



FACULTAD DE
CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

“Optimización electrostática de aminoácidos
para dimerización de dominios: concepto
Magnet aplicado al interruptor optogenético
Fungal Light-Oxygen-Voltage”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

LEONARDO ARTURO GUZMÁN ZAMORA

Director del Seminario de Título: Dr. Luis Fernando Larrondo Castro

Profesor Patrocinante: Dr. Francisco Pablo Chávez Espinoza

Fecha: 29 de Julio del 2022

Santiago-Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el o (la) candidato (a):

LEONARDO ARTURO GUZMÁN ZAMORA

“Optimización electrostática de aminoácidos para dimerización de dominios: concepto *Magnet* aplicado al interruptor optogenético *Fungal Light-Oxygen-Voltage*”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dr. Luis Larrondo Castro
Director del Seminario de Título

Dr. Francisco Chávez Espinoza
Profesor Patrocinante

COMISIÓN REVISORA Y EVALUADORA

Dr. Marcelo Baeza Cancino
Presidente

Dr. Francisco Cubillos Riffo
Evaluador

Santiago de Chile, Noviembre 2022

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi familia, pero por sobre todo a mi madre, quien me ha guiado y cuidado en mi desarrollo como persona.

También la dedico a Daniela, quien me ha acompañado en este duro viaje de procesos y aprendizajes con su paciencia y cariño.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Luis Larrondo por aceptarme en su laboratorio para continuar y finalizar este trabajo. En su grupo de investigación he adquirido conocimientos que me han hecho crecer como científico y persona.

Al Dr. Francisco Salinas, quien me aceptó originalmente en su laboratorio, y su buena voluntad y tutoría reivindicaron mi alegría por las ciencias.

A Vicente Rojas, quien ha tenido la inagotable paciencia de enseñarme y guiarme en el trabajo, así también acompañarme como un gran amigo y maestro.

A los amigos del laboratorio, por su apoyo infaltable en todo y su comprensión. Por sobre todos a Sebastián Dehnhardt, un camarada del que he aprendido muchísimo; y a Rodrigo Pérez, cuya rigurosidad y espíritu científico permitieron mejorar tanto mi trabajo de laboratorio como este escrito.

A los caballeros de la mesa redonda, quienes me han acompañado en toda la aventura que ha significado este proceso.

Agradezco a mi familia y a Daniela Barra por todo su cariño y apoyo, así también a Raúl Loyola, Felipe Torres y Nicolás Álvarez, a quienes considero mi familia de igual forma. Sepan que los quiero a todos con la vida, y que esta tesis es suya.

Este trabajo fue financiado bajo el marco de FONDECYT 1211715 y por el Instituto Milenio de Biología Integrativa (iBio).

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
ÍNDICE DE CONTENIDOS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	X
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XII
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	6
Hipótesis	6
Objetivo general	6
Objetivos específicos	6
MATERIALES Y MÉTODOS	7
Material biológico	7
Bacterias	7
Levaduras.	7
Vectores	7
Equipos	7
Medios de cultivo	8
Bacterias.	8
Levaduras.	8
Partidores	9
Secuenciación	9
Mutagénesis sitio dirigida	9
Purificación de ADN plasmidial	10
Bacterias.	10
Levaduras.	10
Transformación de bacterias	10

Transformación de levaduras	10
Generación de construcciones genéticas	11
Experimentos en el lector de placa	12
Predicción de estructura de proteínas	12
Alineamiento y comparación de modelos	13
RESULTADOS	16
Adaptación del sistema Magnet al dominio LOV de WC-1	16
Mutagénesis sitio dirigida de aminoácidos puntuales	16
Sistema FUN-LOV optimizado mediante Magnets	19
Exploración de optimización por sistema de Half Magnets	22
Combinaciones Half Magnet	22
Combinaciones Half b Magnet	23
Combinaciones Half Magnet entre sí mismas	23
Comparación de las respuestas de combinaciones Magnet	28
Análisis estructural del doble híbrido en FUN-LOV Magnet	30
Homodímeros de Magnets originales	31
Homodímeros de Half Magnets	31
Comparación de valores RMSD e Intensidad de señal	36
DISCUSIÓN	38
CONCLUSIONES	43
MATERIAL SUPLEMENTARIO	44
BIBLIOGRAFÍA	55

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA I. Partidores utilizados en ensamblaje y mutagénesis.	14
TABLA II. Construcciones usadas y generadas en el desarrollo de este trabajo.	15
TABLA III. Comparación de RMSD, porcentaje de aminoácidos alineados e intensidad de respuesta contra FUN-LOV.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistemas de inducción basados en dominios LOV.	4
Figura 2. Esquema de claves utilizadas en este trabajo para cada una de las combinaciones de mutaciones en los plásmidos del sistema FUN-LOV Magnet.....	18
Figura 3. Caracterización del sistema FUN-LOV Magnet en respuesta a un pulso de luz.	21
Figura 4. Caracterización del sistema FUN-LOV “Half” Magnet en respuesta a un pulso de luz.....	25
Figura 5. Caracterización del sistema FUN-LOV “Half b” Magnet en respuesta a un pulso de luz.	26
Figura 6. Caracterización del sistema FUN-LOV Magnet en respuesta a un pulso de luz, entre permutaciones de las variantes “Half” y “Half b”.	27
Figura 7. Gráfico de barras de cepas seleccionadas según intensidad de respuesta...	29
Figura 8. Modelos de estructura terciaria a utilizar comparativamente.	32
Figura 9. Alineamientos de Magnets originales comparados con sistema FUN-LOV. ...	33
Figura 10. Alineamientos de Half Magnets comparados con sistema FUN-LOV.	34
Figura 11. Alineamientos de Half Magnets “b” comparados con sistema FUN-LOV.....	35
Figura 12. Representación del sistema FUN-LOV original considerando el homodímero GAL4-DBD-WC-1 LOV.....	42
Figura suplementaria 1. Alineación de secuencias de aminoácidos entre VVD y WC-1.	44

Figura suplementaria 2. Caracterización del sistema FUN-LOV Magnet en respuesta a luz continua.	45
Figura suplementaria 3. Caracterización del sistema FUN-LOV “Half” Magnet en respuesta a luz continua.	46
Figura suplementaria 4. Caracterización del sistema FUN-LOV “Half b” Magnet en respuesta a luz continua.	47
Figura suplementaria 5. Caracterización del sistema FUN-LOV Magnet en respuesta a luz continua, entre permutaciones de las variantes “Half” y “Half b”.	48
Figura suplementaria 6. Caracterización del sistema FUN-LOV Magnet en respuesta a luz continua, entre permutaciones de las variantes “Half” y “Half b”.	49
Figura suplementaria 7. Controles del sistema FUN-LOV Magnet en respuesta a pulso de luz, oscuridad y luz constante.	50
Figura suplementaria 8. Controles del sistema FUN-LOV “Half” Magnet en respuesta a pulso de luz, oscuridad y luz constante.....	51
Figura suplementaria 9. Controles del sistema FUN-LOV “Half b” Magnet en respuesta a pulso de luz, oscuridad y luz constante.....	52
Figura suplementaria 10. Controles del sistema FUN-LOV Magnet en respuesta a pulso de luz, entre permutaciones de las variantes “Half” y “Half b”.....	53
Figura suplementaria 11. Gráficos de barra comparando luminiscencia a 9 horas por experimento realizado en placa.	54

LISTA DE ABREVIATURAS

AD: Activation Domain.
ADN: Ácido Desoxirribonucleico.
Amp: Ampicilina.
DBD: DNA Binding Domain.
DD: Oscuridad constante.
FAD: Flavín Adenin Dinucleótido.
FMN: Flavín Mononucleótido.
FUN-LOV: Fungal Light-Oxygen-Voltage.
His: L- Histidina.
LB: Luria-Bertani.
Leu: L- Leucina.
LL: Luz constante.
Luc: Luciferasa.
PAS: Per–Arnt–Sim.
PEG: Polyethylene Glycol.
PCR: Polymerase Chain Reaction.
PL: Pulso de luz.
RMSD: Root-mean-square deviation.
Ura: Uracilo.
VVD: VIVID.
WC-1: WHITE COLLAR-1.
WCC: White Collar Complex.
YPD: Yeast Peptone Dextrose.
YNB: Yeast Nitrogen Base.

RESUMEN

Los fotorreceptores son moléculas que surgen como un mecanismo biológico de percibir la luz, provocada por cambios conformacionales que estas moléculas sufren en respuesta a diversas longitudes de onda. Su nivel de respuesta y la capacidad de inducir señales de transcripción ha llevado al surgimiento de la optogenética, disciplina que combina estos receptores para controlar diversos procesos celulares de interés, permitiendo una fina modulación espaciotemporal de expresión de genes, en contraste con inducciones químicas que tienen mayores complejidades.

Dentro la amplia gama de fotorreceptores se encuentran los dominios *Light-oxygen-voltage* (LOV), caracterizados por su pequeño tamaño, la capacidad de dimerizar entre sí y su sensibilidad a luz azul. En el hongo *Neurospora crassa* se han descrito dos proteínas con dominios LOV, White collar-1 (WC-1) y Vivid (VVD), que juegan un importante rol en la fotobiología de este organismo, y que recientemente han además sido utilizadas para el desarrollo de sistemas optogenéticos. En su estado natural, WC-1 dimeriza en presencia de luz y permite activar una serie de procesos transcripcionales dentro de los que se encuentra la expresión de VVD, que a su vez inhibe –por competitividad– el sistema a partir de su interacción con WC-1.

Ambas proteínas se han utilizado conjuntamente en la implementación de un interruptor optogenético basado en el sistema de doble híbrido (Y2H), *Fungal Light-Oxygen-Voltage* (FUN-LOV). Este interruptor utiliza el dominio de unión a ADN de Gal4 fusionado a WC-1, y el dominio de activación de Gal4 unido a VVD, permitiendo la activación de genes de interés en presencia de luz azul. Esta herramienta optogenética destaca por su alta resolución temporal, su alto nivel de inducción y su bajo nivel de ruido basal, transformándose en sistema robusto para el control de expresión génica.

Por su parte, VVD se ha utilizado para reconstituir función de proteínas divididas (*Split*), que se encuentran fusionadas quiméricamente cada una a una unidad de este dominio LOV, de forma tal que mediante luz VVD dimeriza permitiendo que una mitad de la proteína dividida quede junto a la otra. Este sistema ha sido aplicado extensivamente pero no está exento de problemas, en particular la homodimerización de partes. A partir de esta disyuntiva es que se ha desarrollado el sistema de optimización *Magnet*, que reemplaza ciertos aminoácidos neutros de VVD por otros cargados, generando una interacción electrostática de cargas opuestas, permitiendo selectividad de las partes del sistema y una unión más persistente.

Este seminario de título combina el sistema FUN-LOV y la optimización *Magnet*, utilizando aminoácidos cargados sobre la región original de VVD y la región homóloga de WC-1, con el fin de reducir la homodimerización de ambas partes del interruptor original. Esta optimización se caracterizó tanto *in vivo* mediante la activación de un gen reportero, así como *in silico*, mediante el uso de la novedosa herramienta de predicción de estructura AlphaFold. Para este propósito, se desarrollaron variantes de las partes del sistema FUN-LOV conteniendo aminoácidos con carga positiva y negativa, y se evaluaron estos cambios mediante la luminiscencia del gen reportero de luciferasa.

Como resultado de esta caracterización, no se pudo recapitular la interacción electrostática original del sistema *Magnet*. Sin embargo, algunas variantes del sistema entregaron mayores niveles de inducción. En particular, esto ocurrió en los cambios de aminoácido sobre WC-1, sobre todo aquellos con carga negativa, teniendo estas variantes mayor respuesta a luz. La caracterización *in silico* demostró que los aminoácidos cambiados de WC-1 son relevantes y alteran su estructura homodimérica, lo que teóricamente podría permitir una mejor interacción con VVD, aumentando su nivel de respuesta.

ABSTRACT

Photoreceptors are molecules that arise as a biological mechanism of light sensing, provoked by conformational changes that these molecules undergo in response to various wavelengths. Its level of response and its capacity to induce transcription signals has led to the emergence of optogenetics, a discipline that combines these receptors to control various cellular processes of interest, allowing a fine spatiotemporal modulation of gene expression, in contrast to chemical inductions which have greater complexities.

Within the vast range of photoreceptors are the domains *Light-oxygen-voltage* (LOV), distinguished by their small size, their capacity to dimerize with each other and their sensitivity to blue light. Two proteins containing LOV domains have been described in the fungus *Neurospora crassa*, White collar-1 (WC-1) and Vivid (VVD), which play an important role in the photobiology of this organism, and which have also recently been used for the development of optogenetic systems. In its natural state, dimers of WC-1 are formed in presence of light, allowing a number of transcriptional processes to occur, including VVD expression which, when produced, inhibits the system by competing with its interaction with WC-1.

Together these proteins have been used in a recently described switch based on the two-hybrid system (Y2H), *Fungal Light-oxygen-voltage* (FUN-LOV). This switch uses DNA binding domain of Gal4 attached to WC-1, and the activation domain of Gal4 attached to VVD, allowing the activation of genes of interest in the presence of blue light. This optogenetic tool stands out by its high temporal resolution, high level of induction and low noise level, thus becoming a robust system for the control of gene expression.

For its part, VVD has been used to reconstitute the function of divided proteins (Split), which are fused to this LOV domain, in a way that VVD dimerizes by light, allowing one half of the divided protein to remain close to the other. This system has been applied extensively but it is not without its flaws, in particular the homodimerization of its parts. It is from this dilemma that the Magnet optimization system was developed, which replaces certain neutral aminoacids in VDD with charged ones, generating electrostatic interaction between opposed charges, allowing selectivity between the parts of the system and a more persistent union.

The present Pre-graduation seminar combines the FUN-LOV system and a Magnet optimization, using charged aminoacids on the original region of VVD and the homologous region of WC-1, in order to reduce the homodimerization of both parts of the original switch. This optimization was characterized both *in vivo* by activation a reporter gene, as well as *in silico*, using the novel AlphaFold structure prediction tool. For this purpose, variants of the parts of the FUN-LOV system containing positively and negatively charged aminoacids were developed and were evaluated by the luminescence of the luciferase reporter gene.

As a result of this characterization, the original Magnet electrostatic interaction could not be recapitulated. However, the system was optimized by the aminoacids changes over WC-1, especially those with a negative charge, having these variants greater response to light. *In silico* characterization demonstrated that the changed aminoacids from WC-1 are essential and alter its homodimeric structure, which theoretically could allow a better interaction with VVD, increasing its response level.

INTRODUCCIÓN

Múltiples organismos, entre ellos los hongos, utilizan la luz como una potente fuente de información del entorno, con el fin de regular varios aspectos de su biología (Corrochano, 2019). Para obtener dicha información, utilizan proteínas conocidas como fotorreceptores, los cuales reciben las señales de luz a partir de moléculas con capacidad de absorberla, llamadas cromóforos, que permiten provocar cambios estructurales para activar vías de señalización en el organismo (Corrochano, 2019).

El descubrimiento y estudio de los fotorreceptores ha llevado al surgimiento de la optogenética, que se define como la combinación de métodos genéticos y ópticos para adquirir o perder función de eventos bien definidos en células de interés, sean solitarias o en tejido (Deisseroth, 2011). Es en esta área que se han generado herramientas conocidas como interruptores optogenéticos, que traen nuevas posibilidades para controlar procesos biológicos utilizando luz, con una alta resolución espaciotemporal (Shcherbakova y cols., 2015). El uso de estas herramientas, así como el estudio de la fotobiología de sus fotorreceptores, ha llevado a la comprensión de varios eventos celulares con excepcional precisión, como por ejemplo el rol de C-di-GMP en la aerotaxis de ciertas bacterias (O'Neal y cols., 2017), diversos mecanismos neuronales célula-dependientes (Mühlhäuser y cols., 2017), y funciones biológicas complejas y cíclicas como el reloj circadiano del hongo filamentoso *Neurospora crassa* (Malzahn y col, 2010).

Dentro de la vasta variedad de fotorreceptores que existen, hay un grupo de dominios denominados *Light-oxygen-voltage* (LOV), que pertenecen a la familia de proteínas Per-Arnt-Sim (PAS). Durante la fotorrecepción, la luz azul provoca un cambio conformacional en estos dominios, generando una unión entre un cofactor de flavina (FAD o FMN) y una cisteína cercana, lo que provoca que se forme una estructura llamada fotoaducto (Corrochano, 2019). El pequeño tamaño de estos dominios y la presencia de flavina como su cromóforo, que está presente en la

mayoría de células, les ha otorgado una preferencia clave en su uso para el desarrollo de herramientas optogenéticas (Shcherbakova y cols., 2015).

Dentro del grupo de dominios LOV, *N. crassa* utiliza un par de proteínas que contienen dicho dominio para regular procesos biológicos relevantes de su ciclo de vida, *White Collar 1* (WC-1) y *Vivid* (VVD). WC-1, en conjunto con la proteína WC-2, forman el denominado *White Collar Complex* (WCC), que es esencial para el funcionamiento del reloj circadiano de este hongo. Ambas proteínas tienen un *zinc finger* que permite la unión a ADN (Corrochano, 2019), que le otorgan la capacidad de reconocer elementos *cis*-específicos en promotores blancos y activar la transcripción de genes blanco. Además de su rol esencial en mecanismos circadianos, WCC juega un papel clave en las respuestas a luz azul en este organismo. Luego de la exposición a la luz, dos WC-1 interactúan a través de sus dominios LOV para formar dímeros del WCC (Corrochano, 2019). Este complejo activado inducirá la expresión de varias proteínas, entre las que se encuentra VVD, una proteína pequeña compuesta únicamente por el dominio LOV y una tapa amino-terminal (*N-cap*) (Chen y cols., 2010). En presencia de luz VVD puede homodimerizar, así como también heterodimerizar con WC-1, lo que interrumpirá e inactivará el homodímero de WCC a través de la formación competitiva de heterodímeros WC-1-VVD (Malzahn y cols., 2010).

Tanto por sí solas como en conjunto, WC-1 y VVD han sido utilizados en la generación de diversos interruptores optogenéticos. Debido a su capacidad de dimerizar rápidamente y a su dinámica molecular responsiva al volver a su estado basal en oscuridad (Chen y cols., 2010) VVD se ha utilizado para reconstituir la estructura en proteínas cortadas (*Split*), activando su función en presencia de luz (Kawano y cols., 2015). Por su parte, WC-1 se ha usado en conjunto con VVD en la generación de interruptores optogenéticos en un sistema de doble híbrido (Y2H) basado en el factor de transcripción de GAL4, generando una herramienta conocida como *Fungal Light-Oxygen-Voltage* (FUN-LOV), que permite la manipulación precisa de la expresión de genes de interés, con gran resolución temporal y altos niveles de inducción (Salinas y cols., 2018).

Con respecto a los dímeros de VVD como herramienta optogenética, existen problemas de eficiencia y selectividad, debido a que la reconstitución de la función en proteínas *split*, requiere la formación de un heterodímero VVD con cada una de las partes de la proteína, vale decir, amino (A) y carboxilo terminales (B) (Figura 1A). Sin embargo, ambas quimeras A y B pueden interactuar como homodímeros, perdiendo potenciales interacciones por competitividad y disminuyendo su eficiencia teórica (Kawano y cols., 2015). Esta problemática ha llevado al desarrollo de pares VVD^{LOV} distintivos con capacidad selectiva, a partir de la modificación de la región *N-cap*, reemplazando aminoácidos neutros no esenciales en la interfaz proteína-proteína por otros cargados como arginina (+) o ácido aspártico (-). Esta herramienta optogenética avanzada fue denominada *Magnet* por los autores, debido a su interacción electrostática (Kawano y cols., 2015). Estas interacciones a partir de aminoácidos cargados y cadenas laterales polares se han demostrado como puntos claves en la cohesión de proteínas e interfaces entre proteínas, ya que permiten la formación de puentes salinos que terminan por estabilizar los conformeros del multímero (Kumar y Nussinov, 2002).

FUN-LOV, por su parte, sufre también de los problemas asociados a dímeros de VVD. Su sistema está compuesto por una quimera entre el dominio de unión a ADN de Gal4 (GAL4-*DNA Binding Domain*, DBD) acoplado al dominio LOV de WC-1; y el dominio de transactivación de Gal4 (GAL4-*Activation Domain*, AD) acoplado al dominio LOV de VVD (Salinas y cols., 2018) (Figura 1B). GAL4-DBD forma de manera natural un homodímero, ya que es un *zinc finger* binuclear (Hong y cols., 2008), por lo que la homodimerización innata de WC-1 no se presenta como un problema de competitividad. Sin embargo, VVD-GAL4-AD puede homodimerizar, disminuyendo la eficiencia de una manera similar a la expuesta en el trabajo de Kawano.

Este tipo de modificaciones a complejos de proteínas podrían evaluarse *in silico*, mediante el uso de biología computacional. Este campo siempre tuvo como dilema el poder predecir como las alteraciones afectan la estructura terciaria, o cómo interactúan ciertas proteínas sin depender

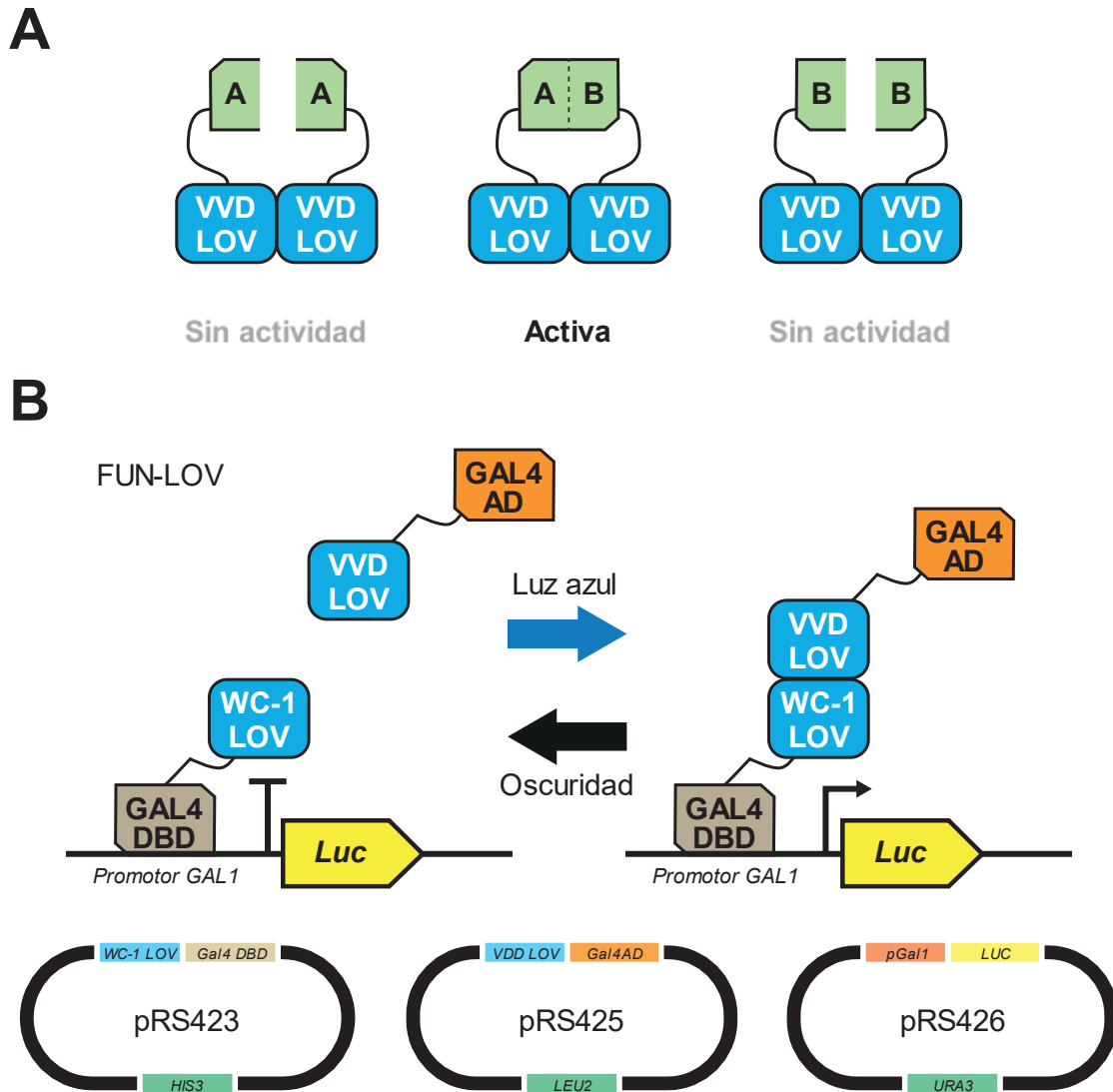


Figura 1. Sistemas de inducción basados en dominios LOV. (A) Reconstitución de actividad en proteínas *Split* basadas en VVD LOV. La respuesta del sistema se tiene con un heterodímero de las partes A y B de la proteína de interés. Hay casos donde no existirá actividad debido a la homodimerización de partes del sistema, lo que provoca una disminución a la potencial respuesta total. (B) Esquema del interruptor optogenético Fungal Light-Oxygen-Voltage (FUN-LOV) y sus plásmidos. Este sistema presenta tres construcciones genéticas: el dominio de unión a ADN GAL4 (GAL4 DBD) unido al dominio LOV de WC-1 en el vector pRS423; el dominio LOV de VVD unido al dominio de transactivación de GAL4 (GAL4 AD) en el vector pRS425; y el promotor de *GAL1* controlando al gen reportero de luciferasa, en el vector pRS426.

de cristalografía. Se estima que la aplicación de estas predicciones podría resolver problemas de diseño en arquitectura de proteínas, y así también extenderse a predecir comportamientos e incluso reacciones (Kuhlman y Bradley, 2019). Este problema no vio un progreso significativo hasta la creación de AlphaFold2, una herramienta de predicción de estructura de proteína nacida de una iteración anterior que combinaba las bases de datos de estructuras conocidas mediante cristalografía y la inteligencia artificial de *deep learning Deepmind* (Cramer, 2021). AlphaFold2 (desde ahora en adelante referido como AlphaFold) ha extendido los límites de la predicción de estructura de proteína, generando para finales del 2021 más de 350.000 estructuras de proteínas tanto humanas como de otras especies. Además, el equipo creador de la herramienta ha liberado su código para uso gratuito, lo que ha llevado a los expertos en el área a considerar el problema de predicción de estructura de manera computacional como uno resuelto (Zhang y cols., 2021).

El presente seminario de título tiene como objetivo aplicar la optimización electrostática del sistema Magnet sobre el interruptor optogenético FUN-LOV, utilizando las sustituciones de aminoácidos del sistema original desarrollado por Kawano en el dominio LOV de VVD, así como también realizando cambios homólogos sobre el dominio LOV de WC-1, debido a su similitud de secuencia (Zoltowski y cols., 2007). Se plantea el desarrollo de estas variantes Magnet en el contexto del sistema FUN-LOV, para lo cual se estudiará su efecto sobre la potencia de dicho interruptor optogenético. Para esto se utilizará como reportero transcripcional el gen de la luciferasa (*Luc*), que permite la rápida visualización *in vivo* a partir de equipos con detección de bioluminiscencia (Salinas y cols., 2018) (Rojas y cols., 2020, p. 298). Además, se plantea el uso de la herramienta AlphaFold para estudiar, *in silico*, el efecto que tienen las modificaciones realizadas sobre el sistema FUN-LOV, extendiendo la comprensión de los efectos electrostáticos de aminoácidos en este seminario de título.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

La presencia de aminoácidos cargados, a partir de sustituciones en la región *N-cap* de VVD y su región homóloga en WC-1, optimizará la respuesta a luz del interruptor optogenético FUN-LOV.

Objetivo general

Construir y caracterizar *in vivo* e *in silico* versiones del interruptor Fungal Light-Oxygen-Voltage con aminoácidos cargados en la región *N-cap* de VIVID y su región homóloga en WC-1.

Objetivos específicos

- Identificar aminoácidos a cambiar y realizar mutagénesis sitio dirigida en dichos aminoácidos tanto en el dominio LOV de VVD como en el homólogo de WC-1, en los residuos a ser sometidos a permutaciones electrostáticas.
- Caracterizar *in vivo* los niveles de expresión de los sistemas construidos en condiciones de luz y oscuridad, mediante un gen reportero de luciferasa.
- Caracterizar *in silico* los cambios conformacionales que provocan estas modificaciones en el sistema FUN-LOV y contrastarlos a partir de herramientas computacionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Bacterias

Se utilizó la cepa comercial *Escherichia coli DH5α* (ThermoFisher).

Levaduras.

Se utilizó la cepa *BY4741* de *Saccharomyces cerevisiae* (Brachmann y cols., 1998).

Vectores

Se utilizaron los vectores de clonamiento comerciales pRS423, pRS425 y pRS426 (Addgene).

Equipos

- Termoblock Pierce.
- Termomixer Eppendorf.
- Cabina de flujo laminar vertical NuAire AireGard 126-400E.
- Baño termostático Haake K20 DC3.
- Balanza electrónica Sartorius TE 1502 S.
- Balanza analítica ADAM AFA-180LC.
- Vortex Mixer Vision Scientific Co., LTD KMC-1300V.
- Agitador magnético Thermolyne Nuova II Stirrer S-18525.
- Fuente de poder CBS Scientific Company INC EPS250.
- Purificador Ultrapure (TYPE I) Water Simplicity Merck Millipore.
- Centrifuga refrigerada Hermle Z300K.
- Microcentrifuga refrigerada Hettich Mikro 22R.
- pH-metro HI 2221 Hanna Instruments.

- Estufa de incubación a 37°C LabTech.
- Estufa de incubación a 30°C LabTech.
- Termociclador Veriti de 96 pocillos Applied Biosystems.
- Nanodrop 2000 Thermo Scientific.
- Synergy HTX BioTek.
- Incu-Shaker 10L Benchmark.
- ChemiDoc™ MP Imaging System Bio-Rad.

Medios de cultivo

Bacterias.

Medio Luria-Bertani (LB): Compuesto por L-Broth 1,55%. En caso de preparar LB sólido, se adicionó agar para una concentración final de 1,5%. La esterilización del medio se realizó mediante autoclave a 120 °C durante 18 minutos. Para selección de bacterias se usó ampicilina (Amp) en concentraciones finales de 100 µg/mL.

Levaduras.

Medio YPD: Compuesto por extracto de levadura 1%, peptona 2%, D-glucosa 2%. En caso de preparar YPD sólido, se adiciona agar a una concentración final de 2%. La esterilización del medio se realiza por medio de autoclave a 120 °C durante 18 minutos.

Medios Sintéticos: Compuesto por YNB sin aminoácidos 0,67%, D-glucosa 2% y mix de aminoácidos determinado 0,2%. Para la preparación del medio sólido se adicionó agar a una concentración final de 2%. La esterilización del medio se realiza por medio de autoclave a 121 °C durante 18 minutos. La selección de levaduras se realizó por medio de marcadores de auxotrofia para uracilo (Ura), L-leucina (Leu) y/o L-histidina (His).

Partidores

La síntesis de partidores se realizó por medio de la empresa Macrogen (Corea) y su diseño se realizó mediante el software Benchling (<https://www.benchling.com>). Estos partidores se encuentran en la Tabla I.

Secuenciación

La secuenciación de los plásmidos generados se llevó a cabo a través del servicio de Macrogen, mediante secuenciación de electroforesis capilar, utilizando los partidores oL3148 y oL3758 como flanqueadores para las regiones de interés de todos los plásmidos generados.

Mutagénesis sitio dirigida

Para la mutagénesis sitio dirigida se utilizó el método de Hoa y cols. (1989). Para esto, se sintetizaron partidores con sustituciones de bases según el codón de interés para la sustitución de aminoácidos, y se realizaron reacciones de PCR en la región de interés: W16 y A19 para WC-1, I52 y M55 para VVD; todos modificados por R, D o G según la Figura 2 (Kawano y cols., 2015), a partir plásmidos con el sistema FUN-LOV pLas750, pLas751 y pLas754 (Salinas y cols., 2018). Una vez obtenidos los productos de PCR, estos se digirieron con la enzima DpnI por 8 horas a 37 °C, para luego inactivarse a 80 °C por 20 minutos. Este tratamiento tiene como fin eliminar el plásmido original. Estos fragmentos fueron ensamblados mediante recombinación en otro vector contenedor (ver Generación de construcciones genéticas).

Excepcionalmente, para las variantes V+ (I52R, M55R) y V- (I52D, M55G) se disponía de estas secuencias Magnet de VVD, que fueron sintetizadas previamente al servicio de la empresa Genewiz. Todo el resto de mutaciones fueron realizadas con el método anterior.

Purificación de ADN plasmidial

Bacterias.

Para la extracción y purificación de plásmidos se utilizó el kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) con el protocolo descrito por la compañía, y luego se cuantificó la cantidad de ADN mediante el uso del equipo Nanodrop 2000.

Levaduras.

Para la extracción y purificación de plásmidos a partir de levaduras se utilizó el kit Zymo Prep Plasmid Miniprep Kit II (Zymo Research) según las indicaciones del protocolo original.

Transformación de bacterias

La transformación de bacterias se realizó mediante el método de Inoue y cols. (1990), donde a células quimiocompetentes se les adicionó una alícuota de 5 μ L de ADN de interés y se mantiene en hielo por 30 minutos. Luego se aplica un choque de calor de 42 °C en baño termorregulado por 1 minuto, y se vuelven a colocar en hielo por 2 minutos. Se procede a recuperar las células con 1 mL de medio LB durante 1,5 horas, para luego ser recolectadas mediante centrifugación a 10000 RPM por 1 minuto. Se elimina el sobrenadante y se resuspenden las células con 200 μ L de LB, y se plaquean en LB sólido con Ampicilina como marcador de selección.

Transformación de levaduras

La transformación de levaduras se realizó según el protocolo de Gietz y Woods (2002), donde se inoculó una cepa de levadura en 5 mL de medio YPD y se incubó *overnight* (~12 h) a 30°C con agitación constante. Al día siguiente son recolectados 300 μ L del cultivo y se disponen en 5 mL de medio YPD por 4 horas de incubación a 30°C con agitación constante. Este cultivo se centrifuga y lava tres veces con 1 mL de agua destilada, para luego ser lavado con 1mL acetato de litio (LiAc) 100 mM y separado en dos tubos eppendorf con 500 μ L. Finalmente, estos tubos

se centrifugan, es removido el sobrenadante y se procede a aplicar en orden, 240 μ L de polietilenglicol 50% p/v, 36 μ L de LiAc 1M, 20 μ L de ADN hebra simple de salmón 2mg/mL desnaturalizado, y los productos de PCR junto al vector digerido (6 μ L de cada producto de PCR y X μ L de vector). También se transformó con mezclas de plásmidos recombinantes (2 μ L de cada uno). Los tubos de transformación se incuban a 30°C durante 30 minutos, y luego a 42°C 30 minutos, para proceder a centrifugar la muestra, lavarla con 1 mL de agua destilada, centrifugar y resuspender el pellet en 200 μ L de agua y aplicarlo a placas con medio selectivo según corresponda. Todas las centrifugaciones fueron realizadas a 10000 rpm por 1 minuto, salvo las dos últimas siendo estas a 8000 rpm 1 minuto. Las placas obtenidas fueron incubadas por 3 días a 30°C.

Generación de construcciones genéticas

Se utilizó el protocolo de Oldenburg y cols. (1997). Para esto se utilizó la maquinaria de recombinación endógena de la levadura *S. cerevisiae*, donde se ensamblan *in vivo* varios fragmentos de ADN. Estos fueron amplificados por una polimerasa de alta fidelidad (8,2 μ L de 2X Phusion Flash Mix, 0,6 μ L de cada partidor 10 mM, 0,6 μ L de ADN templado 50ng/ μ L, 10 μ L de H₂O) con partidores que comparten 30 pb de homología con el fragmento a ser fusionado.

El programa de PCR utilizado consistió en 30 segundos a 98°C, 30 ciclos de 5 segundos a 98°C, 10 segundos a 55°C y extensión de tiempo variable a 72°C (15 segundos por cada kb del fragmento a amplificar), para finalmente terminar el programa con 5 minutos a 72°C.

Los vectores a utilizar (pRS423 y pRS425) fueron digeridos con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI*, y *BamHI* y *XhoI*, respectivamente.

Los plásmidos recombinantes fueron purificados y transformados en *E. coli*, donde cada fragmento fue revisado por PCR. El detalle de los plásmidos generados se encuentra en la tabla II, así como en la Figura 2.

Experimentos en el lector de placa

Las cepas transformantes generadas de levadura se crecieron en placas de 96 pocillos por sextuplicado, en cultivo *overnight* (~12 horas) a 30°C en condiciones de oscuridad. Del cultivo generado luego se tomaron 20 µL que se trasladaron a una nueva placa de 96 pocillos con capacidad de medición óptica, que contenía 180 µL de medio selectivo adecuado suplementado con luciferina a una concentración final de 1 mM.

Las condiciones lumínicas son luz azul a intensidad de 25 µM m⁻²s⁻¹ y una longitud de onda de 460 nm. La medición de bioluminiscencia y densidad óptica (OD600) fueron realizadas cada 30 minutos, por un periodo de 22 horas (con una agitación previa a la medición de 30 segundos), usando el software Gen5, utilizando un equipo Synergy HTX BioTek.

Las condiciones experimentales usadas en las mediciones fueron pulso de luz (PL) de dos horas posteriores a siete horas de oscuridad, oscuridad constante (DD) y luz constante (LL).

Predicción de estructura de proteínas

La estructura de las variantes de GAL4-DBD-WC-1 fue estimada mediante la herramienta computacional AlphaFold (AlphaFold2). El programa está alojado en un servidor en línea de la página *Google Colab* (<https://tinyurl.com/LFAlphaFold>) (Jumper y cols., 2021), al que se le entregaron las secuencias de aminoácidos de las variantes de WC-1 generadas (W+, W-, W_{1/2+}, W_{1/2-}, W_{1/2+b} y W_{1/2-b}) para predecir su estructura. Estas secuencias se entregaron en duplicados, debido a la naturaleza dimérica de GAL4-DBD. Se utilizó la configuración por defecto de la herramienta, usando su función de multímeros para la predicción. Los multímeros generados fueron descargados del mismo programa.

Alineamiento y comparación de modelos

Las estructuras de proteína obtenidas tanto de cristalografía como de predicción computacional fueron alineadas usando el programa *ChimeraX* (v1.3), mediante la función *Matchmaker* en sus configuraciones por defecto (*Tools > Structure Analysis > Matchmaker: Needleman-Wunsch sequence alignment algorithm, BLOSUM-62 matrix*). Esta función también entregó los valores de porcentaje de alineamiento y RMSD utilizados.

TABLA I. Partidores utilizados en ensamblaje y mutagénesis.

Nombre	Secuencia (5' a 3')	Largo (nt)	Tipo	Descripción
oL3148	GGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC GCCGGTAGAGGTGTGGTCAAT	50	Rv	Recombinación y secuenciación
oL3758	AGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGC TAGGCGCATGCAACTTCTTT	50	Fw	Recombinación y secuenciación
oL3966	GTTTCGACATGCTGAGGGCGTTGAGATAT GTGGCATCGAGGAAGGACCCAAAGCT	55	Fw	WC-1 Magnets, W16R
oL3967	GTTTCGACATGCTGAGGGCGTTGAGATAT GTGAGATCGAGGAAGGACCCAAAGCT	55	Fw	WC-1 Magnets, W16R y A19R
oL3968	GTTTCGACATGCTGAGGGCGTTGGACTAT GTGGCATCGAGGAAGGACCCAAAGCT	55	Fw	WC-1 Magnets, W16D
oL3969	GTTTCGACATGCTGAGGGCGTTGGACTAT GTGGACTCGAGGAAGGACCCAAAGCT	55	Fw	WC-1 Magnets, W16D y A19D
oL3970	CAACGCCCTCAGCATGTCTGA	20	Rv	WC-1, p. común
oL3971	GTTATGACATTATGGGCTATCTGAGGCAGA TTATGAACAGGCCAAACCCCAAGT	55	Fw	VVD Magnets, I52R
oL3972	GTTATGACATTATGGGCTATCTGAGGCAGA TTAGGAACAGGCCAAACCCCAAGT	55	Fw	VVD Magnets, I52R y M55R
oL3973	GTTATGACATTATGGGCTATCTGGACCAGA TTATGAACAGGCCAAACCCCAAGT	55	Fw	VVD Magnets, I52D
oL3974	GTTATGACATTATGGGCTATCTGGACCAGA TTGGCAACAGGCCAAACCCCAAGT	55	Fw	VVD Magnets, I52D y M55G
oL3975	CAGATAGCCATAATGTCAT	20	Rv	VVD, p. común
oL5639	TCTGCCTCAGATAGCCCATAATGTCATAAC CGCCGGGAGCGTAGAGCGTA	50	Rv	VVD PMag recombinación
oL5640	TCTGGTCCAGATAGCCCATAATGTCATAAC CGCCGGGAGCGTAGAGCGTA	50	Rv	VVD NMag recombinación
oL5641	CATATCTCAACGCCCTCAGCATGTGAAAC CGTTTTGGAGTAAATGCTC	50	Rv	WC-1 PMag recombinación
oL5642	CATAGTCCAACGCCCTCAGCATGTGAAAC CGTTTTGGAGTAAATGCTC	50	Rv	WC-1 NMag recombinación
oL6398	GTTTCGACATGCTGAGGGCGTTGTGGTAT GTGAGATCGAGGAAGGACCCAAAGCT	55	Fw	WC-1 Magnets, A19R
oL6399	GTTTCGACATGCTGAGGGCGTTGTGGTAT GTGGACTCGAGGAAGGACCCAAAGCT	55	Fw	WC-1 Magnets, A19D
oL6400	GTTATGACATTATGGGCTATCTGATTCAGA TTAGGAACAGGCCAAACCCCAAGT	55	Fw	VVD Magnets, I55R
oL6401	GTTATGACATTATGGGCTATCTGATTCAGA TTGGCAACAGGCCAAACCCCAAGT	55	Fw	VVD Magnets, I55D
oL6402	CATACCACAACGCCCTCAGCATGTGAAAC CGTTTTGGAGTAAATGCTC	50	Rv	WC-1 Magnet b recombinación
oL6403	TCTGAATCAGATAGCCCATAATGTCATAAC CGCCGGGAGCGTAGAGCGTA	50	Rv	VVD Magnet b recombinación

Los partidores aquí mostrados fueron utilizados para generar las construcciones necesarias con el fin de realizar las modificaciones deseadas sobre el sistema FUN-LOV.

TABLA II. Construcciones usadas y generadas en el desarrollo de este trabajo.

Nombre	Backbone	Selección en levaduras	Construcción
pLaS750	pRS423	His3	pADH1-WC-1 ^{LOV} -GAL4 DBD-tADH2
pLaS751	pRS425	Leu2	pADH1-VVD ^{LOV} -GAL4 AD-tADH2
pLaS754	pRS426	Ura3	KanMxRV-pGAL1-LUC pest-tCYC1
pLL613	pRS423	His3	pADH1_WC-1 ^{LOV} -PMag_GAL4-DBD_yADH1t
pLL614	pRS423	His3	pADH1_WC-1 ^{LOV} -NMag_GAL4-DBD_yADH1t
pLL615	pRS425	Leu2	pADH1_VVD ^{LOV} -PMag_GAL4-AD_yADH1t
pLL616	pRS425	Leu2	pADH1_VVD ^{LOV} -NMag_GAL4-AD_yADH1t
pLL858	pRS423	His3	pADH1_WC-1 ^{LOV} -PHMag_GAL4-DBD_yADH1t
pLL859	pRS423	His3	pADH1_WC-1 ^{LOV} -NHMag_GAL4-DBD_yADH1t
pLL931	pRS425	Leu2	pADH1_VVD ^{LOV} -NHMag_GAL4-AD_yADH1t
pLL932	pRS425	Leu2	pADH1_VVD ^{LOV} -PHMag_GAL4-AD_yADH1t
pLL933	pRS425	Leu2	pADH1_VVD ^{LOV} -PHbMag_GAL4-AD_yADH1t
pLL934	pRS423	His3	pADH1_WC-1 ^{LOV} -NHbMag_GAL4-DBD_yADH1t
pLL935	pRS423	His3	pADH1_WC-1 ^{LOV} -PHbMag_GAL4-DBD_yADH1t
pLL936	pRS423	His3	pADH1_WC-1 ^{LOV} -NMag_GAL4-DBD_yADH1t
pLL937	pRS423	His3	pADH1_WC-1 ^{LOV} -PMag_GAL4-DBD_yADH1t

Los plásmidos aquí mostrados fueron aquellos utilizados y desarrollados en este trabajo para la implementación de las modificaciones asociadas al sistema FUN-LOV Magnet. Todos los plásmidos comenzados con pLaS son originales del sistema FUN-LOV (Salinas y cols., 2018), mientras que el resto son originales de este trabajo, basados en modificaciones de FUN-LOV.

RESULTADOS

Adaptación del sistema Magnet al dominio LOV de WC-1

Con el objetivo de aplicar las optimizaciones Magnet a los dominios LOV del sistema FUN-LOV, es necesario realizar dos cambios de aminoácidos en la región N-cap sobre aminoácidos naturalmente neutros (Kawano y col, 2015). Para el caso de VVD, la optimización original Magnet es fácilmente implementable, ya se utilizó la misma secuencia VVD que fue sometida a dicha modificación, reemplazando I52 y M55 por arginina (R) en la variante positiva o ácido aspártico (D) y glicina (G) para la negativa, utilizando los codones de *S. cerevisiae*.

Así, para el caso de WC-1, fue necesario buscar aminoácidos que cumplan con las condiciones de los Magnet originales, es decir que pertenezcan a la región que dimeriza y que sean naturalmente neutros. Para satisfacer este criterio, se realizó un alineamiento de las secuencias de aminoácidos con el fin de encontrar los candidatos por homología (Figura suplementaria 1), ya que se han descrito como semejantes tanto a nivel de secuencia como estructuralmente (Zoltowski y cols., 2007). Se encontraron como aminoácidos candidatos W16 y A19, y se procedió a realizar los cambios por los aminoácidos cargados utilizados en el sistema Magnet original sobre VVD, incluyendo un segundo ácido aspártico en vez de glicina (RR y DD) (Kawano y cols., 2015).

Mutagénesis sitio dirigida de aminoácidos puntuales

Una vez que se determinó los sitios a mutar en ambos dominios LOV, se procedió a realizar las modificaciones de aminoácidos según correspondiera (positivas o negativas) según los codones de *S. cerevisiae*, utilizando mutagénesis sitio dirigida mediante una reacción de PCR con el partidor adecuado por medio de extensión (Hoa y col, 1989), según el cambio de bases que provean el aminoácido de interés (Bennetzen y Hall, 1982). Las variantes de los plásmidos del sistema FUN-LOV generadas fueron secuenciadas para confirmar la presencia de la

mutación, y se asignó una nomenclatura simplificada (Figura 2): si poseen las mutaciones originales del sistema Magnet, denominadas con un simple signo positivo o negativo ($W+$ y $W-$, $V+$ y $V-$); o una de ambas mutaciones, denominadas como *Half Magnets* ($W_{1/2+}$ y $W_{1/2-}$, $V_{1/2+}$ y $V_{1/2-}$). La mutación en la segunda posición fue denominada “b” y añadida al final de cada clave. Cabe destacar que la variante $V_{1/2-b}$ no existe en el presente trabajo, debido a que la segunda mutación negativa del sistema Magnet original tuvo problemas estructurales de gran impacto en la función de VVD, por lo que los autores originales lo terminaron cambiando por glicina como control (Kawano y col, 2015). Así, no es de interés para la optimización de tipo magnética buscada utilizar dicha modificación en versión Half Magnet, y por lo tanto no se construyó dicha variante.

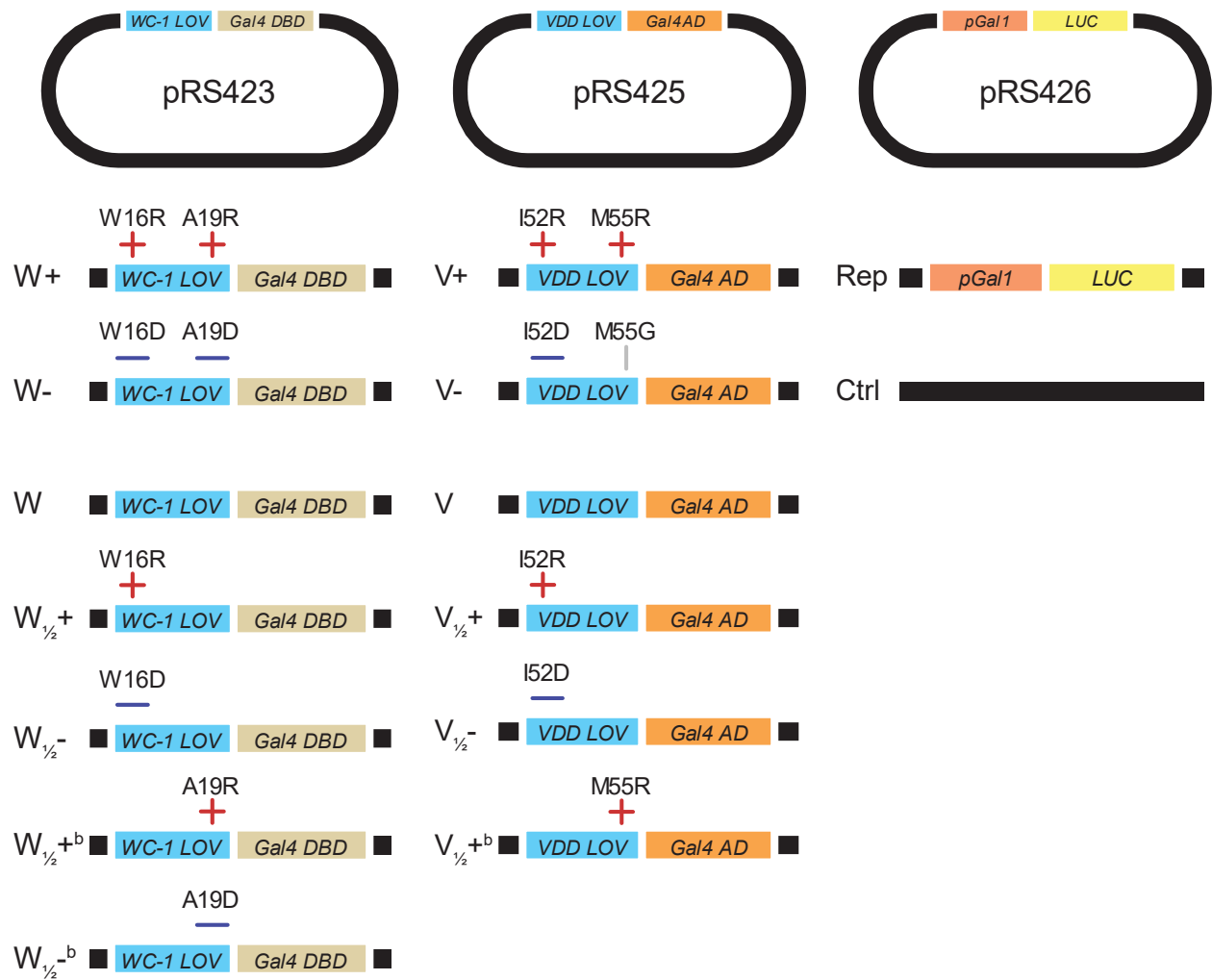


Figura 2. Esquema de claves utilizadas en este trabajo para cada una de las combinaciones de mutaciones en los plásmidos del sistema FUN-LOV Magnet. Se presentan mutaciones apropiadas en los aminoácidos W16 y A19 en WC-1 sobre pRS423; aminoácidos I52 y M55 para VDD sobre pRS425; y el plásmido con el gen reportero, y su control, el vector vacío pRS426. Las mutaciones están basadas en los interruptores Magnet originales.

Sistema FUN-LOV optimizado mediante Magnets

Para caracterizar el nuevo sistema generado, se transformó la cepa de levadura *BY4741* con la combinación de plásmidos que representarían los Magnet originales y homólogos: W+, W-, V+, V-, Rep y Ctrl (Figura 2) en todas sus permutaciones posibles; y se caracterizó mediante la inducción del gen reportero luciferasa, en condiciones de pulso de luz (PL) y oscuridad constante (DD) (Figura 3). Los resultados de esta caracterización pueden observarse en la Figura 3A y 3B, donde se concluye que sólo hay respuesta a luz de la transformante TLG4, que contiene W+ y V-. Esta señal no presenta diferencias significativas en su peak de luminiscencia a 9 horas en comparación a la obtenida por el sistema FUN-LOV original (Figura suplementaria 11A). Por su parte, la respuesta en luz constante (LL) es similar a la de pulso en el sentido de que actúa semejante al sistema original FUN-LOV (Figura suplementaria 2A).

En vista de la ausencia de respuesta de la mayoría de las transformantes generadas, se plantea que las modificaciones de aminoácidos podrían estar siendo perjudiciales para algunas de las partes del sistema FUN-LOV, por lo que se decide caracterizar permutaciones que contengan las variantes neutras originales W y V en conjunto con las variantes Magnet (Figura 3C y 3D). En este experimento se puede observar una respuesta al pulso de luz de las cepas TLG9 y TLG11, que contienen respectivamente las variantes W+ y W- en conjunto con V. Sin embargo, ambas variantes Magnet de VVD con W no tuvieron respuesta en PL. Además, TLG11 presenta una intensidad de señal superior al sistema FUN-LOV (~1,5 veces), mientras que TLG9 presenta una señal equivalente al original (Figura suplementaria 11B). Como punto adicional, la respuesta de estas variantes en LL sigue un patrón similar al de PL, pero se observan mucho menos pronunciadas las diferencias de intensidad (Figura suplementaria 2B).

Ambos resultados observados en la Figura 3 sugieren problemas de función de las modificaciones Magnet sobre VVD, ya que parecen afectar la funcionalidad del sistema, excepto en la transformante TLG4, donde una combinación que incluye V- funciona de manera

equivalente al sistema FUN-LOV original (Figura 3A). Sin embargo, no se aprecia ninguna optimización de tipo electrostática, y a su vez se destaca que TLG11 presente una intensidad de señal superior, pese a tener únicamente modificado el dominio WC-1^{LOV} con cargas negativas.

Finalmente, tanto para las transformantes conteniendo FUN-LOV con optimización Magnet original, así como aquellas que contenían las variantes neutras, no existe respuesta apreciable en las condiciones de oscuridad constante (Figura 3B y 4D). En las transformantes control, que no poseen el reportero, no se evidenció respuesta alguna en ninguna de las combinaciones (Figura suplementaria 7).

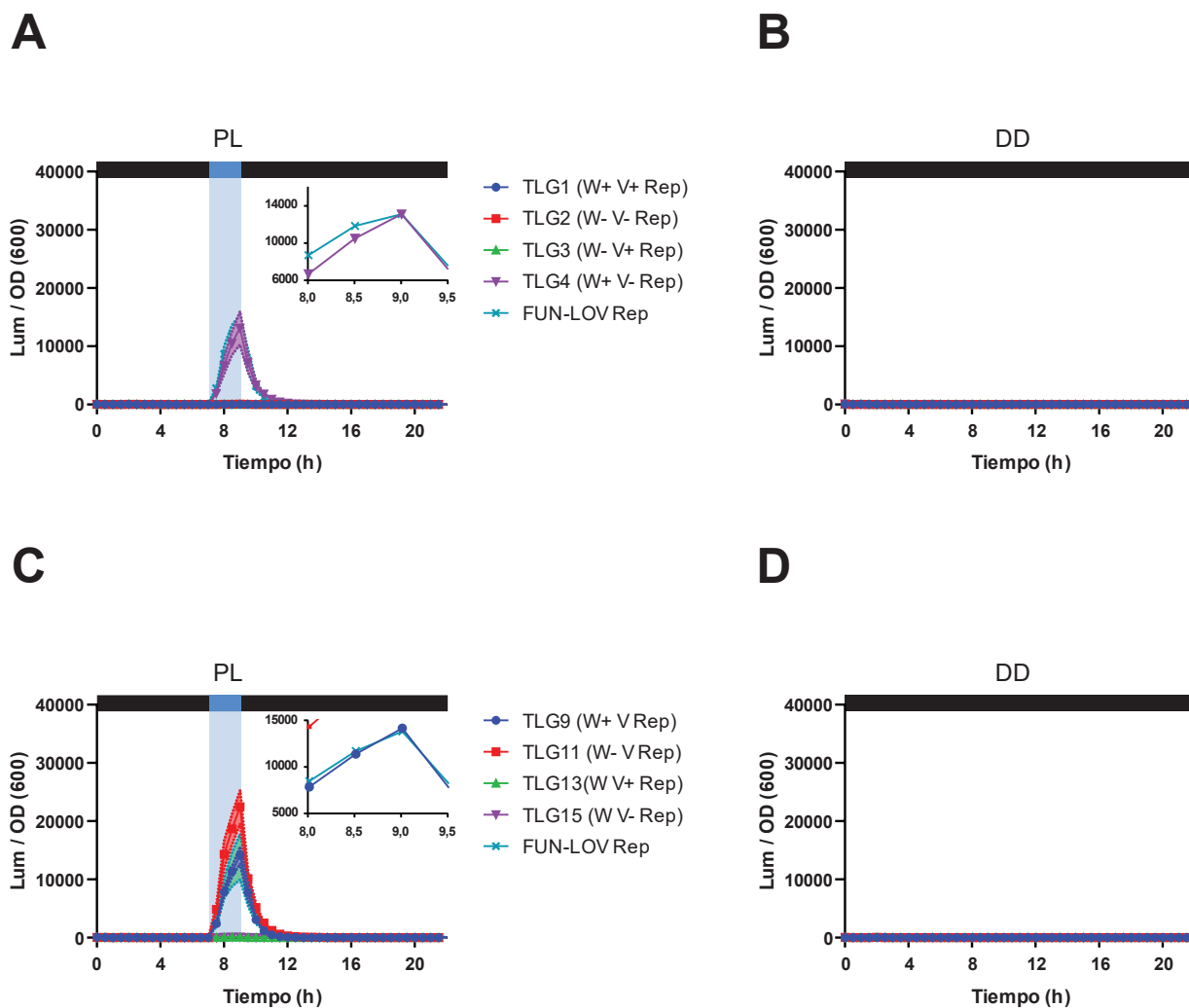


Figura 3. Caracterización del sistema FUN-LOV Magnet en respuesta a un pulso de luz. Se presentan gráficos de luminiscencia normalizada por densidad de crecimiento en **(A)** un pulso de luz azul de 2 horas luego de 7 horas de DD, destacado en una zona sombreada celeste (PL); y **(B)** oscuridad constante (DD), en ambos casos para un primer set de transformantes basados en los Magnet originales; **(C)** el mismo pulso de A; y **(D)** oscuridad constante, para otro set de transformantes considerando los plásmidos sin cambios.

Exploración de optimización por sistema de Half Magnets

Basándose en la caracterización obtenida del sistema Magnet en FUN-LOV, se procedió a explorar las variantes “Half” Magnet”, que consideran una de las dos mutaciones de aminoácidos de los Magnet originales, con fin de estudiar los efectos de las mutaciones unitarias tanto sobre la homodimerización de WC-1 así como su interacción con el dominio VVD y viceversa.

Combinaciones Half Magnet

En primer lugar, se exploraron las combinaciones de la primera mutación para ambos dominios LOV, $W_{1/2+}$, $W_{1/2-}$ (Figura 4A y 4B), $V_{1/2+}$ y $V_{1/2-}$ (Figura 4C y 4D) en combinación con las variantes Magnet anteriores ($W+$, $W-$, $V+$ y $V-$) y las versiones neutras (W y V). De estos resultados se puede observar que las variantes basadas en modificaciones sobre el dominio LOV de WC-1 tienen mejor probabilidad de respuesta en PL, teniendo señal 3 de las 6 combinaciones posibles (Figura 4A). A su vez, sólo 2 de las 6 combinaciones de las variantes basadas en VVD tuvieron una respuesta en condiciones de pulso de luz, la cual fue muy inferior al FUN-LOV original (Figura 4C). Esta información refuerza la idea de que las modificaciones a VVD disminuyen la eficiencia del sistema, mientras que las modificaciones a WC-1 pueden incluso mejorar la intensidad de respuesta (Figura suplementaria 11C y 11D). Además, las dos respuestas que fueron superiores a FUN-LOV fueron aquellas que utilizaban a VVD neutro, y la señal más alta obtenida corresponde a una modificación negativa de WC-1: $W_{1/2-}$, lo coincide con la optimización obtenida de TLG11, basada en $W-$. Por su parte, la respuesta a LL sigue patrones semejantes a las vistas en PL, donde destaca también la alta respuesta de TLG22 ($W_{1/2-} V$) (Figura suplementaria 3).

Combinaciones Half b Magnet

Siguiendo la exploración de variantes Half Magnet, se utilizaron combinaciones basadas en la segunda mutación de cada construcción, $W_{1/2+b}$, $W_{1/2-b}$ (Figura 5A y 6B) y $V_{1/2+b}$ (Figura 5C y 5D), en combinación con las variantes Magnet y neutras ($W+$, $W-$, $V+$, $V-$, W y V). De estos resultados, se observa que las mutantes de WC-1 presentan respuesta a luz en 2 de sus 6 combinaciones, mientras que las mutantes de VVD tienen respuesta a luz en todas sus combinaciones. Para ambos casos, existió una transformante cuyo nivel de respuesta fue muy superior al FUN-LOV original, siendo estas TLG48 ($W_{1/2b-}$ V) y TLG56 ($W-$ $V_{1/2+b}$) (Figura suplementaria 11E y 11F). Los patrones vistos en PL se repiten también en LL (Figura suplementaria 4).

Siguiendo la misma tendencia de los resultados anteriores, co-transformantes conteniendo VVD con ambas mutaciones no presentaron respuesta. A su vez, combinaciones conteniendo el dominio LOV de WC-1 con alguna modificación negativa presentaron un nivel de respuesta superior a FUN-LOV. Sin embargo, en esta ocasión las variantes de VVD $V_{1/2+b}$ presentan una respuesta considerable en contraste con cualquiera de las otras versiones mutadas de este dominio LOV, sugiriendo que esta mutación no provoca cambios tan críticos en su dinámica de interacción proteína-proteína como lo hacen modificaciones en el primer sitio (I52).

Combinaciones Half Magnet entre sí mismas

Para abordar todas las posibles permutaciones de las variantes Magnet, se caracterizó la respuesta de transformantes basadas en combinaciones de los Half Magnet entre ellos: $W_{1/2+}$, $W_{1/2-}$, $W_{1/2+b}$, $W_{1/2-b}$, $V_{1/2+}$, $V_{1/2-}$ y $V_{1/2b}$. Estos resultados se pueden observar en la Figura 6.

De estas combinaciones, se observa la tendencia de baja o nula respuesta en PL si VVD está cargado, salvo las variaciones $V_{1/2+b}$. A su vez, versiones negativas de WC-1 presentaron

tanto señales apreciables en respuesta en luz al estar combinadas con $V_{1/2+}$, así como señales superiores a FUN-LOV al estar en conjunto con $V_{1/2+b}$ (Figura suplementaria 11G y 11H). Por su parte, los resultados de LL siguen los patrones vistos en todos los casos de PL (Figura suplementaria 5 y suplementaria 6).

De todas las permutaciones realizadas, es de esperar que ninguna de las condiciones DD obtuvo un nivel de respuesta observable (Figura 4B, 4D, 5B, 5D, 6B, 6D y 6F). A su vez, los controles negativos que contienen el vector vacío tampoco tienen respuesta (Figura suplementaria 8, suplementaria 9 y suplementaria 10).

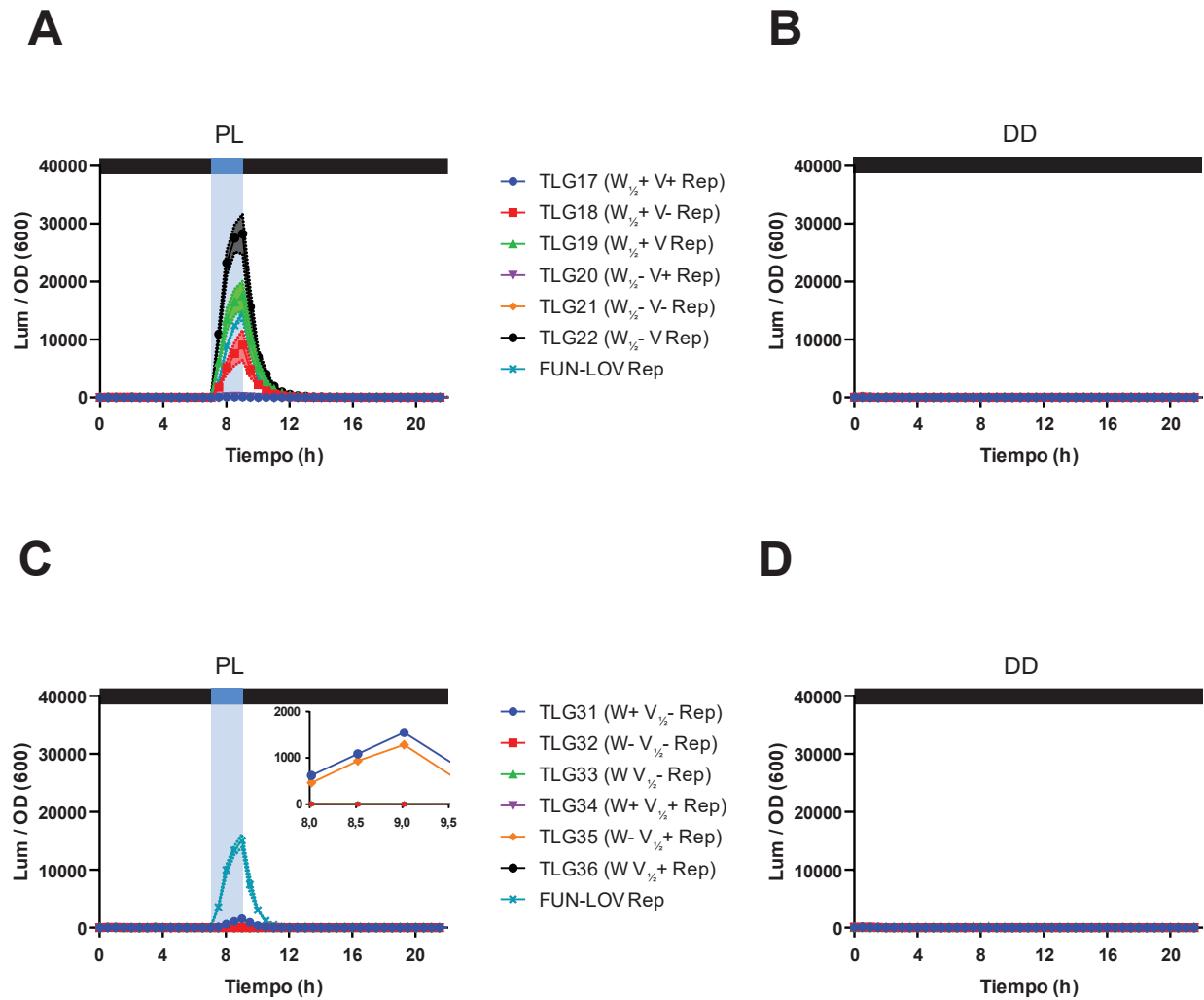


Figura 4. Caracterización del sistema FUN-LOV “Half” Magnet en respuesta a un pulso de luz. Se presentan gráficos de luminiscencia normalizada por densidad de crecimiento en (A) condiciones de pulso de luz; y (B) oscuridad constante, en ambos para un set de transformantes tomando la primera mutación sobre W16 en WC-1, tanto positiva como negativa con todas sus permutaciones contra VVD; (C) el mismo pulso de A; y (D) oscuridad constante, para otro set de transformantes basados en la primera mutación I52 en VVD, positiva y negativa con todas sus permutaciones contra WC-1.

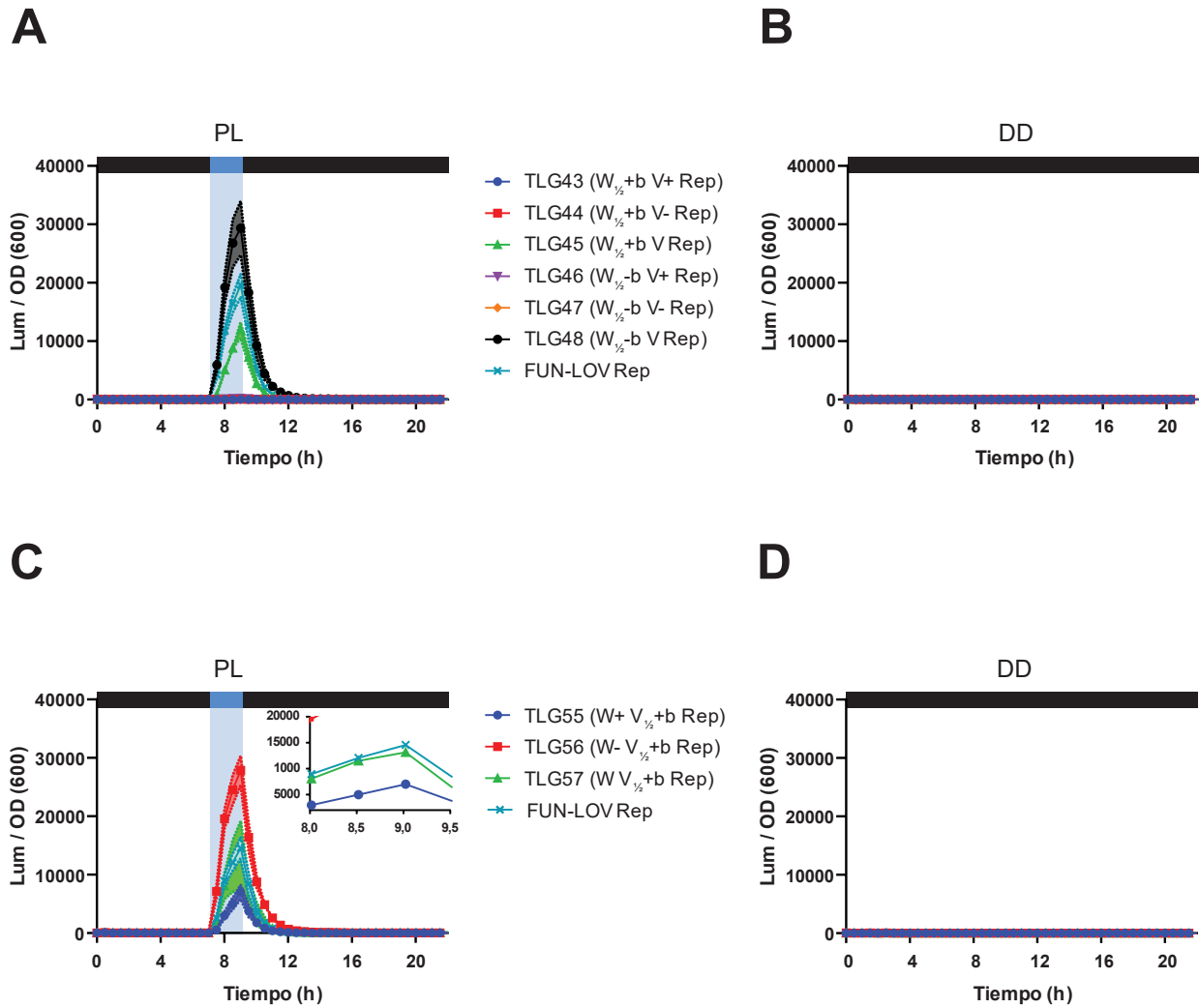


Figura 5. Caracterización del sistema FUN-LOV “Half b” Magnet en respuesta a un pulso de luz. Se presentan gráficos de luminiscencia normalizada por densidad de crecimiento en (A) condiciones de pulso de luz; y (B) oscuridad constante, en ambos para un set de transformantes tomando la segunda mutación sobre A19 en WC-1, tanto positiva como negativa con todas sus permutaciones contra VVD; (C) el mismo pulso de A; y (D) oscuridad constante, para otro set de transformantes basados en la segunda mutación M55 en VVD, positiva y negativa con todas sus permutaciones contra WC-1.

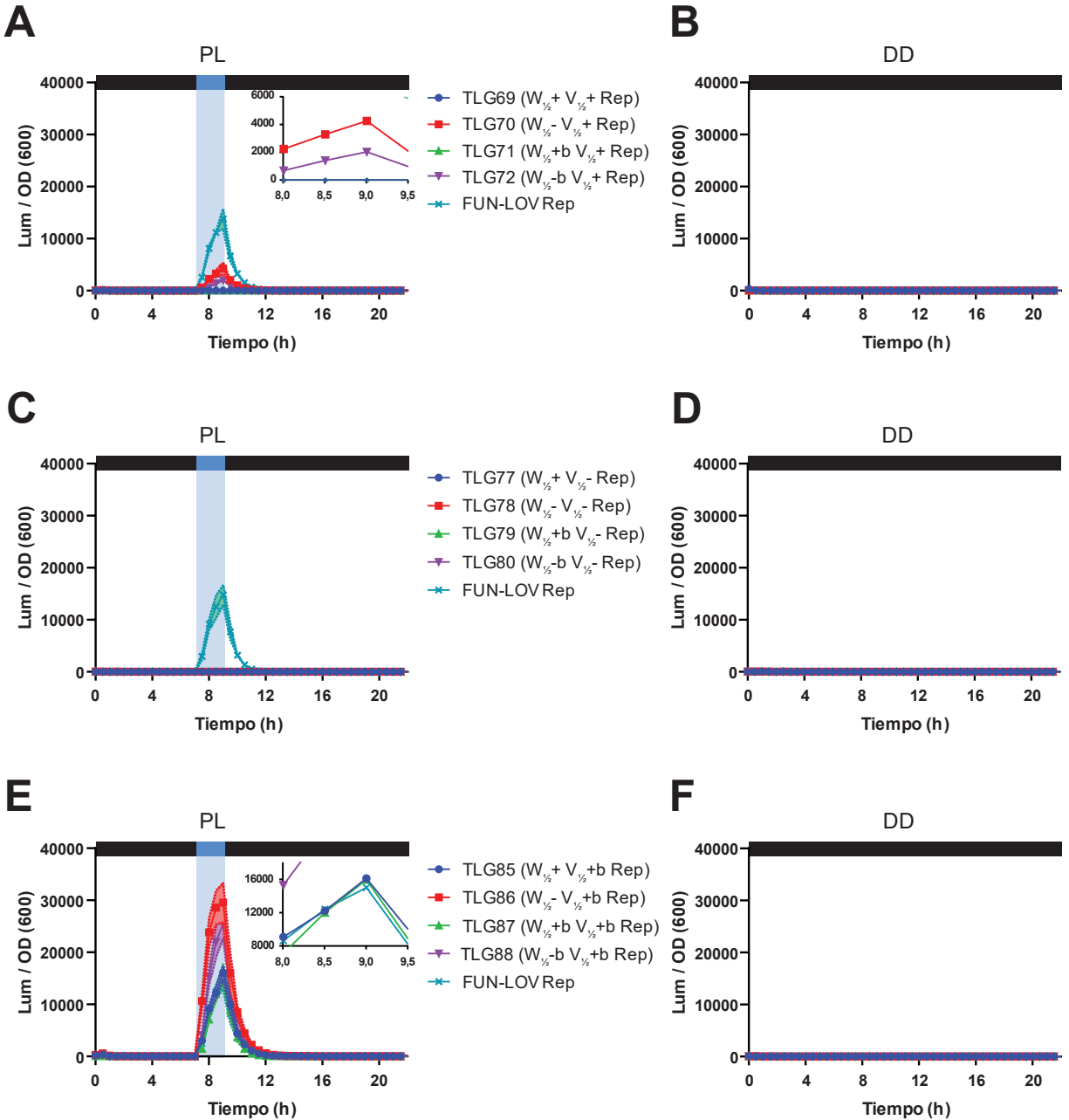


Figura 6. Caracterización del sistema FUN-LOV Magnet en respuesta a un pulso de luz, entre permutaciones de las variantes “Half” y “Half b”. Se presentan gráficos de luminiscencia normalizada por densidad de crecimiento en condiciones de pulso de luz y oscuridad constante, para (**A, B**) grupo de permutaciones basados en $V_{1/2}+$ contra Half Magnets de WC-1; (**C, D**) grupo de permutaciones basados en $V_{1/2}-$ contra Half Magnets de WC-1; (**E, F**) grupo de permutaciones basados en $V_{1/2}+b$ contra Half Magnets de WC-1.

Comparación de las respuestas de combinaciones Magnet

Si bien ninguna de las combinaciones Magnet sobre FUN-LOV presentó un nivel de optimización relacionado a la duración del tiempo de respuesta como ocurría en el sistema Magnet original (Kawano y cols., 2015), sí se presentaron variaciones en el nivel de respuesta al pulso de luz para algunas combinaciones, llegando a ser sustancialmente superiores que las del sistema original.

Con el fin de realizar un análisis comparativo entre estas combinaciones, se hizo una comparación de intensidades de señal a las 9 horas de experimento de la condición de pulso de luz, contrastando el nivel obtenido de cada transformante con la luminiscencia del sistema original FUN-LOV control en su respectiva placa (Figura 7). Este gráfico organiza la información de menor a mayor promedio de intensidad, enfocándose únicamente en combinaciones cuya respuesta fuera mayor a un 10% de señal del sistema FUN-LOV original.

De esta información, es posible distinguir ciertas tendencias entre las variantes y sus combinaciones. Como se mencionó, variantes cargadas de VVD^{LOV} presentaron niveles de respuesta equivalentes o inferiores a FUN-LOV, con excepción de las variantes $V_{1/2}+b$. Estas últimas presentaron un nivel semejante o superior a FUN-LOV, con excepción de la transformante TLG55 ($W+ V_{1/2}+b$), que presentó un nivel bastante inferior. Por su lado, las modificaciones –por sobre todo negativas– de $WC-1^{LOV}$ entregaron altos niveles de señal, llegando a casi el doble de respuesta con respecto a FUN-LOV. Excepciones a esta observación son combinaciones con VVD cargadas, que de por sí ya presentan bajo nivel de respuesta.

Cabe destacar que las transformantes TLG18 y TLG4 son la únicas que presentan la doble mutación en VVD^{LOV} . Así mismo, junto con TLG31 ($W+ V_{1/2}-$) son las únicas variantes que tienen respuesta apreciable, aunque su comportamiento no presenta un patrón claro.

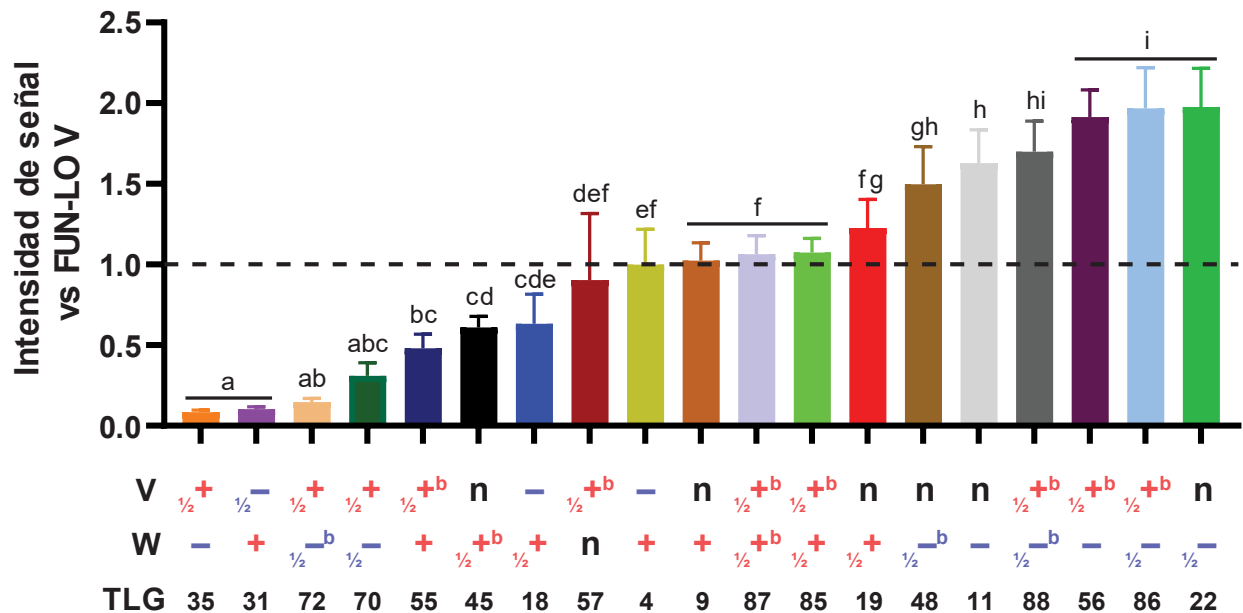


Figura 7. Gráfico de barras de cepas seleccionadas según intensidad de respuesta. Se presenta un gráfico basado en la intensidad de señal de cada cepa en condiciones de pulso de luz contra el control de FUN-LOV de su misma placa. Se seleccionaron las co-transformantes cuya señal fuera mayor al 10% de la señal de FUN-LOV, y se ordenaron según el promedio de las intensidades. Una línea punteada señala que la intensidad de señal es equivalente a la del sistema original. Las letras sobre las barras indican diferencias de significancia basándose en la prueba de Tukey a P=0,005. Abajo se muestran las variantes para cada parte del sistema, destacando aquellas positivas con rojo, negativas con azul y rotulando cada una según el código del trabajo.

Análisis estructural del doble híbrido en FUN-LOV Magnet

De las mutaciones presentadas en el sistema original Magnet, se puede inferir que el comportamiento no es semejante en aplicación al sistema FUN-LOV, primero presentando problemas en las variantes cargadas de VVD, que en su mayoría imposibilitan el funcionamiento del sistema, así como también posibles problemas asociados a la estructura de doble híbrido que se forma en el interruptor (Hong y cols., 2008). Sobre este último punto, existe la posibilidad de que el sistema pierda robustez al introducir mutaciones sobre WC-1, ya que, al presentar cargas iguales en todos los casos, su repulsión electrostática podría provocar un cambio conformacional lo suficientemente grande como para interferir la unión al ADN o, en caso de las optimizaciones halladas, mejorar la estructura multimérica que se forme. Para estudiar de mejor manera esta teorización se aplicaron predicciones de la herramienta AlphaFold (Jumper y cols., 2021), que utiliza la estructura conservada de dominios de bases de datos y lo combina con inteligencia artificial para calcular y modelar la estructura terciaria (Zhang y cols., 2021).

Con el fin de tener una clara imagen cualitativa de la estructura multimérica del doble híbrido en FUN-LOV y sus variaciones, las predicciones obtenidas de AlphaFold se alinearon con la estructura cristalográfica del homodímero del dominio de unión a ADN de Gal4 (Figura 8A). En las predicciones se marcaron en los aminoácidos W16 y A19 con color Magenta, con el fin de poder observar con claridad como resultan las interacciones en el multímero (Figura 8B). Estas estructuras analizadas fueron aquellas relacionadas al dominio de unión a ADN de GAL4 y WC-1^{LOV}.

Cabe destacar que AlphaFold modela estructura basándose en información de bases de datos de cristalografía e inteligencia artificial, por lo que los modelos de WC-1 podrían ser aquellos en presencia de luz, y que por ende están formando el fotoaducto y no aquellas en condiciones de oscuridad.

Homodímeros de Magnets originales

De las predicciones obtenidas, se puede observar con claridad que los dominios LOV de WC-1 dejan de interactuar entre sí cuando se encuentran cargados (Figura 9B y 9C). Sin embargo, los dominios de unión a ADN mantienen su interacción, y es posible que tengan incluso una mejor estabilidad con respecto a FUN-LOV, que presenta una ligera torsión con respecto a la cristalografía (Figura 9 A). Por lo demás, las nuevas formas que adquieren los dominios LOV no son equivalentes entre $W+$ y $W-$, aunque es difícil determinar con certeza los efectos que traen estos cambios sobre el sistema, así como el contraste entre ellos más allá de la comparación con FUN-LOV original.

Homodímeros de Half Magnets

De semejante manera, los homodímeros de las variantes Half Magnet se separaron en comparación con FUN-LOV (Figura 10B, 11C, y 12C). Sin embargo, $W_{1/2+b}$ presentó los dominios unidos de una forma similar a FUN-LOV, salvo que la orientación es distinta (Figura 11B). Acompañado por los resultados, no se explica que este tipo de comportamiento pueda optimizar la intensidad de señal de alguna manera, ya que las transformantes conteniendo $W_{1/2+b}$ tienen una respuesta semejante o menor a FUN-LOV (Figura 7).

A su vez, es difícil identificar cambios estructurales discernibles para las variantes más intensas, como lo son $W-$, $W_{1/2-}$ y $W_{1/2-b}$, salvo que $W_{1/2-}$ presenta una estructura más relajada, que también se observa en parte en $W_{1/2-b}$. No obstante, estas observaciones son cualitativas y no son suficientes para identificar un patrón. Además, se puede destacar que pese a estar separados, $W_{1/2-}$ y $W_{1/2-b}$ otorgan un gran aumento en la intensidad de respuesta, lo que indica que esta forma abierta podría traer beneficios al sistema, que incluso se podrían abstraer a interruptores de doble híbrido como tal.

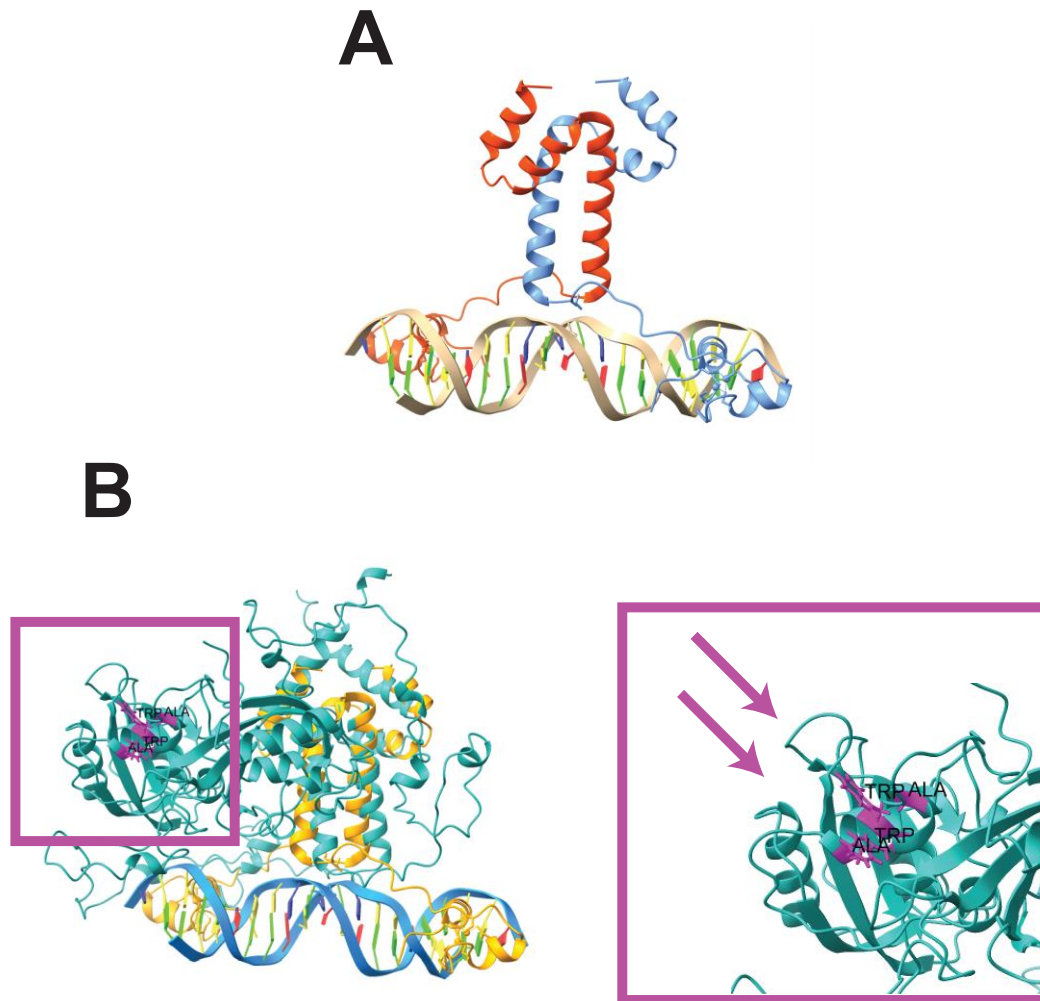


Figura 8. Modelos de estructura terciaria a utilizar comparativamente. Para comparar de forma más certera las predicciones del programa AlphaFold entre sí, se utiliza un **(A)** modelo de la estructura cristalizada del homodímero de Gal4-DBD. **(B)** Esta estructura se alinea contra la predicción del componente WC-1^{LOV}-GAL4 DBD del sistema FUN-LOV, donde además se destacan en púrpura los aminoácidos que son modificados en las variantes Magnet.

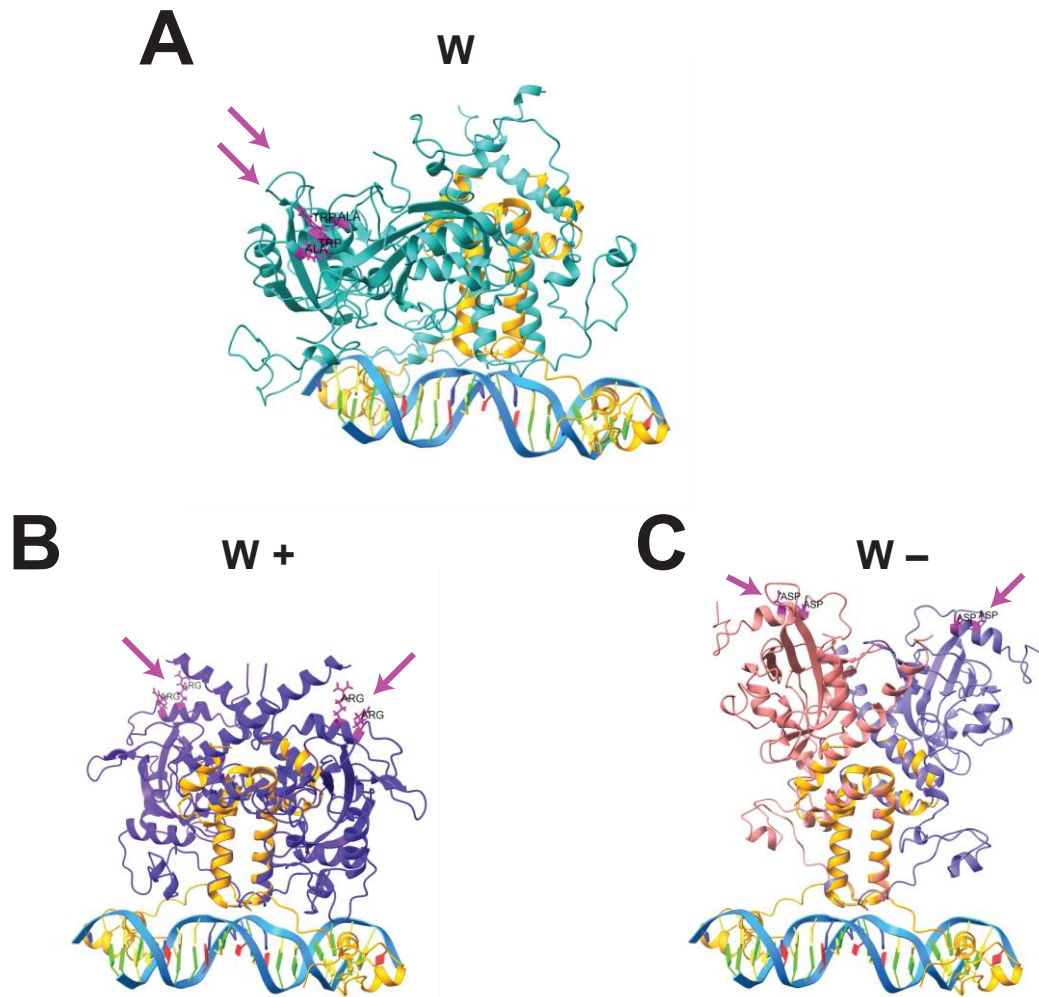


Figura 9. Alineamientos de Magnets originales comparados con sistema FUN-LOV. Se presenta una comparación de alineamientos de los modelos predichos con AlphaFold, donde (A) es componente WC-1^{LOV}-GAL4 DBD del FUN-LOV para comparación; (B) es el homodímero de W+, y (C) homodímero de W-.

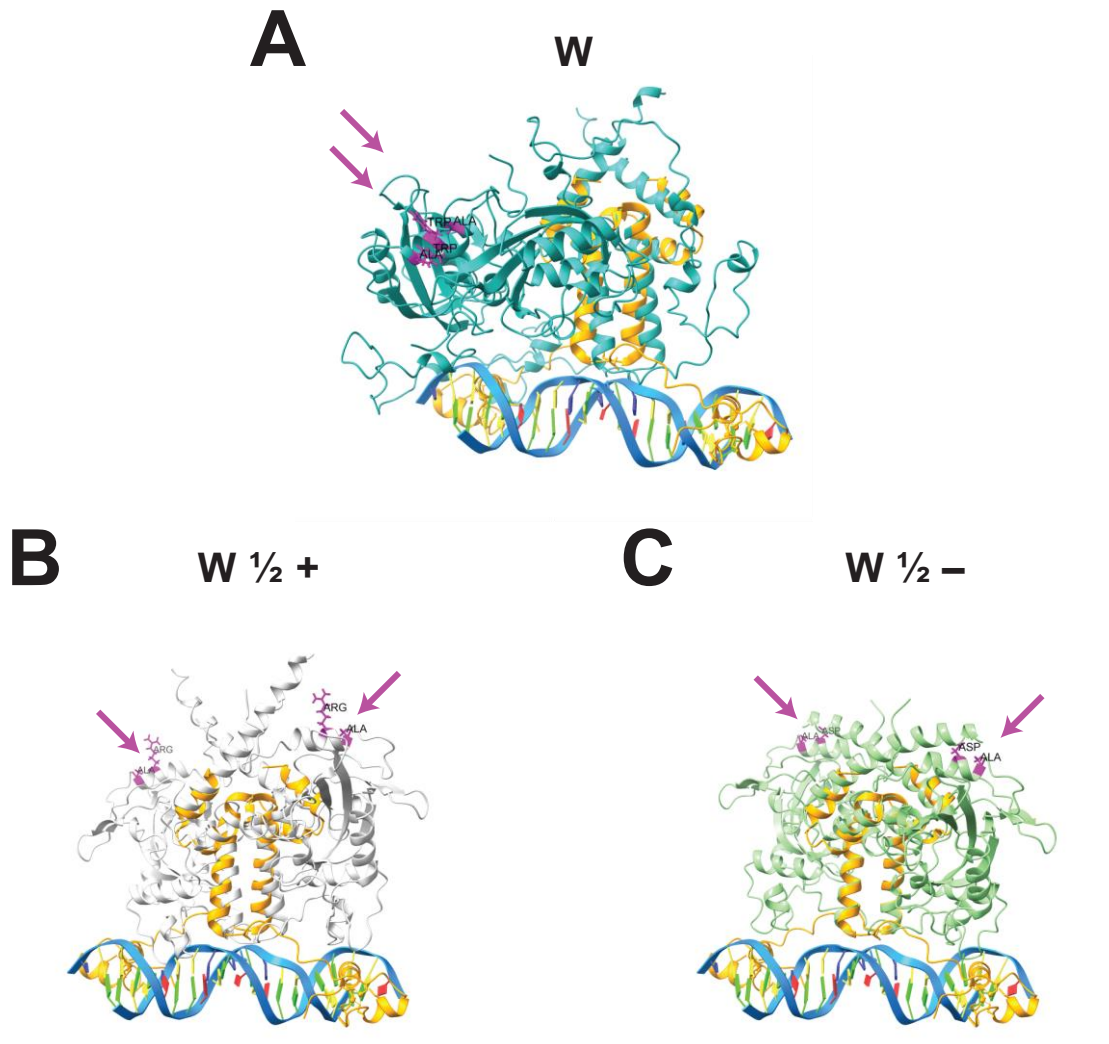


Figura 10. Alineamientos de Half Magnets comparados con sistema FUN-LOV. Se presenta una comparación de alineamientos de los modelos predichos con AlphaFold, donde **(A)** es componente WC-1^{LOV}-GAL4 DBD del FUN-LOV para comparación; **(B)** es el homodímero de W_{1/2+}, **(C)** homodímero de W_{1/2-}.

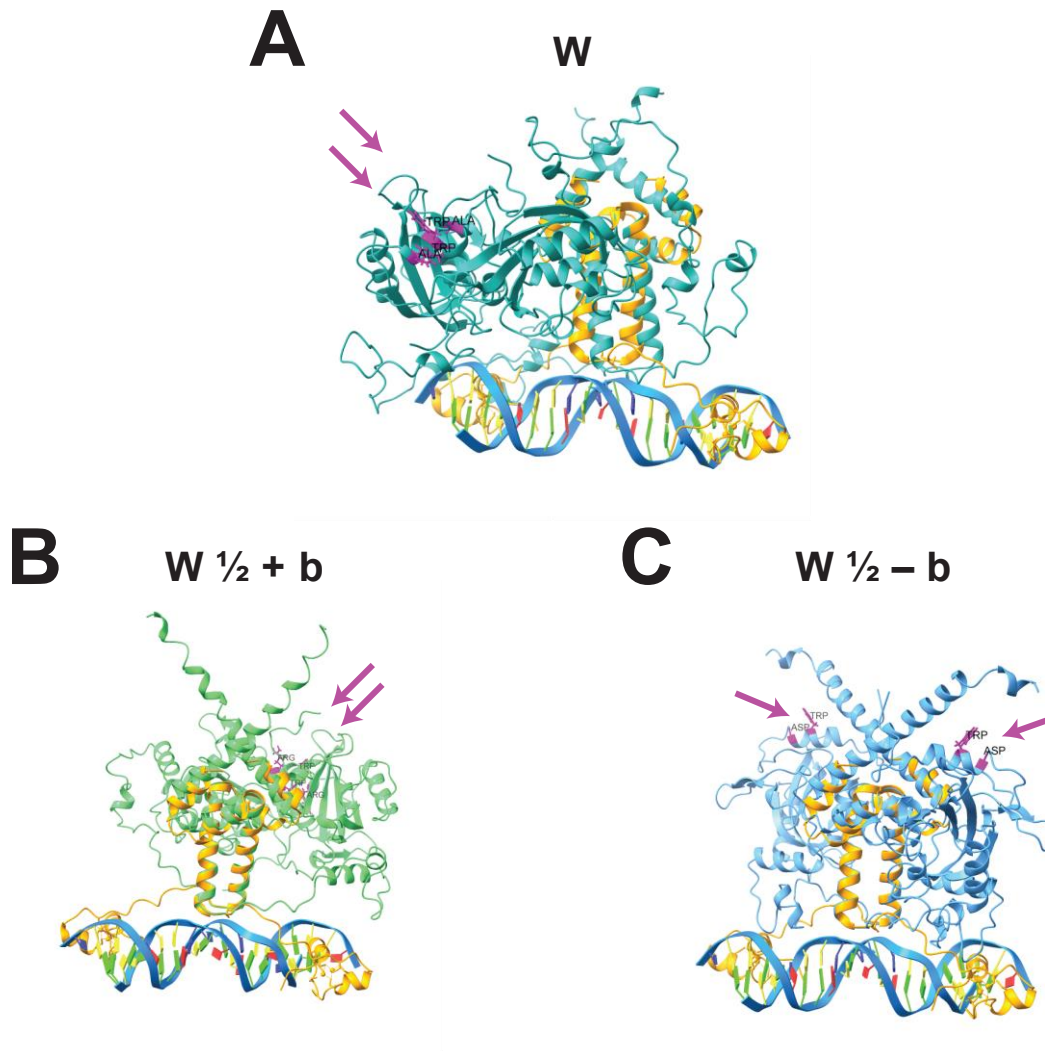


Figura 11. Alineamientos de Half Magnets “b” comparados con sistema FUN-LOV. Se presenta una comparación de alineamientos de los modelos predichos con AlphaFold, donde **(A)** es componente WC-1^{LOV}-GAL4 DBD del FUN-LOV para comparación; **(B)** es el homodímero de $W_{1/2+b}$, **(C)** homodímero de $W_{1/2-b}$.

Comparación de valores RMSD e Intensidad de señal

Con el fin de lograr una comparación más próxima a lo cuantitativo, se utilizaron los valores de desviación cuadrática media del alineamiento, o RMSD (*Root-Mean-Square Deviation*) de las variantes Magnet (Figuras 10, 11 y 12), así como también el porcentaje de aminoácidos en la misma posición, en comparación con el nivel de intensidad de respuesta frente a FUN-LOV, para el dominio WC-1. Esta comparación se realizó además usando como pareja la variante V (neutra), con el fin de observar optimizaciones intrínsecas en el sistema (Tabla III).

De la tabla, se puede destacar que el valor RMSD no se condice con una mejora en el nivel de respuesta, ya que los valores más bajos de RMSD representan una menor distancia en el alineamiento, y el valor más bajo de la tabla no corresponde con el más alto de intensidad. Así también, los valores altos de señal no presentan un patrón distinguible con su RMSD.

No obstante, sí existe un patrón asociado al porcentaje de aminoácidos alineados, teniendo aquellos con mayor correlación una mayor intensidad de respuesta, así como también el menor porcentaje presenta una respuesta inferior. Este comportamiento es destacable debido a que, en los alineamientos, aquellas variantes con mejor respuesta ($W_{1/2-}$ y $W_{1/2-b}$) se encontraban en un importante distanciamiento espacial con respecto al componente original del FUN-LOV (Figura 10C y 12C). Es posible que los aminoácidos reemplazados por otros negativos alteren la estructura de FUN-LOV lo suficiente como para lograr una optimización, pero el resto de la estructura tridimensional mantenga su integridad en estas variantes de mayor intensidad.

TABLA III. Comparación de RMSD, porcentaje de aminoácidos alineados e intensidad de respuesta contra FUN-LOV.

	W+	W-	W _{1/2+}	W _{1/2-}	W _{1/2+b}	W _{1/2-b}
RMSD (Å)	0,392	0,477	0,407	0,388	0,279	0,365
AA %	55,427	51,181	59,132	73,940	47,816	64,198
Intensidad	0,937	1,094	1,352	2,108	0,723	1,559

La tabla muestra los valores de RMSD en Å, el porcentaje de aminoácidos alineados entre las estructuras, y la intensidad de luminiscencia obtenida en la caracterizaciones a 9h de condición pulso con respecto al control. Estos valores fueron usados únicamente en las combinaciones que contenían VVD neutro (V), con el fin de precisar en los cambios comparativos mostrados en los alineamientos de AlphaFold.

DISCUSIÓN

FUN-LOV se presenta como un interruptor optogenético de gran intensidad de respuesta, excelente resolución temporal y bajo nivel basal de ruido, lo que lo hace una herramienta de óptimo uso (Salinas y cols., 2018). Este sistema es más específico que otros basados en reconstitución de función a partir de proteínas cortadas, ya que dos fragmentos iguales podrían interactuar, perdiendo señal entre el abanico de uniones posibles para dichos sistemas (Kawano y cols., 2015). El sistema Magnet surge como una respuesta a estos problemas, permitiendo su optimización al entregar selectividad a los dominios LOV del sistema. Sin embargo, el trabajo original de Kawano entrega un nivel de optimización con cambios no asociados a la optimización electrostática originalmente planteada, ya que se utilizan modificaciones de VVD conocidas por sus cinéticas de apagado. Así, no se demuestran los alcances de la optimización electrostática Magnet, y se plantean dudas en si es posible analogar el sistema a otros basados en fotorreceptores que contengan dominios LOV.

Por su parte, el sistema de doble híbrido permite una especificidad mayor debido a su naturaleza de dos partes (Fields y Song, 1989), pero a su vez no está exento del problema de auto-dimerización donde componentes del sistema podrían estar temporalmente “secuestradas” al poder unirse entre sí. Este es el caso de FUN-LOV, donde existe la posibilidad que se den interacciones tipo VVD-VVD, WC-1-WC-1 y WC-1-VVD. Es por eso que este trabajo busca modificar FUN-LOV con la estrategia Magnet, para proporcionar un nivel de optimización frente a este problema de homodimerización.

En el caso del sistema Magnet original y homólogos aplicados a FUN-LOV (dobles mutantes), en su caracterización no se obtuvo ninguna optimización apreciable e incluso se desactivo por completo el funcionamiento del sistema, sobre todo al considerar las variantes de VVD. Luego de varias exploraciones utilizando los Half Magnets, se pudo denotar que el

fenómeno de interacción electrostática buscado entre aminoácidos con cargas parciales está ausente, teniendo mejoras en su respuesta transformantes cuya combinación incluía elementos neutros.

Variaciones Magnet del dominio LOV de VVD demostraron ser ineficientes, teniendo únicamente una buena respuesta la variante $V_{1/2+b}$, que, en contraste con su versión neutra, optimizó algunas de las combinaciones con mayor intensidad de respuesta. $V_{1/2+b}$, considerando su respuesta *in vivo*, puede tener una dinámica semejante a la de VVD original neutra y algún nivel de interacción posiblemente electrostática, pero el alcance de esta modificación es desconocido, más aún sin poder visualizar el modelo completo de la interacción *in silico*.

Como conjunto de combinaciones (Figura 7), se destaca que las modificaciones negativas, basadas en ácido aspártico (D), se presentan como optimizaciones al sistema FUN-LOV sobre el dominio LOV de WC-1, al menos basándose en lo que la caracterización *in vivo* presenta en su condición de pulso.

Sobre este último punto, AlphaFold permite arrojar luces sobre lo que podría estar ocurriendo con un gran nivel de certeza (Jumper y cols., 2021). En los modelamientos presentes en las Figuras 9 y 10, se puede observar que sólo un par de modificaciones en la secuencia de aminoácidos llevo a los dominios LOV a separarse, en contraste con su forma unida presente en FUN-LOV original. Esto demuestra que cumplen un rol crucial en la interacción de los dominios LOV, pero a su vez que la naturaleza del reemplazo puede tener un alto impacto en su interacción con VVD, sobre todo si la modificación es negativa. Además, la naturaleza de porqué la carga neta es relevante se desconoce, pero se puede teorizar que tiene relación con los puentes salinos y la distancia a la que se forman (Kumar y Nussinov, 2002). Estos puentes salinos pueden formarse tanto entre los residuos de la proteína como con el medio circundante, provocando

volúmenes moleculares diferentes a los que naturalmente se forman en los bolsillos de las interacciones proteína-proteína (Zeng y cols., 2015).

Conformacionalmente hablando, en su estructura multimérica con VVD, la forma original de FUN-LOV presenta los dominios LOV de WC-1 interactuando entre sí, sea por razón del pulso de luz así como intrínsecamente debido al homodímero de Gal4, que interactuará independiente de la condición de iluminación en que se encuentre (Figura 12). Se desconoce si en condiciones de luz VVD se acopla directamente a este complejo, o si se tiene que provocar un cambio conformacional adicional para interactuar en el complejo de homodímeros. Es posible que bajo esta premisa, la conformación “abierta” de parte de los LOV de WC-1 favorezcan energéticamente la unión con VVD, ya sea por la disponibilidad de su región interactuante, así como también por su proximidad espacial a esta conformación. Incluso, es posible que el complejo optimizado con Magnets análogos en WC-1 pueda unir más de una quimera de VVD^{LOV}-GAL4-AD, y que esto provoque un aumento de hasta 2 veces más inducción (Tabla III). Un modelamiento completo de tanto las variantes magnéticas de VVD^{LOV}, así como también del complejo FUN-LOV original y optimizado podría entregar con exactitud la respuesta de por qué la variante abierta tiene mayor respuesta.

Con respecto a la interacción electrostática buscada tanto en el artículo original de Kawano como en este trabajo, queda poco claro que exista suficiente atracción o repulsión para generar la optimización, o si los puentes salinos que se forman entre los residuos tengan mayor fortaleza que aquellos con el medio. En el caso del trabajo original de los Magnets, dos dominios VVD se utilizaron y si bien se logró una respuesta equivalente a VVD sin modificar, las reales optimizaciones surgieron al cambiar aminoácidos de VVD por otros ampliamente descritos (Kawano y cols., 2015) que optimizan el fotociclo de VVD. Por lo demás, en este trabajo se hizo una homología para encontrar aminoácidos que respondieran las características presentes en VVD^{LOV} sobre WC-1. Pese a esto, en el trabajo original se realizó una búsqueda extensiva para

el reemplazo de aminoácidos, por lo que la comparación es escasamente cercana a lo que se requería. Sin embargo, se puede destacar la presencia de optimización por otras razones, por lo que la región catalítica tiene dependencia de los aminoácidos seleccionados.

Una propuesta interesante de optimización adicional para el sistema FUN-LOV podría ser una investigación semejante a la que se hizo en el trabajo de Kawano sobre la región *N-cap* (Kawano y cols., 2015) pero sobre WC-1, y denotar su interacción con el dominio LOV de VVD. Así también, realizar predicción de estructura utilizando AlphaFold podría dar indicios de cómo funciona este proceso, y con más información de otras optimizaciones a nivel de aminoácido podría llegarse a un protocolo *in silico* de optimización de interfaces proteína-proteína, prediciendo los cambios entre las proteínas con su estructura terciaria, así también como a nivel de multímero. Sin embargo, se desconoce hasta qué punto la organización tridimensional que provee AlphaFold se relaciona a la eficiencia energética que pueda existir en dichas interfaces, así como también en cómo afecta esto sus interacciones, por lo que parámetros adicionales podría hacer falta para fortalecer las técnicas *in silico* con AlphaFold.

También y como punto adicional, no se exploró en este trabajo el alcance que puede poseer la secuencia *linker* de FUN-LOV sobre sus posibles interacciones en el sistema optimizado con Magnets. Considerando el aspecto de cambio de aminoácidos y los efectos sobre la estructura que existieron en este trabajo, es posible que un linker más largo que el de FUN-LOV, que únicamente es de 2 aminoácidos, podría mitigar los efectos de repulsión entre los dominios LOV de WC-1, así como también incrementar las posibles conformaciones multiméricas que pueda tener con VVD, de esta manera disminuyendo la energía que requiera esta última para interactuar en el sistema. Simulaciones en AlphaFold podrían entregar una respuesta a esta proyección, y alineamientos podrían demostrar la efectividad de estas alteraciones al sistema original.

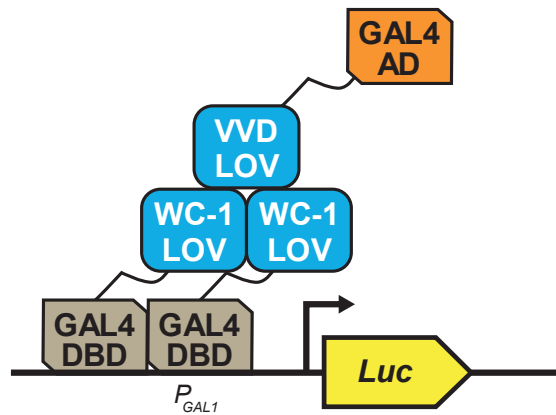


Figura 12. Representación del sistema FUN-LOV original considerando el homodímero GAL4-DBD-WC-1 LOV. El sistema FUN-LOV se ha presentado como un modelo de doble híbrido (Y2H) por tener dos partes que interactúan en el sistema. Sin embargo, originalmente el sistema posee un homodímero de Gal4 DBD, que a su vez tiene el homodímero de WC-1, lo que podría atribuir varias propiedades a este sistema.

CONCLUSIONES

Las variantes por sobre todo negativas de WC-1 presentan una optimización de señal en el sistema FUN-LOV aún sin tener un emparejamiento de importancia electrostática con VVD. Por su parte, VVD con modificaciones de aminoácidos pierde gran parte de su función en el sistema, exceptuando la variante $V_{1/2+b}$, que presento una respuesta semejante a VVD original. Esto demuestra que las modificaciones sí generan optimización, según la hipótesis, pero únicamente en las modificaciones a WC-1.

En general, no se observó un efecto electrostático relevante como el del sistema Magnet original con ninguna de las combinaciones, y aunque se pueden observar patrones en las distintas respuestas no puede relacionarse a un efecto neto de interacciones electrostáticas entre WC-1 y VVD modificados.

Además, las herramientas computacionales como AlphaFold se presentan como métodos para cuestionarse la factibilidad de modificaciones a proteínas y su arquitectura, así como también para comprender la mecánica estructural que puede estar aconteciendo y que suele ser desconocida, como es el caso de las interacciones entre los dominios LOV de WC-1 y su interacción basada en la homodimerización de GAL4-DBD.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

```

VVD      1                               50
          MSHTVNSSTMNPWEVEAYQQYHYDPRTAPTANPLFFHTLYAPGGYDIMGY
WC-1     -----KSIYSKSGFDMLRA
.....

VVD      51                               100
          LIQIMNRPNPQVELGPDVDTSCALILCDLKQKDTPIVYASEAFLYMTGYSN
WC-1     LWYVARSRKDPKLLGAVDMSCAFVVCVTLNDCPIIYVSDNFQNLTGYSR
.....

VVD      101                             150
          AEVLGRNCRFLQSPDGMVKPKSTRKYVDSNTINTMRKAIDRNAEVQVEVV
WC-1     HEIVGRNCRFLQAPDGNVEAGTKREFVENNAVYTLKKTIAEGQEIQQSLI
.....

VVD      151                             200
          NFKKNGQRFVNFLTMIIPVRDETGEYRYSMGFQCETE-----
WC-1     NYRKGKGPFLNLLTMIPIPWDTEEIRYFIGFQIDLVECPDAIIGQENG
.....

VVD      201  208
          -----
WC-1     MQVNYTHS
.....

```

Figura suplementaria 1. Alineación de secuencias de aminoácidos entre VVD y WC-1. Se presenta el alineamiento de secuencias de WC-1 contra la secuencia de VVD. Se destacan en rojo los aminoácidos utilizados en el sistema Magnet original.

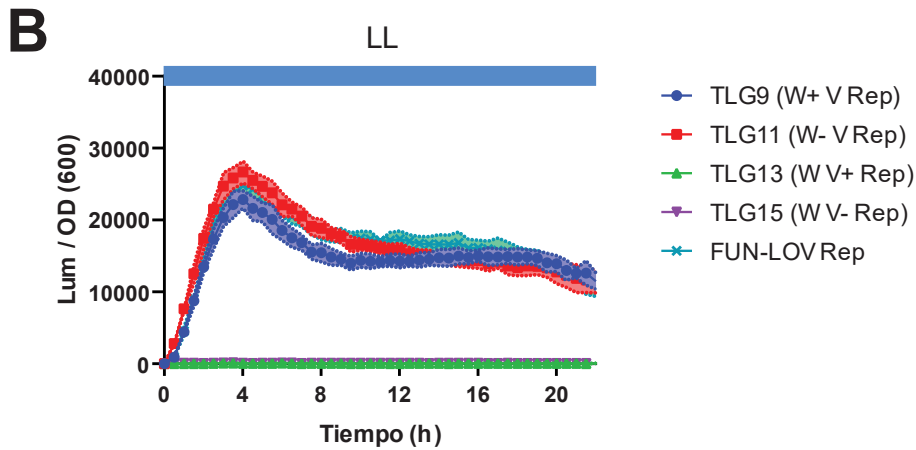
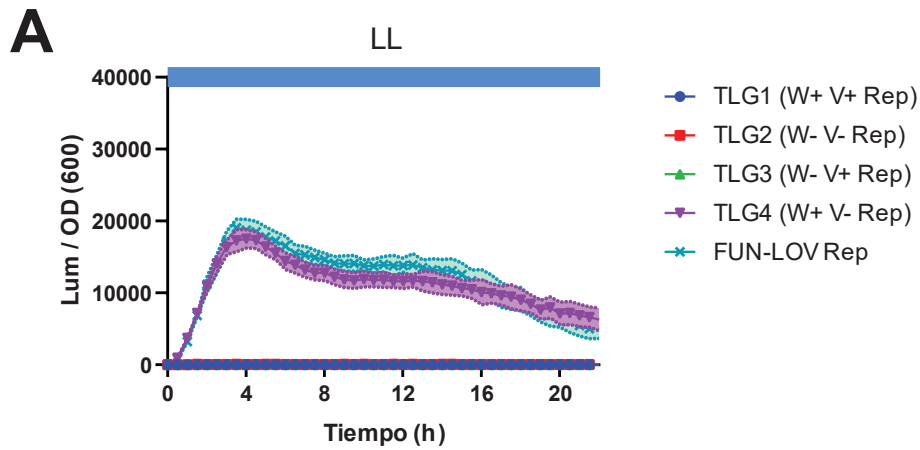


Figura suplementaria 2. Caracterización del sistema FUN-LOV Magnet en respuesta a luz continua. Se presentan gráficos de luminiscencia normalizada por densidad de crecimiento, tanto con los Magnet originales (**A**) y sus combinaciones con el sistema neutro (**B**).

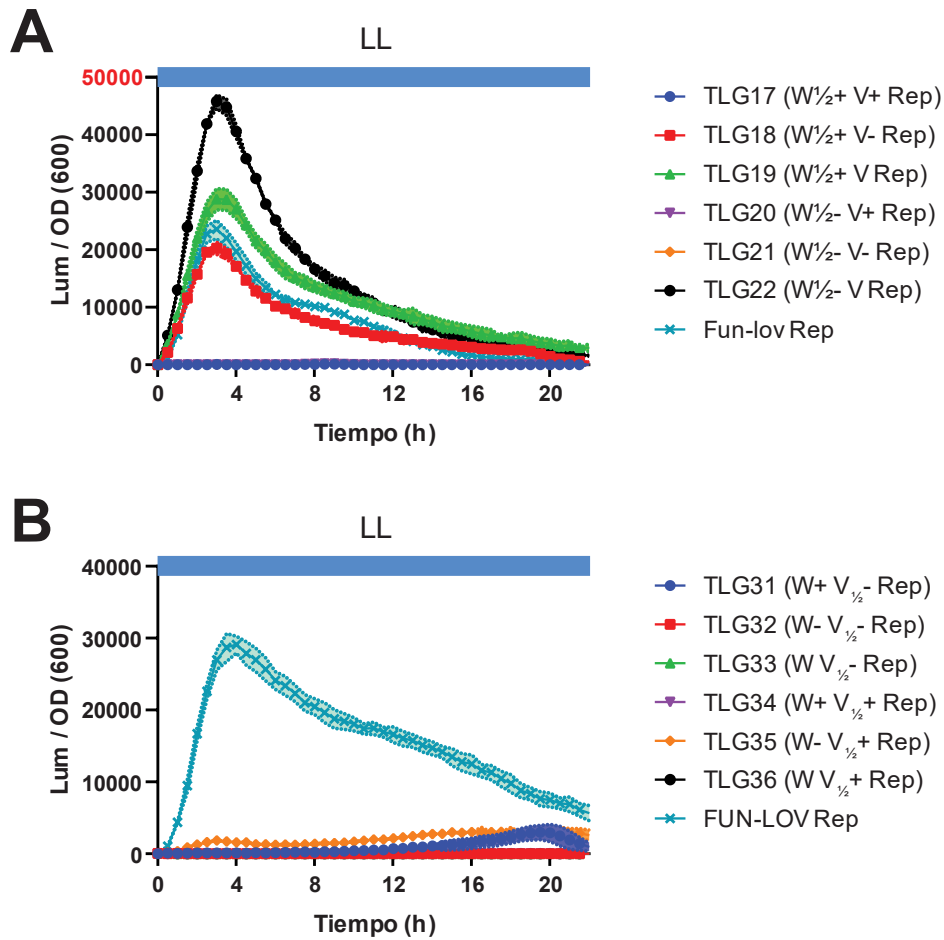


Figura suplementaria 3. Caracterización del sistema FUN-LOV “Half” Magnet en respuesta a luz continua. Se presentan gráficos de luminiscencia normalizada por densidad de crecimiento, tanto con los “Half” magnets de WC-1 (**A**) como los de VVD (**B**).

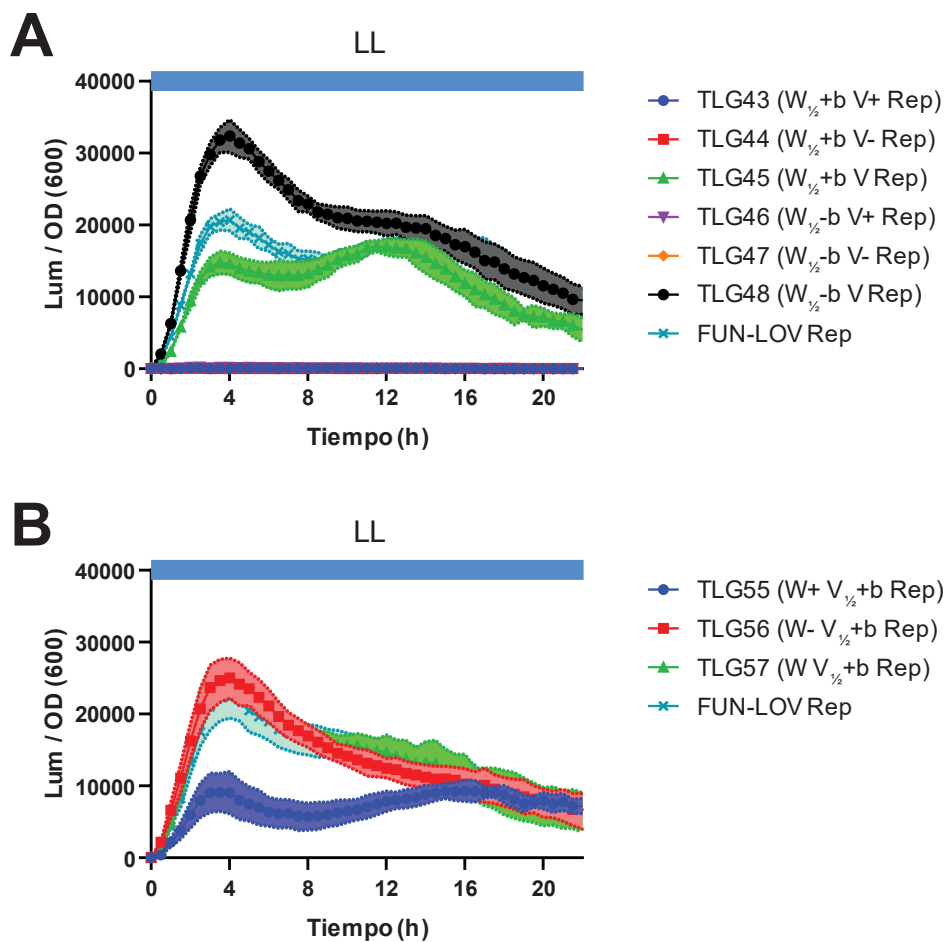


Figura suplementaria 4. Caracterización del sistema FUN-LOV “Half b” Magnet en respuesta a luz continua. Se presentan gráficos de luminiscencia normalizada por densidad de crecimiento, tanto con los “Half b” magnets de WC-1 (**A**) como los de VVD (**B**).

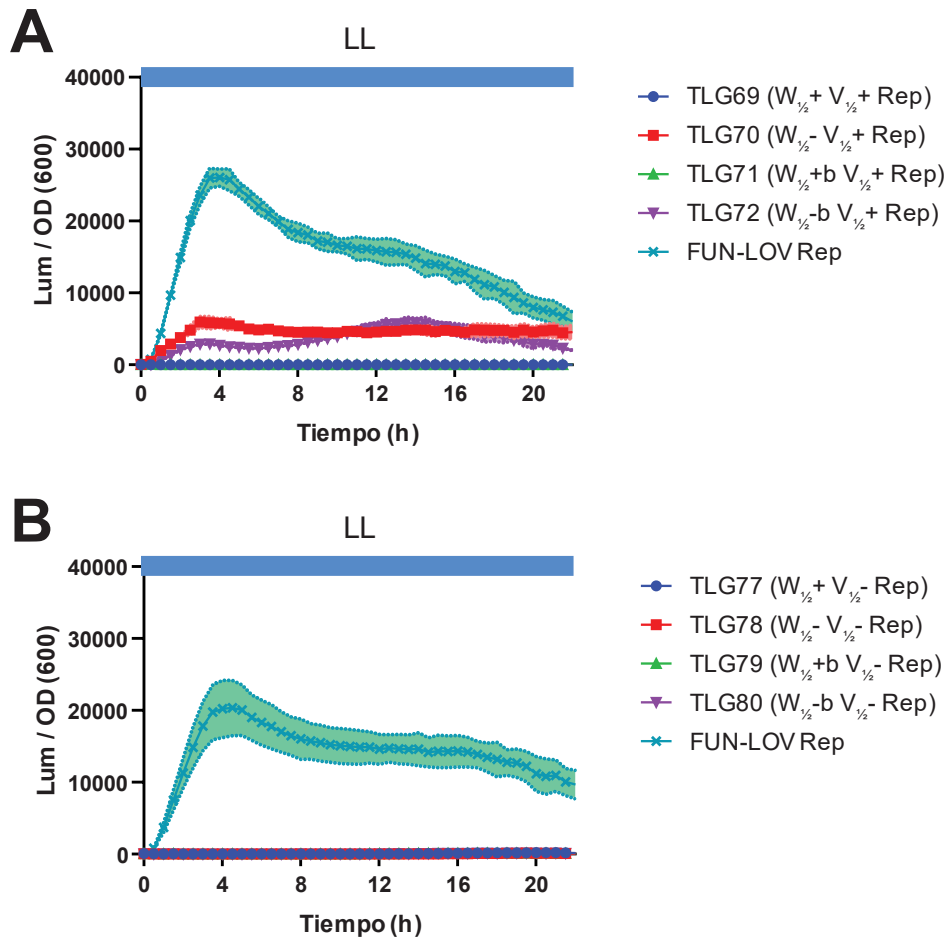


Figura suplementaria 5. Caracterización del sistema FUN-LOV Magnet en respuesta a luz continua, entre permutaciones de las variantes “Half” y “Half b”. Se presentan gráficos de luminiscencia normalizada por densidad de crecimiento en condiciones de pulso de luz y oscuridad constante, para **(A)** grupo de permutaciones basados en $V_{1/2+}$ contra variantes de WC-1; **(B)** grupo de permutaciones basados en $V_{1/2-}$ contra variantes de WC-1.

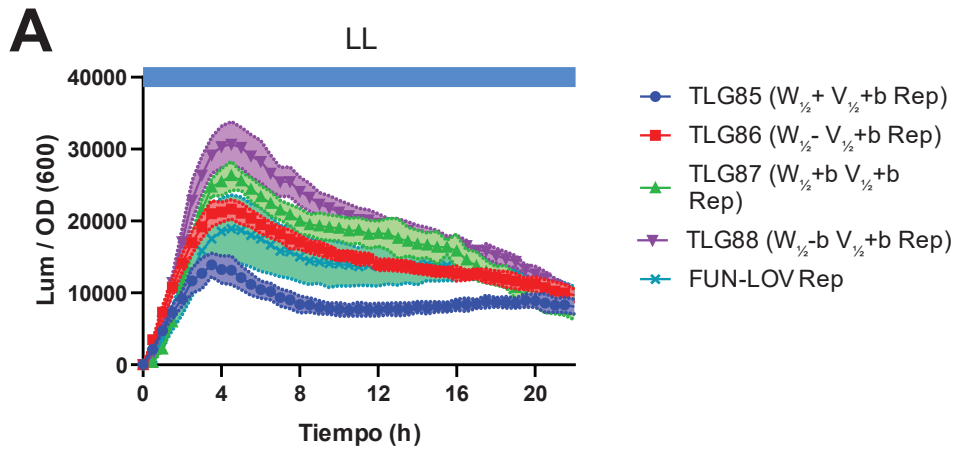


Figura suplementaria 6. Caracterización del sistema FUN-LOV Magnet en respuesta a luz continua, entre permutaciones de las variantes “Half” y “Half b”. Se presentan gráficos de luminiscencia normalizada por densidad de crecimiento en condiciones de pulso de luz y oscuridad constante, para grupo de permutaciones basados en $V_{1/2} + b$ contra variantes WC-1.

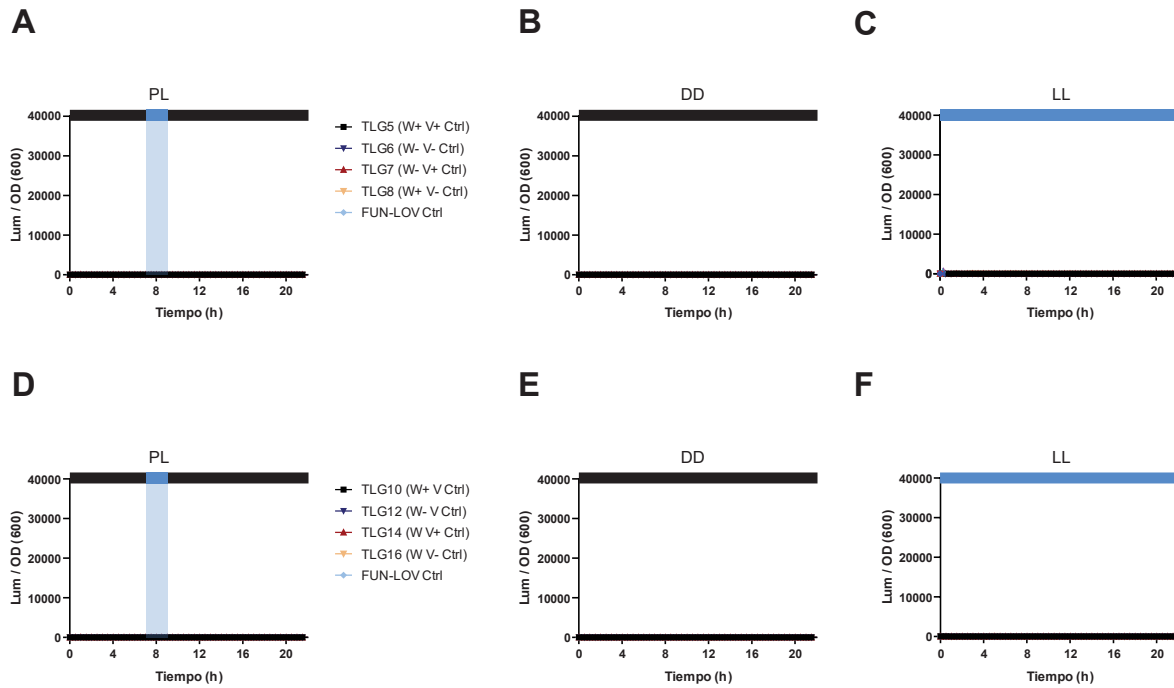


Figura suplementaria 7. Controles del sistema FUN-LOV Magnet en respuesta a pulso de luz, oscuridad y luz constante. Se presentan gráficos de luminiscencia normalizada por densidad de crecimiento en (A) un pulso de luz azul de 2 horas luego de 7 horas de DD (PL); (B) oscuridad constante (DD); y (C) Luz constante (LL), en todos los casos para un el set de transformantes basados en los Magnet originales pero conteniendo un vector vacío como control negativo en vez del reportero; (F) el mismo pulso de A, (E) oscuridad constante, y (F) luz constante para otro set de transformantes considerando los plásmidos sin cambios, también como control negativo.

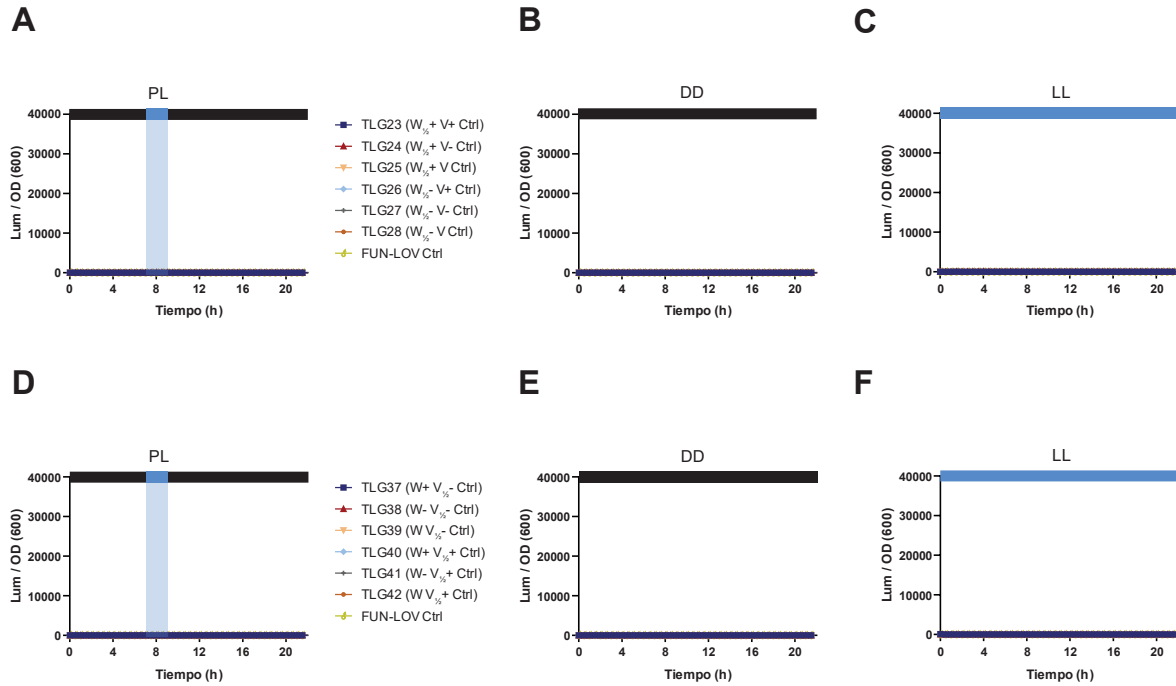


Figura suplementaria 8. Controles del sistema FUN-LOV “Half” Magnet en respuesta a pulso de luz, oscuridad y luz constante. Se presentan gráficos de luminiscencia normalizada por densidad de crecimiento en (A, D) un pulso de luz azul de 2 horas luego de 7 horas de DD (PL); (B, E) oscuridad constante (DD); y (C, F) Luz constante (LL), en todos los casos para un los set de transformantes del sistema FUN-LOV “Half” Magnets pero conteniendo un vector vacío como control negativo en vez del reportero.

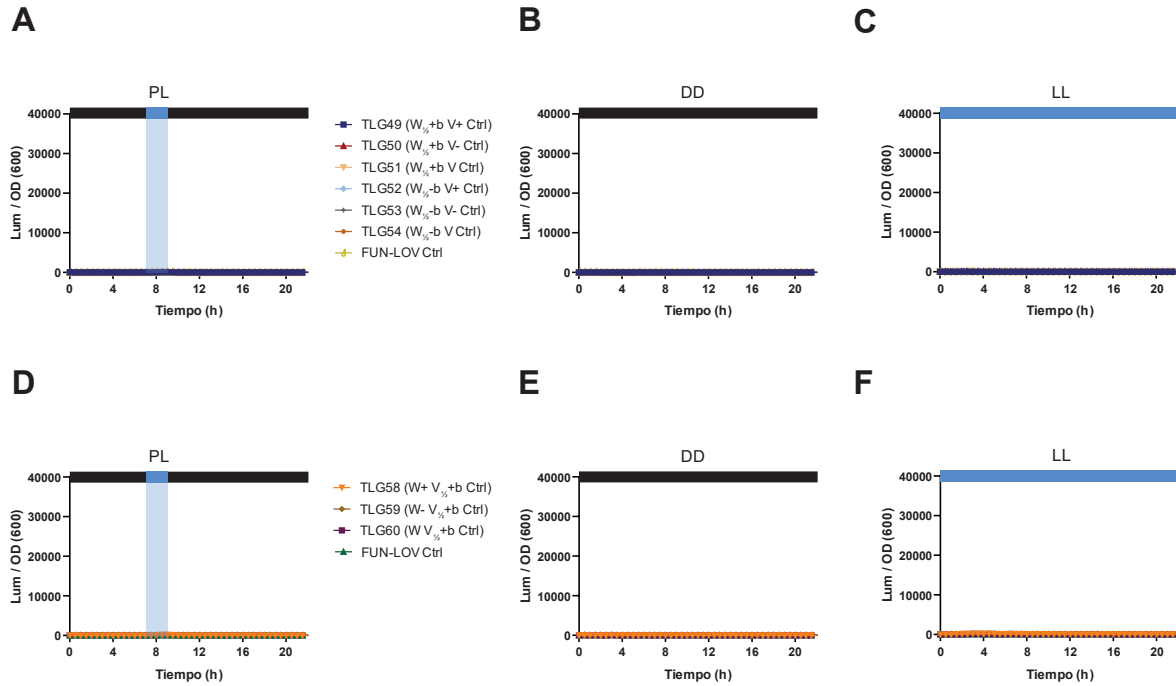


Figura suplementaria 9. Controles del sistema FUN-LOV “Half b” Magnet en respuesta a pulso de luz, oscuridad y luz constante. Se presentan gráficos de luminiscencia normalizada por densidad de crecimiento en (A, D) un pulso de luz azul de 2 horas luego de 7 horas de DD (PL); (B, E) oscuridad constante (DD); y (C, F) Luz constante (LL), en todos los casos para un los set de transformantes del sistema FUN-LOV “Half b” Magnets pero conteniendo un vector vacío como control negativo en vez del reportero.

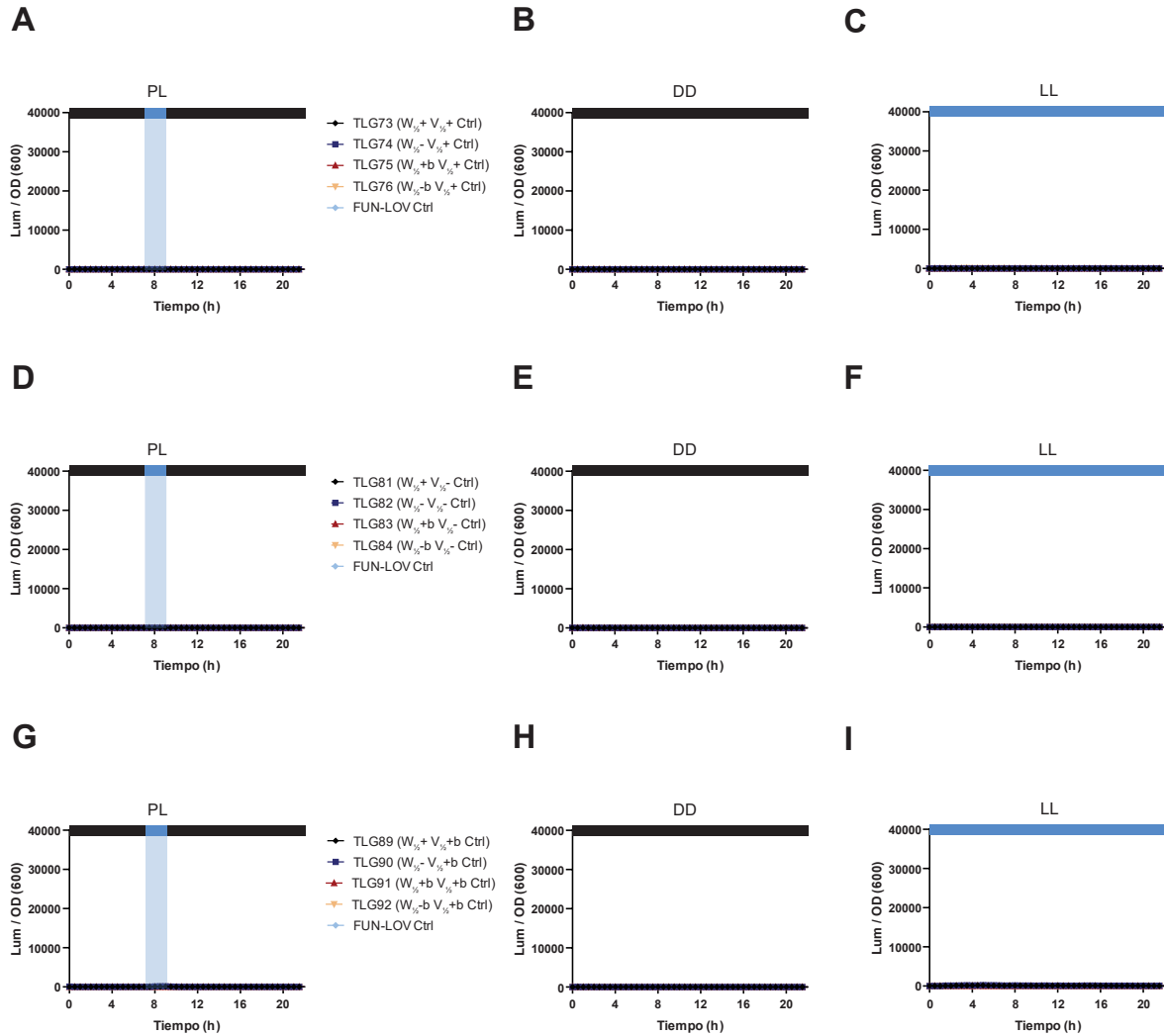


Figura suplementaria 10. Controles del sistema FUN-LOV Magnet en respuesta a pulso de luz, entre permutaciones de las variantes “Half” y “Half b”. Se presentan gráficos de luminiscencia normalizada por densidad de crecimiento en condiciones de pulso de luz, oscuridad constante y luz constante, para **(A, B, C)** grupo de permutaciones basados en $V_{1/2+}$ contra Half Magnets de WC-1; **(D, E, F)** grupo de permutaciones basados en $V_{1/2-}$ contra Half Magnets de WC-1; **(G, H, I)** grupo de permutaciones basados en $V_{1/2+b}$ contra Half Magnets de WC-1, todas conteniendo un vector vacío en vez del reportero.

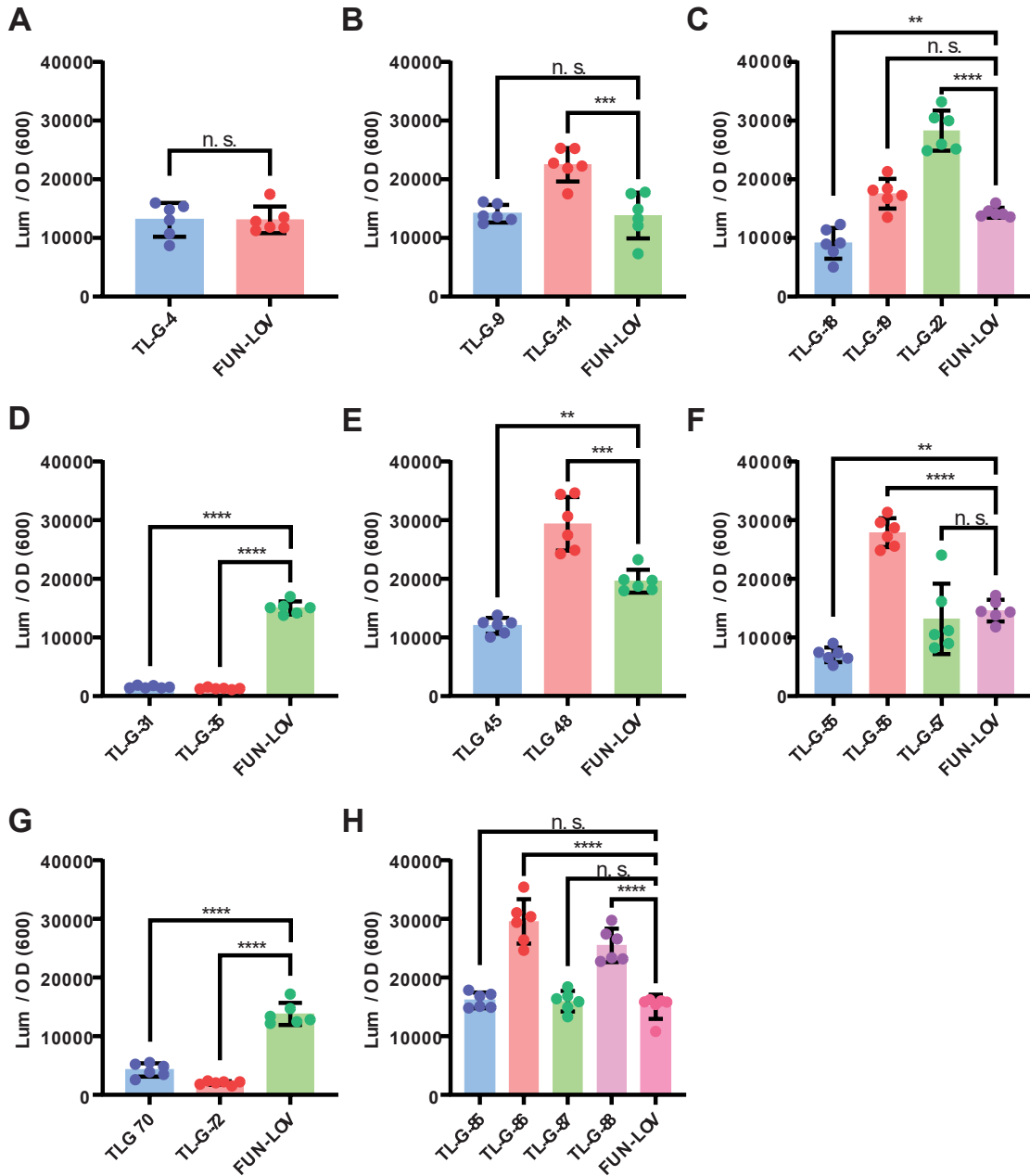


Figura suplementaria 11. Gráficos de barra comparando luminiscencia a 9 horas por experimento realizado en placa. Se presentan gráficos basándose en el peak de luminiscencia a las 9 horas en condiciones de pulso de luz (PL) de 2 horas después de 7 horas de oscuridad constante (DD). Cada gráfico muestra los resultados positivos obtenidos en cada placa medida, donde se compararon con el control positivo FUN-LOV presente en cada una de las placas. La significancia fue medida mediante la prueba de Tukey, a $P=0,005$.

BIBLIOGRAFÍA

Baker Brachmann, C., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., & Boeke, J. D. (1998). Designer Deletion Strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a Useful set of Strains and Plasmids for PCR-mediated Gene Disruption and Other Applications. In *Yeast* (Vol. 14).

Chen, C.-H., DeMay, B. S., Gladfelter, A. S., Dunlap, J. C., & Loros, J. J. (2010). Physical interaction between VIVID and white-collar complex regulates photoadaptation in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(38), 16715–16720.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1011190107>

Corrochano, L. M. (2019). Light in the Fungal World: From Photoreception to Gene Transcription and Beyond. *Annual Review of Genetics*, 53(1).
<https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120417-031415>

Cramer, P. (2021). AlphaFold2 and the future of structural biology. In *Nature Structural and Molecular Biology* (Vol. 28, Issue 9, pp. 704–705). Nature Research.
<https://doi.org/10.1038/s41594-021-00650-1>

Deisseroth, K. (2011). Optogenetics. In *Nature Methods* (Vol. 8, Issue 1, pp. 26–29).
<https://doi.org/10.1038/nmeth.f.324>

Fields, S., & Song, O. K. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340(6230), 245–246. <https://doi.org/10.1038/340245a0>

Gautier, A., Gauron, C., Volovitch, M., Bensimon, D., Jullien, L., & Vriza, S. (2014). How to control proteins with light in living systems. *Nature Chemical Biology*, 10(7), 533–541. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1534>

Gietz, R. D. & Woods, R. A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/singlestranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology*. 350: 87-96.

Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., & Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction (Genetic engineering; sequencing; recombinant DNA; Tag polymerase; oligodeoxyribonucleotide primers; major histocompatibility complex mutants). In *Gene* (Vol. 77).

Hong, M., Fitzgerald, M. X., Harper, S., Luo, C., Speicher, D. W., & Marmorstein, R. (2008). Structural Basis for Dimerization in DNA Recognition by Gal4. *Structure*, 16(7), 1019–1026. <https://doi.org/10.1016/j.str.2008.03.015>

Hunt, S. M., Thompson, S., Elvin, M., & Heintzen, C. (2010). VIVID interacts with the WHITE-COLLAR complex and FREQUENCY-interacting RNA helicase to alter light and clock responses in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(38), 16709–16714. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009474107>

Inoue, H., Nojima, H. y Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 96:23-28.

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>

Kawano, F., Suzuki, H., Furuya, A., & Sato, M. (2015). Engineered pairs of distinct photoswitches for optogenetic control of cellular proteins. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms7256>

Kuhlman, B., & Bradley, P. (2019). Advances in protein structure prediction and design. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 20, Issue 11, pp. 681–697). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0163-x>

Kumar, S., & Nussinov, R. (2002). Close-Range Electrostatic Interactions in Proteins. In *ChemBioChem* (Vol. 3). WILEY.

Lai, D., Zhu, X., & Pestka, S. (1993). A simple and efficient method for site-directed mutagenesis with double-stranded plasmid DNA. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 21, Issue 17). <http://nar.oxfordjournals.org/>

Litvin, O., Causton, H. C., Chen, B. J., & Pe'er, D. (2009). Modularity and interactions in the genetics of gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(16), 6441–6446.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0810208106>

Malzahn, E., Ciprianidis, S., Káldi, K., Schafmeier, T., & Brunner, M. (2010). Photoadaptation in *Neurospora* by Competitive Interaction of Activating and Inhibitory LOV Domains. *Cell*, *142*(5), 762–772. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.010>

Mangan, S., & Alon, U. (2003). Structure and function of the feed-forward loop network motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(21), 11980–11985. <https://doi.org/10.1073/pnas.2133841100>

Mühlhäuser, W. W. D., Fischer, A., Weber, W., & Radziwill, G. (2017). Optogenetics - Bringing light into the darkness of mammalian signal transduction. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1864*(2), 280–292.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.11.009>

Nihongaki, Y., Suzuki, H., Kawano, F., & Sato, M. (2014). Genetically engineered photoinducible homodimerization system with improved dimer-forming efficiency. *ACS Chemical Biology*, *9*(3), 617–621. <https://doi.org/10.1021/cb400836k>

Oldenburg, K. R., Vo, K. T., Michaelis, S., & Paddon, C. (1997). Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 25, Issue 2). Oxford University Press.

O'Neal, L., Ryu, M., Gomelsky, M., & Alexandre, G. (2017). Optogenetic Manipulation of Cyclic Receptor Activity in *Azospirillum*. *Journal of Bacteriology*, 199(18), 1–18.

Raymond, C. K., Sims, E. H., & Olson, M. v. (2002). Linker-mediated recombinational subcloning of large DNA fragments using yeast. *Genome Research*, 12(1), 190–197.
<https://doi.org/10.1101/gr.205201>

Rojas, V. (2016). Floculación Activada por Luz: Control Optogenético de la expresión génica en Levadura. Pontificia Universidad Católica de Chile.

Rojas, V. (2020). Exploiting Fungal Photobiology as a Source of Novel Bio-blocks for Optogenetic Systems. En Esser, K., Benz, J. P., & Schipper, K., *Genetics and Biotechnology: THE MYCOTA* (3rd Ed, pp. 297–318).

<https://doi.org/10.1007/978-3-030-49924-2>

Romero, A. (2019). Modularidad en interruptores optogenéticos basados en la arquitectura de doble híbrido en levaduras: sistema Fungal Light-Oxygen-Voltage como caso de estudio. Universidad de Chile.

Romero, A. (2020). Modularidad genética y molecular como herramienta para la diversificación y mejoramiento de sistemas optogenéticos. Universidad de Chile.

Salinas, F., Rojas, V., Delgado, V., López, J., Agosin, E., & Larrondo, L. F. (2018). Fungal light-oxygen-voltage domains for optogenetic control of gene expression and flocculation in yeast. In *mBio* (Vol. 9, Issue 4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00626-18>

Salinas, F., Rojas, V., Delgado, V., Agosin, E., & Larrondo, L. F. (2017). Optogenetic switches for light-controlled gene expression in yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(7), 2629–2640. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8178-8>

Shcherbakova, D. M., Shemetov, A. A., Kaberniuk, A. A., & Verkhusha, V. v. (2015). Natural Photoreceptors as a Source of Fluorescent Proteins, Biosensors, and Optogenetic Tools. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 84, Issue 1). <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034411>

Wei, L., Xing, P., Zeng, J., Chen, J. X., Su, R., & Guo, F. (2017). Improved prediction of protein–protein interactions using novel negative samples, features, and an ensemble classifier. *Artificial Intelligence in Medicine*, 83, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.artmed.2017.03.001>

Yang, H., Liu, L., & Xu, F. (2016). The promises and challenges of fusion constructs in protein biochemistry and enzymology. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 100, Issue 19, pp. 8273–8281). Springer Verlag.

<https://doi.org/10.1007/s00253-016-7795-y>

Yu, K., Liu, C., Kim, B. G., & Lee, D. Y. (2015). Synthetic fusion protein design and applications. *Biotechnology Advances*, 33(1), 155–164.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.11.005>

Yuan, Q., Chen, S., Rao, J., Zheng, S., Zhao, H., & Yang, Y. (2021). *AlphaFold-aware prediction of protein-DNA binding sites using graph transformer*.

<https://doi.org/10.1101/2021.08.25.457661>

Zeng, J., Li, D., Wu, Y., Zou, Q., & Liu, X. (2015). An Empirical Study of Features Fusion Techniques for Protein-Protein Interaction Prediction. *Current Bioinformatics*, 11(1), 4–12. <https://doi.org/10.2174/1574893611666151119221435>

Zhang, Y., Li, P., Pan, F., Liu, H., Hong, P., Liu, X., & Zhang, J. (2021). *Applications of AlphaFold beyond Protein Structure Prediction*.

<https://doi.org/10.1101/2021.11.03.467194>

Zoltowski, B. D., Schwerdtfeger, C., Widom, J., Loros, J. J., Bilwes, A. M., Dunlap, J. C., & Crane, B. R. (2007). Conformational switching in the fungal light sensor vivid. *Science*, 316(5827), 1054–1057. <https://doi.org/10.1126/science.1137128>