



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Caracterización de las interacciones entre los monómeros de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei*, *T. cruzi*, *Leishmania mexicana* y *Homo sapiens* mediante el sistema de doble híbrido

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO

PRESENTA:
JORGE DIZÁN RAMÍREZ SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. RUY PÉREZ MONTFORT



2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Datos del alumno

Jorge Dizán Ramírez Sánchez
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología

Datos del tutor

Dr. Ruy Pérez Montfort

Jurado Asignado

Presidente: Dr. José Vázquez Prado

Vocal: Dra. Laura Kawasaki Watanabe

Secretario: Dr. Ruy Pérez Montfort

1er Suplente: M. en C. Vanessa Vega García

2do Suplente: Lic. en I.B.B. Genaro Vázquez Victorio

Datos del trabajo escrito

Caracterización de las interacciones entre los monómeros de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei*, *T.cruzi*, *Leishmania mexicana* y *Homo sapiens* mediante el sistema de doble híbrido

Número de páginas: 38

Año: 2013

Reconocimientos

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 201 en el edificio oriente del Departamento de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Ruy Enrique Pérez Montfort.

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del donativo no. 167823, por el programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) De la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México a través del donativo No. IN221812.

Agradezco la ayuda técnica de la Bióloga Nallely Cabrera González y Ricardo Hernández García en la realización del presente trabajo.

Agradecimientos

En principio, agradezco el apoyo, dedicación, tolerancia y comprensión por parte de mis padres, Gabriela Sánchez Cabrera y Jorge Dizán Ramírez Osio, durante la realización de mi licenciatura y la presente tesis.

Al Dr. Ruy Pérez Montfort por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto de investigación en su laboratorio, por su apoyo, asesoría y dirección. También, a la Dra. Ingeborg Becker Fauser, quien me encaminó inicialmente en este proyecto.

Al Dr. José Vázquez Prado por su apoyo, asesoría y orientación en el montaje de la metodología del doble híbrido durante mi estancia en el laboratorio 35F del departamento de farmacología del CINVESTAV. Asimismo, a Ricardo Hernández García por su ayuda y asistencia técnica en la fase inicial de los resultados, que permitió la expansión y complementación de este trabajo.

A los miembros del laboratorio 201 oriente: Nallely Cabrera González, quien me inició en el proyecto de doble híbrido y me instruyó en la parte correspondiente a biología molecular del mismo e Itzhel García Torres por sus incontables aportes y principalmente su gran amistad.

A uno de mis más grandes amigos, Alonso Zavaleta por acompañarme en los momentos más difíciles y tediosos de la carrera.

ÍNDICE

1 Resumen.....	1
2 Introducción	2
2.1 Glucólisis: Origen y evolución	2
2.2 Características generales de la TIM	3
2.3 Importancia y generalidades de las interacciones proteína-proteína	5
2.4 La interfase de la TIM como blanco de agentes terapéuticos.....	6
2.5 Interfases de las TIMs de tripanosomátidos.....	7
2.6 Técnicas para el estudio de las interacciones proteína-proteína.....	8
2.7 Ensayo de Doble Híbrido.....	9
2.8 Genes reporteros empleados en el ensayo de doble híbrido	11
2.9 Aplicaciones del ensayo de Doble Híbrido.....	11
3 Antecedentes	12
3.1 Doble híbrido empleando la TIM	12
4 Objetivos.....	14
4.1 Objetivo General	14
4.2 Objetivos particulares	14
5 Materiales y métodos	15
5.1 Clonación de las TIMs en los vectores pGBK-T7 y pGAD-T7	15
5.2 Transformación de las construcciones en levaduras	19
5.3 Siembra en medios selectivos	21
6 Resultados.....	24
6.1 Grupos Control	24
6.2 Formación de homodímeros de TIM	25
6.3 Formación de heterodímeros de TIM	26
7 Discusión.....	29
7.1 La posición de los dominios de fusión no altera el comportamiento el patrón de dimerización	29
7.2 Las interacciones entre los monómeros de los tripanosomátidos tienen diferente intensidad.....	29
7.3 Compatibilidad entre monómeros de la TIM.....	33
8 Conclusiones	35
9 Perspectivas.....	36
10 Referencias Bibliográficas	37

Abreviaturas

2YH	Ensayo de doble híbrido
AD	Dominio de activación
AHLT	Medio selectivo carente de los aminoácidos histidina, leucina, triptófano y el nucleótido adenina.
CIP	Fosfatasa Alcalina
DBD	Dominio de unión a ADN
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DOB	Medio líquido para levaduras libre de aminoácidos
DOBA	Medio semisólido para levaduras libre de aminoácidos.
FRET	Transferencia de energía de resonancia
G3P	Gliceraldehído 3-fosfato
HLT	Medio selectivo carente de los aminoácidos histidina, leucina y triptófano.
HsTIM	Triosafofosfato isomerasa de <i>Homo sapiens</i>
<i>k</i> _{cat}	Constante catalítica
K _m	Constante de Michaelis-Menten
LB	Medio Luria-Bertani
LmTIM	Triosafofosfato isomerasa de <i>Leishmania mexicana</i>
LT	Medio selectivo carente de los aminoácidos leucina y triptófano
LUCA	Último ancestro común
TbTIM	Triosafofosfato isomerasa de <i>Trypanosoma brucei</i>
TcTIM	Triosafofosfato isomerasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>
TIM	Triosafofosfato isomerasa
YPD	Medio líquido rico en nutrientes para levaduras

1 Resumen

La triosafosfato isomerasa (TIM) es una enzima glucolítica presente en la mayoría de los organismos. Dicha enzima es comúnmente un dímero de dos monómeros idénticos entre sí, y a la zona donde se llevan a cabo las interacciones entre estos se le conoce como interfase. Estas interacciones son determinantes para su actividad enzimática; razón por la cual, dicha interfase puede ser un blanco atractivo para la generación de fármacos que interfieran con las interacciones en variantes de esta proteína presentes en parásitos patógenos para el hombre.

Para estudiar las interacciones de las interfases formadas por los monómeros de las TIMs de *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania mexicana* y *Homo sapiens*, se montó la metodología de doble híbrido en levadura. Esta metodología *in vivo* consiste en la fusión de un dominio proteico a cada monómero de las TIMs mencionadas. En caso de que los monómeros de interés interactúen entre sí, los dominios proteicos reconstituyen el factor transcripcional encargado de activar al gen reportero.

Cada variante de TIM antes referida se subclonó en los vectores pGBK-T7 y pGADT7. De este proceso se obtuvieron un total de 8 construcciones. Con estas construcciones se formaron 16 combinaciones las cuales fueron transformadas en la cepa AH109 de *Saccharomyces cerevisiae*. Los resultados experimentales indicaron que: 1) Los monómeros de cada especie de TIM pueden dimerizar dentro del núcleo de la levadura y formar homodímeros. 2) Existe complementación entre monómeros de especies cercanas y formación de heterodímeros. 3) No existe complementación entre monómeros de especies lejanas como tripanosomátidos y el humano. Por lo tanto, este sistema podría ser empleado para el estudio de interfases y moléculas que afecten las interacciones entre monómeros de TIM.

2 Introducción

2.1 Glucólisis: Origen y evolución

La glucólisis es una de las vías metabólicas más ancestrales en los organismos, evidencia de esto es su presencia en los tres dominios de la vida (Archaea, Procarya y Eucarya)^{1,2}. Esta característica posiciona a la glucólisis en el ancestro común a todos los organismos denominado LUCA, (por su siglas en inglés: Last Universal Common Ancestor) entidad que representa el punto de partida para la divergencia de todas las formas de vida conocidas en la tierra³.

Conformar una nueva ruta metabólica requiere de dos pasos básicos: adquisición de genes y adaptación para funcionalización de la información adquirida (en forma de genes)³. En el caso de la glucólisis, el origen exacto de los genes iniciadores no se conoce con certeza y sigue estando en debate. Las explicaciones existentes acerca de su origen plantean que el mecanismo fundamental debió ser la duplicación génica, y, el medio de adquisición y diversificación de la información, la transferencia horizontal génica¹⁻³. En lo que se refiere al modelado y funcionalización de la vía glucolítica, se cree que su desarrollo debió haber ocurrido mediante ensamblaje aleatorio, es decir enzimas que evolucionaron de forma independiente y que se asociaron por azar. Aunque cabe señalar que, a pesar de que existen similitudes en las enzimas de la vía glucolítica a nivel estructural, éstas similitudes son producto de convergencia evolutiva, un mecanismo a través del cual las enzimas evolucionan hacia formas análogas que favorecen su estabilidad o su interacción con ligandos^{1,2,4}.

La glucólisis es la vía metabólica encargada de la degradación oxidativa de la molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato⁵. Este proceso se lleva a cabo por diez enzimas. De las diez enzimas, sólo cuatro se encuentran altamente conservadas y constituyen lo que se conoce como “vía troncal de la glucólisis” porque en cada variante de esta vía metabólica están presentes. Estas se encuentran en la porción inferior de la vía catalizando la quinta, sexta, séptima y novena reacciones que corresponden a las enzimas, triosafosfato isomerasa

(TIM), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPDH), fosfoglicerato cinasa (PGK) y enolasa, respectivamente^{2,4}. La tasa de mutación de estas enzimas es de las más bajas que se conocen, razón por la cual han sido empleadas como relojes moleculares⁴.

De las enzimas anteriormente mencionadas cabe señalar que la TIM es una de las enzimas clave para el funcionamiento adecuado de la célula. Por ejemplo, se conocen variantes de la TIM con mutaciones puntuales que causan graves padecimientos en humanos⁶.

Asimismo, es una de las proteínas más estudiadas y mejor caracterizadas en laboratorio. Por ende, el estudio de las interacciones entre monómeros a nivel de su interfase puede contribuir al desarrollo de fármacos que tengan como blanco a la TIM. Por estas razones, fue seleccionada para ser el modelo de estudio del presente trabajo.

2.2 Características generales de la TIM

La TIM (E.C. 5.3.1.1) es la enzima glucolítica que lleva a cabo la interconversión de dihidroxiacetona-fosfato (DHAP) a gliceraldehído-3-fosfato (G3P) (Figura 1a). En la TIM la eficiencia catalítica se encuentra limitada por la difusión de sustratos, por lo que esta enzima se ha definido como un “catalizador perfecto”. La relación k_{cat}/k_m para gliceraldehído-3-fosfato es de $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (7).

La TIM presenta una topología arquetípica conocida como barril-TIM ($\alpha\text{-}\beta_8$), la cual consiste en un patrón de α -hélices y láminas- β repetido ocho veces (Figura 1b). Las ocho láminas- β se agrupan en el interior de manera paralela, y son recubiertas en el exterior por las ocho α -hélices correspondientes (Figura 1c). Este arreglo es uno de los más frecuentes en las enzimas, y siempre tiene al sitio activo localizado topológicamente en la misma posición: en la porción carboxilo terminal del barril- β . Cada una de las láminas- β se conecta con una α -hélice mediante un asa, resultando así en un total de ochos asas, las cuales serán referidas de aquí en adelante como asa-1, asa-2, etc.

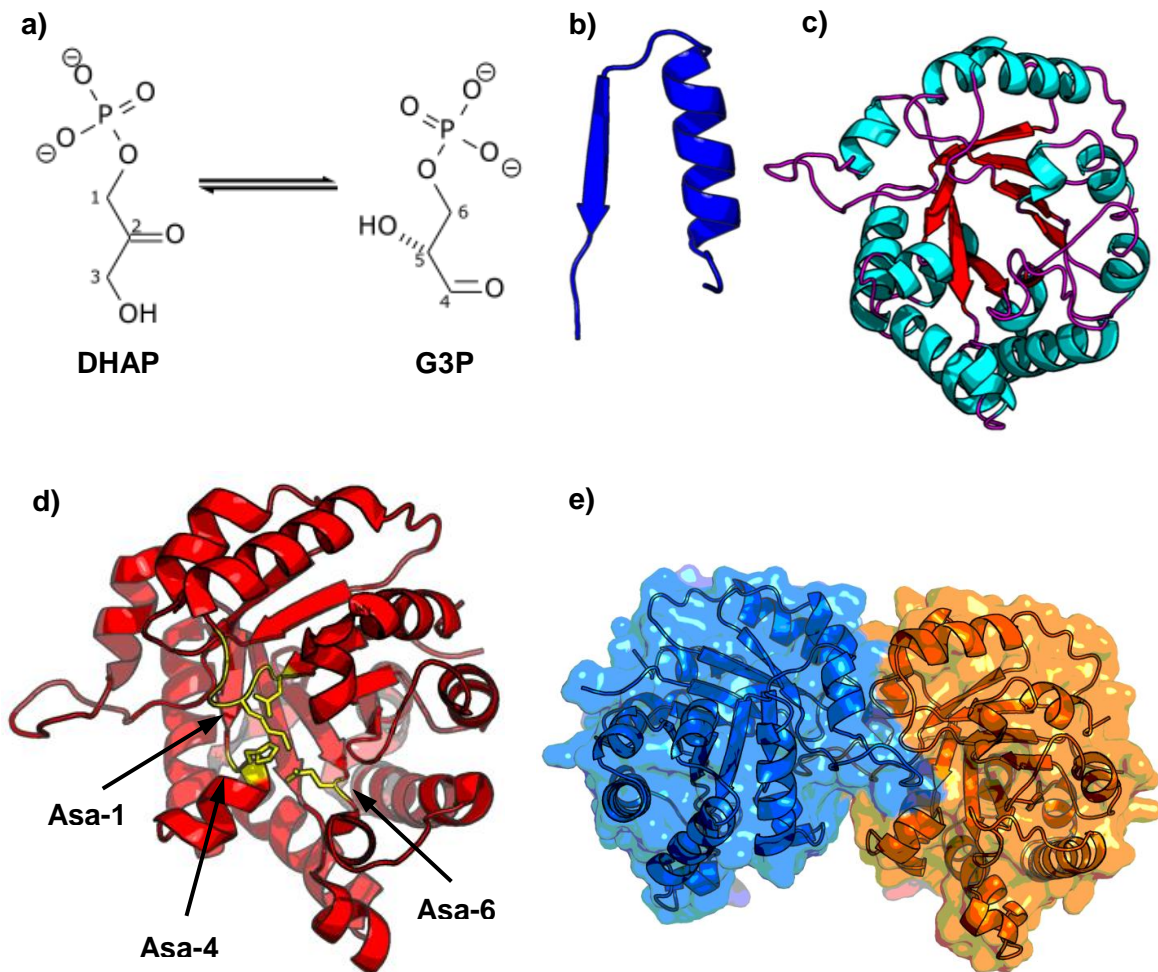


Figura 1: a) Interconversión de dihidroxiacetona-fosfato (DHAP) a gliceraldehído-3-fosfato (G3P). b) Módulo formado por una α -hélice, un asa y una lámina- β ; ocho repeticiones de este módulo conforman a cada barril α - β_8 en la TIM. c) En este panel, se observa a uno de los monómeros, en este se aprecian las láminas- β , en rojo, en el interior del barril y a las α -hélices, en cian, en el exterior del mismo. d) Las flechas señalan a las asas 1, 4 y 6, estas asas aportan los residuos, en color amarillo, que integran el sitio catalítico. e) Modelo de la TIM de *T. brucei*; en este panel se muestra la estructura de la enzima en su forma activa, compuesta por el monómero X en azul y el Y en naranja. Las líneas mas intensas dentro de cada monómero representan la cadena principal de la misma. Los modelos fueron realizados con las coordenadas depositadas en el PDB, con código 5TIM, utilizando el programa Pymol.

Tres de las ocho asas de la TIM, proveen los residuos que conforman el sitio catalítico. Estas son: el asa-1 (Asparagina11 y Lisina 13), el asa-4 (Histidina95) y el asa-6 (Ácido glutámico167) (Figura 1d). La geometría del sitio activo se favorece conformacionalmente por una pequeña hélice en el asa-4 y un asa flexible de once residuos de longitud, que forma parte de las asas 6, y 8. Todos estos aminoácidos, junto con el asa-6, proveen interacciones tipo puente de hidrógeno con el grupo fosfato del sustrato^{8,9}. El asa-6 se conoce como el asa del sitio activo y favorece la unión y liberación del ligando en su conformación abierta, mientras que, en su conformación cerrada, protege y controla los intermediarios de la reacción⁸.

La TIM sólo es activa en su forma dimérica, por lo que requiere forzosamente de la asociación entre dos monómeros idénticos; sin embargo, cada uno de estos monómeros posee todos los aminoácidos que forman su propio sitio activo (Figura1e). Al parecer, es la dimerización la que consolida a cada uno de los sitios activos para proveer el poder catalítico completo. En la asociación entre ambos monómeros de la TIM intervienen las asas 1, 2, 3, 4 y 8; en estas asas se encuentran los aminoácidos que forman la interfase de la enzima^{6,7} (Figura 2).

2.3 Importancia y generalidades de las interacciones proteína-proteína

Las interfases de las proteínas son zonas de estas moléculas donde se llevan a cabo interacciones proteína-proteína, las cuales regulan, a nivel celular y molecular, funciones como actividad, andamiaje y comunicación, entre otras. Las interacciones proteína-proteína son muy complejas y pueden estar determinadas por muchos factores, entre los cuales destacan: tamaño, forma y complementariedad de las moléculas, así como su hidrofobicidad, interacciones electrostáticas y flexibilidad de los aminoácidos que las integran⁷. Las secuencias de aminoácidos que componen estas zonas de interacción proteína-proteína se encuentran relativamente conservadas a nivel evolutivo. Es decir, estas secuencias se conservan en menor grado, en comparación con las que componen el sitio activo, pero en mayor grado que las que se encuentran en la superficie de la proteína. Esto implica que las interfases, al ser regiones menos conservadas que el sitio activo, presentan diferencias significativas en su secuencia de

aminoácidos, lo que puede ser de gran importancia si se busca interferir o alterar dichas interacciones. Teniendo en cuenta lo anterior, perturbar las interacciones de la interfase de proteínas oligoméricas, que tienen una función clave en el metabolismo celular, puede ser una estrategia viable para combatir enfermedades provocadas por organismos patógenos¹⁰.

2.4 La interfase de la TIM como blanco de agentes terapéuticos

La familia trypanosomatidae es un grupo de parásitos protozoarios al que pertenecen las especies *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* y algunas especies del género *Leishmania*, como *L. mexicana*. Estos parásitos son los agentes causales de tres enfermedades en humanos: la tripanosomiasis africana o enfermedad del sueño, la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas y la leishmaniasis, respectivamente. Estos parásitos se caracterizan por tener ciclos de vida complejos que, a su vez, involucran varios estadios de vida en distintos hospederos. Como es el caso en muchas otras parasitosis, los medicamentos son poco específicos y efectivos, además de que estos presentan efectos adversos debido a su toxicidad¹¹. Por esto surge el planteamiento de encontrar agentes específicos dirigidos contra componentes esenciales de estos parásitos, como proteínas involucradas en vías de señalización o en el metabolismo energético.

En relación a lo anterior, se ha observado que *T. brucei* depende exclusivamente de la glucólisis para obtener energía durante su fase sanguínea, etapa en la que recorre el sistema circulatorio del humano¹². También se ha reportado que la delección del gen que codifica para la TIM de *T. brucei*, afecta de manera considerable su crecimiento y supervivencia¹³, lo que sustenta la utilización de esta enzima como blanco. Por lo tanto, interferir, de forma selectiva, con las interacciones que se llevan a cabo en la interfase de las TIMs de estos parásitos, mediante moléculas pequeñas, podría llevar a la inhibición de la actividad catalítica de ésta enzima y, en consecuencia, erradicar a los parásitos dentro del huésped.

2.5 Interfases de las TIMs de tripanosomátidos

Las TIMs de los tripanosomátidos que utilizamos en este estudio son las de *T. brucei*, *T. cruzi* y *L. mexicana*, subsecuentemente estas serán referidas como TbTIM, TcTIM y LmTIM. Las interfases de estas TIMs están formadas por aproximadamente 32 aminoácidos¹⁴. El alineamiento de las tres secuencias de la interfase revela que TbTIM y TcTIM tienen un 76% identidad, lo que quiere decir que solamente existen ocho aminoácidos diferentes entre sí. De estos cambios, cuatro son sustituciones conservativas, una semiconservativa y tres sin homología (Figura 3). Por su parte, LmTIM tiene un 79% de identidad con TbTIM y TcTIM; es decir, siete residuos de diferencia con cada una de ellas. Al comparar LmTIM con TbTIM se observan cuatro sustituciones conservativas, una semiconservativa y dos sustituciones no homólogas; mientras que, al comparar LmTIM con TcTIM se observan cuatro sustituciones conservativas y tres no homólogas. Lo anterior sugiere que las interfases menos similares entre sí, son las TbTIM y TcTIM; mientras que, la interfase mas parecida a TbTIM y TcTIM es la de LmTIM.

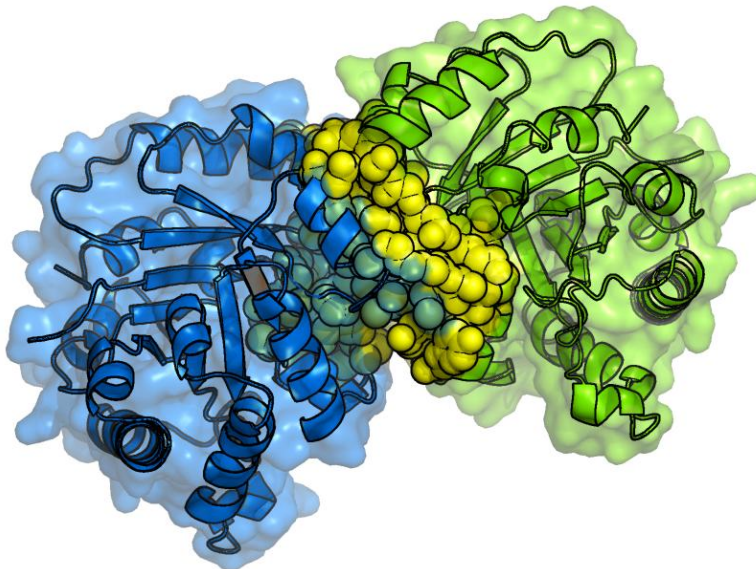


Figura 2: Interfases de las TIMs de los tripanosomátidos. Las interfases se distribuyen del asa 1 a la 4 y en el asa 8 de cada monómero; en la imagen los residuos de la interfase se representan como esferas amarillas. Imagen generada con el programa Pymol con el archivo 5TIM.

```

TcTIM NKCNGSETFLHIPMQISGAFTGEVSQIDYHERY
LmTIM NKCNGTTTFVHIPLEISGAFTGEVSPIDIHERY
TbTIM NKCNGSQTFVHLAQNISGAFTGEVSPIDFHERY
*****: **:*:. :***** ** *****

```

Figura 3: Alineamiento de las interfases de las TIM de los tres tripanosomátidos obtenido del servidor en línea CustalW2. En él se observan las sustituciones que existen entre las tres secuencias, nueve en total, de las cuales dos son no homólogas, dos semiconservativas y siete conservativas. Los símbolos (*), (:), (.) y () denotan identidad, sustitución conservativa, sustitución semiconservativa y sustitución no homóloga, respectivamente, en base a las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos.

2.6 Técnicas para el estudio de las interacciones proteína-proteína

Las interacciones proteína-proteína como, se mencionó anteriormente, están involucradas en todos los procesos celulares, por lo que dilucidar su papel en sistemas biológicos es de especial importancia.

En la actualidad se han desarrollado una gran variedad de técnicas para encontrar y caracterizar estas interacciones que van, desde los enfoques bioquímicos clásicos, hasta las mas recientes tecnologías basadas en aplicaciones biofísicas.

De manera general, a todas estas técnicas se les puede dividir en dos grandes grupos: las técnicas *in vitro*, que son aquellas que involucran extracción, purificación o separación de las proteínas de interés para caracterizar la interacción fuera de los organismos y las técnicas *in vivo*, con las que la interacción puede ser rastreada dentro del organismo.

Algunas de las técnicas *in vitro* para la detección de interacciones proteína-proteína son: la copurificación, la purificación por afinidad y la coimmunoprecipitación. Normalmente estas técnicas se usan acopladas a la espectroscopía de masas para identificar las contrapartes con las que interacciona la proteína de interés. Por su parte, del grupo de las técnicas *in vivo* destacan técnicas como la transferencia de energía de resonancia FRET (por sus siglas en inglés Fluorescence Resonance Energy Transfer) y el doble híbrido. En la

actualidad esta última es una de las más utilizadas, puesto que permite detectar interacciones de baja afinidad o menor estabilidad; además, ésta técnica permite acceder a casi todo el proteoma celular en busca de interacciones, incluyendo proteínas de membrana, proteínas transcripcionalmente activas, proteínas compartimentalizadas en organelos o análisis masivos de bibliotecas génicas¹⁵. En el presente trabajo se empleó la técnica del doble híbrido, cuyo fundamento se abordará en detalle a continuación.

2.7 Ensayo de Doble Híbrido

El ensayo de doble híbrido (Y2H por sus siglas en inglés Yeast Two-Hybrid) es un ensayo *in vivo* semicuantitativo que permite el estudio de interacciones entre proteínas. Esta técnica se desarrolló a partir los descubrimientos hechos por Mark Ptashne, sobre las características modulares estructurales del factor de transcripción conocido como GAL4 de *Saccharomyces cerevisiae*, el cual se activa en presencia de galactosa. En dicho trabajo se observó que la proteína GAL4 posee dos dominios, uno de unión específica al DNA o “DBD” (del inglés, DNA Binding Domain), ubicado en la porción amino-terminal, y otro de activación o “AD” (del inglés, Activation Domain), localizado en la porción carboxilo-terminal, encargado de la activación de la maquinaria de transcripción. Al separar esta proteína en dos fragmentos, se descubrió que el fragmento amino-terminal seguía uniéndose al DNA sin activar la transcripción en presencia de galactosa, puesto que esa función estaba mediada por el fragmento carboxilo-terminal al que corresponde el dominio de activación. Sin embargo, cuando ambos fragmentos estaban presentes, estos no podían reconstituir funcionalmente el factor transcripcional GAL4, a menos que estos fueran fusionados a proteínas que interaccionan; demostrando así que ambos dominios mantienen su función¹⁵.

Las características modulares del factor transcripcional GAL4 incentivaron a que, en el año 1989, Fields y Song desarrollaran el ensayo de doble híbrido para monitorear interacciones proteína-proteína¹⁵. El fundamento de este ensayo consiste en la adición de cada uno de los dominios antes mencionados, el DBD del amino-terminal y el AD del fragmento carboxilo-terminal, a proteínas cuya

interacción se desea analizar, generando así un par de proteínas híbridas. Si las proteínas forman un complejo entre sí, los dos dominios del factor transcripcional (DBA y AD) se encontrarán y entonces habrá una reconstitución de GAL4 la cual se medirá mediante la expresión de genes reporteros que indicarán el tipo y la intensidad de la interacción. En caso de no haber actividad de los genes reporteros, entonces se podrá asumir con cautela que no hay interacción entre las proteínas analizadas. Cabe señalar que, además de las proteínas híbridas, son necesarios sitios de reconocimiento para el anclaje del dominio DBD, específicamente de la secuencia regulatoria conocida como "UAS" (del Inglés, Upstream Activating Sequence), la cual está localizada antes del promotor, previo al sitio de inicio de la transcripción de cada gen reportero. Una vez que ambas proteínas se expresen en el citosol de la levadura, deben atravesar e interactuar dentro del núcleo para activar la transcripción¹⁵ (Figura 4).

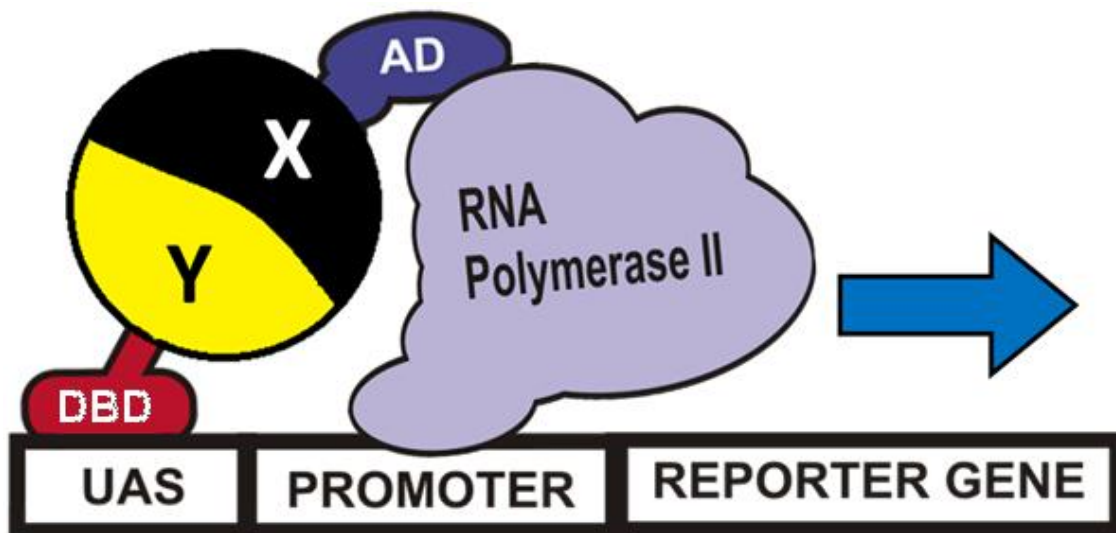


Figura 4: Esquema representativo del funcionamiento del sistema de doble híbrido. Esta imagen explica el ensamble requerido para la activación del gen reportero en el sistema. El rectángulo inferior simboliza la molécula de DNA con su secuencia de reconocimiento "UAS". En color rojo se muestra el dominio de unión a DNA fusionado a una proteína "Y", en color amarillo, que interactúa con una proteína "X", en color negro, unida al dominio de activación. Cuando existe interacción, y se forma este gran complejo, este interactúa con la RNA polimerasa, para entonces comenzar la transcripción del gen reportero.

2.8 Genes reporteros empleados en el ensayo de doble híbrido

Para el ensayo de doble híbrido se emplean una gran variedad de genes reporteros. Estos pueden dividirse en dos grandes grupos: los auxotróficos, que son marcadores nutricionales controlados a través del medio de cultivo; donde las interacciones son monitoreadas por presencia o ausencia de crecimiento de las colonias de levaduras, y, los colorimétricos, donde las interacciones pueden ser monitoreadas semicuantitativamente, mediante intensidades de color. El color resulta de la actividad de enzimas codificadas por los genes reporteros en presencia de su sustrato, como es el caso de la β -galactosidasa codificada por el gen *LacZ*.

Estos marcadores también pueden ser intracelulares o extracelulares; en el caso de los estos últimos, la detección de pares de interacción se puede llevar a cabo a través del fenotipo observado a simple vista directamente en las colonias de levaduras¹⁵.

2.9 Aplicaciones del ensayo de Doble Híbrido

El ensayo de doble híbrido se emplea, principalmente, en el tamizaje de bibliotecas génicas donde se pretende encontrar, dentro de una colección de genes que codifican para proteínas, pares de interacción entre una o varias proteínas de interés. Actualmente se cuenta con bibliotecas de órganos y organismos completos, mismas que permiten llevar a cabo monitoreos a gran escala, y, gracias a las cuales, se ha agilizado la integración de la información proveniente de la secuenciación de genomas. Asimismo este ensayo puede ser utilizado con el propósito de probar fármacos que inhiben interacciones, y en la validación y caracterización de interacciones que se encuentren por otras metodologías, como es el caso del presente trabajo.

3 Antecedentes

3.1 Doble híbrido empleando la TIM

En 2006, Ralser y colaboradores probaron cinco variantes patogénicas de la TIM en el sistema de doble híbrido con el propósito de definir si las mutaciones puntuales en la interfase de la TIM eran las responsables de la deficiencia de TIM en humanos. Entre estas variantes había dos, E104D y C41Y, cuyas mutaciones estaban localizadas cerca o dentro de la interfase. Al probar estas variantes en el ensayo de la β -galactosidasa, se observó que ambas mostraban una dimerización alterada. En la E104D, la interacción se veía disminuida en comparación con la interacción observada en la TIM control o silvestre, una enzima sin mutaciones. Por su parte, la variante C41Y presentaba una interacción aumentada en comparación con la TIM control¹⁶.

Estos hallazgos, junto con resultados provenientes de estudios metabólicos *in vivo*, demuestran que la dimerización aberrante es la causa principal del padecimiento conocido como deficiencia de TIM. Otro factor determinante en la manifestación de dicho padecimiento es la manera como se presenta este alelo, puesto que sólo los individuos homocigóticos manifiestan el padecimiento, es decir, aquellos individuos que portan ambos alelos con mutaciones involucradas en la dimerización de la TIM¹⁶.

Para determinar a detalle la influencia de los alelos mutantes en la dimerización, los investigadores formaron heterodímeros usando la técnica de doble híbrido. Crearon híbridos integrados por un monómero silvestre, en combinación con alguno de los monómeros patógenos, o los formados entre el monómero mutante E104D en combinación con otro que tenía otra mutación.

Hasta el momento, el doble híbrido es una de las pocas técnicas que permite probar heterodímeros y estudiar sus interacciones *in vivo*. Sin embargo, las interacciones entre las TIMs de tripanosomátidos también se han estudiado por otras metodologías *in vitro*, como la utilizada en el trabajo de Zomosa-Signoret y colaboradores en 2003¹⁷. En este caso utilizaron una técnica conocida como

reactivación la cual consiste en desnaturalizar por separado los dímeros de TcTIM y TbTIM con cloruro de guanidina, para después mezclarlos y renaturalizarlos en conjunto. De esta manera se forman tanto heterodímeros, como homodímeros de TcTIM y TbTIM. Interesantemente, se encontró que existe una preferencia por parte de los monómeros de TbTIM en asociarse con los de TcTIM, en vez de asociarse con los propios; y que los monómeros de TcTIM son más rápidos para renaturalizarse, asociarse y activarse¹⁷.

Con base en las observaciones hechas por Zomosa-Signoret y colaboradores decidimos estudiar las interacciones *in vivo* entre las TIMs de tres tripanosomátidos, así como con la TIM de humano, empleando el sistema de doble híbrido en combinación con genes reporteros auxotróficos.

4 Objetivos

4.1 Objetivo General

Investigar y comprobar si existe interacción entre los monómeros de las variantes de la triosafosfato isomerasa de las especies: *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania mexicana* y *Homo sapiens* en el sistema de doble híbrido.

4.2 Objetivos particulares

Caracterizar cualitativamente la fuerza de las interacciones entre monómeros de la misma especie (homodímeros).

Determinar si las interfases de las TIM de los tripanosomátidos utilizados en este trabajo, son suficientemente conservadas para formar heterodímeros entre monómeros de distintas especies.

Determinar cualitativamente la fuerza de la interacción (si es que existe) entre los dímeros formados por monómeros de distintas especies (heterodímeros).

5 Materiales y métodos

5.1 Clonación de las TIMs en los vectores pGBK-T7 y pGAD-T7

Como se mencionó anteriormente, el ensayo de doble híbrido requiere que a cada una de las proteínas de interés se les fusione por separado el dominio de activación (AD), constituido por 113 aminoácidos, o el dominio de unión a DNA (DBD), de 141 aminoácidos, del factor transcripcional GAL4. Los plásmidos pGBK-T7 y pGAD-T7, pertenecientes al Kit comercial de doble híbrido Matchmaker III de Clontech™, contienen, respectivamente, los dominios DBD y AD (Figura 5). Por lo tanto, los genes que codifican para las proteínas: TbTIM, TcTIM, LmTIM y HsTIM, se subclonaron en estos vectores como se describe a continuación.

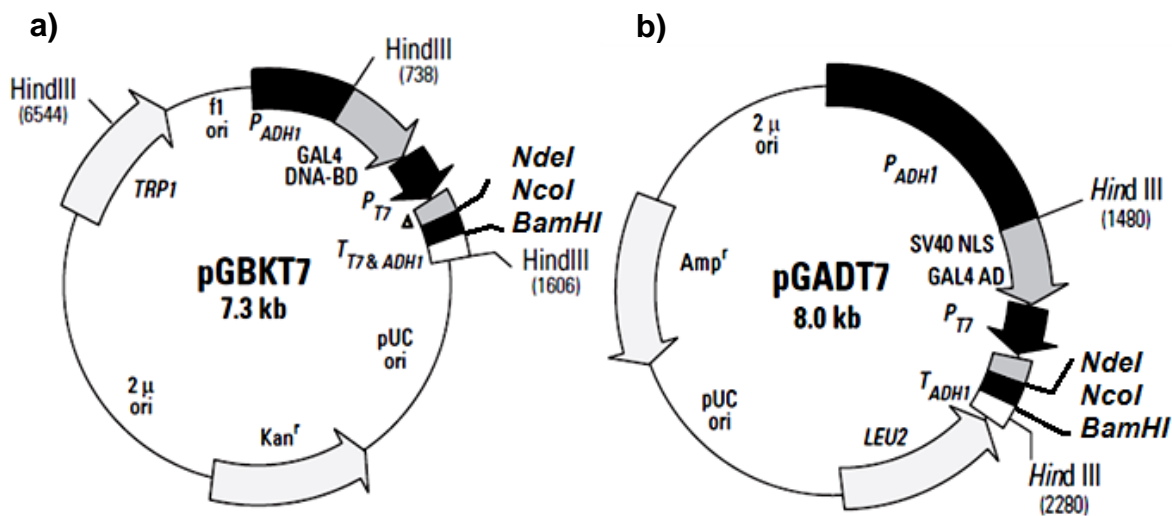


Figura 5: Mapas de los vectores pGADT7 y pGBKT7. En el inciso a) se observa al vector pGBKT7, portador del dominio de interacción con DNA (BD), fragmento que tiene una longitud de 423 pares de bases. Por su parte pGBKT7 posee el marcador auxotrófico TRP1 para levadura y un marcador de resistencia al antibiótico kanamicina para su manipulación en bacterias¹⁸. En el inciso b) se observa al vector pGADT7; este vector es el portador del dominio de activación (AD) que tiene una longitud de 339 pares de bases. pGADT7 cuenta con el marcador auxotrófico LEU2 empleado para la selección en levaduras, asimismo contiene un marcador de resistencia a ampicilina utilizado durante el proceso de subclonación y manipulación de los vectores en bacterias¹⁸.

Cada uno de los genes de las TIMs se encontraba clonado en el vector de expresión pET3a, por lo que estos genes se extrajeron uno a uno empleando enzimas de restricción conforme los sitios de restricción presentes en el vector parental.

Para obtener el gen de TbTIM, el plásmido parental pET3a-TbTIM, se digirió solamente con la enzima *NdeI*, mediante 4 ciclos de 19 segundos en un horno de microondas (Samsung, 2250 Mhz) con intervalos de 3 minutos. Los insertos de TcTIM y LmTIM se extrajeron con las endonucleasas *NdeI* y *BamHI*, de los correspondientes plásmidos parentales pET3a-TcTIM y pET3a-LmTIM, mediante digestión simultánea en el horno de microondas con tres ciclos de 18 y un ciclo de 15 segundos con intervalos de 3 minutos. El vector pET3a-HsTIM fue digerido simultáneamente con las enzimas *NcoI* y *BamHI*, con el mismo intervalo temporal empleado para TcTIM y LmTIM en el horno de microondas, para obtener el gen de HsTIM.

Los productos digeridos se analizaron por corrimiento en geles de agarosa al 1%. Las bandas correspondientes a los insertos de TbTIM, TcTIM, LmTIM y HsTIM se cortaron y purificaron utilizando el Kit de extracción en el gel (Qiaquick).

Los vectores pGBK-T7 y pGAD-T7 se digirieron utilizando la misma combinación de enzimas de restricción empleada en la extracción de cada uno de los insertos. Generando en cada uno de los plásmidos los sitios de restricción *NdeI-NdeI*, *NdeI-BamHI* y *NcoI-BamHI*. El plásmido pGBK-T7 se digirió utilizando un horno de microondas y aplicando 2 ciclos de 18 y un ciclo de 15 segundos con intervalos de 3 minutos; pGAD-T7 se digirió con 3 ciclos de 19 y uno de 16 segundos. Los productos de estas digestiones se analizaron por corrimiento en gel de agarosa y se purificaron con el kit de extracción en el gel. Finalmente, los plásmidos digeridos se trataron con fosfatasa alcalina intestinal de ternero (CIP de NEB), para desfosforilar los extremos generados y evitar su religación, con la finalidad de

aumentar la eficiencia de ligación.

Las reacciones de ligación se realizaron con los plásmidos digeridos y desfosforilados, junto con el DNA digerido de cada una de las TIMs. Para cada reacción de ligación, vector e inserto fueron incubados en una proporción 1:3 (vector: inserto) en presencia de la ligasa T4 de NEB durante toda la noche a 16°C. Los productos de las reacciones se transformaron en *E.coli* cepa XL-Gold, competentes, posteriormente estas células fueron plaqueadas en cajas de Petri con medio LB; adicionado con el antibiótico correspondiente para cada vector, ampicilina para las construcciones resultantes del vector pGAD-T7 y kanamicina para las resultantes de pGBKT-7.

De las colonias transformantes obtenidas, se hicieron cultivos en medio LB líquido con ampicilina y kanamicina para purificar el DNA de cada clona, utilizando el Kit Miniprep de Qiagen. Para monitorear las clonas, y saber cual de ellas contenía el inserto, se digirió el DNA de cada clona con las enzimas de restricción empleadas en la digestión inicial de cada uno de los insertos. El DNA de las clonas positivas para TbTIM se digirió nuevamente con la enzima *PstI* para determinar si este fragmento se encontraba clonado en dirección 5'-3' dentro de cada vector. El gen de TbTIM, y los vectores pGBKT7 y pGADT7, cuentan con un sitio de corte para *PstI*.

Si el fragmento hubiera estado clonado en dirección 5'-3' dentro del vector pGBK-T7, se obtendría un fragmento de 612 y otro de 7441 pares de bases (pb) al ser digerido con *PstI*. En cambio si el fragmento se estuviera en dirección 3'-5' se obtendrían dos fragmentos diferentes, uno de 429 y otro de 7624 pb.

Por su parte, si en el vector pGAD-T7 si el fragmento se encontrara clonado en dirección 5'-3', al ser digerido se obtienen dos fragmentos, uno de 632 y otro de 8334 pb, pero si este estuviera clonado en dirección opuesta se obtendrían dos fragmentos diferentes, uno de 456 y otro de 8510 pb.

El DNA purificado de las clonas de TbTIM con el inserto en dirección 5'-3' y el de las clonas positivas para TcTIM, LmTIM y HsTIM se secuenció para corroborar la identidad de cada fragmento y verificar que no existieran mutaciones.

Las construcciones obtenidas del proceso de subclonación se enumeran a continuación:

- 1) TbTIM+pGADT7**
- 2) TcTIM+pGADT7**
- 3) LmTIM+pGADT7**
- 4) HsTIM+pGADT7**
- 5) TbTIM+pGBKT7**
- 6) TcTIM+pGBKT7**
- 7) LmTIM+pGBKT7**
- 8) HsTIM+pGBKT7**

5.2 Transformación de las construcciones en levaduras

La cepa AH109 de *Saccharomyces cerevisiae* es una cepa modificada que tiene deleciones en los genes *trp1-901* y *leu2-3*; estos genes están involucrados en la síntesis *de novo* de los aminoácidos triptófano y leucina, respectivamente. Por lo tanto, en un medio carente de estos aminoácidos la cepa no crecerá a menos que previamente sea transformada con los plásmidos pGBKT7 y pGADT7 (que contienen los genes *trp1-901* y *leu2-3*, respectivamente). (Figura 5).

Para llevar a cabo la transformación de las construcciones obtenidas del proceso de subclonación; la cepa se cultivó inicialmente en un medio rico en nutrientes (YPD). Posteriormente, el cultivo celular se alicuoteó para ser transformado conforme el método de transformación en un solo paso¹⁹. Una vez transformadas, las células se recuperaron en medio “-LT” DOBA, un medio semisólido carente de los aminoácidos leucina y triptófano, para seleccionar aquellas clonas que contuvieran ambos plásmidos.

La transformación se llevó a cabo de manera que cada colonia de levaduras contuviera una pareja de vectores del tipo “xTIM”+pGADT7 y “xTIM”+pGBKT7 (siendo “xTIM” alguna de las variantes de TIM). Con las combinaciones resultantes, se formaron cuatro homodímeros y doce heterodímeros.

El kit Matchmaker III de Clontech incluye los plásmidos p53+pGBKT7 y pTD1+pGADT7. Estos plásmidos codifican en forma correspondiente a las proteínas p53 y antígeno T grande SV40. Ambas proteínas interactúan específicamente entre sí, y activan todos los genes reporteros del sistema de doble híbrido; por lo tanto constituyen un control positivo de interacción.

Para evitar falsos positivos (interacciones inespecíficas entre p53 o el antígeno T con alguna de las TIMs), los plásmidos control se transformaron en combinación con los plásmidos con las TIMs incorporadas.

En la tabla 1 se presenta la lista completa de parejas de plásmidos cotransformadas (en cada colonia). Las 25 transformaciones enunciadas en la lista fueron repetidas en tres ocasiones de manera independiente.

Posición	pGADT7	pGBKT7	Combinación resultante esperada
1	pTD1	p53	Control positivo
2	pTD1	TbTIM	Control negativo
3	pTD1	TcTIM	Control negativo
4	pTD1	LmTIM	Control negativo
5	pTD1	HsTIM	Control negativo
6	TbTIM	p53	Control negativo
7	TbTIM	TbTIM	Homodímero
8	TbTIM	TcTIM	Heterodímero
9	TbTIM	LmTIM	Heterodímero
10	TbTIM	HsTIM	Heterodímero
11	TcTIM	p53	Control negativo
12	TcTIM	TbTIM	Heterodímero
13	TcTIM	TcTIM	Homodímero
14	TcTIM	LmTIM	Heterodímero
15	TcTIM	HsTIM	Heterodímero
16	LmTIM	p53	Control negativo
17	LmTIM	TbTIM	Heterodímero
18	LmTIM	TcTIM	Heterodímero
19	LmTIM	LmTIM	Homodímero
20	LmTIM	HsTIM	Heterodímero
21	HsTIM	p53	Control negativo
22	HsTIM	TbTIM	Heterodímero
23	HsTIM	TcTIM	Heterodímero
24	HsTIM	LmTIM	Heterodímero
25	HsTIM	HsTIM	Homodímero

Tabla 1: Transformación de parejas de plásmidos en cada colonia de levaduras. La primer columna corresponde a la posición asignada dentro de la caja de Petri donde se sembró cada colonia para ser analizada posteriormente. La segunda y tercera columnas corresponden a las proteínas clonadas en los vectores pGADT7 y pGBKT7, respectivamente. La cuarta columna corresponde a los resultados esperados de la expresión de las proteínas contenidas en cada construcción.

5.3 Siembra en medios selectivos

La cepa AH109 posee tres construcciones génicas que son las responsables de la detección de interacciones entre las proteínas híbridas. Estas construcciones regulan, de forma independiente, la expresión de cuatro genes reporteros a través de su secuencia de nucleótidos, UAS y promotor o caja TATA (Figura 6).

De los cuatro genes reporteros de este sistema, tres de ellos pueden monitorearse a simple vista, analizando el fenotipo de la colonia. Estos reporteros son: *HIS3*, la expresión de este gen permite el crecimiento de la colonia en un medio carente de histidina; *ADE2* la expresión de este gen permite el crecimiento de la colonia en medio carente de adenina y *LacZ* que codifica para la enzima β -Galactosidasa, la cual, en presencia de su sustrato (β -Galactósidos), realiza una reacción de hidrólisis que cambia el color crema de las colonias a color azul.

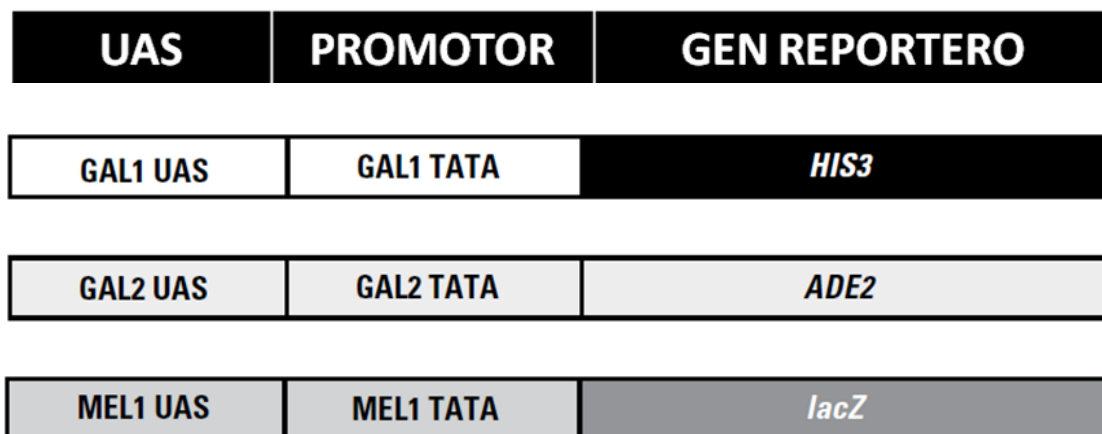


Figura 6: Construcciones presentes en AH109. Las construcciones responsables de la actividad de los genes reporteros en el genoma de AH109 tienen la estructura representada en la línea superior color negro, donde el primer rectángulo corresponde a la secuencia UAS que ensambla al dominio de unión al DNA (DB). El segundo rectángulo corresponde a la secuencia PROMOTOR encargada de reclutar la maquinaria de transcripción en asociación con el dominio de activación (AD). El tercer rectángulo es el GEN REPORTERO que codifica a la proteína que será empleada como señal. Los genes reporteros *HIS3* y *ADE2* son marcadores auxotróficos y el gen reportero *LacZ* es un marcador colorimétrico. En el presente estudio solo se utilizaron los marcadores auxotróficos.

Los genes reporteros *HIS3* y *ADE2* son marcadores cualitativos, cuya señal es del tipo “todo o nada”, debido a que la interacción sólo es detectable mediante la presencia o ausencia de crecimiento de la colonia en un medio selectivo.

Si se desea encontrar interacciones de tipo débil, basta con resembrar la colonia transformante en un medio carente del aminoácido histidina (-HLT). De esta manera, la colonia sólo será expuesta a una sola condición limitante. En cambio, si se desea encontrar interacciones del tipo fuerte, entonces se pueden utilizar ambos reporteros, *HIS3* y *ADE2*, en combinación y someter a la colonia a dos condiciones limitantes en el medio: carencia de adenina e histidina (-AHLT). En consecuencia, se verán sólo aquellas interacciones que puedan activar la expresión de ambos marcadores simultáneamente y garantizar la supervivencia de la colonia en el medio doblemente restrictivo.

Al medio que detecta interacciones de tipo débil o “interacciones temporalmente menos estables” se le conoce como medio de baja astringencia. Al medio que detecta interacciones fuertes o “temporalmente más estables” se le denomina medio de alta astringencia.

Se obtuvieron las colonias de las 25 cotransformaciones posibles. Cada una de ellas se suspendió en agua estéril para eventualmente ser llevadas a una DO_{600nm} de 0.9 mediante dilución y tener un número equivalente de células para gotear en cada uno de los medios selectivos. El goteo se realizó por duplicado de forma consecutiva en cada caja con medio -LT, -HLT y -AHLT. Se aplicó una alícuota de 10 μ l de cada colonia resuspendida en agua (con una DO_{600nm} de 0.9) en la posición señalada en la Figura 7. Finalmente las cajas goteadas con las 25 colonias se incubaron de 3 a 7 días a 30°C para después ser analizadas y fotografiadas.

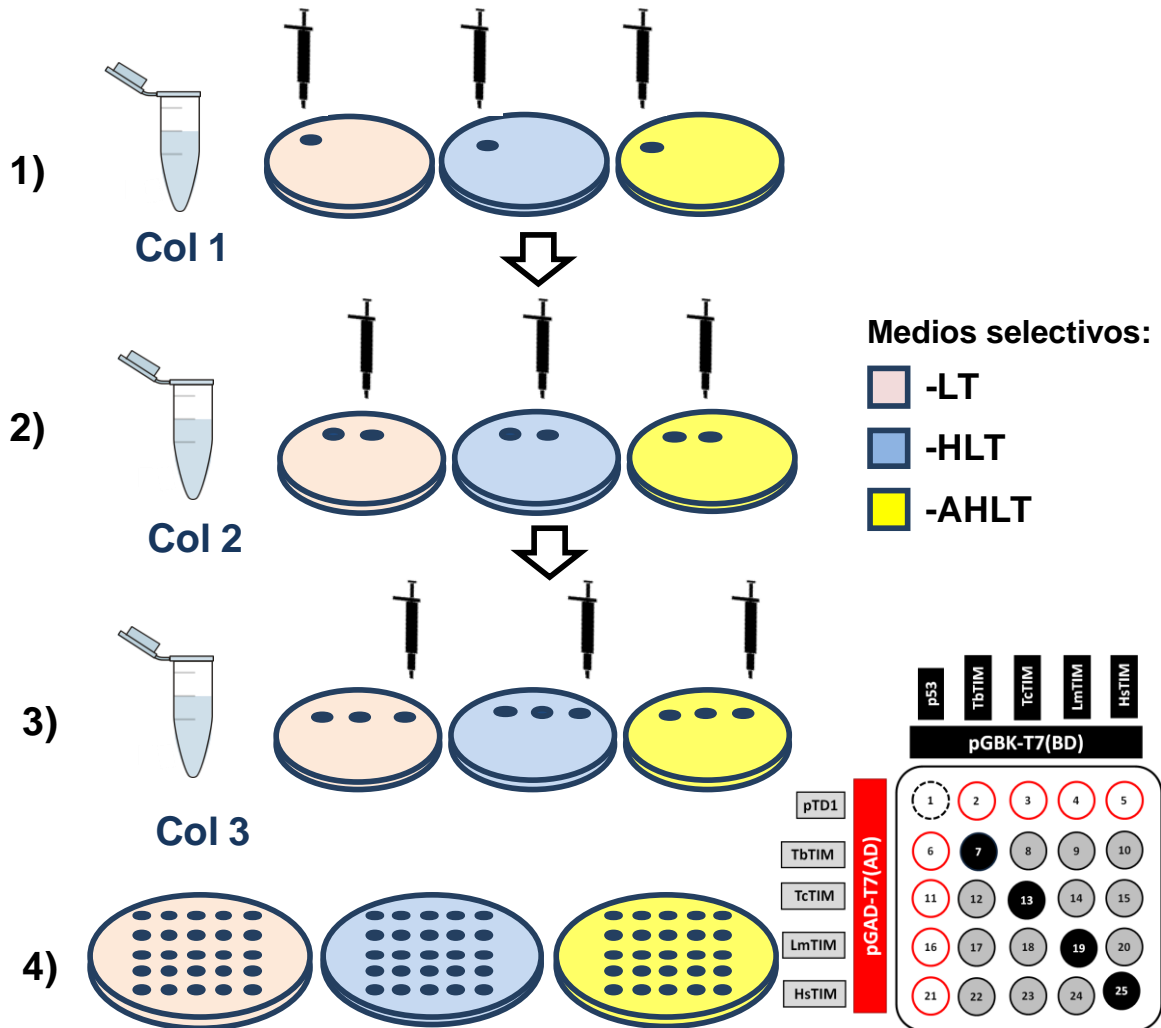


Figura 7: Diagrama de goteo en medios selectivos. Esta imagen representa la manera en la que cada colonia cotransformada fue goteada para ser analizada y fotografiada. En color rosa se representa al medio -LT o medio control de transformación. En color azul se representa al medio -HLT que detecta las interacciones débiles y en color amarillo se representa al medio -AHLT que detecta las interacciones fuertes. El tubo simboliza la colonia resuspendida y los puntos azules las alícuotas goteadas de estas colonias. Cada placa se dividió en veinticinco posiciones que corresponden a las 25 cotransformaciones del experimento, como se indica en la figura localizada en la esquina inferior derecha de esta imagen. Los incisos 1-3) ejemplifican la secuencia en la que fueron goteadas las alícuotas de las tres primeras colonias. 1) En el primer paso se tomó una alícuota de 10 μ L de la colonia 1 en resuspensión, esta alícuota se goteó en la placa con medio -LT en la posición uno. Después se tomó otra alícuota del mismo volumen y se sembró en la misma posición pero en la placa con medio -HLT. Posteriormente se tomó otra alícuota del mismo volumen y se sembró en la posición uno de la placa con medio -AHLT. En el segundo y tercer paso, incisos 2) y 3), se realizó el mismo proceso con la colonia 2 y 3 en las correspondientes posiciones dos y tres de las placas. Esta dinámica fue repetida hasta completar las 25 colonias. 4) Una vez que se gotearon las 25 alícuotas en los tres diferentes medios se incubaron las placas por un periodo de 3 a 7 días a 37°C. Concluido este periodo las placas se fotografiaron y se analizaron determinando la presencia o ausencia de crecimiento de cada colonia, mediante fotografía digital.

6 Resultados

6.1 Grupos Control

Para identificar los tipos de interacciones entre las TIMs de este ensayo, se utilizaron los reporteros auxotróficos *HIS3* y *ADE2*. La actividad de estos marcadores se monitoreó por medio del crecimiento de las levaduras en medios selectivos. Para detectar interacciones de baja astringencia se empleó el medio selectivo carente de histidina (-HLT) mientras que, para las interacciones de alta astringencia se empleó el medio (-AHLT).

La colonia de levaduras coexpresando las proteínas p53 y pTD1 (ubicada en la posición 1 de la placa, Figuras 7 y 8) creció en el medio -HLT. Esto implica que, dentro del núcleo de la levadura, p53 y pTD1 formaron el complejo de interacción y que este complejo activó el reportero *HIS3*. Por el contrario, el grupo control negativo de interacción, formado por las colonias que expresan las proteínas p53 o pTD1, en combinación con cada una de las TIMs (localizadas en las posiciones 2, 3, 4, 5, 6, 11, 16 y 21 de la placa), no creció al ser incubado en medio -HLT (Figura 8). Este resultado indica que no se llevan a cabo interacciones entre las TIMs estudiadas y las proteínas control.

En la placa -AHLT se observa un comportamiento idéntico, sin embargo, el crecimiento de la colonia 1 en este medio indica que la interacción entre las proteínas p53 y pTD1 es fuerte. Por su parte, el grupo control negativo no creció en este medio (Figura 8); este resultado es consistente con el comportamiento observado en este grupo de colonias en la en la placa con medio -HLT. En conjunto, los resultados obtenidos para el grupo control negativo señalan que las proteínas pTD1 y p53 no interaccionan con ninguna de las TIMs en este sistema de doble híbrido.

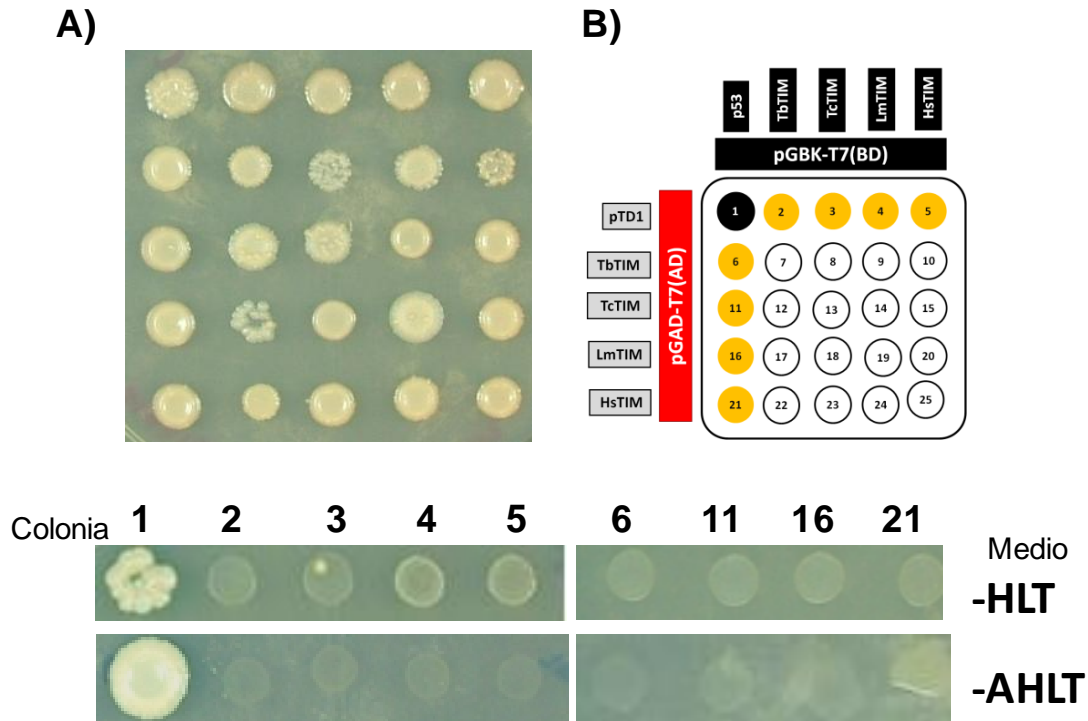


Figura 8: Grupos control del ensayo de doble híbrido. A) Control de cotransformación de levaduras en medio -LT. B) Esquema de goteo. Los círculos amarillos señalan las posiciones de las colonias que conforman al grupo control negativo. El círculo negro, indica la localización del control positivo de interacción. C) Fotografías de las colonias goteadas en medio -HLT y -AHLT.

6.2 Formación de homodímeros de TIM

Las colonias expresando homodímeros se ubican en las posiciones 7, 13, 19 y 25 y corresponden a las TIMs de *T. brucei*, *T. cruzi*, *L. mexicana* y *H. sapiens*, respectivamente. Estas cuatro colonias crecieron en el medio -HLT como se observa en la Figura 9. Este comportamiento indica que cada monómero es capaz de dimerizar en el núcleo de la levadura. No obstante, cuando estas mismas levaduras se gotearon en medio -AHLT, solamente las colonias 13 y 19 fueron capaces de sobrevivir a la restricción. Este resultado implica que las interacciones presentes en los homodímeros TcTIM-TcTIM (colonia 13) y LmTIM-LmTIM (colonia 19) son fuertes porque el complejo formado por estos homodímeros activó los marcadores *HIS3* y *ADE2* del sistema. En contraste, las interacciones de los homodímeros TbTIM-TbTIM (colonia 7) y HsTIM-HsTIM (colonia 25) son débiles,

puesto que estos dímeros sólo son capaces de activar al reportero *HIS3*.

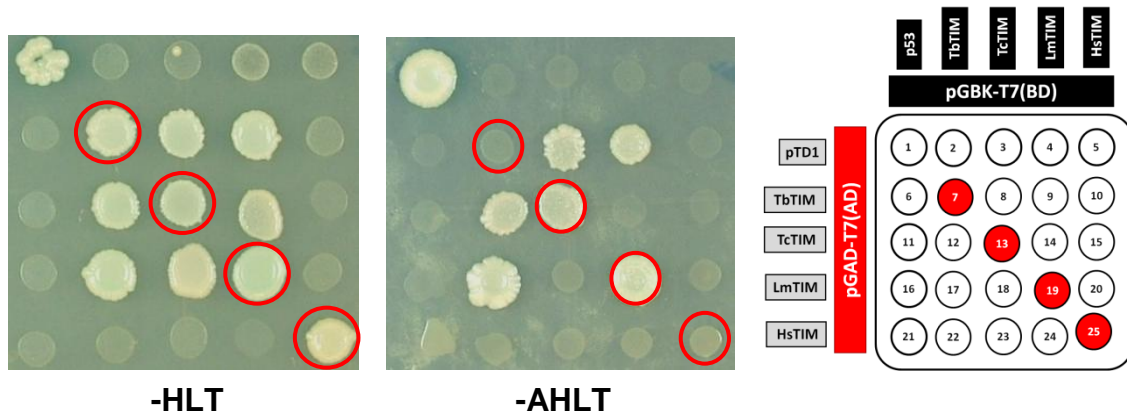


Figura 9: Homodímeros formados por las TIMs empleadas en este ensayo. Los círculos rojos señalan a las colonias 7, 13, 19 y 25, que como se indica en el esquema de goteo, corresponden a los homodímeros de TbTIM, TcTIM, LmTIM y HsTIM respectivamente. Nótese la ausencia de las colonias 7 y 25 en la placa con medio -AHLT.

6.3 Formación de heterodímeros de TIM

Las colonias que expresaron a los heterodímeros corresponden a las posiciones 8, 9, 10, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 22, 23 y 24 de la placa (Figura 10). El grupo de los heterodímeros se dividió en dos subgrupos en base a la similitud de secuencia entre sus monómeros. El subgrupo A, conformado por los heterodímeros con monómeros cuyas secuencias son más parecidas entre sí (80%), y el subgrupo B, constituido por heterodímeros con los monómeros menos similares entre sí (40%).

El subgrupo A, que consta de las colonias 8, 9, 12, 14, 17 y 18, creció en el medio -HLT. Este resultado señala que los heterodímeros del tipo: TbTIM-TcTIM, TbTIM-LmTIM y TcTIM-LmTIM son capaces de activar el marcador *HIS3*. Cuando este grupo fue probado en medio -AHLT, mostró diferencias significativas en su patrón de activación porque los únicos heterodímeros capaces de impulsar la expresión simultánea de los marcadores *HIS3* y *ADE2* fueron los del tipo TbTIM-TcTIM (colonias 12 y 8) y TbTIM-LmTIM (colonias 17 y 9).

Lo observado en estos resultados indica que las interacciones entre los heterodímeros TbTIM-TcTIM y TbTIM-LmTIM son fuertes en comparación a las interacciones del heterodímero TcTIM-LmTIM que son débiles.

El subgrupo B formado por las colonias 10, 15, 20, 22, 23 y 24, consta de los heterodímeros tipo HsTIM-TbTIM, HsTIM-TcTIM y HsTIM-LmTIM. El crecimiento de este subgrupo está completamente ausente en los medios -HLT y -AHLT, lo que significa que no existen interacciones de ningún tipo entre los monómeros que componen cada heterodímero.

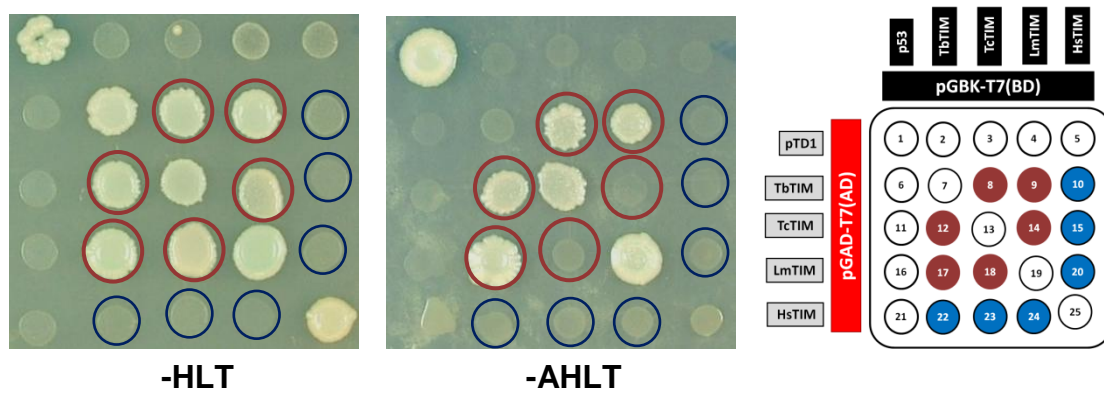


Figura 10: Heterodímeros formados por las TIMs del ensayo. Los círculos color café señalan la ubicación de los heterodímeros del subgrupo A. Este grupo está formado por las colonias 8, 9, 14, 12, 17 y 18. Como se puede apreciar en la placa -AHLT; las colonias expresando heterodímeros del tipo LmTIM-TcTIM no crecen en este medio. Por su parte las colonias del subgrupo B, en círculos azules, están ausentes en ambos medios.

Tabla 2, resumen de todos los resultados obtenidos en los experimentos de doble híbrido.

Monómero A	Monómero B	Tipo de Dímero	Interacción resultante
TbTIM	TbTIM	Homodímero	Débil
TcTIM	TcTIM	Homodímero	Fuerte
LmTIM	LmTIM	Homodímero	Fuerte
HsTIM	HsTIM	Homodímero	Débil
TbTIM	LmTIM	Heterodímero	Fuerte
TbTIM	HsTIM	Heterodímero	Sin Interacción
TbTIM	TcTIM	Heterodímero	Fuerte
TcTIM	LmTIM	Heterodímero	Débil
TcTIM	HsTIM	Heterodímero	Sin Interacción
LmTIM	HsTIM	Heterodímero	Sin Interacción

Tabla 2: Resumen de resultados obtenidos del ensayo de doble híbrido con las cuatro TIMs empleadas en este estudio. La primera y segunda columnas corresponden a la especie de la que proviene la TIM, que forma el dímero. La tercera columna corresponde al tipo de dímero formado y la cuarta columna al tipo de interacción detectada.

7 Discusión

El sistema de doble híbrido empleado en este estudio es capaz de detectar las interacciones de diferente intensidad (débil o fuerte) entre monómeros de las TIMs de *T. brucei*, *T. cruzi*, *L. mexicana* y *H. sapiens*. Esto aporta nueva información acerca de la naturaleza de las interacciones entre monómeros de la TIM en un sistema *in vivo*, ya que además se identificó cualitativamente la fuerza de la interacción.

7.1 La posición de los dominios de fusión no altera el comportamiento del patrón de dimerización

Es apropiado señalar que en esta tesis y, por primera vez en la investigación de heterodímeros de las TIMs de diferentes especies, la formación de cada heterodímero se dio de dos maneras: una, donde el dominio AD quedó unido del lado amino terminal del monómero X, y la otra, donde el dominio AD quedó unido del lado amino terminal del monómero Y. Como ejemplo de esos dos tipos de interacciones para la formación del heterodímero de TcTIM-LmTIM existen dos posibilidades: una en la que TcTIM+AD interacciona con LmTIM+BD y otra en la que TcTIM+BD interacciona con LmTIM+AD (donde TcTIM es el monómero “X” y LmTIM el monómero “Y”). Nuestros resultados mostraron que, la posición en la que se encuentran fusionados los dominios (AD y BDB) no modifica la expresión de los genes reporteros evaluados. Esto significa que, los dominios no interfieren de manera desigual con las interacciones entre los monómeros y que la función de estos dominios se conserva, sin importar a que monómero estén unidos.

7.2 Las interacciones entre los monómeros de los tripanosomátidos tienen diferente intensidad

Los homodímeros con mayor similitud global a nivel de secuencia de aminoácidos, TbTIM y TcTIM (con un valor de 74%), presentan interacciones de diferente intensidad. Como se observa en la Figura 9, el homodímero de TbTIM presenta interacciones de tipo débil, a diferencia del de TcTIM. Este resultado concuerda con lo observado por Zomosa-Signoret en 2003¹⁷. Los autores de ese trabajo

descubrieron mediante la técnica de desnaturalización con cloruro de guanidina que, al desplegar por separado dímeros de TbTIM y TcTIM, y posteriormente mezclarlos (en conjunto) para renaturalizarlos, estos podían formar homodímeros y heterodímeros. En estos experimentos se observó que existe una marcada predilección por parte del monómero de TcTIM por asociarse con el monómero de su misma especie, es decir, con otro monómero de TcTIM. Esto contrasta con el monómero de TbTIM, que prefiere asociarse con el de TcTIM y formar un heterodímero, antes que asociarse con el monómero de su misma especie.

Los resultados de Zomosa-Signoret se resumen en la proporción 1:0.9:0.2, que representa las cantidades relativas de: Homodímero de TcTIM: heterodímero TcTIM-TbTIM: homodímero de TbTIM. Este comportamiento concuerda con lo que observamos en el ensayo de doble híbrido, ya que los heterodímeros TcTIM-TbTIM presentan interacciones de tipo fuerte (ver Figura 10 posiciones 8 y 12), lo que implica que las interacciones entre estos dos monómeros son de mayor estabilidad.

A diferencia de la técnica empleada por Zomosa-Signoret (con cloruro de guanidina), el principal problema metodológico presente en este sistema *in vivo* (doble híbrido) pudiera ser la clonación de cada variante de la TIM dentro de alguno de los dos vectores del sistema (pGBKT7 o pGADT7). En cambio, la limitante principal en la técnica con cloruro de guanidina, es que requiere que cada variante de TIM estudiada tenga un punto isoeléctrico diferente y suficientemente distinto, para que al formar heterodímeros, estos puedan separarse mediante electroforesis nativa; de lo contrario, la población correspondiente a estos heterodímeros, no podrá ser aislada.

Estas dos técnicas ofrecen distintos acercamientos al estudio de la interfase y también son complementarias. Por ejemplo, la formación de heterodímeros con cloruro de guanidina, permite el estudio de parámetros bioquímicos como actividad y termoestabilidad, entre otros, aspectos que no pueden ser evaluados directamente mediante doble híbrido. Sin embargo, el doble híbrido permite la detección de interacciones en un entorno *in vivo* muy cercano al real, es decir,

dentro de una célula. Si bien es cierto que los sistemas *in vivo* pueden ocasionar cierta contaminación en las señales muestreadas, en este ensayo, este problema no parece afectar de manera significativa.

La TIM con menor similitud global dentro del grupo de los tripanosomátidos es la de *L. mexicana*, que tiene un porcentaje de similitud de 68% al ser comparada con TbTIM y TcTIM.

Un resultado singular de este trabajo es que el homodímero de LmTIM presenta interacciones de tipo fuerte, tal como el homodímero de TcTIM. Sin embargo, cuando LmTIM forma el heterodímero LmTIM-TcTIM manifiesta interacciones débiles, a diferencia del heterodímero del tipo LmTIM-TbTIM, el cual manifiesta interacciones fuertes. Esta diferencia puede ser atribuible a la composición interfacial de estas proteínas.

Los heterodímeros con interacciones fuertes son aquellos que tienen mayor similitud a nivel de interfase. En la Figura 11 (panel A y B), se aprecia que, al ser alineada la interfase de TbTIM con la de LmTIM, se presentan dos sustituciones no homólogas (Q17 y Q65 en TbTIM, y T17 y L65 en LmTIM, respectivamente), tal como sucede al alinear la interfase de TbTIM con TcTIM (Q65 y P81 en TbTIM, y M65 y Q81 en TcTIM, respectivamente). En cambio, al alinear la interfase de LmTIM con la de TcTIM se observan tres sustituciones no homólogas (T17, P81 e I86 en LmTIM y E17, Q81 e Y86 en TcTIM, respectivamente). Estas interfases corresponden a las del heterodímero (TcTIM-LmTIM) de interacciones débiles (Figura 11, panel C).

Cabe señalar que, al comparar las tres interfases en conjunto, destaca la posición 86, en la cual se observa que solamente LmTIM no posee un aminoácido de carácter aromático, a diferencia de TbTIM y TcTIM (panel D Figura. 11).

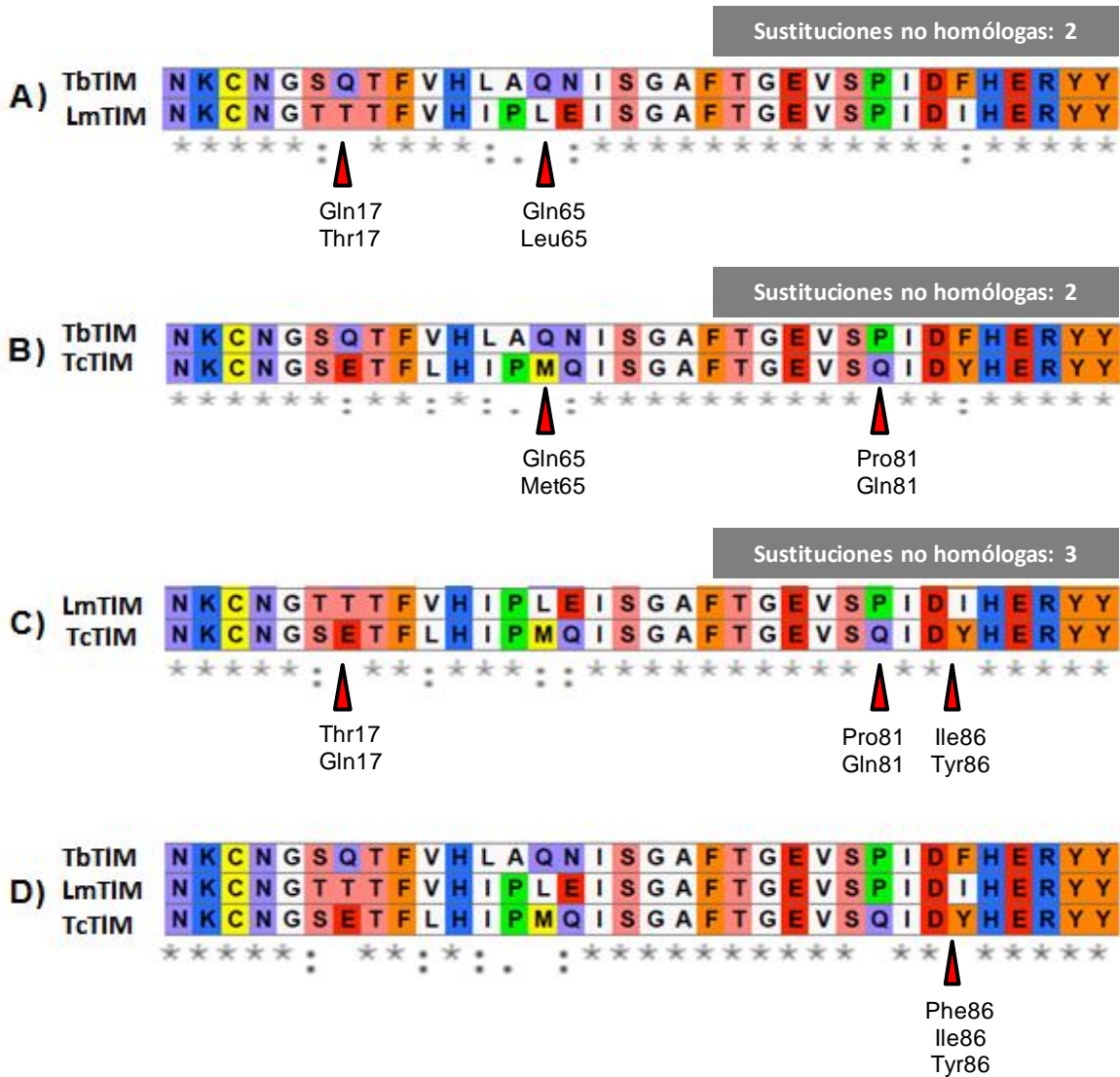


Figura11: Alineamientos de los aminoácidos que corresponden a las interfases de las TIMs de los tripanosomátidos. De los cristales disponibles dentro de la base de datos del Protein Data Bank, se tomaron las secuencias de aminoácidos correspondientes a las interfases de las TIMs de los tripanosomátidos empleados en este ensayo (5TIM de TbTIM, 1AMK de LmTIM y 1TCD de TcTIM). Estas secuencias fueron alineadas en pares utilizando el programa ClustalW2. Los resultados de estos alineamientos aparecen en los paneles: A-C. Las flechas rojas señalan la posición en la secuencia y el aminoácido sustituido. Los rectángulos grises indican el número de sustituciones no homólogas presentes en las secuencias. Finalmente, se realizó un alineamiento global de las tres interfases (panel D), en este panel se resalta la sustitución en la posición 86 que corresponde al aminoácido isoleucina, que a diferencia de las secuencias de TbTIM y TcTIM, no es un residuo aromático.

Para determinar con mayor certeza si son estas diferencias puntuales las que rigen este comportamiento, es necesario realizar estudios con TIMs mutadas en estas posiciones y probar mediante esta metodología si, en efecto, es este cambio el que altera las interacciones entre monómeros.

Finalmente, otro factor que puede explicar la formación de heterodímeros con interacciones de distinta intensidad, puede ser la flexibilidad intrínseca del monómero de TbTIM. En un estudio realizado por Reyes-Vivas y colaboradores en 2002²⁰, se observó que TcTIM resultó tener una mayor susceptibilidad a la proteólisis por subtilisina que TbTIM. Estos estudios indican que TbTIM tiene, de forma general, una estructura más rígida y, en consecuencia, es menos tolerante a cambios en su estructura. Por lo tanto, la interacción entre monómeros rígidos de TbTIM, podría desestabilizar su estructura. Esta desestabilización podría ocasionar que el monómero de TbTIM busque más estabilidad en otro monómero con mayor tolerancia a cambios de estructura (como el de TcTIM) y que entonces, estos heterodímeros se establezcan vía “cross-talk”. No obstante, hace falta más información para respaldar esta suposición, ya que hasta el momento no se dispone de datos experimentales acerca de la susceptibilidad de LmTIM a proteólisis, ni de la formación de heterodímeros de TcTIM y LmTIM mediante desnaturalización con cloruro de guanidina.

7.3 Compatibilidad entre monómeros de la TIM

Los monómeros de TIM de las diferentes especies de tripanosomátidos pueden dimerizar entre sí mediante interacciones débiles, bajo las condiciones de este ensayo. La dimerización entre monómeros se debe al nivel de conservación que existe entre sus interfases (como fue señalado por Sung y colaboradores en 1992²¹). Aquellos monómeros con una similitud mayor al 76% pueden interaccionar, mientras que aquellos con valores inferiores al 20% ya no interaccionan (Tabla 3). Para investigar lo que ocurre con monómeros que presentan valores intermedios de similitud, será necesario incorporar nuevas TIMs de diferentes especies a este sistema de análisis, como las TIMs de *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Taenia solium* y *Sus cofra* entre otras.

Subunidad A	Subunidad B	Porcentaje de Similitud
TbTIM	LmTIM	79%
TcTIM	LmTIM	79%
TcTIM	TbTIM	76%
TcTIM	HsTIM	20%
TbTIM	HsTIM	20%
HsTIM	LmTIM	20%

Tabla 3: Porcentaje de similitud a nivel de interfase de las 4 variantes de la TIM. La primera y segunda columna corresponden a la interfase de subunidad A y B respectivamente. La tercera columna corresponde al porcentaje de similitud calculado por el alineamiento con CustalW2.

Finalmente, otra observación que puede contribuir a explicar las interacciones débiles entre los monómeros de HsTIM y con la ausencia de interacciones entre HsTIM y las TIMs de los tripanosomátidos, es que la interfase de HsTIM cuenta con 6 aminoácidos adicionales, que pueden alterar las interacciones en el homodímero o interferir con las interacciones en los heterodímeros correspondientes (Figura 12).

HsTIM	N	K	M	N	G	R	K	Q	S	P	T	A	Y	I	D	F	Q	Q	N	Y	V	T	N	G	A	F	-	G	E	I	S	G	M	D	C	H	E	R	V	F
TcTIM	N	K	C	N	G	-	-	-	-	S	E	T	F	L	H	I	P	M	Q	-	-	I	S	G	A	F	T	G	E	V	S	Q	I	D	Y	H	E	R	Y	Y
LmTIM	N	K	C	N	G	-	-	-	-	T	T	T	F	V	H	I	P	L	E	-	-	I	S	G	A	F	T	G	E	V	S	P	I	D	I	H	E	R	Y	Y
TbTIM	N	K	C	N	G	-	-	-	-	S	Q	T	F	V	H	L	A	Q	N	-	-	I	S	G	A	F	T	G	E	V	S	P	I	D	F	H	E	R	Y	Y

Figura 12: Alineamiento de las interfases de las cuatro TIMs empleadas en este trabajo. La interfase de HsTIM cuenta con 6 aminoácidos adicionales, en comparación con las TIMs de los tripanosomátidos. Estos aminoácidos son: arginina, lisina, glutamina, serina, tirosina y valina.

8 Conclusiones

En este trabajo se demostró que los monómeros pertenecientes a las TIMs de las especies *T. brucei*, *T. cruzi*, *L. mexicana* y *H. sapiens* forman dímeros dentro del núcleo de la levadura *S. cerevisiae* de la cepa AH109. Los dímeros formados por estos monómeros muestran interacciones de distinta intensidad.

Se determinó que las interacciones de los homodímeros de *T. cruzi* y *L. mexicana* son fuertes a diferencia de las de *T. brucei* y *H. sapiens*, que son débiles. Por su parte, los heterodímeros TbTIM-LmTIM y TbTIM-TcTIM presentan interacciones fuertes, a diferencia del heterodímero LmTIM-TcTIM, que presenta interacciones débiles.

La complementación entre monómeros de diferentes especies depende del grado de similitud entre sus secuencias. Los monómeros con interfases muy similares, (por encima del 76%) son capaces de formar heterodímeros. En cambio, los monómeros con interfases de menor similitud (por debajo del 20%) son incapaces de dimerizar. Por lo tanto, se sugiere que la porción interfacial de cada uno de estos monómeros es la responsable de este comportamiento.

9 Perspectivas

- Considerando que las TIMs de *T. brucei*, *T. cruzi*, y *L. mexicana* pertenecen a parásitos sanguíneos del ser humano, sería interesante probar la actividad y selectividad de algunos de los fármacos específicamente dirigidos contra la interfase de estas TIMs.
- El montaje del ensayo de la β -Galactosidasa podría ser de utilidad para identificar a detalle las diferencias en la fuerza de interacción entre los monómeros y probar el efecto de los fármacos en la interfase.
- Por otro lado, la incorporación de otras variantes de esta enzima dentro del sistema podría ayudar a delimitar con mayor exactitud la similitud mínima requerida, a nivel de interfase, para la dimerización entre monómeros de TIMs de diferentes especies.
- Finalmente, la delección del gen de TIM dentro de la cepa AH109 podría permitir el estudio del efecto global de mutantes de esta enzima en un sistema *in vivo*.

10 Referencias Bibliográficas

1. Fothergill-Gilmore LA. 1986. The evolution of the glycolytic pathway. Trends in Biochemical Sciences. 11: 47-51.
2. Fothergill-Gilmore LA, Michels PA .1993. Evolution in glycolysis. Progress in Biophysics and Molecular Biology.59: 105-227.
3. Fani R, Fondi M. 2009. Origin and Evolution of metabolic pathways. Physics of life reviews. 6: 23-52.
4. Rominus RS, Morgan HW. 2002. Distribution and phylogenies of enzymes of the Embden-Meyerhof-Parnas pathway from archaea and hypertermophilic bacteria support a gluconeogenic origin of metabolism. Archaea. 1:199-221.
5. Nelson DL, Cox MM. 2000. Principles of Biochemistry. Worth Publishing: New York. 3rd Edition: 530-562.
6. Wierenga RK, Kapetaniou EG, Venkatesan R. 2010. Triosephosphateisomerase: a highly evolved biocatalyst. Cellular and Molecular Life Sciences. 67: 3961-3982.
7. Wierenga RK. 2001. The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. Federation of European Biochemical Societies. 492:193-198.
8. Desamero R, Rozovsky S, Zadhin N, McDermott A y Callenger R. 2003. Active site loop motion in triosephosphateisomerase: T-jump relaxation spectroscopy of thermal activation. Biochemistry. 42:2941-2951.
9. Moreira IS, Fernandes PA, Ramos MJ. 2007. Hot spots--a review of the protein-protein interface determinant amino-acid residues. Proteins: Structure Function and Bioinformatics. 68. 4: 803-812.
10. Pérez-Montfort R, Tuena de Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A. 2002. The interfaces of oligomeric proteins as targets for drug design against enzymes from parasites. Current Topics in Medicinal Chemistry. 2: 457-470.
11. Stuart KD, Brun R, Croft SL, Fairlamb A, GürtlerRE, McKerrowJ ,Reed S y Tarleton R. 2008. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. The Journal of Clinical Investigation.118: 1301-1310.
12. Tielens AGM, Van Hellemond JJ. 1998. Differences in energy metabolism between trypanosomatidae. Parasitology Today. 14. 7:265-271.

13. Helfert S, Estevez AM, Michels P y Clayton C. 2001. Roles of triosephosphateisomerase and aerobic metabolism in *Trypanosoma brucei*. *Biochemical Journal*. 357: 117-125.
14. Maldonado E, Soriano-García M, Moreno A, Cabrera N, Garza-Ramos G, de Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A, Perez-Montfort R. 1998. Differences in the intersubunit contacts in triosephosphateisomerase from two closely related pathogenic trypanosomes. *Journal of Molecular Biology*. 283: 193-203.
15. Brückner A, Polge C, Lentze N, Auerbach D, y Schlattner U. 2009. Yeast two hybrid, a powerful tool for systems biology. *International Journal of Molecular Sciences*.10:2763-2788.
16. Ralser M, Heeren G, Breitenbach M, Lehrach y Krosbitsch S. 2006. Triose phosphate isomerase deficiency is caused by altered dimerization-not catalytic inactivity of the mutant enzymes. *Plos One*.1 e30.
17. Zomosa-Signoret V, Hernández-Alcántara G, Reyes-Vivas H, Martínez-Martínez E, Garza Ramos G, et al. 2003. Control of the reactivation kinetics of homodimeric triosephosphate isomerase from unfolded monomers. *Biochemistry* 42: 3311–3318.
18. Clontech Laboratories.2010. Matchmaker™ Yeast Two-Hybrid System User Manual. 1-41.
19. Chen DC, Yang BC, Kuo TT.1992. One-step transformation of yeast in stationary phase. *Current Genetics*. 21:83-84.
20. Reyes-Vivas H, Martínez-Martínez E, Mendoza-Hernández G, López-Velázquez G, Pérez-Montfort R, Gómez-Puyou MT, Gómez-PuyouA. 2002. Susceptibility to proteolysis of triosephosphateisomerase from two pathogenic parasites: Characterization of an enzyme with an intact and a nicked monomer. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 48: 580–590.
21. Sun AQ, Yüksel KU, Gracy RW. 1992. Interactions between the catalytic centers and subunit interface of triosephosphateisomerase probed by refolding, active site modification, and subunit exchange. *The Journal of Biological chemistry*. 28:20168-20174.