



Expresión y purificación de los dominios EF del receptor nuclear Eg2DBD β y aproximación al estudio de ligandos

Tesina de Grado, Licenciatura en Ciencias Biológicas.

Sofía Galareto

Orientadora: Dra. Gabriela Alvite

Sección Bioquímica
Facultad de Ciencias
Diciembre 2025

Agradecimientos

A Gabriela, por darme la posibilidad de realizar este trabajo con ella, por compartir conmigo sus conocimientos y experiencia. Por su acompañamiento incondicional, dedicación y paciencia. Por ser un pilar fundamental durante los últimos meses.

A los integrantes de la sección Bioquímica, por su buena predisposición y amabilidad.

A la Dra. Andrea Villarino, por su asesoramiento sobre la técnica de Rf-cloning.

Al Dr. Diego Valles, por su asesoramiento y consejos durante la purificación cromatográfica.

A mi familia y amigos, por el apoyo y la paciencia incondicional.

ÍNDICE

1. Resumen.....	3
2. Introducción.....	4
2.1. <i>Echinococcus granulosus</i> : clasificación y ciclo de vida.....	4
2.2. Echinococcosis quística.....	6
2.3. Receptores nucleares.....	8
2.3.2. Estructura de los receptores nucleares.....	11
2.3.3 Receptores nucleares con dos dominios de unión al ADN.....	12
3. Objetivos generales y específicos.....	14
4. Materiales y métodos.....	15
4.1. Clonado mediante RF-Cloning.....	15
4.1.1. Primera reacción de PCR.....	15
4.1.2. Segunda reacción de PCR.....	16
4.2 Transformación de pT7-Eg2DBDβ-EF y selección de clones recombinantes.....	17
4.3 Expresión de rEg2DBDβ-EF.....	18
4.3.1. Transformación en cepas optimizadas para la expresión.....	18
4.3.2. Ensayos de mini-expresión.....	19
4.4 Purificación mediante cromatografía de afinidad con metales inmovilizados.....	20
4.5. Estudios de unión en PAGE.....	21
5. Resultados.....	23
5.1. Clonado de Eg2DBDβ-EF en el vector pT7.....	23
5.2. Expresión de rEg2DBDβ-EF.....	27
5.3. Purificación mediante IMAC.....	30
5.4. Estudios de unión en PAGE nativo.....	31
6. Discusión.....	35
7. Conclusiones y perspectivas.....	39
8. Referencias.....	40
9. Anexo.....	46
9.1 Medios de cultivo.....	46
9.2 Soluciones amortiguadoras y otras.....	46
9.3 Programa AKTA:.....	46
9.4 Secuencias:.....	47

1. Resumen

La equinococosis quística (EQ), causada por la forma larvaria del complejo multiespecie *Echinococcus granulosus sensu lato* (platelminto cestodo), es una zoonosis mundial que causa grandes pérdidas económicas y continúa siendo clasificada por la OMS como una de las veinte enfermedades tropicales desatendidas. Los tratamientos no han sido muy efectivos debido a la baja eficacia de los mismos y al desarrollo paulatino de resistencia parasitaria, entre otras causas. Esta situación subraya la necesidad de encontrar nuevas estrategias terapéuticas que se dirijan a blancos específicos del parásito que sean vitales para su supervivencia. En este contexto, los receptores nucleares (NRs) de *E. granulosus s.l.* podrían ser candidatos prometedores. Los NRs son moduladores transcripcionales que regulan procesos como el metabolismo, desarrollo y reproducción en metazoos. La mayoría de estos NRs están regulados por ligandos lipofílicos pequeños, como los ácidos grasos (AG). Además, en los platelmintos parásitos los NRs serían particularmente relevantes, ya que estos organismos son incapaces de sintetizar AG *de novo*, siendo incorporados desde los hospederos, de forma que estas proteínas regulatorias podrían participar de una vía de señalización mediada por estos lípidos. Los Eg2DBDs son NRs que pertenecen a la subfamilia 2DBD (con dos dominios de unión al ADN), la cual no está presente en vertebrados, como los hospederos del parásito, lo que los convierte en blancos terapéuticos atractivos. Asimismo, los NRs de helmintos parásitos están siendo considerados como posibles blanco de drogas antihelmínticas, dado que estas moléculas desempeñan funciones claves en las redes transcripcionales del metabolismo y del desarrollo de estos organismos. Nuestro grupo de investigación identificó cuatro Eg2DBDs en *E. granulosus s.l.*: Eg2DBD α , Eg2DBD β , Eg2DBD γ y Eg2DBD $\alpha.1$, siendo esta última probablemente una isoforma de Eg2DBD α . Se ha determinado sus niveles de expresión en la forma larvaria de protoescólicas (PE), siendo Eg2DBD α y Eg2DBD β los de mayor expresión. Por otro lado, estudios bioinformáticos con Eg2DBD $\alpha.1$ mostraron que uniría con mayor afinidad a AG insaturados como los ácidos oleico y linoleico. Además, se ha determinado que dicha proteína homodimeriza y este proceso es estimulado por el suero del hospedero intermediario (bovino), sugiriendo un posible rol en la comunicación hospedero-parásito. En este marco, nuestro objetivo general se centra en contribuir al conocimiento del mecanismo de acción de Eg2DBD β de *Echinococcus granulosus s.l.*, mediante la determinación de su capacidad de unión de AG. En este trabajo nos planteamos expresar y purificar la región codificante para los dominios E y F (dominio de unión al ligando y C-terminal) de Eg2DBD β , y evaluar su capacidad de unión de un análogo de ácido graso fluorescente (BODIPY FL-C16) mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) nativo. Mediante este trabajo, se puso a punto una estrategia experimental para producir y purificar exitosamente a rEg2DBD β -EF a partir de *E. coli* Rosetta (DE3), con un alto rendimiento. Por otro lado, demostramos que rEg2DBD β -EF es capaz de unir un análogo de AG fluorescente mediante PAGE nativo, metodología que nos permitirá en un futuro realizar ensayos de desplazamiento o competición con AG no marcados. Este es un primer paso para poder avanzar en la identificación de los posibles ligandos e incluso de proteínas que interaccionan con Eg2DBD β , como podría ser la proteína de unión a ácidos grasos EgFABP1. De esta manera, se aportará al conocimiento de la función de Eg2DBD β y su rol potencial en la biología del parásito, contribuyendo a dilucidar una posible vía de transducción de señales mediada por AG del hospedero, donde podrían participar los Eg2DBDs y EgFABP1. Por otro lado, éstos y otros avances en esta línea podrán también sembrar las bases para el estudio de los Eg2DBDs como posibles candidatos terapéuticos.

2. Introducción

2.1. *Echinococcus granulosus*: clasificación y ciclo de vida

Echinococcus granulosus es un platelminto parásito perteneciente a la clase Cestoda y género *Echinococcus* (Thompson, 2017). Presenta cuerpo aplanado dorsoventralmente, simetría bilateral, ausencia de cavidad corporal (acelomado) y carencia de sistemas respiratorio y circulatorio. Además, se caracteriza por la ausencia total de aparato digestivo, compensada por un tegumento especializado en la absorción de nutrientes directamente desde el lumen intestinal del hospedador definitivo. El cuerpo del adulto está segmentado en proglótides, cada uno con estructuras reproductivas, y presenta un escólex en el extremo anterior adaptado para la fijación (ver Figura 1). Los individuos que pertenecen al orden Cyclophyllidea, se caracterizan por un escólex provisto de cuatro ventosas musculares y, algunos presentan un rostelo armado con una doble corona de ganchos quitinosos, que le permiten anclarse firmemente a la mucosa intestinal del hospedador.



Figura 1. Forma adulta del parásito *Echinococcus granulosus* s.l. Figura tomada de: <https://www.insst.es>

El género *Echinococcus* comprende actualmente diez especies reconocidas: *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* (Thompson, 2020). De estas, las seis primeras se integran dentro del denominado complejo multi-especie *E. granulosus sensu lato* (s.l.), el cual agrupa los organismos responsables de gran parte de la equinococosis de relevancia médica y veterinaria. En el marco de este complejo, los estudios de filogenia basados en secuencias mitocondriales (Cox1) han permitido identificar al menos ocho genotipos diferenciados: los genotipos G1–G3 corresponden a *E. granulosus* s.s., el genotipo G4 se asocia a *E. equinus*, el G5 a *E. ortleppi*, los genotipos G6 y G7 a *E. intermedius*, mientras que los genotipos G8 y G10 han sido descritos en *E. canadensis* (Vuitton et al., 2020) (ver Tabla 1).

La forma más ampliamente distribuida y de mayor importancia en salud pública es *Echinococcus granulosus sensu stricto* (s.s.), que incluye los genotipos G1 y G3 (Vuitton et al., 2020; Woolsey et Miller, 2021). El genotipo G1, denominado “cepa ovina”, mantiene un

ciclo doméstico perro–oveja altamente eficiente y es responsable de la mayoría de los casos humanos a nivel mundial. Generalmente cada genotipo está más adaptado a infectar un hospedero específico.

Echinococcus granulosus requiere de dos hospederos mamíferos para completar su ciclo biológico. La forma adulta, hermafrodita, se desarrolla habitualmente en el intestino delgado de cánidos, principalmente el perro. Desde allí, el parásito elimina los huevos al medio ambiente a través de las heces del hospedero. Estos huevos, de elevada resistencia, pueden persistir viables durante varios meses en el suelo, constituyendo la principal fuente de infección. La transmisión al hospedador intermediario —que incluye diversas especies como ovinos y bovinos— ocurre por la ingestión de huevos presentes en agua o alimentos contaminados, o bien mediante la ingestión accidental de material contaminado del ambiente. Una vez ingeridos, los huevos liberan la oncósfera, la cual atraviesa la mucosa intestinal y se disemina a través de los sistemas circulatorio y linfático, localizándose mayoritariamente en hígado y pulmones, aunque puede afectar otros órganos. En estos tejidos, la oncósfera se transforma en metacestodo, formando el quiste hidatídico, el cual crece progresivamente y produce protoescólices, la forma infectante para el hospedador definitivo. Los cánidos completan el ciclo al ingerir vísceras crudas de hospedadores intermediarios infectados. El ser humano actúa como hospedador accidental y se infecta por ingestión de huevos del parásito presentes en alimentos o agua contaminada, o por contacto estrecho con perros parasitados, ya sea a través de su pelo, saliva o heces, así como por vectores mecánicos como las moscas (ver Figura 2).

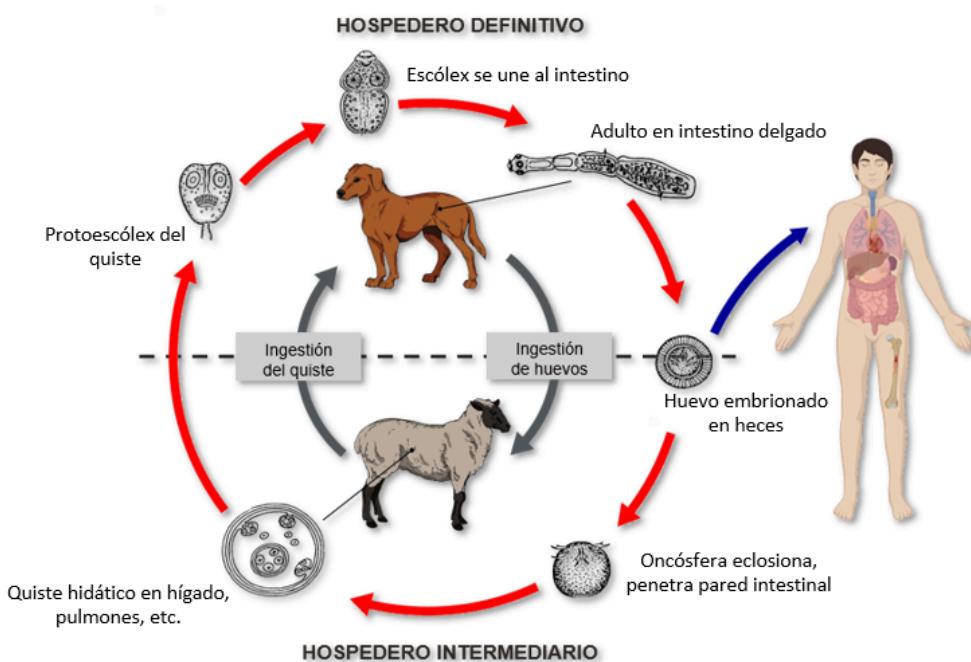


Figura 2. Ciclo de vida de *E. granulosus*. Figura adaptada de: <https://www.cdc.gov/dpdx>

Tabla 1. Características de las especies del complejo multiespecie *Echinococcus granulosus* s.l.. Tabla basada en: R.C.A Thompson 2020.

Especie	Genotipo	Hospedero intermediario más frecuente	Hospedero definitivo	Infección en humanos
<i>Echinococcus granulosus</i> s.s	G1	Oveja	Perro	Sí
<i>Echinococcus granulosus</i> s.s	G3	Bovinos	Perro	Sí
<i>Echinococcus equinus</i>	G4	Caballos y otros équidos	Perro	IND
<i>Echinococcus ortleppi</i>	G5	Bovinos	Perro	Sí
<i>Echinococcus canadensis</i>	G8, G10	Cérvidos	Lobos, perro	Sí
<i>Echinococcus intermedius</i>	G6, G7	Camélidos, cerdos, ovejas	Perro	Sí

2.2. Echinococcosis quística

La forma larvaria de *Echinococcus granulosus* s.l. es la causante de la Echinococcosis quística (EQ), una zoonosis mundial que representa un problema de salud y es considerada una de las veinte enfermedades tropicales desatendidas por la OMS (Woolsey et Miller, 2021; Tamarozzi et al., 2020; WHO, 2023). La EQ se caracteriza por la formación de quistes en órganos internos, siendo más comunes en hígado y pulmón. El quiste hidatídico está compuesto por una capa adventicia (tejido del hospedador) y un endoquiste de origen larvario, con una capa laminar acelular externa y una capa germinativa que forma vesículas prolígeras y protoescólicas (ver Figura 3). En humanos, la enfermedad a menudo es asintomática hasta que el quiste se rompe o alcanza un tamaño considerable que ejerce presión sobre los tejidos circundantes.

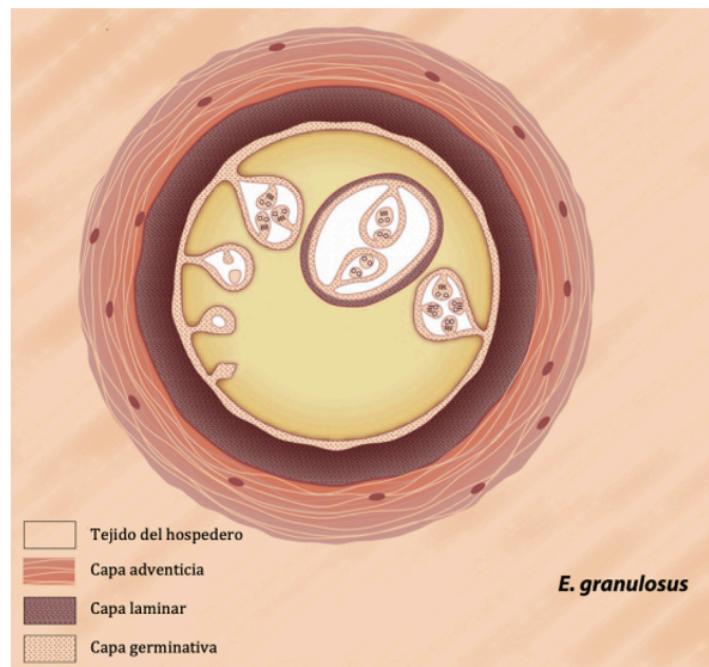


Figura 3. Quiste hidático de *E. granulosus* s.l.. Se representa el desarrollo de las vesículas que dan lugar a los protoescólicos. Figura adaptada de: Thompson et al. 2017.

Esta parasitosis es relevante en Uruguay, Argentina, Brasil, Chile y Perú, donde la cría de ovinos y bovinos, asociada al gran número de perros y la costumbre de alimentarlos con vísceras crudas, favorecen el mantenimiento del ciclo parasitario (Pavletic et al., 2017; Larrieu et al., 2019). Entre los años 2009 y 2014, se diagnosticaron en estos países un total de 29.559 casos de EQ en humanos, siendo de estos 20.785 correspondientes a Perú, 4959 de Chile, 3542 de Argentina, 179 de Uruguay y 94 de Brasil. Más de 9,5 millones de casos de EQ en ganado fueron reportados por los cinco países, siendo el ganado bovino responsable del 80% de los casos, ovino del 13% y porcino del 6% (Pavletic et al. 2017) (ver Figura 4).

Según la OMS, la EQ tiene una incidencia que fluctúa desde menos de 1/100.000 a más de 50/100.000 personas-año y una prevalencia del 5 al 10% en ciertas regiones endémicas, mientras que la prevalencia de EQ en el ganado sacrificado en las zonas hiperendémicas de América del Sur varía entre el 20 y el 95% (OMS, 2020; Hoga et al., 2024). No se encontraron registros actuales de esta zoonosis en Uruguay, pero un reporte que abarca el período 2019-2023 en Argentina indica que desde el año 2021 la tendencia fue ascendente, alcanzando en el año 2023 la tasa de incidencia más alta del periodo, y en algunas regiones del país la tasa de incidencia quinquenal llega a 41,6/100.000 personas-año (Piazza et cols., 2024). Cabe destacar que publicaciones recientes señalan que probablemente el número de pacientes con EQ está subestimado o no notificado a los sistemas de salud (Casulli et al., 2023; Hoga et al., 2024).

En términos de carga socioeconómica, se estima que la EQ sería responsable de US\$ 3000 millones/año en gastos, que incluye tanto costos de tratamiento humano como de producción ganadera (OMS, 2020). Si la enfermedad no se trata oportunamente puede

producir morbilidad, discapacidad y muerte. El tratamiento suele ser costoso y a veces requiere cirugía mayor y/o tratamiento farmacológico prolongado, inhabilitando a las personas para trabajar (Busto-Bea et al., 2016; Higuita et al., 2016; OMS, 2020). Los benzimidazoles son los antiparasitarios de elección, pero su eficacia en la resolución de quistes humanos es baja (30% o menos), con altas tasas de recaída (25% en tratamientos iniciales y 60% en re-tratamientos); además, presentan varias contraindicaciones y efectos secundarios (Busto-Bea et al., 2016). A su vez, el tratamiento con éstos y otros fármacos antihelmínticos, ampliamente utilizados en todo el mundo contra los helmintos de rumiantes y humanos (incluyendo *E. granulosus*), están dejando de ser efectivos debido al desarrollo paulatino de resistencia parasitaria a estas drogas (Nari et al., 2003; Wen et al., 2019; Wang et al., 2022). El control y la prevención de la EQ es un objetivo de la OMS desde la perspectiva de “Una Salud”, ya que esta parasitosis afecta no sólo a los animales y a los humanos, sino también a la cadena alimentaria y al ambiente, siendo considerada la segunda enfermedad parasitaria transmitida por alimentos más importante (Hogea et al., 2024). La ausencia de estrategias terapéuticas eficaces genera la necesidad de nuevas drogas dirigidas a blancos específicos del parásito y a la vez vitales para su supervivencia.

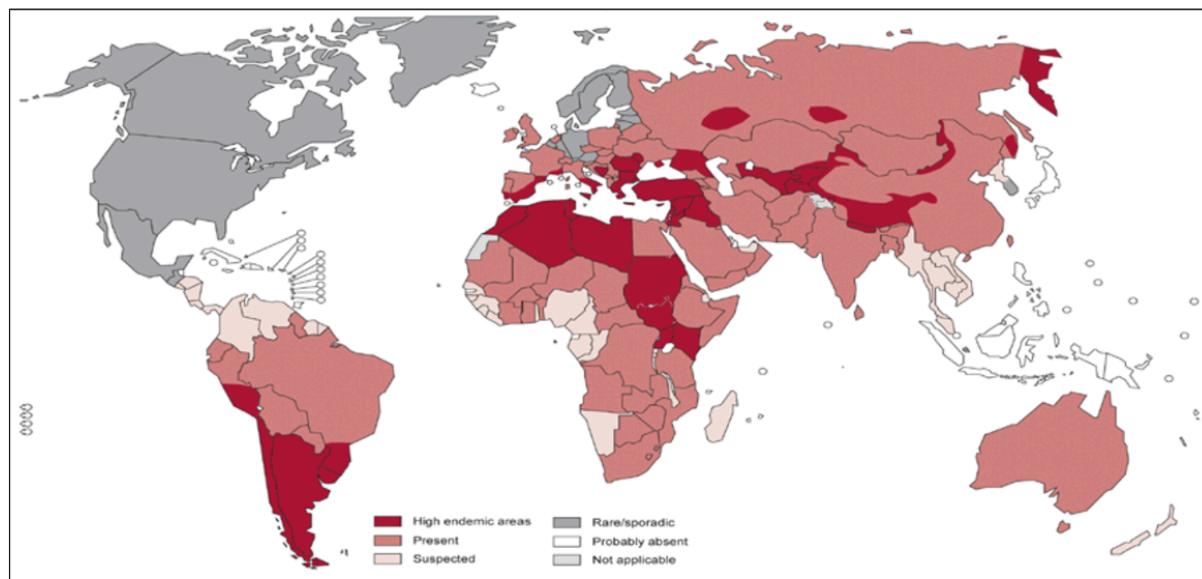


Figura 4. Distribución global de EQ (2011). Figura tomada y adaptada de: <http://www.who.int>

2.3. Receptores nucleares

Los receptores nucleares (NRs) pertenecen a una gran familia de factores de transcripción que son modulados principalmente por pequeñas moléculas lipofílicas capaces de penetrar fácilmente en las membranas biológicas. Entre éstas se incluyen ácidos grasos, esteroides, retinoides, etc.; pero también se han descrito receptores huérfanos para los cuales no se han identificados aún ligandos (Evans et Mangelsdorf, 2014; Weikum et al., 2018). Estas proteínas cumplen roles importantes en la modulación de diversos procesos biológicos en animales, tales como desarrollo, reproducción, homeostasis y metabolismo (Laudet y Gronemeyer, 2002; Evans, 2005). Los NRs pueden unirse a elementos respuesta de ADN específicos, actuando como moduladores de la transcripción de sus genes diana, generando así una conexión directa entre las señales celulares y las respuestas

transcripcionales de una célula (Novac & Heinzel, 2004). Por otro lado, este tipo de proteínas no se han identificado en plantas, hongos, ni eucariotas unicelulares, sin embargo, se encuentran en todos los grupos de metazoos, lo que indica que los NR probablemente surgieron en la base de los metazoarios (Escriva et. al. 2000; 2004).

Los receptores nucleares (NRs) se unen directamente al ADN como homodímeros, heterodímeros o monómeros. Sus dominios de unión al ADN (DBDs) reconocen distintos elementos de respuesta formados por repeticiones palindrómicas o directas, separadas por espaciadores de entre 0 y 5 nucleótidos (nt). La especificidad de esta interacción depende del espaciamiento entre hemi sitios, lo que puede modular los efectos transcripcionales (Evans y Mangelsdorf, 2014; Weikum et al., 2018). Además, proteínas correguladoras y cofactores endógenos pueden alterar la modalidad de unión al ADN, afectando la actividad del receptor (Issa et al., 2001; Lefebvre et al., 1998; Penvose et al., 2019). El heterodímero RAR/RXR es un ejemplo donde la unión de ligandos y de elementos de respuesta del ADN regulan alostéricamente la actividad del receptor, promoviendo la transactivación o transrepresión de genes diana (Germain et al., 2021).

Los avances en la secuenciación masiva han facilitado la identificación de diversos miembros de la familia de NRs, que inicialmente han sido clasificados en seis subfamilias en base a sus relaciones filogenéticas (NR1-NR6) (Laudet, 1997; Nuclear Receptor Nomenclature Committee, 1999) (resumidos en Tabla 2). Esta clasificación se ha establecido en función de la secuencia y organización de sus dominios conservados, principalmente el dominio de unión al ADN (DBD, *DNA-Binding Domain*) y el dominio de unión al ligando (LBD, *Ligand-Binding Domain*), que representan las regiones más características de estos receptores (ver sección 2.3.3). A su vez, existe una subfamilia, denominada NR0, la cual está formada por receptores nucleares que contienen solo el DBD (NR0A, identificados en artrópodos y nematodos) o solo el LBD (NR0B, presentes en algunos vertebrados) (Laudet et al., 1999).

Más recientemente se identificó en el platelminto parásito *Schistosoma mansoni* (trematodo) un nuevo grupo de NRs que contiene dos DBDs en tandem y un LBD (2DBD-NRs). Este parásito expresa tres 2DBD-NRs denominados Sm2DBD α , Sm2DBD β y Sm2DBD γ (Wu et al., 2006). Esta nueva subfamilia de NRs aún no ha sido incluida en este sistema de clasificación (Wu y LoVerde, 2011).

Tabla 2. Clasificación clásica de receptores nucleares. Tabla basada en: Laudet, 1997; Germain, et al., 2006.

Familia (NR)	Miembros representativos	Características principales	Ejemplos de funciones biológicas
NR0	Se clasifican en: NR0A, sólo presentan la región DBD; NR0B, sólo presentan la región LBD.	Receptores atípicos debido a su estructura modular incompleta	KNI (NR0A1), factor transcripcional con actividad represora; DAX1 (NR0B1), implicado en la determinación del sexo.

NR1	TRs (receptores de hormonas tiroideas), RARs (receptores de ácido retinoico), VDR (receptores de vitamina D), EcR (receptores de ecdisona).	Subfamilia más extensa. Alta diversidad funcional.	Regulación del metabolismo lipídico y energético (PPARs), desarrollo embrionario (RARs, TRs), diferenciación celular (VDR).
NR2	RXR (receptor X de retinoides), COUP-TFs (factor de transcripción del promotor ascendente de ovoalbúmina de pollo), HNF4 (factor nuclear de hepatocitos 4).	Sus principales funciones son de regulación transcripcional de procesos metabólicos y de desarrollo.	Control del desarrollo embrionario temprano, diferenciación hepática y regulación del metabolismo energético.
NR3	Receptores esteroideos: ER (estrógeno), GR (glucocorticoide), MR (mineralocorticoide), PR (progesterona), AR (andrógeno); ERRs (receptores huérfanos relacionados a estrógenos).	Receptores esteroideos clásicos. Respuesta a hormonas lipofílicas.	Regulación del sistema reproductivo, respuesta al estrés, homeostasis de agua y electrolitos, metabolismo energético.
NR4	Receptores nucleares huérfanos: NGFI-B (Nur77), Nurr1, NOR1.	Receptores huérfanos, inducibles por señales de diferenciación y proliferación.	Respuesta a estímulos tróficos, regulación de la apoptosis, diferenciación neuronal.
NR5	SF-1 (factor de transcripción esteroidogénico 1).	Regula la esteroidogénesis y el desarrollo de glándulas endocrinas.	Desarrollo de la corteza suprarrenal y gónadas, regulación de la síntesis de hormonas esteroideas.
NR6	GCNF1 (Factor Nuclear de Células Germinales 1)	Subfamilia pequeña, pocos miembros identificados.	Regulación de la gametogénesis y del desarrollo embrionario temprano.

2.3.2. Estructura de los receptores nucleares

Como se mencionó previamente, los NRs presentan diversas funciones, a pesar de ello están relacionados evolutivamente y comparten una estructura modular generalizada formada por distintos dominios que varían en su funcionalidad.

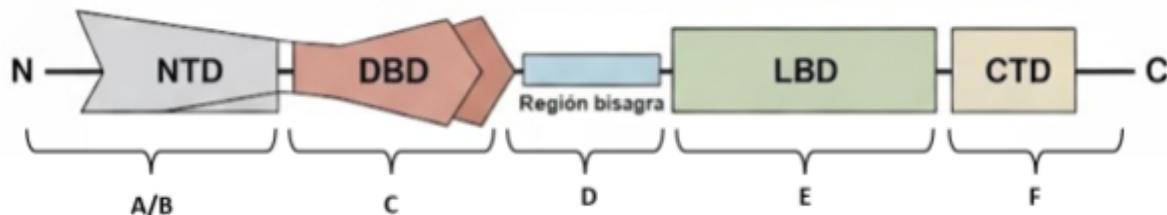


Figura 5. Esquema de estructura modular de NRs.

En primer lugar, la región N-Terminal (NTD), también conocida como dominio A/B, es la región más variable en cuanto a secuencia y tamaño. Contiene al menos una región de transactivación (Activation Factor 1, AF-1) que es independiente de la interacción con ligandos, su actividad es modulada por interacciones con proteínas co-reguladoras, influyendo en la respuesta promotor-específica (Kumar et Thompson et al., 2003). En segundo lugar, el dominio DBD o dominio C, representa la región más conservada de los NRs. Contiene dos "dedos de zinc" y dos α -hélices, que le permiten al receptor unirse a secuencias específicas de ADN, conocidas como elementos de respuesta hormonal (HREs). A su vez, dentro de la región DBD, el primer dedo de zinc contiene la caja P ("P-box"), responsable de la especificidad de la unión al ADN, mientras que, la caja D ("D-box") que está implicada en la dimerización del receptor está presente en el segundo dedo zinc (Pawlak, et al., 2012). La región C-terminal (CTE), poco conservadas, del dominio DBD contiene los motivos T-box y A-box, implicados en el reconocimiento del ADN y la dimerización, respectivamente, y contribuyen a estabilizar la unión al ADN (Laudet et al., 1995). Seguidamente, en tercer lugar, está la región bisagra o dominio D, la cual actúa como un conector flexible entre el dominio DBD y el dominio LBD, siendo la región con menor conservación de secuencia y tamaño; su principal rol es conferir flexibilidad a la estructura. El dominio de unión al ligando (LBD) o región E, es una región moderadamente conservada que incluye una interfase de dimerización, un bolsillo de unión al ligando (LBP) y una función de activación dependiente del ligando (AF-2) que interactúa con coactivadores y correpresores que modulan la respuesta transcripcional (Novac y Heinzel, 2004; Weikum et al., 2018). Estas proteínas poseen una estructura tridimensional característica de sándwich de tres capas (generalmente doce alfa-hélices y dos cadenas beta), que rodea el LBP que es una cavidad hidrofóbica central (Weikum et al., 2018). Por último, la región C-terminal o el dominio F, es de las regiones menos conservadas al punto de que incluso existen NRs que no presentan tal región. Sin embargo, se ha demostrado que cuando está presente, su eliminación o mutación puede alterar la transactivación, la dimerización y la respuesta del receptor a la unión del ligando (Bodofsky et al., 2017; Patel y Skafar, 2015) (ver Figura 5).

2.3.3 Receptores nucleares con dos dominios de unión al ADN

Los platelmintos parásitos son incapaces de sintetizar *de novo* ácidos grasos y esteroles (Smyth et McManus, 1989; Tsai et al., 2013; Zheng et al., 2013); por lo que necesitan capturar ácidos grasos del hospedero para su supervivencia (Brouwers et al., 1997, Alvite et al., 2014). En este proceso de transporte lipídico podrían participar dos familias de proteínas que unen lípidos en cestodos, las proteínas de unión a ácidos grasos (FABPs) y las proteínas que unen ligandos hidrofóbicos (HLBPs) (Alvite et al., 2012). Por otro lado, numerosas evidencias demuestran la interacción entre algunos tipos de FABPs y NRs del tipo PPARs (receptores activados por proliferadores de peroxisomas) de vertebrados (Schroeder et al., 2008; Hostetler et al., 2009; Armstrong et al., 2014). Buscando NRs similares a PPARs que pudieran llegar a interaccionar con las EgFABPs para que éstas les ceden el ligando, nuestro grupo de investigación ha identificado a cuatro NRs pertenecientes a la subfamilia 2DBD en *E. granulosus*: Eg2DBD α , Eg2DBD α .1 (possible isoforma de Eg2DBD α), Eg2DBD β y Eg2DBD γ (Alvite et al., 2019). Como se menciona previamente, esta nueva subfamilia de NRs, fue reportada por primera vez en el platelminto parásito *Schistosoma mansoni* (Wu et al., 2006). Los 2DBD-NRs han sido identificados exclusivamente en algunos invertebrados, como moluscos y platelmintos (Wu et LoVerde, 2023), y no se encuentran en vertebrados, lo cual convierte a estas proteínas en un blanco atractivo para el desarrollo de nuevos fármacos antihelmínticos. Estructuralmente, se determinó que estas proteínas comparten una secuencia P-box única en el primer DBD (EACKK), que no está presente en otro NR conocido, sugiriendo una especificidad de unión al ADN nueva (Wu et LoVerde, 2011). Los 2DBD-NRs han sido muy poco estudiados; los Sm2DBDs han sido parcialmente caracterizados, determinándose que la expresión de sus genes está regulada durante el desarrollo y que Sm2DBD α forma homodímeros (Wu et al., 2007). Estudios en el platelminto de vida libre *Schmidtea mediterránea* demostraron que NHR-1, un NR homólogo a Sm2DBD-NR γ , es necesario para el desarrollo de los órganos reproductivos accesorios y para la diferenciación y maduración de las células germinales (Tharp et al., 2014).

Eg2DBD α .1 ha sido el Eg2DBD más estudiado, el primer DBD contiene la caja P consenso, característica de los 2DBD-NRs, mientras que el segundo contiene una P-box idéntica a la de la mayoría de los miembros de la subfamilia NR1. Predicciones de modelos 3D sugieren que el primer DBD reconoce específicamente el ADN a través de su P-box, mientras que el segundo DBD contribuye a la estabilización del complejo proteína-ADN (Alvite et. al. 2019). Estudios recientes han demostrado que Eg2DBD α .1 forma homodímeros a través de los dominios E y F. Este tipo de interacción abre distintas posibilidades de unión del NR al ADN, que podría depender de la unión de ligandos específicos. Además, dicha homodimerización es estimulada por el suero del hospedero intermediario (bovino), lo que sugiere un papel en la comunicación hospedero-parásito (Blanco et al., 2023). Este hallazgo es interesante ya que la mayoría de los ligandos de los NRs son transportados en el suero unidos a albúmina, que es una de las proteínas más abundantes del líquido hidático de los quistes (Aziz et al. 2011). Asimismo, la presencia de suero en el medio de cultivo es indispensable para la supervivencia y el desarrollo parasitario de larvas de *E. multilocularis*, indicando que la composición lipídica del suero de los mamíferos es importante para la supervivencia del parásito (Brehm et Koziol, 2017). Por otro lado, estudios bioinformáticos con Eg2DBD α .1 entero revelaron que el LBD presenta la estructura conservada de sándwich alfa-helicoidal con tres capas e indican que los ácidos grasos de cadena larga e insaturados, como el

ácido oleico y el ácido linoleico, serían los ligandos preferenciales de este receptor (Cancela et al., 2023) (Figura 6). Además, el nivel de expresión de los cuatro 2DBD-NRs fue analizado en PE de *E. granulosus s.l.*, determinando que Eg2DBD γ se expresa poco o nada mientras que Eg2DBD α y Eg2DBD β son los Eg2DBDs de mayor expresión en este estadio (Blanco et al., 2023). Estudios de inmunohistoquímica han localizado específicamente a Eg2DBD β en el tegumento y el pedúnculo de los PE, lo que sugiere una posible función relacionada con la comunicación entre el parásito y su hospedero (resultados de nuestro grupo de investigación no publicados aún).

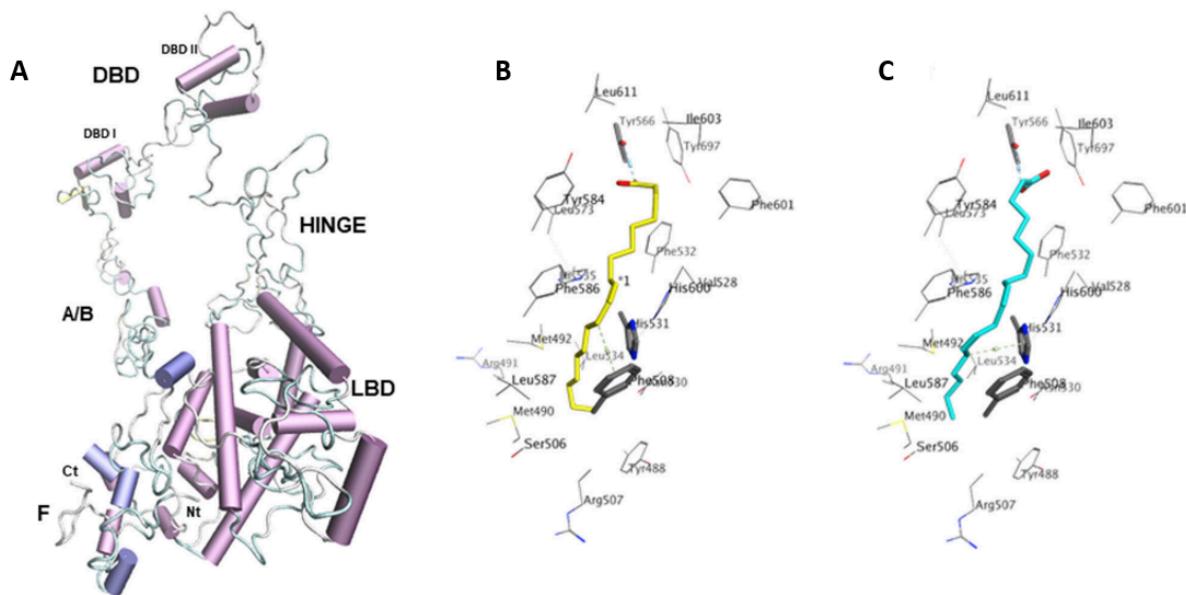


Figura 6. A. Estructura 3D completa de Eg2DBD α -1. B y C. Estructura 3D de las interacciones con ligandos oleicos y linoleicos respectivamente del mismo NR (Cancela et al. 2023).

Desde hace ya varios años, los NRs de helmintos parásitos están siendo considerados como posibles blanco de drogas antihelmínticas, ya que estas moléculas desempeñarían funciones claves en la regulación transcripcional del metabolismo y del desarrollo de estos organismos (Wang et al., 2017). Por otro lado, los NRs en general son blancos atractivos para el desarrollo de drogas de pequeño tamaño y de uso oral que pueden activar o inactivar selectivamente al NR. Actualmente entre el 10 y el 20 % de los medicamentos aprobados por la FDA interaccionan con este tipo de proteínas (Kinch et al., 2015; Frigo et al., 2021; Xu, 2023). El principio de la utilización de NRs como blancos para el tratamiento de enfermedades parasitarias se basa en el uso de ligandos exógenos que interfieran con sus funciones pero también podrían interaccionar con reguladores corriente arriba o los efectores corriente abajo del NR (Wang et al., 2017). En base a lo antedicho, la modulación de la señalización del NR podría proporcionar estrategias terapéuticas novedosas que cubran la necesidad de nuevas drogas que se menciona previamente. Las principales limitaciones para avanzar en el conocimiento de la biología de los NRs en los helmintos parásitos incluyen las dificultades técnicas asociadas al trabajo con estos organismos y sus hospederos, y la ausencia de herramientas genéticas tradicionales para estos parásitos (Wang et al., 2017).

3. Objetivos generales y específicos

Dada la necesidad de nuevas alternativas para combatir la EQ, es fundamental identificar y caracterizar nuevos blancos específicos del parásito y a su vez vitales para su supervivencia como podrían ser los Eg2DBDs. En este marco, nuestro objetivo general es contribuir al conocimiento del mecanismo de acción del receptor nuclear Eg2DBD β de *Echinococcus granulosus s.l.*, uno de los 2DBD-NRs con mayor expresión en protoescólicas. Buscamos también, aportar a la comprensión de su rol funcional en la biología del parásito, contribuyendo así a descifrar una posible vía de transducción de señales mediada por ácidos grasos del hospedero del parásito.

En este trabajo nos planteamos dos objetivos específicos:

1. Obtener Eg2DBD β -EF en forma recombinante y purificada, a partir de *Escherichia coli*, utilizando los métodos de RF-Cloning y cromatografía de afinidad.
2. Evaluar la capacidad de unión de rEg2DBD β -EF con un análogo de ácido graso fluorescente mediante ensayos de unión en electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturizante (PAGE nativo).

Nos centraremos en los dominios E y F de Eg2DBD β , ya que el LBD (dominio E) de los NRs sería el dominio de más fácil purificación y del que se dispone más datos estructurales, y el dominio F, que a veces se incluye como parte del dominio E, actuaría como regulador de la unión al ligando y de la actividad transcripcional, entre otros aspectos (Patel et Skafar, 2015; Weikum et al., 2018).

4. Materiales y métodos

4.1. Clonado mediante RF-Cloning

La técnica de clonado libre de restricción (RF-Cloning) es una metodología empleada para la inserción de genes diana en plásmidos que no requiere el uso de enzimas de restricción convencionales (van den Ent et Löwe, 2006). Implica el uso de cebadores largos diseñados previamente para amplificar el ADN de interés en una primera reacción en cadena de la polimerasa (PCR), estos incluyen una secuencia complementaria tanto a la región de interés como al vector de destino, en esta oportunidad se utilizó el plásmido pT7 (Correa et al., 2014). Esta metodología consiste en una primera PCR cuyo objetivo es la amplificación del megacebador, para luego utilizarlo como molde en una segunda PCR implicada en la inserción del mismo en el plásmido a utilizar. Posteriormente, el producto de la segunda reacción se incuba con la enzima DpnI cuya función es degradar de manera selectiva el vector parental metilado, permitiendo que solo el plásmido que ha incorporado el inserto permanezca y se pueda utilizar para la transformación bacteriana (van den Ent et Löwe, 2006; Correa et al., 2014).

4.1.1. Primera reacción de PCR

Durante la puesta a punto de la primera reacción de PCR se evaluaron distintas condiciones con el objetivo de optimizar la eficiencia de la amplificación. Entre ellas se hicieron variaciones en el número de ciclos de amplificación (30 o 35) y en la temperatura de hibridación de los cebadores (gradiente entre 55 °C y 59 °C). Asimismo, se probaron las ADN polimeraasas Ranger (BIOLINE) y Phusion (Thermo FisherScientific). En todos los casos se utilizaron los cebadores Eg-βLBD-Rf-D y Eg-βLBD-Rf-R diseñados previamente (secuencia en anexo 9.4) para clonar la región de Eg2DBDβ codificante para los 6 aminoácidos del extremo C-terminal del dominio D, el dominio E y el dominio F (ver Figura 8 de Resultados). A partir de estas pruebas se determinan las mejores condiciones de amplificación.

Finalmente, la amplificación del megacebador se realizó utilizando 5 µL de Buffer Phusion 5X, 0,5 µL de dNTPs Kapa (Sigma) (10 mM cada uno), 1,25 µL de cebadores directo y reverso Eg-βLBD-Rf (D y R) (10 µM), 2 µL ADN polimeraza Phusion (Thermo Fisher Scientific) (2 U/µL) y como molde 1 µL del plásmido pCRII-β-LBD (10 ng/µL) obtenido previamente, en un volumen final de reacción de 25 µL. El plásmido nombrado pCRII-β-LBD contiene la región codificante del Eg2DBDβ indicada en la figura 8, que fue anteriormente clonada en el vector de clonación pCRII (Invitrogen) por nuestro grupo de investigación. Las condiciones de la reacción se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Programa empleado en la reacción de PCR I de RF-Cloning.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (segundos)	Ciclos
Desnaturalización inicial	98	30	1
Desnaturalización	98	10	35

Hibridación	57	30	35
Extensión	72	30	35
Extensión final	72	300	1

Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa 1% en amortiguador TAE 1X, y visualizados mediante tinción con SYBR Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific) en el equipo Fast Gene Gel Pic LED Box (Genetics). Luego, se realizó la extracción de la banda correspondiente a la amplificación de interés para ser purificada empleando el kit Zymoclean-Gel DNA Recovery Kit (ZymoResearch) siguiendo el protocolo del fabricante. Se estimó la concentración de ADN mediante espectrofotometría por absorbancia a $\lambda=260$ nm (Abs260) con el equipo NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific) y se evaluó la contaminación proteica mediante la relación Abs260/Abs280. Posteriormente, durante la segunda reacción de PCR se sub-clonó la región amplificada de Eg2DBD β -EF en el plásmido de expresión pT7.

4.1.2. Segunda reacción de PCR

El plásmido de expresión pT7 es una herramienta versátil para la expresión (bajo el promotor fuerte T7) y purificación de proteínas recombinantes en sistemas bacterianos. Este vector incorpora una secuencia que codifica una cola de histidinas (His-tag) en el extremo N-terminal de la proteína recombinante, lo que facilita la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos (IMAC). Además, si el ADNc clonado no presenta un codón STOP, se expresa un tag adicional en la región C-terminal (StrepTagII) que puede ser utilizado para la purificación de la recombinante (Correa et al., 2014) (Figura 7). Este vector contiene también, un gen de resistencia a ampicilina (AmpR), que permite la selección de los transformantes en medios de cultivo con este antibiótico.

Para llevar a cabo la clonación mediante esta técnica se realizó una segunda PCR en la cual se emplearon las mismas condiciones de amortiguador, dNTPs y enzima, utilizadas durante la primera PCR, pero se utilizó 1 μ L de megacebador Eg2DBD β -EF (55 ng/ μ L) como cebador y 0,5 μ L de plásmido pT7 (27 ng/ μ L) como molde en volumen final de 25 μ L. El plásmido pT7 fue amablemente cedido por la Dra. Andrea Villarino (Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias). Durante esta reacción no se requieren dos cebadores debido a que el megacebador utilizado presenta extremos que hibridan al vector. Las condiciones de la reacción se detallan en la Tabla 4. Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa 0,8%, y visualizados de la misma manera que la PCR anterior.

Tabla 4. Programa utilizado en la PCR II de RF Cloning.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (segundos)	Ciclos
Desnaturalización inicial	98	30	1
Desnaturalización	98	10	30
Hibridación	60	60	
Extensión	72	300	

Extensión final	72	420	1
-----------------	----	-----	---

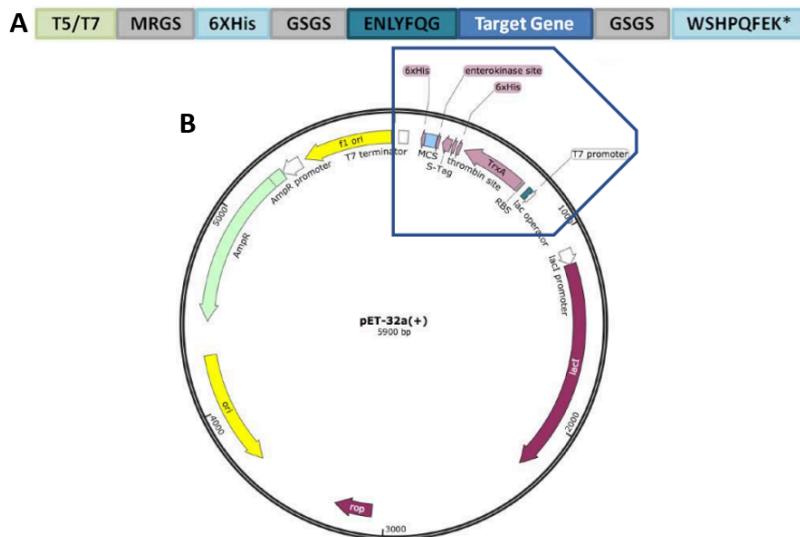


Figura 7. A) **Representación modular genérica del vector pT7.** Incluye promotor T5/T7; etiqueta codificante para la cola de histidinas (6xHis) N-terminal, sitio de reconocimiento de la proteasa del virus del grabado del tabaco TEV (ENLYFQG); secuencias espaciadoras (MRGS - GSGS); espacio para la secuencia de interés (Target Gene); secuencia codificante para StrepTag (WSHPQFEK); codón stop (*) (Correa et al., 2014). B) **Esquema del vector pET-32a (+) que dió lugar al vector pT7.** Se representa el gen de resistencia a la ampicilina (AmpR), sitio de origen de replicación bacteriano (ori), el gen del represor lac (lacI). Se encuadra la región donde se encuentra el sitio múltiple de clonado (MCS) bajo el control del promotor T7 y control del operador lac. Figura tomada y adaptada de Castellano, 2019.

El producto de esta segunda PCR se digirió con 2 μ L de enzima DpnI (Thermo Fisher Scientific, ER1701) (10 U/ μ L), empleando 2,5 μ L de amortiguador Tango 10X y 20,5 μ L de producto de PCR en volumen final 25 μ L, esto se incubó 2 hrs a 37°C.

4.2 Transformación de pT7-Eg2DBD β -EF y selección de clones recombinantes

Tras la obtención del plásmido recombinante mediante la estrategia de RF-Cloning, el producto de la PCR tratado con la enzima DpnI se utilizó para transformar células *Escherichia coli* DH5 α quimio-competentes (método cloruro de calcio) previamente preparadas. Se transformó con 8 μ L del producto de digestión en 50 μ L de células competentes utilizando el método de shock térmico. Brevemente, las células se incubaron con el ADN durante 20 minutos en hielo, seguido de 90 segundos a 42°C y se volvieron a incubar en hielo durante 2 minutos. Luego se agregó en esterilidad 500 μ L de LB y se incubó con agitación a 37° C, 200 rpm por 1 hr, para posteriormente plaquear 200 μ L en medio LB-agar con ampicilina (100 μ g/ μ L). Se rastrearon los clones recombinantes mediante PCR de colonia, utilizando 1 μ L de los mismos cebadores mencionados en el punto 4.1, 2,5 μ L de amortiguador Complete II KCl BIORON (10X), 0,5 de dNTP's Kapa (Sigma) (10 mM cada uno), y 0,5 μ L de la enzima HighTaq DNA Polymerase (BIORON) (75 U/ μ L) en un volumen final de 25 μ L. El programa utilizado se detalla en la tabla 5. Los productos obtenidos de esta reacción se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% como se explicó previamente.

Tabla 5. Programa utilizado durante PCR colonia.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (segundos)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	300	1
Desnaturalización	94	20	30
Hibridación	57	30	
Extensión	72	60	
Extensión final	72	420	1

Se seleccionaron dos colonias positivas por PCR (C1 y C3: clones 1 y 3) para ser cultivadas en medio Luria-Bertani (LB) con ampicilina (0,1 mg/mL) (3 mL) durante toda la noche a 37°C y agitación a 200 rpm. A partir de estos cultivos se realizaron mini-purificaciones plasmídicas (minipreps) empleando el kit Zymo PURE Plasmid Miniprep (ZymoResearch), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos fueron cuantificados mediante mediciones en NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific) cómo se explica anteriormente. A su vez, se realizó una segunda PCR confirmativa utilizando como molde 10 ng de los plásmidos obtenidos por miniprep, y las mismas condiciones y programa mencionado previamente. Por último, se envía los plásmidos pT7-Eg2DBDβ-EF-C1 y C3 para su secuenciación estándar por Sanger en el servicio de Macrogen (Corea) con el cebador T7promoter (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') (ver anexo 9.4) y el Eg-βLBD-Rf-R ya mencionado, para verificar la identidad del inserto y su correcto clonado en pT7. Posteriormente dicha secuencia se analizó mediante alineamiento utilizando Clustal Omega.

4.3 Expresión de rEg2DBDβ-EF

4.3.1. Transformación en cepas optimizadas para la expresión

Una vez confirmada la identidad del plásmido recombinante pT7-Eg2DBDβ-EF, éste fue utilizado para una nueva transformación pero en este caso se emplearon dos cepas optimizadas para la expresión proteica, *E. coli* BL21 (DE3)pLysS (Promega) y *E. coli* Rosetta (DE3) (Novagen), y un método de transformación rápida de baja eficiencia. La cepa BL21(DE3) pLysS se caracteriza por disminuir la expresión basal del gen recombinante antes de la inducción, favoreciendo así una mayor regulación del sistema de expresión. La cepa Rosetta(DE3) optimiza la producción de proteínas de origen eucariota porque incorpora seis ARNt adicionales que reconocen codones poco frecuentes en *Escherichia coli*. Estos ARNt se encuentran codificados en un plásmido auxiliar que, además, otorga resistencia al cloranfenicol, permitiendo la selección de las células transformadas.

Para la incorporación del plásmido en las cepas de *E. coli* mencionadas se utilizó una transformación por shock térmico de baja eficiencia, basada en la exposición de células tratadas con cloruro de calcio (CaCl₂) a un cambio térmico brusco. Las cepas se cultivaron previamente en 3 mL de medio LB complementado con ampicilina (0,1 mg/mL) y, en el caso de Rosetta (DE3), también con cloranfenicol (0,034 mg/mL), incubándose durante 20 h a 37 °C y 200 rpm. Luego del crecimiento durante toda la noche, se tomó un alícuota de 1 mL de

cada cultivo (en esterilidad) y se sedimentaron las células por centrifugación durante 2 minutos a 5000 xg, y posteriormente se resuspendieron en 500 μ L de una solución fría de CaCl₂ 0,1 M estéril. Tras un segundo centrifugado en las mismas condiciones, las células fueron lavadas en 100 μ L de la misma solución fría y se mantuvieron en hielo durante 60 min. Después, se añadió 1 μ L de miniprep y se continuó la incubación en frío durante 30 min. El proceso de transformación se completó mediante la aplicación de un shock térmico breve a 42 °C durante 90 segundos, seguido de un retorno inmediato al hielo por el mismo tiempo. Finalmente, las células tratadas se recuperaron en medio LB y se sembraron en placas selectivas para la obtención de los transformantes que se usaron posteriormente.

4.3.2. Ensayos de mini-expresión

Luego, los clones recombinantes seleccionados fueron evaluados mediante pruebas de mini-inducción en 50 mL de medio, ensayándose distintas condiciones de crecimiento para ambas cepas. Inicialmente se realizó la inducción en medio de cultivo LB durante 3 h a 37 °C, utilizando 1mM de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido (IPTG, Sigma) como inductor. Posteriormente, se empleó medio Terrific Broth (TB) como alternativa de cultivo, con el propósito de optimizar la producción de proteína recombinante. La composición de los medios se detalla en el anexo 9.1. En todos los casos, los medios fueron complementados con ampicilina (0,1 mg/mL) y, en el caso de las inducciones realizadas con la cepa Rosetta (DE3) también con cloranfenicol (0,034 mg/mL). En todos los casos se utiliza 1 mL del precultivo (con antibióticos mencionados) crecido en el medio correspondiente durante toda la noche a 37°C y 200 rpm, para inocular 50 mL de medio, que se incuba en igual temperatura hasta alcanzar una densidad óptica (DO) a 600 nm de aproximadamente 0.7-0.8, momento en que se le adiciona IPTG en esterilidad. En estas condiciones, se ensayaron dos temperaturas de inducción (20 °C y 16 °C) y diferentes concentraciones de IPTG (0,5 mM y 1 mM) en medio TB a 16 °C manteniendo en todas las pruebas las 21 hrs de inducción. Además, se realizaron precultivos en las mismas condiciones para conservar los clones en glicerol 25% a -80 °C. En todos los casos se colecta 1 mL de cultivo no inducido e inducido, antes y después del agregado de IPTG, respectivamente. Estas muestras fueron centrifugadas 1 min a alta velocidad, los *pellets* se resuspendieron en 100 μ L de amortiguador de carga de proteínas 1X (ver Anexo 9.2), se vortexearon y guardaron a -20°C hasta su uso. Luego de la inducción las células son colectadas y lisadas para obtener la fracción soluble e insoluble, como se indica abajo.

En base a estos ensayos de mini-inducción se eligió la condición de expresión a gran escala que se utilizó para la posterior purificación proteica. Se eligieron las células *E. coli* Rosetta (DE3) recombinantes, el medio TB con 400 μ L de cloranfenicol (34 mg/mL) cada 200 mL de medio, inducción durante 21 hs a 20 °C con IPTG 1 mM y agitación a 200 rpm. Los precultivos, complementados con cloranfenicol (0,034 mg/mL) y ampicilina (0,1 mg/mL), se incubaron durante la noche a 37 °C, con agitación a 200 rpm , y posteriormente se utilizaron para inocular 200 mL de TB (x4) en una dilución 1/50, que se crecen hasta alcanzar la DO de inducción, donde se inducen con IPTG 1 mM, como se indica arriba. Finalizado este período, las células se recuperaron por centrifugación a 4420 xg durante 10 min a 4 °C. El sedimento obtenido se resuspendió en 6 mL de amortiguador de sonicación (composición detallada en Anexo 9.2) (x4) suplementado con inhibidor de proteasas 1:100 (Sigma, P8849) y se sometió a lisis celular. Se realizaron tres ciclos de congelado (-20°C) -descongelado y posteriormente se sonicó la muestra con un sonicador Benchmark

Pulse-150 utilizando la sonda 6, en 50% de potencia durante 15 minutos (Pulse On: 2 segundos - Pulse Off: 3 segundos). El lisado resultante fue centrifugado a 15.000 xg durante 30 min a 4 °C, separando de este modo la fracción soluble (sobrenadante) que se conserva a -20 °C hasta su uso en buffer de carga 4X (ver anexo 9.2). El *pellet* remanente se resuspendió en 4 mL de amortiguador de sonicación con urea 8M (x4) y se centrifugó de igual forma que el lisado celular, conservando el sobrenadante para su evaluación (fracción insoluble) en las mismas condiciones que la fracción anterior. Todas las fracciones fueron visualizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE) al 12% y el gel fue teñido durante un mínimo de 20 hrs con Coomassie Coloidal (composición detallada en anexo 9.2). Para todos los SDS-PAGE mostrados se utilizó como marcador de peso molecular (MPM) el PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific; 26616). Para la visualización de la proteína de interés el gel fue sometido a una tinción coloidal siguiendo el siguiente protocolo. En primer lugar, se fijó durante un mínimo de 30 minutos en una solución compuesta por ácido acético al 10% y etanol al 40%. Una vez completada la fijación, la solución fue retirada y el gel se incubó en la solución de tinción coloidal (100–300 mL por gel, según el tamaño) durante toda la noche, permitiendo que la intensidad de la tinción incremente progresivamente. Posteriormente, se enjuaga repetidas veces con agua para eliminar el exceso de colorante, conservándolo hidratado en agua. Por otro lado, utilizando la herramienta ProtParam de Expasy (<https://web.expasy.org/protparam/>) obtuvimos los parámetros fisicoquímicos teóricos de proteína recombinante Eg2DBDβ-EF (masa molecular, coeficiente de extinción molar).

4.4 Purificación mediante cromatografía de afinidad con metales inmovilizados

La purificación de la proteína recombinante se realizó mediante IMAC, utilizando una columna HisTrap FF Crude de 1 mL (GE Healthcare), acoplada a un sistema de cromatografía líquida ÄKTA Start (GE Healthcare). Todas las corridas cromatográficas se llevaron a cabo a un flujo constante de 1 mL/min, a temperatura ambiente y monitoreadas por absorbancia a 280 nm. Como buffer de equilibrio y carga (solución A) se utilizó buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM y glicerol 10% (v/v), suplementado con imidazol. En una primera condición, el buffer A contenía 20 mM de imidazol, mientras que en una segunda condición de optimización se utilizó una concentración de 50 mM de imidazol. El buffer de elución (solución B) tuvo la misma composición que el buffer A, pero suplementado con 500 mM de imidazol.

La columna fue equilibrada con 5 volúmenes de columna (VC) de solución A. Posteriormente, se cargaron 15 mL de muestra clarificada por centrifugación durante 30 min a 15.000 xg y 18 °C, seguido de un paso de lavado con 3 VC de solución A.

La elución de la proteína de interés se realizó mediante un gradiente lineal de imidazol desde 0 hasta 69% de solución B en 15 min. En el primer ensayo, partiendo de un buffer A con 20 mM de imidazol. En el segundo ensayo de optimización, partiendo de un buffer A con 50 mM de imidazol, con un gradiente de 0 a 69% de solución B en 20 min. Durante la elución se colectaron fracciones de 0,5 mL para su posterior análisis.

Las fracciones de eluido con la proteína de interés fueron colectadas y diluidas 4 veces con solución amortiguadora de sonicación sin imidazol. Luego fueron sometidas a diáisis utilizando una membrana semipermeable de 25 mm con cut-off de 3 kDa (Sigma-Aldrich).

La diálisis se realizó contra 100 volúmenes en relación a la muestra del amortiguador fosfato de sodio 50 mM, glicerol 5% y NaCl 137 mM, a 4 °C durante toda la noche, con al menos 2 recambios del mismo. Buscamos así remover el imidazol remanente y mantener a la proteína recombinante en un medio fisiológico (composición similar a PBS 1X) con glicerol.

Por último, la proteína purificada fue evaluada mediante SDS-PAGE al 12% y la banda del tamaño esperado fue recortada y enviada al servicio UByPA del Instituto Pasteur de Montevideo, para su identificación mediante espectrometría de masa LC-MS/MS.

4.5. Estudios de unión en PAGE

Una vez obtenida la proteína purificada, se cuantificó mediante espectrofotometría midiendo la absorbancia a 280 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar teórico obtenido con la herramienta ProtParam (Expasy) y la Ley de Lambert-Beer ($A=\epsilon.b.c$). Los ensayos de unión mediante PAGE nativo se llevaron a cabo en geles pre-hechos Mini-PROTEAN TGX (BIO-RAD) 12%, utilizando amortiguadores de carga y de corrida para condiciones no desnaturalizantes, los cuales se detallan en el Anexo 9.2. Como posible ligando se utilizó un análogo de ácido graso de cadena larga fluorescente, el BODIPY™ FL-C16 (Thermo Fisher Scientific) (Bp). Este ligando fluoresce en un ambiente hidrofóbico y ha sido previamente empleado, junto con otros similares, por nuestro grupo de investigación, en estudios de unión con proteínas que unen ácidos grasos (FABPs) (Esteves et al., 2016; Suarez, 2018). En este ensayo se empleó para el control positivo la albúmina sérica bovina (BSA), mientras que la proteína recombinante tropomiosina 1 de *E. granulosus* (EgTrp) (Alvite et Esteves, 2009) se utilizó como control negativo (Esteves et al., 2016), la primera proteína une ácidos grasos mientras la segunda no.

En primer lugar, se pusieron a punto las condiciones óptimas del ensayo de unión, para ello se utilizaron distintas cantidades de la proteína recombinante y del análogo del ácido graso, como se detalla en la Tabla 6. Como control positivo se utilizó 5 μ L BSA (10 μ g/ μ L) con 5 μ L de Bp (20 μ M), y como control complementario se usó la misma cantidad de BSA pero sin Bp, el cual se reemplazó por el mismo volumen de PBS 1X. Como controles negativos se usó 20 μ L EgTrp (1 μ g/ μ L) con 5 μ L de Bp (20 μ M) y sin Bp, respectivamente. Además, en otro carril se sembró solamente 10 μ L de Bp (20 μ M) con igual volumen de PBS, para visualizar la migración del Bp sin proteína. En todos los geles, también se sembró un carril con 25 μ L de rEg2DBD β -EF purificada sin Bp. Todas las muestras y controles fueron incubados durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego de este tiempo, se les agregó la cantidad necesaria de amortiguador de carga de PAGE nativo 6X (composición en Anexo 9.2) hasta concentración final 1X, y fueron cargadas en el gel.

Tabla 6. Relaciones molares de rEg2DBD β -EF y BODIPY™ FL-C16 utilizadas para la puesta a punto del ensayo de unión en PAGE Nativo.

Muestra	M1	M2	M3	M4
Eg2DBD β -EF	8	3	4	2
BODIPY™ FL-C16	1	1	3	4

Para evitar el sobrecalentamiento del sistema durante la electroforesis y así prevenir posibles desnaturalizaciones, el amortiguador de corrida se enfrió previamente a 4 °C y se mantuvo frío durante la corrida con un refrigerante en gel congelado. Se dejó migrar durante 105 minutos a 10 mA aproximadamente, en oscuridad. La visualización de la fluorescencia del gel se efectuó con el equipo G-Box (SYNGENE) utilizando iluminación con BLUE LED Module y filtro SW06 y 4 min de exposición. Posteriormente se fijó el gel durante 30 minutos en solución fijadora con 10% de ácido acético y 40% etanol para luego teñirlo con Coomassie Coloidal cómo se indica previamente.

A partir de esta puesta a punto, se eligió la mejor condición de unión rEg2DBD β -EF-Bp en PAGE nativo y el ensayo se realizó por duplicado en estas condiciones y con los controles mencionados. Las bandas proteicas cuyo tamaño coincide con las bandas fluorescentes fueron escindidas y enviadas al servicio UByPA del Instituto Pasteur de Montevideo, para su identificación mediante espectrometría de masa LC-MS/MS.

5. Resultados

5.1. Clonado de Eg2DBD β -EF en el vector pT7

El método de clonación mediante RF-Cloning implica dos PCRs como se explicó previamente. En la primera reacción se amplifica la región codificante para Eg2DBD β -EF a partir del plásmido pCRII-Eg2DBD β -EF. Durante la puesta a punto de esta primera reacción se ensayaron distintas condiciones, mencionadas en el punto 4.1.1, las PCRs que no amplificaron no se muestran. Mediante electroforesis se visualizó una única banda de ADN cercana a los 800 pb (Figura 9) en la reacción de PCR exitosa. El tamaño estimado del fragmento se asemeja al esperado de 837 pb correspondiente al megacebador, conformado por 777 pb de la secuencia codificante para Eg2DBD β -EF y 60 pb que pertenecen a las regiones del plásmido pT7 flanqueantes al inserto (30 pb cada una) y que fueron incluidas en los cebadores utilizados en la primera amplificación (secuencia detallada en Figura 8).

gga tcg gaa aac ctg tat ttt cag gga tcc act ctt gcg gaa ttt act cag gga atc gag
G S E N L Y F Q G S T L A E F T Q G I E
cga gcc act gat ttt ctg cga tct gaa cgc atg cgg tta aaa cgg atc agg act gat ccg
R A T D F L R S E R M R L K R I R T D P
cag ccc aga ttc acc aac ttg gac acc att gaa cgt gtc tgg tgc cag atg atg cgg cag
Q P R F T N L D T I E R V W S Q M M R Q
ttc gtt tca cac act aga atg gtc gtc gat ttc tcg aag ctt atc gcg ggc ttc aat cgg
F V S H T R M V V D F S K L I A G F N R
ctg ggc atc aac gac aga agg cag ttg att cgc gct gcc atg tat ccc att atg ctg ata
L G I N D R R Q L I R A A M Y P I M L I
gaa cta agc aga gac ttt cag aac aac agc agt ctc tcc tac aac tac ttt gat ttc ccc
E L S R D F Q N N S S L S Y N Y F D F P
gag cgt gag aaa gaa atc ata att cag cgc ttt cct ccc ctc gca aaa ata atc tcc cac
E R E K E I I I Q R F P P L A K I I S H
ctc gtc cag tcg ggg aag gtt ctt cga cgc ttg aag ttg gac gac ata gag agc acc att
L V Q S G K V L R R L K L D D I E S T I
ata tgt ata cag gaa ctt tta aga cac aag aac gag ctg gaa gat ccg gcc tcc tgc gaa
I C I Q E L L R H K N E L E D P A S C E
cac ctc ttc ctc cta tcc atg cag gcc ctg gtg aac cat gaa cat caa aaa tcc aag tca
H L F L L S M Q A L V N H E H Q K S K S
gat gca gca agc gaa cgt ttg aca gca ttt acg caa ctc ttg ccg ata ttg aat cag ttg
D A A S E R L T A F T Q L L P I L N Q L
aac gta gaa cat cac gaa gtg ttg agt caa gtc cgc ctg cag ttc ccc cac ctc gtt ttt
N V E H H E V L S Q V R L Q F P H L V F
ccc gag ctc tat gtc gag atg ttc gcc atc ggg gcc gat aag cca cct cac ttc ttt cgg
P E L Y V E M F A I G A D K P P H F F R
aac gat tcc aac agg aat gac ttg tga gga tcc ggc agc tgg agc cac ccg cag ttc
N D S N R N D L - G S G S W S H P Q F

Figura 8. Secuencia esperada del megacebador (837 pb). En negrita se resaltan los cebadores utilizados en el RF-Cloning (anexo 9.4). Se subrayan las regiones correspondientes al plásmido pT7 (60 nt). En sombreado azul, amarillo y verde se marcan las regiones codificantes para los dominios D

(18 nt, 6 AA del C-terminal), E (702 nt) y F (54 nt), respectivamente. En rojo se señala el codón STOP. Se utilizó la herramienta PROSITE de Expasy (<https://prosite.expasy.org/>) para determinar los dominios proteicos.

El amplicón fue purificado y cuantificado mediante espectrofotometría, presentando una concentración de 274,9 ng/μL y una relación A260/A280 de 1,9. Estos valores indican una muestra con una concentración elevada y una buena pureza en relación a los contaminantes proteicos.

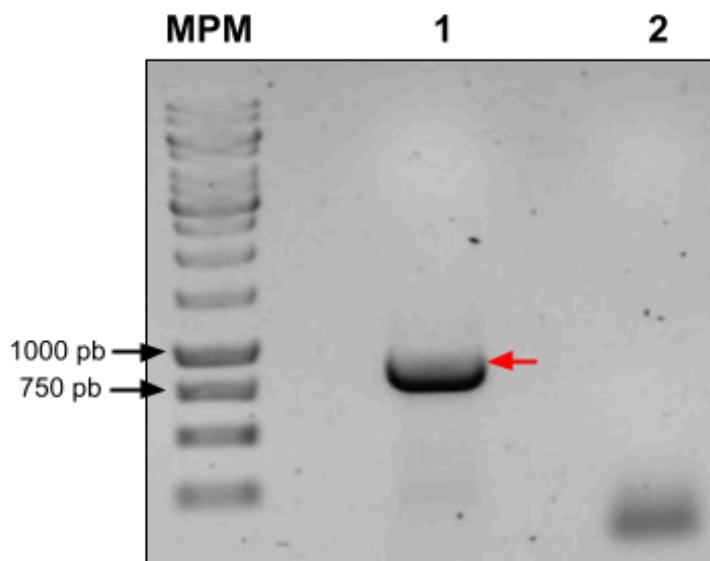


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa 1% del producto de la primera PCR del Rf-cloning. **MPM:** GeneRuler 1kb (Thermo Fisher Scientific). **1)** producto de PCR I Eg2DBD β -EF. **2)** Blanco de la PCR.

Posteriormente, como se detalla en la sección 4.1.2, se realizó una segunda PCR para subclonar la región del ADN de interés previamente amplificada, en el vector de expresión pT7. Este resultado se observa en la Figura 10, donde se muestra que el producto de PCR obtenido fue mayor a 6000 pb, similar al tamaño esperado de 6298 pb correspondiente al vector (5521 pb) contenido el inserto (777 pb).

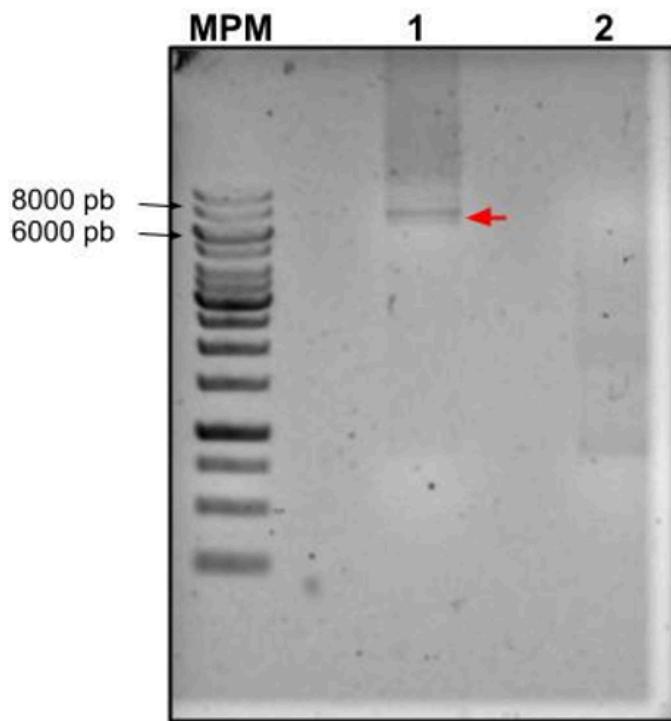


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa 0,8% del producto de la segunda PCR del Rf-cloning. **MPM:** GeneRuler 1kb (Thermo Scientific). **1)** producto de PCR; **2)** Blanco de la PCR.

Luego de la eliminación del plásmido parental metilado, el plásmido recombinante remanente fue cuantificado y empleado para transformar células de *E. coli* DH5 α , como se explica previamente. Los posibles clones recombinantes se rastrearon mediante PCR de colonia. Como se aprecia en la Figura 11, de los cinco clones evaluados, el 1 y el 3 (C1 y C3) mostraron mayor amplificación, por lo que fueron seleccionados para llevar a cabo minipurificaciones de plásmido. Los plásmidos C1 y C3 presentaron una concentración de ADN de 615 y 362 ng/ μ L, y una relación A260/A280 de 1,95 y 1,89, respectivamente. Estos valores se encuentran dentro del rango aceptable de pureza para ADN plasmídico, indicando baja presencia de contaminantes proteicos. Además, se confirmó la presencia del inserto en los plásmidos obtenidos mediante PCR en las mismas condiciones, visualizándose una banda del ADN del tamaño esperado para ambos casos (Figura 12).

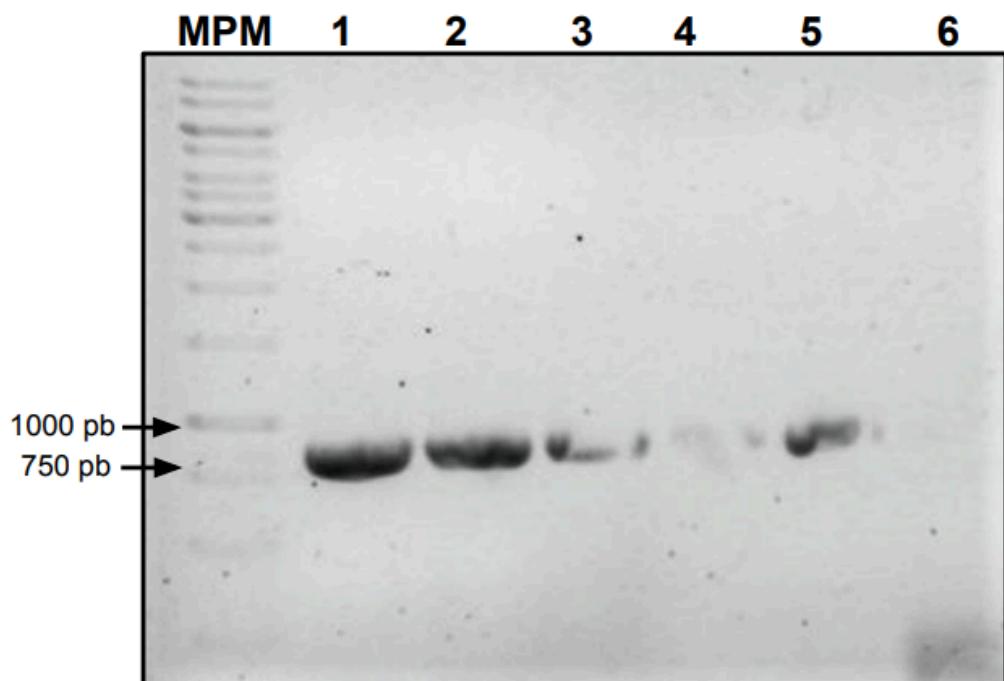


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa 1% de productos de PCR de colonia. **MPM)** GeneRuler 1kb (Thermo Scientific **1)** Clon 1. **2)** Clon 3. **3)** Clon 2. **4)** Clon 4. **5)** Clon 5. **6)** Blanco.

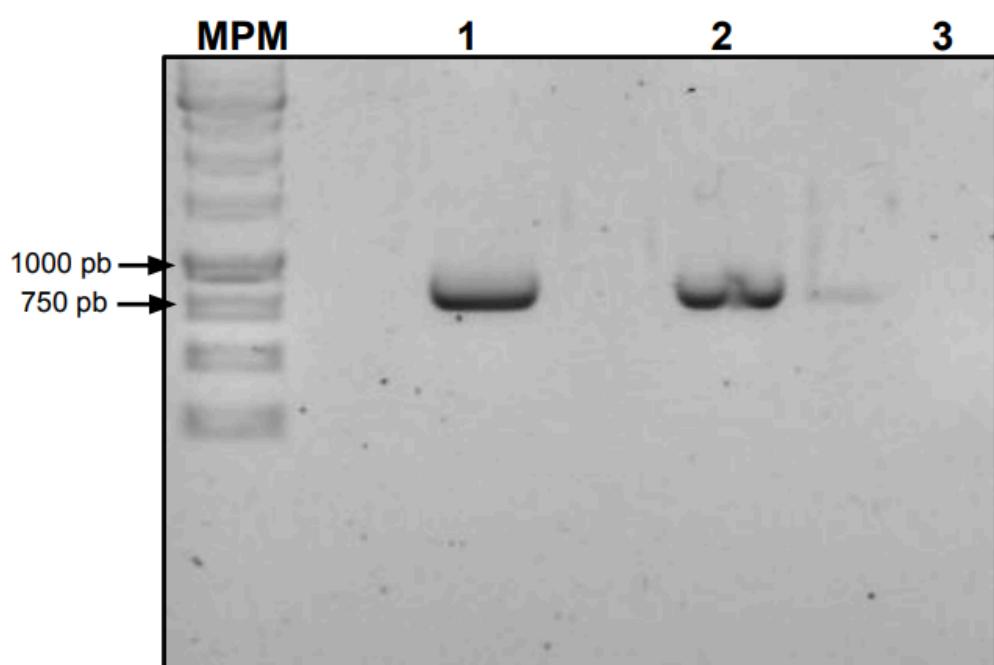


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa 1% de productos de PCR a partir de miniprep. MPM: GeneRuler 1kb (Thermo Scientific), **1)** plásmido C1, **2)** plásmido C3, **3)** Blanco.

Los plásmidos purificados C1 y C3 fueron secuenciados (Macrogen, Corea) y las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante el alineamiento con la secuencia esperada de WormBase ParaSite (<https://parasite.wormbase.org/index.html>, (EgrG_000458200)). Luego de la corrección manual de algunos nucleótidos en base a los

electroferogramas obtenidos, se confirmó la identidad del inserto así como su correcto clonado en el plásmido pT7. Sin embargo, tanto en el plásmido C1 como en el C3 se encontraron 2 cambios nucleotídicos, de los cuales sólo uno (GAT por AAT) produce un cambio de AA (D por N) en el dominio F (Anexo 9.4 y figura 13). Estos dos cambios ya habían sido identificados en el plásmidos nombrado pCRII-β-LBD (pCRII-β-EF) utilizado como molde de la primera PCR. Dado que esta mutación no afecta el dominio de unión al ligando, se decidió continuar con la expresión proteica. Además, los parámetros fisicoquímicos como la masa molecular y el coeficiente de extinción molar no presentan variaciones frente a este cambio aminoacídico. El plásmido C1 fue utilizado para transformar las cepas de expresión *E. coli* BL21 (DE3)pLysS y Rosetta (DE3), y se seleccionó un clon recombinante de cada tipo para llevar a cabo ensayos de mini-inducción. Además, se realizaron precultivos para conservar los clones en glicerol 25% a -80 °C.

ggg gcc aat aag cca cct cac ttc ttt cg ^g aac gat tcc aac agg aat gac ttg
G A N K P P H F F R N D S N R N D L

Figura 13. Dominio F de rEg2DBDβ-EF. En naranja se señala el sitio de cambio de nucleótido y su correspondiente aminoácido.

5.2. Expresión de rEg2DBDβ-EF

Mediante la herramienta bioinformática ProtParam (Expasy) se obtuvo la masa molecular (32449.13 Da) y el coeficiente de extinción molar ($13075 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) teóricos de Eg2DBDβ-EF. Dichos valores se utilizaron para ubicar la banda de interés en las electroforesis SDS-PAGE y para calcular la concentración, respectivamente.

Para establecer un sistema óptimo de expresión de la proteína de interés a mediana escala se evaluaron distintas condiciones experimentales, seleccionándose aquellas que permiten la producción de la mayor cantidad de proteína recombinante en la fracción soluble. En primera instancia, se realizaron ensayos de mini-inducción en medio LB empleando las cepas *E. coli* BL21 (DE3) pLysS y *E. coli* Rosetta (DE3). Los resultados observados en la Figura 14, evidenciaron un nivel de expresión significativamente mayor en la cepa Rosetta (DE3), aunque la mayor cantidad de proteína inducida permanece en la fracción insoluble. En función de este resultado, se seleccionó esta cepa para continuar con las pruebas posteriores.

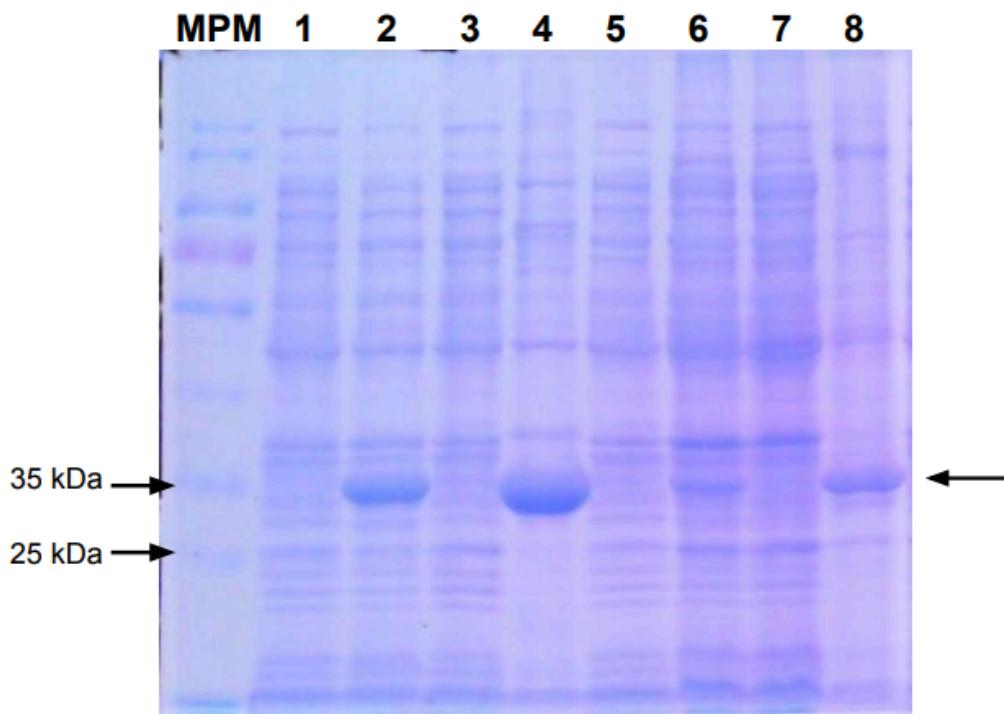


Figura 14. Evaluación de los ensayos de mini-inducción en LB a 37 °C, mediante SDS-PAGE al 12%. **MPM:** PageRuler (Thermo Scientific). **1-4)** cepa *E. coli* Rosetta (DE3): fracciones no inducida, inducida, fracción soluble y fracción insoluble, respectivamente. **5-8)** cepa *E. coli* BL21(DE3) pLysS con el mismo orden de fracciones.

Considerando antecedentes de nuestro grupo (Riera, 2018), se decidió sustituir el medio de cultivo LB por TB, con el fin de aumentar la producción proteica. En este medio, se evaluaron dos condiciones de temperatura (20 °C y 16 °C) para la inducción con IPTG 1 mM durante 21 hs, manteniendo sin más modificaciones las demás condiciones y el procedimiento en general. Se obtuvo una buena inducción en ambas temperaturas, quedando la mayor parte de la proteína recombinante en la fracción insoluble (Figura 15). Sin embargo, a 20°C la proporción de proteína soluble/insoluble parece ser mayor que a 16 °C, por lo que se seleccionó dicha temperatura para escalar la producción. Por último, se llevaron a cabo ensayos de mini-inducción en medio TB a 20 °C durante 21 hs, pero se indujo con dos concentraciones de IPTG distintas (0,5 y 1 mM) (Figura 16).

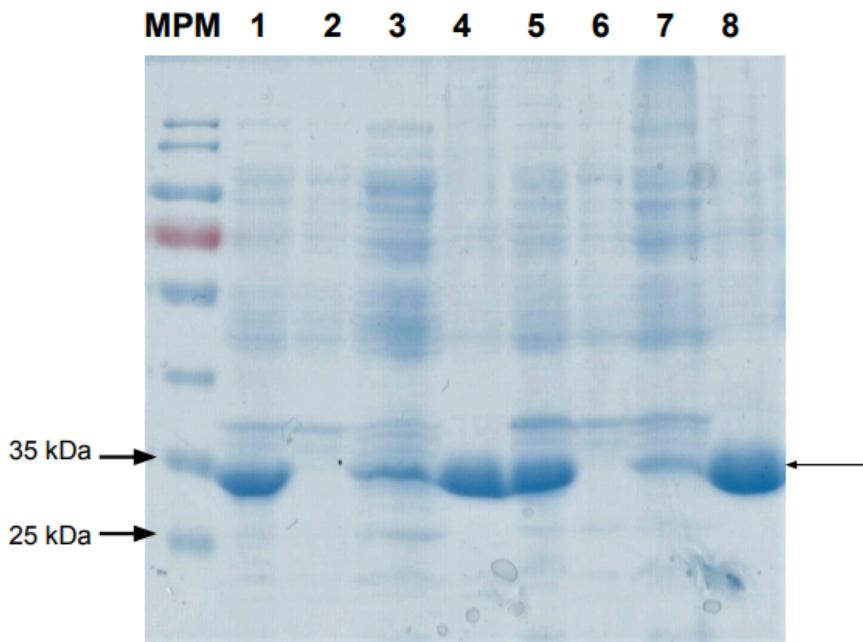


Figura 15. Evaluación de ensayos de mini-inducción en Rosetta (DE3), medio TB, a 20 y 16 °C, mediante SDS-PAGE 12%. **MPM:** PageRuler (Thermo Scientific). **1-4)** inducción a 20°C y **5-8)** inducción a 16 °C, corresponden a las fracciones inducida, no inducida, fracción soluble e insoluble, respectivamente.

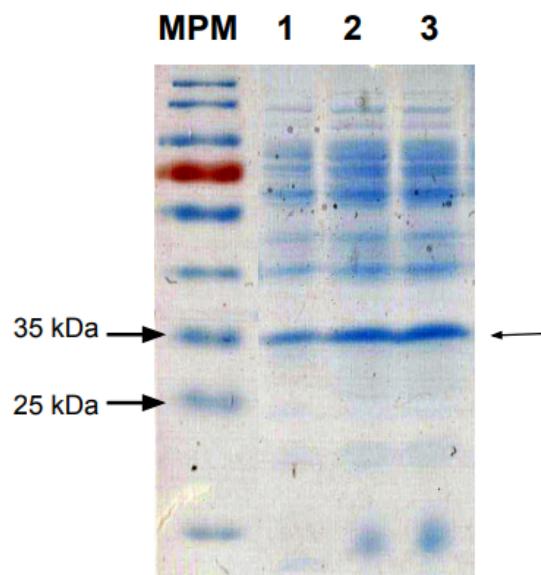


Figura 16. Evaluación de los ensayos de mini-inducción con IPTG 0,5 y 1 mM, mediante SDS-PAGE 12%. **MPM:** PageRuler (Thermo Scientific). **1)** fracción no inducida; **2 y 3)** fracción inducida con IPTG 0,5 y 1 mM, respectivamente.

Debido a que parece haber más inducción con IPTG 1 mM, se seleccionó esta concentración para la producción de la recombinante a una mayor escala.

El análisis comparativo de estos experimentos permitió establecer que las condiciones que proporcionaron una mejor expresión corresponden al uso de la cepa *E. coli* Rosetta (DE3) y medio TB, e inducción con 1 mM de IPTG a 20 °C durante 21 hs. Bajo estas condiciones, la proteína recombinante se detectó tanto en la fracción soluble como en la insoluble,

observándose un predominio en la fracción insoluble. Sin embargo, la fracción soluble se consideró la más adecuada para continuar, dado que existe una mayor probabilidad que la proteína recombinante se encuentre correctamente plegada y sea más estable en relación a la proteína que se podría obtener de la fracción insoluble luego de las etapas de desnaturalización y renaturalización. Esto es una ventaja para los pasos subsiguientes de purificación y el ensayo de unión propuesto, donde buscamos que la proteína posea la conformación nativa.

5.3. Purificación mediante IMAC

La fracción soluble obtenida tras la expresión en 800 mL de medio, fue procesada y purificada mediante IMAC dado que la proteína recombinante posee una etiqueta de histidinas (His₆). En primer lugar, se realizó una IMAC donde se utilizó un amortiguador "A" con 20 mM imidazol y 15 mL como volumen de elución. Debido a que varios tubos del inicio del pico de elución presentaron contaminantes proteicos de *E.coli* (no se muestra), se decidió realizar una IMAC con mayor concentración de imidazol en el buffer A (50 mM), buscando que dichos contaminantes no se unan a la columna y eluyan en el percolado (fracción no unida). En este caso, la elución con un gradiente lineal de imidazol mostró un único pico bien definido como se puede observar en la Figura 17. En base al registro de la absorbancia a 280 nm, se eligieron los tubos para ser analizados mediante SDS-PAGE. Además, se utilizó el cromatograma para calcular la concentración de imidazol correspondiente al máximo del pico, siendo esta de 260 mM.

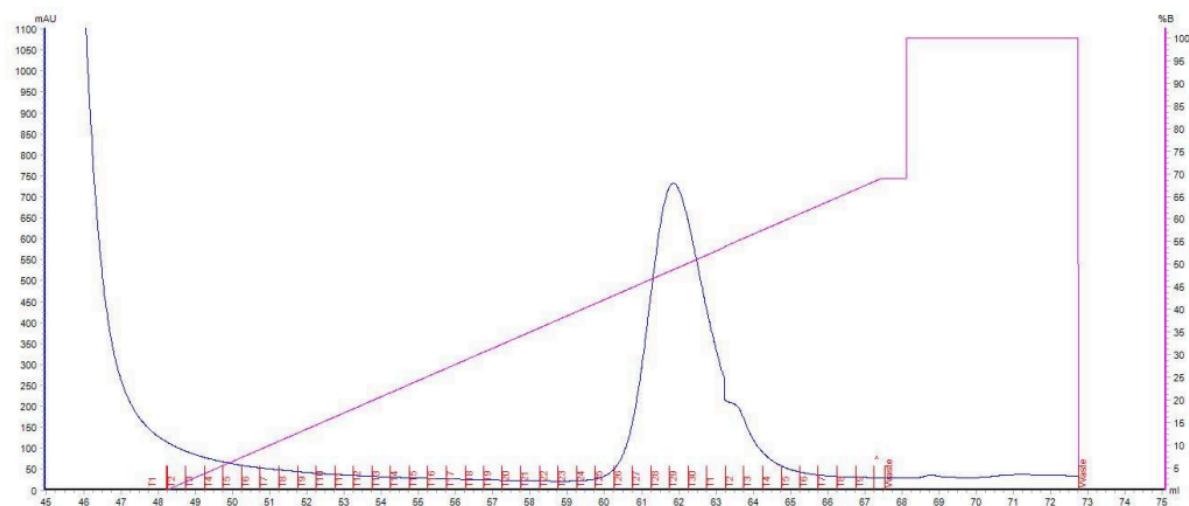


Figura 17. Cromatograma de la IMAC utilizada para la purificación de rEg2DBDβ-EF.

La línea azul representa la absorbancia medida a 280 nm (eje izquierdo). La línea violeta corresponde al gradiente de imidazol utilizado para la elución (% de buffer B, eje derecho).

Las fracciones recolectadas a lo largo del gradiente de elución fueron analizadas por SDS-PAGE. En dicho análisis, se evidenció una banda predominante con la movilidad esperada para la proteína recombinante a lo largo de todo el pico de elución (Figura 18). Sin embargo, al inicio del pico eluyen también varias proteínas contaminantes, por lo que se juntan los tubos desde el 26 al 34 (Figura 17, carril 8 de Figura 18) donde no se visualiza la presencia de contaminantes, indicando un elevado grado de pureza.

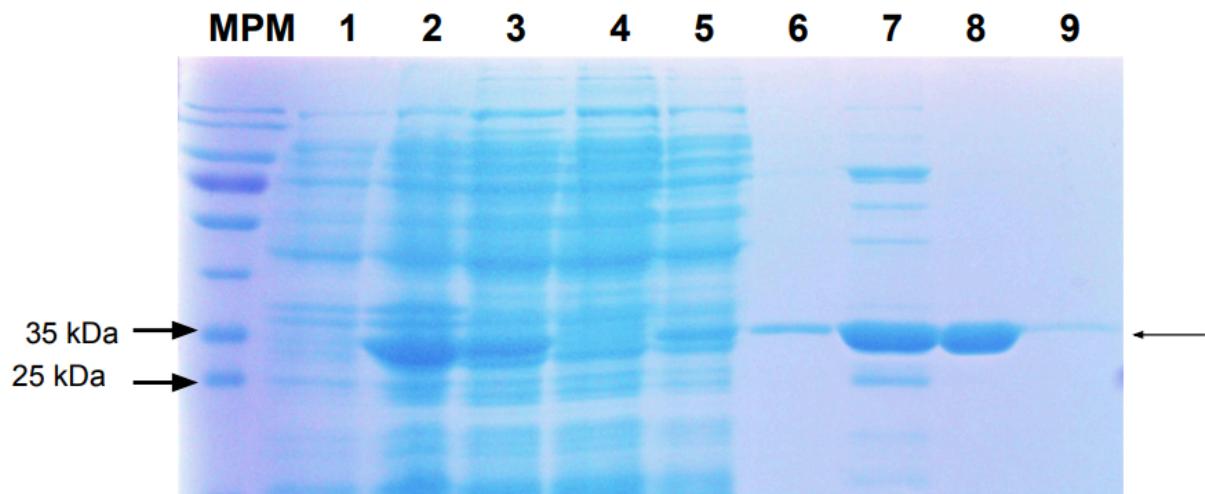


Figura 18. Evaluación de la IMAC mediante SDS-PAGE al 12 %. MPM: PageRuler (Thermo Scientific). **1)** fracción no inducida; **2)** fracción inducida; **3)** muestra cargada en la columna de IMAC; **4)** percolado; **5)** lavado; **6)** primer tubo de elución; **7)** tubo 25 (inicio del pico de elución); **8)** tubos 26 al 34 correspondientes al pico de elución (T34 se muestra en el cromatograma como T4); **9)** tubo del final del pico de elución (tubo 35, mostrado como T5).

La muestra conteniendo las fracciones del pico de elución (T26-34) fue luego dializadas para eliminar el imidazol y reducir la concentración de cloruro de sodio. A posteriori, fue analizada mediante SDS-PAGE, se escindió la banda proteica del tamaño esperado y se confirmó su identidad mediante espectrometría de masa LC-MS/MS (servicio UByPA, Instituto Pasteur). Este análisis mostró una cobertura de secuencia muy alta (263/276 AA, 95,3 %) y un *protein score* de 795.318, siendo el *score* del contaminante más abundante de 51.408, esto indica que la abundancia relativa de la proteína recombinante es también alta (Figura 19).

```

001 HHHHHHGSGS ENLYFQGSTL AEFTQGIERA TDFLRSERMR LKRIRTDQPQ RFTNLDTIER 060
061 VWSQMMRQFV SHTRMVVDFS KLIAGFNRLG INDRRQLIRA AMYPIMLIEL SRDFQNNSSL 120
121 SYNYFDFFPER EKEIIIQRFP PLAKIISHLV QSGKVLRRLK LDDIESTIIC IQELLRHKNE 180
181 LEDPASCEHL FLLSMQALVN HEHQKSKSDA ASERLTAFTQ LLPILNQLNV EHHEVLSQVR 240
241 LQFPHLVFPE LYVEMFAIGA NKEPPHFFRND SNRNDL

```

Figura 19. Cobertura de secuencia de la identificación de rEg2DBD β -EF mediante espectrometría de masa LC-MS/MS.

La proteína purificada se cuantificó mediante espectrofotometría utilizando la absorbancia a 280 nm y el coeficiente de extinción molar teórico ($\epsilon = 13075 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y la Ley de Lambert-Beer, obteniéndose una concentración de 39,7 μM . Con este valor de concentración y el volumen final de la proteína purificada (35 mL) se calculó el rendimiento del proceso de producción y purificación, siendo éste de 56,4 mg/L (proteína recombinante purificada obtenida por litro de cultivo).

5.4. Estudios de unión en PAGE nativo

Posteriormente se realizaron ensayos de unión en PAGE nativo empleando la proteína recombinante purificada y Bp para evaluar si Eg2DBD β sería capaz de unir un análogo de ácido graso. En primer lugar, se evaluaron diferentes relaciones molares de proteína y

Bp, para determinar si la proteína era capaz de unir este ligando y cual es la condición más apropiada para la unión. En la Figura 20 se muestran las condiciones ensayadas en donde la cantidad de proteína disminuye progresivamente mientras que la de Bp aumenta. No se muestra el control negativo con EgTrp debido a que resultó contaminado con el carril 3. Vale la pena mencionar que el amortiguador de carga no contiene colorantes como el azul de bromofenol ya que podría llegar a fluorescer e interferir con la interpretación de los resultados, por lo que se siembra los pocillos del gel sin poder visualizar la muestra. Este ensayo permitió determinar que las mejores condiciones de unión serían con una relación molar proteína:Bp 3:1 (M2: 15 μ L de rEg2DBD β -EF 39,7 μ M con 10 μ L de Bp 20 μ M), ya que la banda fluorescente coincide perfectamente con la banda proteica y es fuerte y discreta, además queda poca cantidad de Bp libre sin unir (*smear*).

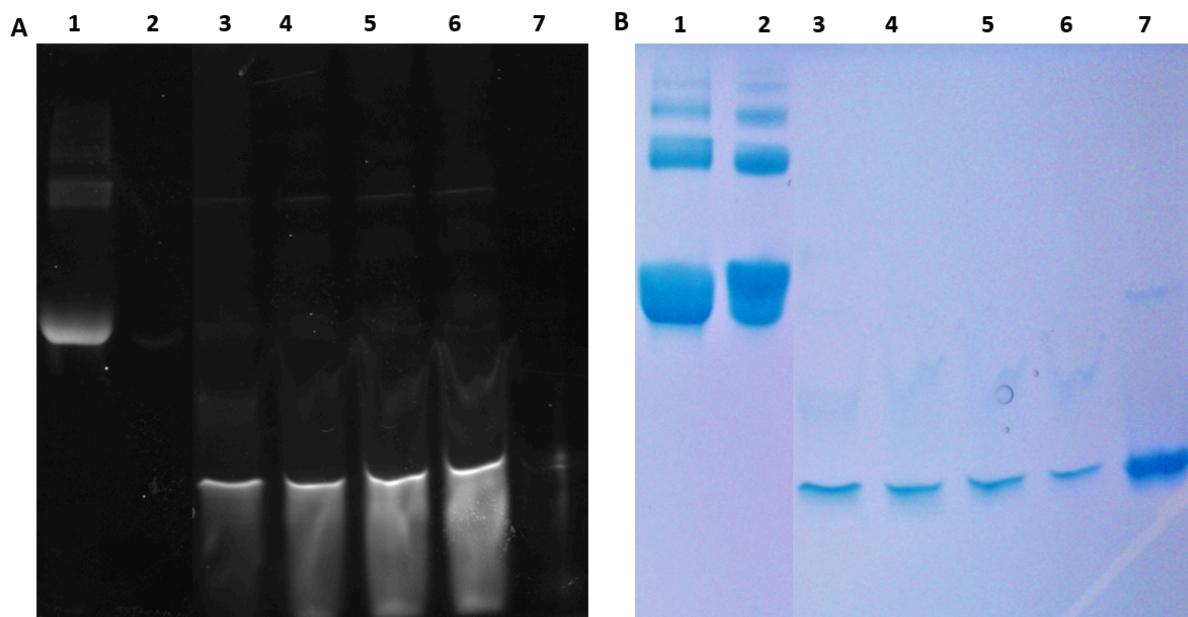


Figura 20. Puesta a punto del estudio de unión de Eg2DBD β -EF con Bp mediante PAGE nativo. **A)** Imagen de señal fluorescente obtenida con G-Box; **B)** Imagen obtenida luego de la tinción con Coomassie Coloidal. **1)** Control positivo (BSA con Bp), **2)** BSA sin Bp, **3)** M1, **4)** M2, **5)** M3, **6)** M4, **7)** Eg2DBD β -EF sin Bp. La composición de las muestras se detallan en el punto 4.5.

Una vez seleccionadas las condiciones óptimas del ensayo, éste se repitió como en M2, y siempre se utilizó 15 μ L de rEg2DBD β -EF 39,7 μ M ya sea con o sin Bp, y 10 μ L de Bp 20 μ M (con o sin proteína). Además, se incluyeron todos los controles necesarios, entre ellos el control negativo con EgTrp y el control de Bp sin proteína (10 μ L de Bp 20 μ M) (Figura 21).

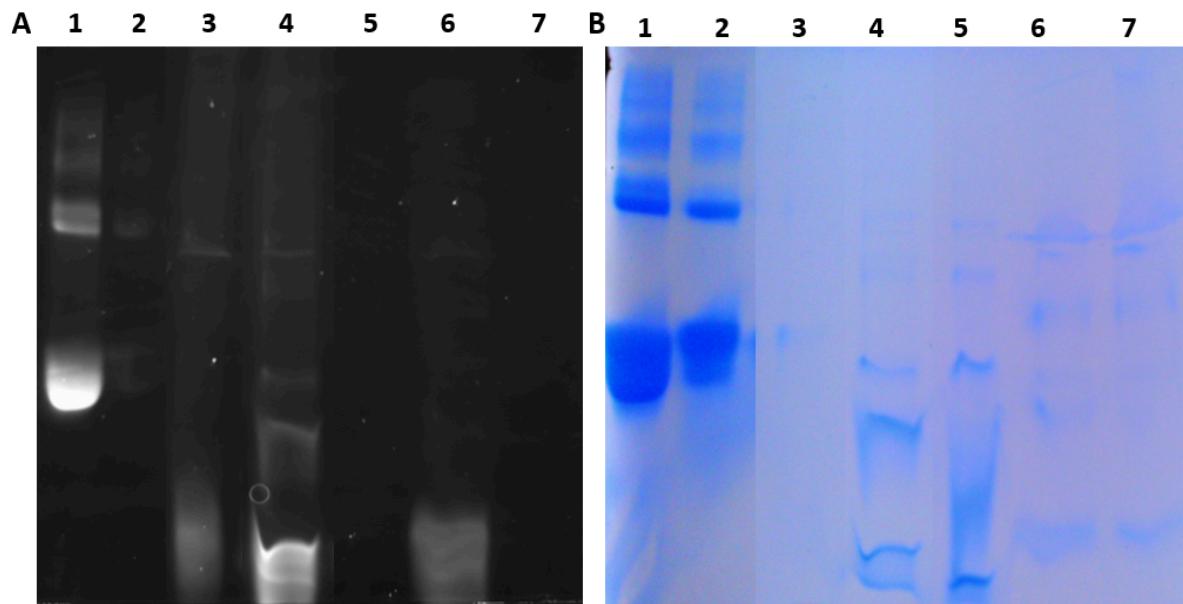


Figura 21. Estudio de unión de Eg2DBD β -EF con Bp mediante PAGE nativo. **A)** Imagen de señal fluorescente obtenida con G-Box; **B)** Imagen obtenida luego de la tinción con Coomassie Coloidal. **1)** Control positivo (BSA con Bp), **2)** BSA sin Bp, **3)** control Bp solo, **4)** proteína rEg2DBD β -EF con Bp, **5)** proteína recombinante sin Bp, **6)** Control negativo (EgTrp con Bp), **7)** EgTrp sin Bp.

En la Figura 21 se observa la unión de Bp a BSA, evidenciada por las diferencias en el patrón de migración del fluoróforo entre los carriles 1 y 3. En contraste, no se detectan variaciones apreciables entre el control negativo con EgTrp (carril 6) y el carril 3 (Bp sin proteína), lo que concuerda con la ausencia de interacción entre EgTrp y Bp. Por otro lado, en el carril correspondiente a la proteína recombinante con Bp (Figura 21 A, carril 4), se observan tres bandas fluorescentes bien definidas (marcadas en la Figura 22) que no se visualizan en el carril 3. Por otro lado, el perfil de migración de las bandas proteicas visualizadas en el carril 4 es diferente al del carril 5 correspondiente a rEg2DBD β -EF sin Bp (Figura 21 B), en el carril 4 se observan dos nuevas bandas y las otras cambian su intensidad relativa. Esto podría indicar que la proteína recombinante (una o más conformaciones) sufre un cambio conformacional al unirse al ácido graso fluorescente, efecto que aparentemente no se observa con la BSA (Figura 21 B, carril 1 y 2). Tres bandas del carril 4 que mostraron fluorescencia, fueron analizadas mediante espectrometría de masas LC-MS/MS para su identificación. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 22, donde el alto índice de cobertura de las tres bandas indica que se han detectado la mayoría de los péptidos de la proteína, lo que permite la identificación de las mismas como rEg2DBD β -EF con una alta confianza. En dichas secuencias, los aminoácidos resaltados en azul corresponden a los péptidos detectados que coinciden con la secuencia teórica, mientras que los aminoácidos en negro representan regiones que no fueron detectadas en las muestras analizadas.

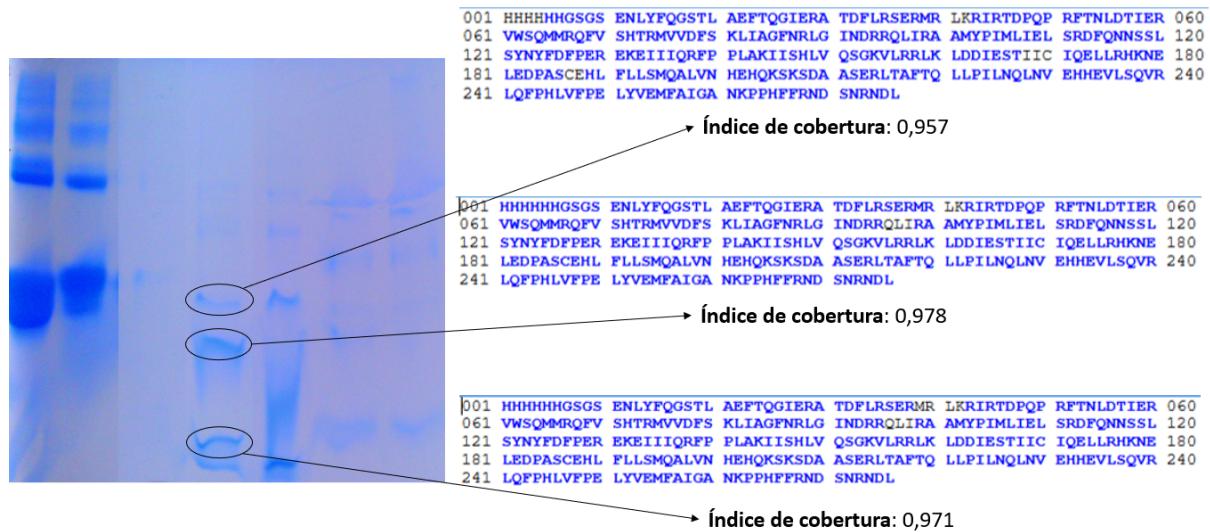


Figura 22. Resultado de espectrometría de masa LC-MS/MS.

6. Discusión

El principal logro de este trabajo fue la obtención de la proteína recombinante Eg2DBD β -EF a partir de bacterias con un alto rendimiento, y de forma purificada y estable. Esto nos permitió posteriormente, evaluar su capacidad de unión de un posible ligando fluorescente mediante un método simple que nos posibilitará el estudio, a futuro, de sus posibles ligandos. A continuación, se discuten los resultados obtenidos en función de los objetivos planteados y se menciona su contribuciones a la construcción del conocimiento sobre el receptor nuclear Eg2DBD β de *E. granulosus*.

En primer lugar, se puso a punto la técnica de RF-Cloning, que nos permitió generar el megacebador correspondiente a la región codificante de Eg2DBD β -EF e insertarlo correctamente en el vector de expresión pT7, en pocos pasos y sin la necesidad de enzimas de restricción específicas y ADN ligasa de altos costos. La posterior secuenciación del plásmido corroboró la identidad del inserto, detectándose únicamente dos cambios nucleotídicos con respecto a la secuencia de la base WormBase Parasite, de los cuales uno sólo produjo un cambio aminoacídico en el dominio F. En cuanto al origen de estas posibles mutaciones, comprobamos que las mismas se encontraban presentes en el plásmido pCRII- β -LBD utilizado como molde en la primera PCR del Rf-cloning. Estos cambios podrían deberse a tres posibles causas: a) el genotipo de los PE (de quistes de pulmón bovino) utilizados para clonar dicho ADNc en el vector pCRII podría ser diferente del de los PE usados para generar la secuencia de la base; b) errores de replicación de la ADN polimerasa Ranger (Bioline) utilizada en el clonado del ADNc mencionado en (a); c) errores en la secuencia de Eg2DBD β (EgrG_000458200) de la base de datos mencionada (<https://parasite.wormbase.org/index.html>). Cabe señalar en relación a la posibilidad (a), que los datos de expresión de la base se obtuvieron de la cepa de *E. granulosus* G1, mientras que los PE de quistes bovinos de *E. granulosus* s.l. utilizados para el clonado, si bien no fueron genotipados podrían ser del genotipo G1 o G5 en base al hospedero (Vuitton et al., 2020). Por otro lado, respecto a (b), la fidelidad de copia de la ADN pol Ranger si bien es mayor que la ADN polimerasa Taq estándar (3,5 veces), no es tan alta como la de las polimerasas de alta fidelidad, como es por ejemplo la enzima Phusion (más de 50 veces mayor que la Taq) utilizada en este trabajo.

De todas formas se discute el posible efecto de dicho cambio aminoacídico. El cambio de AA mencionado consiste en la sustitución de un ácido aspártico por una asparagina en el dominio F del receptor, una región que no siempre está presente en los NRs y es poco conservada. Si bien este dominio no participa directamente en la unión al ligando, se ha demostrado que la eliminación o mutación del mismo altera la transactivación, la dimerización y la respuesta del receptor a la unión del ligando (Patel et Skafar, 2015; Bodofsky et al., 2017). Desde el punto de vista estructural y fisicoquímico, esta sustitución implica el reemplazo de un residuo cargado negativamente a pH fisiológico por uno neutro pero polar, lo que podría llegar a alterar localmente las interacciones electrostáticas. El ácido aspártico, al poseer un grupo carboxilato ionizado, suele participar en interacciones electrostáticas y puentes salinos, mientras que la asparagina tiende a estabilizar la estructura mediante enlaces de hidrógeno debido a su grupo amida. En resumen, el cambio podría afectar sutilmente la estabilidad local del plegamiento proteico o la dinámica conformacional del dominio. Considerando que esta región no constituye un sitio crítico para la unión del ligando (Weikum et al., 2018; Alvite et Esteves, 2025), es probable que el

impacto estructural/funcional sea limitado en las condiciones *in vitro* (no biológicas) utilizadas en este trabajo.

La proteína recombinante purificada en este trabajo se denominó Eg2DBD β -EF, pero no sólo incluye los dominios E y F completos, sino también contiene seis aminoácidos del extremo C-terminal del dominio D (región bisagra) del receptor. Esta corta región del dominio D se incorporó con el objetivo de favorecer el plegamiento adecuado de los dominios E y F, aumentando la probabilidad de obtener una proteína recombinante soluble y funcional en el sistema heterólogo de expresión. La organización modular de los receptores 2DBD de *E. granulosus* fue analizada por Alvite y cols. (2019). Mientras la longitud del dominio E varía poco (234-265 AA) entre los Eg2DBDs, el dominio D presenta importantes diferencias de tamaño (163-413 AA). El modelado molecular de Eg2DBD α .1 entero, muestra que esta región poco conservada es particularmente larga y flexible en comparación con los dominios D de otros NRs (Cancela et al., 2023). Ha sido reportado que su desestructuración le permitiría actuar como una bisagra entre el DBD y el LBD, facilitando transiciones conformacionales inducidas por ligando (Germain et al., 2006; Chandra et al., 2008). En este trabajo decidimos incorporar una pequeña región del dominio D previa al dominio E, pensando que podría favorecer el plegamiento correcto del LBD.

La expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli* constituye una estrategia ampliamente utilizada debido a su rápido crecimiento, bajo costo y facilidad de manipulación genética; sin embargo, su eficacia depende de una adecuada optimización del sistema de expresión (Rosano et al., 2014). Entre los factores más importantes durante esta optimización se encuentra la selección de la cepa bacteriana empleada para la expresión recombinante. En este sentido, BL21(DE3)pLysS y Rosetta(DE3) ofrecen ventajas que responden a distintos desafíos asociados a la expresión heteróloga de proteínas recombinantes. Las cepas DE3 contienen el gen para la enzima T7 ARN polimerasa bajo el control del promotor *lacUV5*. Por un lado, BL21(DE3)pLysS incorpora el plásmido pLysS, que expresa lisozima T7 en bajos niveles y permite reducir de forma efectiva la expresión basal mediada por la T7 ARN polimerasa, evitando así la producción de proteínas potencialmente tóxicas para la célula hospedera y proporcionando un control más estricto del proceso de inducción. Por otro lado, Rosetta(DE3) está diseñada para superar el sesgo de uso de codones que limita la eficiencia de traducción de genes eucariotas en *E. coli*, ya que suplementa tRNAs específicos para codones raros (AGG, AGA, AUA, CUA, CCC y GGA), favoreciendo la traducción y el plegamiento de la proteína recombinante (Rosano et al., 2009). La comparación experimental entre BL21(DE3)pLysS y Rosetta(DE3) (medio LB, 37°C) permitió determinar que esta última genera mayores niveles de proteína recombinante, aunque una proporción considerable de la misma permanece en la fracción insoluble. Este resultado motivó la búsqueda de condiciones más favorables para maximizar la expresión soluble, incluyendo la sustitución del medio LB por TB, y ajustes en la temperatura y el tiempo de inducción. En relación con los medios de cultivo, encontramos que el medio TB permitió obtener un rendimiento proteico superior al registrado en medio LB. Esta diferencia se asocia a la composición nutricionalmente más rica del TB - que incluye triptona, extracto de levadura y glucosa - , la cual favorece un mayor crecimiento celular y una mayor capacidad de síntesis proteica, aspectos fundamentales para aumentar la producción de proteínas recombinantes (Sivashanmugam et al., 2009). Se ha demostrado que la adición de glucosa mejora la expresión al impedir "fugas" de expresión proteica, (especialmente de proteínas tóxicas) mediante la represión del operón *lac* (Kaur et al.,

2018), y al potenciar el crecimiento celular (Mansey et al., 2014). Estos resultados coinciden con antecedentes reportados, donde también se destaca la influencia de la temperatura de expresión (Ayoub et al., 2022). En particular, se ha demostrado que el cultivo en un rango entre 15 °C y 25 °C mejora significativamente el plegamiento correcto de proteínas recombinantes y disminuye su agregación, previniendo así la formación de cuerpos de inclusión insolubles y aumentando el porcentaje de proteína recombinante en la fracción soluble del extracto celular (Vera, et al., 2007). Se ha descrito que en el cultivo a temperaturas bajas, por ejemplo 20 °C, se reduce la tasa de crecimiento bacteriano y la velocidad de síntesis proteica. Esto, si bien disminuye la producción de la recombinante favoreciendo el plegamiento como ya se mencionó, también se traduce en una disminución de las proteínas bacterianas contaminantes y, por ende, en un extracto celular "más limpio" (Ayoub et al., 2022). Por otra parte, las temperaturas bajas contribuyen a minimizar la degradación proteica al disminuir la actividad de proteasas, preservando la integridad de la proteína recombinante (Chesshyre et al., 1989; Ayoub et al., 2022). En este trabajo, la elección de la cepa (Rosetta(DE3)), del medio de cultivo (TB) y las condiciones de inducción (20 °C, 21 hs) nos permitió obtener una fracción soluble enriquecida en rEg2DBDβ-EF. Por lo antedicho, es probable que la recombinante purificada a partir de la fracción soluble se encuentre mayoritariamente en su conformación nativa, ya que se evita someterla a procesos de desnaturación con urea y replegamiento que podrían comprometer su estructura y funcionalidad.

Luego de escalar la producción de rEg2DBDβ-EF, la recombinante se purificó mediante IMAC utilizando un gradiente creciente de imidazol. Aunque una importante cantidad de la recombinante eluye al principio del gradiente contaminada con proteínas de *E. coli*, se logró obtener a rEg2DBDβ-EF con un alto grado de pureza en el pico de elución. El protocolo de purificación utilizado, que incluyó un gradiente más amplio y riguroso que lo habitual (20 mL, solución A con 50 mM de imidazol), permitió que proteínas contaminantes que anteriormente se unían a la columna, en estas condiciones no lo hagan o su unión sea más débil, eluyendo al principio del gradiente. Debido a la eficiencia alcanzada en esta etapa, no fue necesario incorporar pasos adicionales de purificación. El rendimiento del proceso de producción y purificación de rEg2DBDβ-EF fue alto (56,4 mg/L) en relación a la purificación de proteína de unión a ácidos grasos 1 de *E. granulosus* (rEgFABP1) (rendimiento 12,5 mg/L) previamente realizada por nuestro equipo, donde se utilizó otra cepa de *E. coli* y otras condiciones de cultivo e inducción (Alvite et al., 2001). Resumiendo, a través de este trabajo logramos expresar en *E. coli* y purificar en un sólo paso, a rEg2DBDβ-EF sin una proteína de fusión grande, con un rendimiento y grado de pureza alto.

Con el fin de investigar la capacidad de unión a ligandos de rEg2DBDβ-EF, se puso a punto un ensayo de unión en PAGE nativo utilizando un análogo de ácido graso fluorescente de 16 carbonos, similar al ácido palmítico (BODIPY FL-C16). Este simple y económico método ya ha sido utilizado por nuestro grupo de investigación para evaluar la unión de FABPs de *Danio rerio* con BODIPY FL-C5 y BODIPY FL-C12 (Esteves et al., 2016). Mediante este ensayo hemos demostrado que rEg2DBDβ-EF es capaz de unir BODIPY FL-C16 en distintas relaciones molares proteína:ligando, siendo la mejor 3:1. Además, hemos confirmado mediante espectrometría de masa, la identidad de las tres bandas proteicas fluorescentes visualizadas. Debido a que estas bandas corresponden a rEg2DBDβ-EF y tienen distinta movilidad electroforética, sugerimos que podrían ser distintas conformaciones de la misma proteína o incluso homodímeros. Descartamos la posibilidad de que alguna

banda se deba a la proteína recombinante trunca producto de la transcripción o traducción incompleta, ya que la cobertura de secuencia de las espectrometrías de masa muestran que los extremos C-terminales están completos. Por otro lado, también sugerimos que este resultado puede deberse a que la proteína recombinante presente unidos ácidos grasos provenientes del cultivo celular, por ello, proponemos que sería adecuado, a futuro, poner a punto el proceso de dilapidación de la proteína recombinante siguiendo un protocolo ya utilizado por nuestro equipo con Lipidex-1000 (Sigma) (Alvite et al., 2001; Esteves et al., 2016).

Como se menciona en la introducción, existe muy poca información sobre los 2DBD-NRs y muy poco se conoce sobre sus ligandos. Anteriormente, nuestro grupo de investigación ha expresado a Eg2DBD α .1 desde el segundo DBD hasta el C-terminal de forma recombinante en *E. coli* Rosetta(DE3), pero lamentablemente sólo se obtuvo en cuerpos de inclusión (fracción insoluble) aún a bajas temperaturas, resultando ser la proteína desnaturalizada y re-naturalizada inestable (Riera, 2018). Por otro lado, otros estudios de nuestro equipo de investigación determinaron, mediante anclaje molecular, la capacidad de unión del receptor nuclear Eg2DBD α .1 con posibles ligandos. Este estudio reveló que los ácidos grasos insaturados, como el ácido oleico, el linoleico y el araquidónico, serían los ligandos preferidos. Por otro lado, Eg2DBD α .1 presenta una afinidad de unión apenas un poco menor por el ácido palmítico (ácido graso saturado) (Cancela et al., 2022). Los ligandos que fueron seleccionados para este estudio se identificaron en la etapa larvaria de *E. granulosus* y también son ligandos naturales de los receptores nucleares (Thompson, 1995; Weikum et al., 2018). Cabe recordar, que dado que los platelmintos parásitos son incapaces de sintetizar *de novo* ácidos grasos, deben adquirirlos del hospedero, siendo estas moléculas esenciales para su supervivencia. En este sentido los Eg2DBDs podrían estar participando de una posible vía de transducción de señales mediada por AG del hospedero. En esta vía también podría participar EgFABP1 a través de la interacción con algún Eg2DBD para cederle el ligando, de manera similar a lo que ocurre en vertebrados como se menciona en la introducción. El hecho que rEgFABP1 presente una alta afinidad por ácidos grasos de cadena larga insaturados (Alvite et al., 2001) y que dicha proteína se haya localizado en los núcleos de células de PE (Alvite et al., 2016) apoya nuestra hipótesis. Además, como se indica previamente, hemos determinado que Eg2DBD α y Eg2DBD β son los Eg2DBDs con mayores niveles de expresión en PE de *E. granulosus* s.l. (Blanco et al., 2023). En este contexto, resulta muy interesante la identificación de los ligandos de los Eg2DBDs, en particular de Eg2DBD α y Eg2DBD β .

7. Conclusiones y perspectivas

En base a los resultados obtenidos, es posible concluir que este trabajo permitió obtener dos herramientas valiosas para futuros estudios estructurales y funcionales de Eg2DBD β . Por un lado, se logró producir y purificar exitosamente a rEg2DBD β -EF con un alto rendimiento. Planeamos próximamente analizar estructuralmente esta proteína mediante dicroismo circular, para evaluar por ej. si la unión del ligando fluorescente genera cambios conformacionales. Además, nos planteamos determinar su estructura tridimensional mediante cristalografía y difracción de rayos X. También está en nuestros planes generar un anticuerpo policlonal en conejo contra esta proteína recombinante, para poder ser utilizado en un abanico de métodos que aportarán al estudio de su función, como por ej. ensayos de inmunoprecipitación e inmunohistoquímicas.

Por otro lado, en este trabajo demostramos que rEg2DBD β -EF es capaz de unir un análogo de AG fluorescente mediante PAGE nativo. Además, pusimos a punto esta metodología que nos permitirá en un futuro realizar ensayos de desplazamiento o competición con ácidos grasos no marcados, como ha sido descrito por nuestro grupo previamente (Esteves et al., 2016), con el fin de identificar los mejores ligandos de rEg2DBD β -EF. Para caracterizar las propiedades cinéticas de unión, la proteína recombinante purificada puede ser utilizada para estudios de unión *in vitro* con Bodipy FL-C16 u otros posibles ligandos que fluorescen en un ambiente hidrofóbico como ANS y DAUDA. A partir de estos estudios se podrán obtener constantes de disociación (kD) y el número de sitios de unión siguiendo protocolos ampliamente utilizados (Thumser et Storch, 2006; Ibáñez-Shimabukuro et al., 2019; Bélamo et al 2020). Luego, planeamos llevar a cabo ensayos de competición/desplazamiento del ligando fluorescente unido con el o los ácidos grasos no marcados que fueron identificados previamente como posibles ligandos mediante PAGE, de manera similar a los estudios de unión de rEgFABP1 (Alvite et al., 2001). A partir de estos estudios podremos calcular la constante de disociación aparente e identificar las moléculas que se unen con mayor afinidad a rEg2DBD β -EF. Por último, nos planteamos a futuro estudiar la posible interacción de rEg2DBD β -EF con rEgFABP1 mediante PAGE nativo, esperando visualizar un cambio en la movilidad electroforética de los posibles complejos proteicos formados en relación a las proteínas individuales. Otra posible estrategia de estudio de esta interacción putativa sería mediante resonancia plasmónica de superficie, ya que ambas proteínas se obtienen de forma recombinante y purificada. De esta manera, avanzaremos en la identificación de los posibles ligandos e interactores de Eg2DBD β , aportando así al conocimiento de su función y su rol potencial en la biología del parásito. Pudiendo también sembrar las bases para el estudio de los Eg2DBDs como candidatos terapéuticos, ya que los NRs de helmintos parásitos son considerados blanco putativos de nuevas drogas antihelmínticas y además, no existen miembros de la subfamilia 2DBD en los hospederos del parásito. Asimismo, los estudios planteados aportarán a la dilucidación del rol funcional específico de EgFABP1, que no ha sido determinado aún.

En síntesis, el presente trabajo permitió producir y purificar de forma exitosa a los dominios E y F del receptor nuclear 2DBD β de *E. granulosus*, y generó una plataforma experimental para futuros estudios de interacción con ligandos y proteínas, así como para abordajes de caracterización estructural y funcional más profundos.

8. Referencias

- Alvi, M.A. et al. (2023). Revealing novel cytb and nad5 genes-based population diversity and benzimidazole resistance in *Echinococcus granulosus* of bovine origin. *Front. Vet. Sci.* 10: 1191271.
- Alvite, G., Di Pietro, S. M., Santome, J. A., Ehrlich, R., & Esteves, A. (2001). Binding properties of *Echinococcus granulosus* fatty acid binding protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1533(3), 293-302. doi:10.1016/S1388-1981(01)00164-0
- Alvite, G., et Esteves, A. (2009). *Echinococcus granulosus* tropomyosin isoforms: from gene structure to expression analysis. *Gene*, 433(1-2), 40-49.
- Alvite, G. et Esteves, A. (2012). Lipid binding proteins from parasitic platyhelminthes. *Front. Physiol.* 3: 363.
- Alvite, G. et al. (2014). Towards an Understanding of *Mesocestoides vogae* Fatty Acid Binding Proteins' Roles. *PLoS ONE*, 9: e111204
- Alvite, G. et Esteves, A. (2016). *Echinococcus granulosus* fatty acid binding proteins subcellular localization. *Exp. Parasitol.*, 164: 1-4.
- Alvite, G. et al. (2019). Bioinformatic analysis of a novel *Echinococcus granulosus* nuclear receptor with two DNA binding domains. *PLoS ONE*, 14(11): e0224703.
- Alvite, G., et Esteves, A. (2025). Uncovering the diversity of invertebrate nuclear receptors ligands. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 111142.
- Armstrong, E.H. et al. (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. *J. Biol. Chem.* 289: 14941-54.
- Ayoub M, Abouie Mehrizi A, Fazaeli A, Zakeri S, Djadid ND. Optimization of the heterologous expression and purification of *Plasmodium falciparum* generative cell specific 1 in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2022 Oct;198:106126. doi: 10.1016/j.pep.2022.106126. Epub 2022 May 31. PMID: 35661702.
- Aziz A, Zhang W, Li J, Loukas A, McManus DP, Mulvenna J (2011) Proteomic characterisation of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid from sheep, cattle and humans. *J Proteomics* 74(9):1560–1572. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.02.021>.
- Bélgamo, J.A. et al. (2020). Application of target repositioning and in silico screening to exploit fatty acid binding proteins (FABPs) from *Echinococcus multilocularis* as possible drug targets. *J Comput Aided Mol Des.* 2020; 34(12): 1275-1288.
- Bodofsky, S. et al. (2017). Conserved and exapted functions of nuclear receptors in animal development. *Nuclear receptor research*, 4: 101305.
- Blanco, V. et al. (2023). Dimerization, host-parasite communication and expression studies of an *Echinococcus granulosus* 2DBD nuclear receptor. *Parasitology Research*, 122 (9): 2055–2063.
- Brehm, K. et Koziol, U. (2017). Echinococcus-Host Interactions at Cellular and Molecular Levels. *Adv. Parasitol.*, 95: 147-212.
- Brouwers, J.F.H.M. et al. (1997). The incorporation, modification and turnover of fatty acids in adults of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 88: 175.
- Bustos-Bea, V. et al. (2016). Liver hydatid disease: Still a problem. *Med.Clin.(Barc)*, 146:367–371.

- Cancela, S. et al. (2023). Modeling, molecular dynamics and docking studies of a full-length *Echinococcus granulosus* 2DBD nuclear receptor. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 41(4): 1414–1423.
- Castellano, M. (2019). Tesis de maestría en Biotecnología (Facultad de Ciencias). “*Identificación de la proteína Amiloide A del Suero como Potencial Marcador de Infección en el Esturión Ruso*”.
- Casulli, A. et al. (2023). Unveiling the incidences and trends of the neglected zoonosis cystic echinococcosis in Europe: a systematic review from the MEmE project. *Lancet Infect Dis*, 23: e95– 107
- Chandra, V., Huang, P., Hamuro, Y., Raghuram, S., Wang, Y., Burris, T. P., & Rastinejad, F. (2008). Structure of the intact PPAR-gamma-RXRnuclear receptor complex on DNA. *Nature*, 456(7220), 350–356. <https://doi.org/10.1038/nature07413>
- Chesshyre, J.A., Hipkiss, A.R. Low temperatures stabilize interferon α -2 against proteolysis in *Methylophilus methylotrophus* and *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 31, 158–162 (1989). <https://doi.org/10.1007/BF00262455>
- Correa, A. et al. (2014). Generation of a vector suite for protein solubility screening. *Front. Microbiol.*, 5: 67–67.
- 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>
- Escrivá, H., Delaunay, F., Laudet, V., 2000. Ligand binding and nuclear receptor evolution. *BioEssays: News Rev. Mol., Cell. Dev. Biol.* 22, 717–727. [https://doi.org/10.1002/1521-1878\(200008\)22:8<717::AID-BIES5>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1521-1878(200008)22:8<717::AID-BIES5>3.0.CO;2-I).
- Escrivá, H., Bertrand, S., Laudet, V., 2004. The evolution of the nuclear receptor superfamily. *Essays Biochem.* 40, 11–26. <https://doi.org/10.1042/bse0400011>.
- Esteves, A. et al. (2016). Fatty acid binding proteins have the potential to channel dietary fatty acids into enterocyte nuclei., *Journal of Lipid Research* Volume 57, 225-226.
- Evans, R. (2005). The nuclear receptor superfamily: A Rosetta stone for physiology. *Molecular Endocrinology*, 19(6), 1429-1438. doi:10.1210/me.2005-0046.
- Evans, R.M., Mangelsdorf, D.J. (2014). Nuclear receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell*, 157:255– 266.15.
- Frigo, D.E. et al. (2021). Nuclear receptors: from molecular mechanisms to therapeutics. *Essays in biochemistry*, 65(6): 847–856.
- 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>
- Germain, P. et al. (2021). Ligands and DNA in the allosteric control of retinoid receptors function. *Essays in biochemistry*, 65(6): 887–899.
- Gustafsson, J.A. (2016). Historical overview of nuclear receptors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 157: 3–6.
- Hertzel, A.V. et Bernlohr D.A. (2000).The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function. *Trends Endocrinol Metab.*, 11:175 .
- Higuera, N.I.A. et al. (2016). Cystic Echinococcosis. *J. Clin. Microbiol.* 54: 518–523.
- Hoga, M-O. et al. (2024). Cystic Echinococcosis in the Early 2020s: A Review. *Trop. Med. Infect. Dis.*, 9: 36.

- Hostetler, H.A. et al. (2009). L-FABP directly interacts with PPAR in cultured primary hepatocytes. *J. Lipid. Res.*, 50: 1663-1675.
- Ibáñez-Shimabukuro, M. et al. (2019). Structure and ligand binding of As-p18, an extracellular fatty acid binding protein from the eggs of a parasitic nematode. *Biosci. Rep.*, 39(7): BSR20191292.
- Issa, L.L., et al (2001). A.Glucocorticoid receptor-interacting protein-1 and receptor-associated coactivator-3 differentially interact with the vitamin D receptor (VDR) and regulate VDR-retinoid X receptor transcriptional cross-talk. *Endocrinology* 142: 1606–1615.
- Jakobsson, E. et al. (2003). The crystal structure of *Echinococcus granulosus* fatty-acid-binding protein 1. *Biochim. Biophys. Acta*, 1649: 40.
- Kaur, J., Kumar, A., & Kaur, J. (2018). Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. *International journal of biological macromolecules, macromolecules*, 106, 803–822. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.080>
- Kinch, M.S. et al. (2015). Target selection for FDA-approved medicines. *Drug. Discov. Today*, 20: 784–789.
- 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>
- Kumar R, Thompson EB (2003) Transactivation functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator interactions. *Mol Endocrinol* 17:1–10.
- Laudet G, Adelman G. Nuclear receptors. Lonesome orphans. *Curr Biol*. 1995; 5: 124–126. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(95\)00031-5](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(95)00031-5) PMID: 7743173
- Laudet, V. (1997). Evolution of the nuclear receptor superfamily: Early diversification from an ancestral orphan receptor. *Journal Of Molecular Endocrinology*, 19(3), 207-226. doi:10.1677/jme.0.0190207.
- Laudet, 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)
- Laudet, V., & Gronemeyer, H. (2002). The Nuclear Receptor FactsBook. San Diego: Academic Press.
- Larrieu, E. et al. (2019). Control of cystic echinococcosis: Background and prospects. *Zoonoses Public Health*; 1–11.
- Lefebvre, P. et al (1998). Binding of retinoic acid receptor heterodimers to DNA. A role for histones NH₂ termini. *J. Biol. Chem.* 273: 12288–12295.
- Li, H. et al. (2018). Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein Promotes Palmitate-Induced Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis in Macrophages. *Front. Immunol*, 9: 81.
- Li, H-L et al. (2021). A-FABP in Metabolic Diseases and the Therapeutic Implications: An Update. *Int. J. Mol. Sci.*, 22 (17): 9386.
- Mansey MS, Ghareeb, K.A., et al. (2014). Glucose concentration affects recombinant interferon [alpha]-2b production in *Escherichia coli* using thermo-induction system, *J. Appl. Pharmaceut. Sci.* 4 (5) (2014) 1.
- Nari, A. et al. (2003). Resistencia a los antiparasitarios: Estado actual con énfasis en América Latina. *Estudio FAO Producción y Sanidad Animal*. 157, ISSN: 1014-1200.

- Novac, N., & Heinzel, T. (2004). Nuclear Receptors: Overview and Classification. *Current Drug Target -Inflammation & Allergy*, 3(4), 335–346. <https://doi.org/10.2174/1568010042634541>.
- Nuclear Receptor Nomenclature Committee. (1999). A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*, 97(2), 161–163.
- OMS (2020). Echinococcosis: Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es/newsroom/fact-sheets/detail/echinococcosis>
- Patel, S.R., et Skafar, D.F. (2015). Modulation of nuclear receptor activity by the F domain. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 418, 298–305.
- Pavletic, C.F. et al. (2017). Cystic echinococcosis in South America: A call for action. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 41: e42.
- Pawlak, M. et al. (2012). General Molecular Biology and Architecture of Nuclear Receptors. *Curr. Top. Med. Chem.*, 12 (6): 486–504.
- Penrose, A. et al. (2019). Comprehensive study of nuclear receptor DNA binding provides a revised framework for understanding receptor specificity. *Nature communications*, 10 (1): 2514.
- Piazza, A. et al. (2024). Ministerio de Salud de la República Argentina. Boletín Epidemiológico Nacional N°694. Echinococcosis quística/ hidatidosis, pp. 51-62, https://bancos.salud.gob.ar/sites/default/files/2024-03/ben_694_se_9_vf.pdf
- Pórfigo, J.L. et al. (2020). Fatty acid-binding proteins in *Echinococcus spp.*: the family hasgrown. *Parasitol.Res.*, 119(4): 1401–1408.
- Riera, X. (2018). Tesina de grado, Lic. en Bioquímica, Facultad de Ciencias, Udelar: “Identificación y producción de un receptor nuclear perteneciente a una nueva subfamilia en *Echinococcus granulosus*”.
- Rojas-Pincheira, C., Manterola, C., García-Méndez, N., & Totomoch-Serra, A. (2022). Distribución espacial de los Genotipos de *Echinococcus granulosus sensu lato* por hospedero en el continente americano. Revisión sistemática. *Revista médica de Chile*, 150(7), 944-957.
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2009). Rare codon content affects the solubility of recombinant proteins in a codon bias-adjusted *Escherichia coli* strain. *Microbial Cell Factories*, 8, 41. doi:10.1186/1475-2859-8-41
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*, 5, 172.
- Schroeder, F. et al. (2008). Role of fatty acid binding proteins and long chain fatty acids in modulating nuclear receptors and gene transcription. *Lipids*, 43: 1.
- Sivashanmugam, A., Murray, V., Cui, C., Zhang, Y., Wang, J., & Li, Q. (2009). Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein Sci. : Publ. Protein Soc.* 18 (5) (2009) 936–948, <https://doi.org/10.1002/ pro.102>. Epub 2009/04/23, PubMed PMID: 19384993; PubMed Central PMCID: PMCPMC2771296.
- Smyth, J.D. et McManus, D.P. (1989). “The physiology and biochemistry of cestodes”, en *Echinococcus and Hydatid Disease*, R.C.A. Thompson, Oxford, Cambridge University Press, 135-171.
- Suarez, M. (2018). Tesis de Maestría – PEDECIBA Biología, Facultad de Ciencias, Udelar: “Rol de la proteína intestinal de unión a ácidos grasos en el núcleo del enterocito”.
- Tamarozzi, F. et al. (2020). Reinventing the Wheel of *Echinococcus granulosus sensu lato* Transmission to Humans. *Trends. Parasitol.* 36: 427–434.

- Thompson, R.C.A. (2020). The molecular epidemiology of *Echinococcus* infections. *Pathogens*, 9(6), 453.
- Thompson, R.C.A. (2017). Biology and Systematics of *Echinococcus*. *Advances in Parasitology* 95, (Elsevier Ltd).
- Thompson R.C.A. Biology and Systematics of Echicoccus. In: *Echinococcus and Hydatid Disease*. CAB International Publication, Oxford University Press, Oxford, England. 1995
- Tharp, M.E. et al. (2014). A lophotrochozoan-specific nuclear hormone receptor is required for reproductive system development in the planarian. *Developmental biology*, 396(1): 150–157
- Thumser, A. E., & Storch, J. (2007). Characterization of a BODIPY-labeled fluorescent fatty acid analogue. Binding to fatty acid-binding proteins, intracellular localization, and metabolism. *Molecular and cellular biochemistry*, 299(1-2), 67–73. <https://doi.org/10.1007/s11010-005-9041-2>
- Tsai, I.J. et al. (2013). The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature*, 496 (7443): 57-63.
- van den Ent, F. et Löwe, J. (2006). RF cloning: a restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 67:67–74.
- Vera, A., González-Montalbán, N., Arís, A., & Villaverde, A. (2007). The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures. *Biotechnology and bioengineering*, 96(6), 1101-1106.
- Villarino, A. et al. (2005).Proteomic identification of *M. tuberculosis* protein kinase substrates: PknB recruits GarA, a FHA domain-containing protein, through activation loop-mediated interactions. *J. Mol. Biol.*, 350(5): 953–963.
- Vuitton DA, McManus DP, Rogan MT, Romig T, Gottstein B, Naidich A, Tuxun T, Wen H, da Silva AM (2020) International consensus on terminology to be used in the field of echinococcoses. *Parasite* 27:41. <https://doi.org/10.1051/parasite/2020024>
- Wang, Z. et al. (2017). Nuclear receptors: emerging drug targets for parasitic diseases. *J. Clin. Invest.*, 127: 1165-1171.
- Wang, N., Peng, H. Q., Gao, C. Z., Cheng, Y. H., Sun, M. T., Qu, G. L., ... & Lu, D. B. (2022). In vivo efficiency of praziquantel treatment of single-sex *Schistosoma japonicum* aged three months old in mice. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 20, 129-134.
- Wen, H. et al. (2019). Echinococcosis: Advances in the 21st Century. *Clinical microbiology reviews*, 32(2), e00075-18.
- Weikum, E.R. et al. (2018). The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. *Protein Sci.*, 27: 1876–1892.
- WHO (2023). World Health Organization: Neglected Tropical Diseases. https://www.who.int/healthtopics/neglected-tropical-diseases#tab=tab_1
- Woolsey, I.D., Miller, A.L. (2021). *Echinococcus granulosus sensu lato* and *Echinococcus multilocularis*: A review. *Res.Vet.Sci.*135: 517–522.
- Wu, W. et al. (2006). *Schistosoma mansoni* (Platyhelminthes, Trematoda) nuclear receptors: sixteen new members and a novel subfamily. *Gene*, 366: 303–15.
- Wu, W. et al. (2007). Evolution of a novel subfamily of nuclear receptors with members that each contain two DNA binding domains. *BMC. Evol. Biol.*, 7: 27.
- Wu, W. et LoVerde, P.T. (2011). Nuclear hormone receptors in parasitic helminths. *Mol Cell Endocrinol* 334: 56–66.

- Wu, W. et LoVerde, P.T. (2021). Identification and evolution of nuclear receptors in Platyhelminths. PLoS ONE, 16(8): e0250750.
- Wu, W. et LoVerde, P. T. (2023). Updated knowledge and a proposed nomenclature for nuclear receptors with two DNA binding domains (2DBD-NRs). PloS One, 18(9): e0286107
- Xu, P. (2023). Nuclear Receptors in Health and Diseases. Int J Mol Sci., 24(11): 9153.
- Zheng, H. et al. (2013). The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*. Nat. Genet., 45: 1168e1175.

9. Anexo

9.1 Medios de cultivo.

Medios Luria-Bertani (LB): 10 g de peptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de NaC, c.s.p 1 L agua miliRo. Autoclavar.

Medio Terrific Broth (TB): 4.8 g de triptona, 9.6 g de extracto de levadura, 1.6 mL de glicerol, c.s.p. 360 mL agua miliRo. Autoclavar. En condiciones de esterilidad, agregar 40 mL de solución amortiguadora fosfato de potasio $\text{KH}_2\text{PO}_4:\text{K}_2\text{HPO}_4$ (0.17:0.72) M; 800 μL glucosa 10g/L.

9.2 Soluciones amortiguadoras y otras

Solución (sol) amortiguadora de sonicación (500 mM NaCl, 50 mM fosfato de sodio pH 7,4, 10% glicerol). Para 50 mL: 3 mL NaCl 5M, 25 mL buffer fosfato de sodio (100 mM), 5 mL glicerol y agua miliRo hasta completar el volumen.

Sol. amortiguadora de corrida PAGE nativo: (960 mM glicina; 125 mM Tris pH 7,4). Para 500mL de 5X: 36 g de glicina - 7,57 g de Tris.

Sol. amortiguadora de carga PAGE nativo: (30% glicerol; 12% SDS; 0,2 M Tris pH 6,8). Para 2 mL de 6X: 0,6 mL glicerol - 0,24 mL SDS al 10% - 0,8 mL Tris, completar con agua.

Sol. amortiguadora de carga para SDS-PAGE : (5X) 10% de SDS; 50% de glicerol; 500 mM de Tris-HCl pH 6,8; 0,05% de azul de bromofenol; 500 mM de 2-mercaptopropanoal.

Sol. de Coomassie Coloidal: amonio al 10%, ácido fosfórico al 1% (p/p) y Coomassie Blue G-250 al 0,1%

9.3 Programa AKTA:

Fase	Variable	Valor
Configuración del método	Volúmen de la columna	0,962 mL
	Columna	HisTrap FF crude 1mL
	Presión máxima (MPa)	0,3
	Taza de flujo (mL/min)	1,0
Equilibración inicial	Equilibración con concentración de buffer B	0,0
	Volumen de equilibración con buffer A	5,00
Aplicación de la muestra	Volúmen de la muestra (mL)	15,0

	Volumen de arrastre (mL)	0,50
Lavado inicial	Concentración de buffer B para lavado (%B)	0,0
	Volumen de lavado (CV) con buffer A	3,0
Elución y fraccionamiento	Concentración de buffer B para inicio de la elución	0,0
	Acción al último tubo lleno	Pausa
	Volúmen de elución (mL)	0,5
	Concentración de buffer B para el gradiente de elución (%)	69,0
	Volumen total de elución (mL)	20,0
Lavado final	Concentración de buffer B para lavado (%B)	100,0
	Volumen de lavado (CV)	5,0
Equilibración final	Concentración de buffer B para equilibración(%B)	0,0
	Volumen de equilibración(CV) con agua	5,0

9.4 Secuencias:

9.4.1: Cebadores utilizados durante la PCR I de RF-Cloning y durante la PCR colonia:

- **Directo Eg-βLBD-Rf (53 pb):** Tm: 78,7 °C (Macrogen: 73,6; 47% GC).
5'- GGATCGGAAACCTGTATTTCAGGGATCCACTCTTGCAGGAATTACTCAGGG – 3'
- **Reverso Eg-βLBD-Rf (54 pb):** Tm: 83,8 °C.
5'-GAACTGCGGTGGCTCCAGCTGCCGGATCC TCACAAGTCATTCCCTGTTGGAATC- 3'

9.4.2: Cebadores utilizados durante secuenciación por Sanger de plásmido pT7 con vector: Tm = 57°C

- Promotor pT7: 5' - TAATACGACTCACTATAGGG - 3'
- Terminador pT7: 5' - GCTAGTTATTGCTCAGCGG - 3'

9.4.3: Alineamiento de las secuencias obtenidas del plásmido del clon C1 (pT7-beta-C1) con la secuencia de la base WormBase ParaSite (<https://parasite.wormbase.org>) (EgrG_000458200) correspondiente a Eg2DBDβ, con la herramienta Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>). Los asteriscos y flechas indican coincidencia y diferencia de nucleótidos, respectivamente.

Eg2DBD-beta-EF	-----	-----	-----
pT7-beta_C1_T7_mod	NNNTGTTACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAGAGGATCGCATACCATACCATCAC	-----	60
pT7-beta_C1_Beta-Rf-R_mod	-----CCATCNC	-----	7
Eg2DBD-beta-EF	-----ACTCTTGGAGAATTTACTCAGGGA	-----	24
pT7-beta_C1_T7_mod	GGTAGCGGATCGGAAAACCTGTATTCAGGGATCCACTCTTGGAGAATTTACTCAGGGA	-----	120
pT7-beta_C1_Beta-Rf-R_mod	GGTAGCGGATCGGAAAACCTGTATTCAGGGATCCACTCTTGGAGAATTTAcTCAGGGA	*****	67
Eg2DBD-beta-EF	ATCGAGCGAGCCACTGATTTCTCGATCTGAACGCATCGGGTAAACGGATCAGGACT	-----	84
pT7-beta_C1_T7_mod	ATCGAGCGAGCCACTGATTTCTCGATCTGAACGCATCGGGTAAACGGATCAGGACT	-----	180
pT7-beta_C1_Beta-Rf-R_mod	ATCGAGCGAGCCACTGATTTCTCGATCTGAACGCATCGGGTAAACGGATCAGGACT	*****	127
Eg2DBD-beta-EF	GATCCGCAGCCCAGATTCAACCAACTTGGACACCATGAACTGTTCTGGCAGATGATG	-----	144
pT7-beta_C1_T7_mod	GATCCGCAGCCCAGATTCAACCAACTTGGACACCATGAACTGTTCTGGCAGATGATG	-----	240
pT7-beta_C1_Beta-Rf-R_mod	GATCCGCAGCCCAGATTCAACCAACTTGGACACCATGAACTGTTCTGGCAGATGATG	*****	187
Eg2DBD-beta-EF	CGGCAGTTCTTACACACTAGAACATGGTCGATTTCTCGAAAGCTTATCGGGGCTTC	-----	204
pT7-beta_C1_T7_mod	CGGCAGTTCTTACACACTAGAACATGGTCGATTTCTCGAAAGCTTATCGGGGCTTC	-----	300
pT7-beta_C1_Beta-Rf-R_mod	CGGCAGTTCTTACACACTAGAACATGGTCGATTTCTCGAAAGCTTATCGGGGCTTC	*****	247
Eg2DBD-beta-EF	AATCGGCTGGGCATCAACGACAGAACAGCAGTTGATTTCGCGCTGCCATGTATCCATTATG	-----	264
pT7-beta_C1_T7_mod	AATCGGCTGGGCATCAACGACAGAACAGCAGTTGATTTCGCGCTGCTATGTATCCATTATG	-----	360
pT7-beta_C1_Beta-Rf-R_mod	AATCGGCTGGGCATCAACGACAGAACAGCAGTTGATTTCGCGCTGCTATGTATCCATTATG	*****	307
Eg2DBD-beta-EF	CTGATAGAACTAAGCAGAGACTTTCAAGAACACAGCAGTCTCTTACAACACTTTGAT	-----	324
pT7-beta_C1_T7_mod	CTGATAGAACTAAGCAGAGACTTTCAAGAACACAGCAGTCTCTTACAACACTTTGAT	-----	420
pT7-beta_C1_Beta-Rf-R_mod	CTGATAGAACTAAGCAGAGACTTTCAAGAACACAGCAGTCTCTTACAACACTTTGAT	*****	367
Eg2DBD-beta-EF	TTCCCGGAGCGTGAAGAAAGAAATCATAATTAGCGCTTCCCTCCCTCGAAAAATAATC	-----	384
pT7-beta_C1_T7_mod	TTCCCGGAGCGTGAAGAAAGAAATCATAATTAGCGCTTCCCTCCCTCGAAAAATAATC	-----	480
pT7-beta_C1_Beta-Rf-R_mod	TTCCCGGAGCGTGAAGAAAGAAATCATAATTAGCGCTTCCCTCCCTCGAAAAATAATC	*****	427
Eg2DBD-beta-EF	TCCCACCTCGTCCAGTCGGGGAAAGGTTCTCGACGCTTGAAGTTGGACGACATAGAGAGC	-----	444
pT7-beta_C1_T7_mod	TCCCACCTCGTCCAGTCGGGGAAAGGTTCTCGACGCTTGAAGTTGGACGACATAGAGAGC	-----	540
pT7-beta_C1_Beta-Rf-R_mod	TCCCACCTCGTCCAGTCGGGGAAAGGTTCTCGACGCTTGAAGTTGGACGACATAGAGAGC	*****	487
Eg2DBD-beta-EF	ACCATTATATGTATACAGGAACCTTAAGACACAAGAACGAGCTGGAGATCCGGCTTC	-----	504
pT7-beta_C1_T7_mod	ACCATTATATGTATACAGGAACCTTAAGACACAAGAACGAGCTGGAGATCCGGCTTC	-----	600
pT7-beta_C1_Beta-Rf-R_mod	ACCATTATATGTATACAGGAACCTTAAGACACAAGAACGAGCTGGAGATCCGGCTTC	*****	547
Eg2DBD-beta-EF	TGCGAACACCTCTTCCCTATCCATGCAGGCCCTGGTGAACCATGAACATCAAAATCC	-----	564
pT7-beta_C1_T7_mod	TGCGAACACCTCTTCCCTATCCATGCAGGCCCTGGTGAACCATGAACATCAAAATCC	-----	660
pT7-beta_C1_Beta-Rf-R_mod	TGCGAACACCTCTTCCCTATCCATGCAGGCCCTGGTGAACCATGAACATCAAAATCC	*****	607
Eg2DBD-beta-EF	AAGTCAGATGCAGCAAGCGAACGTTGACAGCATTACGCAACTCTGCCGATATTGAAT	-----	624
pT7-beta_C1_T7_mod	AAGTCAGATGCAGCAAGCGAACGTTGACAGCATTACGCAACTCTGCCGATATTGAAT	-----	720
pT7-beta_C1_Beta-Rf-R_mod	AAGTCAGATGCAGCAAGCGAACGTTGACAGCATTACGCAACTCTGCCGATATTGAAT	*****	667
Eg2DBD-beta-EF	CAGTTGAACGTAGAACATCACGAAGTGTGAGTCAGTCAGTCCGCTGCAGTCCCCCACCTC	-----	684
pT7-beta_C1_T7_mod	CAGTTGAACGTAGAACATCACGAAGTGTGAGTCAGTCAGTCCGCTGCAGTCCCCCACCTC	-----	780
pT7-beta_C1_Beta-Rf-R_mod	CAGTTGAACGTAGAACATCACGAAGTGTGAGTCAGTCAGTCCGCTGCAGTCCCCCACCTC	*****	727
Eg2DBD-beta-EF	GTTTTCCCGAGCTATGTCGAGATGTTGCCATCGGGCCATAAGCCACCTCACTTC	-----	744
pT7-beta_C1_T7_mod	GTTTTCCCGAGCTATGTCGAGATGTTGCCATCGGGCCATAAGCCACCGCaCTTC	-----	840
pT7-beta_C1_Beta-Rf-R_mod	GTTTTCCCGAGCTATGTCGAGATGTTGCCATCGGGCCATAAGCCACCGCa-----	*****	778
Eg2DBD-beta-EF	TTTCGGAACGATTCCAACAGGAATGACTTGTGA-----	-----	777
pT7-beta_C1_T7_mod	TTTCGGAACGATTCCAACAGGAATGACTTGTGAAGGATCGGCCAGCTN-----	-----	887
pT7-beta_C1_Beta-Rf-R_mod	-----	-----	778

