



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Universidad Nacional Autónoma de México
Maestría en Ciencias (Neurobiología)
Instituto de Neurobiología

**COMPARACIÓN MOLECULAR DE LAS DESYODASAS EN
VERTEBRADOS**

Tesis que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias (Neurobiología)
presenta
la Biól. Aurora María Olvera Vidal

Tutor principal:

Dr. Carlos M. Valverde Rodríguez, Instituto de Neurobiología, UNAM.

Miembros del Comité Tutor:

Dr. Antonio Lazcano Araujo, Facultad de Ciencias, UNAM.

Dr. Gonzálo Martínez de la Escalera Lorenzo, Instituto de
Neurobiología, UNAM

Dra. Teresa Edith Garay Rojas, Instituto de Neurobiología, UNAM

Dr. Michael Conrad Jeziorski, Instituto de Neurobiología, UNAM

Campus Juriquilla, Querétaro. Noviembre 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado de examen certificamos que la tesis elaborada por: Aurora María Olvera Vidal, cuyo título es: "Comparación molecular de las desyodasas en vertebrados" se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dr. Antonio Lazcano Araujo

Secretario (Tutor)

Dr. Carlos Valverde Rodríguez

Vocal

Dr. Gonzálo Martínez de la Escalera Lorenzo

Suplente

Dra. Teresa Edith Garay Rojas

Suplente

Dr. Michael Conrad Jeziorski

Aprobado por el Comité Académico

Coordinador del Programa

Resumen

COMPARACIÓN MOLECULAR DE LAS DESYODASAS EN VERTEBRADOS

Las Desyodasas de yodotironinas (Ds) pertenecen a la familia de las selenoenzimas y comprenden 3 isotipos: D1, D2 y D3. Estas enzimas son determinantes en la regulación de la bio-disponibilidad de las hormonas tiroideas (TH), removiendo secuencial y estéreo-específicamente, los átomos de yodo de la molécula de TH. Así, la desyodación del anillo externo (ORD) de la T₄ genera productos activos, mientras que la del anillo interno (IRD) produce metabolitos inactivos. La D2 y la D3 catalizan exclusivamente las vías ORD e IRD, respectivamente, mientras que la D1 cataliza ambas vías. La identificación de la región en la proteína que les confiere esta selectividad catalítica aún no se conoce. El modelaje *in silico* sugiere que el arreglo estructural de las Ds incluyen 4 dominios funcionales: TM (transmembranal), H (hinge), L (linker) y G (globular). Inicialmente alineamos secuencias de aminoácidos (n=67), y encontramos que el dominio G que incluye la región catalítica, es muy similar entre los 3 isotipos (60%), mientras que los dominios TM, H y L son más variables (20%). Estos hallazgos nos permitieron dividir las secuencias en 2 grandes regiones: “región variable” (RV) y “región conservada” (RC), lo que nos llevó a proponer que la selectividad de las Ds depende, en cierta medida, del arreglo estructural de la RV. Con el fin de probar esta hipótesis construimos una quimera intercambiando la RV de la D2 y D3, su caracterización mostró que a pesar de contener el sitio catalítico (RC) de la D2 ésta exhibió actividad IRD.

Summary

MOLECULAR COMPARISON OF VERTEBRATE DEIODINASES

Iodothyronine deiodinases (Ds) belong to the family of selenoenzymes and comprise three distinct isotypes: D1, D2 and D3. Ds are crucial in regulating the bioavailability of thyroid hormones (TH), by sequentially and stereo-specifically removing iodine atoms from the TH molecule. In this way, T₄ outer-ring deiodination (ORD) generates the bioactive products, while its inner-ring deiodination (IRD) produces the inactive metabolites. While D2 and D3 exclusively catalyze the ORD and IRD pathways, respectively, D1 catalyzes both; however, the identification of the protein region that confers this catalytic selectivity is to date unknown. *In silico* studies suggest that the molecular arrangement of the three paralogs includes four functional domains: TM (transmembranal), H (hinge), L (linker), and G (globular). We initially aligned Ds protein sequences (n=67) and found that the G domain that includes the catalytic region, is very similar between the 3 paralogs (60% identity), while the TM, H, and L domains stand as the most variable (20%). This information allowed us to divided Ds sequences into 2 major regions: “variable region” (VR) and “conserved region” (CR), and led us to propose that the selectivity of Ds depends, to some extent, on the VR arrangement. In order to test this hypothesis we constructed D2 and D3 chimera interchanging VR. The characterization of this chimera showed that despite containing the catalytic site of D2 (CR) exhibited IRD activity.

Agradecimientos

Al Dr. Carlos Valverde por haber tenido la confianza en mí, por despertar siempre el espíritu de la curiosidad y por compartir sus conocimientos.

A la Dra. Aurea Orozco por tener siempre un momento de apoyo, por instruirme y por ser tan paciente.

A la M. en C. Paty Villalobos por el continuo apoyo que he recibido de tu parte, por ser una guía en el laboratorio y por tu amabilidad.

A la Dra. Edith Garay y el Dr. Manuel Aguilar, miembros de mi comité tutorial que me han acompañado y ayudado desde el inicio de este proyecto, por su gran actitud propositiva y por su apoyo constante.

A mis compañeros de laboratorio Gaby, Pamela, Edna, Arturo, César, gracias por su amistad y ayuda en todo momento.

A Miguel Ángel Maqueda que siempre está dispuesto a dar una mano con la mejor disposición.

A las personas que laboran en el INB las cuales me apoyaron en la realización de este proyecto:

Dra. Teresa Morales Coordinadora de la Maestría en Ciencias (Neurobiología); M. en C. Leonor Casanova de la Unidad de Posgrado; Dra. Anaid Antaramián y M. en C. Adriana González de la Unidad de Proteogenómica, y al Dr. Francisco Javier Valles y demás miembros de la Biblioteca.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
Becario No: 288937

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM
Becario No. 51101505-8

Índice

Introducción	1
Antecedentes.....	3
Fisiología de las hormonas tiroideas	3
Morfología general de la glándula tiroidea y folículo tiroideo	3
Hormonas tiroideas. Síntesis y secreción.....	4
Eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides (HHT).....	6
Desyodasa de Yodotironinas	7
Desyodasa Tipo1 (D1)	8
Desyodasa Tipo 2 (D2)	9
Desyodasa Tipo 3 (D3)	10
Antecedentes Específicos	11
Planteamiento del problema e hipótesis.....	13
Objetivo general	13
Objetivos particulares	14
Métodos.....	15
1. Análisis <i>in silico</i>	15
1.1. Banco de información.....	15
1.2. Análisis de identidad y filogenético.	15
2. Análisis <i>in vitro</i>	16
2.1. Construcción de la enzima quimérica.....	16
2.2. Expresión de la quimera QD3D2 de <i>Ch. punctatum</i> en ovocitos de <i>X. laevis</i>	16
2.3. Cuantificación de la actividad enzimática.....	20
Resultados.....	22

1. Análisis <i>in silico</i>	22
1.1. Banco de información y análisis <i>in silico</i> de las Desyodasas	22
1.2. Análisis filogenético	24
1.2.1. Filogenia de las Desyodasas de vertebrados	24
1.2.2. Filogenia de la RV de las Desyodasas en vertebrados	25
1.2.3. Filogenia de la RC de las de las Desyodasas en vertebrados	25
2. Análisis <i>in vitro</i>	29
2.1. Construcción de quimeras	29
2.2. Expresión de la quimera QD3D2 de <i>Ch. punctatum</i> en ovocitos de <i>X. laevis</i>	332
2.3. Cuantificación de la actividad enzimática	332
Discusión	39
Conclusiones	44
Referencias	45
Anexos	49
Cuadro 1. Desyodasas de Yodotironinas. Principales	49

Índice de figuras

Figura 1. Estructura general de yodoaminoácidos precursores.....	5
Figura 2. Vías de Desyodación de las Yodotironinas.....	8
Figura 3. Obtención de fragmentos RV y RC de las Desyodasas D2 y D3 de <i>Ch. punctatum</i>	17
Figura 4. Construcción de la quimera QD3D2.....	18
Figura 5. Alineación de secuencias de aminoácidos de las Ds.....	23
Figura 6. Reconstrucción filogenética de las Desyodasas en vertebrados.....	26
Figura 7. Reconstrucción filogenética de la región variable de las Desyodasas.....	27
Figura 8. Reconstrucción filogenética de la región conservada de las Desyodasas.....	28
Figura 9. Aislamiento de fragmentos RV, RC e hibridación D2/D3.....	29
Figura 10. Colonias transformadas con la quimera QD3D2.....	30
Figura 11. Alineación de las secuencias de las Desyodasas tipo 2 y 3 de tiburón, y la quimera QD3D2.....	31
Figura 12. Obtención del mRNA de QD3D2, D3 y D2.....	32
Figura 13. Cinética rT ₃ -ORD D2 recombinante.....	34
Figura 14. Porcentaje de desyodación de la D3.....	35
Figura 15. Actividad ORD.....	36
Figura 16. Actividad IRD.....	37
Figura 17. Ensayo de inhibición competitiva para la quimera QD3D2 y para la D3.....	38

Índice de tablas

Tabla 1. Porcentaje de identidad de las desyodasas de yodotironinas.....	24
--	----

Introducción

Las hormonas tiroideas (TH) o yodotironinas son una familia singular de aminoácidos modificados que contienen átomos de yodo en su molécula y que exclusivamente se sintetizan en la glándula tiroides. La síntesis y secreción de las TH está finamente regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT), y su desyodación periférica se considera la vía final común y último eslabón funcional en la regulación del HHT (Valverde-R *et al.*, 2004). La desyodación de las TH se lleva a cabo por dos rutas o vías enzimáticas diferentes: la de activación y la de inactivación. En la primera, la desyodación ocurre en el anillo externo de la hormona y se conoce como ORD por la abreviatura del inglés: *outer ring deiodination*. En el caso de la segunda, la desyodación ocurre en el anillo interno y se denomina IRD por su abreviatura del inglés: *inner ring deiodination*. Estas rutas metabólicas están catalizadas por una familia de proteínas llamadas desyodasas de yodotironinas (Ds) y se conocen 3 tipos: D1, D2 y D3. Mientras que la D2 y D3 catalizan exclusivamente la vía de activación e inactivación, respectivamente; la D1 cataliza ambas (Leatherland *et al.*, 1990; Larsen *et al.*, 1998; Valverde-R *et al.*, 1998). A la fecha ninguna de las Ds ha sido purificada debido en parte a su baja expresión y a que son proteínas integrales de membrana. Esta situación ha impedido identificar con certeza la región de la proteína que les confiere la selectividad catalítica. Sin embargo, estudios recientes de modelaje de proteínas, sugieren que el arreglo molecular de los tres parálogos incluye cuatro dominios funcionales que por sus siglas en inglés se denominan: TM (*transmembrana*), H (*hinge*), L (*linker*) y G (*globular*); (Callebaut *et al.*, 2003).

Tomando como punto de partida este modelo de los cuatro dominios y como se verá con mayor detalle más adelante, en una primera aproximación para estudiar algunos aspectos de estructura-función de esta familia enzimática, decidimos alinear y comparar las secuencias de aminoácidos de las desyodasas reportadas para diferentes especies (n=67, D1=21; D2=22; D3=23). Los resultados de este acercamiento computacional revelaron que en los 3 parálogos el dominio G es muy similar (60% de identidad); mientras que los dominios TM, H y L son los más variables (20% de identidad). Sin embargo, interesantemente, estos tres dominios variables están relativamente conservados entre ortólogos:

D1 50%; D2 55% y D3 60%. Esta información nos llevó a dividir las secuencias de las Ds en 2 grandes regiones: la primera mitad o “región variable” (RV) incluye los dominios TM, H y L, mientras que la segunda mitad corresponde a la “región conservada” (RC) que contiene el dominio G. Igualmente, esta información nos permitió proponer como hipótesis de trabajo que la selectividad catalítica de las Ds depende en cierta medida de la RV. Así, la presente tesis se diseñó para corroborar o descartar esta hipótesis y en ella se incluyen los resultados de dos enfoques experimentales complementarios. Por una parte y empleando recursos de biología computacional, se realizaron análisis filogenéticos que sugieren que la RV ha estado bajo una presión selectiva laxa, permitiendo mutaciones que redundan en la ganancia de novedades fisiológicas y permiten a cada especie contender y adaptarse a las variaciones ambientales. Por otra parte y utilizando técnicas de biología molecular, se construyó una enzima quimérica que posee la RV de la D3 y la RC de la D2. Esta quimera presentó actividad IRD a pesar de contener el sitio catalítico de la D2, robusteciendo la hipótesis de que la RV determina en gran medida la selectividad catalítica de los miembros de esta familia enzimática.

Con el propósito de ubicar en su contexto fisiológico el trabajo realizado, en la primera parte de esta tesis se revisan de manera resumida los aspectos más relevantes acerca de la función de la glándula y las hormonas tiroideas; así como de las desyodasas. Posteriormente se plantean los antecedentes específicos y la hipótesis del trabajo; así como los objetivos y los materiales y métodos utilizados. Después, se presentan y describen los resultados y en seguida la discusión y las conclusiones.

Antecedentes

Fisiología de las hormonas tiroideas

Las hormonas tiroideas (TH) o yodotironinas son una familia singular de aminoácidos modificados que contienen átomos de yodo en su molécula y que exclusivamente se sintetizan en la glándula tiroides. Su síntesis y secreción depende del aporte de yodo en la dieta y está finamente regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT); (McNabb, 1992; Larsen et al, 1998; Valverde-R et al, 1998; Valverde-R *et al.*, 2004; Richardson et al, 2007). Es importante enfatizar que los elementos esenciales que componen al eje HHT están altamente conservados en todos los vertebrados y que la producción, almacenamiento y secreción de las hormonas tiroideas ocurre exclusivamente en la glándula tiroides.

Morfología general de la glándula tiroidea y folículo tiroideo

La glándula tiroides varía su forma dentro del grupo de vertebrados. En los ciclóstomos y la mayoría de los teleósteos el tejido tiroideo está presente en folículos dispersos o en grupos de folículos en la región faríngea. En peces elasmobranquios, reptiles y mamíferos la glándula tiroides es un órgano que se encuentra en la mayoría de los casos en la región ventral del cuello (en tortugas y serpientes se localiza cerca del corazón). Sin embargo, e independientemente de esta heterogeneidad anatómica, en todos los casos la unidad funcional y estructural de la glándula es el folículo tiroideo.

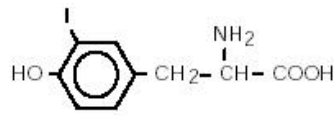
El folículo tiroideo es una estructura esférica que consiste de una monocapa de células epiteliales llamadas tirocitos la cual rodea al lumen. El lumen es un espacio extracelular cerrado que está lleno de un fluido proteínico rico en una glucoproteína específica de la glándula, llamada tiroglobulina o Tg y que contiene las TH almacenadas. La glándula tiroidea es única entre los órganos endocrinos y su cito-arquitectura, altamente organizada, le permite almacenar grandes cantidades de hormona en un espacio extracelular. La estructura del folículo exhibe una gran uniformidad a través de las clases de vertebrados. La monocapa de tirocitos está rodeada por una membrana plasmática continua, la

cual consiste de una membrana apical (adyacente al lumen), una membrana basal (en la superficie externa del folículo), y membranas laterales (haciendo contacto con células adyacentes en la pared folicular). Estas partes de la membrana plasmática llevan a cabo diferentes funciones y exhiben diferencias en su composición citoquímica, reflejando la polaridad de la estructura y la función de las células foliculares (Geven *et al.*, 2007; McNabb, 1992).

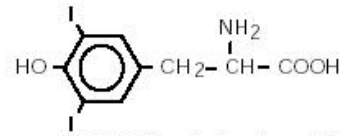
Hormonas tiroideas. Síntesis y secreción

Las hormonas tiroideas y sus metabolitos son derivados yodados del aminoácido L-tirosina el cual se encuentra formando parte de la estructura de la Tg. Esta glucoproteína con un peso molecular de ~660 000 Daltons es el precursor de las TH y es producida por los tirocitos del folículo tiroideo. Como ya se mencionó, la síntesis de las hormonas tiroideas es un proceso metabólico complejo y exclusivo de la glándula tiroides. En un primer paso catalizado por la peroxidasa tiroidea o TPO, los átomos de yodo se incorporan (organifican) al aminoácido tirosina de la Tg. Así, y dependiendo del número de yodos incorporados se forman los precursores de TH: la monoyoditirosina (MIT) y la diyodotirosina (DIT) (**Figura 1**). Estos yodoaminoácidos, también en una reacción catalizada por la TPO, se acoplan y forman las yodotironinas o TH propiamente dichas. Dos DITs forman una tetrayodotironina también llamada tiroxina o T₄, la cual se sintetiza exclusivamente en la glándula tiroides y es la principal hormona secretada por la glándula. La unión de una MIT y una DIT forman triyodotironina (T₃), la cual es la hormona biológicamente activa y puede ser producida en tejidos extratiroideos por medio de la desyodación de la T₄ (Larsen *et al.*, 1998; McNabb 1992; Valverde *et al.*, 2004).

Precusores

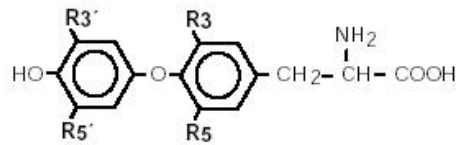


3-monoyodotirosina (MIT)



3,5-diyodotirosina (DIT)

Núcleo de la Tironina



Nombre común	Símbolo	Substituyentes				Nombre sistemático
		R ₃	R _{3'}	R ₅	R _{5'}	
Tiroxina	T ₄	I	I	I	I	3,3',5,5'-Tetra-yodo-L-tironina
Triyodotironina	T ₃	I	I	I	H	3,3',5-Tri-yodo-L-tironina
Triyodotironina reversa	rT ₃	I	I	H	I	3,3',5'-Tri-yodo-L-tironina
3, 5 -Tironina	3,5-T ₂	I	H	I	H	3,5-Di-yodo-L-tironina
3, 3'-Tironina	3,3'-T ₂	I	I	H	H	3,3'-Di-yodo-L-tironina
3',5'-Tironina	3',5'-T ₂	H	I	H	I	3',5'-Di-yodo-L-tironina

Figura 1. Estructura general de yodoaminoácidos precursores. MIT, DIT y principales miembros de la familia de las yodotironinas (Modificado de Valverde *et al.*, 2004).

Eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides (HHT)

En todos los vertebrados, la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas está regulada por una cascada de mensajeros neuroendócrinos, ésta inicia en el hipotálamo con la secreción de la hormona hipotalámica liberadora de la hormona estimulante de la tiroides o TRH (por sus siglas del inglés: *thyrotropin releasing hormone*). Esta neurohormona actúa sobre receptores de membrana de las células de la glándula hipófisis llamadas tirotrópos, estimulando la elevación del calcio intracelular y modificando la composición de carbohidratos de la hormona estimulante de la tiroides o TSH (por sus siglas del inglés: *thyroid stimulating hormone*), para así regular su síntesis y secreción. La TSH es una glucoproteína con un peso molecular de 28,000 a 30,000 Da, que consiste de dos subunidades α y β . Por otra parte, las TH interactuando con los receptores nucleares del tirotrópo hipofisario y a través de un mecanismo de retroalimentación negativa, inhiben la transcripción del mensajero de las subunidades α y β de la TSH. La concentración de TH determina el grado de inhibición o de secreción de la TSH, ya que su concentración es inversamente proporcional (García-G *et al.*, 2007; Richardson *et al.*, 2007)

La TSH liberada por la hipófisis actúa sobre las células foliculares o tirocitos de la glándula tiroides regulando la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas. Las TH, a través de un mecanismo de retroalimentación negativa o positiva, regulan de manera precisa la operación de la cascada neuroendocrina hipotálamo-hipofisiaria, inhibiendo o estimulando la síntesis y liberación de TRH y de TSH. Las TH actúan modificando la expresión génica, mediadas por los receptores nucleares a TH (TRs). Los TRs son factores de transcripción dependientes de ligando, y la biodisponibilidad intracelular de las TH finalmente es controlada por las desyodasas de yodotironinas (Ds). Las Ds activan e inactivan a las TH en tejidos periféricos por medio de la remoción estereoespecífica de los átomos de yodo en un proceso conocido como desyodación. La desyodación se considera la vía final común y el mecanismo órgano-específico que determina la concentración intracelular de hormona activa o inactiva (McNabb 1992; Larsen *et al.*, 1998; Leonard & Köhrle, 2000; Valverde-R *et al.*, 1998; Valverde *et al.*, 2004).

Desyodasas de Yodotironinas

El papel de las Ds en la homeostasis de las TH es crítico, y debido a la multifuncionalidad de estas hormonas en las diferentes etapas de vida de los vertebrados las Ds son actualmente una de las fronteras en el conocimiento y comprensión de la fisiología tiroidea (Braverman *et al.*, 1970; Salvatore 2011; Solís-Sainz *et al.*, 2010). El estudio de esta familia enzimática ha enriquecido el concepto de control pre-receptor; es decir, del conjunto de mecanismos que intervienen en el ajuste fino y selectivo, tanto local como sistémico, de la acción nuclear de los mensajeros endocrinos lipofílicos: esteroides, yodotironinas, retinoides, vitamina D (Köhrle, 2007; Nobel *et al.*, 2001; Solís-Sainz *et al.*, 2010).

Las desyodasas comparten similitudes estructurales; todas ellas son homodímeros que conforman proteínas integrales de membrana de entre 29 y 33 kDa, y sus genes presentan una alta homología especialmente en la secuencia que corresponde al sitio activo (Bianco *et al.*, 2002; Gereben *et al.*, 2008a; Orozco & Valverde, 2005). Por sus características catalíticas y operacionales se reconocen tres diferentes desyodasas: D1, D2 y D3 (**Cuadro 1, anexo**). Los tres isotipos son proteínas integrales de membrana cuya ubicación subcelular (D1 y D3 en membrana plasmática, D2 en retículo endoplásmico), les permite regular de manera precisa la biodisponibilidad intracelular de yodometabolitos activos e inactivos (Baqui *et al.*, 2000; Bianco & Kim, 2006; Gereben *et al.*, 2008b; Toyoda *et al.*, 1995; Vivek-Sagar, *et al.*, 2008). Como se esquematiza en la **Figura 2**, las diferentes yodotironinas son producidas a partir de la T_4 por la remoción secuencial y estereo-específica de los átomos de yodo que ellas contienen. La desyodación del anillo externo (ORD, del inglés *outer-ring deiodination*) de la T_4 y la T_3 , genera yodometabolitos activos (T_3 y $3,5-T_2$, respectivamente) y por esta razón se conoce como la vía de activación. La vía ORD está catalizada por la D1 y la D2. Por el contrario, la desyodación del anillo interno (IRD, del inglés *inner-ring deiodination*), forma yodometabolitos inactivos (rT_3 , $3,5'-T_2$, $3,3'-T_2$) y por ello se conoce como la vía de inactivación. La vía IRD está catalizada por la D3 y D1 (Bianco & Kim, 2006; Solís-Sainz *et al.*, 2010; St Germain *et al.*, 2009).

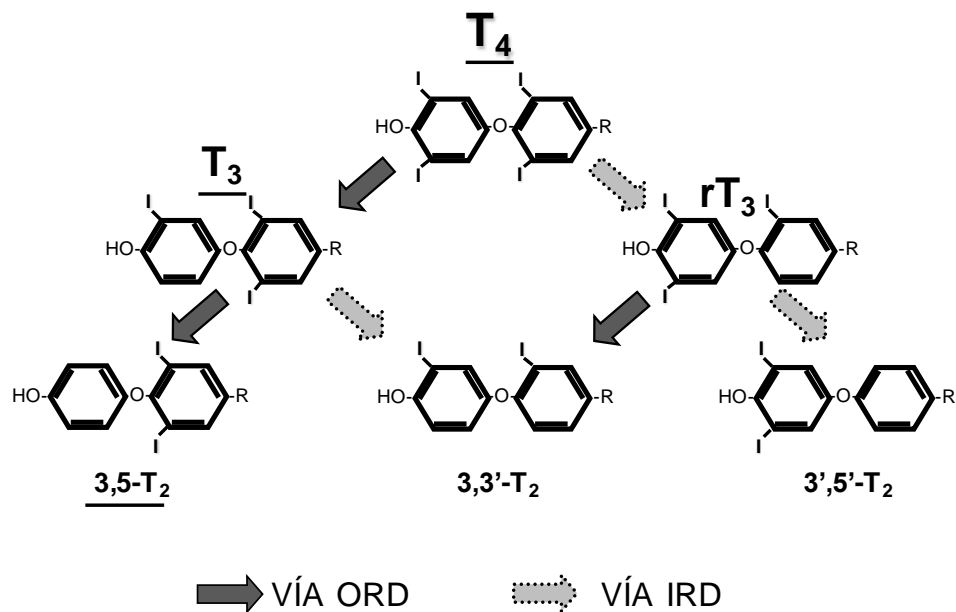


Figura 2. Vías de Desyodación de las Yodotironinas. A partir de la tetrayodotironina o T_4 , la desyodación secuencial del anillo externo (vía ORD) genera tironinas activas (T_3 y $3,5-T_2$). Por el contrario, la desyodación del anillo interno (vía IRD) da lugar a la formación de hormonas inactivas (rT_3 ; $3',5'-T_2$). Se muestran subrayadas las yodotironinas activas. (Modificada de Valverde *et al.*, 2004).

Desyodasa Tipo1 (D1)

Esta desyodasa cataliza la remoción de los átomos de yodo tanto del anillo interno (IRD) como del externo (ORD) de la hormona, pudiendo convertir T_4 a T_3 , o rT_3 y T_3 o rT_3 en $3,3'-T_2$ (**Figura 2**). Su expresión y actividad son reguladas positivamente por la concentración de T_3 . El gen que codifica para la desyodasa tipo I (*dio1*) presenta entre 4 y 5 exones en mamíferos, está bajo el control de promotores SP1 y contiene dos sitios TRE en la región 5', los cuales pueden unir TR o receptores para ácido retinoico (RXR). Se han encontrado al menos 14 transcritos de D1 en humano los cuales varían en cuanto a su longitud, sin embargo, la relevancia funcional de estos transcritos aún no se conoce (Gereben *et al.*, 2008a). La D1 es una proteína integral de membrana plasmática que presenta su sitio catalítico orientado hacia el citosol. Su peso molecular es de alrededor de 27 kDa y su vida media es relativamente larga, >12h. Para su actividad catalítica la D1 requiere de cofactores que contienen grupos tiol. Este proceso es sensible a la inhibición por propiltiouracilo (PTU); aunque en algunos

vertebrados como *Oreochromis*, *Fundulus* y *Xenopus*, esta sensibilidad es reducida (Sanders *et al.*, 1999; Orozco *et al.*, 2002). Los sustratos preferenciales de la D1 *in vitro* son la rT_3 y las tironinas sulfatadas, con una K_m en el rango micromolar. Cuando el anillo hidroxil-fenólico de la T_4 se encuentra sulfatado, se bloquea la desyodación del anillo externo y se facilita la del anillo interno; es decir, la inactivación de la T_4 (Bianco *et al.*, 2002).

El patrón de expresión de la D1 es variable entre las especies. En mamíferos la enzima es abundante en el hígado, riñón y en la tiroides. Se ha detectado también en las branquias y el cerebro de peces; el páncreas de reptiles, y en el estómago de aves y mamíferos. Anteriormente se pensaba que la D1 era la principal enzima que activaba TH, siendo responsable de la mayoría de la producción de T_3 extratiroidea. Sin embargo, esta idea ha sido cambiada al paso de los años, diversos estudios demuestran que es la D2 y no la D1 la fuente responsable de la mayor concentración de T_3 circulante. Se ha demostrado que la D1 juega un papel esencial en un estado tiroideo alterado, manteniendo un balance de las TH; y en un estado eutiroideo es activa en el reciclaje de yodo, aclarando la concentración de rT_3 (Gereben *et al.*, 2008b; Larsen *et al.*, 1998; Orozco *et al.*, 1997; Valverde *et al.*, 2004).

Desyodasa Tipo 2 (D2)

Se trata de una enzima que solo cataliza la vía ORD; es decir, únicamente activa TH. Se ha propuesto que la función de la D2 es la de asegurar el aporte de T_3 a la célula que expresa esta enzima. Por esta razón, juega un papel determinante durante los periodos críticos de desarrollo fetal en donde el aporte de T_3 es indispensable para la neurogénesis y la mielinogénesis (Gereben *et al.*, 2008b; Orozco *et al.*, 2000). La D2 es codificada por el gen *Dio2* y la extensión de sus mRNAs varía de 5 a 8 Kb, aproximadamente. Dentro de la familia de las desyodasas, el mensajero de la D2 es el más conservado con un 77% de identidad molecular dentro del marco abierto de lectura. El mRNA de la D2 tiene una vida media de aproximadamente 2h (*in vitro*), y se ha sugerido que la 3' UTR contribuye a esta vida media corta probablemente por la existencia de motivos

AUUUA dentro de esta región del mensajero. En la mayoría de los vertebrados la enzima se expresa predominantemente en el cerebro, hipófisis, tejido adiposo así como en la glándula tiroidea, el músculo esquelético y el corazón. Por sus propiedades bioquímicas y moleculares la D2 se considera la principal fuente extra-tiroidea de T_3 . Además, en la vida adulta, la D2 que se expresa en músculo esquelético representa la principal fuente de T_3 extra-tiroidea (Gereben *et al.*, 2008^a; McLeese *et al.*, 2000; Valverde *et al.*, 2004).

La D2 es regulada de manera proporcionalmente inversa por el aporte de TH. En el hipotiroidismo se observa un marcado incremento de la actividad de la enzima, mientras que el hipertiroidismo disminuye su actividad. Los mecanismos de acción a través de los cuales actúan las TH son complejos e involucran procesos tanto pre- como postraduccionales. (Gereben *et al.*, 2008a; Larsen *et al.*, 1998; Leonard & Köhrle, 2000; Valverde *et al.*, 1998).

En peces, la actividad desyodativa es mayor en el hígado, pero también ocurre en otros tejidos como el cerebro, intestino, riñón y branquias (Orozco & Valverde, 2005). El gen de la D2 del pez teleosteo *Fundulus heteroclitus* (*FhDio2*) tiene dos elementos funcionales responsivos a osmolaridad (Lopez-Bojorquez *et al.*, 2007).

Desyodasa Tipo 3 (D3)

Esta desyodasa se considera la principal enzima que inactiva a las TH y cataliza la conversión de T_4 a rT_3 y de la T_3 a $3, 3'$ T_2 , productos que son biológicamente inactivos. Así, la D3 contribuye a la homeostasis de las TH protegiendo a los tejidos que la expresan y asegurando su exposición óptima a estas hormonas. Durante la embriogénesis, la D3 es crítica para dicha homeostasis, ya que un exceso o una exposición prematura del embrión a niveles hormonales tiroideos adultos puede ser perjudicial resultando en malformaciones, crecimiento alterado, retraso mental o en el peor de los casos la muerte (Bianco *et al.*, 2002; Valverde *et al.*, 2004).

La clonación del *dio3* mostró que es uno de esos genes raros de los eucariotas que no presentan intrones. El promotor de *dio3* contiene una caja

TATA, dos cajas CAAT y muchos repetidos GC en la región próxima a la región traducible. La expresión de *dio3* da como resultado un transcrito de 2.1 kb que codifica una proteína de 32 kDa aproximadamente. Como los otros miembros de la familia de las desyodasas, la D3 es una proteína integral de membrana con un residuo Sec en el centro catalítico; sin embargo, éste se localiza extracelularmente. Su K_m está en el rango nanomolar, tiene una vida media de 12 hrs y su actividad no es sensible a la inhibición por PTU (Gereben *et al.*, 2002; Sanders *et al.*, 1999; Valverde *et al.*, 2004).

La expresión de la D3 es elevada en el embrión de mamíferos en tejidos como el hígado, cerebro, gónadas, pulmón, corazón, intestino y piel, pero en el adulto también se ha encontrado expresada en el hígado, cerebro y piel. En renacuajos de *Xenopus* la actividad D3 se expresa en extremidades en formación, retina y en la cola durante distintas etapas de desarrollo. La actividad D3 es finamente regulada por el estatus tiroideo, de manera positiva en estados de hipertiroidismo, mientras que en el hipotiroidismo ocurre lo contrario (Gereben *et al.*, 2008b).

Antecedentes Específicos

Las 3 desyodasas muestran una similitud considerable (~50% de identidad en su secuencia), sin embargo, debido a que ellas tienen importantes diferencias como la preferencia de sustrato, propiedades cinéticas, vidas medias y sensibilidad a inhibidores; la idea general que se tenía era que su estructura tridimensional era substancialmente diferente. Este concepto prevaleció hasta hace poco tiempo, en parte por las dificultades que existen para purificar estas enzimas ya que son proteínas integrales de membrana y presentan una alta inestabilidad durante su aislamiento (Bianco & Larsen; 2005).

A la fecha ninguna de las tres Ds conocidas se ha logrado purificar; sin embargo, utilizando el análisis de cúmulos de hidrofobicidad (HCA), se ha propuesto que su arreglo estructural comprende cuatro dominios funcionales que son críticos para la homodimerización y actividad catalítica de la enzima. A partir del extremo amino-terminal, estos dominios se conocen como: TM (*transmembrana*), H (*hinge*), L (*linker*) y G (*globular*). Es pertinente señalar que los límites entre los dominios H y L son ambiguos y que la literatura generalmente

los refiere como los dominios H-L que conectan TM con G (Callebaut *et al.*, 2003; Gereben *et al.*, 2008a; Vivek-Sagar *et al.*, 2008). El sitio activo de las Ds se localiza en el dominio G y por esta razón también se conoce como dominio catalítico. El dominio G comprende ~15 aminoácidos altamente conservados en las tres desyodasas y presenta la característica singular de contener al aminoácido selenocysteína (SeCys). Este residuo, considerado por algunos autores como el aminoácido 21, es crítico para la reacción de desyodación y la maquinaria enzimática celular específica para su síntesis e incorporación a la proteína es prácticamente universal a las selenoproteínas en los eucariontes (Chavatte *et al.*, 2005; Small-Howard *et al.*, 2006).

Recientemente en nuestro laboratorio se clonó, expresó y caracterizó por primera vez, la actividad y estructura molecular de la D3 en un condricio (Mayorga *et al.*, 2008) y en un reptil (Villalobos *et al.*, 2010). Nuestros resultados revelaron que entre los miembros de la familia desyodasa, los parálogos de la D3 se distinguen por la composición y el arreglo del dominio H. Se trata de un dominio variable entre especies y que es relativamente rico en residuos de prolina (P). El dominio está conservado entre las diferentes clases de vertebrados y el número de residuos de P aumenta a lo largo de la escala filogenética. Estas características del dominio H son singulares a la D3; están parcialmente presentes en la D1 y, con excepción del tiburón, no existen en la D2 (Villalobos *et al.*, observaciones no publicadas). En este contexto, es importante enfatizar que entre los ortólogos de las desyodasas, la D2 y la D3 desyodan selectivamente el anillo externo y el interno de las TH; respectivamente. Es decir, la D2 solo produce yodotironinas activas (T_3 y $3,5-T_2$) y la D3 inactivas (rT_3 y $3,5'-T_2$). En contraste, la D1 cataliza ambas reacciones. Como se describe más ampliamente en la sección de resultados, estos hallazgos nos llevaron a realizar diferentes análisis *in silico* y encontramos que el dominio G es muy similar en los 3 parálogos con un 60% de identidad, mientras que los dominios TM, H y L son las regiones más variables con un 20% de identidad. Sin embargo, interesantemente, estos dominios están relativamente conservados entre ortólogos: D1 50%; D2 55% and D3 60%. Esta información nos permitió dividir las secuencias de las Ds en 2 grandes regiones: la primera mitad incluye los dominios TM, H y L la cual

denominamos “región variable” (RV), mientras que la segunda corresponde al dominio G y la denominamos “región conservada” (RC).

Planteamiento del problema e hipótesis

Tomando en cuenta que la selectividad catalítica de los diferentes ortólogos de las desyodasas no se ha analizado de manera sistemática, y que la RV de las Ds está altamente conservada entre ortólogos y es variable entre parálogos, la hipótesis general del presente trabajo plantea que:

La selectividad catalítica y las características operacionales de los diferentes parálogos de las Ds dependen, en cierta medida, del arreglo estructural de la RV.

Como primera aproximación para corroborar o descartar esta hipótesis, en este proyecto proponemos, inicialmente, analizar *in silico* la estructura de las tres desyodasas (D1, D2, D3) en diferentes clases de vertebrados y, a partir de estas aproximaciones computacionales, diseñar experimentos para realizar construcciones quiméricas entre las proteínas D2 y la D3 que son los dos parálogos que presentan selectividad catalítica específica. Además realizaremos el análisis filogenético de una y otra región: variable y conservada, pues resulta razonablemente válido proponer que la primera es el blanco evolutivo de la innovación funcional de esta familia enzimática.

Objetivo general

Determinar si la selectividad catalítica de la D2 y D3 para actuar sobre uno u otro anillo (ORD o IRD, respectivamente), depende en cierta medida del arreglo molecular de la RV.

Objetivos particulares

1. Análisis *in silico*

1.1. Crear un banco de información con las secuencias de aminoácidos de las Ds en las especies para las que se encuentre reportada, identificar la RV y la RC para cada una.

1.2. Realizar un análisis *in silico* de identidad para cada desyodasa entre las diferentes especies, así como también un análisis filogenético.

2. Análisis *in vitro*

2.1. Construcción de una enzima quimérica entre las Desyodasas D2 y D3 del tiburón *Chiloscyllium punctatum*, intercambiando sus respectivas RV y RC.

2.2. Expresión de la quimera en ovocitos de *Xenopus laevis*.

2.3. Realizar una cuantificación de la actividad enzimática de la quimera y compararla con la actividad de las nativas (D2 y D3).

Métodos

1. Análisis *in silico*

1.1. Banco de información.

Se obtuvieron las secuencias de aminoácidos de las desyodasas reportadas en los bancos de información ENSEMBL y NCBI (<http://www.ensembl.org>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Solo se tomaron en cuenta aquellas proteínas que fueron caracterizadas bioquímica y/o molecularmente, excluyendo las variantes y proteínas “predichas” a partir de genomas.

Para identificar la RV y RC en las desyodasas, se realizaron alineaciones empleando el formato MUSCLE. En estas alineaciones se identificaron visualmente los dominios TM, H, L y G tomando como referencia el estudio de Callebaut *et al* 2003, donde se identifican dichos dominios en humano y ratón. Una vez identificados los dominios en cada parólogo realizamos la separación de las 2 regiones: RV que consta de las TM, H y L; y la RC que incluye el dominio G, el cual invariablemente inicia con los aminoácidos RPL en los 3 parálogos.

1.2. Análisis de identidad y filogenético.

Los porcentajes de identidad se analizaron por separado para cada región y para cada parólogo, empleando diferentes programas de dominio público (DNAMAN <http://www.lynnon.com/>; GENRUNNER <http://www.generunner.net/>).

El análisis filogenético y de evolución molecular se realizó en el paquete MEGA versión 5 (Tamura, Peterson, Stecher, Nei and Kumar 2011), con una prueba de *Neighbour Joining* (NJ) y Bootstrap de 500 replicas; para las secuencias de la proteína completa con un árbol de raíz, y para las secuencias de las RV y RC por separado con un árbol sin raíz.

2. Análisis *in vitro*

2.1. Construcción de la enzima quimérica.

Para la construcción de una enzima quimérica intercambiando las respectivas RV/RC, se utilizó cDNA de la D2 y D3 de *Chiloscyllium punctatum* previamente clonadas y caracterizadas en nuestro grupo de trabajo. Dichas desyodasas incluyen el elemento SECIS al extremo 3' el cual es indispensable para la incorporación de la SeCys.

Para obtener los fragmentos de cDNA correspondientes de cada región (RV ~ 400 pb y RC ~800 pb) se diseñaron los oligonucleótidos híbridos específicos QD2Tib1 y QD3Tib2 (**Figura 3**). Estos oligonucleótidos, en cada caso, contienen la mitad de la secuencia correspondiente a la región de una desyodasa y la segunda mitad de la secuencia corresponde con la región de la otra desyodasa, como se ilustra en la **Figura 3**. Se utilizaron también oligonucleótidos específicos para los extremos de cada desyodasa (SD2 y ASD2 para la D2; SD3 y ASD3 para la D3) que incluyen además sitios de corte para las enzimas *Nco1* y *Not1*.

La amplificación de los fragmentos se realizó con un protocolo de PCR convencional de 25 ciclos con las siguientes condiciones: 94°C X 40"; 58°C X 60"; 72°C X 90". Los productos del PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1% en una solución amortiguadora TE 1X (Tris 10mM, EDTA 1mM). Para la purificación del DNA en el gel se utilizó el sistema de extracción Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, según las instrucciones del proveedor y el DNA aislado fue eluído con agua destilada y estéril.



Oligo: QD2Tib1: GACTATAGTCGAGGGGCGCGACCCTTGGTGGTCAAC
Oligo: QD3Tib2: GTTGACCACCAAGGGTTCGCGCCCCTCGACTATAGTC
Oligo: SD2: TTTCCATGGGTTTGCAGTGTGACCTGCT
Oligo: ASD2: TTTGCGGCCGCAAAGTCAAACATTACCTT
Oligo: SD3: TTTCCATGGATCTCCTGAAAGAGATAGTGGCTATT
Oligo: ASD3: TTTGCGGCCGCCCCTGGAATATTTATTATAAAATATAAT

Figura 3. Obtención de fragmentos RV y RC de las Desyodasas D2 y D3 de *Ch. punctatum*. En la parte inferior de la figura se observa la secuencia de los oligonucleótidos utilizados, en la parte superior se esquematiza el sitio de unión de dichos oligonucleótidos para la obtención de fragmentos correspondientes para cada desyodasa. Los oligonucleótidos SD2 y ASD3 corresponden a la porción 5' de la D2 y 3' de la D3, respectivamente.

Una vez obtenidos los fragmentos, se prosiguió con la construcción de la quimera uniendo las regiones RV de la D3 y RC de la D2, (**Figura 4**) mediante PCR de hibridación, como se describe a continuación: en un primer paso, se hibridan los fragmentos RVD3 y RCD2 en una reacción sin oligonucleótidos por 25 ciclos (94°C X 60"; 55°C X 60"; 72°C X 60"). En un segundo paso se añaden los oligonucleótidos correspondientes (sentido: SD3 + antisentido: ASD2) que permiten la amplificación del nuevo templado híbrido de los extremos 5' y 3' (94°C X 60"; 55°C X 60"; 72°C X 90") por 35 ciclos, con una última etapa de extensión para asegurar la clonación a 72°C durante 20 minutos.

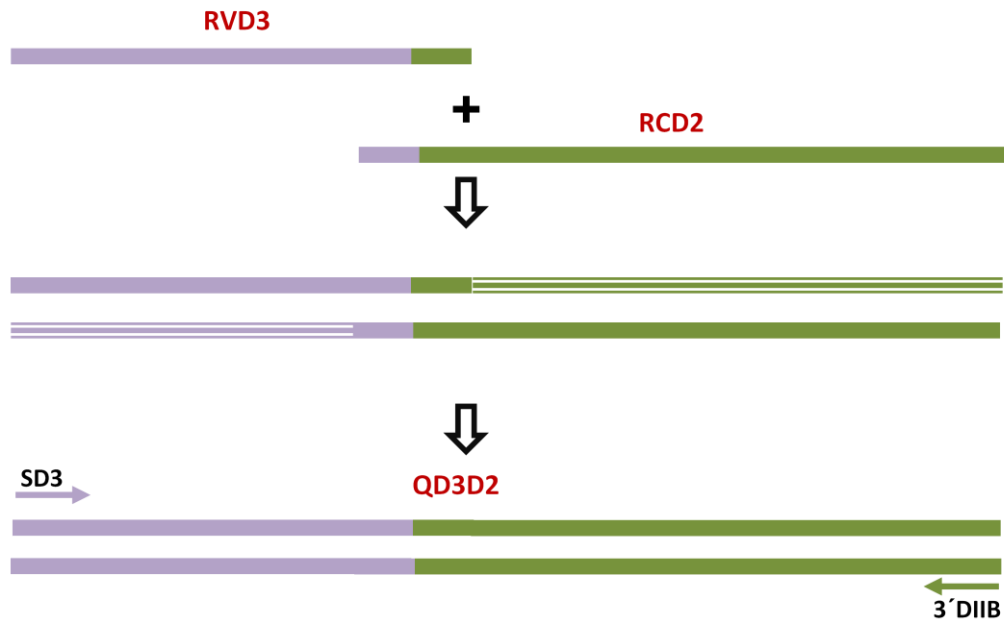


Figura 4. Construcción de la quimera QD3D2. Se esquematiza la hibridación entre los fragmentos RV de la D3 y RC de la D2 para la obtención de la quimera QD3D2.

El producto del PCR amplificado comprendió alrededor de 1200 pb que incluyen la RV de la D3 y la RC de la D2 se corrió en un gel de agarosa al 1% y se purificó con el sistema de extracción Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit previamente descrito. Este producto el cual será referido como quimera QD3D2, se ligó al vector pGEM-T (Promega™) para su clonación. Este vector abierto permite la clonación (T/A) por complementariedad con los extremos del producto del PCR, el cual presenta una deoxiadenosina simple (A) en ambos extremos 3' adicionada por la TAQ polimerasa Platinum®. La reacción de ligación fue la siguiente: 2.5µl 2x rapid ligation buffer (60mM Tris-HCl (pH 7.8), 20mM MgCl₂, 20mM DTT, 2mM ATP and 10% PEG) + 1.75µl QD2D3 cDNA + 0.25µl pGEM-T + 0.5µl T4 DNA ligasa. Se incubó a temperatura ambiente por 2 días.

La reacción de ligación se transformó, es decir, la construcción del DNA plasmídico se introdujo en células competentes de la cepa DH5α de *E. coli*, mediante choque térmico según el siguiente protocolo: las células se descongelaron a 4°C y al vial (100 µl) se le agregó 10µl de la reacción de ligación y se incubó por 30 minutos a 4°C; el vial con las células competentes más la reacción de ligación se calentó 2 minutos a 42°C y se le agregó 200µl de medio SOC a 4°C y se incubó por 5 minutos a 4°C, tiempo después del cual se incubó

en agitación (320rpm) a 37°C por 3hrs. Las células transformadas (100µl) se sembraron en cajas petri con medio LB + 4µL de IPTG y 40µl de X-gal y se incubaron a 37°C por 24hrs. Se seleccionaron las colonias blancas.

Se realizó un segundo tamizaje de colonias blancas para corroborar que las colonias contenían el fragmento del tamaño esperado. Este tamizaje consistió en una amplificación por PCR de la quimera clonada. Para esto, se utilizaron como iniciadores oligonucleótidos específicos del plásmido: M13fw y M13rev, y oligonucleótidos específicos para la quimera QD3D2: SD3 y ASD2. Los oligonucleótidos del plásmido amplifican la zona en donde se inserta la quimera y a los fragmentos de DNA amplificados con éstos deberán adicionárseles 237pb que se copian del los extremos del vector. Para realizar este PCR se seleccionaron 5 colonias blancas y una colonia azul como control negativo. Se corrieron 35 ciclos con las siguientes condiciones: 94°C X 40"; 55°C X 40"; 72°C X 60". Las colonias que contenían la quimera QD3D2 se identificaron después de correr los productos del PCR en un gel de agarosa utilizando un marcador de peso molecular para comparar el tamaño de la quimera amplificada. Las colonias positivas se re-sembraron en agar LB con ampicilina y se crecieron durante toda la noche a 37°C. De este cultivo se preparó el miniprep que se describe enseguida.

Las colonias de células transformadas se inocularon en 5ml de medio LB líquido con ampicilina y se crecieron durante 18 hrs a 37°C con agitación a 230 rpm. El plásmido se purificó con el método NucleoSpin® Plasmid purification kit Macherey-Nagel según las instrucciones del proveedor. El DNA purificado se cuantificó por absorción UV. Los plásmidos con el inserto de la quimera se secuenciaron para corroborar que estuviese completa y verificar que no hubiese errores (**Figura 11**).

2.2. Expresión de la quimera QD3D2 de *Ch. punctatum* en ovocitos de *X. laevis*

Una vez corroborada la secuencia correcta de la quimera, se procedió a cortarla del vector pGEM-T para su posterior inserción en el vector específico para

expresión en *Xenopus*, pXENEX (Jeziorski *et al.*, 1998). Para esto, se digirió el DNA purificado con las enzimas *Nco1* y *Not1* de la siguiente manera: 2µl de amortiguador BSA (20 mM KPO₄, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 5% Glicerol pH 7.0) + 2µl de *Nco1* + 2µl de *Not1* + 1µg de DNA (QD3D2 en pGEM-T) + H₂O hasta llevar a 50µl; esta reacción se incubó 12hrs a 37°C. El fragmento que correspondía a la QD3D2 se purificó y una vez aislada la quimera, se ligó al vector pXENEX como se describió previamente.

Para la síntesis del mRNA de la quimera QD3D2 así como el de las Ds nativas D2 y D3, se realizó una transcripción *in vitro* con el mMACHINE® kit siguiendo las instrucciones del proveedor. El mRNA obtenido se precipitó y se lavó con 1ml de etanol al 70% centrifugando 5 min a 12 000rpm para maximizar la remoción de nucleótidos no polimerizados. Se removió cuidadosamente el etanol y el RNA se resuspendió en 20µl de H₂O libre de RNAsas.

Para la expresión de los mRNAs se utilizaron hembras de *X. laevis* anestesiadas por hipotermia. Se les extrajeron de 2 a 3 lóbulos ováricos removidos a través de una incisión abdominal. Los lóbulos se colocaron en una solución de Barth (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES-NaOH, 0.33 mM Ca(NO₃)₂ · 4 H₂O, 0.41 mM CaCl₂ · 2 H₂O, 0.82 mM MgSO₄ · 7 H₂O, pH 7.4), y se seleccionaron ovocitos en etapas V y VI (n=25). Estos ovocitos fueron microinyectados con 50 nL (100 ng/ovocito) del mRNA, y se incubaron por 3 días a 18°C en solución de Barth. Posteriormente, los ovocitos se homogenizaron en amortiguador HEPES 1:10 y se congelaron a -80°C hasta su utilización para la caracterización cinética (cuantificación de actividad ORD e IRD). La concentración de proteínas se cuantificó por el método de Bradford (1976).

2.3. Cuantificación de la actividad enzimática

La actividad ORD (D2) se cuantificó mediante la modificación de la técnica de liberación de radioyodo rutinariamente utilizada en nuestro grupo de trabajo

(Leonard y Rosenberg, 1980; Orozco *et al.*, 2000). El sustrato para la enzima *in vitro* es $^{125}\text{I-rT}_3$ (New England nuclear). El ^{125}I liberado por la actividad enzimática se cuantificó en un espectrómetro de emisiones gamma. La actividad específica de las enzimas se expresó como la cantidad (fmolas o pmolas) de yodo radioactivo liberado/mg de proteína/hora. Debido a que la D2 solo había sido caracterizada en tejido, fue necesario establecer las condiciones ideales para la D2 recombinante (concentración de proteína, cofactor, temperatura, pH, tiempo). En todos los casos, la actividad enzimática fue medida por duplicado. La mezcla de reacción (volumen total de 100 μl) incluyó homogenado de los ovocitos a la concentración óptima de proteína (~10 μg) y la mezcla de reactantes requeridos para la determinación de cada tipo enzimático: $^{125}\text{I-rT}_3$ 0.5 nM; ditioneitol (DTT) 1, 5, 10, 25 y 35mM; amortiguador HEPES ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$) pH 7. Se realizó un ensayo de inhibición competitiva para determinar la afinidad por el sustrato agregando a la mezcla distintas concentraciones (2-100nM) de tironinas no radioactivas: rT3, T3 y T4. La mezcla se incubó a 37°C durante una hora. La reacción se detuvo por la adición de 50 μl de una solución que contiene suero normal bovino al 50% y PTU 10mM; y 100 μl de ácido tricloroacético (TCA) al 10%. La mezcla se centrifugó en frío (4°C) a 2500rpm por 15 min. El ^{125}I liberado soluble en ácido se separó por cromatografía en columnas con una resina de intercambio catiónico (Dowex-50X2), eluido con 2ml de ácido acético al 10% y cuantificado en el espectrómetro de emisiones gamma.

La actividad IRD (D3) se cuantificó usando un sistema de cromatografía descendente en papel descrito previamente (Fenton y col, 1997). El sustrato utilizado fue $^{125}\text{I-T}_3$. Los productos de la reacción (sustrato radioactivo $^{125}\text{I-T}_3$, + ^{125}I + $^{125}\text{I-3,3'-T}_2$) se separaron (cromatografía) y cuantificaron en un contador gamma (Bellabarba et al, 1968). Los resultados se expresan como el porcentaje de desyodación o como la actividad específica de la enzima expresada como pmol de 3,3'- T_2 liberada/mg de proteína/minuto.

Resultados

1. Análisis *in silico*

1.1. Banco de información y análisis *in silico* de las Desyodasas

En las bases de datos ENSEMBL y NCBI se encontraron 67 secuencias (aminoácidos) correspondientes a las desyodasas. De las cuales: 21 pertenecen a la D1; 23 pertenecen a la D2 y 23 pertenecen a la D3.

El análisis de identidad sobre las 67 secuencias se muestra en la tabla 1 y, como ya se mencionó, nos ilustró el hallazgo sobre las 2 grandes regiones: RV y RC (**Figura 5**). Entre los 3 parálogos se encontró una identidad para la RV de 20% mientras que la RC entre parálogos mostro una identidad del 60%. La identidad de la RV entre ortólogos mostro lo siguiente: D1 50%; D2 55% y D3 60%; mientras que la identidad entre ortólogos para la RC aumento en las 3 desyodasas a alrededor del 75%.

Estos resultados robustecieron la hipótesis de que la selectividad catalítica de las Ds está determinada por la RV ya que ella esta conservada entre ortólogos pero no entre parálogos. En este mismo contexto es importante enfatizar que la RC, que es la región crucial para la desyodación, está altamente conservada entre parálogos y ortólogos (**Figura 5**). De hecho y coincidiendo con otros autores (Klootwijk *et al.*, 2010), nuestros resultados muestran que en la sección correspondiente al dominio G, la RC de los 3 parálogos contiene un conjunto altamente conservado (77% de identidad) de 49 aminoácidos (115 a 163; numeración de D1 en humano). Este conjunto o subdominio incluye un segmento que denominamos “firma” el cual consiste de 9 aminoácidos prácticamente invariables a lo largo de la escala filogenética: FGS(C/A)TXP(P/S)F (**Figura 5**). Por otra parte en la RV aunque como su nombre lo indica es muy variable, se encontraron aminoácidos que comparten características bioquímicas (hidrofobicidad) en posiciones relativamente conservadas entre parálogos (**Figura 5**).

	Completa	RV	RC
Parálogos			
D1,D2,D3 (n=67)		20%	60%
Ortólogos			
D1 (n=21)	68%	50%	75%
D2 (n=23)	75%	55%	79%
D3 (n=23)	69%	60%	73%

Tabla 1. Porcentaje de identidad de las desyodasas de yodotironinas. Se muestran los porcentajes de identidad entre parálogos y ortólogos en las regiones RV y RC.

1.2. Análisis filogenético

1.2.1. Filogenia de las Desyodasas de vertebrados

El análisis filogenético (NJ) realizado para las secuencias completas de las desyodasas en vertebrados se muestra en la **Figura 6**, donde la longitud de las ramas (líneas verticales) denota la tasa de recambio de aminoácidos; mientras que, los nodos representan una bifurcación ancestral de la separación de grupos en ramas. Para contar con una “raíz” del árbol y debido a su ancestría, se utilizó la secuencia del urocordado *Halocynthia roretzi* la cual presenta actividad ORD sobre los metabolitos ácidos de tironinas, y que se ubicó cercana al grupo de las D1 la cual también presenta actividad ORD. La topología del árbol que arrojó este análisis sugiere que dentro de los cordados esta proteína ancestral dio lugar a 2 grupos distintos, uno que retuvo las características de la D1 y el otro que a su vez se dividió en D2 y D3. Todo ello aunado a que la tasa de recambio de aminoácidos es mayor en la D1, apoya la posibilidad que ésta es la desyodasa ancestral dentro de los vertebrados.

1.2.2. Filogenia de la RV de las Desyodasas en vertebrados

De manera consistente con la filogenia de la proteína completa, la región variable se encontró formando 2 grandes grupos (**Figura 7**). Uno que engloba las D1 y otro que se subdivide en D2 y D3. Esta congruencia con la filogenia de la proteína completa robustece la hipótesis de que la RV efectivamente corresponde a la que le confiere diversidad catalítica a esta familia enzimática. Además, también sugiere que la D1 dentro de las Ds de vertebrados es la proteína ancestral, ya que presenta la mayor variación. Mientras que la D2 y D3 son más recientes y cercanas entre ellas. Este análisis que solo incluye la mitad de la proteína no se realizó con raíz.

1.2.3. Filogenia de la RC de las de las Desyodasas en vertebrados

La región conservada como era de esperarse, se divide homogéneamente en 3 grupos (**Figura 8**) D1, D2 y D3; ya que la tasa de recambio de aminoácidos es similar para los 3. Además, como se mencionó anteriormente y como su nombre lo indica, esta región presenta una alta identidad entre las 3 enzimas ~60% (Tabla 1). Todo lo anterior indica que esta región es muy poco susceptible a cambios, y ha permanecido congelada. Sugiriendo nuevamente y de manera robusta que ésta región es fundamental para la actividad catalítica (remoción del yodo), pero no para determinar la selectividad; es decir, sobre cual anillo (ORD o IRD) de la hormona se lleva a cabo la desyodación.

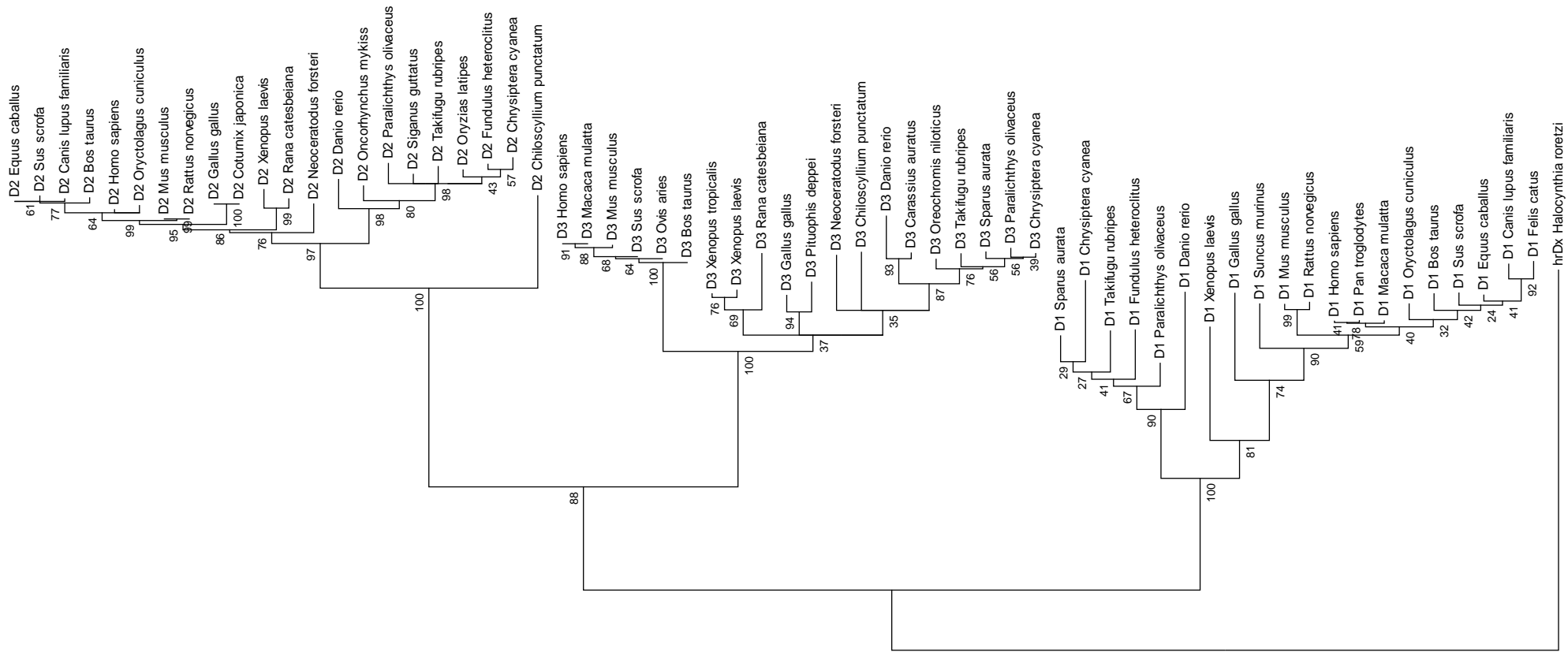


Figura 6. Reconstrucción filogenética de las Desyodasas en vertebrados. El árbol ilustra las relaciones filogenéticas de los 3 parálogos (secuencias completas) de las Ds. A la extrema derecha, la raíz representada por *H. roretzi*. Los ortólogos de los 3 diferentes parálogos se agrupan consistentemente entre si y la tasa de recambio de aminoácidos (líneas verticales) sugiere que el parálogo D1 es el más antiguo. Esta posibilidad se refuerza por el hecho de que el grupo externo del urocordado se ubica más cercano a D1 que a los otros dos parálogos. La escala vertical representa la tasa de recambio de aminoácidos y el número en cada uno de los nodos representa la estadística de bootstrap.

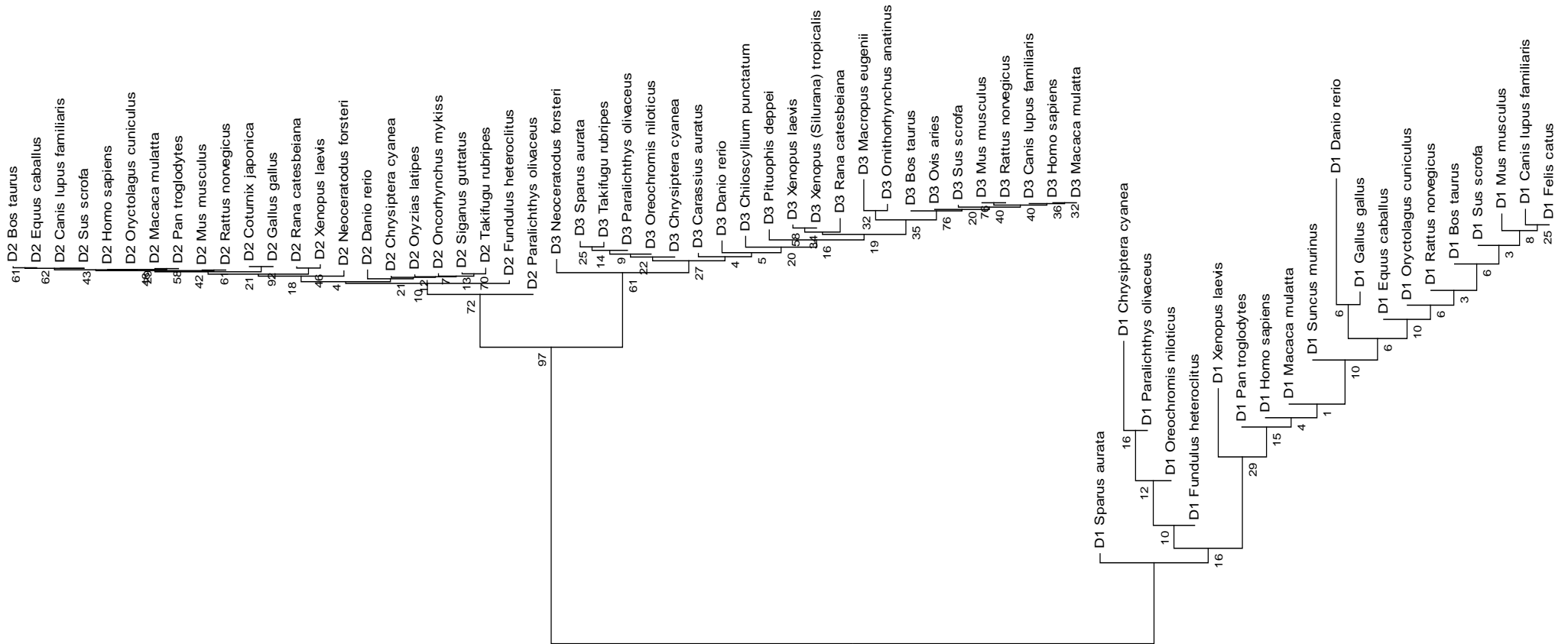


Figura 7. Reconstrucción filogenética de la región variable de las Desyodas. La topología del árbol es congruente con la exhibida por las secuencias completas (Figura 6). Se observa a la D1 como la desyodasa más variable teniendo una mayor tasa de recambio de aminoácidos; y a la D2 y D3 muy cercanas, compartiendo un nodo. La escala vertical representa la tasa de recambio de aminoácidos y el número de los nodos representa la estadística de bootstrap.

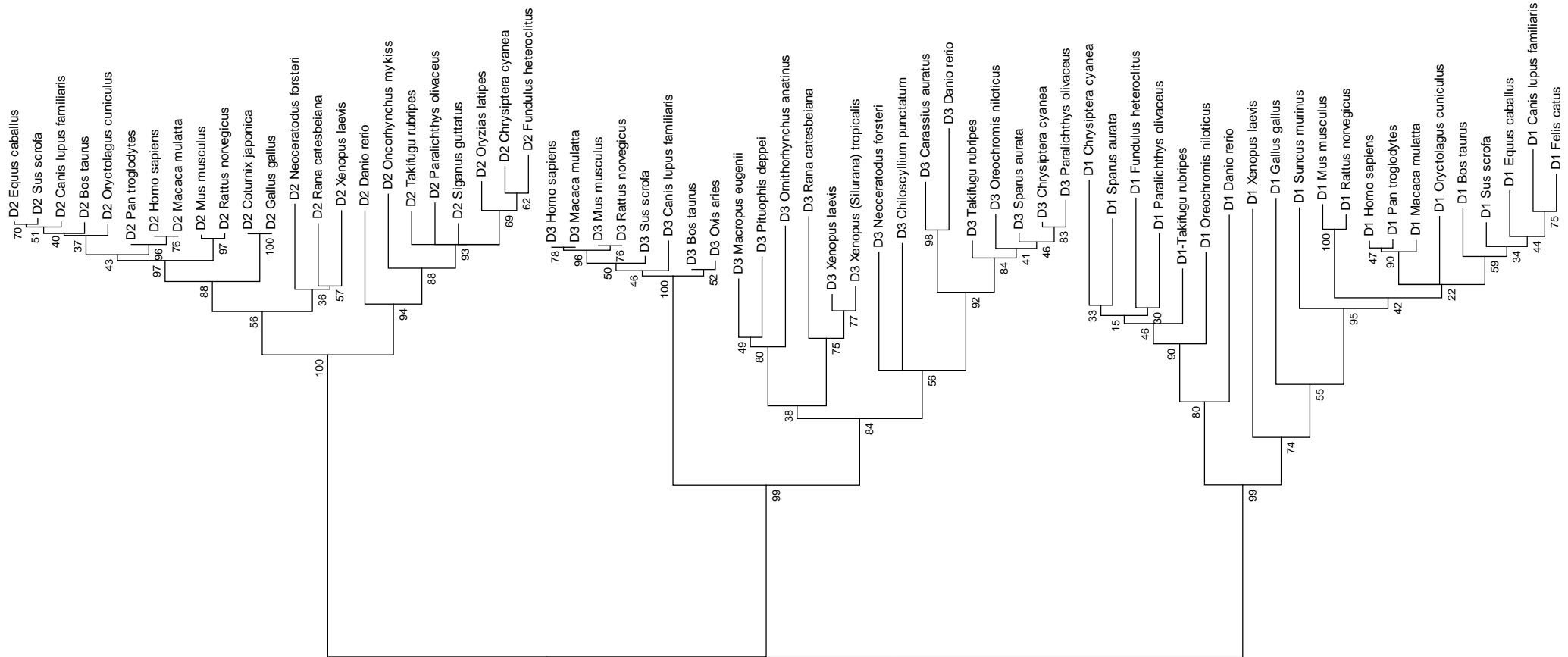


Figura 8. Reconstrucción filogenética de la región conservada de las Desyodasas. La topología de este árbol muestra que la región conservada aparece muy homogénea entre las Ds, se separan en tres grupos que corresponden a cada parálogo, sin encontrarse alguno más variable. La escala vertical representa la tasa de recambio de aminoácidos y el número de los nodos representa la estadística de bootstrap.

2. Análisis *in vitro*

2.1. Construcción de la enzima quimérica

Con el fin de obtener la proteína quimérica que tuviera la RV y RC de la D3 y D2 de *Ch. punctatum* respectivamente, se diseñó una estrategia de PCR utilizando oligonucleótidos híbridos (ilustrado en **Figura 3**). Esta estrategia permitió amplificar los fragmentos RV y RC correspondientes a la D2 y D3, con los pesos aproximados esperados de: ~400pb de la RV y ~800pb de la RC (**Figura 9a**). La hibridación de estos fragmentos sirvieron como molde, el cual se amplificó para la obtención de la QD3D2, con un peso esperado de ~1200pb (**Figura 9b**).

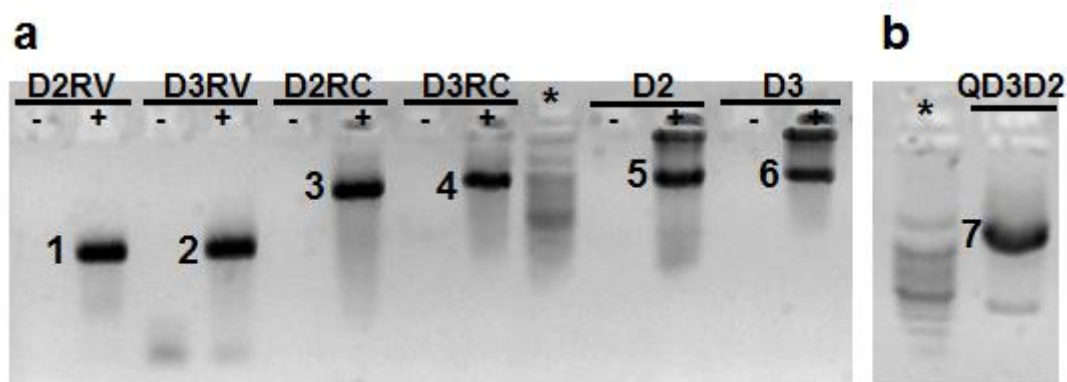


Figura 9. Aislamiento de fragmentos RV, RC e hibridación D2/D3. a) Se observa la imagen de electroforesis efectuada a los fragmentos aislados 1-4 (RV~400pb, RC~800pb) y a las Ds D2 y D3 completas, 5 y 6 respectivamente (~1200pb). b) Producto de la hibridación entre la RV de la D3 y la RC de la D2: quimera QD3D2 (~1200pb) señalada con el número 7. El marcador de peso molecular (100pb) está indicado con un asterisco.

Con el fin de determinar la identidad de los productos amplificados, estos fueron purificados y ligados en el vector pGEM-T. Después de la ligación, bacterias competentes fueron transformadas y para identificar aquellas portadoras del plásmido recombinante se realizó como segundo tamizaje un PCR con oligonucleótidos del vector. Los resultados de la clonación y transformación, se muestran en la electroforesis del PCR de tamizaje (**Figura 10a**). La presencia del inserto (QD3D2) se verificó con un PCR sobre la purificación del plásmido, utilizando oligonucleótidos específicos para las desyodasas y oligonucleótidos del plásmido. Estos resultados (**Figura 10b**)

mostraron que para la quimera QD3D2 dieron positivas las colonias 2, 3, 4 y 5 para los dos de pares oligonucleótidos.

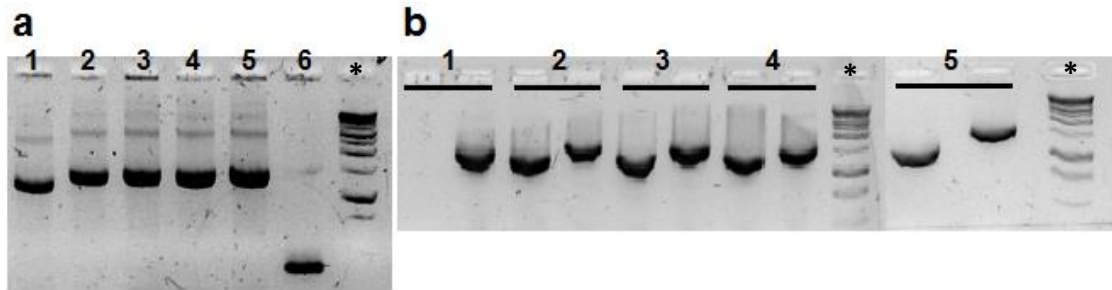


Figura 10. Colonias transformadas con la quimera QD3D2. a) Se observa la electroforesis realizada a los productos obtenidos del ensayo de PCR de tamizaje sobre 5 colonias bacterianas para la quimera QD3D2 (~1200pb), el número indica la colonia (1-5), el 6 es un control: PCR realizado a una colonia azul la cual no tiene el inserto (~240pb). b) Electroforesis del PCR de verificación sobre la purificación del plásmido, el número indica el par de ensayos sobre la misma colonia con oligonucleótidos específicos y con oligonucleótidos para el vector, respectivamente. El marcador de peso molecular (1kb) está indicado con un asterisco.

La secuenciación de la quimera QD3D2 mostró que no presentaba errores (**Figura 11**) y que el marco de lectura concordaba con la respectiva RV y RC de una y otra desyodasa (**Figura 11a**). Además QD3D2 presentó el SECIS correctamente insertado. (**Figura 11b**).

a

```
D3 Ch. punctatum - - - - MDLLKEI VAILILLPRFFI TAFMLWLLDILCIRKRLLPKRREQTEGSADDPPLCVSDT NRMFT LESVKAI WYGQKLDFFKSAHVG 85
QD3D2 - - - - MDLLKEI VAILILLPRFFI TAFMLWLLDILCIRKRLLPKRREQTEGSADDPPLCVSDT NRMFT LESVKAI WYGQKLDFFKSAHVG 85
D2 Ch. punctatum MGLRSV DLLIKLQILPGFFSNCLFLAVYDS VVLLKQAVSRLS GPAAGDGVPRMLTVEGMQTVWRSF LL DAAKPVR PGGQAPNPRVVRLGE 90

D3 Ch. punctatum SPAPNTEVVQLQDQRKVRLLDYSR GARPLV LNFGSCTUPPFMARLKS FQRVAT QYADI ADFLLIYI EE AHPSDGWV STDAPYNI PRHRS L 175
QD3D2 SPAPNTEVVQLQDQRKVRLLDYSR GARPLV VNF GSATUPPFV ASLPAFCRTAE EYQAGADFLLVYI DE AHPSDGWA ATSPFQLPRHRTLA 174
D2 Ch. punctatum RQGEAE RLQRVGG LAECRLLDFAS PGRPLV VNF GSATUPPFV ASLPAFCRTAE EYQAGADFLLVYI DE AHPSDGWA ATSPFQLPRHRTLA 180

D3 Ch. punctatum E DRLKAA SLI DKESPGCLVVADTMDNSS NS AYGAYFERLYVL RDQKV VYQGGRGPEGYKI SEL RLWLE QYKSQSH N SSTVLI EV - - 259
QD3D2 E RCSAA SLLL RHFPVPPQCPVVAD CMDNES NVAYGV SFERFCI VQDQKI VYLG GQGALLLQPA GVR HGLSQHR - - - - - 251
D2 Ch. punctatum E RCSAA SLLL RHFPVPPQCPVVAD CMDN NS NVAYGV SFERFCI VQDQKI VYLG GKGPFF YSLK EVR AWLEQHR - - - - - 253
```

b

```
SECIS D3D2 T G C A A G C G T C C A G G T C A G A A T T C A C A A A T C T G T A C A T A A A T A C G C A T T T C A T G T A T T C T C T A C A T G T T G A G G T G G A C G G A T G G A C G T C A G 90
SECIS F. heteroclitus T G C A A G C G T C C A G G T C A G A A T T C A C A A A T C T G T A C A T A A A T A C G C A T T T C A T G T A T T C T C T A C A T G T T G A G G T G G A C G G A T G G A C G T C A G 90

SECIS D3D2 A A G A A G T G A G G G A A T A T G A A A G G A A A C C A G A C A G A A T T T G T T T C C T C T G A A C A G A T G G A T T G C T C T G C C C A A A G T G A T T A T G G T G T G C A 180
SECIS F. heteroclitus A A G A A G T G A G G G A A T A T G A A A G G A A A C C A G A C A G A A T T T G T T T C C T C T G A A C A G A T G G A T T G C T C T G C C C A A A G T G A T T A T G G T G T G C A 180

SECIS D3D2 A A T G A A A A C C T T T G A C G A A A G A G T C C G T G G C T C A G T C T C T G G T T G G A T A A T A G A C A A C A C C G T G T C A T C A T G A T G C A G G T T G A T G G C A T C 270
SECIS F. heteroclitus A A T G A A A A C C T T T G A C G A A A G A G T C C G T G G C T C A G T C T C T G G T T G G A T A A T A G A C A A C A C C G T G T C A T C A T G A T G C A G G T T G A T G G C A T C 270

SECIS D3D2 T G T T T T C A C T G T C A G T C T C A A A G T T C T G T C C C G T G T C G C A G C C T C A T G C G G A C A C C T C T G G T T T T A A T G T T T G T T T A G C G T G A C G C T T A 360
SECIS F. heteroclitus T G T T T T C A C T G T C A G T C T C A A A G T T C T G T C C C G T G T C G C A G C C T C A T G C G G A C A C C T C T G G T T T T A A T G T T T G T T T A G C G T G A C G C T T A 360

SECIS D3D2 T T T T T A T A T G T A C A A T G G G G - A A A C A C C A C T G G T G T A A A A T A A A G G T G A A T G T T T G A C C T T G 421
SECIS F. heteroclitus T T T T T A T A T G T A C A A T G G G G G A A A C A C C A C T G G T G T A A A A T A A A G G T G A A T G T T T G A C T T T G 422
```

Figura 11. Alineación de las secuencias de las Desyodasas tipo 2 y 3 de tiburón, y la quimera QD3D2. En a) se muestra la alineación de las secuencias de aminoácidos de la D2 y D3 nativas de Tiburón, con la QD3D2, se observa la correspondencia de la quimera en la región variable con la D3 (morado) y en la región conservada con la D2 (verde). En b) la alineación de las secuencias de nucleótidos correspondientes al elemento SECIS en la región 3' no traducida, de la D2 y de la QD3D2.

2.2. Expresión de la quimera QD3D2 de *Ch. punctatum* en ovocitos de *X. laevis*

El cDNA de la quimera QD3D2 se insertó en el vector pXENEX, y la construcción se verificó por ensayos de PCR con oligonucleótidos específicos para el vector y para la quimera (**Figura 12a**). Una vez verificado el plásmido se purificó, junto con los de las D2 y D3 nativas. Los tres plásmidos se linearizaron y purificaron (**Figura 12b**), y se emplearon como molde para la síntesis del mRNA en ensayos de transcripción *in vitro* (**Figura 12c**). El mRNA obtenido se microinyectó en ovocitos de *X. laevis* para expresarlo heterológamente. 48 horas después de la microinyección se obtuvieron extractos totales de proteínas para la realización de los ensayos de actividad enzimática.

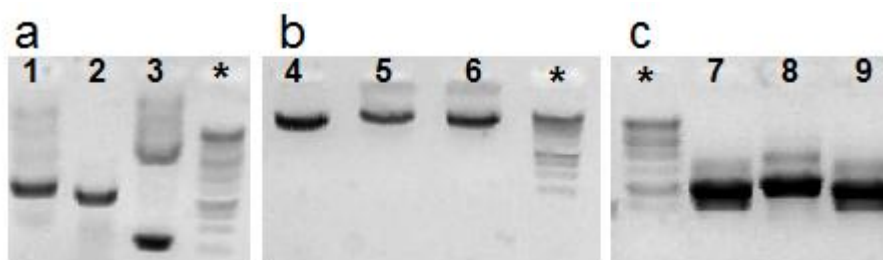


Figura 12. Obtención del mRNA de QD3D2, D3 y D2. a) Se observa la electroforesis de los productos de PCR para verificar la construcción de la QD3D2 en pXENEX, utilizando oligonucleótidos del vector (1) y específicos (2), el control negativo (3). b) se observa la linearización del vector pXENEX que contiene: D2 (4); D3 (5) y QD3D2 (6). c) mRNA transcrito de D2 (7); D3 (8) y QD3D2 (9). El marcador de peso molecular (1kb) se muestra con un asterisco en la parte superior.

2.3. Cuantificación de la actividad enzimática

Caracterización Cinética de la D2 Recombinante. Se realizó la caracterización para la D2 recombinante con ensayos para cuantificar la actividad ORD, tomando como base los ensayos en tejido previamente realizados en nuestro grupo de trabajo. Inicialmente se determinó la

concentración óptima de proteína requerida en el ensayo, y como se muestra en la **Figura 13 a**, la actividad desyodativa se incrementa como incrementa la concentración de proteína empleada en el ensayo. Para los ensayos subsiguientes se eligió el punto intermedio (11 μ g). Como se muestra en la **Figura 13 b**, la actividad desyodativa depende de la presencia del cofactor DTT en la reacción de desyodación (**Figura 13 b**), el cual funciona como segundo sustrato. Se encontró una actividad enzimática máxima a una temperatura de 30-37 °C y a un pH de 7 (**Figura 13 c, d**). La actividad desyodativa fue lineal con respecto al tiempo de incubación, hasta por 3 horas (**Figura 13 e**). Ensayos de inhibición competitiva utilizando diferentes tironinas no marcadas para analizar la especificidad de los sustratos mostraron una preferencia por $T_4 > rT_3 > T_3$ (**Figura 13 f**). En general las características operacionales de la D2 recombinante son las mismas que las encontradas previamente para la D2 nativa.

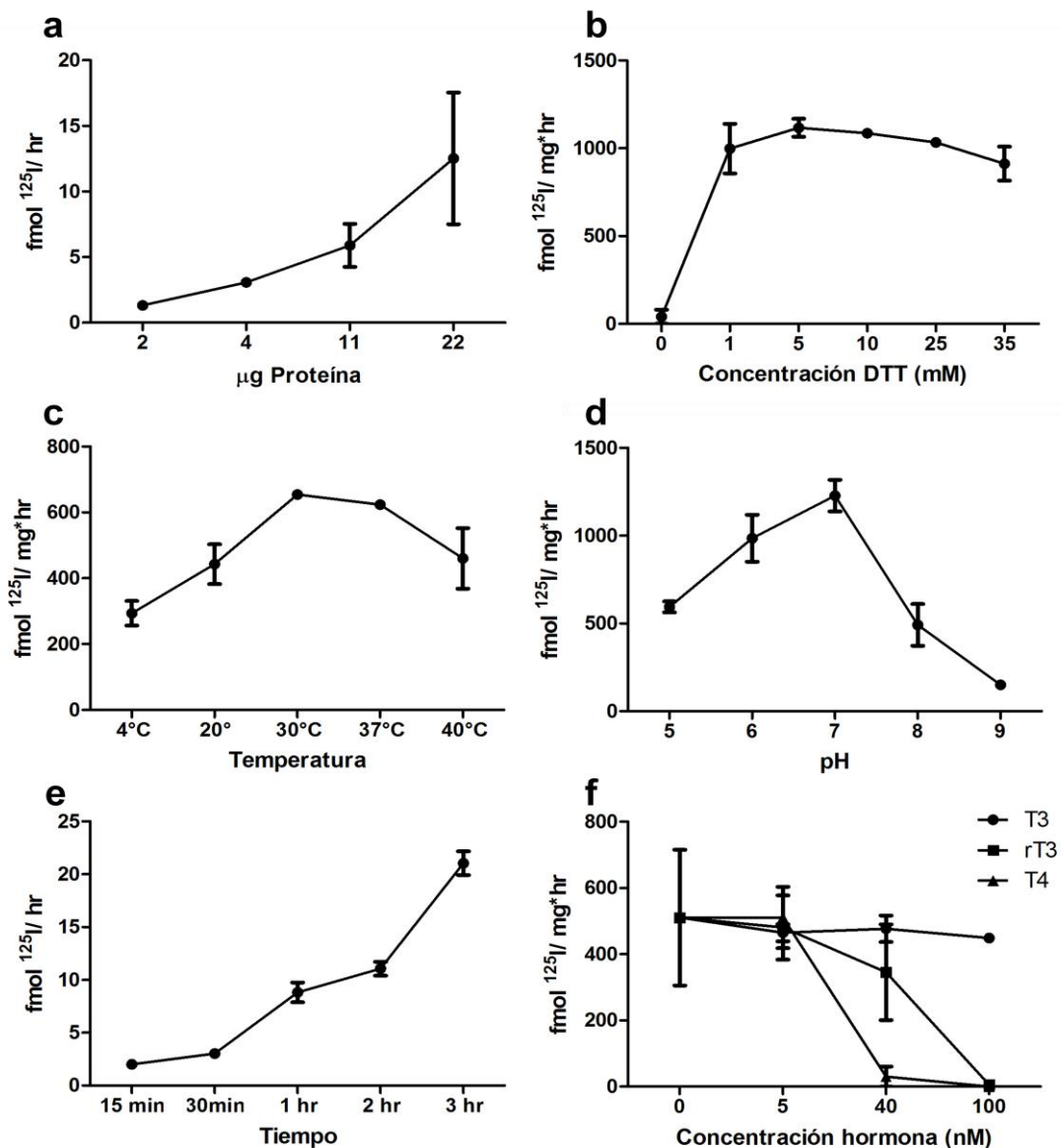


Figura 13. Cinética rT_3 -ORD D2 recombinante. a) Se muestra la curva de desyodación en relación a la concentración de proteína. b) Efecto de la concentración del cofactor DTT en 0,1, 5, 10, 25 y 35 mM. c) y d) Efecto de la temperatura y pH respectivamente. e) Efecto del tiempo de incubación. f) Efecto de la inhibición competitiva con de T_3 , rT_3 y T_4 a una concentración de 40nM.

Caracterización Cinética de la D3 Recombinante. La actividad IRD de la D3 recombinante ya ha sido caracterizada en nuestro laboratorio, por lo que se utilizaron en los ensayos las condiciones previamente reportadas por Mayorga *et al.* 2008. En el presente trabajo se muestra que la D3 presenta una actividad

semejante a la reportada, un porcentaje de desyodación de ~80% y una preferencia de sustrato por $T_3 > T_4 > rT_3$ (Figura 14).

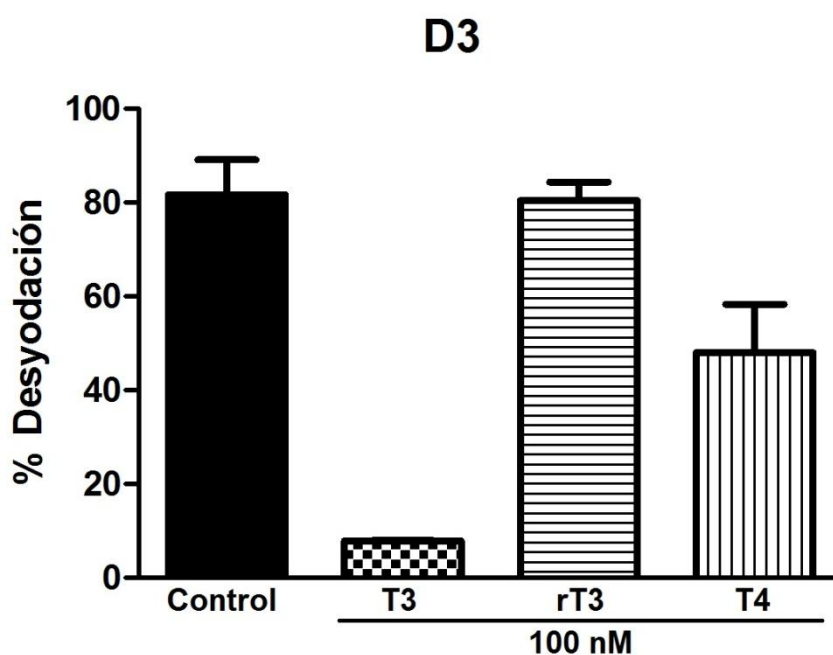


Figura 14. Porcentaje de desyodación de la D3. Se muestra el porcentaje de desyodación de la D3 expresada en ovocitos de *X. laevis*, así como el efecto en ésta de la inhibición competitiva por diferentes tironinas no marcadas en una concentración de 100nM.

Una vez que se corroboraron las condiciones para medir la actividad de la D2 y D3 se prosiguió con el análisis de la actividad de la QD3D2. Se realizó un ensayo para medir actividad IRD y otro para medir actividad ORD, utilizando las condiciones que se encontraron para D2 y D3.

Caracterización Cinética de la QD3D2. Una vez que se corroboraron las condiciones para cuantificar la actividad de la D2 y D3 recombinantes, se prosiguió con el análisis de la actividad desyodativa de la QD3D2. Para esto, se realizaron ensayos independientes para determinar las actividades IRD y ORD, utilizando las condiciones que se encontraron para D2 y D3 recombinantes.

Se realizó un ensayo para ORD, utilizando como controles positivos el

homogenado de ovocitos que expresan la D2 y un homogenado de tejido placentario; como control negativo se utilizó homogenado de ovocitos sin microinyectar. Se encontró actividad desyodativa únicamente en la D2, aunque esta fue únicamente de alrededor de 8% con respecto a la radiactividad total (100%). Es importante resaltar que aún cuando QD3D2 contiene el sitio catalítico de la D2, esta no presenta actividad ORD, como tampoco la presentan el tejido placentario y el ovocito control (**Figura 15**), apoyando la hipótesis de la presente tesis.

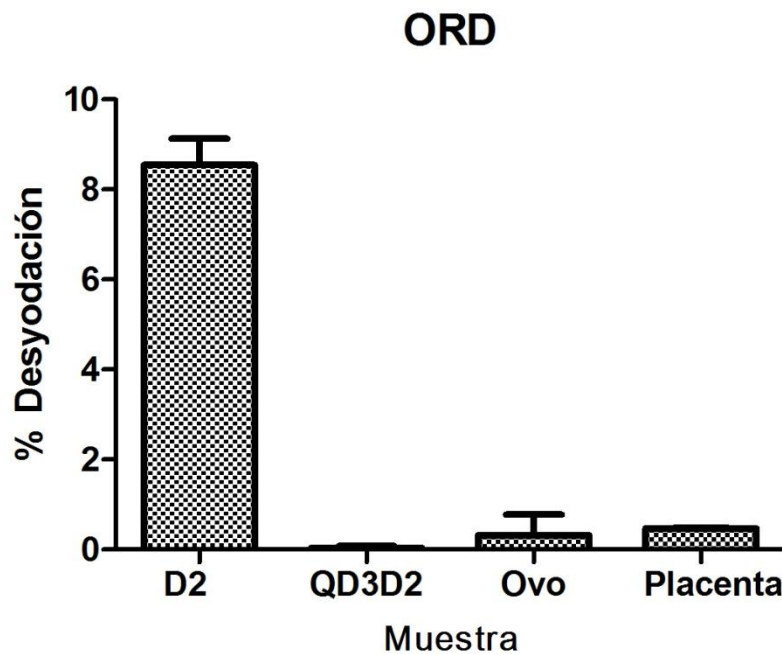


Figura 15. Actividad ORD. Se muestra el porcentaje de desyodación para D2, la quimera QD3D2, el ovocito control y tejido placentario. La D2 fue la única muestra que presentó este tipo de actividad.

Se prosiguió a realizar el ensayo de actividad IRD, utilizando como controles positivos el homogenado D3 recombinante y el homogenado de tejido placentario; como control negativo se usó también homogenado de ovocitos sin

microinyectar. La D3 y el tejido placentario mostraron gran actividad desyodativa ~80% con respecto a la radiactividad total (100%), mientras que el extracto de ovocitos control no mostró actividad tipo IRD. Por otro lado y de acuerdo a lo planteado en esta tesis, la quimera QD3D2 presentó actividad tipo IRD, ~3% (**Figura 16**), actividad baja comparada con la D3 recombinante, sin embargo es un resultado muy interesante sabiendo que esta quimera presenta la región catalítica de la D2.

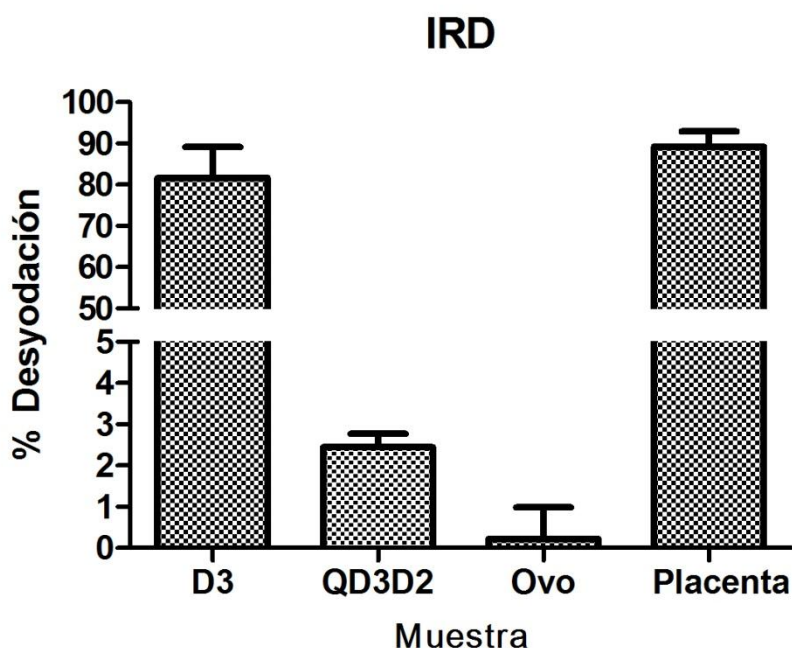


Figura 16. Actividad IRD. Se muestra el porcentaje de desyodación para D3, la quimera QD3D2, ovocito control y tejido placentario. La D3 y el tejido placentario mostraron una gran actividad, la quimera presentó actividad IRD baja comparada con la D3.

Debido a que la quimera QD3D2 no presentó actividad ORD alguna, pero si mostró actividad IRD, lo siguiente fue corroborar la afinidad por sustrato y poder compararla con las correspondientes D2 y D3 nativas.

Se realizó un ensayo de inhibición competitiva utilizando tironinas (T_3 , rT_3 y T_4) a diferentes concentraciones. Encontramos una preferencia por $T_3 > T_4 = rT_3$, siendo ésta parecida a la preferencia que exhibe D3 ($T_3 > T_4 > rT_3$). También se observó inhibición competitiva de la actividad de la QD3D2 (**Figura 17a**) comparada con la inhibición competitiva de la actividad de la D3 (Mayorga *et al.* 2008) (**Figura 17b**), se muestra solo la concentración de 2nM.

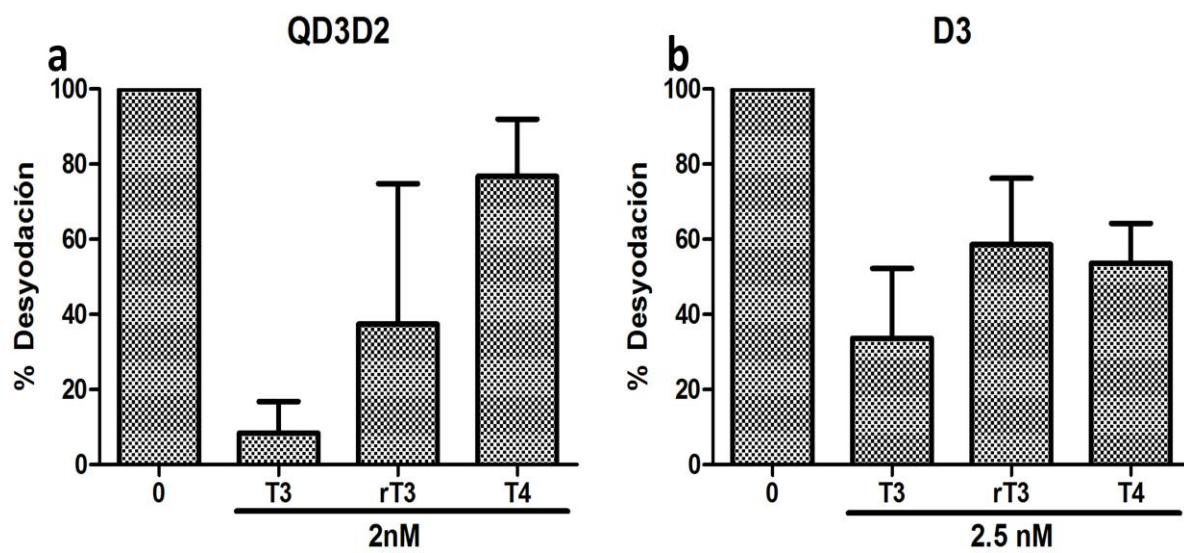


Figura 17. Ensayo de inhibición competitiva para la quimera QD3D2 y para la D3. Se observa el efecto de la inhibición competitiva a la actividad IRD de la quimera QD3D2 y de la D3, con T₃, rT₃ y T₄ a una concentración de 2 nM.

Discusión

En esta tesis y a partir del modelo propuesto por Callebaut *et al.* (2003) acerca del arreglo estructural de las Ds, así como de observaciones preliminares de nuestro grupo de trabajo (Olvera *et al.* 2011), planteamos que la selectividad catalítica que caracteriza a los tres diferentes parálogos de las desyodasas no reside en la región conservada o RC que contiene el dominio G o catalítico de la enzima. Aunque a primera vista esta hipótesis parece un contrasentido, nuestros resultados muestran que en efecto, la preferencia para desyodar uno u otro anillo de las yodotironinas está determinada por un segmento o región de la enzima que comprende a los dominios TM, H y L y que hemos denominado región variable o RV.

Los estudios de estructura-función de esta familia enzimática son escasos y se han dirigido primordialmente a hacer sustituciones puntuales de aminoácidos conservados y a analizar la actividad de la proteína resultante (Berry 1992); o bien, su sensibilidad a inhibidores (Sanders *et al.*, 1997) y/o su homodimerización (Vivek-Sagar *et al.*, 2008). En esta tesis el problema se abordó utilizando dos estrategias complementarias. Por una parte y para analizar con detalle el arreglo estructural de los diferentes ortólogos de los tres parálogos enzimáticos, empleamos algunas de las herramientas que brinda la biología computacional. Este acercamiento *in silico* permitió además analizar algunos aspectos de la filogenia molecular de esta familia proteínica. La estrategia complementaria consistió en utilizar técnicas de biología molecular para construir una quimera enzimática y caracterizar su actividad ya que ella combina las regiones catalítica y variable de 2 diferentes parálogos.

Los resultados del acercamiento *in silico* (identidad y filogenia) brindaron información parte de la cual hasta ese entonces no se conocía y que permitieron diseñar la estrategia experimental de la tesis. Estos análisis mostraron que al tiempo que es diversa entre parálogos, la RV entre ortólogos está relativamente conservada (identidad ~55%). En contraste, tanto entre parálogos como entre ortólogos, la identidad de la RC es de ~60%. Estos datos son congruentes con los estudios de mutagénesis dirigida que muestran que

algunos aminoácidos como la SeCys en los 3 parálogos, Cys en la posición 124 de D1 e His en la posición 158 de la D1, de esta región son esenciales para que la enzima catalice con eficiencia la remoción del átomo de yodo en las TH (Berry *et al.*, 1991; Berry 1992; Buettner *et al.*, 2000; Sanders *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 1997). De hecho, en la RC se localiza el segmento altamente conservado de 49 aminoácidos y el subdominio o firma de 9 aminoácidos que caracteriza a la familia de las desyodasas. Por otra parte, nuestros resultados revelaron que la heterogeneidad de la RV entre parálogos se asocia a un alto grado de identidad entre ortólogos; es decir, a una semejanza relativa entre las diferentes especies de vertebrados. En conjunto, estos hallazgos permiten inferir que la RV confiere, a cada parálogo, la preferencia o selectividad para determinar el anillo del cual se removerá el átomo de yodo, mientras que la RC le confiere la capacidad bioquímica de catalizar dicha remoción.

Esta variabilidad entre una y otra región: RV y RC en las Ds también se revela cuando se analiza por separado su filogenia (**Figura 7 y 8**, respectivamente). Mientras que la topología del árbol de la RC se muestra homogénea y con ramas de longitud similares, la del árbol de la RV presenta una mayor heterogeneidad, separando a las Ds en dos grandes grupos; uno que solo comprende al parálogo D1 y otro que comprende a los parálogos D2 y D3. Esto nos sugiere que el blanco evolutivo de innovación dentro de estas proteínas se encuentra en la RV, ya que ella presenta una mayor tasa de recambio de aminoácidos (1.0), mientras que la RC se preserva a lo largo de la filogenia, con una baja tasa de recambio de aminoácidos (0.05).

La prueba filogenética realizada para las secuencias completas de las Desyodasas en vertebrados (**Figura 6**) muestra a la D1 como la proteína más antigua, la cual dio lugar a la D2 y D3. Esto tiene concordancia con la variabilidad de este parálogo, dentro de la RV es la proteína que muestra más recambios de aminoácidos a lo largo del tiempo, sugiriendo que la desyodasa ancestral tenía 2 tipos de actividades catalíticas (ORD e IRD), y posteriormente perdió una de ellas para dar lugar a una proteína que solo presentase un solo tipo de actividad catalítica.

Los estudios *in silico* representan una gran herramienta en los estudios estructura-función, los análisis realizados en este trabajo han robustecido la hipótesis de que la selectividad catalítica de las Ds depende en cierta medida del arreglo de la RV.

Más aún, los estudios *in vitro* realizados en este trabajo indican que el arreglo de la RV determina las características operacionales tales como la selectividad por el anillo ORD o IRD, la afinidad y preferencia por el sustrato, el grado de dependencia por el cofactor, etc. Para los experimentos que se realizaron en este proyecto, más que caracterizar las particularidades que exhibiese la quimera QD3D3, y remarcando la fina selectividad que presentan la D2 y la D3 por el anillo externo e interno, respectivamente, el objetivo principal fue el de encontrar la selectividad por el anillo que esta quimera presentara.

La caracterización y optimización de los ensayos para cuantificar la actividad desyodativa de la D2 y D3 recombinantes de *Ch. punctatum* nos permitió analizar la actividad catalítica de la quimera QD3D2. Los resultados mostraron claramente que no obstante contener el sitio catalítico de la D2, la quimera no desyoda el anillo externo de la TH. QD3D2 exclusivamente cataliza la remoción del yodo del anillo interno de la hormona.

El ensayo para buscar actividad tipo ORD en la quimera QD3D2 mostró que ésta a pesar de contener el sitio catalítico de la D2 no exhibe este tipo de actividad característica de los ortólogos de D2. Sin embargo, el ensayo para detectar actividad IRD en esta quimera, demostró que presenta este tipo de actividad, siendo muy baja comparada con la actividad que presenta la D3 nativa (~80%), demostrando así que el arreglo que presenta la RV determina en gran medida la preferencia por el anillo externo o interno. Tomando la frase “en gran medida” determinante para la selectividad por el anillo pero no para la totalidad de características que cada parólogo presente, ya que el hecho de que la quimera presentase una baja actividad sugiere que la interacción entre los aminoácidos RV-RC interviene también en la determinación total de las características operacionales de cada parólogo. La preferencia por el sustrato encontrada para la quimera QD3D2 de $T_3 > T_4 = rT_3$, es similar a la preferencia que exhibe la D3, demostrando que las interacciones entre los aminoácidos

que se encuentran en la RV le confieren a la enzima cierta conformación estructural, que le permitirá interactuar con el sustrato de manera precisa y selectiva, como en el caso de la dimerización donde intervienen tanto el dominio TM como el G (Vivek-Sagar, *et al.*, 2008), no así en el caso de la RC, la cual es esencial para la remoción del yodo y no para la selectividad por el anillo o el sustrato.

Por todo lo anterior y bajo un escenario evolutivo, es razonable y válido asumir que la RC de esta familia enzimática ha estado sometida a selección positiva; es decir, una alta presión estructural selectiva manteniéndola muy conservada a lo largo de la filogenia de los cordados. En consecuencia, la selectividad por ORD o IRD y la plasticidad funcional para contender y adaptarse a las diversas demandas que las especies de cordados confrontan, no reside en el dominio catalítico de la enzima sino en un dominio diferente de la proteína. Enfocándonos en que la VR exhibe la mayor tasa de cambios evolutivos, esto revela que esta región ha estado bajo una presión selectiva más relajada con la consecuente ganancia de cambios y novedad fisiológica. Más aun, y en parte debido al reducido número o falta de secuencias de los tres parálogos que pudieran cubrir homogéneamente las 5 clases de vertebrados, estos cambios son más evidentes cuando se comparan peces y mamíferos, las clases de vertebrados en los cuales el número de secuencias de Ds disponibles es mayor (~10). Es importante notar que entre ortólogos, las sutiles diferencias encontradas pueden ser debidas a demandas ambientales y/o fisiológicas especie-específicas. Siguiendo esta idea, la gran variabilidad encontrada en la RV de la D1 junto con la topología del árbol filogenético (**Figura 6**), sugiere que entre los 3 parálogos la D1 es la desyodasa más antigua, con la noción de que mayor tiempo de existencia representa más oportunidad de variación, expresada en mutaciones (mayor tasa de cambio). En este contexto, el hecho de que los genes *Dio2* y *Dio3* se co-localizan en el mismo cromosoma en la mayoría de especies estudiadas (observaciones no publicadas Olvera *et al.* 2012), sugiere que ambas enzimas pudieron haber evolucionado a través de un proceso de duplicación génica; pensando en que una copia adicional del mismo gen provee una fuente de material genético para

la mutación, deriva, y selección sobre la cual actuar, haciendo posibles nuevas oportunidades evolutivas.

Conclusiones

1. Las Ds de vertebrados surgen de una desyodasa ancestral presente en la base de los cordados, siendo la D1 la desyodasa más antigua de los tres parálogos en vertebrados.
2. La RC de las Ds es esencial para la remoción del yodo, y ha estado bajo una alta presión selectiva a lo largo de la filogenia de los cordados, manteniéndola muy conservada.
3. La RV de las Ds determina en cierta medida la fina selectividad por el anillo del cual se removerá el yodo, estableciendo el tipo de actividad ORD o IRD que presenta la enzima.
4. La RV de las Ds ha estado bajo una presión selectiva laxa, permitiendo mutaciones que se ven reflejadas en la ganancia de novedades fisiológicas que le permiten a cada especie contender y adaptarse a las variaciones ambientales.

Referencias

- Baqui M., Botero D., Gereben B., Curcio C., Harney J. W., Salvatore D., Sorimachi K., Larsen P. R. & Bianco A. C., 2000. Distinct subcellular localization of transiently expressed types 1 and 2 iodothyronine deiodinases as determined by immunofluorescence confocal microscopy. *Endocrinology*, 141: 4309-4312.
- Berry M. J., Kieffer J. D., Harney J. W. & Larsen P. R., 1991. Selenocysteine confers the biochemical properties of the type I iodothyronine deiodinase. *J Biol Chem*, 266:14155–14158
- Berry M. J., 1992. Identification of Essential Histidine Residues in Rat Type I Iodothyronine Deiodinase. *J Biol Chem*, 267: 18055-18059
- Bianco A.C. & Kim B. W., 2006. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J Clin Invest*; 116: 2571-2579
- Bianco A. C. & Larsen P. R., 2005. Cellular and structural biology of the deiodinases. *Thyroid*, 15: 777-786
- Bianco A. C., Salvatore D., Gereben B. & Berry M. J., 2002. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrine Rev*, 23: 38-89
- Braverman L. E., Ingbar S.H. & Sterling K., 1970. Conversion of thyroxine (T₄) to triiodothyronine (T₃) in athyreotic subjects. *J Clin Invest*, 49: 855–864
- Buettner C., Harney J. W. & Larsen P. R., 2000. The Role of Selenocysteine 133 in Catalysis by the Human Type 2 Iodothyronine Deiodinase. *Endocrinology*, 141: 4606-4612
- Callebaut I., Curcio-Morelli C., Mornon J. P., Gereben B., Buettner C., Huang S., Castro B., Fonseca T. L., Harney J. W., Larsen P. R. & Bianco A. C., 2003. The iodothyronine selenodeiodinases are thioredoxin-fold family proteins containing a glycoside hydrolase clan GH-A-like structure. *J Biol Chem*, 278: 36887-36896
- Chavatte L., Brown B. A. & Driscoll D.M., 2005. Ribosomal protein L30 is a component of the UGA selenocysteine recoding machinery in eukaryotes. *Nat Struct Mol Biol*, 12: 408-416
- García-G.C., López-Bojorquez L., Nuñez C.J., Valverde-R C. & Orozco A., 2007. 3,5-Diiodothyronine in vivo maintains euthyroidal expression of type 2 iodothyronine deiodinase, growth hormone, and thyroid hormone receptor β 1 in the killifish. *AM J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 293: 877-883
- Gereben B., Zavacki A. M., Ribich S., Kim B. W., Huang S. A., Simonides W. S., Zeöld A. & Bianco A. C., 2008a. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr Rev*, 29: 898-938
- Gereben B., Zeöld A., Dentice M., Salvatore D. & Bianco A. C., 2008b. Activation and inactivation of thyroid hormone by deiodinases: Local action with general consequences. *Cell Mol Life Sci*, 65: 570-590

- Geven E. J. W., Nguyen N., Van Den Boogaart M., Spanings F. A. T., Flik G. & Klaren P. H. M., 2007. Comparative thyroidology: thyroid gland location and iodothyronine dynamics in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters) and common carp (*Cyprinus carpio* L.) *J. Exp Biol*, 210: 4005-4015
- Glöcker G., Eichinger L., Szafranskj K., Pachebat J. A., Bankier A. T., Dear P. H., Lehmann R., Baumgart C., Parra G., Abril J. F., Guigó R., Kumpf K., Tunggal B. M., Cox E., Quail M. A., Platzer M., Rosenthal A. & Noegel A. A., 2002. Sequence and analysis of chromosome 2 of *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, 418:79-85
- Jeziorski M. C., Greenberg R. M., Clark K. S. & Anderson P. A., 1998. Cloning and functional expression of a voltage-gated calcium channel $\alpha 1$ subunit from jellyfish. *The Journal of Biol Chem*; 273:35: 22792-22799
- Klootwijk W., Friesema E. C. H., & Visser T. J., 2011. A Nonselenoprotein from amphioxus deiodinates Triac but not T3: Is Triac the primordial bioactive thyroid hormone?. *Endocrinology*, 152:3259–3267
- Köhrle J., 2007. Thyroid hormone transporters in health and disease: advances in thyroid hormone deiodination. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*; 21: 173-191
- Larsen P. R., Davies T. F., Hay I. D., 1998. The Thyroid Gland. In: Wilson JB, Hoster D, Cronenberg HM, and Larsen PR (eds) William's Textbook of Endocrinology. 9th ed. W B Saunders, Philadelphia, pp 389-515.
- Leatherland, J.F., Reddy, P.K., Yong, A.N., Leatherland, A. & Lam T. J., 1990. Hepatic 5-monodeiodinase activity in teleosts *in vitro*. A survey of 33 species. *Fish. Physiol. Biochem.* 8:1–10
- Leonard J. L., Köhrle J. 2000. Intracellular pathways of iodothyronine metabolism. In: Braverman LE, & Utiger RD (eds.) The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 136-173.
- López-Bojorquez L., Villalobos P., García-G C., Orozco A., & Valverde-R C., 2007. Functional identification of an osmotic response element (ORE) in the promoter region of the killifish deiodinase 2 gene (*FhDio2*). *J Exper Biol*, 210: 3126-3132
- McLeese J. M., Wright G. M., Youson J. H. & Eales J. G., 2000. Deiodination activity in extrathyroidal tissues of the atlantic hagfish, *Myxine glutinosa*. *J Exp Biol*, 287: 445-452
- McNabb, F. M., 1992. Thyroid hormones. Prentice Hall, New Jersey, NJ, pp 43-80
- Mayorga M. L., Orozco A., Villalobos P. & Valverde-R C., 2008. Cloning and characterization of a type 3 iodothyronine deiodinase (D3) in the liver of the chondrichthyan *Chiloscyllium punctatum*. *Gen Comp Endocrinol*, 156: 464-469

- Nobel S., Abrahmsen L. & Oppermann U., 2001 Metabolic conversion as a pre-receptor control mechanism for lipophilic hormones. *Eur J Biochem*, 268: 4113-4125.
- Olvera A., Orozco A., Aguilera P. & Valverde-R C. 2011. Where is the deiodinase selectivity for ord or ird located? a structure-function approach. Front. Endocrin. Conference Abstract: NASCE 2011: The inaugural meet of the North American Soc for Comparative Endocrinol.
- Orozco A., Jeziorski M. C., Linser P. J., Greenberg R. M. & Valverde-R C., 2002. Cloning of the gene and complete cDNA encoding a type 2 deiodinase in *Fundulus heteroclitus*. *Gen Comp Endocrinol*, 128: 162-167
- Orozco A., Linser P. & Valverde-R C., 2000. Kinetic characterization of outer-ring deiodinase activity (ORD) in the liver, gill and retina of the killifish *Fundulus heteroclitus*. *Comp Biochem Physiol*, 126: 283-290
- Orozco A., Silva J. E. & Valverde-R C., 1997. Rainbow trout liver expresses two iodothyronine phenolic ring deiodinase pathways with the characteristics of mammalian types I and II 5'-Deiodinases. *Endocrinology*, 138: 254-258
- Orozco A. & Valverde-R. C., 2005. Thyroid hormone deiodination in fish. (Review). *Thyroid* 15: 799-813
- Putnam N.H., Srivastava M., Hellsten U., Dirks B., Chapman J., Salamoy A., Terry A., Shapiro H., Lindquist E., Kapitonov V. V., Jurka J., Genikhovich G., Grigoriev I. V., Lucas S. M., Steele R. E., Finnerty J. R., Technau U., Martindale M. Q. & Rokhsar D., 2007. Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. *Science*, 317: 86-94
- Richardson S., Power D. & Klaren P., 2007. Comparative thyroid endocrinology. *Gen Comp Endocrinol*, 152: 176-177
- Salvatore D., 2011. Deiodinases: keeping the thyroid hormone supply in balance. *J Endocrinol*, 209: 259-260
- Sanders J. P., Van der Geyten S., Kaptein E., Darras V. M., Kuhn E. R., Leonard J. L., Visser T. J., 1997. Characterization of a propylthiouracilinsensitive type I iodothyronine deiodinase. *Endocrinology*, 138:5153-5160
- Sanders J.P., Van Der Geyten S., Kaptein E., Darras V.M., Kühn E. R., Leonard J. L. & Visser T. J., 1999. Cloning and characterization of type III iodothyronine deiodinase from the fish *Oreochromis niloticus*. *Endocrinology*, 140: 3666-3673.
- Shepherdley C. A., Klootwijk W., Makabe K. W., Visser T. J. & Kuiper G. G. J., 2003. An ascidian homolog of vertebrate iodothyronine deiodinases. *Endocrinology*, 145:1255-1268
- Small-Howard A., Morozova N., Stoytcheva Z., Forry E. P., Mansell J. B., Harney J. W., Carlson B. A., Xue-ming X., Hatfield D. L. & Berry M., 2006.

Supramolecular complexes mediate selenocystein incorporation in vivo. *Mol Cell Biol*, 26:2337-2346

Solís Sainz J. C., Orozco A., García-G C., Robles-Osorio L. & Valverde-R C., 2010 Bioactividad de las hormonas tiroideas. Importancia clínica de los transportadores de membrana, de las desyodasas y de los receptores nucleares. *Rev Invest Clin (Mex)*

St. Germain D. L., Galton V. A. & Hernandez A. 2009. Minireview: Defining the roles of the iodothyronine deiodinases: current concepts and challenges. *Endocrinology*, 150: 1097-1107

Sun B. C., Harney J. W., Berry M. J. & Larsen P. R., 1997. The Role of the Active Site Cysteine in Catalysis by Type 1 Iodothyronine Deiodinase. *Endocrinology*, 138: 5452-5458

Toyoda N., Berry M. J., Harney J. W. & Larsen P. R., 1995. Topological analysis of the integral membrane protein, type 1 iodothyronine deiodinase (D1). *J Biol Chem*, 270: 12310-12318

Valverde R. C., Orozco A., Aceves C, y Romero R.C., 1998. Control y regulación de la función tiroidea. Tomo IV, capítulo 4. En: Texto de Fisiología. Células, Órganos y Sistemas. J. Muñoz-Martínez y X. García. (Edits.) SMCF. FCE., SEP., UNAM. pp 173-187

Valverde R. C., Orozco R. A., Becerra A., Jeziorski M. C., Villalobos P. -6Solís J. C., 2004. Halometabolites and cellular dehalogenase systems: an evolutionary perspective. *Int Rev Cytol*, 234: 143-199

Villalobos P., Orozco A., & Valverde-R C., 2010. Molecular cloning and characterization of a type 3 iodothyronine deiodinase in the pine snake (*Pituophis deppei*). *Gen Comp Endocrinol*, 169: 167-173

Vivek-Sagar G. D., Gereben B., Callebaut I., Mornon J. P., Zeöld A., Curcio-Morelli C., Harney J. W., Luongo C., Mulcahey M. A., Larsen P. R., Huang S. A. & Bianco A. C., 2008. The thyroid hormone-inactivating deiodinase functions as a homodimer. *Mol Endocrinol*; 22: 1382-1393

Anexos.

Cuadro 1. Desyodasas de Yodotironinas. Principales Características Bioquímicas y Funcionales

CARACTERÍSTICA	D1	D2	D3
FUNCIÓN PRINCIPAL	Depuración de rT ₃ y T ₃ S	Principal fuente de T ₃ plasmática	Prevención de T ₃ intracelular
REACCIÓN CATALÍTICA	ORD: T ₄ a T ₃ IRD: T ₄ a rT ₃ T ₃ S a 3,3'-T ₂	ORD: T ₄ a T ₃	IRD: T ₄ a rT ₃ T ₃ y T ₃ S a 3,3'-T ₂
LOCALIZACIÓN SUBCELULAR	Membrana plasmática Sitio activo en citosol	Retículo endoplásmico Sitio activo en citosol	Membrana plasmática Sitio activo en fluido extracelular
Km (M)	10 ⁻⁶ - 10 ⁻⁷	10 ⁻⁹ - 10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁷ - 10 ⁻⁹
Vmax (pmol/mg/h)	~ 60000	~ 0.05	~ 30
INHIBIDORES:			
PTU	++++	-	-
GTG	++++	+	++
Ácido iopanóico	++++	++	+
DISTRIBUCIÓN TISULAR	Hígado Riñón Tiroides Hipófisis	Hipófisis Cerebro BAT	Placenta Piel Cerebro Útero gestante
GEN CODIFICANTE	Humano: 1p32-p33; 17.5 Kb 4 exones; 2 TRES	Humano: 14q24.3; 15 Kb; un intrón de 7.4 kb	Humano: 14q32; 1 exón
REGULACIÓN POR SUSTRATO:			
HIPERTIROIDISMO	↑↑ mRNA	↓ mRNA	¿?
Mecanismos pretranscripcionales	↓↓	↓↓↓	¿?
Mecanismos postranscripcionales		Ubiquitina	
HIPOTIROIDISMO	↓	↑	↑↑ mRNA
OTROS REGULADORES:			
Positivos	Ácido retinoico GH Tiroides: cAMP; TSH	cAMP BAT: Insulina; Glucagon; Catecolaminas	RA aFGF bFGF EGF
Negativos	Glucocorticoides Citocinas	GH	GH