



JULIO DE 2022

PRIMEROS PASOS HACIA LA
TÉCNICA DE DOBLE HÍBRIDO PARA
DETECCIÓN DE POSIBLES
INTERACCIONES DE LA
DIHIDROOROTATO
DESHIDROGENASA DE
TOXOPLASMA GONDII: CLONACIÓN
EN PGBKT7

NICOLLE VALENTINA JAIME LOPEZ
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
Departamento de Ciencias Biológicas – BBMP
Directora: Barbara H. Zimmermann, Ph.D.



Tabla De Contenido

Resumen 2
Agradecimientos 3
Introducción..... 4
Metodología..... 8
Resultados 10
Conclusiones 13
Bibliografía 14

RESUMEN

El presente documento expone el procedimiento aplicado para la construcción del vector cebo pGBKT7 con el inserto TgDHODH, requerido para la aplicación de la técnica *Yeast Two-Hybrid*. Se espera aplicar dicha técnica en la detección de posibles interacciones de la enzima dihidroorotato deshidrogenasa, implicada en la biosíntesis de pirimidinas de *Toxoplasma gondii*.

AGRADECIMIENTOS

A la profesora Barbara Zimmermann por acogerme en su laboratorio y permitirme participar en su investigación. A Cristian, Luis y Carolina por enseñarme, acompañarme y motivarme en cada paso de este camino. A mi familia por apoyarme y respaldarme.

INTRODUCCIÓN

El objetivo inicial de este proyecto es aplicar los primeros pasos del protocolo para la clonación del inserto TgDHODH en vector pGBKT7, mediante la preparación del inserto y el vector, la ligación de estos y la transformación de *Escherichia coli DH5aF'* con el resultado de la ligación. Estos constituyen los pasos iniciales en la técnica de doble híbrido enfocada en la detección de posibles interacciones de la dihidroorotato deshidrogenasa de *Toxoplasma gondii*. El alcance potencial de la aplicación de la técnica *Yeast two-hybrid* (Y2H) es el desarrollo de productos farmacéuticos con mayor tolerancia y eficiencia. Sin embargo, esa técnica requiere de una alta inversión de recursos económicos y tiempo, pues requiere desarrollar varios constructos, lo que puede implicar limitantes.

TOXOPLASMA GONDII.

Toxoplasma gondii es un protozoo parásito intracelular obligado clasificado en el género *Toxoplasma*, familia Sarcocystidae, orden Eucoccidiorida, subclase Coccidia, clase Conoidasida y phylum Apicomplexa [1]. Este organismo muestra un ciclo heteroxeno, es decir, presenta reproducción sexual y asexual, la cual se alterna dependiendo del hospedero en el que se encuentre. En gatos, sus hospederos definitivos, se evidencia reproducción sexual y en el resto de sus hospederos intermedios se observa replicación asexual [2]. Esta coccidia presenta tres estadios infecciosos: Esporozoitos, taquizoítos y bradizoítos. Los esporozoítos se describen como ooquistes esporulados y son resistentes a estrés ambiental, cada ooquiste esporulado contiene ocho esporozoítos encapsulados equitativamente en dos esporoquistes. Los taquizoítos se pueden encontrar solos o en grupos y se caracterizan por reproducirse rápidamente y tienen forma de medialuna. Finalmente, los bradizoítos se reproducen lentamente y se encuentran en quistes tisulares con diversas presentaciones; si son jóvenes son quistes pequeños con dos bradizoítos y si son viejos contienen cientos de bradizoítos, si están en el cerebro son esferoides y si son intramusculares son alargados [19].

La forma inicial de infección de este parásito es el taquizoíto, el cual es haploide y de rápido crecimiento, como se mencionó anteriormente. Este puede alojarse en cualquier célula nucleada perteneciente a un animal que mantenga su temperatura constante (homeostasis térmica). Cuando el taquizoíto se expone al estrés causado por la respuesta inmune, reduce la velocidad de crecimiento y se convierte en bradizoíto encapsulado en un quiste de pared gruesa. Si estos quistes son ingeridos por felinos, la forma sexual del parásito se desarrolla. Este proceso se da en las células epiteliales del intestino de estos hospederos, aquí se presenta un proceso de fusión de gametos para formar un cigoto diploide y el parásito se convierte en ooquiste, el cual cuenta con una pared impermeable y es altamente resistente a condiciones ambientales. Estos ooquistes son expulsados en las heces fecales de los felinos y realizan meiosis en el ambiente y vuelven a quedar como quistes haploides. Estas estructuras o estadios son responsables de la contaminación de alimentos y agua [3]. El ciclo sexual de *T. gondii* se ve afectado según el estadio del parásito que se encuentre en el felino, pues todas las formas infecciosas (bradizoítos, taquizoítos y esporozoítos) pueden desarrollar este ciclo de vida. Por ejemplo, dependiendo del estadio cambia el tiempo previo al desprendimiento de ooquistes; en el caso de bradizoítos son de 3-10 días y para los taquizoítos y esporozoítos son más de 19 días [3].

TOXOPLASMOSIS.

Actualmente se estima que alrededor de un billón de personas en el mundo está infectada con *T. gondii* [4]. Estas infecciones pueden darse a través de distintos medios: Agua o comida cruda contaminada, carnes infectadas mal cocinadas, transfusiones o trasplantes con sangre u órganos infectados, contaminación cruzada con heces fecales de felinos o a través de la placenta [5]. Las infecciones con *T. gondii* suelen tener importantes implicaciones en salud y economía, pues en animales de consumo genera abortos espontáneos y en humanos inmunocomprometidos, tratamientos de por vida [4].

La presentación clínica de la toxoplasmosis suele ser una infección asintomática en personas inmunocompetentes. Sin embargo, entre el 10% - 20% de estos casos desarrolla una infección aguda, la cual se muestra como una linfadenopatía cervical, síntomas similares a gripa y, en casos raros, se evidencia infección ocular con posibilidades de pérdida de visión. La sintomatología descrita suele desaparecer en semanas o meses, no obstante, los bradizoítos pueden permanecer latentes y reactivarse en momentos o situaciones de inmunodeficiencia como SIDA, trasplantes, cáncer o generar problemas durante el embarazo, como abortos espontáneos o la muerte del feto [9]. Los síntomas en pacientes con inmunodeficiencias suelen estar asociados al sistema nervioso central, pero pueden presentar también retinocoroiditis, neumonitis u otras enfermedades sistémicas. En pacientes con SIDA la presentación más común es la encefalitis. La toxoplasmosis congénita surge principalmente de infección aguda primaria adquirida durante el embarazo y la incidencia y severidad de la infección varía según el trimestre en el que se adquiera el parásito [5].

En cuanto al impacto económico hay pocos estudios desarrollados, sin embargo, en el 2019 Stelzer et al. describen las causas de las pérdidas directas asociadas a producción animal: muerte de fetos, efectos secundarios en animales como la pérdida total o parcial de la producción de leche generada por abortos, tratamientos (tanto para atacar al parásito como para controlar o eliminar otros síntomas, como fiebre) y prevención, es decir, programas de vacunación. Los autores afirman que la cuantificación de las causas anteriores debe incluir tanto los recursos físicos necesarios como los servicios y personal requerido. En los casos referidos en esta investigación se encontró que en Uruguay en 1993 nacieron aproximadamente 10 millones de corderos y entre 14 mil y 400 mil fetos fueron abortados por toxoplasmosis, lo que llevó a una pérdida entre 1,4-4,68 millones de dólares, sin tener en cuenta el reemplazo de los animales, la cría y el retraso del progreso genético. En Gran Bretaña en 1996 se estimó una pérdida entre 12 y 18 millones de euros por pérdidas en producción y cerca de un millón de euros invertidos en tratamientos, no se tuvo en cuenta los costos en prevención. Por último, en Australia se estimó una pérdida de 70 millones de dólares australianos en ovejas en el 2017 a causa de esta enfermedad [20].

Según Montazeri et al., para el 2017 la seroprevalencia a nivel global de *T. gondii* en felinos domésticos fue del 35% y salvajes del 59%. Además, este equipo identificó la mayor seroprevalencia en felinos domésticos en Australia y África (52% y 51% respectivamente) y la menor en Asia (27%). Mientras que en felinos silvestres se identificó una seroprevalencia entre el 66%-67% en África, Asia, Europa y Sur América [4]. En cuanto a la seroprevalencia en humanos, en Estados Unidos se ha reportado como una de las principales enfermedades transmitidas por alimentos que generan muerte y hospitalización de pacientes. En dicho país se reportan alrededor de 800.000 casos de infección al año [7]. Los estudios globales en humanos muestran que la seroprevalencia de la toxoplasmosis es mayor en pacientes inmunocomprometidos (42%), población general (42%), mujeres embarazadas (40%), donadores de sangre (33%), mujeres fértiles (32%) y recién nacidos y niños (4%), en ese orden [8].

Según Hortua et al., para el 2016 los tratamientos farmacológicos para la toxoplasmosis no mostraban alta tolerancia ni eficacia en infecciones crónicas por quistes. La biosíntesis *de novo* de pirimidinas está asociada a la cadena de respiración, porque la cuarta enzima, DHODH, transfiere a la ubiquinona los electrones generados por la oxidación del dihidroorotato. Hortua et al. (2016) encontraron que la TgDHODH, es un excelente blanco de estudio, porque la ausencia de esta proteína no permite el crecimiento del parásito *in vitro*, incluso cuando el medio de cultivo se complementa con uracilo, que el parásito puede reciclar mediante la ruta reciclaje de pirimidinas, conocida como la ruta *salvage*. Además, ellos encontraron que al reemplazar la proteína endógena con una DHODH catalíticamente inactiva, el parásito sobrevivió y pudo obtener pirimidinas utilizando la vía de *salvage*, lo que sugiere que la proteína es necesaria para otra función en la mitocondria.

BIOSÍNTESIS DE PIRIMIDINAS.

Las pirimidinas son compuestos orgánicos fundamentales para la formación de ADN y ARN, portan una gran cantidad de energía y son precursores de NAD y SAM. Dada su relevancia, es fundamental que todos los organismos sinteticen estas moléculas. Esta síntesis puede ser llevada por dos vías: *de novo* o *salvage* [10]. La síntesis *de novo* consta de 6 pasos, durante los tres primeros pasos se produce orotato, en el paso cuatro la dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH) cataliza la oxidación del dihidroorotato, posteriormente se produce oritidina 5' monofosfato (OMP) y finalmente, se descarboxila OMP a uracilo monofosfato. La DHODH es la única enzima que cataliza una oxidorreducción en esta vía. Además, esta enzima es significativamente diferente entre humanos y varios patógenos, entre ellos *T. gondii*. Lo anterior lo convierte en un excelente blanco farmacéutico, pues los medicamentos pueden ser diseñados para atacar únicamente al parásito sin generar daños en el metabolismo humano [11].

Como se mencionó anteriormente, las DHODH son enzimas fundamentales para la síntesis de pirimidinas; estas pueden ser categorizadas en dos grandes clases: Las clase 1 se sitúan en el citosol y se dividen en 1A y 1B. Las primeras son homodiméricas, usan fumarato como aceptor de electrones y se codifican en el gen *pyrD*, mientras que las segundas son heterotetraméricas, usan NAD⁺ como aceptor de electrones y se codifican en los genes *pyrD* y *pyrK*. La clase 2 son monoméricas, se ubican en la parte interna de la membrana mitocondrial de los eucariotas y en la membrana citosólica de los procariotas y usan CoQ como aceptor de electrones. Humanos, varios otros mamíferos y una amplia variedad de parásitos, como *T. gondii*, sintetizan DHODH de clase 2 [11].

Los mamíferos producen pirimidinas por la ruta *de novo* a menos que se encuentren bajo condiciones fisiológicas específicas, donde activan la ruta *salvage*, mientras que muchos protozoos sólo pueden generar pirimidinas por la ruta *de novo*, sin embargo, *T. gondii* posee las enzimas para la vía de *salvage*. Si se eliminan mediante técnicas moleculares las enzimas que catalizan los pasos uno o cinco o seis de la ruta *de novo*, los parásitos mutados pueden crecer *in vitro* en presencia de uracilo, que se pueden reciclar utilizando su vía de *salvage*, obteniendo así las pirimidinas necesarias para el crecimiento. Sin embargo, *in vivo* los parásitos mutados no pueden sobrevivir en ratones porque estos mamíferos no poseen la cantidad de uracilo suficiente para los requerimientos del parásito, por lo que no se genera ninguna infección [23]. Cuando Hortua et al., (2016) experimenta con la eliminación de la cuarta enzima de la ruta *de novo*, TgDHODH, concluyen que esta proteína no puede ser eliminada, y aunque se proporcionó uracilo en el medio, los parásitos no crecen *in vitro*. Sin embargo, encontraron que cuando esta proteína está reemplazada por una sin actividad enzimática, los parásitos mutados crecieron *in vitro* en presencia de uracilo, indicando probablemente una función adicional, asociada a una interacción con otras proteínas del parásito [11]. Lo anterior quiere decir que posiblemente TgDHODH cumple una función complementaria disociada de su acción enzimática y que implica una interacción con otra proteína, la cual puede ser detectada usando la técnica *yeast two-hybrid*.

YEAST TWO-HYBRID

El sistema *Yeast Two-Hybrid* (Y2H) es una técnica desarrollada para evaluar la interacción proteína-proteína dentro de una levadura. Esta interacción puede ser entre dos proteínas conocidas, entre una proteína conocida y una biblioteca de posibles proteínas o para identificar dominios de interacción de proteínas. Este ensayo se fundamenta en la evaluación de la expresión génica permitida por la cercanía del dominio de activación (AD) y de unión (BD) dada por la interacción evidenciada entre las dos proteínas de estudio, presentes en dos plásmidos distintos [12]. Este método complementario para el estudio de proteínas tiene grandes ventajas, por ejemplo, permite mantener la estructura nativa de las proteínas pues se lleva a cabo *in vivo*, lo que incrementa la sensibilidad y precisión de la detección de interacciones, es decir, es capaz de identificar interacciones fuertes y débiles [13]. Además, existen modificaciones de la técnica que permiten evaluar la interacción entre dos proteínas membranales asociadas, que suelen ser hidrofóbicas y por tanto su estudio es más complejo a nivel práctico [14].

Como se mencionó anteriormente, el sistema Y2H requiere de la utilización de 2 vectores. El primero es llamado “cebo”, el cual está ligado al factor de transcripción del BD y a un marcador de selección, sobre este vector se clona la proteína de interés. El segundo vector, “presa”, contiene el factor de transcripción del AD y otro marcador de selección, recibe otra proteína dada. Si la proteína de interés y la otra proteína dada interactúan, permiten que el BD y el AD estén lo suficientemente próximos para activar la transcripción del gen reportero o de selección [12]. Se espera que los vectores generados produzcan la proteína de interés y el BD y la otra proteína dada y el AD, respectivamente. Con estas proteínas expresadas se espera que el BD se una a la región de unión del vector con el gen reportero y, en caso de interacción, la presa se una al cebo para acercar el AD al BD y que la RNA Pol II pueda transcribir el gen de selección [15].

Para este ensayo se utilizó Matchmaker® Gold de Takara Bio, el cual implementa los plásmidos pGBKT7 y pGAD. El plásmido pGBKT7 contiene el factor de transcripción BD (es el cebo) de GAL4, el sitio de clonación múltiple, el promotor para levaduras ADH1 y su respectiva señal de terminación, el pUC ori y 2 μ ori para replicación en *E. coli* y *S. cerevisiae* respectivamente, un gen de resistencia a Kanamicina para selección en *E. coli* y el marcador de selección TRP1 para selección en levaduras. Por otro lado, el plásmido pGAD expresa el AD (presa) de GAL4, la señal de localización nuclear SV40, contiene el promotor ADH1 y su señal de terminación, Col E1 ori y 2 μ ori que permiten crecimiento en *E. coli* y *S. cerevisiae* respectivamente, un gen de resistencia a Ampicilina para selección en bacterias y LEU2 para selección en levaduras [15]. El vector pET19b es usado exclusivamente para expresión en bacterias, contiene los promotores AmpR y lacI y gen de resistencia a Ampicilina [23]. En este vector fue clonado la TgDHODH [22]. Es importante resaltar que tanto en pGBKT7 como en pET19b se puede usar la enzima de restricción NdeI

ANTECEDENTES

En el 2016 Hortua et al., examinaron las funciones esenciales de TgDHODH con el desarrollo de alelos deficientes de esta proteína. En dicha investigación se comprueba que la auxotrofia de uracilo generada por la alteración del paso 4 de la síntesis de pirimidinas, solo puede ser llevada a cabo si el gen endógeno de la TgDHODH es reemplazado con uno catalíticamente deficiente. Además, se discute el rol esencial de esta enzima, pues si bien es fundamental para la producción de pirimidinas, se sospecha que cumple otro rol esencial asociado a interacciones proteína-proteína dentro de la mitocondria [21].

En su tesis de maestría de 2019, Cristian Camilo Barrera Grijalba comenzó a investigar las posibles interacciones proteína-proteína de TgDHODH usando ensayos de actividad de DHODH en geles de poliacrilamida Blue Native y Clear Native, con extractos mitocondriales de *T. gondii*. La investigación llevada a cabo sugiere que esta enzima esta posiblemente asociada a una o varias proteínas mitocondriales [22].

METODOLOGÍA

Con el fin de cumplir con los objetivos establecidos, se llevó a cabo un proceso con tres pasos fundamentales y sus respectivas verificaciones:

0. Cultivo inicial:

Para la siembra del vector pGBKT7 se sirvió caldo LB autoclavado en tubos falcon estériles. Se agregó kanamicina con una concentración de 0,05 mg/mL, se extrajo 1 mL en un eppendorf nuevo y estéril como control y con una punta nueva estéril se raspó la superficie de la muestra conservada a -80 °C que contiene *E. coli* transformada con este vector y se sembró en el falcon. Tanto el eppendorf como el falcon fueron puestos en un agitador a 37 °C con velocidad constante durante la noche (ON). En el caso del vector pET19b que contiene TgDHODH, se realizó el mismo proceso, pero cambiando el antibiótico por Ampicilina.

En cada proceso de cultivo se utilizaron guantes, puntas y eppendorf nuevos, todos los insumos fueron esterilizados, la zona de siembra fue desinfectada con alcohol al 70% y se usó mechero.

1. Extracción, Restricción y Purificación de ADN:

- a. La extracción de ADN se llevó a cabo mediante la utilización del kit de miniprep para plásmidos Zyppy™. De cada falcon se extrajeron 1,5 mL en un eppendorf, este volumen fue centrifugado a 22.000 g por 2 minutos, se descartó todo el sobrenadante. Se extrajeron otros 1,5 mL de cultivo del falcon y se centrifugaron nuevamente con las mismas condiciones. Posterior a la segunda centrifugación, se extrajeron 0,9 mL y el pellet fue resuspendido en 0,6 mL del medio restante.

A continuación, se llevó a cabo el protocolo propuesto por Zymo con algunas modificaciones: Al eppendorf con la muestra resuspendida se le añadió 100 uL de buffer de lisado 7X, se mezcló por inversión hasta conseguir un color azul claro. Antes de cumplir 2 minutos, se añadió 350 uL de buffer de neutralización, se mezcló por inversión hasta obtener un precipitado amarillo. Se centrifugó a 16.000 g por 1 minuto y el sobrenadante se transfirió a una columna evitando tocar el pellet. La columna fue centrifugada a 16.000 g por 1 min, se descartó el *flow-through* y se añadió 200 uL de buffer *endo-wash*, se centrifugó nuevamente a 16.000 g por 1 minuto. Luego se agregó 400 uL de buffer de lavado y se centrifugó a 16.000 g por 1 minuto, se descartaron los residuos y se centrifugó en estas condiciones nuevamente. La columna fue transferida a un eppendorf nuevo y estéril, se añadió 30 uL de buffer de elusión, se dejó a temperatura ambiente (RT) por 5 minutos y se centrifugó a 16.000 g por 1 minuto. Las muestras resultantes fueron almacenadas a -20 °C.

- i. La cuantificación de este protocolo fue llevada a cabo a través de nanodrop, donde con el establecimiento de un blanco, la utilización de agua de inyección y puntas estériles y los softwares respectivos se midió la pureza y cantidad de ADN obtenido. (Tabla 1)
- b. La restricción de ADN se llevó a cabo con la enzima NdeI. Según el resultado de cada nanodrop, se ajustaron los valores de la mezcla para restricción: Para cualquier caso se añadió 1 uL de NdeI y 5 uL de buffer, el volumen de ADN varió en cada experimento para contener más de 340 ug de material genético y se aforó a 50 uL con agua de inyección estéril. Esta mezcla se incubó durante 6 horas a 37°C y cada 2 horas se añadió 0,5 uL de NdeI. Al cumplirse las 6 horas se agregó 0,5 uL de enzima CIP por al menos 40 minutos.
 - i. Gel de agarosa: La validación del proceso anterior se llevó a cabo a través de un gel de agarosa al 1%, al cual se le añadió 4 uL de Sybr green. Se construyeron pozos con capacidad de 50 uL. Se realizó el montaje del equipo de electroforesis y se sembró marcador de peso de 1 kDa y las respectivas muestras obtenidas. La

electroforesis fue corrida a 100 V por 70 minutos. Los resultados fueron observados a través de una cámara de luz UV (Figura 1).

- c. La purificación de banda inició eliminando manualmente con cuchillas minora la mayor cantidad de gel de agarosa que no contuviera las bandas de interés. Previo a la iniciación del protocolo, se pesaron los eppendorf nuevos y estériles. Posteriormente se almacenaron las bandas diseccionadas en dichos eppendorf y se calculó el peso de la banda para poder llevar a cabo el protocolo de QIAquick.

Después de tener el peso de la banda, se añadió 3 volúmenes de buffer QG, se incubó a 50 °C por 10 minutos, hasta disolver la agarosa. Se verificó el color obtenido al final (amarillo) con el fin de asegurar el valor del pH menor a 7.5. Se agregó 1 volumen de isopropanol y se mezcló por inversión. Esta mezcla fue transferida a una columna y centrifugada a 17.900 g por 1 minuto, el *flow-through* fue descartado. Se agregó 750 uL de buffer de lavado PE y se centrifugó a 17.900 g por 1 minuto 2 veces. Finalmente, se usó un eppendorf nuevo y estéril para eluir el ADN, se usó 30 uL del buffer EB, se dejó a RT por 1 minuto y se centrifugó a 17.900 g por 1 minuto. La muestra se almacenó a -20 °C. La validación de este proceso se llevó a cabo por nanodrop (Tabla 2).

2. Ligación de ADN:

Este proceso fue llevado a cabo con el protocolo propuesto por NEB [18] para la ligación de DNA con ligasa T4. Inicialmente se preparó la mezcla de ligación con valores constantes de buffer (2uL) y de ligasa T4 (1 uL) y valores variables de inserto de ADN, vector de ADN y agua libre de nucleasas. La concentración de ADN mantenía una relación 1:3 de vector a inserto y se aforó a 30 uL con el agua. En este caso, la concentración de TgDHODH fue de 4,5 ng y la del vector pGBKT7 de 14.5 ng. La ligasa siempre se agregó en último lugar y todo se mezcló por pipeteo. La reacción se incubó a 16 °C por 16 horas. Finalizado el tiempo, se almacenó la muestra a -4 °C.

3. Transformación bacteriana:

La metodología aplicada fue electroporación. Las células fueron expuestas a alcohol al 70% durante 3 minutos y juagadas al menos 5 veces con agua destilada. Posteriormente fue enfriada con hielos. Las bacterias *E. coli DH5aF'* fueron extraídas de una nevera a -80 °C y descongeladas en hielo por 2 horas. Se tomó la ligación obtenida, se resuspendió y se transfirieron 15 uL de esta a la cepa de *E. coli DH5aF'*, se mezcló y se transfirió a la celda. Se corrió el protocolo estipulado por el equipo para bacterias *E. coli*. Al finalizar el proceso se agregó 1 mL de SOC y se incubó por 90 minutos a 37 °C en agitación constante. De la muestra resultante, se extrajo 150 uL para cultivo y el resto fue centrifugado a 10.000 g por 3 minutos y se almacenó a -20 °C.

- a. Para el cultivo de esta muestra se preparó y esterilizó agar LB. Cuando el medio se encontraba líquido, pero a RT, se agregó Kanamicina, se mezcló y se sirvió en una cámara de extracción. La cámara fue previamente desinfectada con luz UV, se usaron puntas y cajas de Petri estériles. La muestra fue sembrada en un ambiente esterilizado con alcohol al 70% y con presencia de un mechero, además de todos los implementos esterilizados. Se incubó a 37°C por 48 horas (Figura 2).

RESULTADOS

1. Cuantificación Extracción de ADN con miniprep.

Tabla 1. Resultados de nanodrop obtenidos de los procesos de extracción de ADN con miniprep.

ID	TIPO	CONCENTRACIÓN ng/uL	260/280
1	TgDHODH	17	1,9
2	TgDHODH	5	1,8
3	TgDHODH	37	1,8
7	TgDHODH	95	1,8
8	TgDHODH	118	1,8
11	TgDHODH	42	1,7
12	TgDHODH	95	1,7
13	TgDHODH	82	1,6
14	TgDHODH	26	1,8
16	TgDHODH	45	1,8
17	TgDHODH	78	1,9
4	pGBKT7	12	1,8
5	pGBKT7	8	1,8
6	pGBKT7	-4	1,4
9	pGBKT7	139	1,9
10	pGBKT7	303	1,9
15	pGBKT7	128	1,8

El promedio de la concentración obtenido de las muestras de TgDHODH es de 58,18 ng/ μ L y el de pGBKT7 es de 97,67 ng/ μ L. Las muestras 6, 11, 12, 13 mostraron contaminación por orgánicos según el índice 260/280. Así mismo, la cantidad total de TgDHODH (contenido en el pET19b) extraído fue de 9,8 ug y la cantidad de pGBKT7 fue de 17,5 μ g. Cabe resaltar que la cantidad del vector cebo obtenida fue casi el doble que la del vector con el inserto y que este resultado se logró con menor cantidad de tiempo y cantidad de muestras.

2. Evaluación de Restricción Enzimática en Gel de Agarosa.

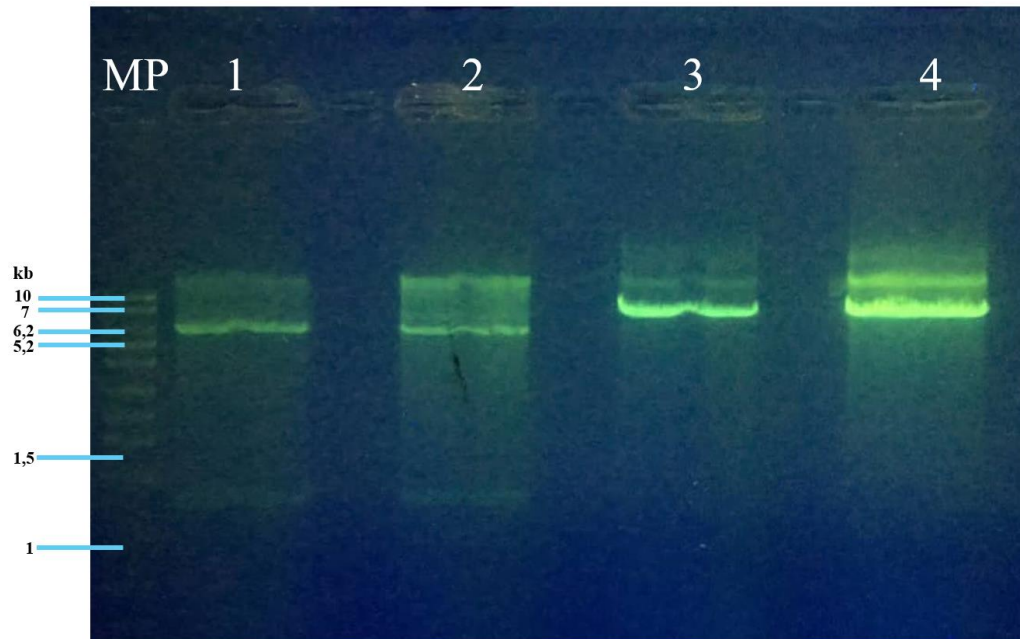


Figura 1. Gel de agarosa bajo luz UV. En el carril MP se observan las bandas del marcador de peso, los carriles 1 y 2 contienen el vector pET19b-TgDHODH y los carriles 3 y 4 contienen el vector pGBKT7. Las muestras fueron obtenidas por la restricción con NdeI.

El vector pET19b pesa 5,7 kb, el inserto TgDHODH 1,2 kb y juntos pesan 6,9 kb y el vector cebo pGBKT7 es de 7,3. El inserto TgDHODH es también visible en los carriles 1 y 2 entre las bandas de 1 y 1.5 kb.

3. Cuantificación de la Extracción de ADN del gel de agarosa.

Tabla 2. Resultados de nanodrop obtenidos de los procesos de purificación de banda.

ID	TIPO	CONCENTRACIÓN ng/uL	260/280
A	pGBKT7	47	2,6
B	pGBKT7	9	2,8
C	TgDHODH	9	2,4
D	pGBKT7	29	1,8

Las muestras A, B y C mostraron contaminación por orgánicos según el índice 260/280. Sin embargo, la muestra C fue utilizada para el proceso de ligación junto con la muestra D. La cantidad total de TgDHODH linealizado extraído de 0,27 ug y la de pGBKT7 es de 0,88 ug.

4. Evaluación de ligación y transformación.

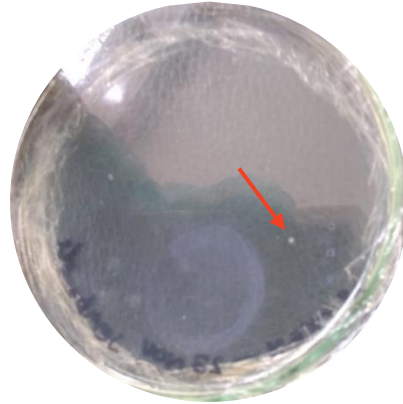


Figura 2. Colonia obtenida posterior al proceso de ligación y transformación, sembrada en agar LB con Kanamicina.

CONCLUSIONES

El estudio de las interacciones de TgDHODH resulta sumamente relevante a la hora de plantear tratamientos eficientes y de alta tolerancia frente a infecciones de toxoplasmosis. Identificar interacciones esenciales entre TgDHODH y otras proteínas puede implicar que la interrupción o inactivación de dicha interacción puede ser una estrategia adicional para el desarrollo de nuevos tratamientos. Sin duda, la técnica de doble híbrido en levaduras es un enfoque que a largo plazo resulta ahorrando tiempo y recursos pues permite seleccionar las proteínas presa más probables para mostrar o presentar interacción, para posteriormente llevar a cabo experimentos como cristalografía y espectrofotometría de masas.

Respecto al presente estudio podemos afirmar que la extracción de pET19b-DHODH y pGBKT7 fue exitosa al usar los kits de extracción de Zymo Research. Adicionalmente, se recomienda llevar el proceso de extracción de forma meticulosa ya que las muestras se contaminan fácilmente, aumentar el tiempo de crecimiento de las muestras, aumentar las revoluciones por minuto del agitador o incrementar el volumen de muestra que es concentrado, con el fin de incrementar la cantidad de volumen de ADN extraído. Pese a la baja eficiencia de NdeI, la capacidad de la enzima es suficiente para continuar con el proceso. Por otra parte, la purificación de bandas permitió recuperar el 23% de pGBKT7 y el 12% de DHODH. Aumentar la carga de ADN en la extracción con miniprep también al mejoramiento de la restricción enzimática e incrementar la cantidad de ADN linealizado purificado del gel de agarosa. Al observar los resultados del nanodrop, donde se observa mayor obtención del plásmido pGBKT7, en la miniprep y purificación de banda, en comparación con el plásmido pET19b y la DHODH respectivamente, se muestra un indicio de mayor eficiencia en la clonación del vector cebo sobre el vector que contiene el inserto de interés.

En cuanto a la obtención de una única colonia después de la transformación, se pueden identificar 3 posibles causas: 1) Transformación no eficiente que puede deberse a fallas experimentales como no cumplir con precisión los tiempos y condiciones requeridas por el método, 2) ligación no exitosa por baja cantidad de ADN recuperado, baja eficiencia enzimática causada por procesos estocásticos generados por contaminación de orgánicos de las muestras purificadas o presencia de una alta cantidad del vector pGBKT7 recircularizado o 3) una mezcla de los anteriores.

BIBLIOGRAFÍA

1. Schoch CL, Ciuffo S, Domrachev M, Hottel CL, Kannan S, Khovanskaya R, Leipe D, Mcveigh R, O'Neill K, Robbertse B, Sharma S, Soussov V, Sullivan JP, Sun L, Turner S, Karsch-Mizrachi I. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford). 2020 Jan 1;2020:baaa062. doi: 10.1093/database/baaa062. PMID: 32761142; PMCID: PMC7408187.
2. Weiss, L. and Kim, K., 2007. *Toxoplasma gondii*. 1st ed. London: Elsevier Academic Press, pp.367-368.
3. Louis M. Weiss and Kami Kim. *Toxoplasma Gondii: The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods*. Academic Press; 2014.
4. Montazeri M, Mikaeili Galeh T, Moosazadeh M, Sarvi S, Dodangeh S, Javidnia J, Sharif M, Daryani A. The global serological prevalence of *Toxoplasma gondii* in felids during the last five decades (1967–2017): a systematic review and meta-analysis. *Parasites and Vectors*. 2020;13(1).
5. *Toxoplasmosis (Toxoplasma infection)* [Internet]. CDC. 2018 [cited 2022 Jul 21]. Available from: <https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/index.html>
6. Fox BA, Bzik DJ. De novo pyrimidine biosynthesis is required for virulence of *Toxoplasma gondii*. *Nature*. 2002 Feb 21;415(6874):926-9. doi: 10.1038/415926a. PMID: 11859373.
7. *Neglected Parasitic Infections in the United States: Toxoplasmosis* [Internet]. CDC. 2021 [cited 2022 Jul 21]. Available from: https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/npi_toxoplasmosis.html
8. Rahmanian V, Rahmanian K, Jahromi AS, Bokaie S. Seroprevalence of *toxoplasma gondii* infection: An umbrella review of updated systematic reviews and meta-analyses. *J Family Med Prim Care*. 2020 Aug 25;9(8):3848-3855. doi: 10.4103/jfmpe.jfmpe_753_20. PMID: 33110778; PMCID: PMC7586519.
9. Pappas G, Roussos N, Falagas ME. *Toxoplasmosis snapshots: global status of Toxoplasma gondii seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis*. *Int J Parasitol*. 2009 Oct;39(12):1385-94. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.04.003. Epub 2009 May 9. PMID: 19433092.
10. Moffatt BA, Ashihara H. Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism. *Arabidopsis Book*. 2002;1:e0018. doi: 10.1199/tab.0018. Epub 2002 Apr 4. PMID: 22303196; PMCID: PMC3243375.
11. Boschi D, Pippione AC, Sainas S, Lolli ML. Dihydroorotate dehydrogenase inhibitors in anti-infective drug research. *Eur J Med Chem*. 2019 Dec 1;183:111681. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.111681. Epub 2019 Sep 12. PMID: 31557612.
12. Paiano A, Margiotta A, De Luca M, Bucci C. Yeast Two-Hybrid Assay to Identify Interacting Proteins. *Curr Protoc Protein Sci*. 2019 Feb;95(1):e70. doi: 10.1002/cpps.70. Epub 2018 Aug 21. PMID: 30133175.
13. Journet L, Cascales E. *Bacterial protein secretion systems*. 1st ed. New York: Springer Science and Business Media; 2018. p. 177-187.
14. Gundersen G, Worman H. *The LINC complex*. 1st ed. New York: Springer Science and Business Media; 2018. p. 221-235.
15. *Matchmaker® Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual* [Internet]. 1st ed. Mountain View: Takara Bio USA; 2022 [cited 2022 Jul 21]. Available from: http://www.takarabio.com/documents/User%20Manual/Matchmaker%20Gold%20Yeast%20Two-Hybrid%20System%20User%20Manual%20%28PT4084-1%29_071519.pdf
16. ZYMO RESEARCH. *Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit* [Internet]. Files.zymoresearch.com. [cited 2022 Jul 21]. Available from:

- https://files.zymoresearch.com/protocols/_d4019_d4020_d4036_d4037_zyppy_plasmid_miniprep_kit.pdf
17. QIAGEN. QIAquick® Spin Handbook [Internet]. 1st ed. QIAGEN; 2020 [cited 2022 Jul 23]. p. 30-32. Available from: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=95f10677-aa29-453d-a222-0e19f01ebe17&lang=en>
 18. New Biolabs. Ligation Protocol with T4 DNA Ligase (M0202) [Internet]. International.neb.com. 2022 [cited 2022 Jul 21]. Available from: <https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/dna-ligation-with-t4-dna-ligase-m0202>
 19. Grandía G. R, Entrena G. Á, Cruz H. J. TOXOPLASMOSIS EN *Felis catus*: ETIOLOGÍA, EPIDEMIOLOGÍA Y ENFERMEDAD. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú [Internet]. 2013;24(2). Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172013000200001
 20. Stelzer S, Basso W, Benavides Silván J, Ortega-Mora LM, Maksimov P, Gethmann J, Conraths FJ, Schares G. *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis in farm animals: Risk factors and economic impact. Food Waterborne Parasitol. 2019 Apr 3;15:e00037. doi: 10.1016/j.fawpar.2019.e00037. PMID: 32095611; PMCID: PMC7033994.
 21. Hortua Triana MA, Cajiao Herrera D, Zimmermann BH, Fox BA, Bzik DJ. Pyrimidine Pathway-Dependent and -Independent Functions of the *Toxoplasma gondii* Mitochondrial Dihydroorotate Dehydrogenase. Infect Immun. 2016 Sep 19;84(10):2974-81. doi: 10.1128/IAI.00187-16. PMID: 27481247; PMCID: PMC5038078.
 22. Barrera C. Technique development for the analysis of possible interactions between Dihydroorotate Dehydrogenase and mitochondrial complexes in *Toxoplasma gondii*. Bogotá: Universidad de los Andes - Facultad de ciencias; 2019.
 23. Fox BA, Falla A, Rommereim LM, Tomita T, Gigley JP, Mercier C, Cesbron-Delauw MF, Weiss LM, Bzik DJ. Type II *Toxoplasma gondii* KU80 knockout strains enable functional analysis of genes required for cyst development and latent infection. Eukaryot Cell. 2011 Sep;10(9):1193-206. doi: 10.1128/EC.00297-10. Epub 2011 Apr 29. PMID: 21531875; PMCID: PMC3187049.