639. <https://doi.org/10.1039/c0pp00234h>
- Rausch, R., & Jentoft, V. L. (1957). Studies on the helminth fauna of Alaska. XXXI. Observations on the propagation of the larval *Echinococcus multilocularis* Leuckart, 1863, in vitro. *The Journal of Parasitology*, 43(1), 1–8.
- Riera, X. (2018). *Identificación y producción de un receptor nuclear perteneciente a una nueva subfamilia en Echinococcus granulosus*.

- Rojas, C. A. A., Romig, T., & Lightowers, M. W. (2014). *Echinococcus granulosus sensu lato* genotypes infecting humans – review of current knowledge. *International Journal for Parasitology*, 44(1), 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.08.008>
- Schroeder, F., Petrescu, A. D., Huang, H., Atshaves, B. P., McIntosh, A. L., Martin, G. G., Hostetler, H. A., Vespa, A., Landrock, D., Landrock, K. K., Payne, H. R., & Kier, A. B. (2008). Role of Fatty Acid Binding Proteins and Long Chain Fatty Acids in Modulating Nuclear Receptors and Gene Transcription. *Lipids*, 43(1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s11745-007-3111-z>
- Schwabe, J. W. R., Chapman, L., Finch, J. T., & Rhodes, D. (1993). The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: How receptors discriminate between their response elements. *Cell*, 75(3), 567–578. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90390-c](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90390-c)
- Sladek, F. M. (2011). What are nuclear receptor ligands? *Molecular and Cellular Endocrinology*, 334(1–2), 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.06.018>
- Smyth, J. D., & McManus, D. P. (1989). *The physiology and biochemistry of cestodes*. 53–76. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511525841.005>
- Spiliotis, M., Lechner, S., Tappe, D., Scheller, C., Krohne, G., & Brehm, K. (2008). Transient transfection of *Echinococcus multilocularis* primary cells and complete in vitro regeneration of metacestode vesicles. *International Journal for Parasitology*, 38(8–9), 1025–1039. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.11.002>
- Spiliotis, M., Tappe, D., Sesterhenn, L., & Brehm, K. (2004). Long-term in vitro cultivation of *Echinococcus multilocularis* metacestodes under axenic conditions. *Parasitology Research*, 92(5), 430–432. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-1046-8>
- Tata, J. R. (2002). Signalling through nuclear receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(9), 702–710. <https://doi.org/10.1038/nrm914>
- Tharp, M. E., Collins, J. J., & Newmark, P. A. (2014). A lophotrochozoan-specific nuclear hormone receptor is required for reproductive system development in the planarian. *Developmental Biology*, 396(1), 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.09.024>

- Thomas, R. S., Sarwar, N., Phoenix, F., Coombes, R. C., & Ali, S. (2008). Phosphorylation at serines 104 and 106 by Erk1/2 MAPK is important for estrogen receptor- α activity. *Journal of Molecular Endocrinology*, *40*(4), 173–184. <https://doi.org/10.1677/jme-07-0165>
- Thompson, R. C. Andrew. (2020). The Molecular Epidemiology of Echinococcus Infections. *Pathogens*, *9*(6), 453. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060453>
- 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>
- Treuter, E., & Venteclef, N. (2011). Transcriptional control of metabolic and inflammatory pathways by nuclear receptor SUMOylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1812*(8), 909–918. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.12.008>
- Tsai, I. J., Zarowiecki, M., Holroyd, N., Garcarrubio, A., Sanchez-Flores, A., Brooks, K. L., Tracey, A., Bobes, R. J., Fragoso, G., Sciutto, E., Aslett, M., Beasley, H., Bennett, H. M., Cai, J., Camicia, F., Clark, R., Cucher, M., Silva, N. D., Day, T. A., ... Berriman, M. (2013). The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature*, *496*(7443), 57–63. <https://doi.org/10.1038/nature12031>
- Umesono, K., & Evans, R. M. (1989). Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell*, *57*(7), 1139–1146. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90051-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90051-2)
- Venteclef, N., Jakobsson, T., Ehrlund, A., Damdimopoulos, A., Mikkonen, L., Ellis, E., Nilsson, L.-M., Parini, P., Jänne, O. A., Gustafsson, J.-Å., Steffensen, K. R., & Treuter, E. (2010). GPS2-dependent corepressor/SUMO pathways govern anti-inflammatory actions of LRH-1 and LXR β in the hepatic acute phase response. *Genes & Development*, *24*(4), 381–395. <https://doi.org/10.1101/gad.545110>
- Vuitton, D. A., McManus, D. P., Rogan, M. T., Romig, T., Gottstein, B., Naidich, A., Tuxun, T., Wen, H., Silva, A. M. da, Vuitton, D. A., Rogan, M. R., Avcioglu, A., Boufana, B., Budke, C., Casulli, A., Güven, E., Hillenbrand, A., Jalousian, F., Jemli, M. H., ... Manton, G. A. (2020). International consensus on terminology to be used in the field of echinococcoses. *Parasite*, *27*, 41. <https://doi.org/10.1051/parasite/2020024>

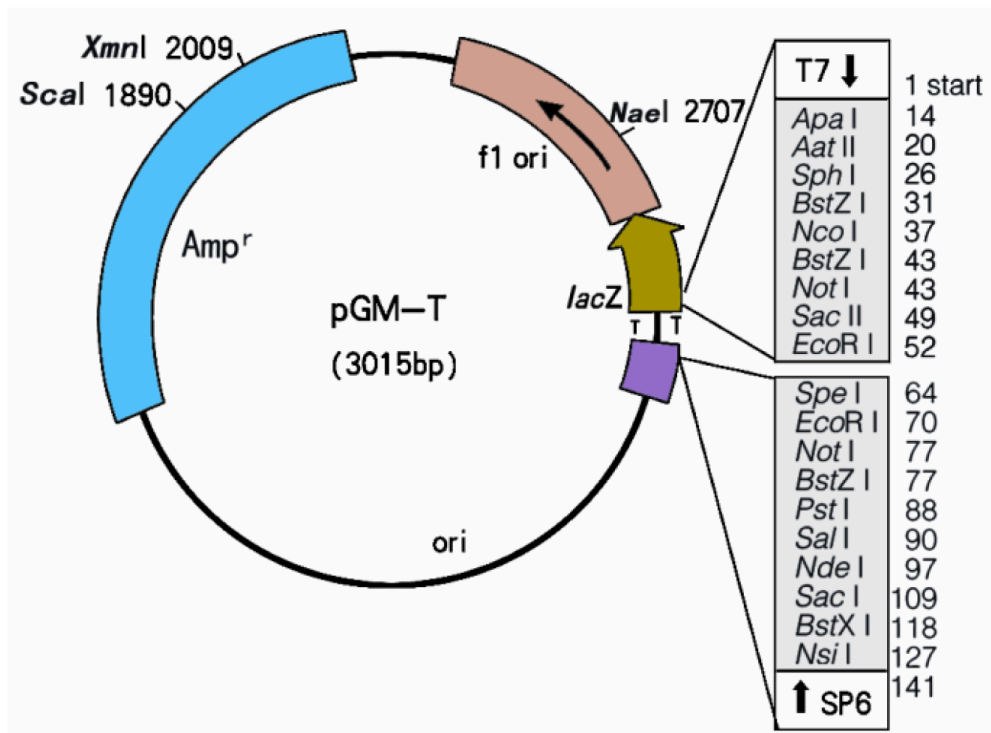
- Vusse, G. J. V. der. (2009). Albumin as Fatty Acid Transporter. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 24(4), 300–307. <https://doi.org/10.2133/dmpk.24.300>
- Wang, Z., Schaffer, N. E., Kliewer, S. A., & Mangelsdorf, D. J. (2017). Nuclear receptors: emerging drug targets for parasitic diseases. *Journal of Clinical Investigation*, 127(4), 1165–1171. <https://doi.org/10.1172/jci88890>
- Watson, L. C., Kuchenbecker, K. M., Schiller, B. J., Gross, J. D., Pufall, M. A., & Yamamoto, K. R. (2013). The glucocorticoid receptor dimer interface allosterically transmits sequence-specific DNA signals. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(7), 876–883. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2595>
- Weatherman, R. V., Fletterick, R. J., & Scanlan, T. S. (1999). Nuclear-Receptor Ligands and Ligand-Binding Domains. *Annual Review of Biochemistry*, 68(1), 559–581. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.559>
- Weikum, E. R., Liu, X., & Ortlund, E. A. (2018). The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. *Protein Science*, 27(11), 1876–1892. <https://doi.org/10.1002/pro.3496>
- Weikum, E. R., Tuntland, M. L., Murphy, M. N., & Ortlund, E. A. (2016). A Structural Investigation into Oct4 Regulation by Orphan Nuclear Receptors, Germ Cell Nuclear Factor (GCNF), and Liver Receptor Homolog-1 (LRH-1). *Journal of Molecular Biology*, 428(24), 4981–4992. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.10.025>
- 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., & LoVerde, P. T. (2021). Identification and evolution of nuclear receptors in Platyhelminths. *PLOS ONE*, 16(8), e0250750. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250750>
- Wu, W., Niles, E. G., El-Sayed, N., Berriman, M., & LoVerde, P. T. (2006). *Schistosoma mansoni* (Platyhelminthes, Trematoda) nuclear receptors: Sixteen new members and a novel subfamily. *Gene*, 366(2), 303–315. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.09.013>

- Wu, W., Niles, E. G., Hirai, H., & LoVerde, P. T. (2007). Evolution of a novel subfamily of nuclear receptors with members that each contain two DNA binding domains. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 27. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-27>
- Wurtz, J.-M., Bourguet, W., Renaud, J.-P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D., & Gronemeyer, H. (1996). A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nature Structural Biology*, 3(1), 87–94. <https://doi.org/10.1038/nsb0196-87>
- Xu, E. H., & Lambert, M. H. (2003). Structural insights into regulation of nuclear receptors by ligands. *Nuclear Receptor Signaling*, 1(1), e004. <https://doi.org/10.1621/nrs.01004>
- Yang, P.-J., Chen, E.-H., Song, Z.-H., He, W., Liu, S.-H., Dou, W., & Wang, J.-J. (2020). Molecular Characterization and Expression Profiling of Nuclear Receptor Gene Families in Oriental Fruit Fly, *Bactrocera Dorsalis* (Hendel). *Insects*, 11(2), 126. <https://doi.org/10.3390/insects11020126>
- Ye, Q., & Worman, H. J. (1995). Protein-Protein Interactions between Human Nuclear Lamins Expressed in Yeast. *Experimental Cell Research*, 219(1), 292–298. <https://doi.org/10.1006/excr.1995.1230>
- Yu, V. C., Delsert, C., Andersen, B., Holloway, J. M., Devary, O. V., Näär, A. M., Kim, S. Y., Boutin, J.-M., Glass, C. K., & Rosenfeld, M. G. (1991). RXR β : A coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements. *Cell*, 67(6), 1251–1266. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90301-e](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90301-e)
- Zhang, X., Lehmann, J., Hoffmann, B., Dawson, M. I., Cameron, J., Graupner, G., Hermann, T., Tran, P., & Pfahl, M. (1992). Homodimer formation of retinoid X receptor induced by 9-cis retinoic acid. *Nature*, 358(6387), 587–591. <https://doi.org/10.1038/358587a0>

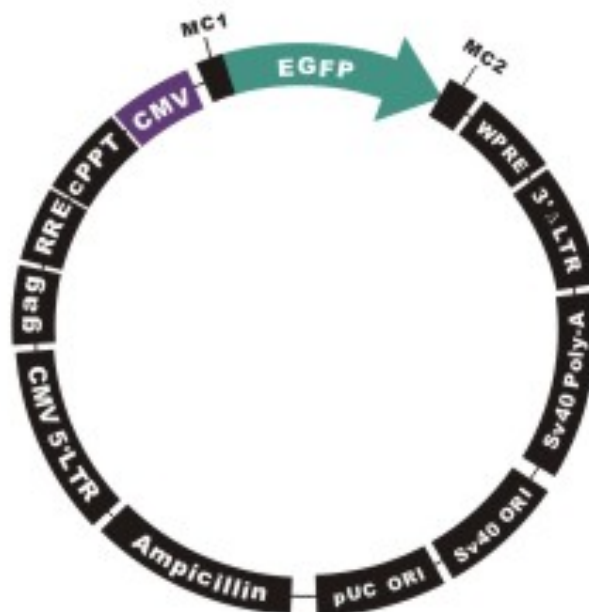
10. ANEXO

Anexo 10.1 Plásmidos

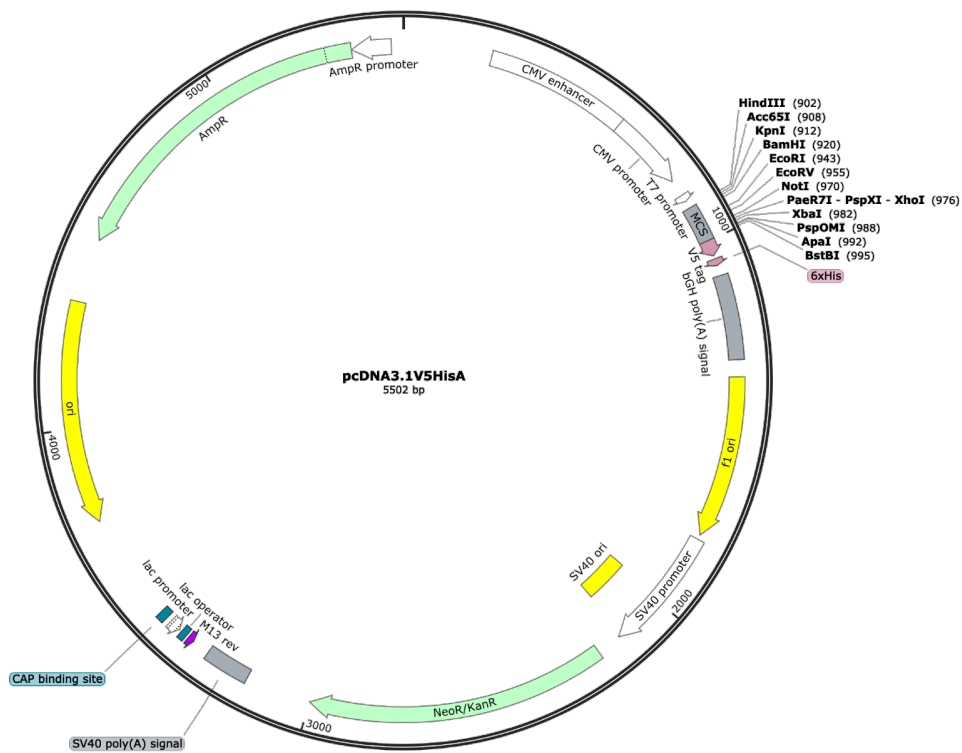
pGM-T



pEX-EGFP-Lv01



pcDNA3.1/V5-His A



Anexo 10.2 Medios de cultivo

Luria-Bertani – LB

1. Preparar para 1 L:
 - 10 g de peptona
 - 5 g de NaCl
 - 5 g de extracto de levadura
 - H₂O c.s.p. 1 L

Si se desea preparar medio sólido agregar:

- 15 g de agar
2. Autoclavar durante 20 minutos

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

Si se desea preparar medio sólido agregar:

- 20 g de agar

2. Autoclavar durante 15 minutos

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

SD/-Leu/-Trp/-His

1. Preparar para 1 L:

- 6,8 g de base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos (SD, Sigma)
- 20 g de glucosa
- 0,6 g de DO/-Leu/-Trp/-His/-Ade (Sigma)
- 15 mL de adenina hemisulfato 0,2% (Sigma)
- H₂O c.s.p. 1 L
- 20 g de agar

2. Autoclavar durante 15 minutos

SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade

1. Preparar para 1 L:

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

2. Autoclavar durante 15 minutos

Anexo 10.3 Cebadores universales

Nombre	Secuencia	T _m (° C)
T7-F	5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG - 3'	47,7
pAD-R	5' - AGA TGG TGC ACG ATG CAC AG - 3'	58,1
pBD-R	5' - TTT TCG TTT TAA AAC CTA AGA GTC -3'	48,7

Anexo 10.4 Genotipo de cepas de levadura

Cepa	Genotipo	Reportero	Marcador de transformación
AH109	<i>MATα, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, MEL1 GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i>	<i>HIS3, ADE2, lacZ, MEL1</i>	<i>trp1, leu2</i>
Y187	<i>MATα, ura3-52, his3-200, ade 2-101, trp 1-901, leu 2-3, 112, gal4Δ, met, gal80Δ, URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ, MEL1</i>	<i>lacZ, MEL1</i>	<i>trp1, leu2</i>

Anexo 10.5 Soluciones de ensayos de SDS-PAGE

Buffer Laemmli SDS

- 125 mM Tris-HCl pH 6,8
- 4 % SDS
- 20 % glicerol
- 10 % betamercapto etanol
- 0,02 % azul de bromofenol

Gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE)

Gel separador (8 % 5 mL):

- 1,33 mL Bis-acrilamida 30:08
- 2,17 H₂O
- 1,38 mL Buffer tris 1 M pH 8,8
- 75 μL SDS 10 %
- 3,75 μL TEMED
- 37,5 μL de persulfato de amonio

Gel concentrador (2,5 mL):

- 0,42 mL Bis-acrilamida 30:08
- 1,84 H₂O
- 0,23 mL *Buffer* tris 1 M pH 6,8
- 25 µL SDS 10 %
- 2,5 µL TEMED
- 12,5 µL de persulfato de amonio

***Buffer* de corrida para geles poliacrilamida**

Preparar para 1 L:

- 6 g tris
- 28,8 g glicina
- 1 g SDS
- H₂O c.s.p 1 L

Anexo 10.6 Soluciones de ensayos de *Western Blot*

***Buffer* de transferencia de proteínas**

- 25 mM Tris-HCl pH 8,3
- 187 mM glicina
- 20 %v/v etanol

TBS-T

1. Preparar para 500 mL:
 - 4 g de NaCl
 - 0,1 g de KCl
 - 15 g de Tris
 - 250 µL de Tween20
 - 400 mL de H₂O
2. Ajustar pH a 7,4 con HCl
3. Agregar H₂O hasta completar 500 mL

Solución de bloqueo

Preparar para 50 mL:

- 2,5 g de leche descremada
- 1 g de glicina
- TBS-T c.s.p. 50 mL

Anexo 10.7 Anticuerpos de ensayos de *Western Blot*

	Anticuerpos	Fabricante	Código	Origen	Caraterísticas
Primarios	α -HA	Thermo Fisher	71-5500	Conejo	Policlonal
	α -c-Myc	Thermo Fisher	13-2500	Ratón	Monoclonal
	α - β -Tubulina	Abcam	ab6046	Conejo	Policlonal
Secundarios	α -IgG de ratón	Sigma Aldrich	A3562	Cabra	Conjugado a fosfatasa alcalina
	α - IgG de conejo	Sigma Aldrich	A3687	Cabra	Conjugado a fosfatasa alcalina
	α -IgG de ratón	Invitrogen	A16072	Cabra	Conjugado a HRP
	α - IgG de conejo	Promega	W4011	Cabra	Conjugado a HRP

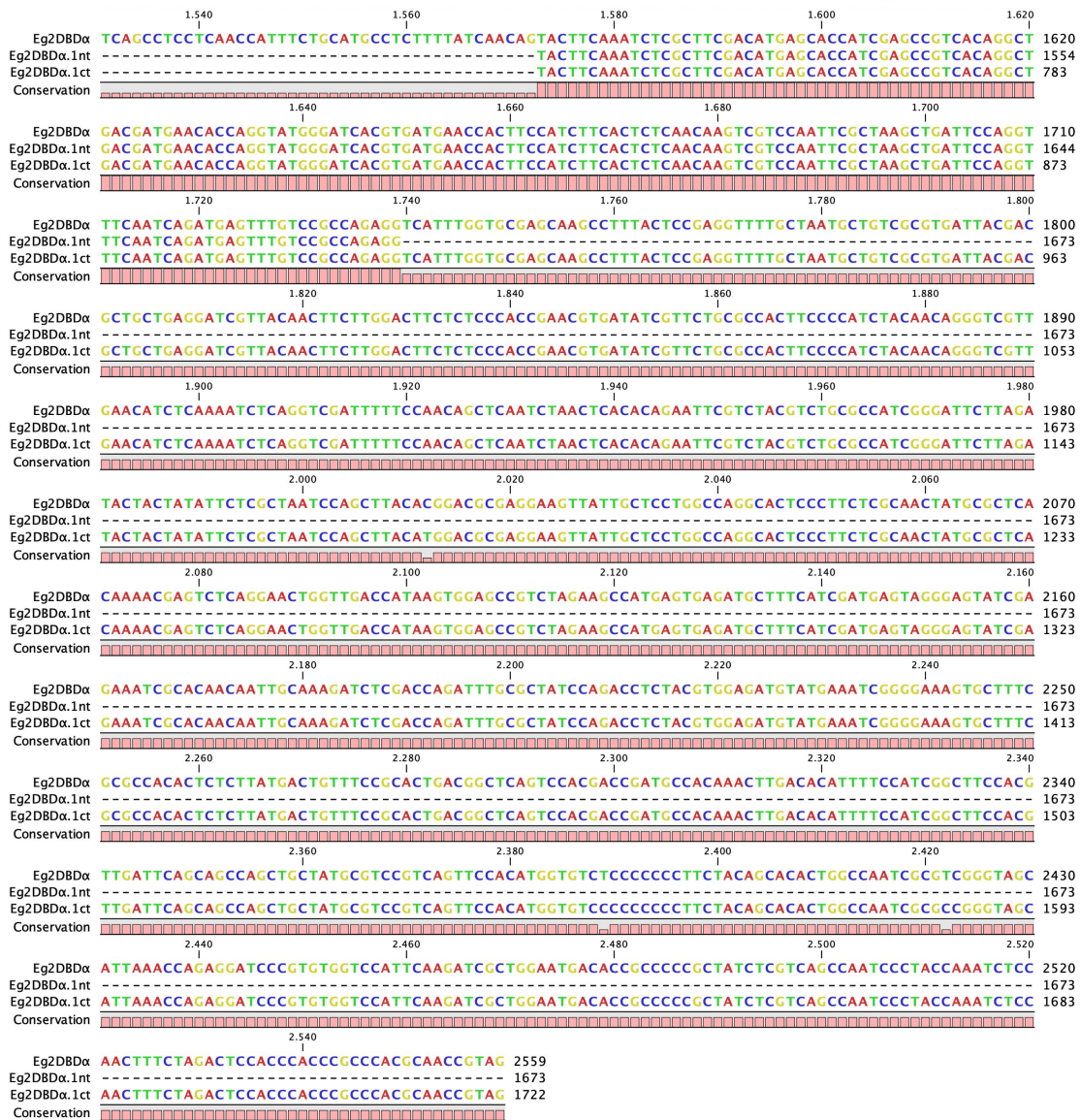
Anexo 10.8 Anticuerpos de ensayos de inmunocitoquímica

	Anticuerpos	Fabricante	Código	Origen	Caraterísticas
Primarios	α -HA	Thermo Fisher	71-5500	Conejo	Policlonal
	α -c-Myc	Thermo Fisher	13-2500	Ratón	Monoclonal
Secundarios	α -IgG de ratón	Invitrogen	A11029	Cabra	Conjugado a Alexa Fluor 488
	α - IgG de conejo	Invitrogen	A21429	Cabra	Conjugado a Alexa Fluor 555

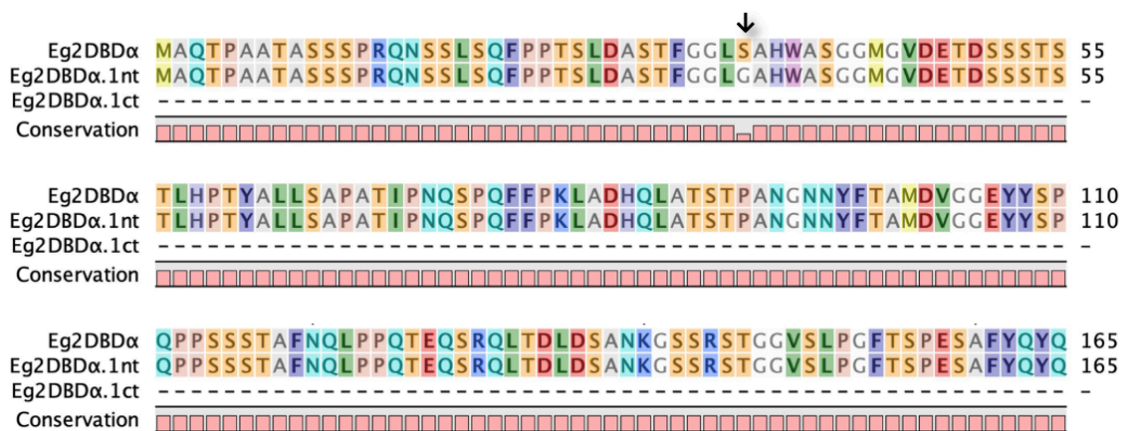
Anexo 10.9 Secuencias

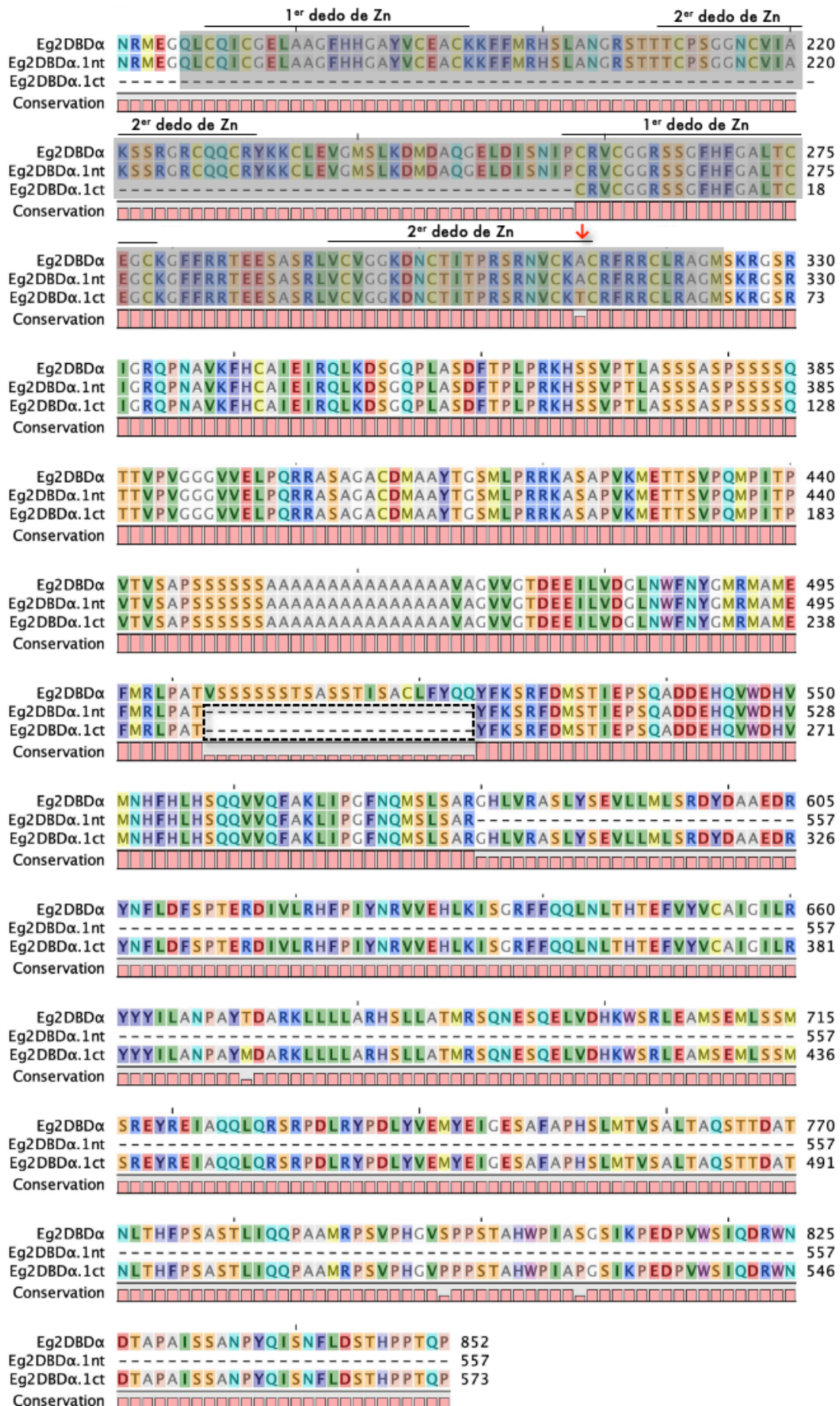
Alineamiento nucleotídico de las secuencias de *Eg2DBDα.1* con *Eg2DBDα*



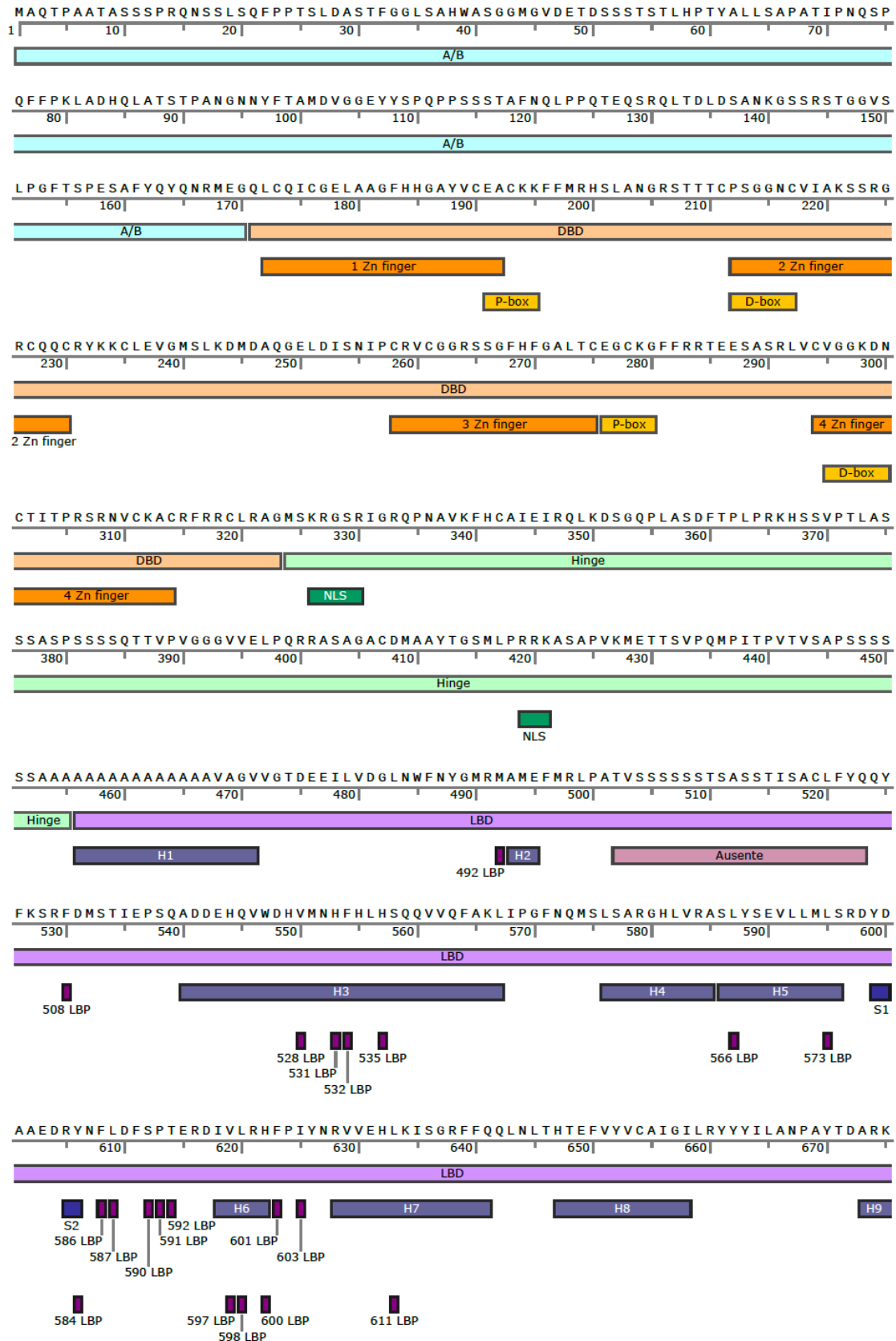


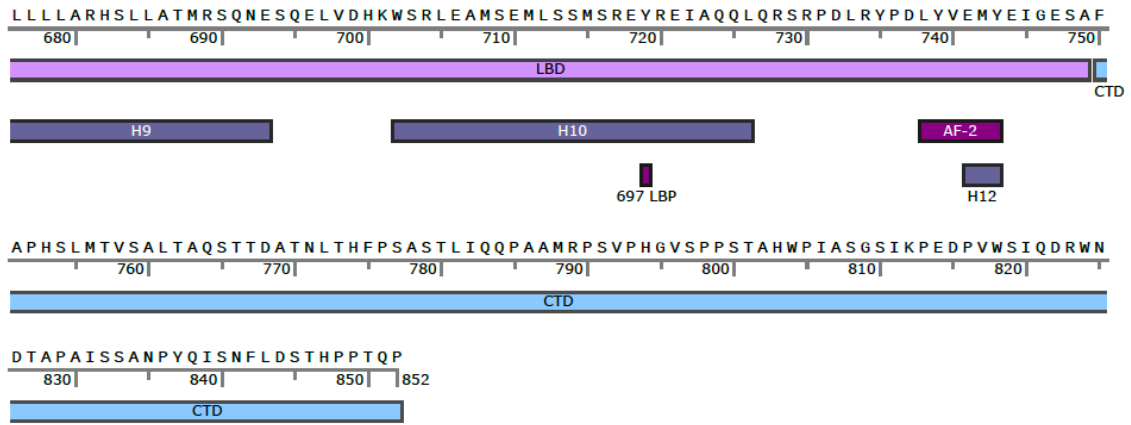
Alineamiento proteico de las secuencias de Eg2DBDα.1 con Eg2DBDα





Secuencia proteica anotada de Eg2DBD α





11. GLOSARIO

SIGLA	SIGNIFICADO
2DBD	Receptor nuclear con dos dominios de unión al ADN
ADNc	ADN copia
AF-1	Región de transactivación 1
AF-2	Región de transactivación 2
Caja D	Caja distal
Caja P	Caja proximal
Co-IP	Co-inmunoprecipitación
CTD	Dominio C-Terminal
CTE	Región C-terminal del dominio de unión al ADN
DBD	Dominio de unión al ADN
DHL	Doble híbrido de levadura
DHL_m	Doble híbrido de levadura modificado
EQ	Entrecruzamiento químico
FABP	Proteína de unión a ácidos grasos
HLBP	Proteína de unión a ligandos hidrofóbicos
HRE	Elemento de respuesta hormonal
LBD	Dominio de unión al ligando
LBP	Bolsillo de unión al ligando

SIGLA	SIGNIFICADO
NR(s)	Receptor(es) Nuclear(es)
NTD	Dominio N-Terminal
PE	Protoescólex
PFA	Paraformaldehído
PPAR	Receptor activado por proliferadores de peroxisomas
pPCR	Producto de amplificación de PCR
RXR	Receptor X retinoide
SD	Base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos (para medio de cultivo)
SFB	Suero fetal bovino
Tm	Temperatura de fusión
WB	Western Blot

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a Gabriela por haber dedicado su tiempo a mi formación, siempre con tan buena disposición. Gracias por ser un gran soporte tanto en lo académico como en lo personal. Por darme la oportunidad de crecer, permitiéndome probar ideas propias y equivocándome por mi cuenta, pero siempre estando cerca para ayudarme y enseñarme. Muchas gracias por tanta paciencia Gaby.

Me gustaría agradecer a Lucia Canclini, por los conocimientos brindados en la pasantía realizada en el Departamento de Genética del IIBCE, pero sobretodo me gustaría agradecerle por contagiarme su pasión y locura por la ciencia.

Agradecerle al Dr. Uriel Koziol, que además de aceptar ser parte del tribunal, nos brindó parte del material utilizado en esta tesis, así como también varios protocolos y tips que nos facilitaron el camino en algunos de los experimentos realizados.

Gracias al resto del tribunal, a las Dras. Estela Castillo y Verónica Fernández, por aceptar corregir esta tesis. Personalmente es un honor que científicos de su nivel lean mi trabajo.

Mis agradecimientos a toda la 304. A Adriana, por abrirme las puertas del laboratorio junto con Gabriela. Y especialmente a Ceci y a Mari por ser tan cómplices y tan chismosas como yo.

Gracias a toda la Sección Bioquímica, por el compañerismo que hay entre todos, por generar que el lugar de trabajo se sienta una casa, donde cada uno realmente aporta y construye. Pero especialmente quiero agradecer a mi *team* Bq 914. A Tania, por su nivel de energía tan grande que contagia y que hace que la mía se multiplique incluso cuando creo que no es posible. Y a Marcos, por hacer este camino a la par, compartiendo cursos, experimentos y congresos, por hacer disfrutable tanto el trabajo académico como el administrativo durante nuestro pasaje por Laboratorios Prácticos. A los dos muchas gracias por tantas risas.

Mi más profundo agradecimiento al laboratorio de genómica funcional. Especialmente a Juan Pablo y a Alfonso, primero que nada por permitirme ingresar a un excelente equipo de trabajo tanto a nivel académico como personal. Pero también agradecerles por alentarme y motivarme a que finalice mi maestría, por brindarme el tiempo y el espacio dentro de LGF, que fueron tan indispensables para culminar esta etapa. ¡De verdad muchas gracias!. Y sin dudas van mis agradecimientos también para mis compis: Mauri, Marco, Rosa y Bruno, gracias por su compañerismo y alegría diaria.

Y en cuanto a lo académico, no me puede faltar Eliana. Una de las personas que me acompaño desde el comienzo de este camino, orientándome y aconsejándome siempre de forma sabia, convirtiéndose en lo que yo llamo “mi madre académica”. Gracias por tanto cariño.

Agradecerle a toda mi familia. A mis padres, por alentarme, apoyarme y cuidarme siempre, sin dudas hicieron que este camino sea más fácil. A mi hermano, por sus charlas motivadoras y por sus consejos, y sobre todo agradecerle por su familia, por Ju y por Lolo que con su amor y alegría motivan los días.

Agradecerles a mis amigas y amigos de toda la vida, por ser mi cable a tierra y permitirme la desconexión del lado académico.

Y por último, pero sin duda uno de los más importantes, quiero agradecer a Martin. Por la paciencia que me tuvo a lo largo de este camino, por entender y aceptar el tiempo y dedicación que requiere la Ciencia. Agradecerle por ser la persona que me encuentro cuando llego a casa, que intenta darle luz a los días de frustración motivandome siempre a sacar lo mejor mi. Gracias por apoyarme y por alentarme, gracias por tu amor incondicional y tu paciencia inagotable.

FINANCIACIÓN

El presente trabajo de maestría fue enmarcado en un proyecto Fondo Clemente Estable financiado por Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) el cual brindó una beca que me permitió realizar este posgrado.

Agradecer a el Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) mediante alcúotas de estudiante y becas me permitieron financiar algunos de los reactivos utilizados en esta tesis, y mediante becas financiar parte de la pasantía realizada en el Departamento de Genética del IIBCE, así como también cursos y congresos en el exterior.