



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Grado en Biología

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Revisión bibliográfica: El sistema del doble híbrido y su papel en la detección de nuevas dianas terapéuticas

Revisión bibliográfica: O sistema do dobre híbrido e o seu papel na detección de novas dianas terapéuticas

Review: The two-hybrid system and its role in detecting new therapeutic targets

Iria Domínguez Martínez

A Coruña, 30 de julio de 2020

Directores académicos:

María Esperanza Cerdán Villanueva y Mónica Lamas Maceiras

AGRADECIMIENTOS

A mis directoras académicas María Esperanza Cerdán Villanueva y Mónica Lamas Maceiras por su paciencia y dedicación. Asimismo, también me gustaría agradecer a mis padres por su apoyo incondicional.

Las Dras. **María Esperanza Cerdán Villanueva** y **Mónica Lamas Maceiras**,
profesoras del Área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de A
Coruña,

INFORMAN:

Que el presente Trabajo de Fin de Grado realizado por **Iria Domínguez Martínez**
ha sido realizado bajo nuestra dirección y, considerándolo finalizado, damos el
Visto Bueno para su presentación al Tribunal Calificador.

A Coruña, 30 de julio de 2020

Fdo.: María Esperanza Cerdán Villanueva

Fdo.: Mónica Lamas Maceiras

ÍNDICE

RESUMEN/RESUMO/ABSTRACT

PALABRAS CLAVE/KEYWORDS

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia de las interacciones físicas entre macromoléculas..... 1

1.2. Perspectiva histórica y fundamento del sistema del doble híbrido
en levaduras..... 3

2. OBJETIVO 6

3. MATERIAL Y MÉTODOS 6

4. RESULTADOS

4.1. ¿A qué se debe el éxito del sistema del doble híbrido en levaduras?
Ventajas y desventajas 7

4.2. Variantes del sistema del doble híbrido en levaduras..... 10

4.3. Fundamento del sistema del mono híbrido en levaduras..... 13

4.4. Fundamento del sistema del triple híbrido en levaduras..... 14

4.5. El sistema del doble híbrido en levaduras en el descubrimiento
de nuevas dianas terapéuticas 17

5. DISCUSIÓN 23

6. CONCLUSIONES/CONCLUSIÓNS/CONCLUSIONS..... 25

7. BIBLIOGRAFÍA 26

ABREVIATURAS 29

RESUMEN/RESUMO/ABSTRACT

RESUMEN

Las interacciones macromoleculares están implicadas en todos los procesos biológicos, y su mal funcionamiento o desregulación puede causar distintas enfermedades. En 1989 se desarrolló el sistema del doble híbrido en levaduras, una innovadora técnica que permitía el análisis *in vivo* de las interacciones proteína-proteína. Rápidamente, se desarrollaron variantes de esta técnica como el sistema del mono híbrido y el sistema del triple híbrido capaces de estudiar las interacciones ADN-proteína y ARN-proteína, respectivamente. En este trabajo se revisarán las ventajas y desventajas del sistema del doble híbrido en levaduras, además del papel de esta técnica y de sus variantes mono híbrido y triple híbrido en la identificación de nuevas dianas terapéuticas hacia las que dirigir nuevos fármacos para el tratamiento de enfermedades, por lo que se hará hincapié en las distintas aplicaciones de estas técnicas para este fin. Los resultados indican que, aunque con limitaciones, estas técnicas se podrían utilizar con cierto éxito para el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas.

Palabras clave: interacciones macromoleculares, sistema del doble híbrido, sistema del mono híbrido, sistema del triple híbrido, nuevas dianas terapéuticas.

RESUMO

As interaccións macromoleculares están implicadas en todos os procesos biolóxicos, e o seu mal funcionamento ou desregulación pode causar distintas enfermidades. No 1989 desenvolveuse o sistema do dobre híbrido en lévedos, unha innovadora técnica que permitía a análise *in vivo* das interaccións proteína-proteína. Rapidamente, se desenvolveron variantes desta técnica coma o sistema do mono híbrido e o sistema do triplo híbrido capaces de estudar as interaccións ADN-proteína e ARN-proteína, respectivamente. Neste traballo revisaranse as vantaxes e desvantaxes do sistema do dobre híbrido en lévedos, ademais do papel desta técnica e das súas variantes mono híbrido e triplo híbrido na identificación de novas dianas terapéuticas cara ás que dirixir novos fármacos para o tratamento de enfermidades, polo que se fará fincapé nas distintas aplicacións destas técnicas para este fin. Os resultados indican que, aínda que con limitacións, estas técnicas poderíanse empregar con certo éxito no descubrimento de novas dianas terapéuticas.

Palabras clave: interaccións macromoleculares, sistema do dobre híbrido, sistema do mono híbrido, sistema do triplo híbrido, novas dianas terapéuticas.

ABSTRACT

Macromolecular interactions are involved in every biological process, and their malfunction or deregulation may cause different illnesses. In 1989 the yeast two-hybrid system was developed, an innovative technique that allowed the *in vivo* analysis of protein-protein interactions. Quickly, variants of this technique were developed such as the one-hybrid system and the three-hybrid system capable of studying DNA-protein and RNA-protein interactions, respectively. In this work we will review the advantages and disadvantages of the yeast two-hybrid system, along with the role of this technique and its variants one-hybrid and three-hybrid in the identification of new therapeutic targets towards which address drugs for illness treatment, so that we will focus on the different applications of these techniques for this purpose. The results show that, though with limitations, these techniques may be used with certain success for discovering new therapeutic targets.

Keywords: macromolecular interactions, two-hybrid system, one-hybrid system, three-hybrid system, new therapeutic targets.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. IMPORTANCIA DE LAS INTERACCIONES FÍSICAS ENTRE MACROMOLÉCULAS

Las interacciones físicas entre macromoléculas como las proteínas, el ADN, el ARN, los lípidos y los metabolitos son la base de todas las funciones celulares. Esto es, mientras que el genoma codifica para la síntesis de proteínas, son las interacciones biofísicas entre distintas biomoléculas junto con sus ensamblajes macromoleculares, los responsables de convertir la información genética tanto en reacciones y rutas bioquímicas, como en los componentes estructurales celulares, es decir, el conjunto de todas las interacciones moleculares constituye el puente de unión entre genotipo y fenotipo. Por tanto, identificar y comprender las interacciones entre las moléculas de todos los procesos celulares, como puede ser el caso de las interacciones proteína-proteína, ADN-proteína y ARN-proteína, es clave para entender tanto la organización celular como su funcionamiento (Oñate-Sánchez, 2018).

En concreto, las proteínas interactúan entre sí y forman amplias redes que mantienen el correcto funcionamiento de las actividades biológicas en todos los organismos (Yang *et al.*, 2018). De este modo, la mayoría de los procesos biológicos clave, incluidos los procesos de transcripción, traducción, transporte y señalización, dependen de las interacciones proteína-proteína que ocurren tanto de manera directa como en la formación de complejos multiproteicos (Mehla *et al.*, 2017). Dado que estos complejos proteicos median procesos celulares tan importantes como la división y el crecimiento celular, diseccionar las interacciones proteicas entre sus componentes constituye la base para investigar su regulación y función. Esta información ayuda también a entender los distintos estadios de ciertas enfermedades, en los que se alteran sus funciones (Fetchko y Stagljar, 2004). Además, estas interacciones moleculares también desempeñan un papel fundamental en la relación entre patógenos y hospedadores en diversas enfermedades (Alcántara *et al.*, 2019), como puede ser el caso por ejemplo de los ciclos de infección vírica, donde las interacciones proteína-proteína son clave (Guo *et al.*, 2008).

Por otra parte, la importancia de las interacciones proteicas con los ácidos nucleicos no se queda atrás. Las interacciones ADN-proteína son esenciales para descubrir los mecanismos implicados en la regulación génica (Oñate-Sánchez, 2018), ya que pueden aumentar o disminuir la transcripción de los genes adyacentes (Reece-Hoyes y Walhout, 2012). Por su parte, las interacciones ARN-proteína, además de en la transcripción, intervienen en numerosos procesos biológicos tales como las modificaciones postraduccionales, el ensamblaje de estructuras supramoleculares como los ribosomas (Putz *et al.*, 1996) o en la propagación vírica (Hook *et al.*, 2005).

Estas interacciones moleculares son de suma importancia en la lucha contra las enfermedades, pues dado que determinadas variantes genéticas y mutaciones pueden alterar las interacciones moleculares, conocer el papel que desempeñan estas interacciones es fundamental tanto para abordar ciertas enfermedades humanas como para desarrollar tratamientos específicos y efectivos (Oñate-Sánchez, 2018). Dicho esto, queda claro que conocer la interacción de las proteínas es clave para comprender la complejidad a la que operan los sistemas biológicos en situaciones fisiológicas normales, y para entender por tanto cómo se desregulan estos sistemas en condiciones patológicas. Además, como se viene diciendo, este conocimiento es importante también a nivel terapéutico, pues puede ser útil para el diseño de nuevos fármacos. Esto es, si se localiza que una proteína y su interacción con otras proteínas o moléculas es clave para el desarrollo de una enfermedad, se pueden encontrar nuevas dianas moleculares hacia las que dirigir los fármacos (Hollingsworth y White, 2004).

Dado que las redes de interacciones físicas entre biomoléculas controlan desde el desarrollo embrionario hasta las respuestas a patógenos o enfermedades (Reece-Hoyes y Walhout, 2012), desenmarañar las redes de interacciones proteína-proteína es crucial para entender los procesos biológicos (Erfelínck *et al.*, 2018). Sin embargo, identificar la función de una proteína no es fácil, pero se puede esperar que las proteínas que interaccionan directamente entre sí participen en los mismos procesos celulares, por lo que contar con un método que permita obtener pistas acerca de la función de una proteína mediante el estudio de sus interacciones con el resto de macromoléculas celulares supone una gran ventaja (Coates y Hall, 2003). Aquí es donde entra en juego el sistema del doble híbrido en levaduras, pues este sistema no solo permite el estudio de las interacciones proteína-proteína *in vivo* en situaciones normales, sino que puede utilizarse para identificar proteínas que interaccionan con productos codificados por oncogenes o con proteínas bacterianas o víricas, proporcionando información útil para el diseño de proteínas o péptidos con funciones terapéuticas (Fields y Song, 1989).

1.2. PERSPECTIVA HISTÓRICA Y FUNDAMENTO DEL SISTEMA DEL DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURAS

En 1989 Fields y Song revolucionaron el análisis de las interacciones proteicas al describir un sistema genético capaz de detectar las interacciones físicas directas proteína-proteína *in vivo*, en concreto en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Hasta ese momento el estudio de las interacciones entre proteínas se llevaba a cabo mayoritariamente mediante técnicas bioquímicas (Brückner *et al.*, 2009). Una de las principales razones que llevaron al desarrollo de este método capaz de detectar interacciones directas entre dos proteínas era que, a diferencia de en los métodos bioquímicos, no era necesario conocer *a priori* los requerimientos físicos necesarios para la interacción (Izumchenko *et al.*, 2007).

El desarrollo de esta nueva técnica está íntimamente ligado con el análisis molecular de los factores de transcripción eucariotas (Brückner *et al.*, 2009). Así pues, el fundamento del sistema del doble híbrido en levaduras se basa en los descubrimientos sobre el inicio de la transcripción hechos a mediados de 1980, en concreto, en el descubrimiento de la naturaleza modular de los factores de transcripción (Fields y Sternglanz, 1994). Estos descubrimientos se esquematizan en la Figura 1. En primer lugar, se descubrió que los factores de transcripción eucariotas conocidos como activadores transcripcionales cuya función es incrementar la transcripción de algunos genes específicos, contenían al menos dos dominios funcionales separables. De este modo, estos factores de transcripción constan de un dominio que media la unión a ADN (DBD o *DNA binding domain*) y un dominio que media la activación transcripcional (TAD o *transcriptional activation domain*) capaces de mantener su funcionalidad de forma independiente (Luban y Goff, 1995). Además, como los dominios de unión a ADN y de activación transcripcional que forman un factor transcripcional son funcionalmente independientes, se vio que era posible crear distintos factores combinándolos mediante enlaces covalentes, es decir, se podía utilizar el dominio de activación transcripcional de una proteína y el dominio de unión a ADN de otra proteína y crear un factor transcripcional funcional quimérico que regulase la transcripción de genes diana. Por último, otra pista para la creación del sistema del doble híbrido en levaduras fue percatarse de que la reconstrucción de su función se podía llevar a cabo aunque no existiese un enlace covalente, es decir, el dominio de unión a ADN de una proteína podía interaccionar de manera no covalente con el dominio de activación transcripcional de otra y originar un activador transcripcional funcional (Fields y Sternglanz, 1994).

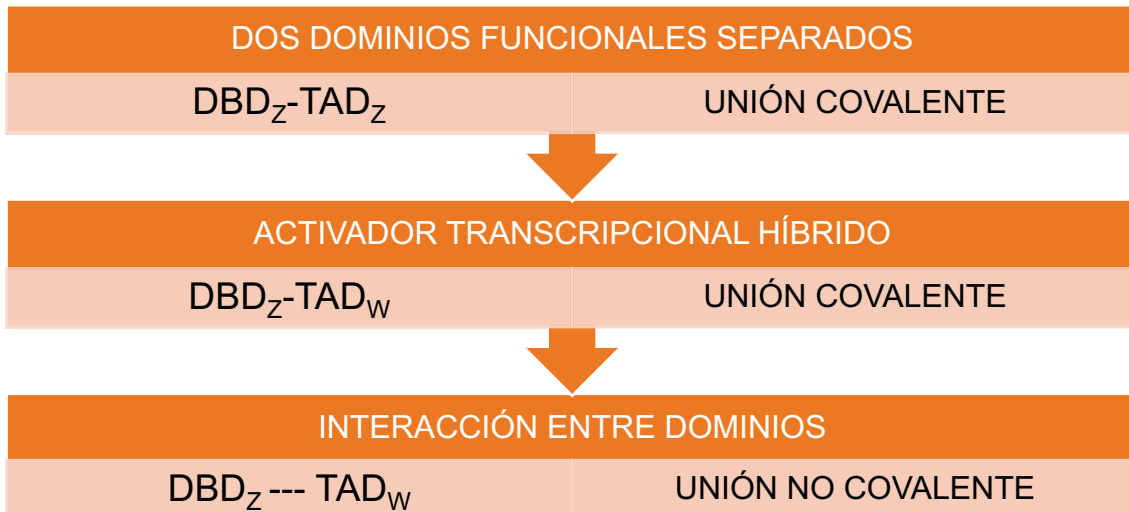


FIGURA 1. Descubrimientos anteriores al sistema del doble híbrido en levaduras y que fueron clave para su creación. DBD=*DNA binding domain* o dominio de unión a ADN; TAD=*transcriptional activation domain* o dominio de activación transcripcional; “Z” y “W” hacen referencia a dos proteínas distintas cualesquiera (Fields y Sternglanz, 1994).

Estos descubrimientos inspiraron a Fields y Song para aprovechar las propiedades modulares de los factores de transcripción en el estudio de las interacciones proteicas, surgiendo así lo que hoy se conoce como sistema del doble híbrido en levaduras. Este sistema del doble híbrido en levaduras fue originariamente descrito utilizando el activador transcripcional Gal4 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, por lo que se hacía uso de la genética de estas levaduras para la identificación *in vivo* de las interacciones proteína-proteína. El activador transcripcional usado, Gal4, tiene como función permitir la expresión de los genes que codifican para los transportadores y enzimas necesarios para el aprovechamiento de los galactósidos y la galactosa del medio, permitiendo así el crecimiento de la levadura en un medio con este monosacárido como fuente de carbono (Fields y Song, 1989). Este ensayo basado en la transcripción tiene su fundamento, como ya se dijo, en el principio de que muchas proteínas, incluyendo los activadores transcripcionales consisten en múltiples dominios que pueden funcionar de manera independiente (Fashena *et al.*, 2000). Así pues, Gal4 consta de dos dominios esenciales y funcionalmente separables: un dominio de unión a ADN y un dominio de activación transcripcional (Fields y Song, 1989). El dominio de unión a ADN media la unión del factor de transcripción al promotor de los genes regulados mediante el reconocimiento de una secuencia de ADN específica (Coates y Hall, 2003), y el otro dominio, el dominio de activación transcripcional interacciona con la maquinaria basal de transcripción para promover su activación (DeMaggio *et al.*, 2000). Ninguno de los dominios de manera individual consigue activar la transcripción. El objetivo era, por tanto, crear dos proteínas híbridas de fusión (de ahí el nombre de doble híbrido, pues el nombre de la técnica hace referencia al número de moléculas híbridas que se utilizan, y en concreto, en este sistema se usan dos proteínas híbridas) cada una con una porción de Gal4. Esto es, una

de estas proteínas híbridas consiste en el dominio de unión a ADN de Gal4 fusionado con una proteína de interés cualquiera “X”, y la otra proteína híbrida consiste en el dominio de activación transcripcional de Gal4 fusionado con otra proteína cualquiera de interés “Y”. Se obtiene así el híbrido de unión a ADN DBD-X o cebo, y el híbrido de activación transcripcional TAD-Y o presa. Aunque lo que se quiere testar es si existe o no interacción entre dos proteínas de interés, originariamente este sistema se testó utilizando dos proteínas que ya se sabía que interactuaban entre sí, concretamente Snf1 y Snf4. Para ello, se introdujeron plásmidos que contenían la información necesaria para codificar estas proteínas híbridas en cepas de levaduras carentes de Gal4, ya que el objetivo era ver si se producía o no la reconstitución de este factor. Dado que Gal4 es un activador transcripcional activa la transcripción de diversos genes, entre ellos el gen que codifica para la β -galactosidasa (enzima encargada de degradar galactósidos liberando galactosa). Por último, es importante resaltar que la interacción sucederá en el núcleo celular (Fields y Song, 1989). En la Figura 2 se ejemplifica el fundamento de este sistema.

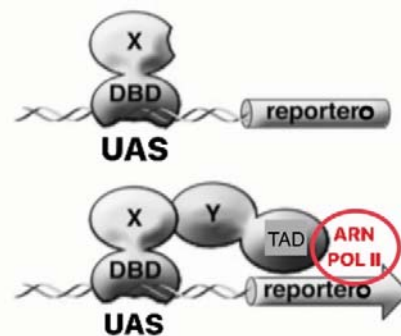


FIGURA 2. Fundamento del sistema del doble híbrido en levaduras. El híbrido X-DBD o cebo se une a la secuencia de activación del promotor o *upstream activation sequence* (UAS). Si se produce la interacción del híbrido cebo con el híbrido presa TAD-Y, el factor de transcripción se vuelve funcional y la ARN polimerasa II transcribe el gen reportero (Fields y Song, 1989). Imagen adaptada de Izumchenko *et al.*, 2007.

La interacción entre proteínas se identificará por tanto, por la expresión de un gen reportero (como consecuencia de la reconstitución del factor transcripcional) que no necesariamente tiene por qué ser el gen de la β -galactosidasa que utilizaron Fields y Song en el experimento inicial. Los genes reporteros generalmente codifican enzimas necesarias que forman parte de rutas de biosíntesis de aminoácidos o nucleótidos. Su mutación, delección o eliminación provocan que dicha ruta se paralice, haciendo necesaria la obtención del compuesto final de la ruta directamente del medio de cultivo para la supervivencia de la levadura. La expresión de algunos genes reporteros previamente inactivos puede complementar estas mutaciones y permitir la selección positiva de aquellas cepas donde sí se haya producido la interacción en medios carentes del aminoácido o compuesto correspondiente (Guo *et al.*, 2008). Asimismo, también se utilizan otros genes reporteros introducidos en la

levadura por ingeniería genética bajo el control de promotores activados por Gal4, y que proceden de otros organismos; estos sistemas tienen la ventaja de que su activación puede ser medida por colorimetría como es el caso del gen *lacZ* de bacterias al actuar sobre sustratos cromogénicos como X-Gal, o fluorimetría como es el caso de la proteína fluorescente verde o *green fluorescent protein* (GFP) procedente de la medusa *Aequorea victoria* (DeMaggio *et al.*, 2000).

La versatilidad del concepto del doble híbrido fue rápidamente utilizada para desarrollar ensayos similares pero que diesen respuesta a otro tipo de preguntas más allá de las interacciones proteína-proteína (Hollingsworth y White, 2004). De este modo, el método del sistema del doble híbrido en levaduras se ha adaptado para generar variantes capaces de detectar interacciones entre proteínas y otras moléculas. Este es el caso del sistema del mono híbrido en levaduras que permite estudiar las interacciones ADN-proteína y el sistema del triple híbrido en levaduras para las interacciones ARN-proteína y el análisis de los complejos proteicos ternarios (Guo *et al.*, 2008).

2. OBJETIVO

Dada la importancia de las interacciones moleculares en el desarrollo de enfermedades, en este trabajo se pretende realizar una revisión bibliográfica del sistema del doble híbrido en levaduras centrándonos en el papel que desempeña la técnica en el descubrimiento de nuevas dianas moleculares que permitan el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de enfermedades. Para ello, se revisarán las ventajas y desventajas de esta técnica, así como las principales variantes y aplicaciones de la misma que más se usan para este propósito. Cabe destacar que, por su importancia, se hará especial hincapié en sus variantes mono híbrido y triple híbrido en levaduras.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Para la elaboración del presente trabajo de revisión bibliográfica se llevó a cabo una búsqueda tanto de artículos científicos como de capítulos de libros en *Web of Science* (<https://www.recursoscientificos.fecyt.es>), *ScienceDirect* (<https://www.sciencedirect.com>) y *NCBI/Pubmed* (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>). De igual modo, también se realizó una búsqueda de trabajos científicos relacionados con el tema a tratar en *Google Scholar* (<https://scholar.google.es>). Se buscó información relativa no solo al sistema del doble híbrido en levaduras sino también a sus variantes mono híbrido y triple híbrido en levaduras. De toda la bibliografía posible, para la realización de esta memoria se seleccionaron tanto artículos originales en los que se describen por primera vez estas técnicas como artículos de revisión posteriores y capítulos de libros. Por lo que, la información recopilada para la realización de este trabajo pertenece al periodo comprendido entre los años 1989 y 2020. Los

documentos obtenidos fueron el resultado de búsquedas con palabras clave como interacciones proteína-proteína, sistema del doble híbrido en levaduras, sistema del mono híbrido en levaduras, sistema del triple híbrido en levaduras y descubrimiento de fármacos, entre otras. Cabe destacar que para el apartado de descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas se utilizaron simultáneamente varias de estas palabras clave, por ejemplo, sistema del doble híbrido en levaduras y descubrimiento de fármacos. Finalmente, se obtuvieron un total de 36 documentos.

4. RESULTADOS

4.1. ¿A QUÉ SE DEBE EL ÉXITO DEL SISTEMA DEL DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURAS? VENTAJAS Y DESVENTAJAS

El sistema del doble híbrido en levaduras presenta algunas ventajas sobre otras técnicas como es que se trata de un ensayo *in vivo* (Oñate-Sánchez, 2018) en un ambiente fisiológico (Hamdi y Colas, 2012). En concreto, la levadura eucariota unicelular *Saccharomyces cerevisiae* es un buen organismo modelo para el estudio de las células eucariotas dado que muchos de los procesos celulares básicos están altamente conservados entre levaduras y humanos. Este organismo ha permitido el análisis molecular de muchos genes implicados en enfermedades, lo que lo convierte en un excelente sistema modelo para el descubrimiento de fármacos. Además, es barato de mantener y crecer, es un microorganismo seguro, se ha secuenciado la totalidad de su genoma y permite utilizar multitud de marcadores selectivos (Auerbach *et al.*, 2005). Cabe destacar que además, esta técnica permite detectar no solo interacciones fuertes y estables en el tiempo, sino también interacciones débiles y transitorias (Oñate-Sánchez, 2018).

Otro punto clave de esta técnica es que presenta la posibilidad de escalado para utilizarse a gran escala en ensayos *high-throughput* (de alto rendimiento) que permiten obtener numerosos datos en un corto periodo de tiempo (Joshi *et al.*, 2019). Esto es, se puede probar la interacción de una proteína cebo frente a una librería de presas genómicas preparada mediante la obtención de ADNc que incluye todos los genes que están expresando proteínas de un organismo o tejido de interés en una situación concreta. Por tanto, el sistema del doble híbrido en levaduras se utiliza tanto para evaluar interacciones binarias de forma individual como para conocer interactomas completos (Suter *et al.*, 2008). El concepto de interactoma hace referencia al conjunto de todas las interacciones moleculares que se producen en una determinada situación fisiológica (Ruffner *et al.*, 2007). Además, a diferencia de otras técnicas *in vitro*, en el método del doble híbrido no se necesitan purificar las proteínas objeto de ensayo previamente (Oñate-Sánchez, 2018).

Sin embargo, a pesar de ser una de las técnicas *in vivo* más prometedoras para el estudio de las interacciones proteicas, también tiene sus limitaciones, como es la alta incidencia de falsos positivos (Joshi *et al.*, 2019). Pero estos no son los únicos resultados erróneos que proporciona la técnica, sino que los falsos negativos también son frecuentes (Suter *et al.*, 2008). Esto es, mientras que los falsos negativos son interacciones que sí se producen en la realidad pero que no se pueden detectar en levaduras, los falsos positivos son interacciones que no suceden en la realidad pero que sí se producen en el contexto del doble híbrido en levaduras (Lentze y Auerbach, 2008). Los resultados falsos positivos y falsos negativos pueden suceder por diferentes motivos, uno de estos puede ser el cambio de las proteínas de su ambiente biológico natural y su translocación al núcleo de las levaduras. Además, se puede producir la autoactivación del gen reportero por parte de la proteína cebo, lo que da lugar a falsos positivos (Oñate-Sánchez, 2018). Cabe destacar que este problema de los resultados falsos o erróneos es inherente a la técnica, y por tanto, afecta también a las distintas modificaciones o adaptaciones que se derivan de esta como su aplicación a gran escala (Suter *et al.*, 2008). De igual modo, también afecta a sus variantes como es el caso por ejemplo, del sistema del triple híbrido en levaduras (Rezwan y Auerbach, 2012).

Para intentar evitar el problema de los resultados falsos, se han realizado diferentes modificaciones a la técnica. Una aproximación que se ha hecho para evitar los falsos positivos es que la cepa de levadura cuente con más de un gen reportero y que cada uno de ellos esté inducido por un promotor diferente (James *et al.*, 1996). Aun así, los resultados obtenidos mediante el sistema del doble híbrido en levaduras deben verificarse mediante otras técnicas independientes (Guo *et al.*, 2008). Por ejemplo, los mapas de interacciones proteicas generados mediante el método del doble híbrido en levaduras tienen que ser comprobados con otras técnicas alternativas como pueden ser la co-inmunoprecipitación, o posteriores ensayos *in vitro* (Hamdi y Colas, 2012).

Pero estos resultados erróneos no son la única desventaja de la técnica, sino que el sistema del doble híbrido en levaduras presenta otras limitaciones como el hecho de que las proteínas interactúen en células de mamíferos, por ejemplo, no implica que lo vayan a hacer en levaduras (Topcu y Borden, 2000). El sistema del doble híbrido en levaduras no puede detectar interacciones proteicas que dependan de modificaciones postraduccionales que no tienen lugar en levaduras. Esta limitación puede afectar a interacciones proteicas que jueguen papeles cruciales en rutas reguladoras cuya desregulación cause enfermedades. Además, la toxicidad de algunas proteínas frente a levaduras es un problema técnico limitante (Hamdi y Colas, 2012). Por otra parte, el sistema del doble híbrido en levaduras no se puede usar con proteínas que tengan actividad transcripcional intrínseca por la posibilidad de autoactivación. Además, la necesidad de que las interacciones proteicas sucedan en el núcleo (pues la

técnica se basa en la actividad del factor transcripcional (Fetchko y Stagljar, 2004)) de la levadura imposibilita el estudio de determinados tipos de proteínas como pueden ser las proteínas integrales de membrana (Oñate-Sánchez, 2018). En la Tabla 1 se recogen las principales ventajas y desventajas de esta técnica.

TABLA 1. Principales ventajas y desventajas del sistema del doble híbrido en levaduras (Hollingsworth y White, 2004).

<u>VENTAJAS</u>	<u>DESVENTAJAS</u>
Barato, simple y versátil	El ambiente celular de levaduras no es el mismo que el de mamíferos
Permite el análisis de las interacciones proteicas <i>in vivo</i>	Las interacciones siempre se evalúan en el núcleo celular
Detecta interacciones débiles o incluso transitorias	No aplicable a las proteínas de membrana
Presenta múltiples variantes para distintas aplicaciones	Falsos positivos y falsos negativos
Permite la detección de nuevas interacciones mediante la utilización de librerías de proteínas de fusión obtenidas de ADNc	
Puede utilizarse para el mapeo de las interacciones proteicas a escala genómica	

Una de las razones principales del tremendo éxito de la metodología del doble híbrido en levaduras fue su oportunidad. Esto es, hasta su desarrollo, el estudio de las interacciones proteicas era una tarea ardua y casi exclusivamente bioquímica. Otra razón para el éxito de esta metodología la constituye su gran versatilidad, la cual ha permitido el desarrollo de ensayos similares con aplicaciones en el descubrimiento de fármacos (Hamdi y Colas, 2012). No obstante, en la actualidad el éxito de las técnicas basadas en el doble híbrido se debe a que permiten una determinación fácil, barata y rápida de las interacciones proteicas en un ambiente celular *in vivo*. Además, su posibilidad de escalado para ensayos *high-throughput* (de alto rendimiento) que permiten estudios experimentales a escala proteómica es otro aspecto clave (Oñate-Sánchez, 2018). Cabe destacar que el sistema del doble híbrido en levaduras cobra aún mayor importancia si se tiene en cuenta que la mayoría del conocimiento sobre las redes de interacciones proteicas proviene de datos derivados de esta técnica (Suter *et al.*, 2008). Por todo esto, el sistema del doble híbrido en levaduras es aún a día de hoy una de las técnicas más utilizadas para el estudio de las interacciones proteína-proteína junto con las técnicas proteómicas basadas en espectrometría de masas (Patrício y Fardilha, 2020).

4.2. VARIANTES DEL SISTEMA DEL DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURAS

Muchas de las variantes adicionales del sistema del doble híbrido en levaduras se diseñaron para compensar algunas de las limitaciones inherentes a este sistema (Fetchko y Stagljar, 2004). Así pues, el sistema del doble híbrido de membrana o *split-ubiquitin system* (sistema de partición de ubiquitina) se usa para analizar las interacciones que impliquen proteínas solubles no nucleares. Este ensayo se diseñó específicamente para eliminar la limitación impuesta por el sistema del doble híbrido clásico donde todas las interacciones tienen que ocurrir en el núcleo (Joshi *et al.*, 2019). Otra variante para este mismo propósito sería el sistema basado en el reclutamiento de Ras (Zhu *et al.*, 2016). Esto es importante porque las proteínas transmembrana suponen una buena parte del total de proteínas y por tanto, de las posibles dianas para fármacos, por lo que el desarrollo de técnicas capaces de identificar interacciones que involucren a este tipo de proteínas es muy importante desde el punto de vista farmacológico (Hollingsworth y White, 2004).

En lo que a los hospedadores se refiere, además de en levaduras, este sistema del doble híbrido se puede aplicar también a bacterias y a células de mamíferos (Guo *et al.*, 2008). El primer método para identificar interacciones proteína-proteína en mamíferos se llevó a cabo en 1991 por Dang y colaboradores, y desde entonces se han descrito múltiples aplicaciones de la técnica, principalmente centradas en el reconocimiento de rutas de señalización desreguladas en enfermedades. A pesar de algunas de las ventajas del doble híbrido en mamíferos frente al doble híbrido en levaduras clásico, este sistema en mamíferos presenta limitaciones prácticas, ya que el cultivo de células de mamífero es mucho más complejo y costoso y por tanto, es más difícil de implementar en el laboratorio en comparación con el sistema del doble híbrido clásico (Patrício y Fardilha, 2020).

De 1991 a 1993, distintos grupos de investigadores describieron sistemas de doble híbrido en levaduras optimizados para el trabajo con librerías de presas, por lo que desde entonces tanto esta técnica como sus variantes se pueden utilizar para estudios a escala genómica completa (Izumchenko *et al.*, 2007).

Cabe destacar que para analizar inhibidores de las interacciones proteicas se desarrollaron modalidades reversas de las técnicas del doble híbrido. Un ejemplo de esto lo constituyen el doble híbrido y el mono híbrido reverso en levaduras (Vidal *et al.*, 1996). En concreto, por su importancia en el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas, en este trabajo nos centraremos más *in extenso* en la variante conocida como el sistema del doble híbrido reverso en levaduras (Suter *et al.*, 2008). Esta variante se ha adaptado para poder detectar inhibidores de las interacciones proteína-proteína tales como mutaciones o pequeñas moléculas que puedan tener interés terapéutico (Hollingsworth y White, 2004). El nombre se debe a que la selección se revierte de positiva a negativa, esto es,

ahora la interacción proteica entre una proteína cualquiera “X” unida a un dominio de unión a ADN y una proteína cualquiera “Y” unida a un dominio de activación transcripcional provoca la reconstitución del factor de transcripción híbrido que activa un gen reportero tóxico, provocando la muerte de la levadura. No obstante, si se añade un agente que impida la interacción proteica como una molécula de bajo peso molecular, se evita la expresión del gen tóxico y la célula no muere. Por tanto, con esta técnica se pueden escanear librerías de moléculas pequeñas para identificar posibles inhibidores de una interacción terapéuticamente relevante (Rezwan y Auerbach, 2012). En la Figura 3 se ejemplifica de manera gráfica el fundamento de esta variante.

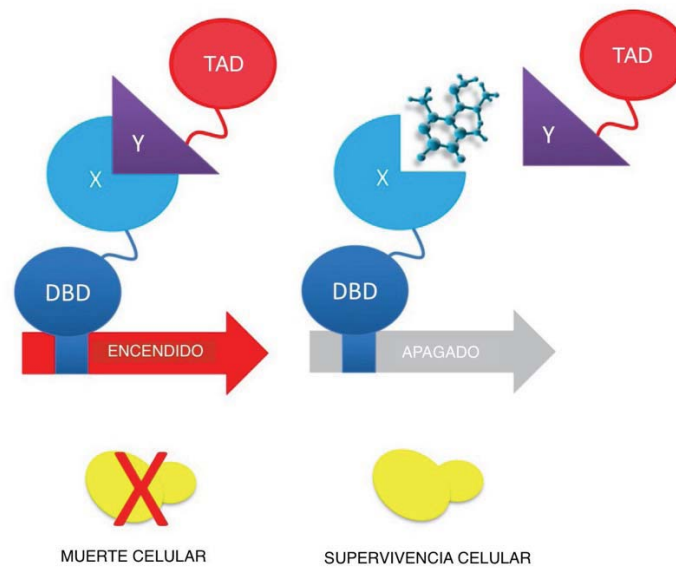


FIGURA 3. Fundamento del sistema del doble híbrido reverso en levaduras. La adición de una molécula pequeña que interfiera con la interacción entre la proteína X unida al dominio de unión a ADN (DBD) y la proteína Y unida al dominio de activación transcripcional (TAD) no activa la transcripción del gen tóxico, por lo que la célula sobrevive. Imagen adaptada de Rezwan y Auerbach, 2012.

En la Tabla 2 se recogen algunas de las principales variantes del sistema del doble híbrido en levaduras junto con sus características destacadas.

TABLA 2. Características clave de algunas de las principales variantes de los sistemas del doble híbrido, del mono híbrido y del triple híbrido en levaduras (Suter *et al.*, 2008).

<u>VARIANTE DEL DOBLE HÍBRIDO</u>	<u>CARACTERÍSTICAS DESTACADAS</u>
Doble híbrido en levaduras	Permite el estudio de las interacciones proteicas en el núcleo celular
<i>Split-ubiquitin system</i>	Permite el estudio de las interacciones proteicas entre proteínas solubles de membrana o citosólicas
Doble híbrido en bacterias	Permite el estudio de las interacciones proteína-proteína en bacterias
Doble híbrido en mamíferos	Permite el estudio de las interacciones proteína-proteína en células de mamíferos
Doble híbrido reverso en levaduras	Permite detectar la interferencia en una interacción entre proteínas
Mono híbrido en levaduras	Permite detectar proteínas capaces de unirse a una determinada secuencia de ADN
Triple híbrido en levaduras	Permite detectar tanto proteínas capaces de unirse a una determinada secuencia de ARN como interacciones ternarias entre proteínas. Su adaptación para moléculas pequeñas permite detectar interacciones entre moléculas de bajo peso molecular y proteínas

Es importante resaltar que dentro de cada variante del sistema del doble híbrido en levaduras hay distintas subvariantes y modificaciones ya que esta es una técnica en constante desarrollo. Un ejemplo de esto es la existencia de técnicas intermedias como es el *one-and-a-half hybrid* (sistema del uno y medio híbrido), que es una variante que permite analizar las proteínas que se unen de manera condicional al ADN (Guo *et al.*, 2008). De este modo, las mejoras y modificaciones del sistema original han permitido ampliar el espectro de acción de la técnica permitiéndole tareas como detectar interacciones entre distintas proteínas víricas y diferentes células (Guo *et al.*, 2008), la detección de interacciones proteicas a escala genómica, el análisis de las interacciones molécula pequeña-proteína o estudiar los agentes que bloqueen o modifiquen las interacciones proteicas (Lentze y Auerbach, 2008). Por lo que, además de para el descubrimiento de fármacos, el doble híbrido también tiene otras muchas aplicaciones como pueden ser la determinación concreta de la secuencia de interacción entre las proteínas, el estudio de la estructura de las proteínas y el análisis de la estructura del interactoma de las proteínas (Joshi *et al.*, 2019).

4.3. FUNDAMENTO DEL SISTEMA DEL MONO HÍBRIDO EN LEVADURAS

El sistema del mono híbrido en levaduras es una variante del sistema del doble híbrido que se desarrolló a principios de la década de 1990 (Reece-Hoyes y Walhout, 2012). Esta variante permite identificar *in vivo* proteínas capaces de interaccionar físicamente con una secuencia de ADN dada (MacDonald, 2001). Por tanto, en este caso nos centraremos en las interacciones físicas entre los factores de transcripción y sus sitios de ADN diana en el genoma (Reece-Hoyes y Walhout, 2012).

En el sistema del mono híbrido en levaduras clásico están implicados dos componentes principales, el ADN de interés o cebo que se localiza en posición 5' respecto de un gen reportero cuya expresión pueda ser fácilmente detectable, y una proteína híbrida o presa (de ahí el nombre de mono híbrido, pues únicamente hay una molécula híbrida) compuesta por la fusión entre un factor de transcripción de interés y un dominio de activación transcripcional. Ambos componentes se introducen en una cepa de levadura y, si el factor de transcripción híbrido se une al ADN de interés en el núcleo de la levadura, el dominio de activación induce la expresión del gen reportero. Cabe destacar que el dominio de activación transcripcional en levaduras activa al reportero sin importar si el factor de transcripción es un activador o un represor, por lo que este sistema únicamente nos indica que se produjo la interacción ADN-proteína (Reece-Hoyes y Walhout, 2012). En la Figura 4 se esquematiza el fundamento de este sistema.

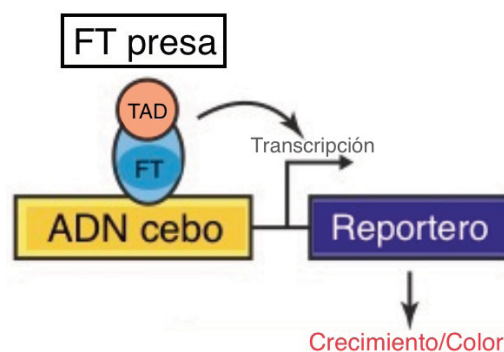


FIGURA 4. Fundamento del sistema del mono híbrido en levaduras. El ADN cebo se utiliza para “pescar” factores de transcripción (FT) presa que están unidos a un dominio de activación transcripcional (TAD). La interacción entre el ADN cebo y el factor transcripcional presa se detecta por crecimiento (marcadores auxotróficos) o por color (enzimas como el de la β -galactosidasa). Imagen adaptada de Oñate-Sánchez, 2018.

Con esta técnica se han descubierto multitud de factores de transcripción y además, el análisis de las mutaciones tanto de las proteínas de unión a ADN como de la propia secuencia de ADN facilita el mapeo de contactos clave y secuencias de reconocimiento para estas interacciones ADN-proteína (Hollingsworth y White, 2004).

Hay que destacar que, al igual que pasa con la técnica original del doble híbrido en levaduras, dentro de la variante mono híbrido en levaduras también existen distintas adaptaciones que dan lugar a subvariantes. Por ejemplo, una modificación del sistema del mono híbrido en levaduras es utilizar más de una construcción reportera, pero aunque esto reduce la incidencia de resultados falsos positivos, aumenta la duración del ensayo (Reece-Hoyes y Walhout, 2012).

4.4. FUNDAMENTO DEL SISTEMA DEL TRIPLE HÍBRIDO EN LEVADURAS

En 1996, dos laboratorios desarrollaron de manera independiente el sistema del triple híbrido en levaduras (Martin, 2012). Al igual que el sistema del doble híbrido en levaduras y del mono híbrido en levaduras, esta es una técnica que se basa en la genética de las levaduras para analizar interacciones *in vivo*, en este caso concreto, interacciones ARN-proteína (SenGupta *et al.*, 1996).

Como su propio nombre indica, en este sistema se usan tres moléculas híbridas o quiméricas. Una proteína híbrida que contiene el primer dominio de unión a ARN fusionado con el dominio de unión a ADN que se localiza aguas arriba del promotor de un determinado gen reportero, otra proteína híbrida que contiene el segundo dominio de unión a ARN unido a un dominio de activación transcripcional que activará la transcripción del gen reportero y, por último, un ARN híbrido que contiene dos sitios de reconocimiento, uno para cada uno de los dominios de unión a ARN de las dos proteínas híbridas. Este ARN híbrido une las dos proteínas híbridas entre sí, resultando en un complejo tripartito que provoca la expresión del gen reportero (SenGupta *et al.*, 1996). En la Figura 5 se representa de manera gráfica el fundamento del sistema del triple híbrido para el estudio de las interacciones ARN-proteína.

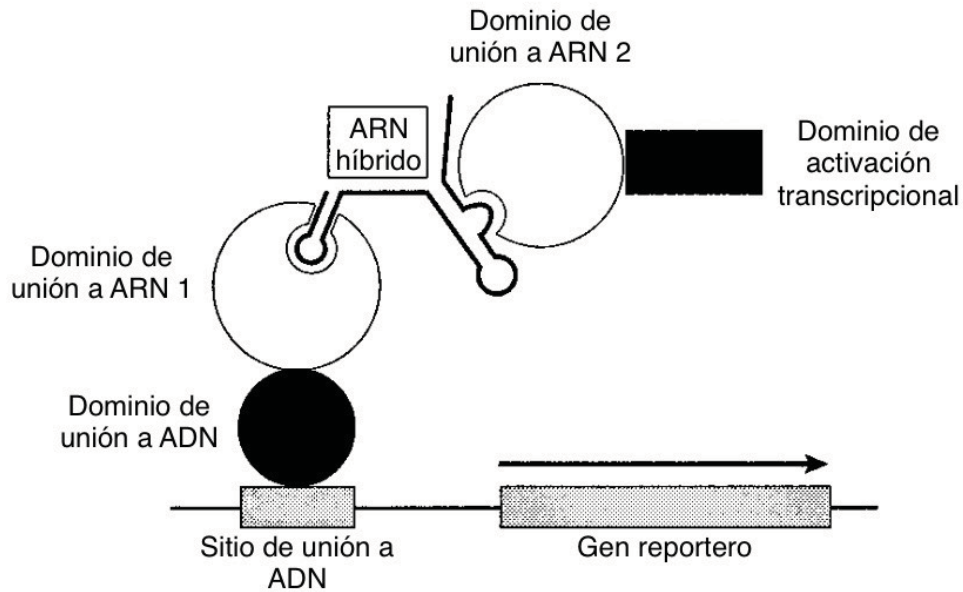


FIGURA 5. Fundamento del sistema del triple híbrido en levaduras. Se fusiona un dominio de unión a ADN con el receptor para uno de los dominios del ARN híbrido y, un dominio de activación transcripcional con el receptor para otro de los dominios del ARN híbrido. Cuando las proteínas con los dominios de unión a ADN y de activación transcripcional se aproximan gracias al ARN híbrido, se produce la transcripción del gen reportero. Imagen adaptada de SenGupta *et al.*, 1996.

Cabe destacar que, al igual que para el sistema del doble híbrido en levaduras y del mono híbrido en levaduras, este primer concepto del triple híbrido en levaduras también se adaptó para poder generar subvariantes que permitiesen estudiar interacciones diferentes tales como interacciones ARN-ARN (Martin, 2012) o interacciones triméricas entre proteínas (Xing *et al.*, 2016). No obstante, en este trabajo nos centraremos en la variante del sistema del triple híbrido en levaduras que permite estudiar las interacciones molécula pequeña-proteína diana por su importancia para el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas (Lentze y Auerbach, 2008). En esta variante que se conoce como sistema del triple híbrido para moléculas pequeñas o de bajo peso molecular en levaduras, como cabía esperar, uno de los componentes de la interacción es una molécula pequeña como puede ser por ejemplo un fármaco, de ahí su importancia terapéutica. A la molécula pequeña a investigar se le unen un conector y un ancla. La función del conector es generar un puente de unión flexible entre la molécula pequeña de interés y el ancla. Por su parte, el ancla sirve para unir toda esta estructura a una proteína híbrida cebo que consta de la proteína diana del ancla y un dominio de unión a ADN (Rezwan y Auerbach, 2012). Por tanto, como el compuesto de interés se une al cebo por el ancla, esta molécula pequeña queda libre para poder interactuar con otras proteínas (Lentze y Auerbach, 2008). El último componente de la interacción lo constituye una proteína híbrida presa que consta de la proteína diana de la molécula pequeña unida a un dominio de activación transcripcional. Puesto que la molécula pequeña queda libre, si la proteína híbrida presa interactúa con esta, se activa un gen reportero

que permite el crecimiento celular en un medio selectivo (Rezwan y Auerbach, 2012). De este modo se puede identificar qué proteínas se unen al compuesto de interés que quedó libre (Lentze y Auerbach, 2008). En la Figura 6 se representa de manera gráfica el fundamento de esta adaptación del sistema del triple híbrido para el estudio de las interacciones molécula pequeña-proteína en levaduras.

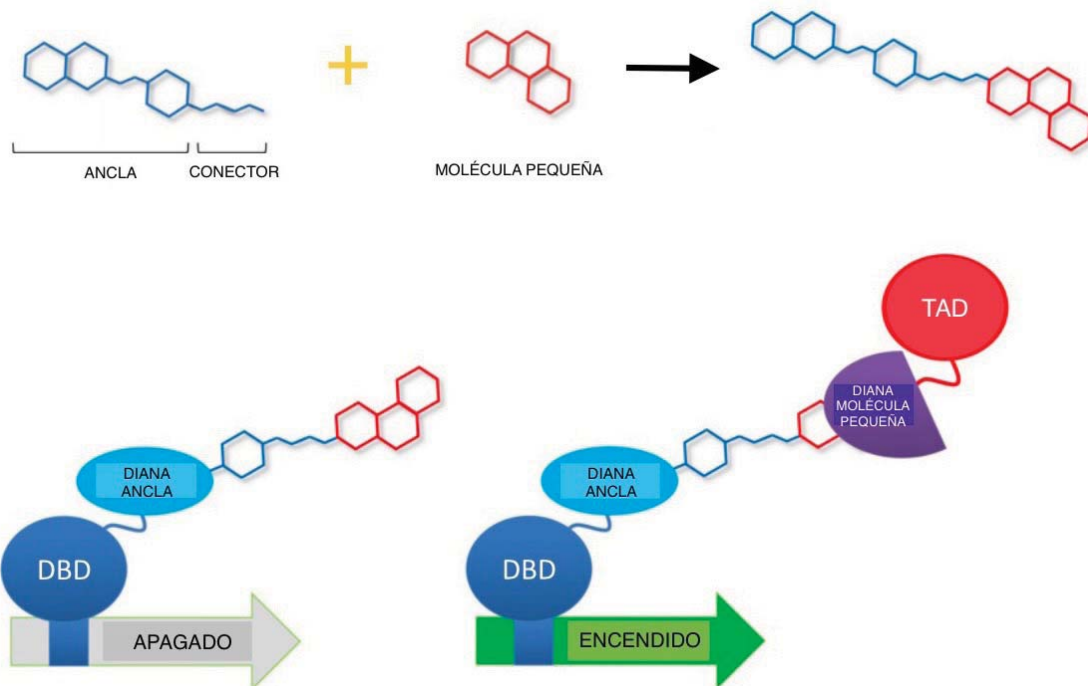


FIGURA 6. Fundamento del sistema del triple híbrido para moléculas pequeñas en levaduras. La molécula pequeña de interés se une al dominio de unión a ADN (DBD) mediante la interacción del ancla con su diana, por lo que esta molécula pequeña queda libre para poder interactuar con su propia proteína diana que está unida a un dominio de activación transcripcional (TAD). Si se produce la interacción de la molécula pequeña con su diana, se activa el gen reportero. Imagen adaptada de Rezwan y Auerbach, 2012.

4.5. EL SISTEMA DEL DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURAS EN EL DESCUBRIMIENTO DE NUEVAS DIANAS TERAPÉUTICAS


Las interacciones físicas proteína-proteína cobran aún mayor relevancia terapéutica si se tiene en cuenta que las proteínas que causan enfermedades con cuadros clínicos similares son más susceptibles de interactuar entre sí y formar subredes interconectadas (Ruffner *et al.*, 2007). Si nos centramos en las interacciones proteicas, el número de posibles nuevas dianas terapéuticas aumenta, pues se estima que el tamaño del interactoma humano (red de interacciones que describe la totalidad de las interacciones físicas entre proteínas que se producen en un determinado organismo) es considerablemente superior al del proteoma (conjunto de proteínas totales de un organismo dado). No obstante, hay que resaltar que muchas de las interacciones proteicas aún no se conocen, por lo que se desconocen muchas de las posibles dianas para fármacos (Sugaya *et al.*, 2007).

Por su parte, el descubrimiento de fármacos es un proceso complejo que incluye la identificación tanto de dianas biológicas como de moléculas capaces de alterar o inhibir la función de una determinada diana. En lo que a los compuestos que se pueden utilizar para bloquear las interacciones proteína-proteína se refiere, aunque en la teoría podrían usarse multitud de moléculas diferentes tales como anticuerpos, péptidos o moléculas pequeñas (compuestos de bajo peso molecular). Lo cierto es que, en la práctica, debido al coste, distribución en los tejidos, estabilidad y permeabilidad celular, son principalmente las moléculas pequeñas las que se utilizan como potenciales fármacos. De hecho, se ha visto que el concepto de inhibir una interacción proteína-proteína usando moléculas pequeñas se puede aplicar a cualquier enfermedad donde el bloqueo de la interacción pueda tener un beneficio terapéutico. Cabe destacar que estos candidatos a moléculas bioterapéuticas deben ser modificados para limitar su inmunogenicidad y para que se dirijan a los tejidos o células diana (Auerbach *et al.*, 2005).

El sistema del doble híbrido en levaduras es capaz tanto de identificar y validar dianas, como de detectar compuestos capaces de inhibir una interacción proteína-proteína diana. Además, este sistema en levaduras se ha usado tanto para identificar interacciones proteicas binarias como para estudios de interactoma a nivel de organismo (Patrício y Fardilha, 2020). Y, puesto que muchas de las proteínas con papel en las enfermedades humanas tienen ortólogos (genes homólogos en distintas especies que descienden de un gen de un ancestro común) en eucariotas inferiores como las levaduras, una ruta potencial para la identificación de nuevas dianas terapéuticas es identificar estos ortólogos y llevar a cabo escaneos de doble híbrido en levaduras para crear redes de interacciones que permitan identificar nuevos miembros implicados en estas redes en estos organismos modelo y luego tratar de transferir lo aprendido al contexto humano (Auerbach *et al.*, 2005).

Como se viene sugiriendo, el descubrimiento de otras moléculas que interaccionen con proteínas asociadas a enfermedades que no son manejables terapéuticamente hablando, es decir, proteínas hacia las que no se pueden dirigir fármacos directamente, ofrece la posibilidad de identificar estas interacciones como nuevas dianas terapéuticas. Un ejemplo de esto lo constituye el supresor de tumores p53, que se encuentra mutado en la mitad de los cánceres y cuya ruta está parcialmente inactivada en la otra mitad (Hamdi y Colas, 2012). El sistema del doble híbrido en levaduras se utilizó para identificar compañeros de interacción de este supresor tumoral y se vio que interaccionaba con la oncoproteína Mdm2, lo que posibilita identificar inhibidores de la interacción p53-Mdm2 (Ruffner *et al.*, 2007). Mdm2 media la ubiquitinización de p53 para su degradación (Hamdi y Colas, 2012). Por lo que, los tumores que sobre-expresan Mdm2 degradan a p53, impidiendo así sus efectos antitumorales. Por tanto, una estrategia para inhibir el crecimiento de tumores es inhibir la interacción p53-Mdm2 (Auerbach *et al.*, 2005). En concreto, se vio que las moléculas pequeñas denominadas “nutlinas” podían inhibir esta interacción (Ruffner *et al.*, 2007). Por esto, la interacción entre p53 y Mdm2 representa una diana interesante para el escaneo de inhibidores porque la interacción es terapéuticamente relevante y porque dadas las características de la interacción, es susceptible de ser inhibida por moléculas pequeñas (Auerbach *et al.*, 2005). Otro ejemplo de la relevancia del doble híbrido en levaduras para hacer frente a las enfermedades lo constituyen las ataxias. Las ataxias son un grupo de enfermedades neurodegenerativas que causan la pérdida del equilibrio y de la coordinación. Los estudios de doble híbrido en levadura para estas proteínas revelaron que muchas proteínas causantes de ataxia compartían compañeros de interacción comunes; algunos de los cuales se vio que regulaban la neurodegeneración en organismos modelo, por lo que estas interacciones pueden ser de importante valor terapéutico (Hamdi y Colas, 2012). En la Tabla 3 se recogen los distintos niveles de actuación del sistema del doble híbrido en levaduras para el estudio de las interacciones proteicas y su importancia para el desarrollo de fármacos.

TABLA 3. Distintos niveles de estudio de interacciones proteicas mediante el sistema del doble híbrido en levaduras y su relevancia para el descubrimiento de fármacos (Ruffner *et al.*, 2007).

<u>NIVEL DE ESTUDIO</u>		<u>IMPORTANCIA PARA EL DESCUBRIMIENTO DE FÁRMACOS</u>	<u>EJEMPLO</u>
	Búsqueda de interacciones a nivel del proteoma	Información contextual, relevancia para las enfermedades humanas	Muchos
	Rutas terapéuticamente relevantes	Posibles dianas de la ruta implicada en la enfermedad	Muchos
	Redes de interacciones proteicas implicadas en enfermedades	Información contextual de las proteínas causantes de enfermedades, correlación fenotipo-ruta	Ataxias
	Proteínas asociadas a enfermedades	Posibles inhibidores de la interacción proteína-proteína	p53-Mdm2

De igual modo, el sistema del doble híbrido *high-throughput* (de alto rendimiento) en levaduras se ha utilizado para construir mapas de interacción patógeno-hospedador. Algunos ejemplos de estos mapas implican patógenos infecciosos como el virus del SARS, el de la gripe o el del dengue, y permiten ampliar el conocimiento general sobre los mismos, así como descubrir nuevas dianas terapéuticas para fármacos futuros. No obstante, el doble híbrido en levaduras presenta algunas limitaciones a la hora de generar estos mapas de interacciones proteicas pues ya se ha comentado la incidencia de los falsos positivos y falsos negativos en los resultados obtenidos mediante esta técnica (Hamdi y Colas, 2012).

Como se viene diciendo, dada la versatilidad del sistema del doble híbrido en levaduras, esta técnica no solo permite conocer un gran número de interacciones proteicas y hasta interactomas completos, sino que distintas adaptaciones de esta técnica de doble híbrido posibilitan dirigirse a las interacciones proteicas individuales con finalidad terapéutica. En concreto, el sistema del doble híbrido reverso en levaduras y el sistema del triple híbrido para el estudio de las interacciones molécula pequeña-proteína en levaduras son las principales variantes que permiten evaluar el efecto de las moléculas de bajo peso molecular en las interacciones proteicas en un ambiente fisiológico. Por tanto, estas técnicas permiten encontrar moléculas pequeñas capaces de impedir las interacciones proteicas (Suter *et al.*, 2008).

Con el sistema del doble híbrido reverso en levaduras se pudieron identificar compuestos capaces de interrumpir la interacción entre proteínas implicadas en el cáncer como las oncoproteínas Ras y Raf-1. Además, con esta técnica también se consiguió aislar mutantes de una librería de proteínas de VIH (virus

de inmunodeficiencia humana) que habían perdido la capacidad de unirse a células humanas. Por tanto, como se viene diciendo, esto permite caracterizar interacciones proteína-proteína terapéuticamente importantes y abre nuevas posibilidades para la intervención terapéutica (Rezwan y Auerbach, 2012).

Mientras que el sistema del doble híbrido reverso en levaduras evalúa la interrupción de las interacciones proteicas, el sistema del triple híbrido en levaduras permite escanear proteínas que interactúan directamente con una molécula pequeña específica *in vivo* (Suter *et al.*, 2008). Por tanto, con esta variante de triple híbrido para moléculas pequeñas en levaduras se estudian las interacciones molécula pequeña-proteína en lugar de las interacciones proteína-proteína (Lentze y Auerbach, 2008). Dado que el sistema del triple híbrido en levaduras permite estudiar las interacciones de compuestos de bajo peso molecular con proteínas, este sistema se puede usar para el descubrimiento de fármacos (Hollingsworth y White, 2004). El descubrimiento y desarrollo eficiente de inhibidores de molécula pequeña capaces de evitar las interacciones proteína-proteína depende de aproximaciones *high-throughput* (de alto rendimiento) para poder identificar a gran escala y rápidamente posibles candidatos. Además, puesto que se trata de un ensayo con células vivas, los compuestos que muestren toxicidad o baja permeabilidad celular no lograrán pasar la criba de este método. Posiblemente, una de las aplicaciones más relevantes del sistema del triple híbrido en levaduras para el descubrimiento de fármacos es el estudio de inhibidores de quinasas dependientes de ciclina por su importancia en la regulación del ciclo celular (Lentze y Auerbach, 2008).

Por otro lado, comprender las interacciones ADN-proteína y las funciones de los factores de transcripción es crucial para el descubrimiento de dianas terapéuticas, una variante del sistema ya comentada, el sistema del mono híbrido en levaduras, es una de las técnicas más empleadas para esto porque permite caracterizar dominios proteicos capaces de regular la transcripción. Y esto desde un punto de vista farmacológico puede ser particularmente útil para estudiar reguladores de las dianas de los factores de transcripción (Hollingsworth y White, 2004).

A pesar de que los sistemas basados en la genética de levaduras presentan ventajas como la eficiencia de transformación y el rápido crecimiento celular, la posibilidad de estudiar las interacciones proteicas en otros tipos celulares, en concreto, en células de mamíferos es particularmente relevante para la investigación farmacéutica (Hollingsworth y White, 2004). Esto es así porque permite identificar y modular las interacciones proteína-proteína en un ambiente que simula el contexto celular en el que de manera natural ocurren las interacciones. Además, se puede aplicar a distintas líneas celulares y permite el estudio de las interacciones proteína-proteína en un tejido específico (Patrício y Fardilha, 2020). Así pues, los ensayos en células de mamíferos pueden usarse

para validar los resultados de doble híbrido en levaduras y proveen la oportunidad de testar interacciones que pueden requerir modificaciones postraduccionales o cofactores no disponibles en las células de levaduras (Hollingsworth y White, 2004). El doble híbrido en mamíferos con la aproximación *high-throughput* (de alto rendimiento) se puede aplicar para la investigación terapéutica, permitiendo evaluar los efectos de fármacos y moléculas pequeñas en interacciones proteína-proteína concretas, posibilitando el desarrollo de tratamientos específicos de diana. Por ejemplo, en la investigación contra el cáncer se ha podido incrementar la identificación de fármacos capaces de inhibir y/o modular las interacciones proteína-proteína implicadas en la supresión de tumores y en la resistencia quimioterapéutica. No obstante, aunque la mayoría de estudios usando el doble híbrido en mamíferos para el descubrimiento de fármacos se han centrado en el cáncer, el doble híbrido en mamíferos con la aproximación *high-throughput* (de alto rendimiento) también se puede aplicar a la modulación de interacciones proteína-proteína en otros contextos; como por ejemplo, para estudiar las interacciones proteína-proteína implicadas en la movilidad o disfunción espermática, permitiendo identificar dianas para su tratamiento y por tanto, desarrollar fármacos contra la infertilidad masculina. Asimismo, esta técnica también se puede aplicar en el campo de las infecciones víricas ya que permite el desarrollo de antivirales (Patrício y Fardilha, 2020).

En la Tabla 4 se resumen las aplicaciones mencionadas del sistema del doble híbrido en levaduras y de sus variantes en el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas. Pero estos solo son algunos ejemplos del posible papel del doble híbrido y sus variantes para hacer frente a distintas enfermedades, pues este sistema ha madurado lo suficiente como para interrogar de manera sistemática la interconectividad entre las rutas de transducción de señales relevantes y las proteínas implicadas en enfermedades, como se ejemplificó con p53 (Ruffner *et al.*, 2007) y como es el caso de las proteínas implicadas en ataxias (Hamdi y Colas, 2012).

TABLA 4. Posibles aplicaciones del sistema del doble híbrido en levaduras y sus distintas variantes para el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas. Y2H=*yeast two-hybrid* o doble híbrido en levaduras; M2H=*mammalian two-hybrid* o doble híbrido en mamíferos; rY2H=*reverse yeast two-hybrid* o doble híbrido reverso en levaduras; Y3H=*yeast three-hybrid* o triple híbrido en levaduras; Y1H=*yeast-one hybrid* o mono híbrido en levaduras.

<u>TÉCNICAS</u>	<u>CARACTERÍSTICAS</u>	<u>APLICACIONES</u>
Y2H vs M2H	Detección de interacciones proteína-proteína; estudios a nivel de interactoma; mapas de interacción patógeno-hospedador	Y2H → p53-Mdm2 (Ruffner <i>et al.</i> , 2007); ataxias (Hamdi y Colas, 2012)
		M2H → validar los resultados de Y2H y testar interacciones proteicas no posibles en levaduras (Hollingsworth y White, 2004); cáncer; infertilidad masculina; infecciones víricas (Patrício y Fardilha, 2020)
rY2H vs Y3H	Inhibición de interacciones proteína-proteína por parte de moléculas pequeñas	rY2H → detectar la rotura de las interacciones proteína-proteína (Suter <i>et al.</i> , 2008); Ras y Raf-1; VIH (Rezwan y Auerbach, 2012)
		Y3H → detectar interacciones proteína-molécula pequeña (Suter <i>et al.</i> , 2008); inhibidores de quinasas dependientes de ciclina (Lentze y Auerbach, 2008)
Y1H	Caracterización de proteínas capaces de unirse a ADN y activar la transcripción	Y1H → reguladores de las dianas de los factores de transcripción (Hollingsworth y White, 2004)

En resumen, el sistema del doble híbrido en levaduras ha evolucionado para posibilitar la creación de técnicas capaces de intervenir en el desarrollo de fármacos (Lentze y Auerbach, 2008). Sin embargo, aunque estos métodos son fiables, su aplicación en el descubrimiento de fármacos presenta limitaciones (Suter *et al.*, 2008). Por ejemplo, se pueden escanear moléculas pequeñas capaces de inhibir las interacciones proteicas en levaduras, pero siguen existiendo ciertas limitaciones como por ejemplo la especificidad a la hora de dirigirse a las interfaces de interacción de las proteínas. Este es el caso por ejemplo de las moléculas pequeñas identificadas originalmente como bloqueantes de la interacción p53-Mdm2, pues estas moléculas también afectan a la interacción del homólogo de p53, p73 con Mdm2. El uso de sistemas de doble híbrido más avanzados como el sistema del doble cebo o *dual bait system* desarrollado por Kato-Stankiewicz y colaboradores, puede ayudar a seleccionar inhibidores de las interacciones proteicas específicas al permitir investigar el

efecto de una molécula pequeña particular en muchas interacciones proteicas a la vez (Lentze y Auerbach, 2008). Por otro lado, el problema de los falsos positivos y los falsos negativos en los escaneos de doble híbrido, así como la activación del gen reportero cuando a lo mejor ni siquiera ha sucedido la interacción proteica siguen estando presentes. No obstante, existen técnicas como la del doble híbrido en mamíferos que tratan de solventar estas limitaciones reduciendo la incidencia de estos resultados erróneos (Patrício y Fardilha, 2020). De igual modo, otras técnicas como el sistema del doble híbrido de membrana en levaduras o *split-ubiquitin system* permiten soslayar limitaciones inherentes del sistema del doble híbrido en levaduras como puede ser la necesidad de que las interacciones proteicas ocurran en el núcleo y de este modo evaluar el efecto de las moléculas pequeñas en las interacciones proteicas que involucran proteínas de membrana (Lentze y Auerbach, 2008). No obstante, a pesar de las limitaciones de estas técnicas y de la necesidad de mejorar ciertos aspectos, variantes como la del triple híbrido siguen constituyendo técnicas rápidas y directas para el descubrimiento de nuevos posibles fármacos hacia una diana terapéutica concreta (Rezwan y Auerbach, 2012).

5. DISCUSIÓN

Como se viene diciendo, existen dos grandes grupos de técnicas para el estudio de las interacciones proteicas, los métodos bioquímicos y los métodos genéticos. La base de estos dos grandes grupos es diferente, pues mientras que en los métodos bioquímicos el estado de interacción de las proteínas se establece trabajando directamente con los complejos proteicos, en los métodos genéticos la composición de los complejos proteicos se determina de manera indirecta haciendo uso de los genes (Fetchko y Stagljär, 2004). No obstante, es difícil afirmar que un método o una técnica en concreto sea superior a otra en todos los aspectos. Así pues, dado que todas las técnicas tienen sus ventajas y desventajas, una técnica concreta puede resultar más útil para un tipo de proteínas y otra técnica para otro tipo, es decir, todo depende de lo que se quiera estudiar y del tipo de estudio que se pretenda llevar a cabo, pues no es lo mismo un ensayo simple de una interacción proteica dada que un ensayo a gran escala a nivel de interactoma, por ejemplo (Joshi *et al.*, 2019). Por tanto, quizá ver las distintas técnicas como complementarias y no como excluyentes entre sí sea una buena opción. Este podría ser el caso por ejemplo del método bioquímico de la co-inmunoprecipitación y del método genético del doble híbrido. Esto es, mientras que la técnica de doble híbrido en levaduras es una técnica *in vivo*, económicamente rentable y que permite el uso de ensayos *high-throughput* o a gran escala, dada la incidencia de resultados falsos positivos y falsos negativos de esta técnica, es necesario verificar los resultados obtenidos mediante la misma con otras técnicas alternativas. Y aquí es donde entraría en juego la técnica de co-inmunoprecipitación, pues de detectarse por ejemplo una posible interacción candidata a ser diana terapéutica mediante el sistema del doble

híbrido en levaduras, la técnica de co-inmunoprecipitación confirmaría si dicha interacción existe en las células originales o es un mero artefacto del doble híbrido. Sin embargo, cabe destacar que la confirmación individual de las interacciones proteicas con técnicas alternativas como la co-inmunoprecipitación no siempre es posible para los datos generados mediante doble híbrido a gran escala, por lo que el desarrollo de técnicas bioinformáticas que permitan eliminar los falsos positivos cobra especial importancia (Suter *et al.*, 2008).

En lo que al futuro del uso del doble híbrido para el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas se refiere, lo cierto es que, desde su invención hace tres décadas, el sistema del doble híbrido en levaduras se ha perfeccionado y adaptado para expandir su campo de actuación, lo cual ha sido fundamental para permitir conocer los complejos sistemas biológicos. Sin embargo, a pesar de sus avances, a esta técnica aún le quedan retos a los que hacer frente. Por ejemplo, la necesidad de combinar múltiples métodos del doble híbrido para maximizar la identificación de verdaderas interacciones dificulta crear un interactoma completo. Aún así, a día de hoy, el método del doble híbrido sigue siendo la manera más efectiva de generar mapas de interacciones binarias de alta calidad y también es el más adecuado para obtener información que permita conocer los eventos moleculares y genéticos que aumenten o disminuyan la susceptibilidad para un amplio rango de enfermedades humanas (Oñate-Sánchez, 2018). Por tanto, aunque hacer predicciones prospectivas es siempre una tarea arriesgada, especialmente cuando se trata de un campo complejo y de rápido desarrollo como es el descubrimiento de fármacos, una predicción bastante probable es que los escaneos de doble híbrido *high-throughput* (de alto rendimiento) seguirán siendo el método de referencia para construir interactomas, ya que se beneficiarán de los constantes avances tecnológicos y posiblemente se desarrollen nuevos conceptos. De este modo, se cree que se continuarán desarrollando métodos del doble híbrido versátiles, de *ultrahigh-throughput* (ultra-alto rendimiento), robustos en cuanto a fiabilidad, económicamente rentables y altamente sensibles. Con estos avances los métodos del doble híbrido se pueden aplicar a nuevas fronteras como construir herramientas médicas de alta precisión para el diagnóstico de pacientes al describir el interactoma de las variantes específicas del paciente o prediciendo su respuesta a fármacos. Asimismo, el desarrollo de fármacos terapéuticos que son específicos contra determinadas interacciones proteicas específicas está empezando a surgir. Estos esfuerzos van a estar facilitados en el futuro por los avances tecnológicos en los métodos de doble híbrido, ya que uno de los mayores cuellos de botella tecnológicos implica testar un gran número de interacciones proteicas terapéuticamente relevantes frente a un vasto número de pequeñas moléculas para descubrir compuestos que sean moduladores de las interacciones proteicas de manera específica. En resumen, el campo de la interactómica y su continua evolución resulta prometedor para avanzar en el campo de la biología y de la medicina, así como para entender y tratar de

controlar de manera precisa las complejas redes biológicas (Hamdi y Colas, 2012). En concreto, un importante objetivo para el futuro es tratar de conocer cómo cambian los interactomas bajo determinadas condiciones fisiológicas o bajo los distintos estadios de una enfermedad (Oñate-Sánchez, 2018).

6. CONCLUSIONES/CONCLUSIÓNS/CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

Desde su descubrimiento en 1989, el sistema del doble híbrido en levaduras se ha utilizado para el estudio de las interacciones entre proteínas con notable éxito. Además, han surgido muchas adaptaciones y variantes de este sistema incluyendo las variantes mono híbrido (interacciones ADN-proteína) y triple híbrido (interacciones ARN-proteína) con el objetivo de solventar algunas de sus inherentes limitaciones, así como para ampliar su rango de aplicación. Una de las últimas y exitosas aplicaciones de este sistema es que permite la identificación de nuevas dianas terapéuticas para el desarrollo de fármacos útiles frente a numerosas enfermedades.

CONCLUSIÓNS

Desde o seu descubrimento no 1989, o sistema do dobre híbrido en lévedos utilízouse para o estudo das interaccións entre proteínas con notable éxito. Ademais, xurdiron moitas adaptacións e variantes deste sistema incluíndo as variantes mono híbrido (interaccións ADN-proteína) e triplo híbrido (interaccións ARN-proteína) co obxectivo de resolver algunhas das súas inherentes limitacións, así como para ampliar o seu rango de aplicación. Unha das últimas e exitosas aplicacións deste sistema é que permite a identificación de novas dianas terapéuticas para o desenvolvemento de fármacos útiles fronte a numerosas enfermidades.

CONCLUSIONS

Since its discovery in 1989, the yeast two-hybrid system has been used for studying interactions between proteins with remarkable success. Besides, many adaptations and variants of this system including the variants one-hybrid (DNA-protein interactions) and three-hybrid (RNA-protein interactions) have emerged in order to overcome some of its inherent limitations, as well as to expand its range of application. One of the newest and most successful applications of this system is that it allows the identification of new therapeutic targets for the development of useful drugs against several illnesses.

7. BIBLIOGRAFÍA

Artículos científicos:

- Alcântara, A., Bosch, J., Nazari, F., Hoffmann, G., Gallei, M., Uhse, S., Darino, M. A., Olukayode, T., Reumann, D., Baggaley, L. y Djamei, A. (2019). *Systematic Y2H screening reveals extensive effector-complex formation*. *Frontiers in Plant Science*, 10: 1-10.
- Auerbach, D., Arnoldo, A., Bogdan, B., Fetchko, M. y Stagljär, I. (2005). *Drug discovery using yeast as a model system: a functional genomic and proteomic view*. *Current Proteomics*, 2: 1-13.
- Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D. y Schlattner, U. (2009). *Yeast Two-Hybrid, a Powerful Tool for Systems Biology*. *International Journal of Molecular Sciences*, 10: 2763-2788.
- Coates, P. J. y Hall, P. A. (2003). *The yeast two-hybrid system for identifying protein-protein interactions*. *Journal of Pathology*, 199: 4-7.
- Erffelinck, M. L., Ribeiro, B., Perassolo, M., Pauwels, L., Pollier, J., Storme, V. y Goossens, A. (2018). *A user-friendly platform for yeast two-hybrid library screening using next generation sequencing*. *PLOS ONE*, 13: 1-21.
- Fashena, S. J., Serebriiskii, I. y Golemis, E. A. (2000). *The continued evolution of two-hybrid screening approaches in yeast: how to outwit different preys with different baits*. *Gene*, 250: 1-14.
- Fetchko, M. y Stagljär, I. (2004). *Application of the split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid system to investigate membrane protein interactions*. *Methods*, 32: 349-362.
- Fields, S. y Song, O. (1989). *A novel genetic system to detect protein-protein interactions*. *Nature*, 340: 245-246.
- Fields, S. y Sternglanz, R. (1994). *The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions*. *Trends in Genetics*, 10: 286-292.
- Hamdi, A. y Colas, P. (2012). *Yeast two-hybrid methods and their applications in drug discovery*. *Trends in Pharmacological Sciences*, 33: 109-118.
- Hollingsworth, R. y White, J. (2004). *Target discovery using the yeast two-hybrid system*. *Drug discovery today: TARGETS*, 3: 97-103.
- Hook, B., Bernstein, D., Zhang, B. y Wickens, M. (2005). *RNA-protein interactions in the yeast three-hybrid system: Affinity, sensitivity and enhanced library screening*. *RNA*, 11: 227-233.
- James, P., Halladay, J. y Craig, E. A. (1996). *Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast*. *Genetics*, 144: 1425-1436.
- Joshi, S., Gupta, P. y Gopal, G. (2019). *Different approaches for studying protein-protein interaction and analysis*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10: 4006-4025.
- Lentze, N. y Auerbach, D. (2008). *The yeast two-hybrid system and its role in drug discovery*. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 12: 505-515.

- Luban, J. y Goff, S. P. (1995). *The yeast two-hybrid system for studying protein-protein interactions*. Current Opinion in Biotechnology, 6: 59-64.
- Martin, F. (2012). *Fifteen years of the yeast three-hybrid system: RNA-protein interactions under investigation*. Methods, 58: 367-375.
- Patrício, D. y Fardilha, M. (2020). *The mammalian two-hybrid system as a powerful tool for high-throughput drug screening*. Drug Discovery Today, 25: 764-771.
- Putz, U., Skehel, P. y Kuhl, D. (1996). *A tri-hybrid system for the analysis and detection of RNA-protein interactions*. Nucleic Acids Research, 24: 4861-4863.
- Reece-Hoyes, J. S. y Walhout, A. J. M. (2012). *Yeast one-hybrid assays: A historical and technical perspective*. Methods, 57: 441-447.
- Rezwani, M. y Auerbach, D. (2012). *Yeast "N"-hybrid systems for protein-protein and drug-protein interaction discovery*. Methods, 57: 423-429.
- Ruffner, H., Bauer, A. y Bouwmeester, T. (2007). *Human protein-protein interaction networks and the value for drug discovery*. Drug Discovery Today, 12: 709-716.
- SenGupta, D. J., Zhang, B., Kraemer, B., Pochart, P., Fields, S. y Wickens, M. (1996). *A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 93: 8496-8501.
- Sugaya, N., Ikeda, K., Tashiro, T., Takeda, S., Otomo, J., Ishida, Y., Shiratori, A., Toyoda, A., Noguchi, H., Takeda, T., Kuhara, S., Sakaki, Y. y Iwayanagi, T. (2007). *An integrative in silico approach for discovering candidates for drug-targetable protein-protein interactions in interactome data*. BMC Pharmacology, 7: 1-15.
- Suter, B., Kittanakom, S. y Stagljar, I. (2008). *Two-hybrid technologies in proteomics research*. Current Opinion in Biotechnology, 19: 316-323.
- Topcu, Z. y Borden, K. L. B. (2000). *The yeast two-hybrid system and its pharmaceutical significance*. Pharmaceutical Research, 17: 1049-1055.
- Vidal, M., Brachmann, R. K., Fattaey, A., Harlow, E. y Boeke, J. D. (1996). *Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 93: 10315-10320.
- Xing, S., Wallmeroth, N., Berendzen, K. W. y Grefen, C. (2016). *Techniques for the analysis of protein-protein interactions in vivo*. Plant Physiology, 171: 727-758.
- Yang, F., Lei, Y., Zhou, M., Yao, Q., Han, Y., Wu, X., Zhong, W., Zhu, C., Xu, W., Tao, R., Chen, X., Lin, D., Rahman, K., Tyagi, R., Habib, Z., Xiao, S., Wang, D., Yu, Y., Chen, H., Fu, Z. y Cao, G. (2018). *Development and application of a recombination-based library versus library high-throughput yeast two-hybrid (RLL-Y2H) screening system*. Nucleic Acids Research, 46: 1-12.

- Zhu, Z. X., Yu, Z. M., Taylor, J. L., Wu, Y. H. y Ni, J. (2016). *The application of yeast hybrid systems in protein interaction analysis*. *Molecular Biology*, 50: 663-670.

Libros o capítulos de libros:

- DeMaggio, A. J., Goldman, P., Shih, H. M., Goodman, R. H. y Hoekstra, M. F. (2000). *The yeast split-hybrid system* pág 128-137, en *Applications of Chimeric Genes and Hybrid Proteins, Part C: Protein-Protein Interactions and Genomics (Methods in Enzymology 328)*. Thorner, J., Emr, S. D. y Abelson, J. N. (Eds.) Academic Press, San Diego (CA). ISBN 978-0121822293.
- Guo, D., Rajamäki, M. L. y Valkonen, J. (2008). *Protein-protein interactions: the yeast two-hybrid system* pág 421-439, en *Plant Virology Protocols: From Viral Sequence to Protein Function (Methods in Molecular Biology 451)*. Foster G. D., Johansen, I. E., Hong, Y. y Nagy, P. D. (Eds.) Humana Press, Totowa (NJ). ISBN 978-1-58829-827-0.
- Izumchenko, E., Wolfson, M., Golemis, E. A. y Serebriiskii, I. G. (2007). *Yeast hybrid approaches* pág 103-137, en *Yeast Gene Analysis (Methods in Microbiology 36)*. Stansfield, I. y Stark, M. J. R. (Eds.) Academic Press, Amsterdam. ISBN 978-0-12-369478-2.
- MacDonald, P. N. (Ed.) (2001). *Two-Hybrid Systems: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology 177)*. Humana Press, Totowa (NJ), 336 pp. ISBN 978-1-59259-210-4.
- Mehla, J., Caufield, J. H., Sakhawalkar, N. y Uetz P. (2017). *A comparison of two-hybrid approaches for detecting protein-protein interactions* pág 333-358, en *Proteomics in Biology, Part B (Methods in Enzymology 586)*. Shukla, A. K. (Ed.) Academic Press, Cambridge (MA). ISBN 978-0-12-809743-4.
- Oñate-Sánchez, L. (Ed.) (2018). *Two-Hybrid Systems: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology 1794)*. Humana Press, Nueva York, 355 pp. ISBN 978-1-4939-7870-0.

Recursos electrónicos:

- Elsevier. *ScienceDirect* [en línea]. [Consultado el 15 de junio de 2020]. Disponible en <https://www.sciencedirect.com>
- FECYT. *Web of Science* [en línea]. [Consultado el 12 de junio de 2020]. Disponible en <https://www.recursoscientificos.fecyt.es>
- Google. *Google Scholar* [en línea]. [Consultado el 3 de julio de 2020]. Disponible en <https://scholar.google.es>
- NCBI. *Pubmed* [en línea]. [Consultado el 18 de junio de 2020]. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>

Webs visitadas entre junio y julio de 2020.

ABREVIATURAS

DBD: *DNA binding domain* o dominio de unión a ADN

GFP: *Green fluorescent protein* o proteína de fluorescencia verde

M2H: *mammalian two-hybrid* o doble híbrido en mamíferos

rY2H: *reverse yeast two-hybrid* o doble híbrido reverso en levaduras

TAD: *transcriptional activation domain* o dominio de activación transcripcional

UAS: *upstream activation sequence* o secuencia de activación aguas arriba

Y1H: *yeast one-hybrid* o mono híbrido en levaduras

Y2H: *yeast two-hybrid* o doble híbrido en levaduras

Y3H: *yeast three-hybrid* o triple híbrido en levaduras