

Análisis *in silico* de factores reguladores de interferón (IRFs) y sus correspondientes interacciones ADN-proteína en el contexto del promotor del gen *LGALS9*

Vega del Real, M.^{1,2}, Aparicio Flores, J.¹, Vallejo Ruiz, V.², Milflores Flores, L.¹

¹ Laboratorio de biología molecular y microbiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, C.P. 72592, Puebla, México.

² Centro de Investigación Biomédica de Oriente (CIBIOR, IMSS), C.P. 74360, Atlixco, México.

Contacto: maria.vegadelreal@alumno.buap.mx

RESUMEN

La evidencia experimental indica que miembros de la familia de factores de transcripción IRF podrían estar involucrados en el aumento de expresión de Gal-9 inducido por interferones de tipo I y II en líneas celulares. Al analizar por medio de métodos computacionales la región promotora de 727 pb del gen *LGALS9*, se encontraron un sitio ISRE y diversos sitios ISRE *Half Sites*. Se modelaron por homología los dominios de unión a ADN (DBD) de miembros de la familia IRF, y las secuencias consenso ISRE e ISRE *Half Sites* localizados en la secuencia del promotor del gen *LGALS9* para, posteriormente, realizar acoplamiento molecular proteína-ADN. Los complejos resultantes presentan energías de interacción estables, además de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas residuo-específicos.

INTRODUCCIÓN

IFN- α estimula la expresión de mRNA de Gal-9 en células dendríticas¹, e IFN- γ induce la expresión de Gal-9 en astrocitos² y aumenta la expresión en fibroblastos³ y células HUVEC (por medio de la vía HDAC3/P13K/IRF3)⁴. En este último artículo, se reporta que IRF3 se une a una secuencia no especificada del promotor del gen *LGALS9* para aumentar la expresión. En nuestro grupo de trabajo, se demostró que la región promotora 727 pb del gen *LGALS9* (que codifica para la Gal-9) muestra actividad transcripcional y sitios de unión para ISGF3⁵. Un análisis a detalle reveló una secuencia ISRE y secuencias ISRE *Half-Sites* específicas para los factores de transcripción de la familia IRF. Se propone que el sitio ISRE presente en la región promotora de 727 pb del gen *LGALS9* está relacionado con el aumento de la expresión del gen *LGALS9* inducida por interferones.

OBJETIVOS

1. Identificar secuencias consenso para IRFs en la región promotora de 727 pb del gen *LGALS9* por medio de programas computacionales.
2. Modelar por homología los DBD de IRFs.
3. Obtener complejos que reflejen la interacción y afinidad entre los IRFs seleccionados y sus secuencias consenso localizadas en la región promotora de 727 pb del gen *LGALS9* por medio de acoplamiento molecular.
4. Identificar los residuos importantes que interaccionan por medio de puentes de hidrógenos e interacciones hidrofóbicas en los complejos IRFs-ADN obtenidos por medio de los acoplamiento molecular.

METODOLOGÍA

1. Búsqueda de secuencias consenso en LASAGNA Search 2.0 empleando el fragmento de 727 pb (posición -565 a +162).
2. Búsqueda de secuencias de DBDs de IRFs y alineamiento (UniProt, Clustal Omega).
3. Búsqueda de estructuras en PDB o modelamiento por homología (SWISS-MODEL, I-TASSER).
4. Evaluación de calidad de los modelos obtenidos (VERIFY, PROCHECK, MolProbity).
5. Modelamiento de secuencias consenso (w3DNA Fiber Mode).
6. Acoplamiento molecular (HADDOCK 2.4 Easy Interface).
7. Visualización de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas (LigPlot+).

RESULTADOS

Se modelaron por homología los DBD de IRFs 1, 5, 7, 8 y 9. IRF3 se obtuvo de PDB (PDB ID 3QU6). El alineamiento de las secuencias de DBD en Clustal Omega indicó que el templado más idóneo para emplear en el modelamiento molecular es IRF4 (PDB ID 7JM4). El porcentaje de residuos en regiones favorables del gráfico de Ramachandran fue mayor al 90% en todos los modelos obtenidos, mientras que el valor de RMSD fue menor a 1.0 Å.

Los acoplamiento molecular dieron como resultado diferentes clústeres que se clasificaron en orden de estabilidad. En HADDOCK, el grupo superior es el más confiable, y es el que se muestra en las siguientes imágenes.

Se obtuvieron complejos estables para todos los casos, siendo el DBD de IRF7 el caso en el que se obtuvieron energías de interacción (HADDOCK Score) más bajas. Los DBD presentaron una clara tendencia por los sitios ISRE-Half Site (o sitios alternativos GAGA, GACA), lo cual se corroboró al analizar los puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en LigPlot+. La mayor parte de éstas interacciones se concentraron en los nucleótidos que conforman la secuencia TTTC (GAAA en la cadena antisentido).

HADDOCK Score (ISRE)

IRF1	-128.9 +/- 8.0
IRF3	-131.4 +/- 11.6
IRF5	-99.0 +/- 15.7
IRF7	-67.4 +/- 13.4
IRF8	-91.1 +/- 11.8
IRF9	-106.3 +/- 20.6

HADDOCK Score (CCTTTCTC)

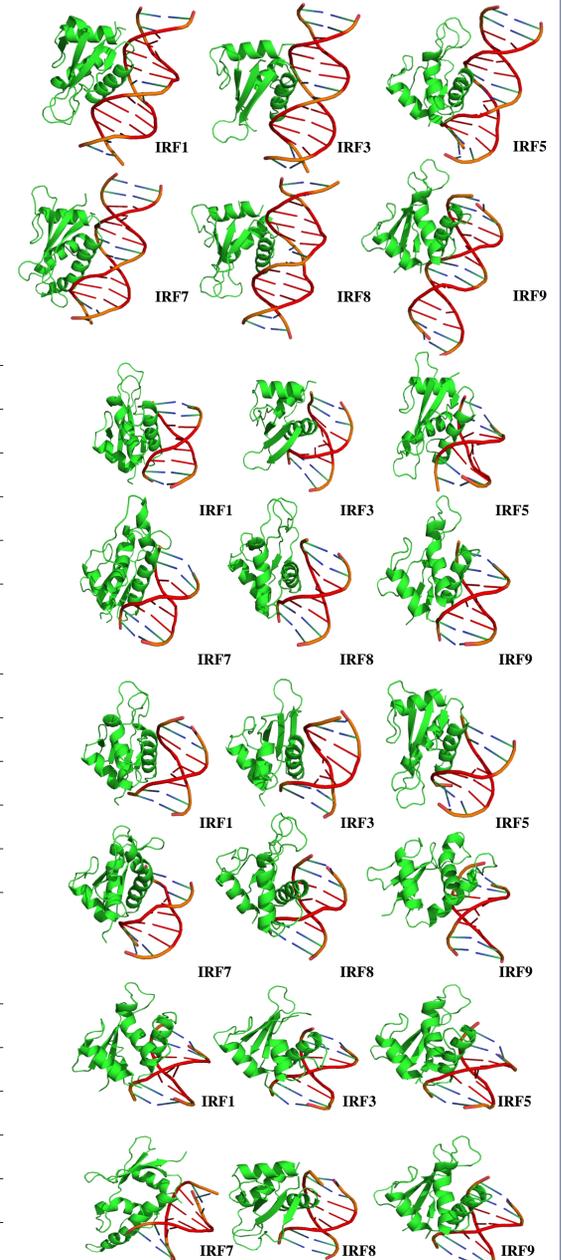
IRF1	-88.0 +/- 5.7
IRF3	-108.2 +/- 3.5
IRF5	-96.5 +/- 10.2
IRF7	-54.5 +/- 12.1
IRF8	-91.1 +/- 7.9
IRF9	-108.7 +/- 10.8

HADDOCK Score (AAGAGAGG)

IRF1	-87.5 +/- 8.6
IRF3	-76.5 +/- 9.7
IRF5	-89.8 +/- 3.6
IRF7	-71.9 +/- 7.8
IRF8	-95.2 +/- 4.7
IRF9	-87.7 +/- 11.0

HADDOCK Score (AGGACACA)

IRF1	-87.5 +/- 8.6
IRF3	-76.5 +/- 9.7
IRF5	-89.8 +/- 3.6
IRF7	-71.9 +/- 7.8
IRF8	-95.2 +/- 4.7
IRF9	-87.7 +/- 11.0



CONCLUSIONES

Se obtuvieron complejos proteína-ADN estables, los cuales presentaron energías de afinidad altas y puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Se espera corroborar de manera experimental la importancia del sitio ISRE presente en la región promotora de 727 pb del gen *LGALS9*.

REFERENCIAS

1. van den Hoogen, L. L., van Roon, J., Mertens, J. S., Wienke, J., Lopes, A. P., de Jager, W., Rossato, M., Pandit, A., Wichers, C., van Wijk, F., Fritsch-Stork, R., & Radstake, T. (2018). Galectin-9 is an easy to measure biomarker for the interferon signature in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Annals of the rheumatic diseases*, 77(12), 1810–1814. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-213497>
2. Steelman, A. J., Smith, R., 3rd, Welsh, C. J., & Li, J. (2013). Galectin-9 protein is up-regulated in astrocytes by tumor necrosis factor and promotes encephalitogenic T-cell apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 288(33), 23776–23787. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.451658>
3. Park, W. S., Jung, W. K., Park, S. K., Heo, K. W., Kang, M. S., Choi, Y. H., Kim, G. Y., Park, S. G., Seo, S. K., Yea, S. S., Liu, K. H., Shim, E. B., Kim, D. J., Her, M., & Choi, I. W. (2011). Expression of galectin-9 by IFN- γ stimulated human nasal polyp fibroblasts through MAPK, PI3K, and JAK/STAT signaling pathways. *Biochemical and biophysical research communications*, 411(2), 259–264. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.06.110>
4. Alam, S., Li, H., Margariti, A., Martin, D., Zampetaki, A., Habi, O., Cockerill, G., Hu, Y., Xu, Q., & Zeng, L. (2011). Galectin-9 protein expression in endothelial cells is positively regulated by histone deacetylase 3. *The Journal of biological chemistry*, 286(51), 44211–44217. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.242289>
5. Aparicio Flores, J. (2019). Tesis: Identificación, caracterización y evaluación de la actividad del promotor del gen *LGALS9*.