



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

---

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**MODELADO *IN SILICO* DE LA INTERACCIÓN ENTRE LOS  
FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN IRFs Y NF- $\kappa$ B CON SUS  
ELEMENTOS DE RESPUESTA LOCALIZADOS EN EL  
PROMOTOR DEL GEN *LGALS9***

Tesis para obtener el título de  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:  
LIC. MARÍA JOSÉ VEGA DEL REAL

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LORENA MILFLORES FLORES  
CODIRECTORA DE TESIS: DRA. VERÓNICA VALLEJO RUIZ

ASESORES DE TESIS: DRA. ROSALINA MARÍA DE LOURDES  
REYES LUNA DR. GERARDO SANTOS LÓPEZ

NOVIEMBRE 2021



## Declaratoria de No Plagio

Yo, Lic. María José Vega del Real, con número de matrícula 219470579, alumna de la maestría en Ciencias Biológicas adscrita a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, declaro que la presente tesis, la cual lleva por título:

*“Modelado in silico de la interacción entre los factores de transcripción IRFs y NF- $\kappa$ B con sus elementos de respuesta localizados en el promotor del gen LGALS9”*

es el producto original de mi trabajo y no existe plagio de ninguna naturaleza en ella. Declaro también que el trabajo de otros autores ha sido debidamente citado a lo largo de la presente tesis y que no ha sido usada para otro trámite de graduación.

Atte.



Lic. María José Vega del Real

Puebla de Zaragoza, Pue. 01 de noviembre de 2021



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

H. Puebla de Z. a 28 de octubre de 2021

Asunto: Voto Aprobatorio

Comité Académico del Posgrado  
PRESENTE

Por medio de la presente se hace constar que se revisó y aprobó la tesis titulada:

**"Modelado *in silico* de la interacción entre factores de transcripción IRFs y NF- $\kappa$ B con sus elementos de respuesta localizados en el promotor del gen *LGALS9*"**

Que presenta la estudiante **María José Vega del Real** con número de matrícula **219470579**, aspirante al grado de **Maestra en Ciencias Biológicas**, de la Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento: **"Estructura y Funcionamiento de los Seres Vivos"**, notificamos que la tesis reúne los requisitos y se aprueba para su réplica oral en el examen de grado.

Por lo tanto, emitimos los **VOTOS APROBATORIOS** como miembros del **Comité de Jurado de Examen de Grado** como a continuación se indica:

Tutor Interno: Dra. Rosalina María de Lourdes Reyes Luna

Tutor Externo: Dr. Gerardo Santos López

Revisor: Dr. Luis Márquez Domínguez



Agradecemos de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

## Agradecimientos académicos



Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de este trabajo.

No. CVU: 896647

A la Maestría en Ciencias biológicas de la BUAP incluida en el PNPC (Referencia 005671).

The FP7 WeNMR (project# 261572), H2020 West-Life (project# 675858), the EOSC-hub (project# 777536) and the EGI-ACE (project# 101017567) European e-Infrastructure projects are acknowledged for the use of their web portals, which make use of the EGI infrastructure with the dedicated support of CESNET-MCC, INFN-PADOVA-STACK, INFN-LNL-2, NCG-INGRID-PT, TW-NCHC, CESGA, IFCA-LCG2, UA-BITP, SURFsara and NIKHEF, and the additional support of the national GRID Initiatives of Belgium, France, Italy, Germany, the Netherlands, Poland, Portugal, Spain, UK, Taiwan and the US Open Science Grid.

Este trabajo de investigación fue presentado en los siguientes congresos:

*X Congreso de Biotecnología y Bioingeniería del Sureste (X-CBBSE)*

Participación en modalidad cartel con el nombre: “Análisis *in silico* de factores reguladores del interferón (IRF) y sus correspondientes interacciones ADN-proteína en el contexto del promotor del gen *LGALS9*”, llevado a cabo a distancia, teniendo como sede virtual el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), del 10 al 12 de febrero de 2021.

*XI Congreso Nacional de Tecnología Aplicada a Ciencias de la Salud y I Congreso Internacional de Tecnología Aplicada a Ciencias de la Salud*

Participación en modalidad video con el nombre: “Análisis *in silico* de factores reguladores del interferón (IRF) y sus correspondientes interacciones ADN-proteína en el contexto del promotor del gen *LGALS9*”, llevado a cabo a distancia, teniendo como sede virtual la Facultad de Medicina (FM) de la UNAM, del 10 al 12 de junio de 2021.

*XXII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica, XI Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica y XVIII Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular*

Participación en modalidad cartel con el nombre: “Análisis *in silico* de la familia de factores reguladores del interferón (IRF) y sus correspondientes interacciones proteína–ADN en el contexto del promotor del gen *LGALS9*”, llevado a cabo a distancia, teniendo como sede virtual el Colegio Mexicano de Ingenieros Bioquímicos, el 30 de junio y 1 y 2 de julio de 2021.

## CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	3
ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO.....	4
Galectina-9.....	4
Definición general .....	4
Promotor del gen <i>LGALS9</i> .....	6
Localización y función de Gal-9 .....	10
Papel de Gal-9 relacionado con procesos inmunitarios en enfermedades.....	11
Citocinas que aumentan la expresión de Gal-9 .....	26
Interferones .....	27
IL-1 $\beta$ .....	36
TNF- $\alpha$ .....	38
Herramientas computacionales.....	41
Modelado molecular .....	41
Optimización y validación de modelos .....	45
Acoplamiento ( <i>docking</i> ) molecular .....	49
JUSTIFICACIÓN.....	52
HIPÓTESIS .....	53
OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS.....	53
Objetivo general .....	53
Objetivos específicos.....	53
MATERIALES Y MÉTODOS .....	54
Localización in silico de elementos de respuesta dentro de la secuencia de la región promotora de 727 pb del gen <i>LGALS9</i> .....	54
Búsqueda de secuencias de DBD de IRF y alineamiento.....	55
Elección de los miembros de la familia IRF para modelado y acoplamiento ....	56
Obtención de estructuras de factores de transcripción en bases de datos o por modelado por homología.....	56
Evaluación de la calidad de los modelos obtenidos .....	57
Modelado de la secuencia de ADN .....	58

Prueba de parámetros y controles.....	58
Acoplamiento molecular Proteína–ADN.....	61
Visualización de interacciones específicas.....	61
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	62
Elementos de respuesta reportados por LASAGNA-Search 2.0 (matrices de TRANSFAC y JASPAR CORE Vertebrates) .....	62
Alineamiento de secuencias en Clustal Omega.....	63
Modelos obtenidos en SWISS-MODEL y Parámetros de calidad .....	65
Modelos de ADN de doble cadena.....	73
Acoplamientos moleculares.....	74
Posibles vías de señalización involucradas en la expresión de <i>LGALS9</i> en procesos inflamatorios.....	103
CONCLUSIONES.....	106
PERSPECTIVAS.....	107
BIBLIOGRAFÍA .....	108
APÉNDICES Y ANEXOS .....	140
Apéndice A: descripción de las herramientas computacionales utilizadas .....	140
Apéndice B: residuos activos detectados por HADDOCK 2.4 .....	142
Apéndice C: resultados de acoplamientos entre IRF–IRE .....	146
Apéndice D: resultados de acoplamientos entre dímeros de IRF–ISRE .....	152
Anéxo I: constancias.....	158

## ABREVIATURAS GENERALES

ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tools</i> (Herramientas de búsqueda de alineamientos locales básicos)
CRD	<i>Carbohydrate Recognition Domain</i> (Dominio de reconocimiento de carbohidratos)
DBD	<i>DNA Binding Domain</i> (Dominio de unión a ADN)
FASTA	<i>Fast Alignment</i> (Alineamiento rápido)
TNF- $\alpha$	<i>Tumoral Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i> (Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$ )
Gal-9	Galectina-9
GTF	<i>General Transcription Factors</i> (Factores de transcripción generales)
IFN	Interferón
IFN- $\alpha$	Interferón- $\alpha$
IFN- $\beta$	Interferón- $\beta$
IFN- $\gamma$	Interferón- $\gamma$
IL-1 $\alpha$	Interleucina-1 $\alpha$
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$

IRE	<i>Interferon Regulatory Element</i> (Elemento regulador del interferón)
IRF	<i>Interferon Regulatory Factor</i> (Factor regulador del interferón)
ISRE	<i>IFN-stimulated regulatory element</i> (Elemento regulador estimulado por interferones)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional para la Información Biotecnológica)
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear Factor <math>\kappa</math>B</i> (factor nuclear $\kappa$ B)
Pb	Pares de bases
PDB	<i>Protein Data Bank</i> (Banco de datos de proteínas)

## LISTA DE TABLAS

- Tabla 1. Evidencia experimental del efecto de citocinas proinflamatorias en los cambios de expresión de Gal-9 en diversas líneas celulares.
- Tabla 2. Clasificación de IFN.
- Tabla 3. Números de acceso UniProt para las secuencias de DBD de IRF empleadas para alineamiento.
- Tabla 4. Complejos proteína–ADN seleccionados para las pruebas de parámetros en HADDOCK.
- Tabla 5. Modelos seleccionados para obtención de valores de control.
- Tabla 6. Matriz de porcentaje de identidad del alineamiento de secuencias de IRF obtenido en Clustal Omega.
- Tabla 7. Parámetros de calidad para los modelos de DBD de IRF obtenidos en SWISS-MODEL.
- Tabla 8. Valores obtenidos de los acoplamientos entre complejos elegidos para prueba de parámetros – secuencias de ADN (mejores resultados de cada clúster obtenido en HADDOCK).
- Tabla 9. Valores obtenidos de los acoplamientos entre modelos elegidos para prueba de controles – secuencia ISRE (mejores resultados de cada clúster obtenido en HADDOCK).
- Tabla 10. Valores obtenidos de los acoplamientos entre DBD de IRF – secuencia ISRE (mejores resultados de cada clúster obtenido en HADDOCK).

- Tabla 11. Puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en el clúster DBD IRF1 – ISRE.
- Tabla 12. Puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en el clúster DBD IRF3 – ISRE.
- Tabla 13. Puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en el clúster DBD IRF5 – ISRE.
- Tabla 14. Puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en el clúster DBD IRF7 – ISRE.
- Tabla 15. Puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en el clúster DBD IRF8 – ISRE.
- Tabla 16. Puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en el clúster DBD IRF9 – ISRE.
- Tabla 17. Valores obtenidos de los acoplamientos entre dímeros de IRF (sólo DBD) – ISRE. (mejores resultados de cada clúster obtenido en HADDOCK).
- Tabla 18. Puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en el clúster IRF1-1 – ISRE.
- Tabla 19. Puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en el clúster IRF3-4 – ISRE.
- Tabla 20. Puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en el clúster IRF5-1 – ISRE.

- Tabla 21. Puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en el clúster IRF7-8 – ISRE.
- Tabla 22. Puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en el clúster IRF8-10 – ISRE.
- Tabla 23. Puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en el clúster IRF9-10 – ISRE.
- Tabla 24. Valores obtenidos de los acoplamientos entre subunidades A (RelA) y B (p50) de NF- $\kappa$ B–sitio  $\kappa$ B alternativo (mejores resultados de cada clúster obtenido en HADDOCK).

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Clasificación de las galectinas.
- Figura 2. Representación esquemática del fragmento amplificado de 2089 pb y los elementos de respuesta presentes en este fragmento.
- Figura 3. Representación esquemática de los fragmentos del promotor y la distribución de los elementos de respuesta a interferón reportados en la base de datos TRANSFAC.
- Figura 4. Vías de señalización inducidas por IFN de tipo I y II.
- Figura 5. Vía de señalización NF- $\kappa$ B inducida por TNF- $\alpha$ , e IL-1 $\beta$ .
- Figura 6. Localización del sitio ISRE y sitios IRE en la región de -565 a +162 pb del promotor del gen *LGALS9*.
- Figura 7. Alineamiento de secuencias original obtenido en Clustal Omega.
- Figura 8. Modelos obtenidos en SWISS-MODEL.
- Figura 9. Superposición entre modelos obtenidos en SWISS-MODEL e I-TASSER.
- Figura 10. Gráficos de Ramachandran para los modelos obtenidos por modelado por homología en SWISS-MODEL.
- Figura 11. Secuencia 3' GGTTTCTATTTCTT '5, sitio ISRE canónico.
- Figura 12. Sitios IRE (canónico y alternativos).

- Figura 13. Secuencia 3' TGGGGCATGCCCCTT 5', sitio  $\kappa$ B alternativo.
- Figura 14. Acoplamientos resultantes entre las proteínas elegidas para la prueba de parámetros y secuencias de ADN.
- Figura 15. Acoplamientos resultantes entre las proteínas elegidas para la prueba de controles – secuencia ISRE.
- Figura 16. Acoplamientos resultantes entre DBD de IRF y la secuencia ISRE.
- Figura 17. Acoplamientos resultantes entre dímeros de IRF (sólo DBD) y la secuencia ISRE.
- Figura 18. Acoplamientos resultantes entre NF- $\kappa$ B y el sitio  $\kappa$ B alternativo.
- Figura 19. Posible regulación del promotor del gen *LGALS9* mediada por IRF.
- Figura 20. Posible regulación del promotor del gen *LGALS9* mediada por NF- $\kappa$ B.

## RESUMEN

Gal-9 es codificada por el gen *LGALS9*, del cual su regulación transcripcional no ha sido descrita de manera extensiva. Los estudios principalmente realizados son análisis *in silico* de su secuencia en bases de datos. Se conoce que las citocinas proinflamatorias aumentan la expresión de Gal-9 en líneas celulares; partiendo de este antecedente, se localizaron *in silico* elementos de respuesta relacionados con la vía de señalización de los factores de transcripción IRF y NF- $\kappa$ B en la secuencia del promotor del gen *LGALS9*, se modelaron las secuencias de estos elementos de respuesta y se obtuvieron modelos de los factores de transcripción IRF y NF- $\kappa$ B en bases de datos y por modelado por homología, posteriormente, se realizó un acoplamiento proteína-ADN para obtener complejos que reflejan la interacción y afinidad entre los factores de transcripción y sus elementos de respuesta; además, se identificaron los residuos importantes que interaccionan en los complejos proteína-ADN obtenidos por medio del acoplamiento molecular.

Se obtuvieron complejos proteína-ADN estables, los cuales presentaron energías de afinidad altas y puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas con los nucleótidos que conforman la secuencia ISRE. Se propone que el sitio ISRE localizado en la posición de -42 a -33 pb, en la región promotora de 727 pb del gen *LGALS9* está relacionado con el aumento de la expresión del gen *LGALS9* inducida por interferones, y que los factores de transcripción IRF1/3/5/7/8/9 están involucrados, además, se localizó por medio de métodos computacionales, un elemento de respuesta no canónico para NF- $\kappa$ B en la posición de -452 a -438 pb en la región promotora del gen *LGALS9*, se propone que la vía de señalización NF- $\kappa$ B podría estar relacionada con la expresión de Gal-9 mediada por citocinas como TNF- $\alpha$  e IL- $\beta$ .

Palabras clave: Galectina-9, Acoplamiento molecular, ISRE, Sitio  $\kappa$ B.

## ABSTRACT

Gal-9 is encoded by the *LGALS9* gene, of which its transcriptional regulation has not been extensively described yet. The studies mainly carried out about its transcriptional regulation are *in silico* analysis of its sequence in databases. Proinflammatory cytokines are known to increase Gal-9 expression in cell lines; Starting from this background, response elements related to the signaling pathway of the transcription factors IRF and NF- $\kappa$ B in the promoter sequence of the *LGALS9* gene were located *in silico*, then, the sequences of these response elements were modeled, and models of the transcription factors IRF and NF- $\kappa$ B were obtained in databases and by homology modeling, subsequently, a protein-DNA docking was performed in order to obtain complexes that reflect the interaction and affinity between the transcription factors and their response elements; Furthermore, important interacting residues in the protein-DNA complexes were identified.

Stable protein-DNA complexes were obtained, all of them presented high affinity energies, and hydrogen bonds and hydrophobic interactions with the nucleotides of the ISRE sequence. It is proposed that the ISRE site located at position -42 to -33 bp in the promoter region of 727 bp of the *LGALS9* gene, is related to the increase in the expression of the *LGALS9* gene induced by interferons, and that the transcription factors IRF1/3/5/7/8/9 are involved. In addition, a non-canonical response element for NF- $\kappa$ B was located by means of computational methods at position -452 to -438 bp in the promoter region of the *LGALS9* gene: It is proposed that the NF- $\kappa$ B signaling pathway could be related to the expression of Gal-9 mediated by cytokines such as TNF- $\alpha$  and IL- $\beta$ .

Keywords: Galectin-9, Molecular Docking, ISRE site,  $\kappa$ B site.

## INTRODUCCIÓN

La correcta ejecución de los procesos biológicos en los seres vivos requiere de una serie de pasos cuidadosamente orquestados que dependen de una expresión espaciotemporal idónea de los genes. Un error en esta expresión puede ocasionar una patología (Maston, Evans, Green, 2006).

Para comprender los mecanismos moleculares que regulan los patrones de expresión específicos es importante identificar los elementos reguladores de la transcripción asociados con el ácido desoxirribonucleico (ADN). Para la regulación de la transcripción son necesarios: el promotor central, la región proximal al promotor central y las secuencias distales, las cuales pueden ser potenciadores (*enhancers*), silenciadores, aislantes o regiones de control de locus (LCR). Los elementos del promotor central dirigen el ensamblaje de distintos complejos de pre-iniciación, compuestos por los factores de transcripción generales (GTF) (Juven-Gershon *et al.*, 2008). Las regiones proximales del promotor y las secuencias distales dirigen el enlace de factores de transcripción específicos, que pueden ser activadores o represores de la transcripción (Maston, Evans y Green, 2006). Los factores de transcripción específicos juegan un papel fundamental en estos procesos, pues regulan de manera minuciosa la expresión genética uniéndose con alta afinidad a su elemento de respuesta.

En lo que respecta a la regulación transcripcional del gen *LGALS9*, esta no ha sido descrita de manera extensiva. Este gen codifica para la proteína conocida como galectina-9 (Gal-9), y se conoce que da lugar a diferentes isoformas de esta proteína (Heusschen, Griffioen y Thijssen, 2013). De éstas, tres han sido mejor caracterizadas, y difieren entre sí por el tamaño del segmento denominado péptido de unión. A estas isoformas se les denomina: Gal-9 de tamaño largo, de 355 aminoácidos (Gal-9L), Gal-9 de tamaño mediano, de 323 aminoácidos (Gal-9M) y Gal-9 tamaño corto, de 311 aminoácidos (Gal-9S) (Chabot *et al.*, 2002). Los estudios realizados sobre la regulación transcripcional del gen *LGALS9* se limitan principalmente a análisis *in silico* por medio de la base de datos TRANSFAC (*Transcription Factor Analysis Software*) (Matys *et al.*, 2006), en los cuales se han identificado elementos de respuesta en la región promotora para los factores de transcripción: Kid3, WT1, p300, SREBP, TCFII, STAT (*Homo sapiens*) (John y Mishra, 2016), sin embargo, no se conoce a detalle (ni *in silico* ni *in vitro*) cuáles son los factores de

transcripción que están involucrados en la regulación transcripcional del promotor del gen *LGALS9*.

## ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO


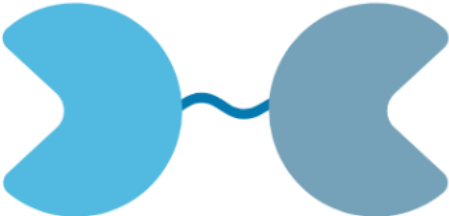
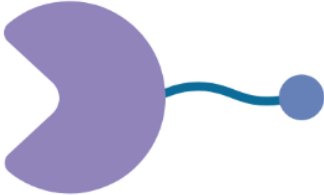
### Galectina-9

#### *Definición general*

Las galectinas son proteínas de unión a carbohidratos que participan en diversas funciones fisiológicas como la inflamación, las respuestas inmunitarias, la migración celular, la autofagia y la señalización. Estas proteínas se relacionan también con enfermedades como la fibrosis, el cáncer y las enfermedades cardíacas, entre otras. La familia de las galectinas se descubrió gracias a su actividad de unión a  $\beta$ -galactósidos, y se definió con base en sus sitios conservados, los cuales constan de  $\sim$ 130 aminoácidos y se denominan dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRD, por sus siglas en inglés de *Carbohydrate Recognition Domains*) (Barondes *et al.*, 1994).

Las galectinas se sintetizan como proteínas citosólicas, residen en el citosol o núcleo durante gran parte de su vida útil y alcanzan sus ligandos sólo después de ser secretadas por medio de una vía no clásica que excluye al complejo de Golgi (Cummings *et al.*, 2015). Si bien, todas las células expresan galectinas, en ocasiones en concentraciones citosólicas de hasta 5  $\mu$ M (Lindstedt *et al.*, 1993), el patrón de expresión varía entre los tipos de células y de tejidos (Johannes, Jacob y Leffler, 2018).

Como se mencionó anteriormente, la clasificación de la familia de las galectinas se define por los CRD de éstas. Hasta la fecha se han identificado 15 galectinas de mamíferos, que se subdividen en tres grupos: las galectinas prototipo, que constan de un CRD (se incluyen en esta categoría las galectinas 1, 2, 5, 7, 10, 13, 14 y 15); las galectinas de repetición en tándem, las cuales poseen dos CRD unidos por un péptido enlazador de longitud variable (galectinas 4, 6, 8, 9 y 12), y el tipo quimera, que consta de un CRD fusionado a repeticiones de tramos cortos de aminoácidos y cuyo único exponente reportado a la fecha es la galectina-3 (Gal 3) (Rabinovich *et al.*, 2007) (Figura 1).

Tipo	Estructura	Galectinas
Prototipo		1, 2, 5, 7, 10, 13, 14, 15
Repetición en tándem		3
Quimera		4, 6, 8, 9, 12

**Fig. 1.** Clasificación de galectinas de acuerdo con su estructura: prototipo, repetición en tándem y quimera.

La galectina-9 (Gal-9) es una galectina de tipo repetición en tándem de 34-39 kDa que presenta dos CRD no homólogos N- y C-terminales unidos por un polipéptido corto (John y Mishra, 2016). Estos CRD son diferentes entre sí, y mientras que ambos CRD presentan afinidad a estructuras repetitivas de residuos N-acetil-lactosamina enlace  $\beta$ 1-3 (poli-N-Acetil-lactosamina) altamente ramificada, sólo el CRD en la región N-terminal reconoce el glicoesfingolípido Forssman (un ligando de unión de Gal-9) con una alta afinidad (Hirabayashi *et al.*, 2002).

Gal-9 se expresa ampliamente en el núcleo, el citosol, la membrana plasmática externa y la matriz extracelular y, al igual que otras galectinas, se sintetiza en polirribosomas libres en

el citoplasma y se secreta a través de vías no clásicas o se libera al medio extracelular tras la muerte celular (Bozorgmehr *et al.*, 2021).

La Gal-9 fue descrita inicialmente por tres grupos independientes como: un autoantígeno derivado del tejido involucrado en el linfoma de Hodgkin (Türeci *et al.*, 1997); un quimioatrayente de eosinófilos de 36 kDa expresado en linfocitos T (Matsumoto *et al.*, 1998), y como un transportador de urato (Leal-Pinto *et al.*, 1997). Posteriormente, estas tres proteínas fueron reconocidas como variantes de Gal-9 con diferencias mínimas en los aminoácidos que influyen en sus características funcionales y estructurales.

### *Promotor del gen LGALS9*

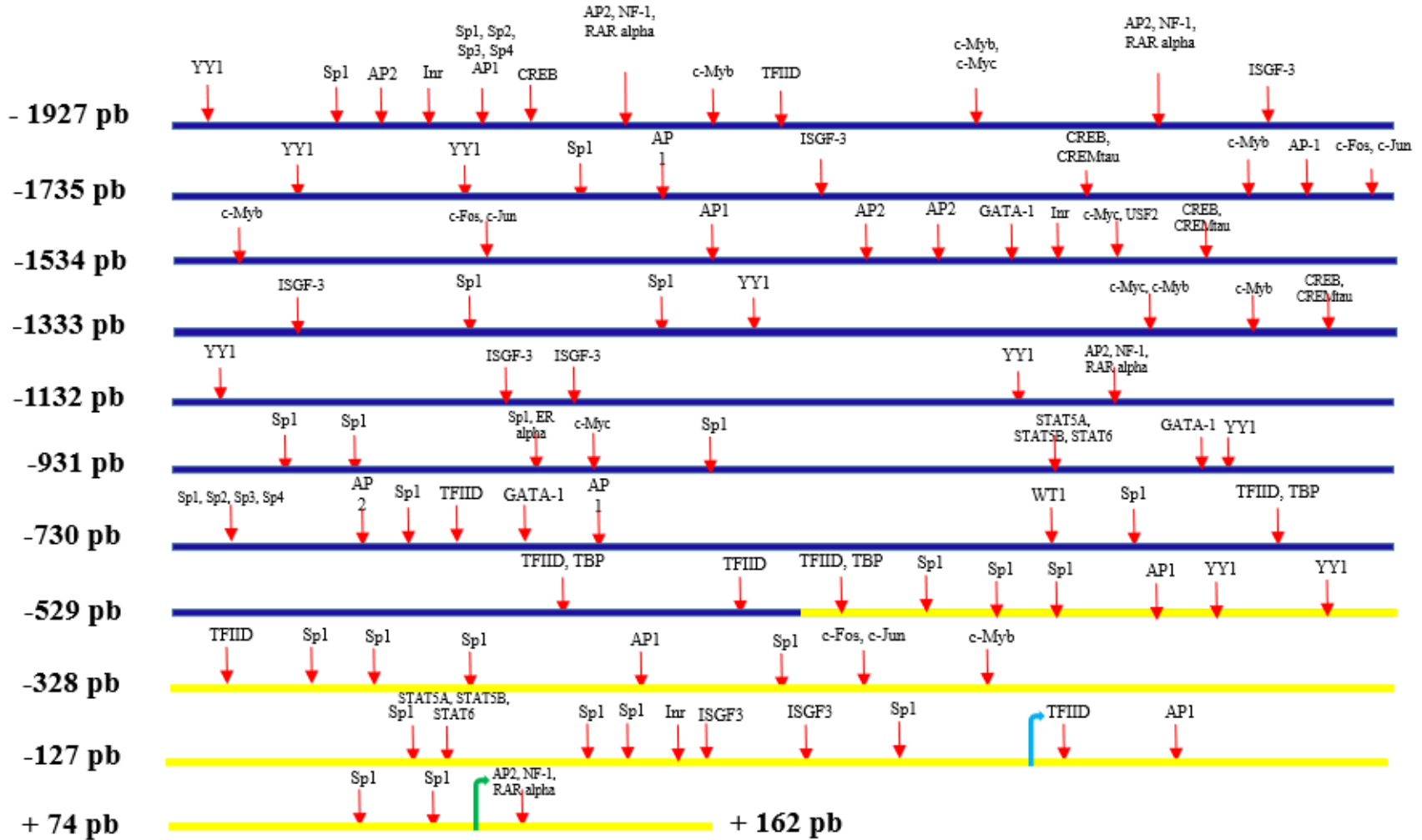
Gal-9 es codificada por el gen *LGALS9* (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000168961-LGALS9>), localizado en el brazo corto del cromosoma 17 (17q11.2) el cual consiste en 11 exones (Leffler *et al.*, 2004).

Un análisis realizado por medio de la base de datos TRANSFAC muestra que el promotor de *LGALS9* de *Homo sapiens* cuenta con sitios de unión a Kid3, WT1, p300, SREBP, TCFII, STAT, entre otros. La estimulación del gen que codifica para la Gal-9 es específica del tipo celular y se ha reportado que los interferones (IFN)  $\gamma$  y  $\beta$  y las interleucinas (IL)  $1\beta$  y  $1\alpha$ , inducen su expresión (John y Mishra, 2016).

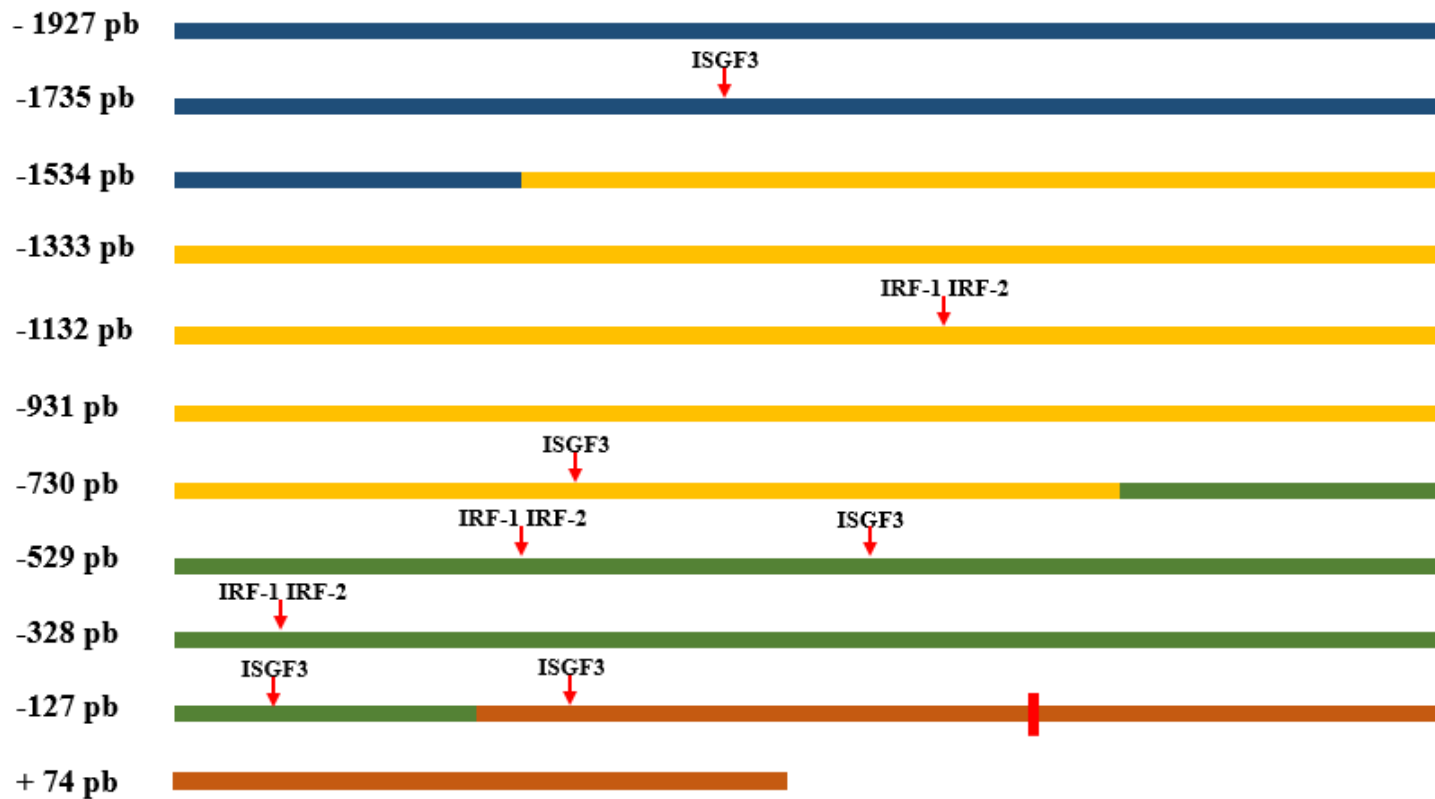
De acuerdo con Aparicio, 2019, se reportó que el gen comprende una región situada entre 27631148 a 27649560 pb, lo cual indica que su tamaño es de 18412 pb de acuerdo con la entrada 3965 en la base de datos Gene de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3965>). En este mismo trabajo se analizó la secuencia de *LGALS9* empleando el programa *Eukaryotic Promoter Database* (EPD), el cual detecta posibles regiones promotoras de acuerdo con la secuencia indexada. Se encontraron dos posibles regiones promotoras, la primera entre las posiciones 27623260 (la cual se sobrepone con la región codificante del gen *KSR-1*) y 27649392 pb del gen *LGALS9*; la segunda región entre las posiciones 27630224 y 27630824 pb dentro del gen *LGALS9* (datos obtenidos en la página <http://atlasgeneticsoncology.org/index.html>), por lo cual se diseñaron oligonucleótidos para amplificar un fragmento de 2089 pb en el que se encuentran ambas regiones (Figura 2).

Se clonó el fragmento de 2089 pb y construcciones cortas de este (1479 pb, 727 pb y 222 pb) (Figura 2) en un vector pGL4.12 el cual contiene al gen reportero de luciferasa luc2CP de luciérnaga (*Photinus pyralis*). Estas construcciones se transfectaron en células HaCaT y se evaluó la actividad transcripcional de cada una de ellas por medio de un ensayo de luciferasa, encontrándose que la construcción de 727 pb presentó mayor actividad transcripcional. Por ese motivo en el presente trabajo nos limitaremos a analizar la secuencia de esta construcción.

De acuerdo con dicho estudio, el promotor del gen *LGALS9* es un promotor clásico que es activado por cajas TATA, las cuales son reconocidas por proteínas de unión a cajas TATA (TBP, por sus siglas en inglés de *TATA binding protein*). Entre los elementos de respuesta encontrados en el promotor se observa la presencia AP1, Sp1 NF- $\kappa$ B, C-Myb, entre otros, en las diferentes construcciones (Figura 2). De los elementos de respuesta encontrados, los relacionados con las vías de señalización canónicas inducidas por interferones se muestran en la Figura 3.



**Fig. 2.** Representación esquemática del fragmento amplificado de 2089 pb y los elementos de respuesta. En color amarillo se indica la posible región promotora. La flecha azul claro indica el sitio de inicio de la transcripción, la flecha verde indica el sitio de inicio de la traducción. Imagen tomada de Aparicio, 2019.



**Fig. 3.** Representación esquemática de los fragmentos del promotor y la distribución de los elementos de respuesta a interferón reportados en la base de datos TRANSFAC. En anaranjado, la construcción de 222 pb. En anaranjado y verde, la construcción de 727 pb. En anaranjado, verde y amarillo, la construcción de 1479 pb. En anaranjado, verde, amarillo y azul, la construcción de 2089 pb.

### *Localización y función de Gal-9*

Gal-9 participa en varios procesos biológicos intracelulares y extracelulares, incluido el tráfico y plegamiento de proteínas, las interacciones célula-célula o célula-matriz extracelular, la transducción de señales y el desarrollo celular (Vasta *et al.*, 2012). Cuando se describió por primera vez, se observó que se expresaba abundantemente en el hígado murino fetal y adulto (Wada *et al.*, 1997). Se ha reportado también en el sistema esquelético (Tanikawa *et al.*, 2008; Wiersma *et al.*, 2013), sistema muscular (Wada *et al.*, 1997; Leal-Pinto *et al.*, 1997; Spitzenberger *et al.*, 2001), sistema respiratorio (Leal-Pinto *et al.*, 1997; Wada *et al.*, 1997; Türeci *et al.*, 1997; Matsumoto *et al.*, 1998; Spitzenberger *et al.*, 2001), sistema digestivo (estómago y células epiteliales que recubren las criptas de intestino delgado, mucosa intestinal, colon, hígado, vesícula biliar) (Wada *et al.*, 1997; Matsumoto *et al.*, 1998; Spitzenberger *et al.*, 2001; Thijssen *et al.*, 2008), sistema urinario (corteza renal, arteriolas, capilares intertubulares de médula y corteza, mesangio glomerular de los riñones) (Wada *et al.*, 1997; Leal-Pinto *et al.*, 1997; Spitzenberger *et al.*, 2001), sistema reproductivo (ovario, útero, mama, testículos) (Leal-Pinto *et al.*, 1997; Bauersachs *et al.*, 2006; Shimizu *et al.*, 2008), sistema cardiovascular (Wada *et al.*, 1997; Leal-Pinto *et al.*, 1997; Spitzenberger *et al.*, 2001), sistema linfático (bazo, ganglio linfático, células estromales/epiteliales del timo) (Leal-Pinto *et al.*, 1997; Wada *et al.*, 1997; Matsumoto *et al.*, 1998), sistema nervioso (cerebro, epitelio corneal y conjuntival, células estromales de la conjuntiva, iris, cuerpo ciliar, esclerótica, vasos sanguíneos de la retina, epitelio pigmentario de la retina, coroides y queratinocitos) (Leal-Pinto *et al.*, 1997; Schlötzer-Schrehardt *et al.*, 2012), sistema tegumentario (Igawa *et al.*, 2006), células mieloides (Türeci *et al.*, 1997; Matsumoto *et al.*, 1998) y células linfoides (Türeci *et al.*, 1997). Por lo tanto, Gal-9 se distribuye en una amplia variedad de tipos de células de mamíferos, con algunas especificidades dependientes del tejido, debido que se ha reportado que el microambiente y la especificidad de las células influyen en gran medida en la expresión del gen que codifica para esta proteína; estos microambientes comprenden factores tanto internos como externos, como ciertos factores fisiológicos y patológicos responsables del crecimiento, diferenciación, desarrollo y protección (Hirashima *et al.*, 2002). Además, la especificidad de Gal-9 está

intrínsecamente modulada por los mecanismos inmunes (como tolerancia, supresión y de defensa) (Yang *et al.*, 2008).

Se ha reportado que Gal-9 tiene una distribución celular endógena y exógena (Heusschen *et al.*, 2013). En la superficie extracelular, Gal-9 se une selectivamente a oligosacáridos y glicoproteínas que contienen galactosa en las matrices extracelulares y a los glicoconjugados de la superficie celular (como laminina, fibronectina, vitronectina) (Nobumoto *et al.*, 2008), permitiendo que Gal-9 module la adhesión celular, la quimioatracción y la endocitosis.

Se ha observado la localización nuclear de Gal-9 en células endoteliales de placenta, hígado, colon, monocitos y células de melanoma (Kageshita *et al.*, 2002; Thijssen *et al.*, 2008; Matsuura *et al.*, 2009; Barjon *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2013), pero no se conocen a profundidad las funciones nucleares de Gal-9. La transfección transitoria de Gal-9 aumenta la expresión de interleucina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) e interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) en células THP-1 (monocitos) (Matsuura *et al.*, 2009), y las tres isoformas aumentan la actividad promotora del gen *IL1A*, pero sólo la isoforma de tamaño corto aumenta la actividad promotora de los genes *IL1B* e *IFN $\gamma$*  (Matsuura *et al.*, 2009), sin embargo, la expresión de estos genes se debe también a la participación conjunta de varios factores de transcripción como AP-1, NF-IL6 y NF-kB (Matsuura *et al.*, 2009; John y Mishra, 2016).

### *Papel de Gal-9 relacionado con procesos inmunitarios en enfermedades*

#### *Enfermedades autoinmunes*

##### Lupus eritematoso sistémico

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmunitaria, inflamatoria polimórfica y multigénica. Esta enfermedad se caracteriza por una pérdida global de la auto-tolerancia inmunitaria con la activación de las células T y B autorreactivas que conduce a la producción de autoanticuerpos patógenos y daño tisular (Choi, Kim y Kraft, 2012). En el LES, Gal-9 efectúa el ajuste del equilibrio de las células T y disminuye los anticuerpos anti-dsDNA al inducir una disminución de linfocitos TIM-3+Th1 y Th17, críticos para la patogénesis del LES. Además, el tratamiento con Gal-9 aumenta las células CD19+ en

ratones MRL/lpr propensos a lupus y reduce las células plasmáticas CD19-CD138+ pero no los plasmablastos CD19+CD138+. Esta reducción de células plasmáticas puede resultar en la supresión de la producción de anticuerpos anti-dsDNA, disminuyendo la gravedad clínica en la patogénesis del LES (Moritoki *et al.*, 2013). Se ha reportado también que Gal-9 es un biomarcador aplicable clínicamente para detectar la expresión de genes que codifican para IFN (moléculas relacionadas con procesos inflamatorios) en pacientes con LES (van den Hoogen *et al.*, 2018).

## Diabetes

**Diabetes tipo 1.** La diabetes tipo 1 es una enfermedad autoinmune mediada por células T que destruye selectivamente las células  $\beta$  productoras de insulina en el páncreas. El ratón NOD/SCID (diabético no obeso con inmunodeficiencia grave combinada, *Non-Obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency*) es un modelo animal para estudiar la patogenia de la diabetes tipo 1. La disminución del número de células inmunes Th1 agresivas por parte de Gal-9 inhibe el desarrollo de diabetes autoinmune en ratones NOD/SCID y, por lo tanto, la sobreexpresión de Gal-9 o Gal-9 recombinante puede ser una terapia útil contra la diabetes Tipo 1, que se puede utilizar además para prolongar la supervivencia de los trasplantes de células de los islotes pancreáticos u otros trasplantes durante la regeneración pancreática (Kanzaki *et al.*, 2012; Chou *et al.*, 2013).

**Diabetes tipo 2.** Se ha reportado que Gal-9 tiene un control indirecto sobre la diabetes tipo 2 al participar en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa en sangre. El receptor de superficie Glut-2 (transportador de glucosa-2, *Glucose Transporter-2*) participa en la secreción de insulina estimulada por glucosa y actúa como un importante ligando de Gal-9, por lo tanto, Gal-9 ejerce un control indirecto sobre la homeostasis de la glucosa en sangre en respuesta a la ingesta de glucosa. Gal-9 reconoce y retiene el transportador de glucosa Glut-2 en la superficie de las células  $\beta$  pancreáticas, lo que inhibe la endocitosis de Glut-2 y mantiene la respuesta primaria de secreción de insulina estimulada por glucosa (Ohtsubo *et al.*, 2005). Además, los niveles séricos elevados de Gal-9 en los pacientes con diabetes tipo 2 y enfermedad renal crónica se correlacionan de manera negativa con la tasa de filtración

glomerular, que a su vez puede estar relacionado con la alteración de la respuesta inmune y la inflamación (Kurose *et al.*, 2013).

#### Glomerulonefritis causada por anticuerpos anti-membrana basal glomerular

La enfermedad por anticuerpos anti-membrana basal glomerular (*Anti-Glomerular Basement Membrane*, anti-GBM), es un trastorno inmunológico caracterizado por la presencia de anticuerpos contra la membrana basal glomerular y glomerulonefritis (inflamación de los glomérulos) (GN) (Robledo *et al.*, 2011), en la cual se ven involucradas predominantemente las células Th1 y Th17. El papel protector de Gal-9 en la GN anti-GBM se asocia con la inhibición de las respuestas inmunitarias mediadas por células Th1 y Th17, que cambia la respuesta inmune de Th1 a Th2 y finalmente mejora la inmunidad Th2 en el riñón. Se ha informado que la respuesta inmune mediada por células Th2 desempeña un papel protector en la GN anti-GBM que se asocia con la supresión de la respuesta inmune mediada por células Th1, relacionada con las citocinas expresadas específicamente por estos tipos de células (Tipping *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2014).

#### Hepatitis autoinmune

La hepatitis autoinmune (HAI) es una enfermedad que ocurre cuando el sistema inmunológico ataca las células del hígado. Cuando disminuye la expresión de TIM-3 (inmunoglobulina de células T y dominio 3 de mucina), un ligando de Gal-9, las células efectoras se vuelven menos susceptibles a la supresión inmune mediada por células Treg. La señalización reducida del eje TIM-3/Gal-9 contribuye a un control de células Treg deficiente durante la HAI (Liberal *et al.*, 2012); la activación de células Treg mediada por Gal-9 juega un papel crucial en la HAI, lo cual se demostró empleando el modelo murino de lesión hepática experimental inducida por Concanavalina A (Con A) (Wang *et al.*, 2012), en el que una sola inyección de Gal-9 en ratones tuvo un efecto protector contra la hepatitis inducida por Con A (Liberal *et al.*, 2012).

## Lesión hepática por isquemia/reperfusión

La lesión hepática por isquemia/reperfusión (*Ischemia-Reperfusion Injury*, IRI) es una patología inflamatoria exógena independiente del antígeno en la que las células T CD4<sup>+</sup> actúan como mediador clave. La IRI hepática ocurre con frecuencia después de una resección hepática importante o un trasplante de hígado (Cannistrà *et al.*, 2016). Se ha demostrado que el bloqueo de la vía TIM-3/Gal-9 exacerba la inflamación local y el daño hepático debido a la expresión del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , por sus siglas en inglés de *Tumoral Necrosis Factor*) e interleucina-6 (IL-6) y amplifica la actividad de las células T de las células de Kupffer. Estos resultados sugieren la importancia de la señalización TIM-3/Gal-9 en el mantenimiento de la homeostasis hepática y en el control de la respuesta inmune hepática alterada (Hirao *et al.*, 2015).

## Enfermedad del hígado graso no alcohólico

Tras la activación endógena/exógena, las células T/NK (*Natural Killers*) secretan citocinas como IFN- $\gamma$  e IL-4, y regulan positivamente la expresión de TIM-3. El IFN- $\gamma$  induce la producción de Gal-9 por las células de Kupffer (Mengshol *et al.*, 2010), y conduce a la apoptosis de las células TIM-3+NKT, que limita la respuesta inflamatoria. Gal-9 también interactúa con TIM-3 expresado en células de Kupffer para producir IL-15, que induce la proliferación de células T/NK. Esto eventualmente conduce a la homeostasis de las células T/NK y al equilibrio del microambiente inmunológico local. Además, Gal-9 exógena también puede mejorar significativamente la esteatosis inducida por la dieta y la obesidad de una manera dependiente de las células T/NK a través de la vía de señalización TIM-3/Gal-9 (Tang *et al.*, 2013).

## Trombocitopenia inmunitaria

La trombocitopenia inmunitaria (ITP, por sus siglas en inglés de *Immune Thrombocytopenia*) es un trastorno hemorrágico autoinmune causado por una disregulación inmune que involucra diferentes mecanismos, los cuales incluyen la formación de

anticuerpos antiplaquetarios del tipo inmunoglobulina G (IgG) contra varios antígenos de superficie plaquetaria, la fijación del complemento y la disfunción de los linfocitos T, que desempeñan funciones importantes en la fisiopatología de la ITP (Zahran *et al.*, 2018). Los pacientes con ITP poseen células T autorreactivas a plaquetas que presentan un aumento de la secreción de citocinas proinflamatorias debido a la pérdida de tolerancia periférica. La desregulación de la inmunidad celular en la ITP incluye un cambio significativo de las respuestas inmunitarias proinflamatorias de las células Th1 y Th17, y una pérdida de tolerancia como resultado de un número reducido y funcionamiento defectuoso de las células T reguladoras CD4+CD25+. También hay destrucción de plaquetas por parte de linfocitos T citotóxicos (CTL) y defectos en células presentadoras de antígeno (APC), que potencialmente pueden conducir a procesamiento anormal y/o presentación de autoantígenos y a la estimulación de la autoinmunidad antiplaquetaria. Se ha sugerido también un vínculo entre la ITP y la vía TIM-3 en el que Gal-9 puede influir terapéuticamente (Zhang y Shan, 2014).

### Aterosclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad crónica progresiva de las arterias, que es la base de muchos eventos vasculares adversos importantes y la principal causa de morbilidad y mortalidad por enfermedades cardiovasculares. Varios tipos de células inmunorreactivas están presentes durante la formación de la aterosclerosis, incluidos macrófagos, células T, células B, mastocitos y células dendríticas. A pesar de que los macrófagos son las células clave en la aterosclerosis, se ha demostrado que las células T están relacionadas con la aterogénesis y, en especial, se ha sugerido que las subpoblaciones de células T desencadenan/amortiguan los procesos inflamatorios ateroscleróticos (Yu *et al.*, 2020). Previamente se ha reportado una disminución de los niveles relativos de expresión de ARNm de Gal-9, TIM-3 y Foxp3 en células mononucleares de sangre periférica en pacientes con síndrome coronario agudo (Xie *et al.*, 2020). Con base en esos hallazgos, se ha sugerido que Gal-9 tiene una función inmunorreguladora significativa en el proceso de aterosclerosis (vía Gal-9/TIM-3) y la mejora de la señalización de Gal-9 atenúa el desarrollo de placa aterosclerótica, proceso que se caracteriza por una disminución de monocitos/macrófagos y

células T efectoras y un aumento de células Treg (células T reguladoras). Esta afirmación se apoya en la demostración experimental de que la administración de anti-TIM-3-Ab aumenta la formación de placa aterosclerótica y TIM-3, el receptor de Gal-9, actúa como un regulador negativo de la aterosclerosis (Foks *et al.*, 2013). El bloqueo de las interacciones entre Gal-9 y TIM-3 promueve el desarrollo de la aterosclerosis, regula a la baja el número de células Treg y regulando al alza el número de monocitos/macrófagos y células T efectoras (Yu *et al.*, 2020).

### Esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple (EM) es un trastorno degenerativo progresivo crónico del sistema nervioso central, caracterizado por inflamación, desmielinización, falla del proceso de remielinización y pérdida axonal. La EM es una enfermedad autoinmune dependiente de células Th1 y se caracteriza por altas cantidades de IFN- $\gamma$ . Gal-9 se encontró en núcleos de microglía en lesiones activas de esta enfermedad, mientras que en las lesiones inactivas se encontró en el citoplasma (Stancic *et al.*, 2011), este hecho sugiere que Gal-9 puede estar involucrada en la regulación del promotor de genes relacionados con la inflamación asociada a la EM. Además, se han reportado niveles altos de Gal-9 en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con esclerosis múltiple secundaria progresiva, comparado con los controles sanos (Burman y Svenningsson, 2016).

### Artritis reumatoide

En modelos de roedores de artritis inmunomediada (*Rodent Models of Immune-Mediated Arthritis*, RMIA) que se utilizan comúnmente para evaluar los mecanismos de esta enfermedad inflamatoria de las articulaciones, se ha reportado que Gal-9 regula negativamente la progresión de la artritis reumatoide (AR) al inducir la diferenciación de células T vírgenes a Treg y, por lo tanto, inducir la apoptosis de células TIM3+Th1 y células Th17 proinflamatorias (Seki *et al.*, 2007). Gal-9 induce también la apoptosis de sinoviocitos hiperproliferativos (*pannus*) en las articulaciones degradadas por la AR, lo que, en consecuencia, disminuye los niveles de IL-6 proinflamatoria. En cultivos celulares, la

incubación con Gal-9 disminuye la expresión de citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL6, TNF- $\alpha$ , MCP-1, MIP-2, IL-12 e IL-17 (John y Mishra, 2016).

### Desórdenes alérgicos

**Asma.** Se ha demostrado, en un modelo murino de asma, que la administración de Gal-9 reduce la hipersensibilidad y la inflamación de las vías respiratorias asociada con Th2. La interacción de CD44 con hialuronano media la migración de células T a los pulmones, con lo que se genera un aumento de las respuestas alérgicas; Gal-9 se une a CD44 e inhibe esta migración (Katoh *et al.*, 2007).

La administración de Gal-9 suprime la reacción asmática inmediata en cobayas al formar un complejo con IgE y, por lo tanto, previene la desgranulación de los mastocitos, que de otro modo liberarían mediadores proinflamatorios (Niki *et al.*, 2009).

En una evaluación de las muestras de esputo de pacientes con asma para el análisis de inflamación de las vías respiratorias, se ha reportado que los macrófagos expresaban niveles bajos de Gal-1 y Gal-9. Los bajos niveles de Gal-1 y Gal-9 en pacientes con asma pueden estar involucrados a las respuestas inflamatorias asociadas con esta enfermedad (Sánchez-Cuellar *et al.*, 2012).

**Dermatitis atópica.** La dermatitis atópica (AD, por sus siglas en inglés de *Atopic Dermatitis*) es una enfermedad alérgica de la piel caracterizada por eosinofilia periférica, activación de mastocitos y predominio de células Th2. Los niveles séricos de Gal-9 en pacientes con AD son significativamente más altos que los de controles sanos y se correlacionan con el índice de gravedad y el área del eccema. Los niveles séricos de Gal-9 disminuyen después del tratamiento contra la AD, acompañados de una mejoría de las lesiones cutáneas. Un estudio inmunohistoquímico reportado en este mismo artículo reveló que Gal-9 se expresa en queratinocitos epidérmicos y mastocitos en la piel lesionada de la AD. Los resultados sugieren que la expresión elevada de Gal-9 está asociada con la progresión de la AD (Nakajima *et al.*, 2015).

**Alergias alimentarias.** Se ha planteado que Gal-9 tiene una función inmunorreguladora significativa durante la inflamación alérgica inducida por los alimentos; en ratones sensibilizados al trigo, la administración de *Bifidobacterium breve* M-16V (GF/*Bb*) aumenta la concentración de Gal-9 en suero y disminuye la desgranulación de mastocitos, reduciendo la gravedad de la alergia. Estos efectos fueron abolidos parcialmente por la neutralización de Gal-9 sérica (de Kivitt *et al.*, 2012; Sziksz, Vannay y Haczku, 2012).

## Cáncer

### Transformación celular

Se ha establecido una correlación negativa entre la expresión de Gal-9 y la transformación maligna (John y Mishra, 2016). En el carcinoma de células escamosas de cuello uterino, la expresión disminuida de Gal-9 puede estar asociada con la desdiferenciación de células epiteliales normales a neoplasia intraepitelial cervical. La pérdida de la expresión de Gal-9 está asociada con la disminución de la expresión de E-cadherina en las células epiteliales (Mishra *et al.*, 2010), por lo que disminución de E-cadherina en el cáncer de cuello uterino podría estar involucrada en la gravedad de las lesiones y la transformación maligna (Liang *et al.*, 2008).

### Apoptosis

La regulación de la apoptosis es una de las funciones intracelulares más estudiadas de Gal-9, relevante para la progresión tumoral. Los principales factores que influyen en los efectos de Gal-9 sobre la apoptosis de células cancerígenas son: los ligandos, la compartimentación celular, las respuestas dosis-tiempo y los tipos de células (John y Mishra, 2016).

La estructura dimérica estable de Gal-9 es importante para inducir apoptosis en células de mieloma múltiple, mediante la activación de la señalización de JNK (quinasas c-Jun N-terminal, por sus siglas en inglés de *c-Jun N-terminal kinases*) y p38-MAPK (cinasas activadas por mitógenos, por sus siglas en inglés de *mitogen-activated protein kinases*) y

mediante la activación independiente de caspasa-8, -9 y -3 (Kobayashi *et al.*, 2010); estas cinasas pueden fosforilar H2AX (un indicador de daño del ADN), lo que conduce a la fragmentación del ADN y la apoptosis. En la leucemia mieloide crónica, Gal-9 se ha relacionado con la vía apoptótica ATF3-Noxa en la que la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la inducción del estrés del retículo endoplásmico es precedida por la activación de las cascadas de caspasa-3/caspasa-8/caspasa-9 y caspasa-8/caspasa-4 (señales proapoptóticas) (Kikushige *et al.*, 2015).

En pacientes con infección crónica por virus de la hepatitis C o virus de la hepatitis B, Gal-9 induce la apoptosis mediada por TIM-3 de las células T efectoras, favorece la expansión de células Treg y atenúa las respuestas inmunitarias adaptativas para inducir el fallo de la respuesta inmunitaria, facilitando de esa manera la persistencia viral. Gal-9 muestra un efecto tumoral al mediar la disfunción de las células T en el carcinoma nasofaríngeo asociado al virus de Epstein-Barr y hepatocarcinoma y predice un mal pronóstico en pacientes con hepatocarcinoma asociado al virus de la hepatitis B (Bacigalupo *et al.*, 2013).

El efecto inhibitorio de Gal-9 sobre cánceres sólidos (mama, colon, oral, gástrico, etc.) parece depender de la interferencia con varias características metastásicas de las células cancerígenas en lugar de la citotoxicidad inmediata. Aunque las células B no expresan TIM-3, las líneas celulares de linfoma de células B son sensibles a la inducción de muerte celular por Gal-9 recombinante (Bacigalupo *et al.*, 2013). Por lo tanto, Gal-9 induce la muerte celular apoptótica en muchos tipos de cáncer como el melanoma (Wiersma *et al.*, 2012), cáncer de mama, carcinoma hepatocelular, leucemia de células T maduras (Kashio *et al.*, 2003), mieloma múltiple (Kobayashi *et al.*, 2010), leucemia mieloide crónica (Kuroda *et al.*, 2010), linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, sarcoma (Nagahara *et al.*, 2008), carcinoma de vesícula biliar (Tadokoro *et al.*, 2016), cáncer gástrico (Takano *et al.*, 2016), colangiocarcinoma (Kobayashi *et al.*, 2015), entre otros. Sin embargo, en la leucemia mieloide, TIM-3/Gal-9 activan las vías ERK1/2 y AKT que permiten que la  $\beta$ -catenina y la NF- $\kappa$ B impulsen cooperativamente vías de señalización implicadas en la malignidad de este cáncer (Elahi *et al.*, 2012).

## Adhesión, migración e invasión

El desprendimiento de las células cancerígenas de su sitio primario al dañarse los contactos célula-célula, la invasión de la matriz extracelular por interacciones célula-célula y célula-matriz, la unión de células cancerígenas al endotelio vascular, la invasión de células cancerígenas a través del endotelio vascular, la migración a sitios distantes y el establecimiento del crecimiento tumoral con neovascularización son los pasos esenciales en la metástasis tumoral maligna (Leber y Efferth, 2009; Martin *et al.*, 2013). En los estudios sobre el cáncer, numerosos hallazgos apoyan la importancia de Gal-9 en los procesos de adhesión, migración e invasión. Gal-9 juega un papel importante en la formación de agregados celulares (Irie *et al.*, 2005), interacciones célula-matriz extracelular (Nobumoto *et al.*, 2008) e interacciones inhibitoras entre célula y endotelio (Zhang *et al.*, 2009) y prevención de invasiones de células cancerígenas (Kageshita *et al.*, 2002; Irie *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012). Si bien Gal-9 promueve la agregación celular, previene la adhesión celular de las células cancerígenas con las células endoteliales vasculares al bloquear la interacción entre las VCAM1 (moléculas de adhesión celular vascular, por sus siglas en inglés de *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*) y VLA4 (antígeno muy tardío 4, por sus siglas en inglés de *Very Late Antigen-4*) (Nobumoto *et al.*, 2008). Tanto la forma endógena como la Gal-9 secretada exógenamente pueden inhibir el contacto libre de células (Zhang *et al.*, 2009).

Gal-9 puede desencadenar la agregación de células cancerígenas (Kageshita *et al.*, 2002; Irie *et al.*, 2005), afectar el desprendimiento de células (Nobumoto *et al.*, 2008) y prevenir el escape de células cancerígenas del tumor primario (Irie *et al.*, 2005; Kageshita *et al.*, 2002; Liang *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012). Gal-9 puede inhibir el proceso metastásico mediante el bloqueo de la adhesión celular a los componentes de la matriz extracelular, como el colágeno, la laminina y la fibronectina (Nobumoto *et al.*, 2008). Sin embargo, las células de carcinoma escamoso oral que expresan baja Gal-9 muestran una mayor adhesión al colágeno y fibronectina (Kasamatsu *et al.*, 2005). Además, se ha reportado que TIM-3 expresado por células endoteliales facilita la metástasis por células de melanoma y en tales casos se puede usar Gal-9 recombinante para reducir la adhesión/metástasis de células cancerígenas bloqueando competitivamente TIM-3 en las células endoteliales (John y Mishra, 2016).

Gal-9 se expresa altamente en lesiones melanocíticas de baja malignidad, mientras que las lesiones metastásicas se caracterizan por una expresión baja o nula de Gal-9. En hepatocarcinoma, la disminución de Gal-9 da como resultado metástasis en los ganglios linfáticos, invasión vascular y metástasis intrahepática, mientras que el aumento de la expresión de Gal-9 inhibe la adhesión y la invasión de las células cancerígenas al endotelio (Zhang *et al.*, 2012; Bacigalupo *et al.*, 2013).

Los tumores de carcinoma de mama primarios se caracterizan por altos niveles de Gal-9 endógena, mientras que todas las metástasis distantes carecen de expresión de Gal-9 (Irie *et al.*, 2005). El epitelio normal y el carcinoma de cuello uterino de bajo grado presentan niveles altos de Gal-9, mientras que las lesiones de carcinoma de cuello uterino de alto grado presentan niveles muy bajos de Gal-9 (Liang *et al.*, 2008), por lo tanto, la pérdida de Gal-9 es un factor pronóstico negativo en estos tipos de cáncer.

Las células cancerígenas transfectadas con Gal-9 mostraron una menor metástasis que las células cancerígenas negativas para Gal-9 en modelos murinos de melanoma y cáncer de colon. Además, la administración intravenosa de Gal-9 recombinante redujo significativamente la formación de metástasis de melanoma y células de cáncer de colon en un modelo murino (Kageshita *et al.*, 2002). Tomados en conjunto, estos datos indican que Gal-9 expresada de forma endógena inhibe la formación de metástasis en ciertos tipos de cánceres. Gal-9 puede modular positiva o negativamente el comportamiento invasivo de las células cancerígenas, de modo que sus mecanismos completos y resultados siguen siendo en gran parte desconocidos con los diferentes tipos de cáncer. Por ejemplo, se ha encontrado que la Gal-9 aumenta la adhesión en melanoma (Kageshita *et al.*, 2002), cáncer oral (Kasamatsu *et al.*, 2005) y de las células de cáncer de colon (Zhang *et al.*, 2009) pero reduce la adhesión de las células de cáncer de mama (Irie *et al.*, 2005).

### Escape inmunológico

En el contexto inmunológico, Gal-9 está bien caracterizada como un quimioatrayente de eosinófilos (Matsumoto, 1998; Sato *et al.*, 2002). Los eosinófilos se asocian predominantemente con la actividad antitumoral y generalmente son indicadores de un buen pronóstico en patologías (Thijssen *et al.*, 2015). Curiosamente, la eosinofilia se observa a

menudo en tumores hematológicos y de colon (Munitz y Levi-Schaffer, 2004; Wedemeyer y Vosskuhl, 2008), además, estos tumores muestran con frecuencia una mayor expresión de Gal-9 en comparación con el tejido normal. Gal-9 derivada del tumor media la infiltración de eosinófilos en el microambiente tumoral y la pérdida de Gal-9, como se observa en varios tipos de tumores sólidos, permite que los tumores escapen de la respuesta antitumoral mediada por eosinófilos (John y Mishra, 2016). La capacidad de Gal-9 para modular la diferenciación, expansión y migración de otras células inmunes (por ejemplo, diferenciación Th17, apoptosis Th1 y migración de células Th2), apoya la actividad inmunosupresora de Gal-9 en el escape inmunológico tumoral. Este efecto inmunosupresor de Gal-9 se ha propuesto como el mecanismo gracias al cual las células de carcinoma nasofaríngeo infectadas con el virus de Epstein-Bar escapan a la vigilancia inmunológica (Keryer-Bibens *et al.*, 2006; Klibi *et al.*, 2009). También se observa una función similar del escape inmune con el carcinoma hepatocelular asociado al virus de la hepatitis B a través del eje Gal-9/TIM-3 (Bacigalupo *et al.*, 2013; Nebbia *et al.*, 2012). Por otro lado, se ha demostrado que la administración de Gal-9 induce la expansión de las células dendríticas, lo que resulta en la potenciación de la inmunidad antitumoral mediada por células CD8+ o NK en modelos de sarcoma y melanoma, respectivamente (Clayton *et al.*, 2014).

### *Enfermedades infecciosas*

#### Infecciones virales

**Virus de inmunodeficiencia humana.** Gal-9 favorece la infección por VIH-1 al inducir la apoptosis de las células Th1 y la migración de las células Th2, lo cual afecta la proporción de células Th1/Th2 (Bi *et al.*, 2011). Gal-9 se une a O-glicanos en la proteína disulfuro isomerasa (PDI, por sus siglas en inglés de *Protein Disulfide-Isomerase*) del receptor de células T de las células Th2 (Fenouillet *et al.*, 2001). Los ensayos de inmunoprecipitación y migración de células T han revelado que la interacción Gal-9-PDI induce la migración de células Th2 al aumentar la concentración y el tiempo de retención de PDI en la superficie de las células Th2. Por consiguiente, se ha demostrado que la adición exógena de Gal-9 aumenta la entrada viral de una manera dependiente de PDI, ya que los inhibidores de PDI revierten

la entrada viral mediada por Gal-9 *in vitro*. En resumen, el microambiente Th2 resultante de la regulación positiva de Gal-9 es aprovechado por el VIH-1 para promover la infección (Ayona *et al.*, 2020).

**Virus de la hepatitis B.** Un nivel elevado de Gal-9 se correlaciona con la regulación positiva de las células Treg de memoria (mTreg) lo que provoca una expansión de estas células a través de la interacción Gal-9/TIM-3 que puede limitar los daños hepáticos provocados durante la fase inflamatoria de la infección crónica por virus de la hepatitis B (VHB) (Hu *et al.*, 2017). Se ha reportado que la vía de señalización TIM-3/Gal-9 regula la disfunción y el agotamiento de las células T en la infección crónica por VHB (Li *et al.*, 2012). Por último, se han reportado niveles detectables de Gal-9 en biopsias de pacientes infectados por VHB (Barjon *et al.*, 2012).

**Virus de la hepatitis C.** Se ha reportado que la persistencia de la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) está relacionada con el aumento de los niveles de Gal-9 y la expansión de las Treg que expresan Gal-9 (Zhuo *et al.*, 2017; Kared *et al.*, 2013; Harwood *et al.*, 2016). La infección puede deberse a un desequilibrio entre las células Treg productoras de Th17 y Gal-9 que producen IL-21, lo que sugiere que Gal-9 e IL21 median la regulación cruzada entre las células Th17 y Treg durante la infección por VHC, respectivamente. Además, las células infectadas por el VHC estimulan a los monocitos a diferenciarse en macrófagos, lo que contribuye al aumento de Gal-9 en el hígado y suero de pacientes infectados con VHC (Harwood *et al.*, 2016). Se reportan también niveles bajos, pero detectables, de Gal-9 en hepatocitos, leucocitos y células de Kupffer en biopsias de pacientes infectados con VHC (Wang *et al.*, 2020).

**Virus del herpes simple.** Gal-9 participa en la reactivación del virus del herpes simple (HSV). Tras la infección por HSV, las células T CD8+ se acumulan en el ganglio del trigémino y mantienen la latencia del HSV, pero la latencia intermitente y la reactivación son provocadas por la interacción TIM-3/Gal-9. Se ha demostrado que los ganglios del trigémino infectados con virus (replicantes/latentes) presentan la expresión de Gal-9 regulada al alza, la cual interactúa con TIM-3 de las células T CD8+ y reduce la función efectora de las células

T e induce su apoptosis (Reddy *et al.*, 2011). Las células T CD8+ aisladas del ganglio del trigémino de ratones infectados deficientes de Gal-9 presentan una mayor funcionalidad efectora que las aisladas de ratones silvestres; un indicio de esta funcionalidad es la presencia detectable de citocinas proinflamatorias IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Además, la adición de Gal-9 recombinante a cultivos de células de ganglio del trigémino infectados con HSV en la fase latente dio como resultado la apoptosis de la mayoría de las células T CD8+. La reactivación de HSV a partir de la latencia puede ocurrir cuando se altera el número o la función efectora de las células T CD8+ del ganglio del trigémino (Freeman *et al.*, 2007; Strauss *et al.*, 2002), por lo tanto, Gal-9 parece favorecer la infección por HSV-1 al facilitar la reactivación viral de la latencia bajo la influencia de los mecanismos homeostáticos del hospedero (Reddy *et al.*, 2011).

**Virus de Epstein-Barr.** Un estudio *in vitro* sobre carcinomas nasofaríngeos asociados al virus de Epstein-Barr (EBV) ha sugerido que Gal-9 contribuye al progreso de la infección (Ayona *et al.*, 2020). El carcinoma nasofaríngeo asociado al EBV produce exosomas que contienen Gal-9 (Pioche-Durieu *et al.*, 2005), estos exosomas protegen a Gal-9 de la escisión proteolítica y conservan su capacidad de unión a TIM-3. En consecuencia, se ha demostrado que estos exosomas inducen la apoptosis de células T CD4+ específicas de EBV a través de la vía TIM-3/Gal9 y que la apoptosis puede inhibirse neutralizando anticuerpos dirigidos contra el dominio de unión a TIM-3 de Gal-9 (Klibi *et al.*, 2009).

**Virus sincitial respiratorio.** Se ha reportado que la administración de Gal-9 provoca una reducción de la patología pulmonar y la carga viral en la infección por virus sincitial respiratorio, que pueden inhibir la producción de células Th17 y alterar la apoptosis de las células T CD8+ (Lu *et al.*, 2015).

**Virus de la influenza.** Se ha informado que Gal-9 desempeña funciones en la infección por el virus de la influenza: los pacientes infectados con virus de la influenza presentan niveles altos de Gal-9 en plasma (Kato *et al.*, 2014); otro estudio en un modelo murino específico para el estudio de la influenza A reportó que obstaculizar las señales de Gal-9 dirigidas a las células que expresan TIM-3 causa una respuesta inmune por medio de la

respuesta de las células T CD8+ específicas del virus de la influenza, mejorando así la generación de anticuerpos específicos hacia el virus (IgM, IgG e IgA) y promoviendo la eliminación rápida del virus (Sharma *et al.*, 2011).

**Virus del dengue.** En la infección por el virus del dengue (DENV), Gal-9 funge como un biomarcador que puede ayudar a rastrear la respuesta inflamatoria inducida por la infección por DENV, pues los niveles de Gal-9 en plasma de estos pacientes es notablemente elevado (Chagan-Yasutan *et al.*, 2013). Además, un informe indicó una regulación al alza de Gal-9 en células dendríticas humanas (DC) después de la infección por DENV; en este mismo estudio se reporta que las DC *knockout* para Gal-9 inhiben la migración estimulada por DENV al quimioatrayente CCL19 y CCL21, y reducen su producción de IL-12p40 y la activación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), lo que sugiere que Gal-9 es un objetivo terapéutico para prevenir la inmunopatogénesis inducida por DENV (Hsu *et al.*, 2015).

#### Infecciones bacterianas

***Klebsiella pneumoniae*.** Durante la infección por *K. pneumoniae*, la citocina IL-17A juega un papel crucial en la defensa del hospedero contra la infección (Ye *et al.*, 2001). IL-17A es producida por células Th17 que también son susceptibles a la apoptosis mediada por Gal-9/TIM-3. Consecuentemente, se ha demostrado que la administración de Gal-9 a ratones infectados con *K. pneumoniae* reduce la secreción de citocinas por las células Th1 y Th17 y también inhibe la regulación positiva de G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos) y MIP-2 (proteína inflamatoria de macrófagos 2), que son cruciales para la diferenciación de neutrófilos. Por tanto, la inyección de Gal-9 a ratones infectados reduce el aclaramiento bacteriano, lo que resulta en una tasa de supervivencia más baja que la del grupo de control sin tratamiento con Gal-9. En conjunto, estos hallazgos sugieren que la apoptosis de células Th1 y Th17 mediada por Gal-9/TIM-3 actúa como un regulador negativo del mecanismo de defensa del hospedero contra *K. pneumoniae* (Wang *et al.*, 2011; Ayona *et al.*, 2020).

## Citocinas que aumentan la expresión de Gal-9

Se ha reportado que las citocinas proinflamatorias, pero no las antiinflamatorias, inducen o aumentan la expresión de Gal-9 en diferentes líneas celulares. La evidencia experimental al respecto se resume en la Tabla 1:

**Tabla 1.** Evidencia experimental del efecto de citocinas proinflamatorias en los cambios de expresión de Gal-9 en diversas líneas celulares.

Citocina	Efecto en línea celular	Referencia
IFN- $\gamma$	Aumenta la expresión de Gal-9 en células HUVEC (vía HDAC3/P13K/IRF3), en fibroblastos (vía MAPK, PI3K y JAK/STAT), en APCs (células presentadoras del antígeno), en astrocitos TCR (vía TNF/TNFR1/JNK/c-Jun), en células mesenquimales multipotentes humanas (MSC, por sus siglas en inglés <i>Mesenchymal Stem Cells</i> ) y en células mesenquimales derivadas de la médula ósea (BM-MSC, por sus siglas en inglés de <i>Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells</i> ).	Alam <i>et al.</i> , 2011; Imaizumi <i>et al.</i> , 2002; Park <i>et al.</i> , 2011; Asakura <i>et al.</i> , 2002; Li <i>et al.</i> ; 2012; Steelman <i>et al.</i> , 2013; Zhu <i>et al.</i> , 2005; Gieseke <i>et al.</i> , 2013; Kim <i>et al.</i> , 2015
IFN- $\alpha$	estimula la expresión de Gal-9 en células dendríticas.	van den Hoogen <i>et al.</i> , 2018.
IFN- $\beta$	Induce la expresión de Gal-9.  En fibroblastos de prepucio humano (HFF-1) infectados con citomegalovirus humano primario (HCMV, por sus siglas en inglés de <i>Human Cytomegalovirus</i> ), regula positivamente la expresión de Gal-9.	Leaman <i>et al.</i> , 2003  McSharry <i>et al.</i> , 2014. Schilling <i>et al.</i> , 2021.
IL-1 $\beta$	Estimula la expresión de Gal-9 en astrocitos.	Yoshida <i>et al.</i> , 2001; Steelman <i>et al.</i> , 2013.

---

TNF- $\alpha$	Aumenta la expresión de Gal-9 en astrocitos e induce la expresión y secreción de Gal-9 en BM-MSCs	Induce la Steelman <i>et al.</i> , 2013; Kim <i>et al.</i> , 2015.
---------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------

---

Se ha demostrado que las citocinas antiinflamatorias inducen el proceso contrario; de hecho, se ha reportado que IL-5, citocina antiinflamatoria (Opal y DePalo, 2000) regula a la baja la expresión de Gal-9 en eosinófilos (Saita *et al.*, 2002).

### *Interferones*

#### *Definición*

Se sabe que el gen *LGALS9* es estimulado por IFN (Kane *et al.*, 2016), sin embargo, se desconocen los factores de transcripción específicos involucrados en este proceso.

Los IFN son una familia de citocinas que participan en vías de señalización y se agrupan de acuerdo con su origen celular y sus agentes inductores. De estas citocinas ha sido descrita principalmente su actividad antiviral. Después de unirse a su receptor específico, los IFN activan la vía de transducción de señal que activa a su vez una amplia gama de genes que son conocidos por su papel en la actividad antiviral y en procesos de inmunomodulación y control de la proliferación. La inhibición del crecimiento del virus o de la proliferación de células mediada por IFN está asociada con cambios fisiológicos, algunos de los cuales dependen de la actividad de proteínas específicas que son inducibles por IFN (De Andrea *et al.*, 2002). Los IFN regulan una amplia gama de procesos fisiológicos que incluyen la síntesis de citocinas y quimiocinas (Biron, 1999), traducción de ARNm (Williams, 2001), estabilidad de proteínas y ARN (Silverman, 1997; Nyman *et al.*, 2000) presentación del antígeno (Taniguchi *et al.*, 2001), tráfico nuclear (Enninga *et al.*, 2002), diferenciación celular (Takayanagi *et al.*, 2002; Horiuchi, Hayashida, Akishita, 2000), división celular y apoptosis (Kissil y Kimchi, 1998). Estas citocinas se han catalogado principalmente en tres clases:

Tipo I, donde se incluyen principalmente a IFN - $\alpha$  y  $\beta$  (Figura 4 y Tabla 2); tipo II, cuyo miembro más representativo (y único reportado a la fecha) es IFN- $\gamma$  (Figura 4 y Tabla 2), y tipo III, compuesta por IFN- $\lambda$ .

Los IFN transducen señales a través de vías diferentes, pero estrechamente relacionadas entre sí (Tabla 2):

**Tabla 2.** Clasificación de IFN.

Tipos de IFN	Nombres	Locus	Cadena Receptora 1	Cadena Receptora 2	Vías de transducción de señales
IFN de tipo I	IFN- $\alpha$	9p21+3	IFN- $\alpha$ R1	IFN- $\alpha$ R2	Jak1, Tyk2
	IFN- $\beta$	9p21+3			Stat1, Stat2, Stat3
	IFN- $\delta$	No identificado			Stat4, Stat5
	IFN- $\epsilon$	9p21+3			PI3K
	IFN- $\kappa$	9p21+3			Akt
	IFN- $\tau$	No identificado			NF- $\kappa$ B
	IFN- $\omega$	9p21+3			MAPK
	Limitina (IFN- $\zeta$ )	No identificado			p53/ PRMT1
IFN de tipo II	IFN- $\gamma$	12q14+3	IFN- $\gamma$ R1	IFN- $\gamma$ R2	Jak1, Jak2/ Stat1, Stat3, Stat5/ PI3K/ Akt/ NF- $\kappa$ B/ MAPK
IFN de tipo III	IFN- $\lambda$ 1 (IL-29)	19q13+2	IL-28R1	IL-28R1	Stat5
	IFN- $\lambda$ 2 (IL-28B)	19q13+2			Stat1, Stat2, Stat3
	IFN- $\lambda$ 3 (IL-28A)	19q13+2			Jak1, Tyk2
	IFN- $\lambda$ 4	19q13+2			JAK-STAT

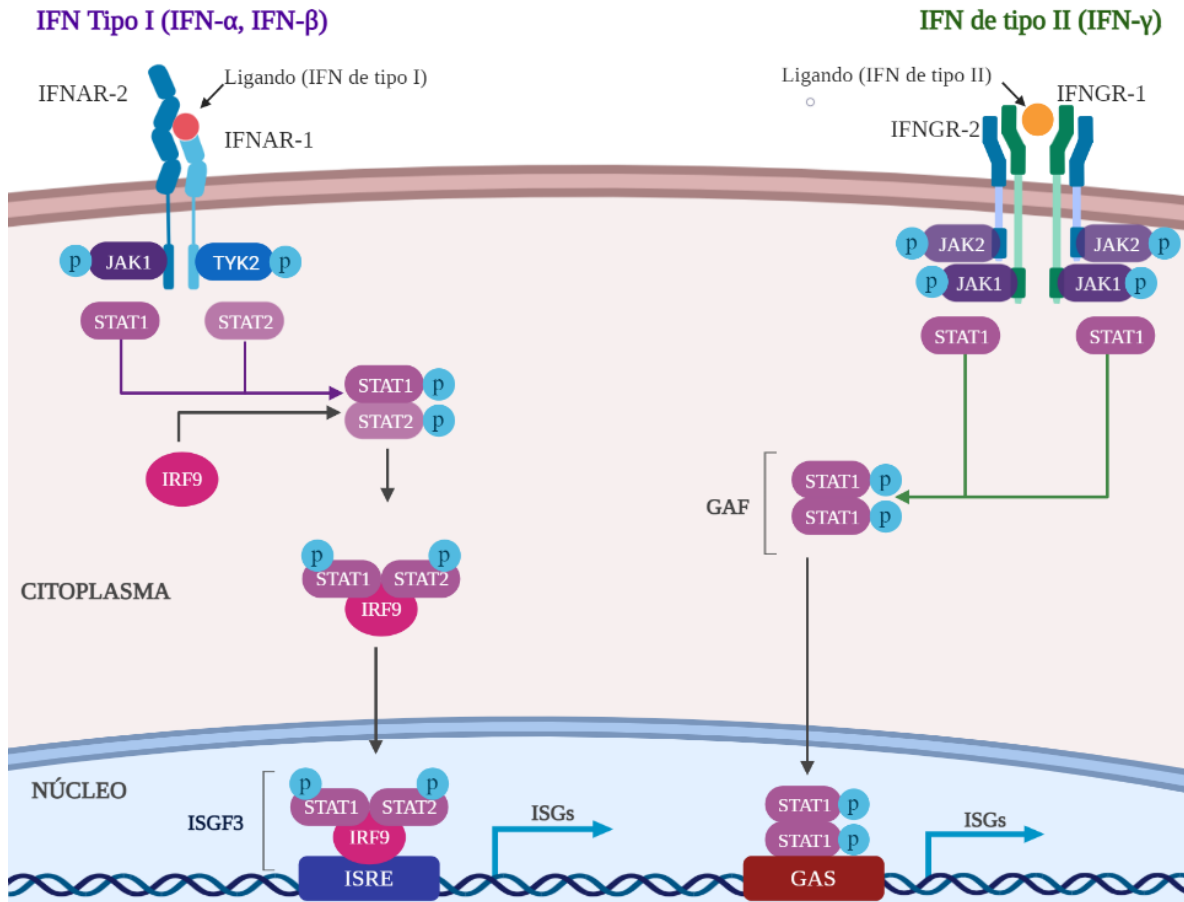
Modificado de Pestka, Krause y Walter, 2004.

Debido a la escasa información referente al efecto de los IFN de tipo III sobre la expresión y regulación de Gal-9, los antecedentes presentados en este trabajo se centrarán en los IFN de tipo I y II, pues existen bases experimentales que señalan a los IFN  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  incrementan o inducen su expresión en diferentes líneas celulares.

#### *Vías canónicas de señalización de IFN de tipo I y II*

En lo que respecta a la vía de señalización de los IFN del tipo I, estos son reconocidos por un receptor heterodimérico compuesto por las subunidades 1 y 2 del receptor de interferón- $\alpha$  (IFNAR, por sus siglas en inglés de *Interferon Alpha Receptor*). Tras la interacción con el ligando, ocurre la fosforilación del receptor mediada por JAK, que conduce al reclutamiento y activación de STAT1 y STAT2 citoplasmáticos; una vez fosforiladas STAT1 y STAT2; éstas se asocian con el factor regulador de interferón 9 (IRF9, por sus siglas en inglés de *Interferon Regulatory Factor 9*) presente en el citoplasma para formar un complejo heterotrimérico llamado factor 3 estimulado por interferón (ISGF3, por sus siglas en inglés de *Interferon Stimulated Gene Factor 3*), el cual es transportado al núcleo, dónde reconoce el elemento de respuesta estimulado por IFN (ISRE, por sus siglas en inglés de *IFN-Stimulated Response Element*) para activar los genes que presentan esta secuencia (Figura 4, izquierda) (Michalska *et al.*, 2018).

El IFN de tipo II, como ligando, interactúa exclusivamente con el receptor formado por dos subunidades del receptor del interferón- $\gamma$  1 (IFNGR1, por sus siglas en inglés de *Interferon Gamma Receptor 1*) y dos del receptor del interferón- $\gamma$  2 (IFNGR2, por sus siglas en inglés de *Interferon Gamma Receptor 2*), cuya fosforilación es mediada por JAK 1 y 2, las cuales a su vez son capaces de fosforilar sólo proteínas STAT1, que a su vez forman un homodímero llamado factor activado por  $\gamma$  (GAF, por sus siglas en inglés de  *$\gamma$ -Activated Factor*). El homodímero GAF translocará al núcleo, activando genes que contengan la secuencia activada por  $\gamma$  (GAS, por sus siglas en inglés de  *$\gamma$ -Activated Sequence*,) (Figura 4, derecha) (Michalska *et al.*, 2018).



**Fig. 4.** Vías de señalización inducidas por IFN de tipo I (izquierda) y II (derecha). Las letras “p” en la imagen indican fosforilación. Modificado de Michalska *et al.*, 2018.

Además de IRF9, que juega un papel fundamental en la regulación de la vía canónica de señalización activada por IFN de tipo I, y en vías no canónicas de señalización activada por IFN de tipo II, existen otros factores de transcripción de la misma familia que pueden regular vías de señalización activadas por IFN, de los cuales hablaremos en la siguiente sección.

### *Familia IRF*

#### Definición y estructura

La familia de factores reguladores del interferón (*Interferon Regulatory Factors*, IRF), comprende nueve miembros (IRF1-9) (Honda y Taniguchi, 2006), y está compuesta por

factores de transcripción que juegan un papel importante no sólo en la inducción de genes inducida por IFN, sino también en el desarrollo celular, la respuesta antiviral intrínseca de la célula, la inflamación y la oncogénesis (Savitsky *et al.*, 2010). Todos los miembros de la familia IRF poseen un DBD (dominio de unión a ADN, por sus siglas en inglés de *DNA Binding Domain*) en su extremo amino terminal que se caracteriza por cinco repeticiones de triptófano conservadas (Taniguchi *et al.*, 2010). El DBD forma una estructura tipo hélice-giro-hélice que reconoce el elemento ISRE el cual se caracteriza por la secuencia 5'-RRTTTCNNTTTY-3' (Cho *et al.*, 2008; Platanitis *et al.*, 2019). La región carboxilo-terminal de los IRF media la interacción de un IRF específico con miembros de su misma familia, con otros factores de transcripción o con cofactores, así como también confiere las actividades específicas de cada IRF. En esta misma región se han identificado dos módulos de asociación: dominio 1 asociado a IRF (IAD1, por sus siglas en inglés de *IRF-Associated Domain 1*), el cual se encuentra conservado en todos los miembros de la familia IRF excepto IRF1 e IRF2, y el dominio 2 asociado a IRF (IAD2), el cual poseen IRF1 e IRF2 (Mamane *et al.*, 1999). La naturaleza de las interacciones proteína-proteína que posibilitan estos dominios determina la función y especificidad de los miembros de la familia IRF, los cuales pueden actuar como activadores o represores transcripcionales, (Michalska *et al.*, 2018).

Adicionalmente, el DBD de IRF se une a un motivo específico llamado elemento IRE (IRE. por sus siglas en inglés de *IRF Element*), cuya secuencia es 5'-GAAA-3', presente dentro de los promotores de los genes IFN $\alpha$  e IFN $\beta$ , así como en los ISG. IRE podría considerarse una versión más corta de ISRE y no es reconocida por ISGF3 (Michalska *et al.*, 2018; Antonczyk *et al.*, 2019). Se han reportado también sitios IRE alternativos o especiales (GAGA, GACA) que pueden ser reconocidos por IRF3, 5 y 9 (Csumita *et al.*, 2020).

### Unión al ADN de IRF y activación transcripcional

Tras la unión del IFN con su receptor, se desencadena la señalización de STAT a través de la fosforilación de JAK1 y/o JAK2. El IFN- $\gamma$  (IFN de tipo II) induce específicamente la formación del homodímero STAT1, mientras que los IFN-I y IFN-III inducen la formación del heterotrímero ISGF3, o STAT2/IRF9 en ausencia de ISGF3. Estos complejos se translocan al núcleo para unirse al ADN en las secuencias de reconocimiento GAS o ISRE.

La estimulación inicial con IFN conduce a la expresión temprana de ISG y la transcripción de IRF 1/5/7/8/9, STAT1 y STAT2. La acumulación de estos factores de transcripción recién sintetizados conduce a una oleada secundaria prolongada de expresión de ISG, que contribuye a la actividad antiviral y la defensa del hospedero (Michalska *et al.*, 2018).

Los IRF activados en las vías de señalización inducidas por IFN se unen al ISRE como homo y heterodímeros, en los que cada IRF entra en contacto con la secuencia IRE en lados opuestos del ADN. Por ejemplo, IRF1 e IRF2 pueden formar un heterodímero que se ha demostrado que regula la transcripción del gen EBNA1 del virus de Epstein-Barr en fibroblastos infectados (Schaefer, Strominger y Speck, 1997). Además, IRF1 e IRF2 se unen y regulan a los genes Cox-2 y prostaglandina E2 tras la estimulación con IFN- $\gamma$  (Blanco *et al.*, 2000).

Se conoce también que IRF3 forma homodímeros tras la infección viral (Wang *et al.*, 2016; Yoneyama, Suhara y Fujita, 2002). Las estructuras cristalinas del dominio de transactivación de IRF3 revelan un mecanismo autoinhibidor único. Como tales, los elementos autoinhibidores que rodean al IAD, en una forma condensada cerrada, creando un núcleo hidrofóbico que mantiene la proteína en un estado inactivo. La liberación del sitio activo hidrófobo tras la fosforilación conduce a un cambio conformacional, expone el DBD y permite la unión al ADN (Qin *et al.*, 2003; Takahasi *et al.*, 2003). La actividad transcripcional de IRF3 está controlada por eventos de fosforilación en los residuos Ser385 o Ser386 (Takahasi *et al.*, 2003). El homodímero de IRF3 se considera el activador principal de la transcripción de los genes IFN $\beta$  e IFN $\alpha$ 4, lo que lleva a la activación de la vía del IFN-I y la expresión posterior de ISGs (Wang *et al.*, 2016). Se ha reportado también la actividad transcripcional de IRF3 inducida por IFN- $\gamma$ , regulada por la histona deacetilasa 3 (HDAC3), en la que la fosfoinositol-3-cinasa (PI3K) fosforila IRF3, lo cual permite la dimerización de este factor de transcripción y su posterior translocación al núcleo (Bi *et al.*, 2011; Alam *et al.*, 2011).

El modelo propuesto de la activación transcripcional por IRF5 e IRF7 es similar al de IRF3 e implica cambios conformacionales inducidos por la fosforilación C-terminal seguida de homo y heterodimerización, y translocación al núcleo. Sin embargo, otros miembros de la familia IRF pueden funcionar a través de diferentes sistemas de activación independientes de la fosforilación; uno de estos miembros es IRF4, que se caracteriza por una baja afinidad de

unión al ADN y posee una región autoinhibidora (AR, por sus siglas en inglés de *Auto-inhibitory Region*) compuesta por los últimos 30 aminoácidos del IAD. En un modelo de mecanismo autoinhibidor propuesto por Remesh *et al.* (2015), se sugiere que el AR interactúa directamente con el DBD y deja la proteína en un estado inactivo autoinhibido. Tras la interacción con un compañero de unión, la estructura de la proteína se reorganiza, expone el DBD y permite que IRF4 entre en contacto con el ADN. Debido a la alta similitud estructural, se especula que la regulación de la actividad de IRF8 ocurre de manera similar (Barnes, Field y Pitha-Rowe, 2003; Remesh *et al.*, 2015).

Un estudio de genoma completo en el que se utilizaron microarreglos de unión a proteínas que se empleó para caracterizar la unión al ADN de los homodímeros IRF3/5/7 reveló que, además de los sitios de unión comunes, hay un gran número de sitios de unión al ADN específicos de dímeros en el genoma humano (Andrilenas *et al.*, 2018). De manera similar a los homodímeros, los heterodímeros de IRF forman un complejo con un IRF a cada lado de la hélice del ADN, y ambos entran en contacto con la secuencia ISRE. Tanto IRF5 como IRF7 se expresan constitutivamente en monocitos, linfocitos B y precursores de células dendríticas. Cuando IRF7 se fosforila, puede interactuar con IRF5 y formar un heterodímero. Mediante el mapeo del dominio de interacción, Barnes *et al.* (2004) demostraron *in vitro* que los heterodímeros de IRF5/IRF7 se forman a través del extremo amino y enmascaran el dominio de unión al ADN, lo que da como resultado una alteración en el complejo de enhanceosoma de conjuntos de genes activados por IFN- $\alpha$  (Barnes, Field y Pitha-Rowe, 2003). El heterodímero IRF5/7 activa la expresión de genes que codifican proteínas inflamatorias, antivirales y proapoptóticas (Barnes *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2008).

El heterodímero mejor estudiado es IRF3/IRF7 (Antonczyk *et al.*, 2019). IRF3 e IRF7 interactúan durante etapas específicas del proceso inflamatorio. En líneas celulares de fibroblastos humanos, la infección viral activa IRF7 y, en consecuencia, aumenta la regulación de MAP3K8, una cinasa que inhibe la formación del dímero de IRF3 y promueve la formación de heterodímeros de IRF3/IRF7, necesarios para limitar la replicación viral *in vitro* (Schmid *et al.*, 2014).

## *Evidencia experimental del efecto de los IFN en la expresión de Gal-9*

### IFN de tipo I (IFN- $\alpha$ e IFN- $\beta$ )

Se ha mencionado previamente que Gal-9 es inducida por mediadores proinflamatorios implicados en la fisiopatología de las enfermedades autoinmunes. En un estudio *in vitro* donde se incubaron células dendríticas con IFN- $\alpha$  durante 3 horas, la expresión de Gal-9 mostró un incremento significativo (van den Hoogen *et al.*, 2018).

En el caso del IFN- $\beta$ , los estudios de microarreglos indican que el IFN- $\beta$  induce la expresión de Gal-9 (Leaman *et al.*, 2003). En un estudio en el que las células de fibroblastos de prepucio humano (HFF-1) fueron infectadas con HCMV o HCMV inactivado con luz UV, la presencia de anticuerpos policlonales de IFN- $\beta$  humanos evitó la regulación al alza de Gal-9, perfilando al IFN- $\beta$  como una molécula esencial para la regulación positiva de Gal-9 relacionada con el HCMV. En este mismo estudio, se informó que el IFN- $\beta$  recombinante por sí solo aumentó de manera significativa la expresión de Gal-9, sugiriendo que IFN- $\beta$  es el principal factor impulsor de la regulación positiva de Gal-9 mediada por HCMV (McSharry *et al.*, 2014; Schilling *et al.*, 2021).

### IFN de tipo II (IFN- $\gamma$ )

Gal-9 derivada de astrocitos en respuesta a citocinas proinflamatorias aumenta la apoptosis de las células Th1, lo cual sugiere que Gal-9 podría actuar como una de las señales de retroalimentación negativa para amortiguar la inmunidad Th1 en el sistema nervioso central. (Steelman *et al.*, 2013).

En células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) estimuladas con IFN- $\gamma$ , la expresión de Gal-9 está regulada por HDAC3 y la fosforilación de IRF3 mediada por PI3K (Imaizumi *et al.*, 2002; Alam *et al.*, 2011). En este último artículo se reporta que IFN- $\gamma$  induce la expresión de Gal-9 en HUVEC de una manera dependiente del tiempo, que coincide con la activación de HDAC3. La expresión de Gal-9 inducida por IFN- $\gamma$  fue abolida en células endoteliales tratadas con el inhibidor de HDAC3, apicidina, o tras el silenciamiento de shRNA-HDAC3, sin embargo, la sobreexpresión de HDAC3 induce la interacción entre

PI3K e IRF3, lo cual conduce a la fosforilación de IRF3, su translocación al núcleo y la inducción de la expresión de Gal-9. HDAC3 funciona como una proteína de andamio para la interacción PI3K/IRF3 (Alam *et al.*, 2011). En el trabajo de Imaizumi *et al.* (2002), se detectó Gal-9 en fracciones citosólicas y de membrana de HUVEC estimuladas con IFN- $\gamma$ ; Gal-9 se expresa en el endotelio de lesiones inflamatorias humanas, pudiendo mediar, en parte, las respuestas inmunitarias en las células endoteliales inducidas por el IFN- $\gamma$  (Imaizumi *et al.*, 2002).

HDAC3 es esencial para la transcripción constitutiva de PI3K e IRF3. La fosforilación de IRF3 es necesaria para la expresión de Gal-9; la posterior dimerización de IRF3 y la actividad transcripcional que exagera están reguladas por fosforilación, que ocurre en el residuo Ser-386. La fosforilación de la Ser-386 de IRF3 está mediada por PI3K en respuesta a la infección por virus. IFN- $\gamma$  induce la fosforilación de la Ser-386 de una manera dependiente de PI3K y HDAC3. Tanto el inhibidor de PI3K como el de HDAC3 suprimen la fosforilación de la Ser-386 de IRF3 inducida por IFN- $\gamma$ . La fosforilación de Ser-386 es imperativa para la expresión de Gal-9 mediada por IRF3, ya que se ha demostrado que IRF3 con una mutación en la Ser-386 pierde su función reguladora sobre la expresión de Gal-9 (Alam *et al.*, 2011).

De manera similar, la expresión de Gal-9 inducida por IFN- $\gamma$  en fibroblastos media la adhesión de eosinófilos a las células, lo que sugiere un papel crucial de Gal-9 en fibroblastos estimulados por IFN- $\gamma$  como modulador fisiológico en los sitios inflamatorios (Asakura *et al.*, 2002). Gal-9 exhibe una actividad quimioatrayente de eosinófilos potente y selectiva *in vitro* e *in vivo*, y está implicada en la patogénesis de la poliposis nasal, la cual es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias superiores caracterizada por la presencia marcada de células inflamatorias, en particular eosinófilos. En este contexto, Park *et al.* 2011, examinaron si el IFN- $\gamma$  podía inducir un aumento de la expresión de Gal-9 en pólipos nasales. En este trabajo, se llegó a la conclusión de la expresión de Gal-9 y la infiltración de eosinófilos en pólipos nasales está correlacionada, y que las vías de señalización implicadas en el aumento de Gal-9 en respuesta a IFN- $\gamma$ , además del posterior reclutamiento selectivo de eosinófilos en los tejidos del pólipo nasal son: MAPK, PI3K y la Janus-cinasas-transductores de la señal y activadores de la transcripción (JAK/STAT) (Park *et al.*, 2011).

La expresión de Gal-9 inducida por IFN- $\gamma$  en fibroblastos media también la adhesión de eosinófilos a estas células, lo que sugiere un papel crucial de Gal-9 en fibroblastos estimulados por IFN- $\gamma$  como modulador fisiológico en la inflamación (Asakura *et al.*, 2002).

En el carcinoma hepatocelular (HCC), el IFN- $\gamma$  derivado de células T infiltrantes de tumores estimula la expresión de Gal-9. Una vez más, la vía de señalización TIM-3/Gal-9 está implicada, ya que se ha reportado una colocalización de células T TIM-3<sup>+</sup> y Gal-9<sup>+</sup> en células de Kupffer en HCC (Li *et al.*, 2012).

En las células estromales mesenquimales multipotentes humanas (MSC), Gal-9 es fuertemente inducida por citocinas proinflamatorias como el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$ , y los ligandos de los receptores tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés de *Toll like receptors*) TLR2, TLR3 y TLR4. La expresión de Gal-9 no solo se ve incrementada de forma intracelular, sino que también es expresada por las células MSC en cantidades significativas después de la exposición a estímulos proinflamatorios. En los ensayos de proliferación, las células MSC *knockdown* para Gal-9 pierden significativamente sus efectos antiproliferativos sobre las células T (Gieseke *et al.*, 2013).

Las células mesenquimales derivadas de la médula ósea (BM-MSC, por sus siglas en inglés de *Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells*) presentan propiedades inmunomoduladoras y pueden suprimir la respuesta inmune proinflamatoria. Gal-9 es fuertemente inducida y secretada a partir de BM-MSC humanas tras la estimulación con IFN- $\gamma$ . Un ensayo de inmunosupresión *in vitro* reveló que las BM-MSC deficientes en Gal-9 no ejercen actividad inmunosupresora, incluso tras la estimulación con IFN- $\gamma$  (Kim *et al.*, 2015).

## *IL-1 $\beta$*

### *Definición*

La citocina interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), una potente citocina proinflamatoria, es una mediadora clave de la respuesta inflamatoria. Desempeña un papel esencial para la respuesta del hospedero a la infección y la resistencia a los patógenos, y también exacerba el daño durante la enfermedad crónica y la lesión tisular aguda. También es el miembro mejor

caracterizado y estudiado de los 11 miembros de la familia IL-1. La IL-1 $\beta$  es producida y secretada por una variedad de tipos de células, aunque la gran mayoría de los estudios se han centrado en su producción dentro de las células del sistema inmunológico innato, como los monocitos y los macrófagos (Lopez-Castejon y Brough, 2011). Esta IL se sintetiza como un precursor inactivo de 31 kDa, denominado pro-IL-1 $\beta$ , en respuesta a los denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés de *Pathogen Associated Molecular Patterns*). Los PAMP actúan a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en inglés de *Patron Recognition Receptors*), entre los cuales se encuentran los TLR y receptores de lectina de tipo C (Takeuchi y Akira, 2010), en los macrófagos para regular las vías que controlan la expresión del gen IL1B, que es el que codifica para IL-1 $\beta$  (Auron *et al.*, 1984). La inducción de la expresión de pro-IL-1 $\beta$  es un estímulo de secreción ineficaz, y la inducción del procesamiento y la secreción de una molécula de IL-1 $\beta$  activa comienza cuando la célula encuentra un PAMP adicional, o un patrón molecular asociado a peligro (DAMP, por sus siglas en inglés de *Danger Associated Molecular Pattern*) (Lopez-Castejon y Brough, 2011).

Aunque casi todos los productos microbianos inducen IL-1 $\beta$  a través de ligandos TLR, se ha reportado que IL-1 $\beta$  se induce a sí misma tanto *in vivo* como *in vitro* (Dinarello *et al.*, 1987).

#### *Evidencia experimental del efecto de IL-1 $\beta$ en la expresión de Gal-9*

Los astrocitos humanos normales expresan Gal-9 en respuesta a la estimulación con IL-1 $\beta$ , y el esteroide antiinflamatorio dexametasona suprime esta expresión. Los astrocitos pueden regular el tráfico de eosinófilos en el sistema nervioso central, al menos en parte a través de la producción de Gal-9, aunque debe considerarse que estas células no expresan Gal-9 en condiciones basales (Yoshida *et al.*, 2001; Steelman *et al.*, 2013).

## *TNF- $\alpha$*

### *Definición*

La superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés de *Tumoral Necrosis Factor*), compuesta por 19 ligandos y 29 receptores, desempeña funciones muy diversas en el organismo. Todos los miembros de la superfamilia TNF, sin excepción, exhiben actividad proinflamatoria, en parte a través de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Varios miembros de la superfamilia del TNF exhiben actividad proliferativa en las células hematopoyéticas, parcialmente a través de la activación de varias cinasas activadas por mitógenos, y algunos miembros de esta familia juegan un papel en la apoptosis (Bhardwaj y Aggarwal, 2003; Gaur y Aggarwal, 2003).

El TNF- $\alpha$  es un potente mediador paracrino y endocrino de las funciones inflamatorias e inmunes. También se sabe que regula el crecimiento y la diferenciación de una amplia variedad de tipos de células (Zhang y An, 2007). Aunque inicialmente se descubrió como un agente contra el cáncer, se ha relacionado con la proliferación fisiológica y la diferenciación de las células B en condiciones de estado estacionario. También se ha relacionado con una amplia variedad de enfermedades, que incluyen trastornos cardiovasculares, neurológicos, pulmonares, autoinmunes y metabólicos (Aggarwal, Gupta y Kim, 2012). Las actividades carcinogénicas del TNF- $\alpha$  están mediadas por su capacidad para activar el factor de transcripción proinflamatorio NF- $\kappa$ B, que regula positivamente la expresión de genes relacionados con la supervivencia, proliferación, invasión, angiogénesis y metástasis de las células tumorales (Balkwill, 2009). Varios tipos de células tumorales expresan constitutivamente TNF- $\alpha$  (Aggarwal *et al.*, 2006); la mayoría de las células tumorales que expresan TNF- $\alpha$  exhiben activación constitutiva de NF- $\kappa$ B, y su supervivencia depende en gran medida de este factor (Aggarwal, Gupta y Kim, 2012). La inducción de la vía NF- $\kappa$ B activada por TNF- $\alpha$  se revisará a detalle más adelante.

### *Evidencia experimental del efecto de TNF- $\alpha$ en la expresión de Gal-9*

La regulación positiva de Gal-9 inducida por TNF- $\alpha$  es mediada a través de la activación de la vía TNFR1/JNK/c-Jun. Gal-9 derivada de astrocitos puede funcionar como una proteína inmunorreguladora en respuesta a la neuroinflamación en curso. Al igual que en el caso de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  desencadena la transcripción del gen que codifica para la Gal-9 de una manera dependiente de la concentración (Steelman *et al.*, 2013).

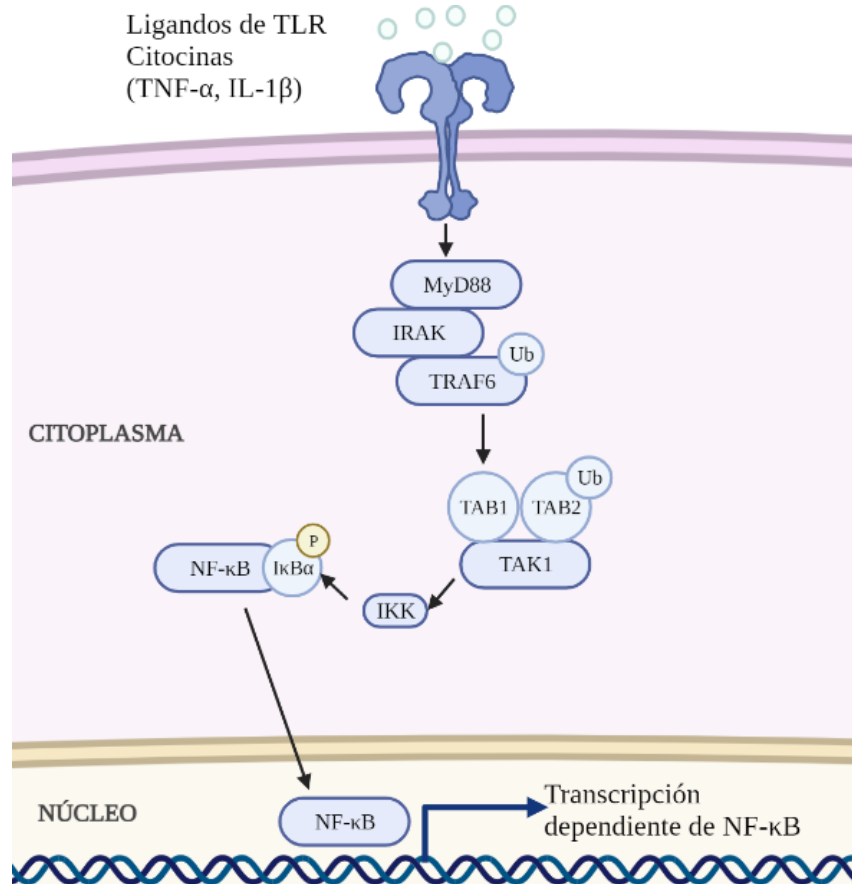
La expresión de Gal-9 no se observa en células BM-MSK en reposo, pero es fuertemente inducida por el tratamiento con TNF- $\alpha$ . Se especula que Gal-9 secretada por las células MSC puede representar un factor importante derivado de las células MSC que se une a TIM-3 y promueve la internalización de Gal-9/TIM-3, lo que lleva a la apoptosis de los linfocitos activados (Kim *et al.*, 2015).

### *Vía NF- $\kappa$ B*

Una de las vías que se ha propuesto para fundamentar el cambio de expresión de Gal-9 es la vía NF- $\kappa$ B.

La vía NF- $\kappa$ B inducida por citocinas (Figura 5) responde a diversos estímulos, incluidos ligandos de varios receptores de citocinas, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN (Liu *et al.*, 2017). El mecanismo principal para la activación de esta vía comienza con la unión de un ligando de TLR, que puede ser el de TNF- $\alpha$  o la IL-1 $\beta$ , lo cual activa a MyD88 (factor 88 de diferenciación mieloide, por sus siglas en inglés de *Myeloid differentiation factor 88*), que a su vez implica la activación de la familia de cinasas IRAK (cinasas asociada al receptor de la interleucina 1, por sus siglas en inglés de *Interleukin-1 Receptor Associated Kinase*), que estimulan la actividad de la ubiquitina ligasa E3 de TRAF6 (Factor 6 asociado al receptor de TNF, por sus siglas en inglés de *TNF Receptor Associated Factor 6*), lo que permite que TRAF6 se autoubicuitine y conjugue las cadenas de ubiquitina con otras moléculas de señalización que participan en la activación de TAK1 (cinasa 1 activada por el factor de crecimiento transformante  $\beta$ , por sus siglas en inglés de *Transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1*). TAK1 tiene dos subunidades reguladoras, TAB1 y TAB2 (Proteína de unión a TAK, por sus siglas en inglés de *TAK Binding protein 1 & 2*), la última de las cuales

es capaz de unirse a cadenas de poliubiquitina, que se requieren para la activación de TAK1. Tras la activación, TAK1 activa la cinasa IKK (quinasas de I $\kappa$ B, por sus siglas en inglés de *I $\kappa$ B kinases*). IKK se compone de dos subunidades catalíticas, IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ , y una subunidad reguladora denominada modulador esencial NF- $\kappa$ B (NEMO) o IKK $\gamma$ ; tras la activación, IKK fosforila I $\kappa$ B $\alpha$  en dos residuos de serina N-terminales desencadenando la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  (inhibidor del factor nuclear  $\kappa$ B, subunidad  $\alpha$ , por sus siglas en inglés, *Inhibitor of  $\kappa$ B, subunit  $\alpha$* ) dependiente de ubiquitina, lo que resulta en una translocación nuclear rápida y transitoria de los miembros canónicos de NF- $\kappa$ B, predominantemente los dímeros p50/RelA y p50/c-Rel, y su unión con las secuencias llamadas sitios  $\kappa$ B presentes en los genes estimulados por NF- $\kappa$ B (Liu *et al.*, 2017).



**Fig. 5.** Vía de señalización NF- $\kappa$ B inducida por TNF- $\alpha$ , e IL-1 $\beta$ . En la imagen, “Ub” se refiere a eventos de ubiquitinación y las letras “p” indican fosforilación. Modificado de Liu *et al.*, 2017.

## Herramientas computacionales

### *Modelado molecular*

El modelado molecular utiliza métodos computacionales basados en cálculos de mecánica molecular y/o mecánica cuántica, para identificar relaciones entre estructuras moleculares y su actividad biológica (De Vivo *et al.*, 2016).

Mediante la mecánica molecular (mecánica clásica), la molécula se representa como un grupo de átomos unidos por enlaces flexibles, que son representados como resortes que pueden ser estirados, comprimidos, y doblados en diferentes ángulos, cada posición proporciona una fuerza, y la suma de todas estas, más las fuerzas de interacción entre átomos no unidos se denomina campo de fuerza de la molécula. Por otro lado, la mecánica cuántica permite obtener un modelo de la estructura de una molécula mediante la resolución de la ecuación de Schrödinger. Estos cálculos proporcionan propiedades tales como la distribución de cargas en átomos particulares, información sobre sitios reactivos en una molécula o la interacción electrostática, y son la base de los principales métodos empleados para la construcción tridimensional de una proteína partiendo de su estructura primaria. Estos métodos son: métodos *ab initio*, *threading* (enhebrado) y modelado por homología (Haddad, Adam y Heger, 2020).

En la predicción de estructuras mediante métodos *ab initio*, se parte de la idea de que una secuencia de proteínas se pliega a una conformación nativa o conjunto de conformaciones que están cerca del mínimo global de energía libre. El problema de encontrar conformaciones nativas para una secuencia dada se divide en dos subproblemas:

- (a) desarrollar un potencial preciso, y
- (b) desarrollar un protocolo eficiente para buscar el total de la energía resultante.

El método *ab initio* es utilizado por ROSETTA (Rosetta Commons, 2016) ([www.rosettacommons.org](http://www.rosettacommons.org)). Básicamente, parte de una estructura conocida de la cual genera una librería de fragmentos, se divide la secuencia problema en fragmentos con una longitud de aminoácidos determinada y a cada uno de estos le asignan fragmentos de la librería creada que tengan una secuencia igual o lo más parecida posible. El modelo 3D se construye mediante la combinación de todas las estructuras posibles de los fragmentos seleccionando la conformación que tenga una menor energía libre (Bonneau y Baker, 2001).

El método conocido como *threading*, emplea técnicas de alineamiento de secuencias con estructuras tridimensionales. Dado que proteínas con secuencias muy parecidas pueden adoptar plegamientos parecidos, se espera que la estructura de una secuencia problema tenga una alta similitud a una secuencia ya caracterizada, de esta forma se puede realizar un “enhebrado” entre la secuencia problema con modelos estructurales como posibles moldes formados con plegamientos conocidos, y posteriormente se evalúa la energía del sistema donde se selecciona aquel modelo que presente el menor valor de energía libre (Bonneau y Baker, 2001).

El tercer método, conocido como modelado por homología, parte de la teoría de que las proteínas tienen una conformación similar cuando éstas se encuentran relacionadas evolutivamente, por lo que este método permite predecir la estructura tridimensional de una proteína de interés a través de la alineación de secuencias de una proteína previamente cristalizada que funge como un molde. El modelado por homología es el método computacional más preciso para crear modelos estructurales confiables con aplicaciones biológicas (Skariyachan y Garka, 2018) y es el empleado en la presente tesis.

El modelado por homología es útil cuando la proteína modelo (con una secuencia conocida y una estructura desconocida) está relacionada con al menos otra proteína con una secuencia y una estructura conocidas. La calidad de la estructura predicha por el modelado por homología depende del grado de similitud entre el modelo y las secuencias del molde: si la similitud es muy baja, el modelado por homología de la proteína de interés no producirá un resultado significativo (Robinson, Afzal y Leader, 2014).

Las propiedades fisicoquímicas, así como la visualización tridimensional de las propiedades moleculares electrónicas y estéricas, el esclarecimiento de la interacción entre fármacos y macromoléculas diana, pueden calcularse y/o sugerirse mediante programas de modelado molecular. En ausencia de estructuras tridimensionales de proteínas determinadas experimentalmente, el modelado por homología juega un papel rentable en aplicaciones basadas en estructuras y en la caracterización de las propiedades y funciones de las proteínas (Cavasotto y Phatak, 2009). El proceso de modelado por homología siempre comienza eligiendo la mejor estructura tridimensional, en la que la secuencia de destino se puede modelar con éxito (Robinson, Afzal y Leader, 2014; Haddad, Adam, y Heger, 2020). La secuencia con una estructura conocida se llama molde, mientras que la secuencia con una

estructura desconocida se llama modelo. Las herramientas de alineamiento de secuencias como BLAST (herramientas de búsqueda de alineamientos locales básicos, por sus siglas en inglés de *Basic Local Alignment Search Tools*) (Johnson *et al.*, 2008), FASTA (alineamiento rápido, por sus siglas en inglés de *Fast Alignment*) (Pearson, 2016) y Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011; Sievers y Higgins, 2018) pueden determinar la identidad entre el molde y el modelo obtenido por modelado. Cuando el porcentaje de identidad entre la región alineada de la secuencia del molde y la secuencia de interés es favorable, se puede construir un modelo.

Algunos de los servidores más utilizados para modelado por homología son: SWISS-MODEL ([swissmodel.expasy.org](http://swissmodel.expasy.org)) (Guex y Peitsch, 1997) (Waterhouse *et al.*, 2018), Robetta ([www.robetta.org](http://www.robetta.org)) (Kim, Chivian y Baker, 2004), Protein Homology/AnalogY Recognition Engine 2 (Phyre2) ([www.sbg.bio/psipred/](http://www.sbg.bio/psipred/)) (Kelley *et al.*, 2015). Por otro lado, existen programas públicos y comerciales que son ampliamente utilizados, en particular MODELLER (Webb y Sali, 2014), SCWRL y MolIDE (Wang, Canutescu y Dunbrack, 2008) y Prime, afiliado al programa Schrödinger (Nayeem, Sitkoff, y Krystek, 2006; Haddad, Adam y Heger, 2020).

### *Etapas generales del modelado por homología*

#### *Alineamiento inicial y selección de la estructura molde*

Para asegurar un correcto proceso de modelado, el porcentaje de identidad del modelo y la secuencia del molde debe ser lo suficientemente alto (alrededor del 10%) como para ser detectado por los programas computacionales de alineamiento de secuencias como BLAST o FASTA. Para identificar la secuencia del molde, cualquiera de los programas compara la secuencia de consulta con todas las secuencias de estructura conocida en el repositorio de *Protein Data Bank*. Usualmente se emplea la secuencia con el porcentaje de identidad más alto como secuencia molde, o pueden combinarse múltiples secuencias en una secuencia molde. Este último método es utilizado por los servidores SWISS-MODEL (Guex y Peitsch, 1997) (Waterhouse *et al.*, 2018).

## *Generación del esqueleto*

Una vez que se ha realizado el alineamiento, el proceso de construcción del modelo prosigue con la generación de un esqueleto. En el caso de un molde único, esto es trivial, y se puede simplemente transferir las coordenadas del esqueleto de los residuos alineados y las coordenadas de la cadena lateral de los residuos conservados. En el caso de múltiples moldes, se usa una estructura promedio donde las contribuciones de los moldes individuales se ponderan por el grado local de identidad de secuencia (Haddad, Adam, y Heger, 2020).

## *Modelado de bucle*

Las alineaciones de secuencia pueden contener espacios en blanco (lo mismo ocurre también con la alineación de modelos y moldes); estos espacios en blanco se pueden abordar fácilmente omitiendo los residuos de la secuencia molde. De manera similar, la inserción de residuos en la secuencia modelo aborda los espacios en blanco en la secuencia del molde. Sin embargo, en ambos casos conducen a cambios conformacionales en el esqueleto. Por otro lado, estos cambios rara vez ocurren en estructuras secundarias regulares como hélices- $\alpha$  y hojas- $\beta$ . Por lo tanto, es más apropiado “cambiar” todas las inserciones y eliminaciones a estructuras de giro y bucle, lo que puede resolver el problema de las inserciones y eliminaciones; sin embargo, los cambios en la conformación del bucle son difíciles de predecir (Haddad, Adam, y Heger, 2020).

Hay tres estrategias principales para el modelado de bucles:

1. *Ab initio*: este método utiliza una búsqueda exhaustiva para identificar la conformación de la energía mínima a través de algoritmos de optimización utilizando una función de puntuación basada en el conocimiento. La precisión de un algoritmo se prueba con diferentes señuelos o blancos (Totrov, 2011). El programa ModLoop proporcionado en MODELLER es uno de los métodos *ab initio* más utilizados (Fiser y Sali, 2003).

2. Basado en el conocimiento (*Knowledge Based*): este tipo de método analiza las bases de datos de cristalografía de rayos X para encontrar conformaciones homólogas para una secuencia de bucle determinada. Herramientas como ProMod3 (Studer *et al.*, 2019), en el servidor SWISS-MODEL (Biasini, *et al.*, 2014), FREAD (Choi y Deane, 2010), y la

aproximación basada en datos utilizando estructuras remotas o no relacionadas para modelado de bucles (DaReUS-Loop) (Karami *et al.*, 2018), son buenos ejemplos de algoritmos de uso común basados en el conocimiento.

3. Estrategias combinadas: un ejemplo es la estrategia propuesta por Liang y colaboradores (Liang *et al.*, 2012), la cual combina un método *ab initio* con un potencial basado en el conocimiento para lograr una mayor precisión en el proceso de modelado.

### Modelado de cadenas laterales

Cuando el porcentaje de identidad de secuencia es superior al 40%, las conformaciones de las cadenas laterales de los residuos conservados exhiben la misma orientación (Roitberg y Elber, 1991), por lo tanto, es posible transferir directamente los residuos conservados de la secuencia molde a la secuencia modelo. Sin embargo, esto solo es aplicable cuando se obtienen niveles de identidad de secuencia superiores al 40%. Para superar este problema, el modelado de cadenas laterales utiliza un enfoque basado en el conocimiento, donde se emplean bibliotecas de conformaciones de cadenas laterales comunes para colocar las cadenas laterales. Cada conformación de la biblioteca se puntúa con una variedad de funciones de energía y se utiliza la mejor. Por esta razón, en casos de niveles bajos de similitud, la predicción de las cadenas laterales puede ser computacionalmente costosa (Robinson, Afzal y Leader, 2014).

### *Optimización y validación de modelos*

#### *Optimización del modelo*

Para predecir la conformación de la cadena lateral con alta precisión, se necesitan las conformaciones correctas de la cadena principal, que a su vez dependen de la conformación de la cadena lateral. Por lo tanto, existe un círculo vicioso en el modelado de las conformaciones de la cadena principal y la cadena lateral, el cual se resuelve modelando iterativamente la estructura de la cadena principal y la cadena lateral hasta que la solución converge. Primero, se predice la estructura de los rotámeros, después, la estructura de la

cadena principal se remodela para acomodar rotámeros y finalmente, los rotámeros se reajustan a una nueva estructura de cadena principal en un proceso que consta de una serie de predicciones de rotámeros y pasos de minimización de energía. Otro enfoque para optimizar el modelo es simplemente ejecutar una simulación de dinámica molecular del mismo. Esta simulación sigue los movimientos de la proteína e imita el proceso de plegado en sí (Haddad, Adam y Heger, 2020).

### *Validación del modelo*

Los errores en el modelado por homología dependen de dos factores: el porcentaje de identidad de secuencia entre el molde y las secuencias del modelo y el número de errores en la secuencia del molde. Si la identidad entre el molde y las secuencias del modelo es superior al 90%, la precisión del modelo predicho es comparable a las estructuras determinadas experimentalmente (Burley *et al.*, 2019). Un porcentaje de identidad del 50-90% conduce a un modelo con un error local moderado pero considerable, mientras que un porcentaje de identidad del 25-50% a menudo conduce a grandes regiones de error, en cuyo caso el modelado por homología no es aplicable. Los errores en la estructura de la proteína se pueden estimar calculando la energía del modelo o determinando los índices de normalidad. El primero verifica la longitud de enlace y los ángulos de enlace y determina si están dentro del rango normal, mientras que el segundo compara las características de la estructura predicha con las de la estructura real (Burley *et al.*, 2019).

La mayoría de los programas de modelado por homología generan una gran cantidad de modelos de proteínas en 3D y los evalúa y clasifica de acuerdo con varios métodos de puntuación. Dado que cada método de evaluación estudia la estructura 3D desde una perspectiva diferente, la combinación de varios métodos podría permitir una evaluación más confiable. La evaluación no es necesariamente el paso final en el modelado por homología, ya que algunos errores identificados pueden requerir la repetición de pasos anteriores del proceso. Los métodos de evaluación se pueden dividir en cuatro grupos:

1. Métodos basados en la física: la mayoría de estos métodos se basan en cálculos de los parámetros fisicoquímicos y la estereoquímica óptima. Se puede realizar una evaluación de la estructura cristalina de rayos X o de un modelo obtenido por modelado, de una proteína

utilizando MolProbity (Chen *et al.*, 2010), que valida la calidad desde las perspectivas global (proteína completa) y local (regiones pequeñas). El método identifica valores atípicos del esqueleto, valores atípicos de la cadena lateral y contactos inapropiados entre los átomos (choques atómicos). Los valores atípicos del molde (valores atípicos del gráfico de Ramachandran y desviaciones de C $\beta$ ) son los más importantes, ya que pueden amplificarse en errores más grandes. De manera breve, el gráfico de Ramachandran evalúa la calidad estereoquímica de la nueva estructura modelada. Para considerar que un modelo cumple con una calidad apropiada, el 90% o más de los residuos que lo componen deben encontrarse en regiones favorables del gráfico (Elslinger y Wilson, 2012). Los valores atípicos en el gráfico de Ramachandran describen las desviaciones en los ángulos diedros que corresponden a la estructura secundaria de la proteína. Los valores atípicos de C $\beta$  describen las desviaciones en la posición del átomo de C $\beta$  (conectado al C $\alpha$  en el esqueleto).

Otros programas de uso común incluyen WHAT IF (Vriend, 1990) y PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993).

2. Métodos basados en el conocimiento (*Knowledge Based*): un enfoque de validación dependiente de la base de datos utiliza puntuaciones que representan energías obtenidas estadísticamente dentro del contexto de todas las estructuras tridimensionales experimentales conocidas en una base de datos. SWISS-MODEL utiliza el Análisis Cualitativo de Energía del Modelo (QMEAN, actualmente QMEANDisCo) (Benkert, Tosatto y Schomburg, 2008; Studer *et al.*, 2020) para puntuar la energía de interacción C $\beta$ , la energía por pares de todos los átomos, la energía del ángulo de torsión y la energía de solvatación (Benkert, Tosatto y Schomburg, 2008). El programa MODELLER utiliza dos métodos basados en el conocimiento: DOPE (Shen y Sali, 2006) y PROSAII (Wiederstein y Sippl, 2007) y un método basado en la física, PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993), para la evaluación. Un enfoque alternativo es el servidor de evaluación de calidad QA-RecombineIt, que permite a los usuarios modelar estructuras de proteínas en 3D basándose en el consenso que identifica regiones altamente conservadas en una amplia gama de modelos de proteínas de entrada en 3D (Pawlowski, Bogdanowicz y Bujnicki, 2013). Aquí, la calidad se verifica mediante varios métodos, ya sea para un solo modelo o mediante la agrupación de varios modelos.

3. Métodos basados en el aprendizaje automático: pueden predecir errores en modelos homólogos utilizando el método de regresión de la máquina de vectores de apoyo (*Support*

*Vector Machine*, SVM) (Eramian *et al.*, 2006), el cual es un algoritmo de aprendizaje supervisado que deriva características de un conjunto de datos de entrenamiento y las prueba en un conjunto de datos separado, lo que puede ser útil para regresión, clasificación o agrupamiento.

4. Métodos basados en experimentos: una validación experimental es la prueba definitiva para un modelo teórico. Todos los datos experimentales que van desde la unión del ligando hasta la espectroscopia o la cristalografía de rayos X pueden usarse para la evaluación. El método más simple para la evaluación de la estructura dentro de su contraparte experimental es la desviación cuadrática media (*Root-mean-square deviation*, RMSD), que da un promedio de las distancias entre todos los átomos en dos estructuras 3D. Dado que las perturbaciones mínimas en un bucle entre dominios pueden dar lugar a un valor de RMSD alto engañoso, el método se aplica mejor dividiendo primero la proteína en fragmentos (Haddad, Heger y Adam, 2016). Se puede realizar también una evaluación detallada de la concordancia entre el modelo 3D y una referencia (por ejemplo, la estructura tridimensional del molde) utilizando SphereGrinder (<http://spheregrinder.cs.put.poznan.pl/>) (Lukasiak *et al.*, 2015). SphereGrinder realiza pruebas basadas en RMSD en motivos localizados basados en átomos seleccionados en el modelo 3D. Los motivos localizados están representados por esferas de radios definidos por los usuarios y según diferentes niveles de calidad. Es posible utilizar los métodos anteriores para identificar y corregir errores manualmente a través de un programa de visualización gráfica (haciendo una lista de verificación y utilizando herramientas para modificar ángulos diedros y cambiar rotámeros), sin embargo, algunos programas de modelado por homología tienen sus propios subprogramas de refinamiento, como RosettaCM (Song *et al.*, 2013) en Rosetta, y el subprograma de refinamiento en I-TASSER (Xu *et al.*, 2011).

El paso de refinamiento a menudo se superpone con el procedimiento de muestreo que es el objetivo final del modelado por homología, es decir, identificar la conformación nativa con energía potencial mínima (Haddad, Adam, y Heger, 2020).

## *Acoplamiento (docking) molecular*

El acoplamiento molecular consiste en explorar computacionalmente distintas formas de unión entre dos macromoléculas cuyas estructuras tridimensionales son conocidas, e intentar así predecir el o los modos de unión y su afinidad. El acoplamiento molecular se puede realizar entre una macromolécula y una molécula pequeña (acoplamiento proteína–ligando) o entre dos macromoléculas (por ejemplo, acoplamiento proteína–proteína o proteína–ADN). Esta técnica se destaca de los métodos experimentales tradicionales, tales como cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear (NMR) y mutagénesis dirigida, por ser más rápida y menos costosa. Actualmente es una técnica simplemente predictiva, sin embargo, es una herramienta clave para la biología molecular y la química computacional, pues permite la caracterización de sitios de unión en una macromolécula problema y la predicción los modos de unión entre macromoléculas cuando los datos experimentales no están disponibles. El acoplamiento consta básicamente de dos partes: un método de búsqueda y una función de puntaje que permite ordenar y clasificar las estructuras encontradas al explorar el espacio de configuraciones. Los modos de unión o de enlace resultantes quedan completamente definidos por la posición de la molécula móvil, su orientación y su conformación. Existen diversos tipos de programas y algoritmos para realizar el acoplamiento molecular. La elección de uno u otro método está sujeta a la información disponible respecto de la interacción y sobre el tipo de moléculas interactuantes (Prieto-Martínez, Arciniega y Medina-Franco, 2018). En este trabajo se empleó HADDOCK 2.4 debido a que es capaz de soportar los acoplamientos proteína–ADN.

### *HADDOCK*

HADDOCK (*High Ambiguity Driven DOCKing*) (Dominguez, Boelens y Bonvin, 2003), es un programa de acoplamiento molecular que utiliza datos de interacción bioquímica y/o biofísica (normalmente traducidos en restricciones ambiguas de distancia (o interacción – AIR)) para conducir el acoplamiento molecular.

El protocolo de acoplamiento en HADDOCK consta de tres pasos:

- I. Aleatorización de la orientación y acoplamiento del cuerpo rígido mediante minimización de energía guiada por restricción (it0),
- II. Refinamiento semiflexible en el espacio del ángulo de torsión en el que las cadenas laterales y los átomos del esqueleto se mantienen flexibles (it1), y
- III. Refinamiento en solvente explícito.

Al final de cada paso, los resultados se puntúan de acuerdo con una combinación lineal (suma) de términos energéticos, que juntos forman el HADDOCK *score*, el cual es la puntuación por defecto de HADDOCK y se obtiene con base en la siguiente ecuación:

$$HADDOCK \text{ score} = 0.1 E_{vdw} + 0.2 E_{elec} + 1.0 E_{desolv} + 0.1 E_{AIR}$$

donde  $E_{vdw}$  y  $E_{elec}$  representan energías intermoleculares de van der Waals y energía potencial electrostática (Coulomb), respectivamente,  $E_{desolv}$  es un término empírico de desolvatación y  $E_{AIR}$  son las restricciones de energía que expresa la concordancia entre datos experimentales y retrocalculados. Las energías intermoleculares se calculan usando los parámetros del campo de fuerza OPLS (potenciales optimizados para simulaciones líquidas por sus siglas en inglés de *optimized potentials for liquid simulations* (Jorgensen, Maxwell y Tirado-Rives, 1996) para átomos no enlazados, usando un corte de 8.5 Å con una función de desplazamiento para la energía electrostática y la función de conmutación entre 6.5 y 8.5 Å para la energía de van der Waals. Las estructuras finales refinadas se agrupan de acuerdo con la fracción de contactos comunes (FCC, por defecto en HADDOCK 2.4), agrupando los resultados de acuerdo con la similitud de sus redes de contacto en la interfaz o la similitud del valor de RMSD del esqueleto interfaz-ligando. De forma predeterminada, un clúster se refiere a las conformaciones obtenidas por el programa, y se define si un mínimo de 4 modelos cae en el mismo grupo, aplicando como límites 0.75 para el valor de FCC o 7.5 Å para el valor de RMSD de la interfaz principal-ligando. Por último, los complejos resultantes se analizan y clasifican de acuerdo con el HADDOCK *score* promedio de sus cuatro miembros principales para garantizar que la puntuación se base en un número similar de modelos por grupo. (Vangone *et al.*, 2017).

Por último, el programa HADDOCK proporciona un valor llamado Z-score, el cual representa cuántas desviaciones estándar está separado el HADDOCK *score* de un clúster

determinado, de la media de todos los complejos obtenidos. Cuanto menor sea el puntaje  $z$ , mejor (van Zundert *et al.*, 2016).

## JUSTIFICACIÓN

Debido a que Gal-9 ejerce un importante papel en procesos inflamatorios, y su expresión es aumentada por citocinas proinflamatorias, resulta de suma importancia identificar los factores de transcripción que podrían estar involucrados en estos procesos. La identificación de sitios de unión a factores de transcripción es un paso importante hacia la comprensión de muchos procesos biológicos. Existen métodos experimentales con el objetivo de caracterizar los sitios de unión a factores de transcripción con sus elementos de respuesta localizados en las regiones promotoras de los genes, sin embargo, su aplicación es laboriosa, costosa, y limitada. El empleo de herramientas computacionales representa una alternativa viable para predecir los sitios de unión de FT, y una de estas herramientas computacionales es el acoplamiento molecular.

En esta tesis se realizó un estudio en el que, a través de herramientas computacionales, se identificaron elementos de respuesta a IRF y NF- $\kappa$ B en la región promotora del gen *LGALS9* (que codifica para Gal-9) y, por medio de acoplamientos moleculares, se analizó la interacción de dichos factores de transcripción con estos elementos de respuesta para, posteriormente, analizar las interacciones específicas presentes en los complejos ADN-factores de transcripción obtenidos.

Consecuentemente, las preguntas que delimitan esta investigación son:

1. ¿De qué manera se acoplarán los factores de transcripción IRF y NF- $\kappa$ B con sus elementos de respuesta localizados en la región promotora del gen *LGALS9*?
2. De los complejos obtenidos por acoplamiento ¿cuáles serán los residuos que estarán interaccionando por medio de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas?

## **HIPÓTESIS**

- Los factores de transcripción IRF y NF- $\kappa$ B, interaccionan de manera estable con sus elementos de respuesta localizados en la región promotora del gen *LGALS9*, en acoplamientos obtenidos *in silico*.

## **OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS**

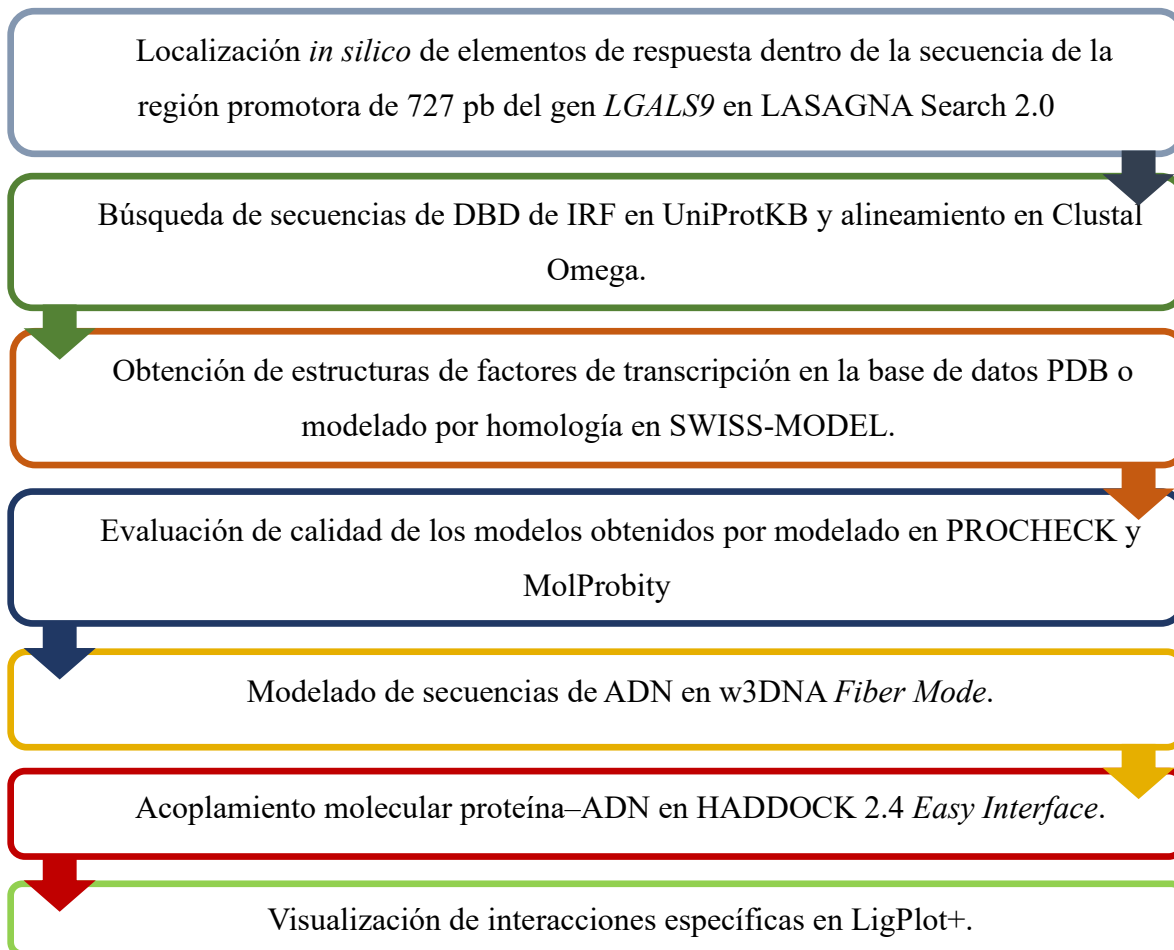
### **Objetivo general**

- Modelar *in silico* la interacción entre los factores de transcripción IRF y NF- $\kappa$ B con sus elementos de respuesta localizados en la región promotora del gen *LGALS9*.

### **Objetivos específicos**

1. Identificar los elementos de respuesta a los factores de transcripción IRF y NF- $\kappa$ B en la región promotora del gen *LGALS9* por medio de programas computacionales.
2. Obtener modelos de los DBD de factores de transcripción IRF por medio de modelado por homología.
3. Obtener complejos que reflejen la interacción y afinidad entre los factores de transcripción IRF y sus elementos de respuesta localizados en la región promotora del gen *LGALS9* por medio de acoplamientos moleculares.
4. Identificar los residuos importantes que interaccionan (por medio de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas) en los complejos factores de transcripción–ADN obtenidos por medio del acoplamiento molecular.
5. Con base en la revisión bibliográfica, proponer vías de señalización que podrían estar relacionadas con la expresión de Gal-9 regulada por citocinas proinflamatorias.

## MATERIALES Y MÉTODOS



### *Localización in silico de elementos de respuesta dentro de la secuencia de la región promotora de 727 pb del gen LGALS9*

Se realizó una búsqueda preliminar de la secuencia de la región promotora de 727 pb (de -565 a +162 pb) en la base de datos EPD (<https://epd.epfl.ch//index.php>). Se seleccionó la secuencia con ID *LGALS9\_1*. Posteriormente, se realizó una búsqueda de los factores de transcripción y sus correspondientes elementos de respuesta presentes en la secuencia delimitada empleando el servidor LASAGNA-Search 2.0 (*Length-Aware Site Alignment Guided by Nucleotide Association*) (Lee y Huang, 2014). LASAGNA-Search 2.0 permite elegir entre matrices de diferentes bases de datos: JASPAR CORE Vertebrates 2018 (Khan

*et al.*, 2018), TRANSFAC (Matys *et al.*, 2006) y UniPROBE (Hume *et al.*, 2015), sin embargo, debido a que las matrices de *Homo sapiens* provenientes de UniPROBE están limitadas en la herramienta LASAGNA-Search 2.0, se seleccionaron las matrices de JASPAR CORE Vertebrates 2018 y de TRANSFAC para la búsqueda de sitios ISRE y sitios kB presentes en la secuencia de la región promotora del gen *LGALS9*.

### *Búsqueda de secuencias de DBD de IRF y alineamiento*

Se empleó la base de datos UniProtKB (The UniProt Consortium, 2017), la cual especifica las secuencias de los sitios de interés del FT. Los números de acceso UniProt se especifican en la Tabla 3:

**Tabla 3.** Números de acceso UniProt para las secuencias de DBD de IRF empleadas para alineamiento.

IRF	Número de acceso UniProt
IRF1	P10914
IRF2	P14316
IRF3	Q14653
IRF4	Q15306
IRF5	Q13568
IRF6	O14896
IRF7	Q92985
IRF8	Q02556
IRF9	Q00978

Se seleccionaron las secuencias de los DBD de IRF de *Homo sapiens* especificadas en la base de datos previamente mencionada, para emplearlas en el modelado por homología. Además, se realizó un alineamiento de secuencias empleando Clustal Omega, que es una

herramienta de alineamiento específica para secuencias de proteínas (Sievers y Higgins, 2018).

#### *Elección de los miembros de la familia IRF para modelado y acoplamiento*

Los miembros de la familia IRF que se analizaron en el presente trabajo se eligieron siguiendo los siguientes criterios: ser capaz de activar la transcripción de los genes estimulados por IFN, ser un factor de transcripción regulado por IFN, y participar en procesos como inmunidad innata o inflamatorios. Debido a lo anterior, se excluyeron los siguientes miembros de la familia IRF:

- × IRF2: se une al ADN, pero no activa la transcripción. Inhibe de manera competitiva la actividad transcripcional de IRF1 (Choo *et al.*, 2006.).
- × IRF4: es el único IRF que no es un regulado por IFN (Sundararaj *et al.*, 2021.) y posee baja afinidad por el ADN (Antonczyk *et al.*, 2019.).
- × IRF6: no participa en procesos relacionados con la inmunidad innata, pero es necesario para el desarrollo normal y la diferenciación de la epidermis (Yanai *et al.*, 2012).

#### *Obtención de estructuras de factores de transcripción en bases de datos o por modelado por homología*

Se obtuvieron de la base de datos PDB (por sus siglas en inglés de *Protein Data Bank*) las estructuras del DBD de IRF3 (código de identificación PDB: 3QU6), y de NF- $\kappa$ B (heterodímero p50/p65) (código de identificación PDB: 2O61) en formato .pdb. El resto de las estructuras de DBD de los factores de transcripción empleados en esta tesis se modelaron por homología. Los modelos obtenidos por modelado por homología son sólo aproximaciones basadas en la secuencia y en otros modelos preexistentes, y no resulta recomendable emplearlos si se puede disponer de estructuras dilucidadas por medio de métodos experimentales. Al no encontrarse estructuras idóneas o con una resolución deseable de IRF1, 5, 7, 8 y 9 en las bases de datos, se obtuvieron modelos a partir de la secuencia de

sus DBD reportada en UniProtKB. La metodología básica para el modelado por homología es la siguiente:

1. Búsqueda de secuencias y alineamiento.
2. Construcción de un esqueleto.
3. Modelado de asas (*loops*) y refinamiento de cadenas laterales.

Se emplearon las herramientas SWISS-MODEL (Waterhouse *et al.*, 2018) e I-TASSER (Yang *et al.*, 2015) para contar con un valor comparativo de RMSD.

Para el modelado de dímeros se empleó la herramienta de acoplamiento simétrico de ROSIE (*Rosetta Online Server that Includes Everyone*) (<https://rosie.graylab.jhu.edu/>) (André *et al.*, 2007; Lyskov *et al.*, 2013). Se especificó una simetría cíclica y dos subunidades. Se mantuvieron los parámetros por defecto del programa.

#### *Evaluación de la calidad de los modelos obtenidos*

Se comprobó la calidad del modelo obtenido mediante un gráfico de Ramachandran y un análisis de compatibilidad de la estructura 3D con su secuencia de aminoácidos. Para obtener el gráfico de Ramachandran se emplearon los programas PROCHECK (alojado en: <https://saves.mbi.ucla.edu/>) (Laskowski *et al.*, 1993) y MolProbity (alojado en <http://molprobity.biochem.duke.edu/index.php>) (Chen *et al.*, 2010), cuyo análisis se incluye en el servidor SWISS-MODEL. Un parámetro más, empleado para la comprobación de calidad del modelo, es el RMSD o raíz de la desviación cuadrática media. Para obtener este valor, se superpusieron las estructuras obtenidas en SWISS-MODEL e I-TASSER empleando la herramienta MatchMaker del programa UCSF Chimera 1.15 (Pettersen *et al.*, 2004). El valor de RMSD entre los átomos correspondientes de dos cadenas de proteínas es una medida de similitud de uso común entre dos estructuras de proteínas. Cuanto menor es el valor de RMSD entre dos estructuras, más similares son éstas. El valor de este parámetro no debe superar los 2 Å (Kufareva y Abagyan, 2012). La visualización de las estructuras obtenidas se realizó por medio de UCSF Chimera 1.15.

### *Modelado de la secuencia de ADN*

Para este procedimiento fue necesario modelar una secuencia específica de ADN en una estructura tridimensional con un formato específico (.pdb), que pudiera ser interpretado por las herramientas computacionales empleadas en la metodología. Para este fin se empleó el servidor w3DNA 2.0 (web 3DNA 2.0) (Zheng, Lu y Olson, 2009; Li, Olson y Lu, 2019).

Partiendo de que los miembros de la familia IRF se unen específicamente al elemento ISRE o IRE (o sitios IRE alternativos), y que el factor de transcripción NF- $\kappa$ B se une al sitio  $\kappa$ B, se eligieron las secuencias de ADN mencionadas, localizadas previamente en la región promotora de 727 pb del gen *LGALS9*, para el modelado tridimensional de ADN-B. Por motivos de estabilidad estructural, se optó modelar y emplear las secuencias 3' GGTTCCTATTTCTT 5', (ISRE), 5' GGGAAAGG 3' (IRE canónico), 5' AAGAGAGG 3' y 5' AGGACACA 3' (IRE alternativos), y 3' TGGGGCATGCCCCT 5' (sitio  $\kappa$ B) (Kunsch, Ruben y Rosen, 1992; Wong *et al.*, 2011).

El tipo de ácido nucleico y la conformación que se seleccionaron fueron ADN dúplex y hélice de forma B canónica, la cual presenta una rotación de una base respecto a la siguiente (valor de *twist*) de 35.9° (Berman, 1997), y una separación entre las bases (valor de elevación o *rise*) de 3.32 Å (Beveridge, Cheatham y Mezei, 2012). A partir de estos datos se eligió el modo más cercano posible a estos valores, en este caso, el modo FIBER, el cual está basado en modelos indexados en PDB. De estos modelos se eligió el que ofrecía los parámetros B-DNA (*generic sequence*: A, C, G, T) con valores de *Twist* de 36.0° y *Rise* de 3.375 Å.

### *Prueba de parámetros y controles*

Con el objetivo de obtener parámetros que indicaran la viabilidad del resultado del acoplamiento de las moléculas problema, se realizaron acoplamientos con complejos cristalizados obtenidos de la base de datos PDB (Tabla 4). A continuación, se describe de manera general el procedimiento:

1. Se eligen y descargan de la base de datos PDB los complejos con los cuales se realizarán las pruebas;
2. cada molécula del complejo es separada (proteínas de ADN);

3. se ingresan las moléculas al servidor;
4. se establecen los residuos activos y pasivos, con una distancia efectiva de 2Å como máximo;
5. se realiza un acoplamiento con los parámetros establecidos por defecto;

**Tabla 4.** Complejos proteína–ADN seleccionados para las pruebas de parámetros en HADDOCK.

Código PDB	Nombre	IRF seleccionado	Secuencia de ADN del complejo	Referencia
1IF1	Interferon regulatory factor 1 (IRF-1) complex with DNA	IRF1	5´ GAGAAGTGAAAG 3´ 3´ CTTTCACTTCTC 5´	Escalante <i>et al.</i> , 1998.
2IRF	Crystal structure of an IRF-2/DNA complex	IRF2	5´ AAGTGAAAGGA 3´ 3´ TCCTTTCACCTT 5´	Fujii <i>et al.</i> , 1999.
2O6G	Crystal structure of IRF-3 bound to the interferon-B enhancer	IRF3	5´ GGGAAACTGAAAGG 3´ 3´ CCTTTCAGTTTCCC 5´	Panne, Maniatis y Harrison, 2007
2PI0	Crystal structure of IRF-3 bound to the PRDIII-I regulatory element of the human	IRF3	5´ CTGAAAGGGAGAAG 3´ 3´ CTTCTCCCTTTCAG 5´	Escalante <i>et al.</i> , 2007.

	interferon-B enhancer			
7JM4	IRF transcription factor	IRF4	5' CTGAAACCGAGAAA 3' 3' TTTCTCGGTTTCAG 5'	Sundararaj <i>et al.</i> , 2021.
2O61	Crystal structure of NF-κB, IRF7, IRF3 bound to the interferon-B enhancer	IRF7	5' TTGAAAGGGAGAAG 3' 3' CTTCTCCCTTTCAA 5'	Panne, Maniatis y Harrison, 2007

De la misma manera, para obtener valores que sirvan como control, se acoplaron diferentes factores de transcripción cuyos modelos están disponibles en PDB cuyos elementos de respuesta no son ISRE, con la secuencia ISRE empleada en el presente trabajo. Los modelos seleccionados para obtener los valores control se enlistan en la Tabla 5:

**Tabla 5.** Modelos seleccionados para obtención de valores de control.

Código PDB	Nombre	Factor de transcripción elegido	Referencia
1FOS	Two human C-Fos:C-Jun:DNA complexes.	C-Fos/C-Jun	Glover y Harrison, 1995.
3CO7	Crystal Structure of FoxO1 DBD Bound to DBE2 DNA	FoxO1	Brent, Anand y Marmorstein, 2008.
1A02	Structure of the DNA binding domains of NFAT, Fos and Jun bound to DNA.	NFAT	Chen <i>et al.</i> , 1998.

1H88	Crystal structure of ternary protein-DNA complex1 (C-Myb-C/Ebpbeta).	C-Myb	Tahirov <i>et al.</i> , 2002.
------	----------------------------------------------------------------------	-------	-------------------------------

### *Acoplamiento molecular Proteína-ADN*

Este paso es esencial para predecir las conformaciones que tomará el complejo proteína-ADN. Se utilizó el programa HADDOCK 2.4, que incorpora información experimental con respecto a la interacción para predecir las conformaciones y los modos de unión. La información experimental se incorporó a la simulación determinando una serie de residuos activos y pasivos en el receptor. En todos los casos se definieron como activos aquellos residuos sugeridos por el programa. El acoplamiento se realizó empleando la interfaz *Easy* del servidor HADDOCK 2.4 y manteniendo los parámetros por defecto. Se realizaron acoplamientos de monómeros de los DBD de IRF elegidos con la secuencia ISRE y con sitios IRE (canónico y alternativos), DBD de IRF en forma dimerica con la secuencia ISRE, y de las subunidades 1 y 2 de NF-kB con el sitio kB. De entre las conformaciones obtenidas en cada acoplamiento se eligió para cada caso el primer resultado del primer clúster indicado por el programa. Los resultados se visualizaron en el programa Discovery Studio 2020 (BIOVIA, Dassault Systèmes, 2020).

### *Visualización de interacciones específicas*

Se empleó el programa LigPlot+ (Laskowski y Swindells, 2011) para obtener un diagrama 2D a partir de los complejos obtenidos mediante acoplamiento molecular. Este diagrama representa los puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas presentes en los complejos resultantes del acoplamiento molecular.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*Elementos de respuesta reportados por LASAGNA-Search 2.0 (matrices de TRANSFAC y JASPAR CORE Vertebrates)*

*Sitios ISRE e IRE (canónico y alternativos) y sitio  $\kappa$ B*

La búsqueda de sitios ISRE e IRE en la secuencia de la región promotora de 727 pb (de -565 a +162 pb) a través de LASAGNA-Search 2.0 dio como resultado la identificación de las secuencias resaltadas en la Figura 6, correspondientes a sitios IRE canónico y alternativos, y un sitio ISRE en la posición de -42 a -33 pb.

De la misma manera, la búsqueda de sitios  $\kappa$ B señaló una secuencia en la posición de -452 a -438 pb, resaltada en verde en la Figura 6. Esta secuencia es identificada en la literatura como un sitio  $\kappa$ B alternativo (Kunsch, Ruben y Rosen, 1992; Wong *et al.*, 2011).

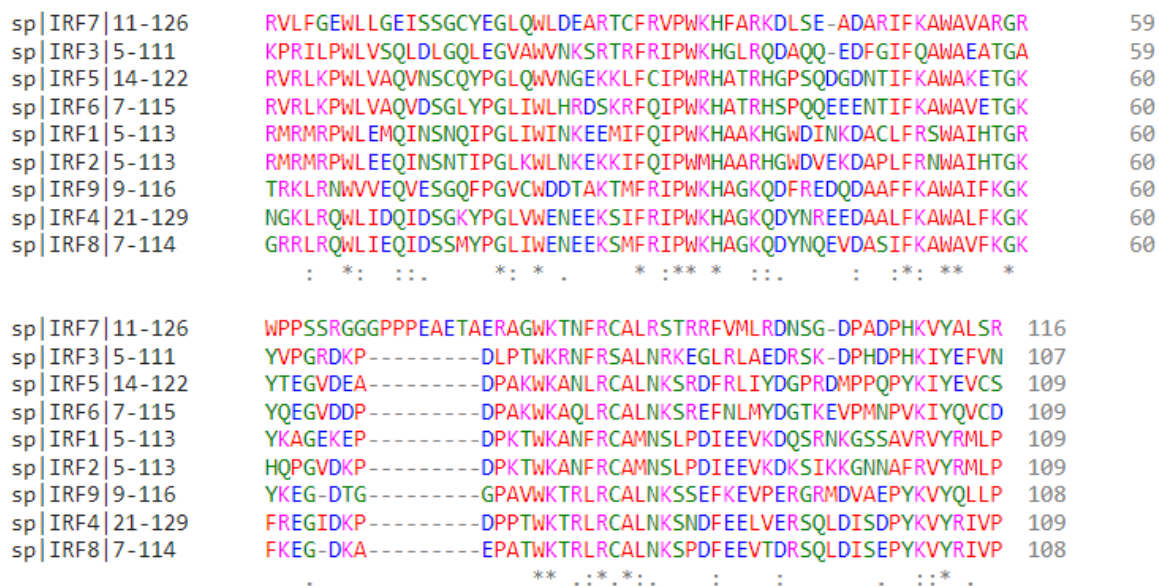
```
>FP022909 LGALS9_1 :+U EU:NC; range -565 to 162.
```

```
TCTACATAATTATGTTTTTACATGAATAATATAAAATTTAAACAGGAGAAATACTTTTTTGA  
AGAGTCTGAGAAATCTTCATAAAGTTCAGGCGGCCACGAATTAGCTGTGTGACCTGGGCGA  
GGGCGGCTTAGACTCTGAGCCTCAGCTTCTCTGTATGTAAAATGGGTGAAGCCGCCCTTC  
CCCACAAGCACCCCTGTGCACAGGCAATGCCAGCCCCATTATTTTCTGGACTCCGTGGCC  
AAGCATGCTTAGGACACACAGCCACATACTTCTGGGCAGTGTTCATCTGGCAACTTGCTGT  
CATGTCAGTGTGGTCAAGCATTGTAGACCTCTATGAACCAAATATGCTTCAGGCTTGGGT  
TGAGCACAGGAGAGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG  
TGAGTGTACCCCCAGTCCACCCAGTACCATAACCTTTCTCTCTCTGACCCACTTCCTTTT  
GCTGCCGGCTCCTCCCCATTGAATAACAGCCAAGTTGCTTTGGTTTCTATTTCTTTGTTA  
AGTCGTTCCCTCTACAAAGGACTTCCTAGTGGGTGTGAAAGGCAGCGGTGGCCACAGAGG  
CGGCGGAGAGGATGGCCTTCAGCGGTTCAGGCTCCCTACCTGAGTCCAGTGAGTTCCAG  
GGCTATGGGCACAGGGCTGCCTCAGCCAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG  
ACTCCTGG
```

**Fig. 6.** Localización del sitio ISRE (resaltado en azul), sitios IRE (resaltados en amarillo) y sitio  $\kappa$ B alternativo (resaltado en verde) en la región de -565 a +162 pb del promotor del gen *LGALS9*.

### *Alineamiento de secuencias en Clustal Omega*

El alineamiento múltiple aportó información previa para la construcción del molde. La Figura 7 representa el resultado del alineamiento múltiple de las secuencias de los DBD de diferentes IRF. En la imagen, un punto (.) indica una coincidencia, dos puntos (:), una coincidencia alta, un asterisco (\*), un residuo conservado en todas las secuencias alineadas.



**Fig. 7.** Alineamiento de secuencias obtenido en Clustal Omega (Sievers y Higgins, 2018).

La similitud entre los DBD se ve reflejada de manera más clara en la matriz de porcentaje de identidad (Tabla 6). La elección de las estructuras empleadas para el modelado por homología dependió del porcentaje de identidad reflejado en la matriz de porcentaje de identidad y de la disponibilidad de modelos en PDB.

**Tabla 6.** Matriz de porcentaje de identidad del alineamiento de secuencias de IRF obtenido en Clustal Omega.

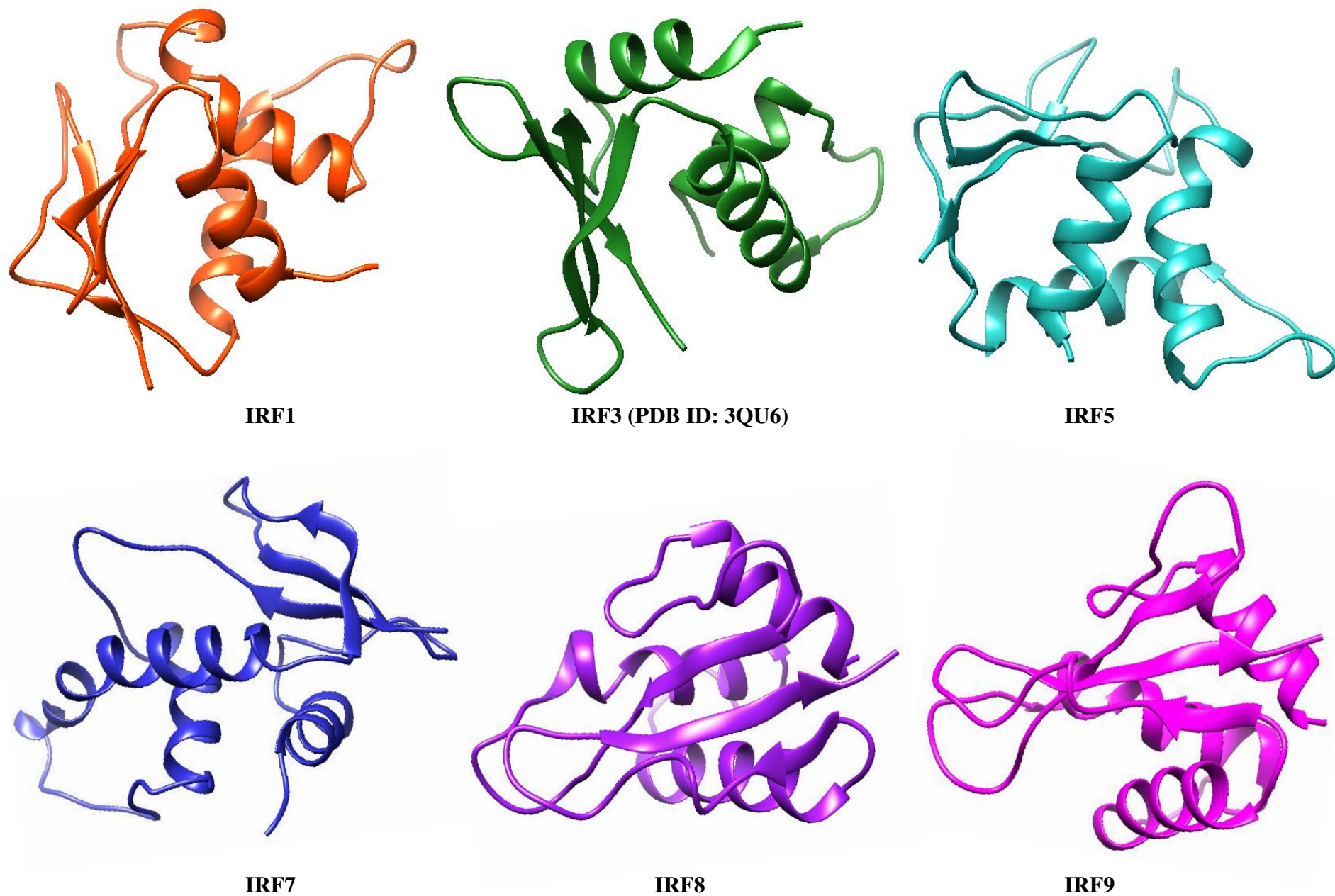
	IRF1	IRF2	IRF3	IRF4	IRF5	IRF6	IRF7	IRF8	IRF9	Posición del DBD en la secuencia	Número de acceso UniProt
IRF1	-	77.06	34.58	44.04	42.20	37.61	30.84	46.30	37.04	5–113	P10914
IRF2	77.06	-	35.51	45.87	44.04	42.20	31.78	47.22	35.19	5–113	P14316
IRF3	34.58	35.51	-	42.06	42.99	43.93	38.32	40.57	35.85	5–111	Q14653
IRF4	44.04	45.87	42.06	-	44.04	44.04	38.32	79.63	57.41	21–129	Q15306
IRF5	42.20	44.04	42.99	44.04	-	68.81	36.45	49.07	44.44	14–122	Q13568
IRF6	37.61	42.20	43.93	44.04	68.81	-	36.45	47.22	42.59	7 – 115	O14896
IRF7	30.84	31.78	38.32	38.32	36.45	36.45	-	40.57	38.68	11–126	Q92985
IRF8	46.30	47.22	40.57	79.63	49.07	47.22	40.57	-	60.19	7–114	Q02556
IRF9	37.04	35.19	35.85	57.41	44.44	42.59	38.68	60.19	-	9–116	Q00978

### *Modelos obtenidos en SWISS-MODEL y Parámetros de calidad*

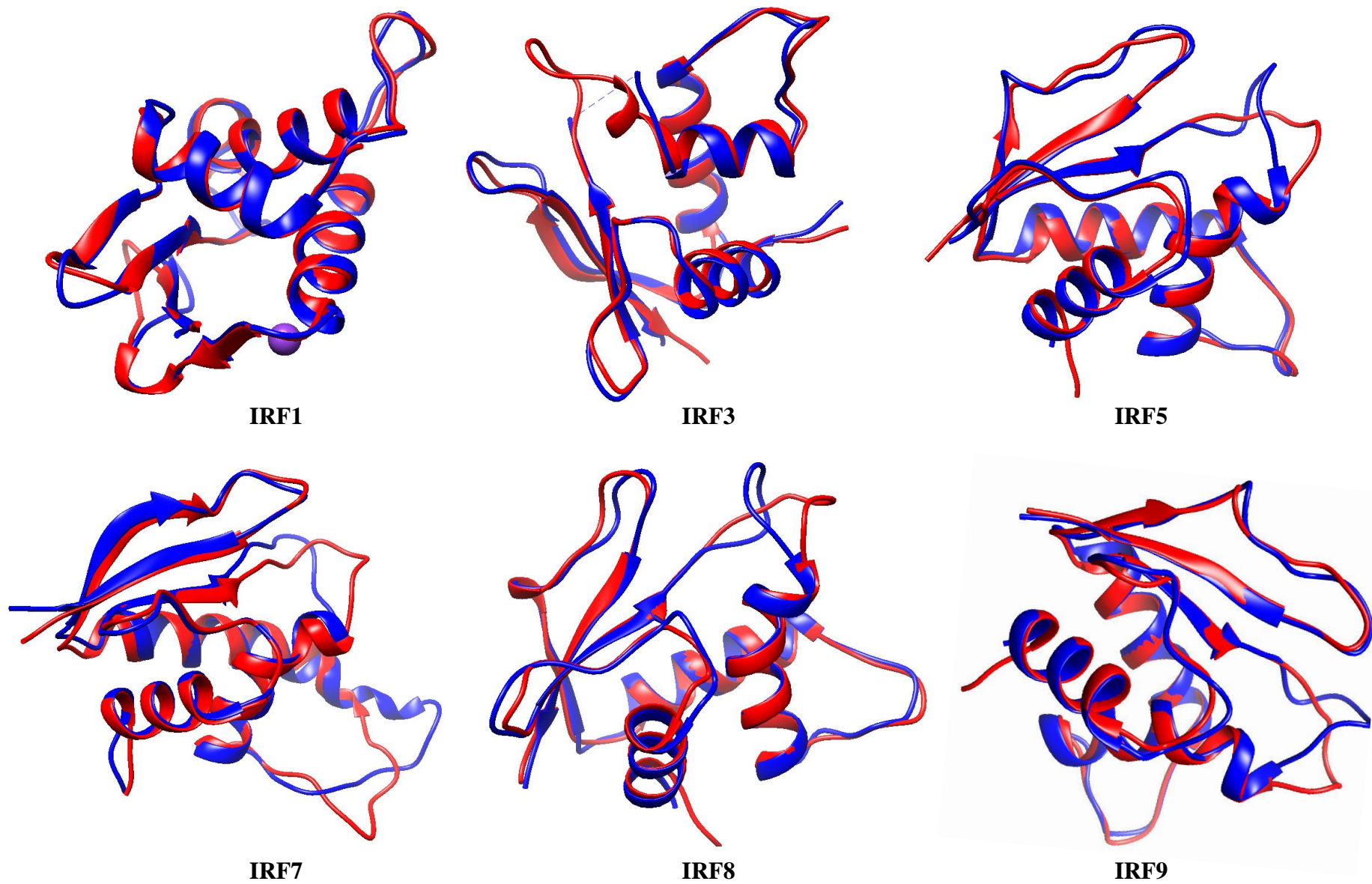
En primera instancia, se debe tener en cuenta que la calidad de los modelos obtenidos mediante modelado por homología varía de manera acorde con la disponibilidad de estructuras obtenidas por medio de métodos experimentales, en las bases de datos. Dado que un modelo obtenido por medio de enfoques teóricos es una aproximación probabilística a la estructura real. Si bien actualmente las estructuras de la mayoría de los miembros de la familia IRF se encuentran disponibles en PDB (los organismos fuente de las estructuras disponibles varían), y las identidades de secuencia con los modelos obtenidos oscilan desde 44.04% hasta 81.13%, la elección de estas estructuras se ve limitada debido a diversos factores. La elección de los moldes se restringe cuando se tiene en cuenta el organismo fuente, la resolución y la cobertura de estas estructuras con respecto a la secuencia que se pretende modelar. IRF1 cuenta con una estructura relacionada depositada en PDB (código de identificación PDB: 1IF1), pero al revisar la resolución y el sistema de expresión de este (*Escherichia coli*), se optó por obtener un modelo para cuyo molde se eligió IRF2 (código de identificación PDB: 2IRF), debido a la alta identidad de secuencia que comparte con IRF1 (77.06%) (Tabla 5). En el caso de IRF5, PDB cuenta con una estructura relacionada depositada en PDB (código de identificación PDB: 3DSH), pero se trata del dominio de transactivación de este factor de transcripción, el cual es un sitio diferente al DBD. Con respecto a IRF7, existe una estructura relacionada (código de identificación PDB: 2O61), pero la secuencia de la estructura correspondiente al sitio de interés, es decir, el DBD, difiere de la secuencia reportada en UniProtKB. Además, esta estructura no fue propuesta como un molde por los programas empleados para el modelado por homología, probablemente debido a esta diferencia entre la secuencia problema y la secuencia de la estructura. IRF8 no cuenta con una estructura dilucidada por medio de métodos experimentales, pero su alta identidad de secuencia con IRF4, cuya estructura sí está disponible en PDB (código de identificación PDB: 7O56), permitió obtener un modelo viable. Por último, IRF9 de ratón (*Mus musculus*) (código de identificación PDB: 5OEN), está disponible en PDB, sin embargo, debido a la diferencia entre especies, el programa SWISS-MODEL sugirió una estructura de IRF4 (código de identificación PDB: 7JM4) como molde para este modelo.

En la Figura 8 se muestran los modelos de DBD de IRF obtenidos por medio de modelado por homología y el DBD de IRF3, el cual se obtuvo de PDB. Todas las estructuras comparten el motivo de unión a ADN hélice-giro-hélice y poseen además hojas- $\beta$ .

Para el modelado se emplearon los servidores SWISS-MODEL e I-TASSER. Los modelos obtenidos por medio de I-TASSER se emplearon como comparativa para asegurar la calidad de los modelos obtenidos por medio de SWISS-MODEL por medio de la superposición entre ambos modelos y posterior comprobación de sus valores de RMSD (Figura 9). Debido a que los modelos empleados para el acoplamiento fueron los obtenidos en SWISS-MODEL, los parámetros de calidad tomados en cuenta para el modelado fueron los calculados por las herramientas adjuntas en este servidor (Tabla 7).



**Fig. 8.** Modelos obtenidos en SWISS-MODEL y PDB (IRF3, PDB ID: 3QU6) (visualizados en el programa UCSF Chimera 1.15)



**Fig. 9.** Superposición entre modelos obtenidos en SWISS-MODEL (azul) e I-TASSER (rojo) (IRF3 se obtuvo de PDB, y no se modeló en SWISS-MODEL pero sí en I-TASSER para realizar esta superposición) (visualizados en el programa UCSF Chimera 1.15 en

**Tabla 7.** Parámetros de calidad para los modelos de DBD de IRF obtenidos en SWISS-MODEL (IRF3 es la estructura cristalizada obtenida de PDB).

	Porcentaje de residuos en regiones favorables del gráfico de Ramachandran (Molprobit)	Número de modelo elegido (SWISS-MODEL)	Molde principal (código de identificación PDB)	Identidad con la secuencia original (SWISS-MODEL)	GMQE	QMEANDisCo	RMSD contra modelos de I-TASSER
IRF1	96.26%	01	2IRF	77.06%	0.80	0.79 ± 0.08	0.797 Å
IRF3 (PDB ID: 3QU6)	99.03%	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0.800 Å
IRF5	94.29%	02	7JM4	44.04%	0.71	0.67 ± 0.08	0.708 Å
IRF7	93.86%	03	3QU3	75.00%	0.81	0.72 ± 0.08	0.915 Å
IRF8	95.19%	03	7O56	81.13%	0.88	0.82 ± 0.08	0.666 Å
IRF9	94.23%	01	7JM4	57.41%	0.83	0.77 ± 0.08	0.647 Å

GMQE (Estimación global de la calidad del modelo, *Global Model Quality Estimate*).

QMEANDisCo (Análisis Cualitativo de Energía del Modelo con restricción de distancia basada en consenso, *Qualitative Model Energy ANalysis, consensus-based Distance COstraint*).

RMSD (desviación cuadrática media, *Root-mean-square deviation*).

En cuanto a los parámetros de calidad señalados en la Tabla 7, GMQE, y QMEANDisCo son valores que aportan una medición general de la calidad del modelo. Sus valores varían entre 0 y 1, donde los valores más cercanos a uno indican una calidad esperada más alta (Waterhouse *et al.*, 2018; Studer *et al.*, 2020).

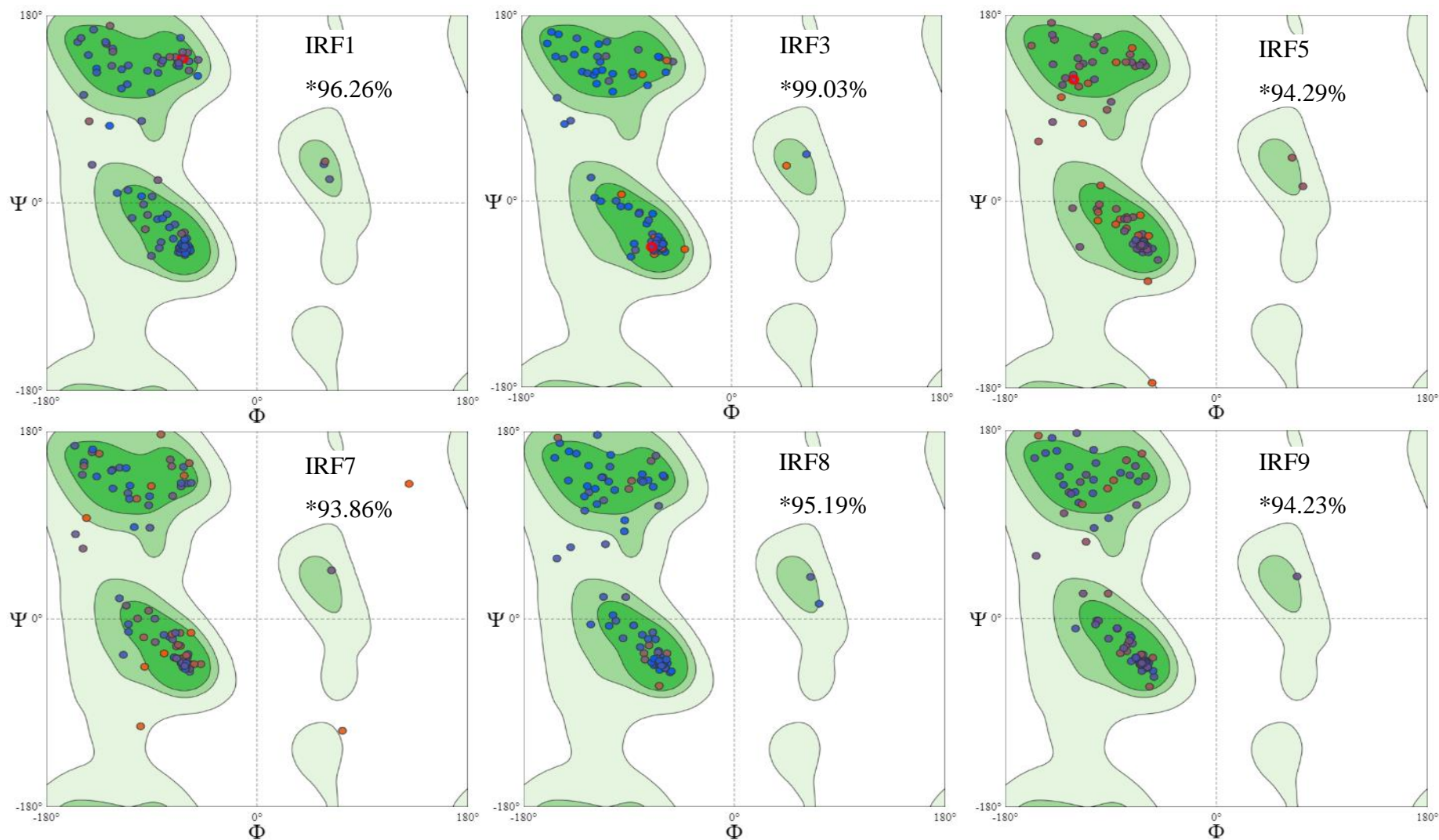
El valor de GMQE evalúa las propiedades de la alineación de la secuencia problema (modelo) y el molde seleccionado, por lo que depende de la cobertura de la estructura del molde con respecto a la del modelo; por lo tanto, es poco probable que un molde que cubra solo la mitad de la secuencia del modelo obtenga una puntuación de GMQE superior a 0,5 (Waterhouse *et al.*, 2018). Todos los modelos obtenidos presentan una puntuación de GMQE mayor a 0.5, lo que indica que cada molde seleccionado cubre de manera idónea cada secuencia problema.

QMEAN es una función de puntuación compuesta que describe los principales aspectos geométricos de las estructuras de proteínas y medición de calidad evalúa el modelo sin dependencia de cobertura explícita (Benkert, Tosatto, y Schomburg, 2008). QMEANDisCo emplea potenciales estadísticos de promedios de fuerza y términos de concordancia al introducir una puntuación de restricción de distancia basada en consenso (*distance constraint*, DisCo) (Studer *et al.*, 2020). El valor de QMEANDisCo provisto por SWISS-MODEL representa la diferencia cuadrática media (es decir, la desviación estándar) entre la puntuación global de QMEANDisCo y la IDDT (prueba de diferencia de distancia local, por sus siglas en inglés *Local Distance Difference Test*). IDDT es una puntuación sin superposición que evalúa las diferencias de la distancia local de todos los átomos en un modelo e incluye una validación de la plausibilidad estereoquímica (Mariani *et al.*, 2013). La referencia puede ser una estructura única o un conjunto de estructuras equivalentes. Como la confiabilidad de la predicción depende del tamaño del modelo, la estimación del error proporcionada se calcula en base a estructuras disponibles de tamaño similar al modelo. Los modelos obtenidos presentan un valor de QMEANDisCo cercano a uno, por lo que también cumplen con este parámetro de calidad.

Como se mencionó anteriormente, el valor de RMSD entre los carbonos  $\alpha$  de las estructuras de dos cadenas de proteínas es una medida de similitud entre dos estructuras de proteínas, y cuánto menor es este valor, más similares son éstas (Kufareva y Abagyan, 2012). El valor de RMSD de los modelos en SWISS-MODEL e I-TASSER, al ser superpuestos

entre sí, no supera en ningún caso 1 Å (el valor de este parámetro no debe superar los 2 Å). Ambas herramientas emplean metodologías de modelado diferentes (SWISS-MODEL emplea un método de modelado por homología e I-TASSER, método *threading*), por lo que esta comparación se realizó con el fin de subrayar la pertinencia de los modelos obtenidos empleando SWISS-MODEL.

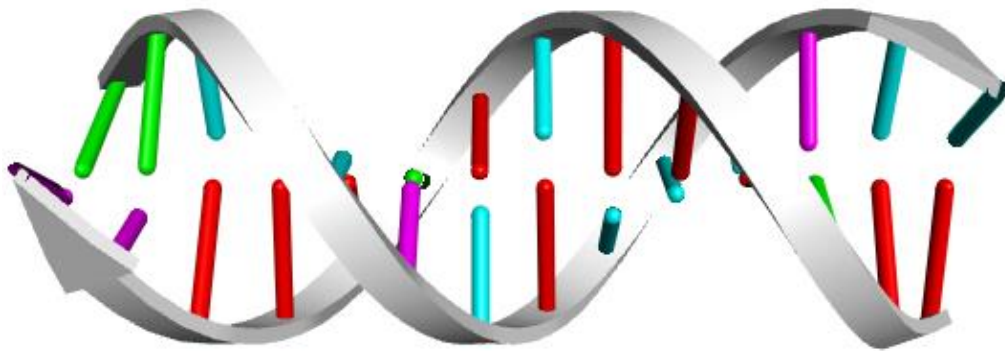
En los resultados del gráfico de Ramachandran (Figura 10) puede apreciarse que más del 90 % o más de los residuos se encuentran en regiones favorables del gráfico para todos los modelos obtenidos y para IRF3, siendo este porcentaje el mínimo deseable para considerar que un modelo es preciso (Elslinger y Wilson, 2012). Para obtener el gráfico de Ramachandran se emplearon los programas MolProbity y PROCHECK. Debido a que SWISS-MODEL incorpora por defecto el gráfico de Ramachandran generado por MolProbity, se sometieron los modelos obtenidos a una evaluación empleando PROCHECK para corroborar los resultados del gráfico de Ramachandran (datos no mostrados debido a similitud entre resultados).



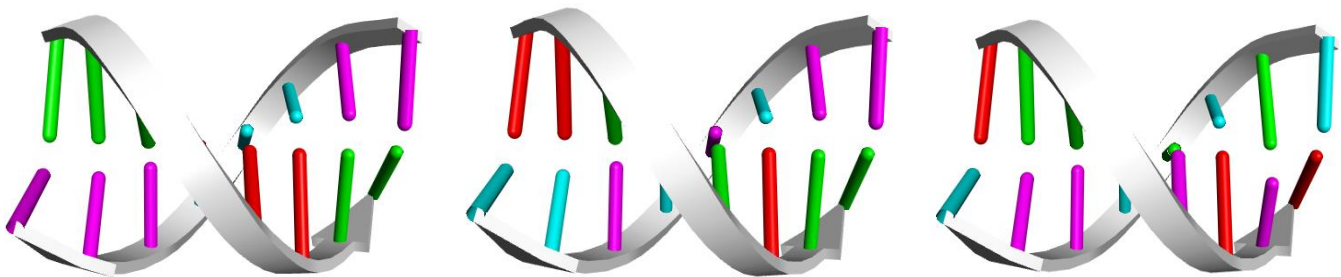
**Fig. 10.** Gráficos de Ramachandran para los modelos obtenidos por modelado por homología en SWISS-MODEL (IRF3 se obtuvo de PDB). En todos los casos, más del 90% de los residuos que conforman los modelos se encuentran en regiones favorables del gráfico.

### Modelos de ADN de doble cadena

Las siguientes figuras (Figuras 11 a 13) muestran los modelos de doble cadena de ADN-B obtenidos por medio del servidor w3DNA 2.0 y posteriormente empleados para el acoplamiento molecular con los factores de transcripción IRF y NF- $\kappa$ B. Se modelaron los elementos de respuesta para IRF, ISRE (Figura 11) o IRE (canónico y alternativos) (Figura 12), y el elemento de respuesta para NF- $\kappa$ B, el sitio  $\kappa$ B (Figura 13). Se eligieron las secuencias de ADN localizadas en la región promotora de 727 pb del gen *LGALS9* por el servidor LASAGNA-search 2.0.



**Fig. 11.** Secuencia 3' GGTTTCTATTTCTT '5, sitio ISRE canónico.

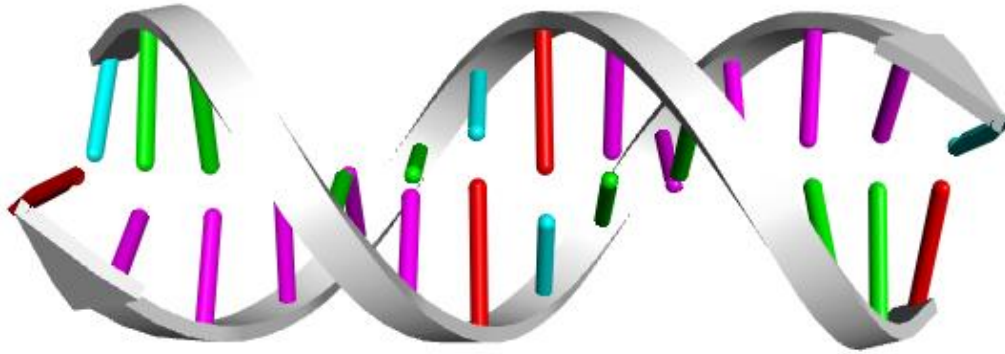


3' GG**GAAA**GG'5

3' AAG**GAGAGG** '5

3' AG**GACACA** '5

**Fig. 12.** Sitios IRE (canónico y alternativos) En azul se señala la secuencia del elemento de respuesta.



**Fig. 13.** Secuencia 3' CTGGGGGCATGCCCCCTT 5', sitio κB alternativo.

### *Acoplamiento molecular*

La capacidad para diseñar tratamientos efectivos para enfermedades que son causadas por un mal funcionamiento de los complejos procesos intracelulares que regulan la expresión génica está muy limitada por la escasa comprensión de la regulación genética y el control transcripcional. Las proteínas de unión al ADN juegan un papel fundamental en estos procesos y, en particular, los factores de transcripción que regulan la expresión de genes específicos uniéndose con alta afinidad a su elemento de respuesta. Esclarecer a detalle la especificidad molecular de los factores de transcripción es un desafío importante para descifrar los patrones de expresión génica espaciotemporal que sustentan la vida a nivel celular, sin embargo, la información estructural disponible que confieren los complejos proteína-ADN dilucidados por métodos experimentales deja en claro que no es posible definir un código simple (o único) basado en contactos entre cadenas laterales específicas de aminoácidos y bases específicas de ADN, para la unión proteína-ADN (Garvie y Wolberger, 2001; Sarai y Kono, 2005; Fornes *et al.*, 2014).

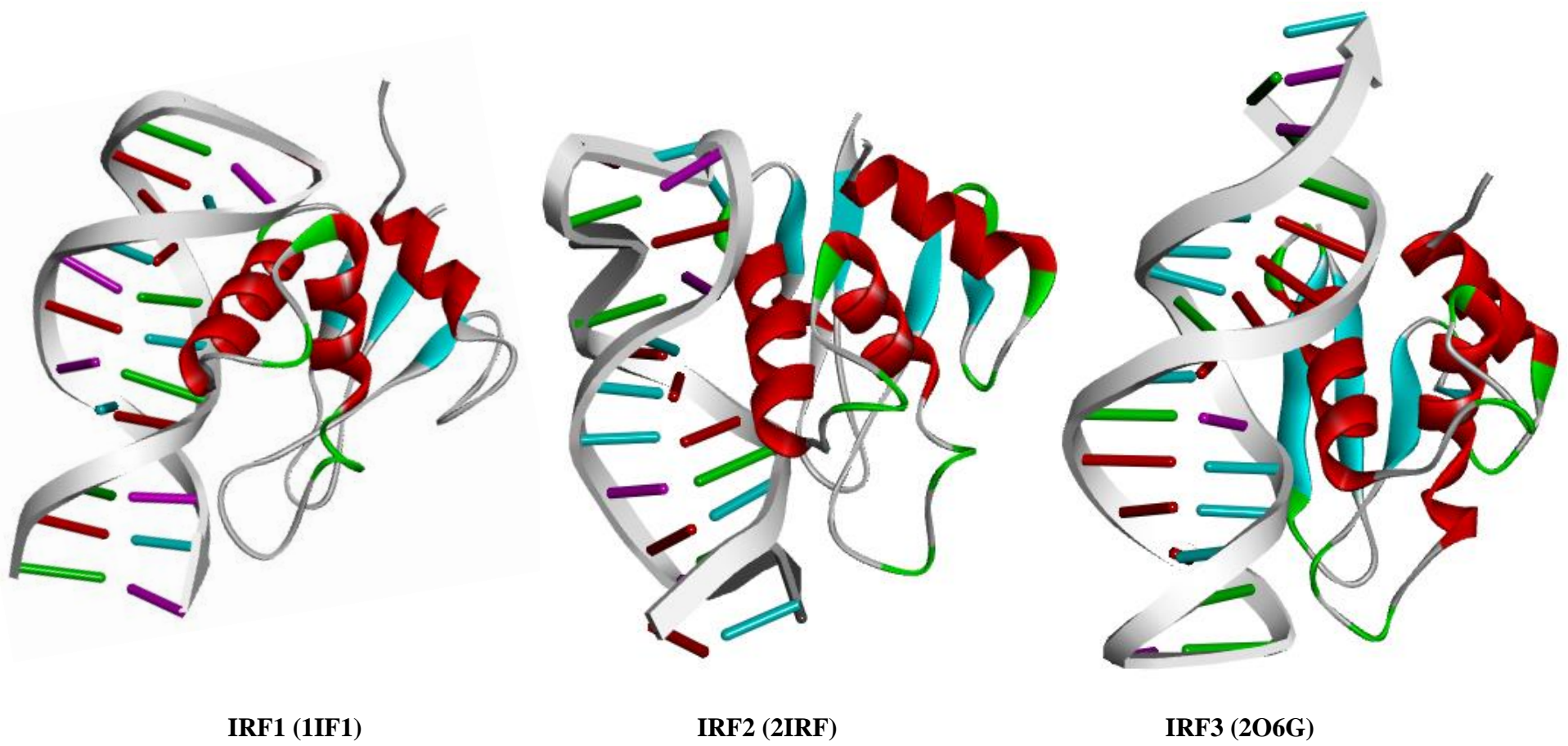
Si bien algunos modelos predictivos que se basan exclusivamente en la secuencia de ADN han tenido éxito en un limitado número de casos (por ejemplo, los modelos basados en PWMs) (Stormo, 2014), estos son incapaces de explicar la variedad de factores estructurales y dinámicos que regulan la afinidad de unión (O'Flanagan, Paillard y Sengupta, 2005), debido principalmente a que las interfaces proteína-ADN son altamente dinámicas y una sola estructura es a menudo insuficiente para analizar el reconocimiento, la conformación y el modo de unión y, en particular, para identificar los residuos clave que hacen las

contribuciones más importantes en la unión FT–ADN; en este contexto, las simulaciones moleculares han alcanzado un nivel de precisión que les ha permitido convertirse en una útil herramienta para complementar la información estructural experimental disponible o para emplearse por sí sola para el estudio de las propiedades de la interacción. El análisis de los datos estructurales obtenidos mediante cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear proporcionan una comprensión más profunda de la unión de los factores de transcripción al ADN, sin embargo, al carecer de estos datos, el análisis de los complejos FT–ADN obtenidos por medio del acoplamiento molecular puede brindar información valiosa sobre el modo de unión y los residuos importantes que participan en esta unión.

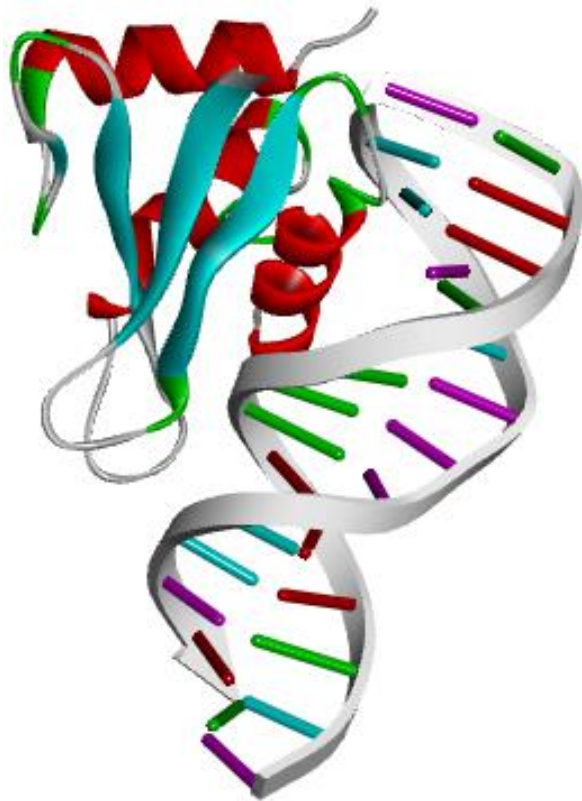
Uno de los pasos previos para realizar un acoplamiento en HADDOCK es la definición de los residuos activos en los modelos indexados. Estos residuos son los de importancia central para la interacción y se definen como aquellos cuya eliminación conlleva una anulación de la interacción. A lo largo de la simulación, estos residuos se restringen para que formen parte de la interfaz que interactuará de manera constante con el receptor. Para realizar el acoplamiento se tomaron en cuenta todos los residuos señalados por el programa, los cuales pueden consultarse a detalle en el apéndice B.

#### *Prueba de parámetros y controles*

Para la prueba de parámetros se eligieron estructuras de IRF dilucidadas por medio de métodos experimentales, depositadas en la base de datos PDB. La información que se obtuvo de estos acoplamientos es: a) la conformación adoptada por el IRF con respecto a la secuencia de ADN (Figura 14) y b) el HADDOCK *score* para cada uno de los acoplamientos (Tabla 8), lo cual nos brinda parámetros que nos ayudan a definir si la energía de interacción de los acoplamientos entre los modelos de IRF obtenidos por modelado y los modelos de las secuencias identificadas en el promotor del gen *LGALS9* son lo suficientemente favorables para predecir una verdadera interacción.



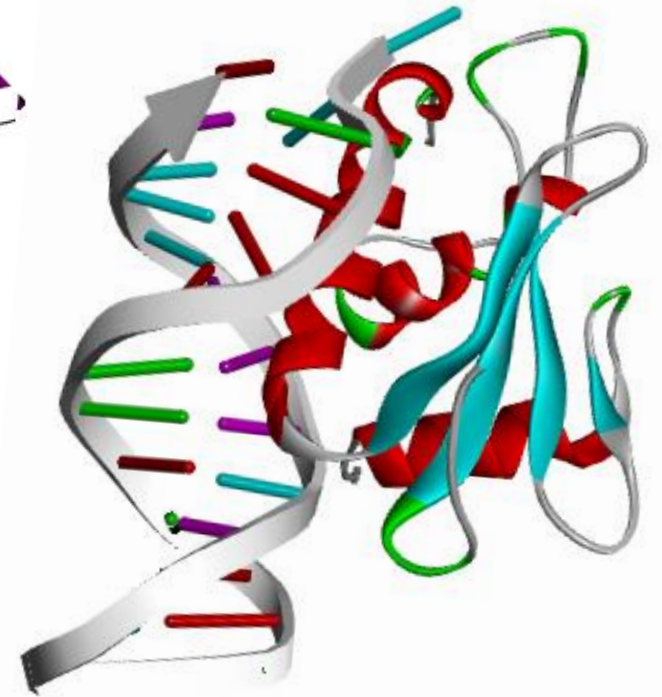
**Fig. 14.** Acoplamiento resultante entre las proteínas elegidas para la prueba de parámetros y secuencias de ADN.



**IRF3 (2PI0)**



**IRF4 (7JM4)**



**IRF7 (2O61)**

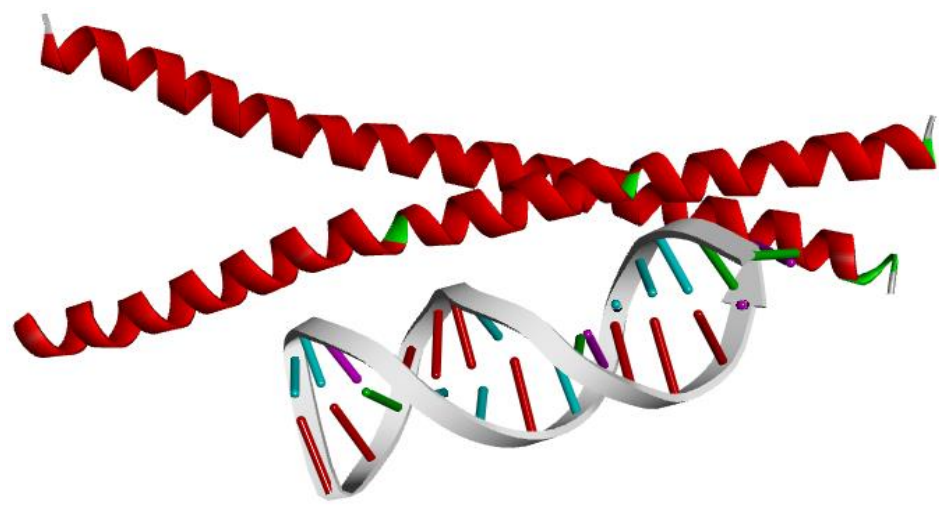
**Fig. 14.** (Continuación). Acoplamientos resultantes entre las proteínas elegidas para la prueba de parámetros y secuencias de ADN.

**Tabla 8.** Valores obtenidos de los acoplamientos entre complejos elegidos para prueba de parámetros – secuencias de ADN (mejores resultados de cada clúster obtenido en HADDOCK).

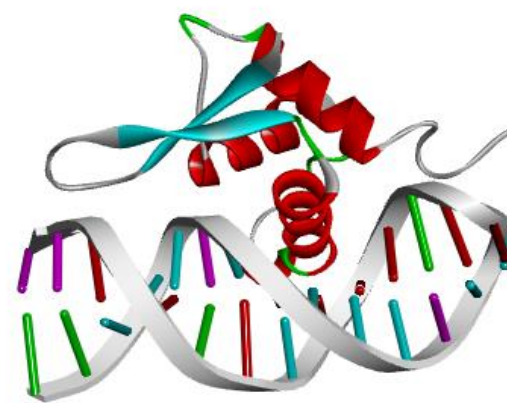
	HADDOCK Score	Cluster	Cluster size	RMSD from the overall lowest-energy structure	Van der Waals energy	Electrostatic energy	Desolvation energy	Restraints violation energy	Buried surface area	Z - score
IRF1 (1IF1)	-185.9 +/- 7.1	2	30	0.7 +/- 0.4	-67.7 +/- 4.3	-794.4 +/- 30.6	9.8 +/- 1.6	308.8 +/- 106.5	2301.5 +/- 59.5	-2.1
IRF2 (2IRF)	-116.4 +/- 20.2	2	10	1.7 +/- 1.1	-62.5 +/- 6.7	-606.9 +/- 48.2	15.6 +/- 1.7	519.0 +/- 136.6	2287.3 +/- 152.6	-1.4
IRF3 (2O6G)	-124.8 +/- 13.7	2	9	17.1 +/- 0.1	-78.9 +/- 2.5	-704.5 +/- 43.9	22.5 +/- 1.6	726.0 +/- 98.9	2365.2 +/- 99.1	-1.7
IRF3 (2PI0)	-89.0 +/- 18.8	4	7	12.2 +/- 0.1	-65.0 +/- 8.3	-451.0 +/- 43.4	24.4 +/- 2.7	417.4 +/- 89.3	1912.2 +/- 136.8	-2.0
IRF4 (7JM4)	-116.1 +/- 6.1	1	15	0.8 +/- 0.5	-69.2 +/- 4.1	-542.0 +/- 19.7	17.9 +/- 1.6	436.2 +/- 32.0	1815.6 +/- 27.1	-2.1
IRF7 (2O61)	-132.1 +/- 10.1	1	7	8.6 +/- 0.4	-72.9 +/- 10.1	-676.7 +/- 47.3	17.4 +/- 3.4	587.2 +/- 44.8	2332.8 +/- 87.3	-1.4

En cuanto a la prueba de controles se realizó un acoplamiento entre factores de transcripción cuyo elemento de respuesta difiere de ISRE y la secuencia ISRE localizada en la región promotora del gen *LGALS9* en HADDOCK, esto con el fin de definir un rango de valores de HADDOCK *score* que indicara valores no aceptables (C-Fos/C-Jun), bajos (NFAT), altos (FoxO1) y muy altos (C-Myb) (Tabla 9), partiendo del hecho de que el motivo de unión a ADN de la familia IRF es hélice-giro-hélice. Nótese que sólo las hélices- $\alpha$  cortas interaccionan de manera favorable con el modelo de ADN, y que sólo los factores de transcripción que presentan este tipo de hélices- $\alpha$  logran un HADDOCK *score* alto (Figura 15).

El hecho de que los factores de transcripción de la familia IRF y la oncoproteína c-Myb poseen un motivo estructural común para el reconocimiento del ADN (Veals *et al.*, 1992) puede ser el motivo por el que este factor de transcripción presenta un alto HADDOCK *score* al acoplarse con el modelo de la secuencia ISRE. De igual manera, se observó afinidad de una de las hélices- $\alpha$  que conforman la estructura de c-Myb, por la estructura de ADN (Figura 15, inferior izquierda).



**C-Fos/C-Jun**



**FoxO1**



**NFAT**



**C-Myb**

**Fig. 15.** Acoplamiento resultante entre las proteínas elegidas para la prueba de controles – secuencia ISRE.

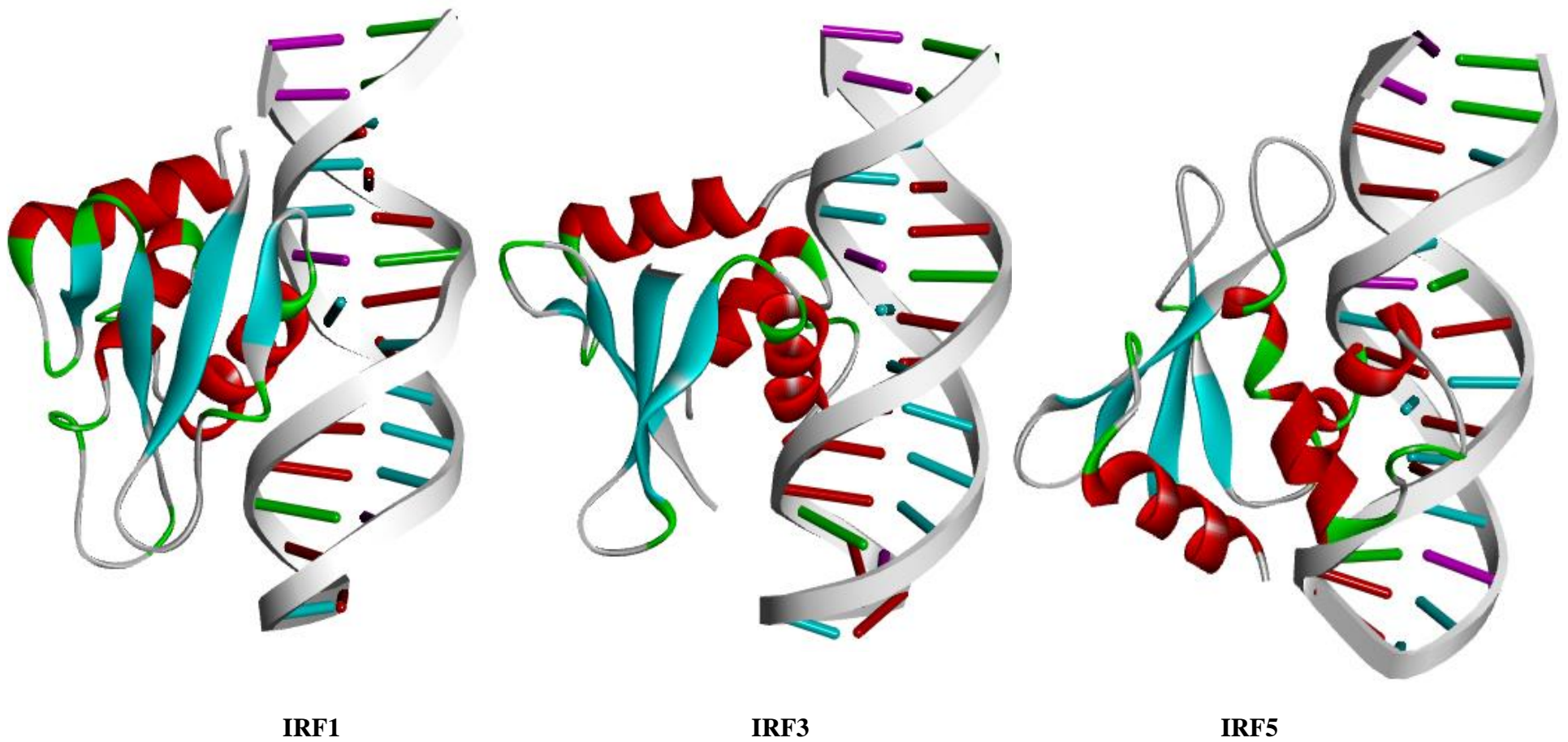
**Tabla 9.** Valores obtenidos de los acoplamientos entre modelos elegidos para prueba de controles – secuencia ISRE (mejores resultados de cada clúster obtenido en HADDOCK).

	HADDOCK Score	Cluster	Cluster size	RMSD from the overall lowest-energy structure	Van der Waals energy	Electrostatic energy	Desolvation energy	Restraints violation energy	Buried surface area	Z - score
C-Fos/C-Jun	2.1 +/- 2.9	3	12	2.7 +/- 0.9	-55.1 +/- 8.6	-183.5 +/- 42.5	14.6 +/- 5.1	793.5 +/- 21.6	1831.5 +/- 141.6	-1.6
FoxO1	-84.1 +/- 6.7	2	9	17.3 +/- 0.5	-53.8 +/- 11.1	-417.0 +/- 46.8	6.1 +/- 1.1	469.7 +/- 34.9	1814.6 +/- 64.8	-2.0
NFAT	-9.1 +/- 20.6	1	6	0.7 +/- 0.5	-83.9 +/- 6.9	-309.7 +/- 30.0	14.3 +/- 1.6	1224.7 +/- 176.0	2445.9 +/- 99.9	-1.7
C-Myb	-100.4 +/- 11.2	9	5	14.9 +/- 0.1	-82.2 +/- 12.4	-791.1 +/- 18.7	18.1 +/- 1.9	1119.5 +/- 50.6	2776.3 +/- 204.0	-2.5

#### *Acoplamiento IRF–ISRE*

Los complejos IRF–ADN obtenidos presentaron energías de afinidad altas (Tabla 10) y puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en cada una de las secuencias núcleo TTTC (GAAA) de las dos que conforman la secuencia ISRE (Figura 16). Estos resultados se ven reforzados por la obtención de altas energías de afinidad en los acoplamientos entre los DBD de IRF y el sitio IRE canónico (secuencia GAAA), y los sitios IRE alternativos (secuencias GAGA, GACA) (Apéndice C). En estos complejos, una de las

tres hélices- $\alpha$  (llamada hélice de reconocimiento  $\alpha 3$ ) (Escalante *et al.*, 1998)) que componen el DBD muestra una evidente preferencia por la secuencia núcleo GAAA, posicionándose de manera transversal sobre el surco mayor de ADN en todos los casos.



**Fig. 16.** Acoplamiento resultante entre DBD de IRF y la secuencia ISRE.



**IRF7**



**IRF8**



**IRF9**

**Fig. 16.** (Continuación). Acoplamiento resultante entre DBD de IRF y la secuencia ISRE.

**Tabla 10.** Valores obtenidos de los acoplamientos entre DBD de IRF – secuencia ISRE (mejores resultados de cada clúster obtenido en HADDOCK).

	HADDOCK Score	Cluster	Cluster size	RMSD from the overall lowest-energy structure	Van der Waals energy	Electrostatic energy	Desolvation energy	Restraints violation energy	Buried surface area	Z - score
IRF1	-128.9 +/- 8.0	1	12	1.4 +/- 0.9	-50.5 +/- 6.8	-780.0 +/- 60.4	21.7 +/- 1.6	559.5 +/- 147.0	2094.8 +/- 183.6	-1.8
IRF3	-131.4 +/- 11.6	1	17	16.8 +/- 0.6	-65.2 +/- 5.7	-693.9 +/- 17.4	26.9 +/- 3.2	455.9 +/- 63.1	2145.3 +/- 71.6	-1.2
IRF5	-99.0 +/- 15.7	1	10	17.0 +/- 0.0	-53.2 +/- 12.4	-629.3 +/- 20.9	14.5 +/- 3.7	655.0 +/- 133.4	2016.8 +/- 158.5	-1.5
IRF7	-67.4 +/- 13.4	4	6	16.1 +/- 0.1	-55.3 +/- 7.3	-554.9 +/- 69.8	21.9 +/- 5.0	770.0 +/- 109.3	2191.3 +/- 186.0	-2.1
IRF8	-91.1 +/- 11.8	4	8	15.4 +/- 1.0	-42.0 +/- 5.3	-546.9 +/- 50.7	16.4 +/- 4.8	439.8 +/- 140.3	1741.8 +/- 65.7	-1.7
IRF9	-106.3 +/- 20.6	1	7	1.2 +/- 0.8	-47.8 +/- 8.9	-745.5 +/- 94.0	22.3 +/- 4.0	683.1 +/- 7.8	1848.1 +/- 133.2	-2.0

*Puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en los complejos IRF–ISRE visualizados en LigPlot+*

El reconocimiento de una secuencia de ADN por un factor de transcripción se logra mediante complementación química (Coulocheri *et al.*, 2007). Esta complementación entre las dos moléculas es direccional y está determinada por los contactos químicos específicos que incluyen principalmente enlaces de hidrógeno, pero que también pueden incluir otro tipo de interacciones, siendo una de estas las interacciones hidrofóbicas. En una interfaz proteína–ADN ocurren diversos arreglos espaciales que se ven condicionados por el

plegamiento y el acoplamiento local y global de la proteína (Pabo y Nekludova, 2000). De manera similar, se ha propuesto que las interacciones hidrofóbicas son una de las principales fuerzas impulsoras de la asociación proteína-ADN; estas interacciones surgen de la interacción entre las superficies proteicas no polares en el sitio de unión del ADN (Spyrakakis *et al.*, 2007), y, en conjunto con los puentes de hidrógeno, confieren estabilidad al complejo proteína-ADN.

Las siguientes tablas (Tablas 11 a 16) compendian los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas en los complejos IRF-ISRE obtenidos por el acoplamiento molecular, visualizados en el programa LigPlot+. En la parte superior de las tablas se aprecia la secuencia de la cadena de sentido de ADN (GGTTTCTATTTCTT) y en la parte inferior, la secuencia de la cadena antisentido (AAGAAATAGAAACC). Los residuos resaltados en **verde** corresponden a residuos que forman puentes de hidrógeno con el ADN, y los residuos resaltados en **azul**, los que interaccionan de manera hidrofóbica.

De manera interesante, los puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas de los complejos obtenidos se concentran en su mayoría en uno de los dos sitios centrales TTTC que conforman la secuencia del sitio ISRE, para todos los complejos DBD IRF-ISRE obtenidos, sin embargo, las interacciones visualizadas en el programa difieren significativamente entre los complejos en los cuales los IRF se mantuvieron como monómero (Tablas 11 a 16), y los complejos en los que los IRF se analizaron como dímeros (Tablas 18 a 23), siendo este último caso lo más cercano a lo que sucede en un evento bioquímico real (puesto que la mayoría de los IRF se unen a su elemento de respuesta tras dimerizar), sin embargo, el uso de estructuras de proteínas en sus formas monoméricas está más extendido en este tipo de análisis puesto que las simulaciones computacionales siempre serán más inexactas cuánto más grande sea el sistema atómico analizado.

La estructura cristalina del DBD de IRF1 en complejo con un fragmento de ADN de 13 nucleótidos de un elemento PRD1 que contiene la secuencia central de GAAA está indexada en la base de datos PDB (código de identificación PDB: 1IF1); topológicamente, la región de unión al ADN de IRF1 es similar a un dominio de unión al ADN de tipo hélice-giro-hélice e incluye una hoja- $\beta$  antiparalela de cuatro hebras y tres bucles (L1-L3) y tres hélices- $\alpha$ , de las cuales la hélice de reconocimiento  $\alpha 3$  se posiciona de manera transversal

sobre el surco mayor de ADN. En esta estructura, cuatro residuos median el contacto con el ADN en el surco mayor (Arg82, Cys83, Asn86 y Ser87). Además, tres residuos de triptófano (Trp11, Trp38 y Trp58) están involucrados en las interacciones con el esqueleto de azúcar-fosfato (Escalante *et al.*, 1998). En el caso del complejo IRF1-ISRE obtenido (Tabla 11), el análisis del diagrama obtenido en LigPlot+ indicó que, con relación a la estructura de IRF1, Arg78, Cys79 y Asn82 (equivalente a Arg82, Cys83 y Asn86, comprobado por alineamiento) forman puentes de hidrógeno con los nucleótidos que conforman la secuencia núcleo GAAA (interaccionan específicamente con A19 y A20), y Trp34 y Trp54 (equivalente a Trp38 y Trp58, comprobado por alineamiento) interacciona de manera hidrofóbica con T4 y A18, respectivamente.

**Tabla 11.** Puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en el clúster DBD IRF1 – ISRE.

Secuencia:		G1	G2	T3	T4	T5	C6	T7	A8	T9	T10	T11	C12	T13	T14	
IRF1	Residuo			Arg3	Trp54	Met4	Ser83	Arg60							Lys97	
				Leu84	Thr58	Arg5										
				Pro85	Asn76	Ala80										
Secuencia:		A15	A16	G17	A18	A19	A20	T21	A22	G23	A24	A25	A26	C27	C28	
IRF1	Residuo			Lys71	Trp34	Arg78	Cys79								Arg1	
					His36		Asn82									
					Lys74		Lys91									



Puente de hidrógeno      Interacción hidrofóbica

En el caso de IRF3, los residuos conservados Asn79, Arg81 y Ser82, pertenecientes a la hélice de reconocimiento  $\alpha 3$ , presentan alta especificidad por la secuencia GAAA (Panne, Maniatis y Harrison, 2007). Los contactos adicionales de los residuos Leu42, Arg78 y Arg86 explican la especificidad de unión más restringida de IRF3 (Panne *et al.*, 2004). Con respecto al complejo obtenido (Tabla 12 y 19), se comprobó que Asn79, Arg81 y Ser82 forman puentes de hidrógeno con los nucleótidos que conforman la secuencia ISRE. Arg78 y Arg86 interactúan de la misma manera con los nucleótidos T5, A19, G23 y A26, que forman parte de ambas secuencias núcleo TTTC (GAAA).

**Tabla 12.** Puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en el clúster DBD IRF3 – ISRE.

Secuencia:		G1	G2	T3	T4	T5	C6	T7	A8	T9	T10	T11	C12	T13	T14	
IRF3	Residuo				Lys5	Arg7	Pro6	Ala63	Thr61							
					Trp57	Arg86		Asn79	Gly62							Lys98
						Lys87			Ser82							
Secuencia:		A15	A16	G17	A18	A19	A20	T21	A22	G23	A24	A25	A26	C27	C28	
IRF3	Residuo		Leu73		Arg78	Trp38	Arg81	Asn85	Arg86	Arg86			Arg86			
			Pro74		Lys77	His40										
						Arg78										
					Lys105											

Puente de hidrógeno	Interacción hidrofóbica

No existe mucha información con respecto a los residuos importantes que participan en el reconocimiento de ISRE por parte de IRF5, además de los residuos de triptófano característicos del DBD de la familia IRF. De estos cinco residuos de triptófano, se identificaron Trp34 y Trp54, los cuales interactúan de manera hidrofóbica con T9 y A18, respectivamente (Tabla 13). Los residuos que interactúan por medio de puentes de hidrógeno con las secuencias núcleo en este complejo corresponden a los residuos Arg3, Lys74, Lys83 y Thr58, mientras que las interacciones hidrofóbicas corresponden a los residuos Trp34, His36, Ala37, Trp54, Lys60, Lys72, Ala75 y Asn76.

**Tabla 13.** Puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en el clúster DBD IRF5 – ISRE.

Secuencia:		G1	G2	T3	T4	T5	C6	T7	A8	T9	T10	T11	C12	T13	T14
IRF5	Residuo			His36		Ala37 Ala71	Lys74		Arg78 Cys79 Asn82	Trp34	Ala75	Lys83			
		Secuencia:		A15	A16	G17	A18	A19	A20	T21	A22	G23	A24	A25	A26
IRF5	Residuo	Ser84	Arg85	Lys83	Arg3	Thr58	Lys60								
					Trp54	Asn76	Lys72								




Puente de hidrógeno

Interacción hidrofóbica

Para IRF7, se ha reportado que los residuos Phe45 y Leu50 participan en la unión de este factor de transcripción con su elemento de respuesta (Antonczyk *et al.*, 2019). En el complejo obtenido en el presente trabajo, esta fenilalanina se encuentra en la posición 37 (Phe37) e interacciona de manera hidrofóbica con G17. En cuanto a la leucina, se encuentra en la posición 42 (Leu42) e interacciona de manera hidrofóbica con A20 (Tabla 14).

**Tabla 14.** Puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en el clúster DBD IRF7 – ISRE.

Secuencia:		G1	G2	T3	T4	T5	C6	T7	A8	T9	T10	T11	C12	T13	T14	
IRF7	Residuo		Val2		Arg93	Ser91	Phe4	Arg1	Asn84	Arg59			Arg39			
			Leu3			Arg93	Gly5	Trp53	Arg57	Arg59						
Secuencia:		A15	A16	G17	A18	A19	A20	T21	A22	G23	A24	A25	A26	C27	C28	
IRF7	Residuo		Thr75	Phe37	Ala38	Thr83	Leu42	Ala88					Arg1			
				Ala79	Ala76		Cys87									
					Lys82		Arg90									


  
 Puente de hidrógeno      Interacción hidrofóbica

Con respecto a IRF8, se ha reportado que el reemplazo de Thr80 por un residuo de alanina en la hélice de reconocimiento  $\alpha 3$  altera la interfaz hidrofóbica entre el factor de transcripción y el ADN (Hambleton *et al.*, 2011), sin embargo, este residuo no se identificó entre las interacciones visualizadas en LigPlot+. En el caso de los residuos que forman puentes de hidrógeno con los nucleótidos de las secuencias núcleo, estos son Arg3, Leu4, Arg5, His36, Trp54, Arg75, Cys78, Asn81, Lys82, Ser83 (Tabla 15).

**Tabla 15.** Puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en el clúster DBD IRF8 – ISRE.

Secuencia:		G1	G2	T3	T4	T5	C6	T7	A8	T9	T10	T11	C12	T13	T14	
IRF8	Residuo				His36	Arg77	Cys78	Lys82			Lys82	Lys82				Arg3
					Lys73		Asn81									
Secuencia:		A15	A16	G17	A18	A19	A20	T21	A22	G23	A24	A25	A26	C27	C28	
IRF8	Residuo			Lys58			Arg3	Trp54	Arg75							
				Ala79			Leu4	Lys60								
						Arg5	Arg75									
						Ser83										

Puente de hidrógeno	Interacción hidrofóbica

Por último, en lo concerniente a IRF9 (Tabla 16), los residuos Trp54, Lys58, Lys60 y Arg75 forman puentes de hidrógeno con la secuencia núcleo TTTC (GAAA) conformada por T9, T10, T11 y C12, mientras que Val71 y Ala 79 interaccionan de manera hidrofóbica con estos nucleótidos. Arg77 y Cys78 forman puentes de hidrógeno con A18, mientras que Lys3 interacciona de manera hidrofóbica con A24.

**Tabla 16.** Puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en el clúster DBD IRF9 – ISRE.

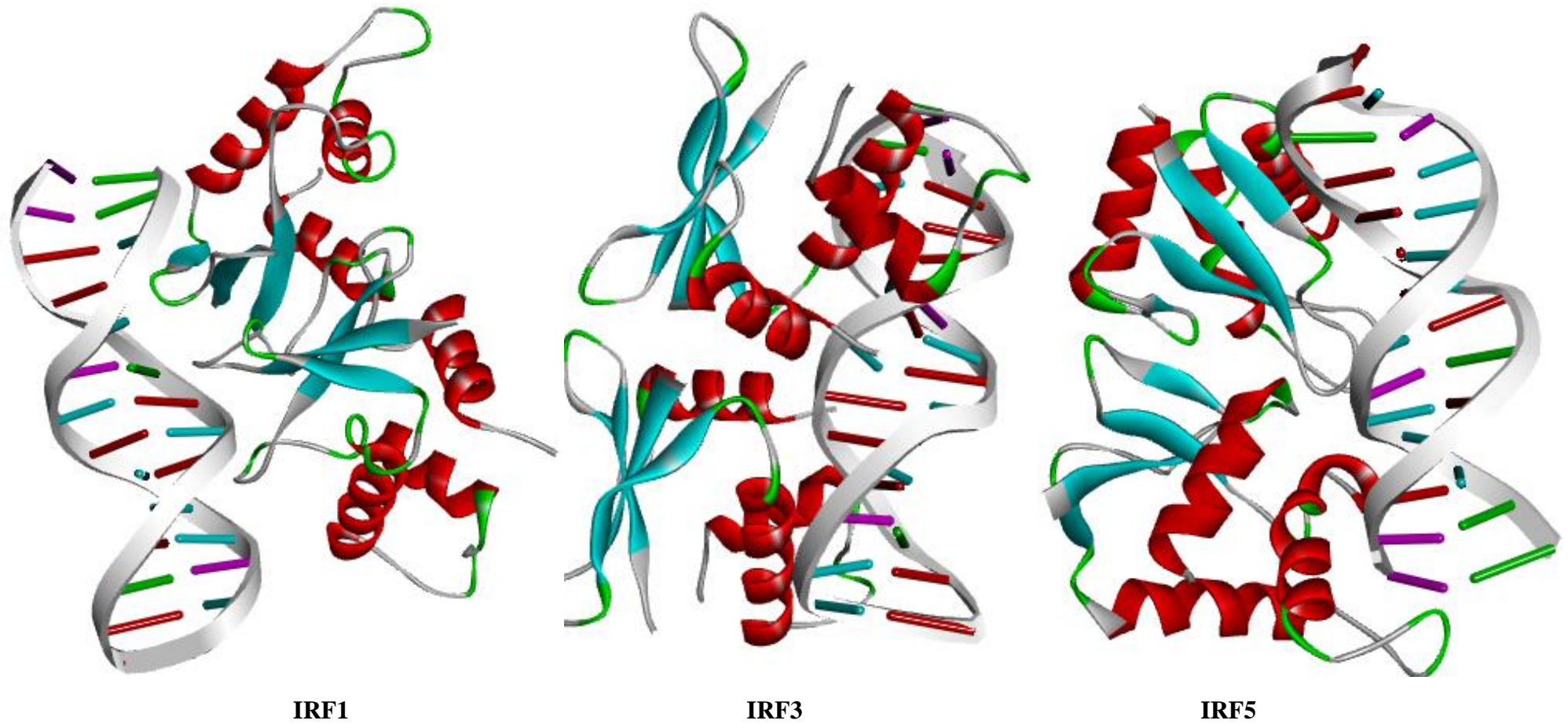
Secuencia:		G1	G2	T3	T4	T5	C6	T7	A8	T9	T10	T11	C12	T13	T14	
IRF9	Residuo							Lys82	Leu4	Trp54	Lys60	Lys60				
								Ser84	Ser83	Lys58	Arg75	Val71				
								Glu85		Arg75	Ala79					
Secuencia:		A15	A16	G17	A18	A19	A20	T21	A22	G23	A24	A25	A26	C27	C28	
IRF9	Residuo	His36	Ala37	Thr74	Arg77			Lys82			Lys3					
		Ala70	Lys73	Met95	Cys78											

Puente de hidrógeno	Interacción hidrofóbica

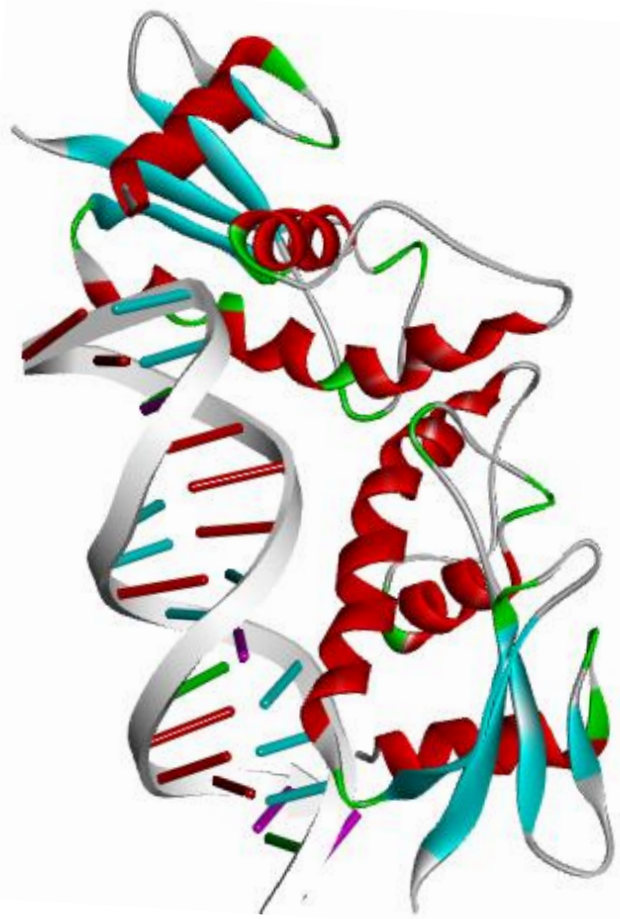
#### *Acoplamiento entre dímeros de IRF-ISRE*

Se modelaron los dímeros de los miembros de la familia IRF empleando el servidor ROSIE con el objetivo de comprobar la conformación de los DBD con respecto a las dos secuencias núcleo TTTC presentes en la secuencia ISRE analizada (Figura 17). Se tomaron en cuenta los diez mejores modelos obtenidos en ROSIE de cada IRF para realizar los acoplamientos. De estos, se seleccionó sólo la mejor

conformación de cada set de resultados. El HADDOCK Score más alto obtenido corresponde a IRF9 (remarcado en amarillo en la Tabla 17). En el Apéndice D pueden consultarse los resultados detallados de esta sección.



**Fig. 17.** Acoplamiento resultante entre dímeros de IRF (sólo DBD) y la secuencia ISRE,



**IRF7**



**IRF8**



**IRF9**

**Fig. 17.** (Continuación) Acoplamientos resultantes entre dímeros de IRF (sólo DBD) y la secuencia ISRE.

**Tabla 17.** Valores obtenidos de los acoplamientos entre dímeros de IRF (sólo DBD) – ISRE. (mejores resultados de cada clúster obtenido en HADDOCK).

	Mejor conformación (Número de modelo de ROSIE)	HADDOCK Score	Cluster	Cluster size	RMSD from the overall lowest-energy structure	Van der Waals energy	Electrostatic energy	Desolvation energy	Restraints violation energy	Buried surface area	Z - score
IRF1	IRF1-1	-60.6 +/- 17.8	3	5	16.3 +/- 0.2	-74.1 +/- 4.5	-728.6 +/- 74.7	-728.6 +/- 74.7	1331.7 +/- 82.8	2413.2 +/- 96.0	-1.7
IRF3	IRF3-4	-76.0 +/- 8.1	5	6	1.5 +/- 1.0	-69.2 +/- 4.6	-734.3 +/- 42.8	31.2 +/- 3.4	1089.0 +/- 131.3	2483.7 +/- 88.5	-1.8
IRF5	IRF5-1	-61.9 +/- 8.1	1	10	1.6 +/- 1.0	-96.4 +/- 7.4	-634.0 +/- 32.4	22.8 +/- 4.7	1384.3 +/- 35.1	2898.9 +/- 94.2	-2.4
IRF7	IRF7-8	-63.1 +/- 16.6	4	8	1.4 +/- 1.0	-65.0 +/- 2.8	-850.5 +/- 44.9	27.9 +/- 3.7	1441.7 +/- 86.8	2899.7 +/- 47.1	-2.3
IRF8	IRF8-10	-86.8 +/- 6.3	7	7	13.5 +/- 0.2	-71.6 +/- 10.6	-808.1 +/- 81.6	32.4 +/- 4.8	1140.2 +/- 73.5	2840.9 +/- 192.7	-2.0
<b>IRF9</b>	IRF9-10	-112.8 +/- 21.8	4	13	0.8 +/- 0.6	-90.0 +/- 4.1	-847.2 +/- 85.3	21.4 +/- 3.1	1252.7 +/- 51.7	2669.8 +/- 60.1	-2.3

*Puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en los complejos dímeros de IRF (sólo DBD)–ISRE*

Las Tablas 18 a 23 muestran los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas en los complejos dímero de IRF–ISRE obtenidos por medio de acoplamiento molecular, visualizados en el programa LigPlot+. Un porcentaje significativo de las interacciones se concentra en los nucleótidos T3, T4, T5, C6, G23, A24, A25 y A26, correspondiendo las dos secuencias núcleo TTTC (GAAA).

Los residuos resaltados en **verde** corresponden a residuos que forman puentes de hidrógeno con el ADN, y los residuos resaltados en **azul**, los que interaccionan de manera hidrofóbica.

**Tabla 18.** Puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en el clúster IRF1-1 – ISRE.

Secuencia:		G1	G2	T3	T4	T5	C6	T7	A8	T9	T10	T11	C12	T13	T14
IRF1-1	Residuo	Glu198	Arg187	Asn191	Lys206	Lys97		Ala37		Ala38					Lys71
		Arg212		Asn205		Ser203									
Secuencia:		A15	A16	G17	A18	A19	A20	T21	A22	G23	A24	A25	A26	C27	C28
IRF1-1	Residuo					Lys35		Trp34	Ser99		Gly98	Lys200	Asp201	His36	
						Ala101		Asn96			Gln202				
										Arg215					



Puente de hidrógeno

Interacción hidrofóbica

**Tabla 19.** Puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en el clúster IRF3-4 – ISRE.

Secuencia:		G1	G2	T3	T4	T5	C6	T7	A8	T9	T10	T11	C12	T13	T14
IRF3-4	Residuo		Arg68	Arg68	Ser69	Arg73							Arg170	Ser166	Arg162
			Arg65	Arg65										Thr145	
Secuencia:		A15	A16	G17	A18	A19	A20	T21	A22	G23	A24	A25	A26	C27	C28
IRF3-4	Residuo	Ala147	Ala144	Trp141	Pro98	Leu4	Arg2	Lys74	Ile3	Arg73	Pro1				
				Glu172			Lys171	Arg99	Ala70		Trp44				
						Ile100				Thr48					
						Leu101									



Puente de hidrógeno

Interacción hidrofóbica

**Tabla 20.** Puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en el clúster IRF5-1 – ISRE.

Secuencia:		G1	G2	T3	T4	T5	C6	T7	A8	T9	T10	T11	C12	T13	T14	
IRF5-1	Residuo		Asp149		Arg93	Pro96	Gly150	Met95		Cys119	Gln120	Tyr98				
					Pro97	Pro122										Lys81
					Ser147											
Secuencia:		A15	A16	G17	A18	A19	A20	T21	A22	G23	A24	A25	A26	C27	C28	
IRF5-1	Residuo		Leu79	Arg86	Asn80	Lys101	Trp32					Asp94		Lys156	Asn152	
					Leu87	Tyr103	Arg76							Ala157	Thr153	
														Lys160	Glu167	



Puente de hidrógeno

Interacción hidrofóbica

**Tabla 21.** Puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en el clúster IRF7-8 – ISRE.

Secuencia:		G1	G2	T3	T4	T5	C6	T7	A8	T9	T10	T11	C12	T13	T14
IRF7-8	Residuo			Ser91	Leu3	Arg1	Trp53							Trp169	Ala170
				Arg94	Gly5	Phe4	Arg57							Arg173	Asn200
					Thr92		Cys87							Arg175	Phe201
					Arg93		Ala88								
Secuencia:		A15	A16	G17	A18	A19	A20	T21	A22	G23	A24	A25	A26	C27	C28
IRF7-8	Residuo	Cys203	Ser207	Ala195	Gly196	Lys198	Lys82		Arg90						
			Arg209		Arg206	Thr199	Thr83								



Puente de hidrógeno

Interacción hidrofóbica

**Tabla 22.** Puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en el clúster IRF8-10 – ISRE.

Secuencia:		G1	G2	T3	T4	T5	C6	T7	A8	T9	T10	T11	C12	T13	T14
IRF8-10	Residuo	Val54	Lys60	Lys56				Lys80			Cys182	Trp158	Arg107		
		Phe55									Ala183	Thr178	Leu108		
		Gly57										Arg179	Lys162		
		Phe59													
Secuencia:		A15	A16	G17	A18	A19	A20	T21	A22	G23	A24	A25	A26	C27	C28
IRF8-10	Residuo	Val160	Gly163					Lys86	Lys86			Trp52	Thr72		Leu2
		Phe161	Lys166									Arg7	Cys76		Thr69
												Ala77			

Puente de hidrógeno	Interacción hidrofóbica

**Tabla 23.** Puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en el clúster IRF9-10 – ISRE.

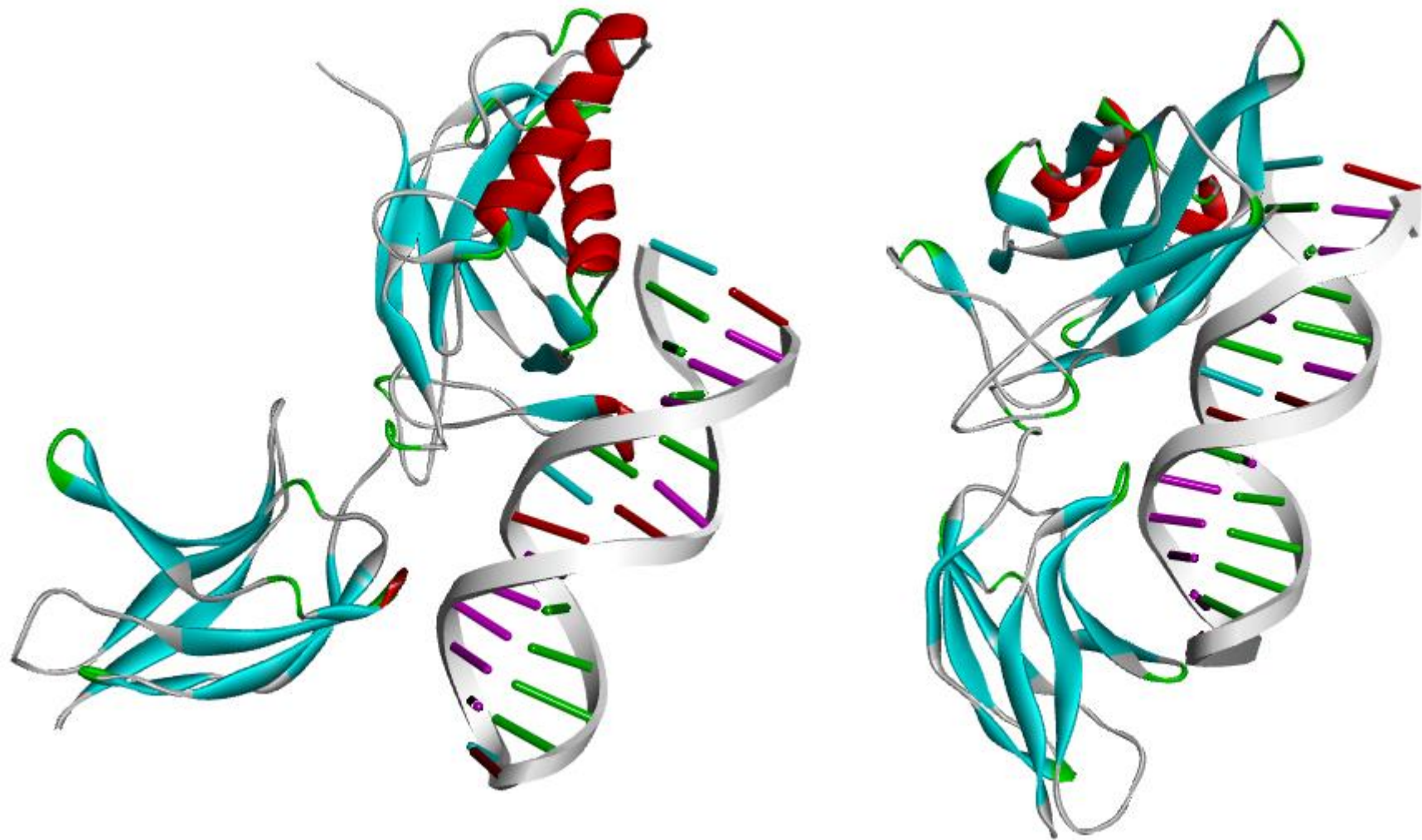
Secuencia:		G1	G2	T3	T4	T5	C6	T7	A8	T9	T10	T11	C12	T13	T14	
IRF9-10	Residuo		Cys182	Gln38	His140	Ala141		Lys37	Gly36		Ala35				Cys76	
			Pro173	Trp138		Ala174										Asn79
			Lys206	Lys177		Arg181										Lys80
				Arg181												
		Met199														
Secuencia:		A15	A16	G17	A18	A19	A20	T21	A22	G23	A24	A25	A26	C27	C28	
IRF9-10	Residuo			Trp32	Ala68		His34								Lys164	
				Lys71	Arg75		Gln144								Arg179	
					Met93											Cys182
					Lys100											Lys186



Puente de hidrógeno

Interacción hidrofóbica

*Acoplamiento NF- $\kappa$ B–sitio  $\kappa$ B alternativo*



**Fig. 18.** Acoplamientos resultantes entre NF- $\kappa$ B (subunidades p50 (izquierda) y p65 (derecha)) y el sitio  $\kappa$ B alternativo.

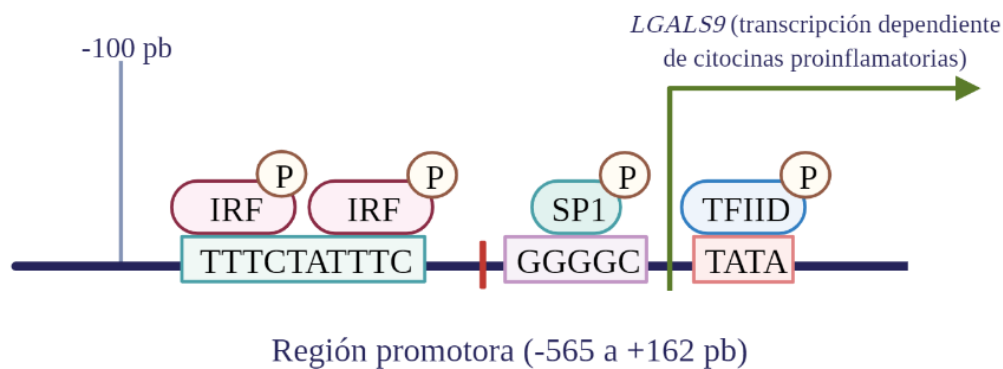
**Tabla 24.** Valores obtenidos de los acoplamientos entre subunidades p50 (B) y p65 (A) de NF- $\kappa$ B – sitio  $\kappa$ B alternativo (mejores resultados de cada clúster obtenido en HADDOCK).

Sub-unidad	HADDOCK Score	Cluster	Cluster size	RMSD from the overall lowest-energy structure	Van der Waals energy	Electrostatic energy	Desolvation energy	Restraints violation energy	Buried surface area	Z - score
p50 (Chain B)	-37.8 +/- 11.6	1	8	0.9 +/- 0.1	-49.1 +/- 5.7	-532.6 +/- 49.5	18.6 +/- 2.9	1748.0 +/- 168.2	2017.4 +/- 215.4	-1.4
p65 (Chain A)	-8.6 +/- 8.8	1	10	16.7 +/- 0.2	-92.9 +/- 7.6	-262.7 +/- 18.1	3.0 +/- 3.1	1338.3 +/- 86.1	2236.4 +/- 160.2	-2.1

Cabe destacar que, en el caso del acoplamiento de las subunidades p50 y p65 con el sitio  $\kappa$ B alternativo (Figura 18), no se obtuvieron conformaciones que reflejen la orientación de los sitios activos de las subunidades con respecto a la doble cadena de ADN, debido al tamaño del sistema atómico y a las limitaciones de las herramientas empleadas en la presente tesis. De hecho, en el acoplamiento de la subunidad p65, la cual contiene residuos importantes para la unión del factor de transcripción con la secuencia de ADN, presentó un valor de HADDOCK de -8.6 +/-8.8, uno de los más cercanos a cero (más bajos) obtenidos (Tabla 24). Esto puede deberse por la incapacidad de la actual interfaz del programa para identificar y especificar de manera precisa el sitio activo específico en estructuras de muchos átomos.

*Posibles vías de señalización involucradas en la expresión de LGALS9 en procesos inflamatorios*

Las citocinas proinflamatorias, pero no las antiinflamatorias, aumentan la expresión de Gal-9 (Steelman *et al.*, 2013) y se ha comprobado que la familia IRF participa en este aumento de la expresión (Alam *et al.*, 2011) (Figura 19). Se propone que el aumento de expresión mediado por citocinas proinflamatorias es específico para cada tipo celular, y depende también del tipo de proceso inflamatorio.



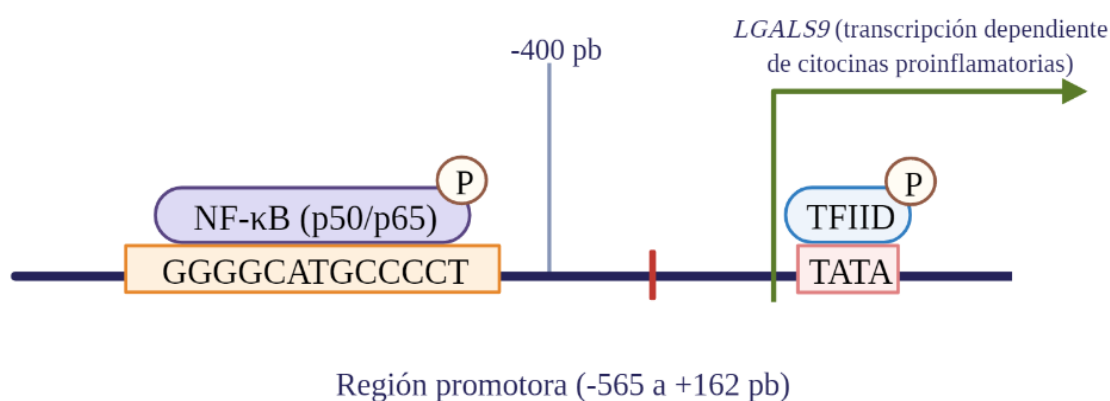
**Fig. 19.** Regulación propuesta para el promotor del gen *LGALS9* mediada por IRF.

En astrocitos, tras la estimulación con  $\text{TNF-}\alpha$ , Gal-9 es regulada positivamente por un mecanismo que es distinto del de la vía  $\text{IFN-}\gamma/\text{PI3K}/\text{IRF3}$  y requiere la activación de la vía  $\text{JNK}/\text{c-Jun}$  (Steelman *et al.*, 2013). De acuerdo con Aparicio, 2019, se ha comprobado por medio de métodos computacionales que el promotor del gen *LGALS9*, en efecto, presenta elementos de respuesta para la vía  $\text{JNK}/\text{c-Jun}$ . Por otro lado, se ha comprobado experimentalmente que la expresión de Gal-9 mediada por  $\text{TNF-}\alpha$  en los astrocitos depende de  $\text{TNFR1}$  y de la activación de  $\text{JNK}/\text{c-Jun}$ , por lo que se propone que  $\text{TNF-}\alpha$  aumenta la expresión de Gal-9 en procesos inflamatorios por medio de esta vía (Lensch *et al.*, 2006).

En el caso de Gal-1,  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$  aumentan su expresión al activar la vía  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ . El promotor del gen *LGALS1* presenta un sitio  $\kappa\text{B}$  que permite este aumento. De manera similar, se comprobó por medio de métodos computacionales la presencia de un sitio  $\kappa\text{B}$ , reportado como un sitio  $\kappa\text{B}$  alternativo, en la región promotora del gen *LGALS9*, que podría estar involucrado en el aumento de la expresión de Gal-9 en líneas celulares incubadas con  $\text{TNF-}$

$\alpha$  e IL-1 $\beta$ , de una manera similar a la reportada en el gen *LGALS1* por Toscano y colaboradores (Toscano *et al.*, 2011).

El factor de transcripción NF- $\kappa$ B, con respecto al cual se localizó un elemento de respuesta alternativo en la región promotora del gen *LGALS9*, podría estar involucrado en la inducción de Gal-9 característica de los procesos inflamatorios (Figura 20); debido a esto, se propone de manera teórica que la vía de señalización NF- $\kappa$ B podría estar relacionada con la expresión de Gal-9 mediada por citocinas como TNF- $\alpha$  e IL- $\beta$ , de la misma manera en la que se ve involucrada en la transcripción del gen *LGALS1*, si bien la secuencia reportada en LASAGNA-search 2.0 corresponde a un sitio  $\kappa$ B alternativo.



**Fig. 20.** Regulación propuesta para el promotor del gen *LGALS9* mediada por NF- $\kappa$ B

El factor de transcripción p53 induce la expresión de Gal-7 y está relacionado con la expresión de Gal-7 inducida en células de cáncer de mama (St-Pierre, 2021); esta expresión está correlacionada con una mayor actividad de NF- $\kappa$ B y es inhibida por inhibidores de NF- $\kappa$ B, lo que indica que la capacidad de p53 para inducir Gal-7 depende de la actividad de NF- $\kappa$ B (Campion *et al.*, 2013). La región promotora del gen *LGALS9* presenta un elemento de respuesta para p53 (secuencia AAGCATGC (el-Deiry *et al.*, 1992) en la posición de -325 a -318 pb obtenida empleando matrices de TRANSFAC), por lo que es probable que p53 induzca la expresión de Gal-9 en eventos inflamatorios de la misma índole, coregulando, en conjunto con NF- $\kappa$ B, respuestas proinflamatorias (Lowe *et al.*, 2014), o por medio de diafonía con NF- $\kappa$ B, pues se ha reportado que la expresión génica dirigida por NF- $\kappa$ B inducida por TNF- $\alpha$  se basa en p53, por lo que este factor de transcripción es necesario para

la expresión génica mediada por NF- $\kappa$ B inducida por estímulos atípicos y clásicos (Schneider *et al.*, 2010).

## CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron complejos proteína–ADN estables, los cuales presentaron energías de afinidad altas y puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en cada una de las secuencias núcleo TTTC (GAAA) de las dos que conforman la secuencia ISRE. Se propone que el sitio ISRE localizado en la posición de -42 a -33 pb, en la región promotora de 727 pb del gen *LGALS9* está relacionado con el aumento de la expresión del gen *LGALS9* inducida por interferones, y que los factores de transcripción IRF1/3/5/7/8/9, y notablemente IRF9 e IRF3, están involucrados en ese aumento de expresión al promover la transcripción del gen, lo cual se deberá corroborar experimentalmente en un futuro.

2. Se localizó por medio de métodos computacionales, un elemento de respuesta no canónico para NF- $\kappa$ B en la posición de -452 a -438 pb en la región promotora del gen *LGALS9*, pero no se logró obtener una conformación que representara el modo de unión entre las subunidades p50 y p65 y la secuencia de ADN. Esto se debe al tamaño del sistema atómico analizado, la carencia de una interfaz en el programa que permita la delimitación exacta del sitio activo de la subunidad, y a parámetros energéticos inadecuados para un sistema atómico grande (considerando que se tomaron en cuenta los parámetros energéticos por defecto de la interfaz *easy* de HADDOCK). Esto no indica que NF- $\kappa$ B no esté involucrado en la regulación transcripcional del gen *LGALS9*, puesto que este presenta un sitio  $\kappa$ B en su región promotora de 727 pb. Como nota al margen, el complejo p50/p65/ADN ya ha sido dilucidado por medio de métodos experimentales (algunos de ejemplos de esto son las entradas en PDB con códigos de identificación 1LE9 (*Mus musculus*), 1NFK (*Mus musculus*) y 2O61 (*Homo sapiens*)).

3. Tomando en cuenta la relación entre el factor de transcripción NF- $\kappa$ B y los procesos inflamatorios en los que Gal-9 se ve involucrada, se propone que la vía de señalización podría estar relacionada con la expresión de Gal-9 mediada por citocinas como TNF- $\alpha$  e IL- $\beta$ , siendo estas los ligandos que activan la cascada de señalización canónica que regula la expresión de genes que presentan un sitio  $\kappa$ B.

## **PERSPECTIVAS**

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis se propone corroborar de manera experimental la importancia del sitio ISRE presente la región promotora de 727 pb del gen *LGALS9* por medio de cultivos celulares, incubaciones con diferentes tipos de IFN, transfecciones de la secuencia ISRE y mutaciones sitio-dirigidas en esta secuencia. Sería interesante comprobar también el efecto de los IFN de tipo III en la expresión de Gal-9, pues las vías de señalización que regulan reflejan una notoria similitud con las vías de señalización reguladas por IFN de tipo I.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Aggarwal, B. B., Gupta, S. C., & Kim, J. H. (2012). Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*, 119(3), 651–665. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-325225>
2. Aggarwal, B. B., Shishodia, S., Sandur, S. K., Pandey, M. K., & Sethi, G. (2006). Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochemical pharmacology*, 72(11), 1605–1621. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.06.029>
3. Alam, S., Li, H., Margariti, A., Martin, D., Zampetaki, A., Habi, O., Cockerill, G., Hu, Y., Xu, Q., & Zeng, L. (2011). Galectin-9 protein expression in endothelial cells is positively regulated by histone deacetylase 3. *The Journal of biological chemistry*, 286(51), 44211–44217. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.242289>
4. André, I., Bradley, P., Wang, C., & Baker, D. (2007). Prediction of the structure of symmetrical protein assemblies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(45), 17656–17661. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702626104>
5. Antonczyk, A., Krist, B., Sajek, M., Michalska, A., Piaszyk-Borychowska, A., Plens-Galaska, M., Wesoly, J., & Bluysen, H. (2019). Direct Inhibition of IRF-Dependent Transcriptional Regulatory Mechanisms Associated With Disease. *Frontiers in immunology*, 10, 1176. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01176>
6. Aparicio Flores, J. (2019). Identificación, caracterización y evaluación de la actividad del promotor del gen LGALS9 (Tesis de maestría). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.
7. Asakura, H., Kashio, Y., Nakamura, K., Seki, M., Dai, S., Shirato, Y., Abedin, M. J., Yoshida, N., Nishi, N., Imaizumi, T., Saita, N., Toyama, Y., Takashima, H., Nakamura, T., Ohkawa, M., & Hirashima, M. (2002). Selective eosinophil adhesion to fibroblast via IFN-gamma-induced galectin-9. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 169(10), 5912–5918. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.10.5912>
8. Auron, P. E., Webb, A. C., Rosenwasser, L. J., Mucci, S. F., Rich, A., Wolff, S. M., & Dinarello, C. A. (1984). Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(24), 7907–7911. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.24.7907>

9. Ayona, D., Fournier, P. E., Henrissat, B., & Desnues, B. (2020). Utilization of Galectins by Pathogens for Infection. *Frontiers in immunology*, 11, 1877. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01877>
10. Bacigalupo, M. L., Manzi, M., Rabinovich, G. A., & Troncoso, M. F. (2013). Hierarchical and selective roles of galectins in hepatocarcinogenesis, liver fibrosis and inflammation of hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology*, 19(47), 8831–8849. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i47.8831>
11. Balkwill F. (2009). Tumour necrosis factor and cancer. *Nature reviews. Cancer*, 9(5), 361–371. <https://doi.org/10.1038/nrc2628>
12. Barjon, C., Niki, T., V erillaud, B., Opolon, P., Bedossa, P., Hirashima, M., Blanchin, S., Wassef, M., Rosen, H. R., Jimenez, A. S., Wei, M., & Busson, P. (2012). A novel monoclonal antibody for detection of galectin-9 in tissue sections: application to human tissues infected by oncogenic viruses. *Infectious agents and cancer*, 7(1), 16. <https://doi.org/10.1186/1750-9378-7-16>
13. Barnes, B. J., Field, A. E., & Pitha-Rowe, P. M. (2003). Virus-induced heterodimer formation between IRF-5 and IRF-7 modulates assembly of the IFNA enhanceosome in vivo and transcriptional activity of IFNA genes. *The Journal of biological chemistry*, 278(19), 16630–16641. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212609200>
14. Barnes, B. J., Richards, J., Mancl, M., Hanash, S., Beretta, L., & Pitha, P. M. (2004). Global and distinct targets of IRF-5 and IRF-7 during innate response to viral infection. *The Journal of biological chemistry*, 279(43), 45194–45207. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400726200>
15. Barondes, S. H., Castronovo, V., Cooper, D. N., Cummings, R. D., Drickamer, K., Feizi, T., Gitt, M. A., Hirabayashi, J., Hughes, C., & Kasai, K. (1994). Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell*, 76(4), 597–598. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90498-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90498-7)
16. Bauersachs, S., Ulbrich, S. E., Gross, K., Schmidt, S. E., Meyer, H. H., Wenigerkind, H., Vermehren, M., Sinowatz, F., Blum, H., & Wolf, E. (2006). Embryo-induced transcriptome changes in bovine endometrium reveal species-specific and common molecular markers of uterine receptivity. *Reproduction (Cambridge, England)*, 132(2), 319–331. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00996>

17. Benkert, P., Tosatto, S. C., & Schomburg, D. (2008). QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. *Proteins*, 71(1), 261–277. <https://doi.org/10.1002/prot.21715>
18. Berman, H. M. (1997). Crystal studies of B-DNA: The answers and the questions. *Biopolymers*, 44(1), 23–44. doi:10.1002/(sici)1097-0282(1997)44:1<23::aid-bip3>3.0.co;2-1
19. Beveridge, D. L., Cheatham, T. E., 3rd, & Mezei, M. (2012). The ABCs of molecular dynamics simulations on B-DNA, circa 2012. *Journal of biosciences*, 37(3), 379–397. <https://doi.org/10.1007/s12038-012-9222-6>
20. Bhardwaj, A., & Aggarwal, B. B. (2003). Receptor-mediated choreography of life and death. *Journal of clinical immunology*, 23(5), 317–332. <https://doi.org/10.1023/a:1025319031417>
21. Bi, S., Hong, P. W., Lee, B., & Baum, L. G. (2011). Galectin-9 binding to cell surface protein disulfide isomerase regulates the redox environment to enhance T-cell migration and HIV entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(26), 10650–10655. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017954108>
22. Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Gallo Cassarino, T., Bertoni, M., Bordoli, L., & Schwede, T. (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic acids research*, 42(Web Server issue), W252–W258. <https://doi.org/10.1093/nar/gku340>
23. Biron, C. A. (1999). Initial and innate responses to viral infections--pattern setting in immunity or disease. *Current Opinion in Microbiology*, 2(4), 374–381.
24. Blanco, J. C., Contursi, C., Salkowski, C. A., DeWitt, D. L., Ozato, K., & Vogel, S. N. (2000). Interferon regulatory factor (IRF)-1 and IRF-2 regulate interferon gamma-dependent cyclooxygenase 2 expression. *The Journal of experimental medicine*, 191(12), 2131–2144. <https://doi.org/10.1084/jem.191.12.2131>
25. Bonneau, R., & Baker, D. (2001). Ab initio protein structure prediction: progress and prospects. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 30, 173–189. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.30.1.173>
26. Bozorgmehr, N., Mashhour, S., Perez Rosero, E., Xu, L., Shahbaz, S., Sligl, W., Osman, M., Kutsogiannis, D. J., MacIntyre, E., O'Neil, C. R., & Elahi, S. (2021). Galectin-

9, a Player in Cytokine Release Syndrome and a Surrogate Diagnostic Biomarker in SARS-CoV-2 Infection. *mBio*, 12(3), e00384-21. <https://doi.org/10.1128/mBio.00384-21>

27. Burley, S. K., Berman, H. M., Bhikadiya, C., Bi, C., Chen, L., Di Costanzo, L., Christie, C., Dalenberg, K., Duarte, J. M., Dutta, S., Feng, Z., Ghosh, S., Goodsell, D. S., Green, R. K., Guranovic, V., Guzenko, D., Hudson, B. P., Kalro, T., Liang, Y., Lowe, R., ... Zardecki, C. (2019). RCSB Protein Data Bank: biological macromolecular structures enabling research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology and energy. *Nucleic acids research*, 47(D1), D464–D474. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1004>

28. Burman, J., & Svenningsson, A. (2016). Cerebrospinal fluid concentration of Galectin-9 is increased in secondary progressive multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*, 292, 40–44. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.01.008>

29. Brent, M. M., Anand, R., & Marmorstein, R. (2008). Structural basis for DNA recognition by FoxO1 and its regulation by posttranslational modification. *Structure (London, England: 1993)*, 16(9), 1407–1416. <https://doi.org/10.1016/j.str.2008.06.013>

30. Cannistrà, M., Ruggiero, M., Zullo, A., Gallelli, G., Serafini, S., Maria, M., Naso, A., Grande, R., Serra, R., & Nardo, B. (2016). Hepatic ischemia reperfusion injury: A systematic review of literature and the role of current drugs and biomarkers. *International journal of surgery (London, England)*, 33 Suppl 1, S57–S70. <https://doi.org/10.1016/j.ijisu.2016.05.050>

31. Champion, C. G., Labrie, M., Lavoie, G., & St-Pierre, Y. (2013). Expression of galectin-7 is induced in breast cancer cells by mutant p53. *PloS one*, 8(8), e72468. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072468>

32. Cavasotto, C. N., & Phatak, S. S. (2009). Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. *Drug discovery today*, 14(13-14), 676–683. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.04.006>

33. Chabot, S., Kashio, Y., Seki, M., Shirato, Y., Nakamura, K., Nishi, N., Nakamura, T., Matsumoto, R., Hirashima, M. (2002) Regulation of galectin-9 expression and release in Jurkat T cell line cells. *Glycobiology*. 12, 111-118.

34. Chagan-Yasutan, H., Ndhlovu, L. C., Lacuesta, T. L., Kubo, T., Leano, P. S., Niki, T., Oguma, S., Morita, K., Chew, G. M., Barbour, J. D., Telan, E. F., Hirashima, M., Hattori, T., & Dimaano, E. M. (2013). Galectin-9 plasma levels reflect adverse hematological and immunological features in acute dengue virus infection. *Journal of clinical virology: the*

official publication of the Pan American Society for Clinical Virology, 58(4), 635–640.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.10.022>

35. Chen, L., Glover, J. N., Hogan, P. G., Rao, A., & Harrison, S. C. (1998). Structure of the DNA-binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA. *Nature*, 392(6671), 42–48. <https://doi.org/10.1038/32100>

36. Chen, V. B., Arendall, W. B., 3rd, Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S., & Richardson, D. C. (2010). MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 66(Pt 1), 12–21. <https://doi.org/10.1107/S0907444909042073>

37. Cho, H. Y., Lee, S. W., Seo, S. K., Choi, I. W., Choi, I., & Lee, S. W. (2008). Interferon-sensitive response element (ISRE) is mainly responsible for IFN-alpha-induced upregulation of programmed death-1 (PD-1) in macrophages. *Biochimica et biophysica acta*, 1779(12), 811–819. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2008.08.003>

38. Choi, J., Kim, S. T., & Craft, J. (2012). The pathogenesis of systemic lupus erythematosus-an update. *Current opinion in immunology*, 24(6), 651–657. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.10.004>

39. Choi, Y., & Deane, C. M. (2010). FREAD revisited: Accurate loop structure prediction using a database search algorithm. *Proteins*, 78(6), 1431–1440. <https://doi.org/10.1002/prot.22658>

40. Choo, A., Palladinetti, P., Passioura, T., Shen, S., Lock, R., Symonds, G., & Dolnikov, A. (2006). The role of IRF1 and IRF2 transcription factors in leukaemogenesis. *Current gene therapy*, 6(5), 543–550. <https://doi.org/10.2174/156652306778520683>

41. Chou FC, Kuo CC, Wang YL, Lin MH, Linju Yen B, Chang DM and Sytwu HK 2013 Overexpression of galectin-9 in islets prolongs grafts survival via downregulation of Th1 responses. *Cell Transplant* 22 2135–2145

42. Clayton, K. L., Haaland, M. S., Douglas-Vail, M. B., Mujib, S., Chew, G. M., Ndhlovu, L. C., & Ostrowski, M. A. (2014). T cell Ig and mucin domain-containing protein 3 is recruited to the immune synapse, disrupts stable synapse formation, and associates with receptor phosphatases. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 192(2), 782–791. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302663>

43. Coulocheri, S. A., Pigis, D. G., Papavassiliou, K. A., & Papavassiliou, A. G. (2007). Hydrogen bonds in protein-DNA complexes: where geometry meets plasticity. *Biochimie*, 89(11), 1291–1303. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.07.020>
44. Csumita, M., Csermely, A., Horvath, A., Nagy, G., Monori, F., Göczi, L., Orbea, H. A., Reith, W., & Széles, L. (2020). Specific enhancer selection by IRF3, IRF5 and IRF9 is determined by ISRE half-sites, 5' and 3' flanking bases, collaborating transcription factors and the chromatin environment in a combinatorial fashion. *Nucleic acids research*, 48(2), 589–604. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1112>
45. Cummings, R. D., Liu, F. T. and Vasta, G. R. (2015). Galectins. In *Essentials of Glycobiology* (ed. A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, A. G. Darvill, T. Kinoshita, N. H. Packer, et al.), Chapter 33, pp. 469-480. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
46. de Kivit, S., Saeland, E., Kraneveld, A. D., van de Kant, H. J., Schouten, B., van Esch, B. C., Knol, J., Sprickelman, A. B., van der Aa, L. B., Knippels, L. M., Garssen, J., van Kooyk, Y., & Willemsen, L. E. (2012). Galectin-9 induced by dietary synbiotics is involved in suppression of allergic symptoms in mice and humans. *Allergy*, 67(3), 343–352. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02771.x>
47. De Vivo, M., Masetti, M., Bottegoni, G., & Cavalli, A. (2016). Role of Molecular Dynamics and Related Methods in Drug Discovery. *Journal of medicinal chemistry*, 59(9), 4035–4061. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01684>
48. Dinarello, C. A., Ikejima, T., Warner, S. J., Orencole, S. F., Lonnemann, G., Cannon, J. G., & Libby, P. (1987). Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 139(6), 1902–1910.
49. Dominguez, C., Boelens, R., & Bonvin, A. M. (2003). HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *Journal of the American Chemical Society*, 125(7), 1731–1737. <https://doi.org/10.1021/ja026939x>
50. Elahi, S., Niki, T., Hirashima, M., & Horton, H. (2012). Galectin-9 binding to Tim-3 renders activated human CD4+ T cells less susceptible to HIV-1 infection. *Blood*, 119(18), 4192–4204. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-389585>

51. el-Deiry, W. S., Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1992). Definition of a consensus binding site for p53. *Nature genetics*, 1(1), 45–49. <https://doi.org/10.1038/ng0492-45>
52. Elsliger, M.-A., & Wilson, I. A. (2012). 1.8 Structure Validation and Analysis. In E. H. Egelman (Ed.), *Comprehensive Biophysics* (pp. 116–135). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374920-8.00110-7>
53. Enninga, J., Levy, D. E., Blobel, G., & Fontoura, B. M. A. (2002). Role of nucleoporin induction in releasing an mRNA nuclear export block. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5559), 1523–1525. <https://doi.org/10.1126/science.1067861>
54. Eramian, D., Shen, M. Y., Devos, D., Melo, F., Sali, A., & Marti-Renom, M. A. (2006). A composite score for predicting errors in protein structure models. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 15(7), 1653–1666. <https://doi.org/10.1110/ps.062095806>
55. Escalante, C. R., Nistal-Villán, E., Shen, L., García-Sastre, A., & Aggarwal, A. K. (2007). Structure of IRF-3 bound to the PRDIII-I regulatory element of the human interferon-beta enhancer. *Molecular cell*, 26(5), 703–716. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.04.022>
56. Escalante, C. R., Yie, J., Thanos, D., & Aggarwal, A. K. (1998). Structure of IRF-1 with bound DNA reveals determinants of interferon regulation. *Nature*, 391(6662), 103–106. <https://doi.org/10.1038/34224>
57. Fenouillet, E., Barbouche, R., Courageot, J., & Miquelis, R. (2001). The catalytic activity of protein disulfide isomerase is involved in human immunodeficiency virus envelope-mediated membrane fusion after CD4 cell binding. *The Journal of infectious diseases*, 183(5), 744–752. <https://doi.org/10.1086/318823>
58. Fiser, A., & Sali, A. (2003). ModLoop: automated modeling of loops in protein structures. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 19(18), 2500–2501. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg362>
59. Foks, A. C., Ran, I. A., Wasserman, L., Frodermann, V., Ter Borg, M. N., de Jager, S. C., van Santbrink, P. J., Yagita, H., Akiba, H., Bot, I., Kuiper, J., & van Puijvelde, G. H. (2013). T-cell immunoglobulin and mucin domain 3 acts as a negative regulator of atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 33(11), 2558–2565. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301879>

60. Fornes, O., Garcia-Garcia, J., Bonet, J., & Oliva, B. (2014). On the use of knowledge-based potentials for the evaluation of models of protein-protein, protein-DNA, and protein-RNA interactions. *Advances in protein chemistry and structural biology*, 94, 77–120. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800168-4.00004-4>
61. Freeman, M. L., Sheridan, B. S., Bonneau, R. H., & Hendricks, R. L. (2007). Psychological stress compromises CD8<sup>+</sup> T cell control of latent herpes simplex virus type 1 infections. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 179(1), 322–328. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.1.322>
62. Fujii, Y., Shimizu, T., Kusumoto, M., Kyogoku, Y., Taniguchi, T., & Hakoshima, T. (1999). Crystal structure of an IRF-DNA complex reveals novel DNA recognition and cooperative binding to a tandem repeat of core sequences. *The EMBO journal*, 18(18), 5028–5041. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.18.5028>
63. Garvie, C. W., & Wolberger, C. (2001). Recognition of specific DNA sequences. *Molecular cell*, 8(5), 937–946. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00392-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00392-6)
64. Gaur, U., & Aggarwal, B. B. (2003). Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochemical pharmacology*, 66(8), 1403–1408. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(03\)00490-8](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(03)00490-8)
65. Gieseke, F., Kruchen, A., Tzaribachev, N., Bentzien, F., Dominici, M., & Müller, I. (2013). Proinflammatory stimuli induce galectin-9 in human mesenchymal stromal cells to suppress T-cell proliferation. *European journal of immunology*, 43(10), 2741–2749. <https://doi.org/10.1002/eji.201343335>
66. Glover, J. N., & Harrison, S. C. (1995). Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature*, 373(6511), 257–261. <https://doi.org/10.1038/373257a0>
67. Gooden, M. J., Wiersma, V. R., Samplonius, D. F., Gerssen, J., van Ginkel, R. J., Nijman, H. W., Hirashima, M., Niki, T., Eggleton, P., Helfrich, W., & Bremer, E. (2013). Galectin-9 activates and expands human T-helper 1 cells. *PloS one*, 8(5), e65616. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065616>
68. Guex, N., & Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18(15), 2714–2723. <https://doi.org/10.1002/elps.1150181505>

69. Haddad, Y., Adam, V., & Heger, Z. (2020). Ten quick tips for homology modeling of high-resolution protein 3D structures. *PLoS computational biology*, 16(4), e1007449. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007449>
70. Haddad, Y., Heger, Z., & Adam, V. (2016). Guidelines for Homology Modeling of Dopamine, Norepinephrine, and Serotonin Transporters. *ACS chemical neuroscience*, 7(11), 1607–1613. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.6b00242>
71. Hambleton, S., Salem, S., Bustamante, J., Bigley, V., Boisson-Dupuis, S., Azevedo, J., Fortin, A., Haniffa, M., Ceron-Gutierrez, L., Bacon, C.M., Menon, G., Trouillet, C., McDonald, D., Carey, P., Ginhoux, F., Alsina, L., Zumwalt, T.J., Kong, X.F., Kumararatne, D., Butler, K., Hubeau, M., Feinberg, J., Al-Muhsen, S., Cant, A., Abel, L., Chaussabel, D., Doffinger, R., Talesnik, E., Grumach, A., Duarte, A., Abarca, K., Moraes-Vasconcelos, D., Burk, D., Berghuis, A., Geissmann, F., Collin, M., Casanova, J.L., Gros, P. (2011). IRF8 mutations and human dendritic-cell immunodeficiency. *The New England journal of medicine*, 365(2), 127–138. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1100066>
72. Harwood, N. M., Golden-Mason, L., Cheng, L., Rosen, H. R., & Mengshol, J. A. (2016). HCV-infected cells and differentiation increase monocyte immunoregulatory galectin-9 production. *Journal of leukocyte biology*, 99(3), 495–503. <https://doi.org/10.1189/jlb.5A1214-582R>
73. Heusschen, R., Freitag, N., Tirado-González, I., Barrientos, G., Moschansky, P., Muñoz-Fernández, R., Leno-Durán, E., Klapp, B.F., Thijssen, V.L., Blois, S.M. (2013). Profiling LGALS9 splice variant expression at the fetal–maternal interface: implications in normal and pathological human pregnancy. *Biol. Reprod.*, 88, 1-10. 85 219.
74. Heusschen, R., Griffioen, A. W., & Thijssen, V. L. (2013). Galectin-9 in tumor biology: A jack of multiple trades. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1836(1), 177–185. <https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2013.04.006>
75. Hirabayashi, J., Hashidate, T., Arata, Y., Nishi, N., Nakamura, T., Hirashima, M., Urashima, T., Oka, T., Futai, M., Muller, W. E., Yagi, F., & Kasai, K. (2002). Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochimica et biophysica acta*, 1572(2-3), 232–254. [https://doi.org/10.1016/s0304-4165\(02\)00311-2](https://doi.org/10.1016/s0304-4165(02)00311-2)

76. Hirao, H., Uchida, Y., Kadono, K., Tanaka, H., Niki, T., Yamauchi, A., Hata, K., Watanabe, T., Terajima, H., & Uemoto, S. (2015). The protective function of galectin-9 in liver ischemia and reperfusion injury in mice. *Liver transplantation: official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*, 21(7), 969–981. <https://doi.org/10.1002/lt.24159>
77. Hirashima, M., Kashio, Y., Nishi, N., Yamauchi, A., Imaizumi, T. A., Kageshita, T., Saita, N., & Nakamura, T. (2002). Galectin-9 in physiological and pathological conditions. *Glycoconjugate journal*, 19(7-9), 593–600. <https://doi.org/10.1023/B:GLYC.0000014090.63206.2f>
78. Honda, K., & Taniguchi, T. (2006). IRF: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nature reviews. Immunology*, 6(9), 644–658. <https://doi.org/10.1038/nri1900>
79. Horiuchi, M., Hayashida, W., Akishita, M., Yamada, S., Lehtonen, J. Y., Tamura, K., Daviet, L., Chen, Y. E., Hamai, M., Cui, T. X., Iwai, M., & Minokoshi, Y. (2000). Interferon-gamma induces AT(2) receptor expression in fibroblasts by Jak/STAT pathway and interferon regulatory factor-1. *Circulation research*, 86(2), 233–240. <https://doi.org/10.1161/01.res.86.2.233>
80. Hsu, Y. L., Wang, M. Y., Ho, L. J., Huang, C. Y., & Lai, J. H. (2015). Up-regulation of galectin-9 induces cell migration in human dendritic cells infected with dengue virus. *Journal of cellular and molecular medicine*, 19(5), 1065–1076. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12500>
81. Hu, C. C., Jeng, W. J., Chen, Y. C., Fang, J. H., Huang, C. H., Teng, W., Hsieh, Y. C., Lin, Y. C., Chien, R. N., Sheen, I. S., & Lin, C. Y. (2017). Memory Regulatory T cells Increase Only In Inflammatory Phase of Chronic Hepatitis B Infection and Related to Galectin-9/Tim-3 interaction. *Scientific reports*, 7(1), 15280. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15527-x>
82. Hughes R. C. (2001). Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie*, 83(7), 667–676. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(01\)01289-5](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(01)01289-5)
83. Hume, M. A., Barrera, L. A., Gisselbrecht, S. S., & Bulyk, M. L. (2015). UniPROBE, update 2015: new tools and content for the online database of protein-binding microarray

data on protein-DNA interactions. *Nucleic acids research*, 43(Database issue), D117–D122. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1045>

84. Igawa, K., Satoh, T., Hirashima, M., & Yokozeki, H. (2006). Regulatory mechanisms of galectin-9 and eotaxin-3 synthesis in epidermal keratinocytes: possible involvement of galectin-9 in dermal eosinophilia of Th1-polarized skin inflammation. *Allergy*, 61(12), 1385–1391. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2006.01130.x>

85. Imaizumi, T., Kumagai, M., Sasaki, N., Kurotaki, H., Mori, F., Seki, M., Nishi, N., Fujimoto, K., Tanji, K., Shibata, T., Tamo, W., Matsumiya, T., Yoshida, H., Cui, X. F., Takanashi, S., Hanada, K., Okumura, K., Yagihashi, S., Wakabayashi, K., Nakamura, T., ... Satoh, K. (2002). Interferon-gamma stimulates the expression of galectin-9 in cultured human endothelial cells. *Journal of leukocyte biology*, 72(3), 486–491.

86. Irie, A., Yamauchi, A., Kontani, K., Kihara, M., Liu, D., Shirato, Y., Seki, M., Nishi, N., Nakamura, T., Yokomise, H., & Hirashima, M. (2005). Galectin-9 as a prognostic factor with antimetastatic potential in breast cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 11(8), 2962–2968. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0861>

87. Johannes, L., Jacob, R., & Leffler, H. (2018). Galectins at a glance. *Journal of cell science*, 131(9), jcs208884. <https://doi.org/10.1242/jcs.208884>

88. John, S., & Mishra, R. (2016). Galectin-9: From cell biology to complex disease dynamics. *Journal of Biosciences*, 41(3), 507–534. doi:10.1007/s12038-016-9616-y

89. Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuk, Y., McGinnis, S., & Madden, T. L. (2008). NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic acids research*, 36(Web Server issue), W5–W9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn201>

90. Juven-Gershon, T., Hsu, J.-Y., Theisen, J. W., & Kadonaga, J. T. (2008). The RNA polymerase II core promoter - the gateway to transcription. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(3), 253–259. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.03.003>

91. Jorgensen, W. L., Maxwell, D. S., & Tirado-Rives, J. (1996). Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *Journal of the American Chemical Society*, 118(45), 11225–11236. doi:10.1021/ja9621760

92. Kageshita, T., Kashio, Y., Yamauchi, A., Seki, M., Abedin, M. J., Nishi, N., Shoji, H., Nakamura, T., Ono, T., & Hirashima, M. (2002). Possible role of galectin-9 in cell aggregation and apoptosis of human melanoma cell lines and its clinical significance. *International journal of cancer*, 99(6), 809–816. <https://doi.org/10.1002/ijc.10436>
93. Kane, M., Zang, T. M., Rihn, S. J., Zhang, F., Kueck, T., Alim, M., Schoggins, J., Rice, C. M., Wilson, S. J., & Bieniasz, P. D. (2016). Identification of Interferon-Stimulated Genes with Antiretroviral Activity. *Cell host & microbe*, 20(3), 392–405. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.08.005>
94. Kanzaki, M., Wada, J., Sugiyama, K., Nakatsuka, A., Teshigawara, S., Murakami, K., Inoue, K., Terami, T., Katayama, A., Eguchi, J., Akiba, H., Yagita, H., & Makino, H. (2012). Galectin-9 and T cell immunoglobulin mucin-3 pathway is a therapeutic target for type 1 diabetes. *Endocrinology*, 153(2), 612–620. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1579>
95. Karami, Y., Guyon, F., De Vries, S., & Tufféry, P. (2018). DaReUS-Loop: accurate loop modeling using fragments from remote or unrelated proteins. *Scientific reports*, 8(1), 13673. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32079-w>
96. Kared, H., Fabre, T., Bédard, N., Bruneau, J., & Shoukry, N. H. (2013). Galectin-9 and IL-21 mediate cross-regulation between Th17 and Treg cells during acute hepatitis C. *PLoS pathogens*, 9(6), e1003422. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003422>
97. Kasamatsu, A., Uzawa, K., Nakashima, D., Koike, H., Shiiba, M., Bukawa, H., Yokoe, H., & Tanzawa, H. (2005). Galectin-9 as a regulator of cellular adhesion in human oral squamous cell carcinoma cell lines. *International journal of molecular medicine*, 16(2), 269–273.
98. Kashio, Y., Nakamura, K., Abedin, M. J., Seki, M., Nishi, N., Yoshida, N., Nakamura, T., & Hirashima, M. (2003). Galectin-9 induces apoptosis through the calcium-calpain-caspase-1 pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 170(7), 3631–3636. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.7.3631>
99. Katoh, S., Ikeda, M., Shimizu, H., Mouri, K., Obase, Y., Kobashi, Y., Fukushima, K., Hirashima, M., & Oka, M. (2014). Increased levels of plasma galectin-9 in patients with influenza virus infection. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 232(4), 263–267. <https://doi.org/10.1620/tjem.232.263>

100. Katoh, S., Ishii, N., Nobumoto, A., Takeshita, K., Dai, S. Y., Shinonaga, R., Niki, T., Nishi, N., Tominaga, A., Yamauchi, A., & Hirashima, M. (2007). Galectin-9 inhibits CD44-hyaluronan interaction and suppresses a murine model of allergic asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 176(1), 27–35. <https://doi.org/10.1164/rccm.200608-1243OC>
101. Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols*, 10(6), 845–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>
102. Keryer-Bibens, C., Pioche-Durieu, C., Villemant, C., Souquère, S., Nishi, N., Hirashima, M., Middeldorp, J., & Busson, P. (2006). Exosomes released by EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells convey the viral latent membrane protein 1 and the immunomodulatory protein galectin 9. *BMC cancer*, 6, 283. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-283>
103. Khan, A., Fornes, O., Stigliani, A., Gheorghe, M., Castro-Mondragon, J. A., van der Lee, R., Bessy, A., Chèneby, J., Kulkarni, S. R., Tan, G., Baranasic, D., Arenillas, D. J., Sandelin, A., Vandepoele, K., Lenhard, B., Ballester, B., Wasserman, W. W., Parcy, F., & Mathelier, A. (2018). JASPAR 2018: update of the open-access database of transcription factor binding profiles and its web framework. *Nucleic acids research*, 46(D1), D260–D266. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1126>
104. Kikushige, Y., Miyamoto, T., Yuda, J., Jabbarzadeh-Tabrizi, S., Shima, T., Takayanagi, S., Niuro, H., Yurino, A., Miyawaki, K., Takenaka, K., Iwasaki, H., & Akashi, K. (2015). A TIM-3/Gal-9 Autocrine Stimulatory Loop Drives Self-Renewal of Human Myeloid Leukemia Stem Cells and Leukemic Progression. *Cell stem cell*, 17(3), 341–352. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.011>
105. Kim, D. E., Chivian, D., & Baker, D. (2004). Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic acids research*, 32(Web Server issue), W526–W531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh468>
106. Kim, S. N., Lee, H. J., Jeon, M. S., Yi, T., & Song, S. U. (2015). Galectin-9 is Involved in Immunosuppression Mediated by Human Bone Marrow-derived Clonal Mesenchymal Stem Cells. *Immune network*, 15(5), 241–251. <https://doi.org/10.4110/in.2015.15.5.241>

107. Kissil, J. L., & Kimchi, A. (1998). Death-associated proteins: from gene identification to the analysis of their apoptotic and tumour suppressive functions. *Molecular Medicine Today*, 4(6), 268–274.
108. Klibi, J., Niki, T., Riedel, A., Pioche-Durieu, C., Souquere, S., Rubinstein, E., Le Moulec, S., Guigay, J., Hirashima, M., Guemira, F., Adhikary, D., Mautner, J., & Busson, P. (2009). Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells. *Blood*, 113(9), 1957–1966. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-142596>
109. Kobayashi, K., Morishita, A., Iwama, H., Fujita, K., Okura, R., Fujihara, S., Yamashita, T., Fujimori, T., Kato, K., Kamada, H., Niki, T., Hirashima, M., Okano, K., Suzuki, Y., & Masaki, T. (2015). Galectin-9 suppresses cholangiocarcinoma cell proliferation by inducing apoptosis but not cell cycle arrest. *Oncology reports*, 34(4), 1761–1770. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4197>
110. Kufareva, I., & Abagyan, R. (2012). Methods of protein structure comparison. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 857, 231–257. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-588-6\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-588-6_10)
111. Kunsch, C., Ruben, S. M., & Rosen, C. A. (1992). Selection of optimal kappa B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF-kappa B with DNA is required for transcriptional activation. *Molecular and cellular biology*, 12(10), 4412–4421. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.10.4412-4421.1992>
112. Kuroda, J., Yamamoto, M., Nagoshi, H., Kobayashi, T., Sasaki, N., Shimura, Y., Horiike, S., Kimura, S., Yamauchi, A., Hirashima, M., & Taniwaki, M. (2010). Targeting activating transcription factor 3 by Galectin-9 induces apoptosis and overcomes various types of treatment resistance in chronic myelogenous leukemia. *Molecular cancer research: MCR*, 8(7), 994–1001. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0040>
113. Kurose, Y., Wada, J., Kanzaki, M., Teshigawara, S., Nakatsuka, A., Murakami, K., Inoue, K., Terami, T., Katayama, A., Watanabe, M., Higuchi, C., Eguchi, J., Miyatake, N., & Makino, H. (2013). Serum galectin-9 levels are elevated in the patients with type 2 diabetes and chronic kidney disease. *BMC nephrology*, 14, 23. <https://doi.org/10.1186/1471-2369-14-23>

114. Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26(2), 283–291. <https://doi.org/https://doi.org/10.1107/S0021889892009944>
115. Laskowski, R. A., & Swindells, M. B. (2011). LigPlot+: Multiple Ligand–Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 51(10), 2778–2786. doi:10.1021/ci200227u
116. Leal-Pinto, E., Tao, W., Rappaport, J., Richardson, M., Knorr, B. A., & Abramson, R. G. (1997). Molecular cloning and functional reconstitution of a urate transporter/channel. *The Journal of biological chemistry*, 272(1), 617–625. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.1.617>
117. Leaman, D. W., Chawla-Sarkar, M., Jacobs, B., Vyas, K., Sun, Y., Ozdemir, A., Yi, T., Williams, B. R., & Borden, E. C. (2003). Novel growth and death related interferon-stimulated genes (ISGs) in melanoma: greater potency of IFN-beta compared with IFN-alpha2. *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 23(12), 745–756. <https://doi.org/10.1089/107999003772084860>
118. Leber, M. F., & Efferth, T. (2009). Molecular principles of cancer invasion and metastasis (review). *International journal of oncology*, 34(4), 881–895. [https://doi.org/10.3892/ijo\\_00000214](https://doi.org/10.3892/ijo_00000214)
119. Lee, C., & Huang, C.-H. (2014). LASAGNA-Search 2.0: integrated transcription factor binding site search and visualization in a browser. *Bioinformatics*, 30(13), 1923–1925. doi:10.1093/bioinformatics/btu115
120. Lee, H. L., Jang, J. W., Lee, S. W., Yoo, S. H., Kwon, J. H., Nam, S. W., Bae, S. H., Choi, J. Y., Han, N. I., & Yoon, S. K. (2019). Inflammatory cytokines and change of Th1/Th2 balance as prognostic indicators for hepatocellular carcinoma in patients treated with transarterial chemoembolization. *Scientific reports*, 9(1), 3260. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40078-8>
121. Leffler, H., Carlsson, S., Hedlund, M., Qian, Y., & Poirier, F. (2002). Introduction to galectins. *Glycoconjugate Journal*, 19(7–9), 433–440. <https://doi.org/10.1023/B:GLYC.0000014072.34840.04>

122. Lensch, M., Lohr, M., Russwurm, R., Vidal, M., Kaltner, H., André, S., & Gabius, H. J. (2006). Unique sequence and expression profiles of rat galectins-5 and -9 as a result of species-specific gene divergence. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38(10), 1741–1758. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.04.004>
123. Li, H., Wu, K., Tao, K., Chen, L., Zheng, Q., Lu, X., Liu, J., Shi, L., Liu, C., Wang, G., & Zou, W. (2012). Tim-3/galectin-9 signaling pathway mediates T-cell dysfunction and predicts poor prognosis in patients with hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 56(4), 1342–1351. <https://doi.org/10.1002/hep.25777>
124. Li, Q., Tang, L., Roberts, P. C., Kraniak, J. M., Fridman, A. L., Kulaeva, O. I., Tehrani, O. S., & Tainsky, M. A. (2008). Interferon regulatory factors IRF5 and IRF7 inhibit growth and induce senescence in immortal Li-Fraumeni fibroblasts. *Molecular cancer research: MCR*, 6(5), 770–784. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-0114>
125. Li, S., Olson, W. K., & Lu, X.-J. (2019). Web 3DNA 2.0 for the analysis, visualization, and modeling of 3D nucleic acid structures. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W26–W34. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz394>
126. Liang, M., Ueno, M., Oomizu, S., Arikawa, T., Shinonaga, R., Zhang, S., Yamauchi, A., & Hirashima, M. (2008). Galectin-9 expression links to malignant potential of cervical squamous cell carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 134(8), 899–907. <https://doi.org/10.1007/s00432-008-0352-z>
127. Liang, S., Zhang, C., Sarmiento, J., & Standley, D. M. (2012). Protein Loop Modeling with Optimized Backbone Potential Functions. *Journal of chemical theory and computation*, 8(5), 1820–1827. <https://doi.org/10.1021/ct300131p>
128. Liberal, R., Grant, C. R., Holder, B. S., Ma, Y., Mieli-Vergani, G., Vergani, D., & Longhi, M. S. (2012). The impaired immune regulation of autoimmune hepatitis is linked to a defective galectin-9/tim-3 pathway. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 56(2), 677–686. <https://doi.org/10.1002/hep.25682>
129. Lindstedt, R., Apodaca, G., Barondes, S. H., Mostov, K. E., & Leffler, H. (1993). Apical secretion of a cytosolic protein by Madin-Darby canine kidney cells. Evidence for polarized release of an endogenous lectin by a nonclassical secretory pathway. *The Journal of biological chemistry*, 268(16), 11750–11757.

130. Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C. (2017). NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal transduction and targeted therapy*, 2, 17023–. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
131. Lopez-Castejon, G., & Brough, D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. *Cytokine & growth factor reviews*, 22(4), 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.10.001>
132. Lowe, J. M., Menendez, D., Bushel, P. R., Shatz, M., Kirk, E. L., Troester, M. A., Garantziotis, S., Fessler, M. B., & Resnick, M. A. (2014). p53 and NF- $\kappa$ B coregulate proinflammatory gene responses in human macrophages. *Cancer research*, 74(8), 2182–2192. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1070>
133. Lu, X., McCoy, K. S., Xu, J., Hu, W., Chen, H., Jiang, K., Han, F., Chen, P., & Wang, Y. (2015). Galectin-9 ameliorates respiratory syncytial virus-induced pulmonary immunopathology through regulating the balance between Th17 and regulatory T cells. *Virus research*, 195, 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.10.011>
134. Lukasiak, P., Antczak, M., Ratajczak, T., & Blazewicz, J. (2015). SphereGrinder - reference structure-based tool for quality assessment of protein structural models. <https://doi.org/10.1109/BIBM.2015.7359765>
135. Lyskov, S., Chou, F. C., Conchúir, S. Ó., Der, B. S., Drew, K., Kuroda, D., Xu, J., Weitzner, B. D., Renfrew, P. D., Sripakdeevong, P., Borgo, B., Havranek, J. J., Kuhlman, B., Kortemme, T., Bonneau, R., Gray, J. J., & Das, R. (2013). Serverification of molecular modeling applications: the Rosetta Online Server that Includes Everyone (ROSIE). *PloS one*, 8(5), e63906. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063906>
136. Ma, C. J., Li, G. Y., Cheng, Y. Q., Wang, J. M., Ying, R. S., Shi, L., Wu, X. Y., Niki, T., Hirashima, M., Li, C. F., Moorman, J. P., & Yao, Z. Q. (2013). Cis association of galectin-9 with Tim-3 differentially regulates IL-12/IL-23 expressions in monocytes via TLR signaling. *PloS one*, 8(8), e72488. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072488>
137. Mamane, Y., Heylbroeck, C., Génin, P., Algarté, M., Servant, M. J., LePage, C., DeLuca, C., Kwon, H., Lin, R., & Hiscott, J. (1999). Interferon regulatory factors: the next generation. *Gene*, 237(1), 1–14. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(99\)00262-0](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(99)00262-0).
138. Mariani, V., Biasini, M., Barbato, A., & Schwede, T. (2013). IDDT: a local superposition-free score for comparing protein structures and models using distance

difference tests. *Bioinformatics* (Oxford, England), 29(21), 2722–2728. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt47>

139. Martin, T., Ye, L., AJ, S., Lane, J., & Jiang, W. (2013). *Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular perspective* (pp. 135–168).

140. Maston, G. A., Evans, S. K., & Green, M. R. (2006). Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annual review of genomics and human genetics*, 7, 29–59. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.7.080505.115623>

141. Matsumoto, R., Matsumoto, H., Seki, M., Hata, M., Asano, Y., Kanegasaki, S., Stevens, R. L., & Hirashima, M. (1998). Human ecalectin, a variant of human galectin-9, is a novel eosinophil chemoattractant produced by T lymphocytes. *The Journal of biological chemistry*, 273(27), 16976–16984. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.27.16976>

142. Matsuura, A., Tsukada, J., Mizobe, T., Higashi, T., Mouri, F., Tanikawa, R., Yamauchi, A., Hirashima, M., & Tanaka, Y. (2009). Intracellular galectin-9 activates inflammatory cytokines in monocytes. *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms*, 14(4), 511–521. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2009.01287.x>

143. Matys, V., Kel-Margoulis, O. V., Fricke, E., Liebich, I., Land, S., Barre-Dirrie, A., Reuter, I., Chekmenev, D., Krull, M., Hornischer, K., Voss, N., Stegmaier, P., Lewicki-Potapov, B., Saxel, H., Kel, A. E., & Wingender, E. (2006). TRANSFAC and its module TRANSCompel: transcriptional gene regulation in eukaryotes. *Nucleic acids research*, 34(Database issue), D108–D110. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj143>

144. McSharry, B. P., Forbes, S. K., Cao, J. Z., Avdic, S., Machala, E. A., Gottlieb, D. J., Abendroth, A., & Slobedman, B. (2014). Human cytomegalovirus upregulates expression of the lectin galectin 9 via induction of beta interferon. *Journal of virology*, 88(18), 10990–10994. <https://doi.org/10.1128/JVI.01259-14>

145. Mengshol, J. A., Golden-Mason, L., Arikawa, T., Smith, M., Niki, T., McWilliams, R., Randall, J. A., McMahan, R., Zimmerman, M. A., Rangachari, M., Dobrinskikh, E., Busson, P., Polyak, S. J., Hirashima, M., & Rosen, H. R. (2010). A crucial role for Kupffer cell-derived galectin-9 in regulation of T cell immunity in hepatitis C infection. *PloS one*, 5(3), e9504. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009504>

146. Michalska, A., Blaszczyk, K., Wesoly, J., & Bluysen, H. (2018). A Positive Feedback Amplifier Circuit That Regulates Interferon (IFN)-Stimulated Gene Expression

and Controls Type I and Type II IFN Responses. *Frontiers in immunology*, 9, 1135. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.011135>

147. Mishra, R., Grzybek, M., Niki, T., Hirashima, M., & Simons, K. (2010). Galectin-9 trafficking regulates apical-basal polarity in Madin–Darby canine kidney epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(41), 17633 LP-17638. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012424107>

148. Morishita, A., Nomura, K., Tani, J., Fujita, K., Iwama, H., Takuma, K., Nakahara, M., Tadokoro, T., Oura, K., Chiyo, T., Fujihara, S., Niki, T., Hirashima, M., Nishiyama, A., Himoto, T., & Masaki, T. (2021). Galectin 9 suppresses the tumor growth of colon cancer in vitro and in vivo. *Oncology reports*, 45(6), 105. <https://doi.org/10.3892/or.2021.8056>

149. Moritoki, M., Kadowaki, T., Niki, T., Nakano, D., Soma, G., Mori, H., Kobara, H., Masaki, T., Kohno, M., & Hirashima, M. (2013). Galectin-9 ameliorates clinical severity of MRL/lpr lupus-prone mice by inducing plasma cell apoptosis independently of Tim-3. *PloS one*, 8(4), e60807. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060807>

150. Munitz, A., & Levi-Schaffer, F. (2004). Eosinophils: 'new' roles for 'old' cells. *Allergy*, 59(3), 268–275. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2003.00442.x>

151. Nagahara, K., Arikawa, T., Oomizu, S., Kontani, K., Nobumoto, A., Tateno, H., Watanabe, K., Niki, T., Katoh, S., Miyake, M., Nagahata, S., Hirabayashi, J., Kuchroo, V. K., Yamauchi, A., & Hirashima, M. (2008). Galectin-9 increases Tim-3<sup>+</sup> dendritic cells and CD8<sup>+</sup> T cells and enhances antitumor immunity via galectin-9-Tim-3 interactions. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 181(11), 7660–7669. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.11.7660>

152. Nakajima, R., Miyagaki, T., Oka, T., Nakao, M., Kawaguchi, M., Suga, H., Morimura, S., Kai, H., Asano, Y., Tada, Y., Kadono, T., Sato, S., & Sugaya, M. (2015). Elevated serum galectin-9 levels in patients with atopic dermatitis. *The Journal of dermatology*, 42(7), 723–726. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.12884>

153. Nayeem, A., Sitkoff, D., & Krystek, S., Jr (2006). A comparative study of available software for high-accuracy homology modeling: from sequence alignments to structural models. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 15(4), 808–824. <https://doi.org/10.1110/ps.051892906>

154. Nebbia, G., Peppia, D., Schurich, A., Khanna, P., Singh, H. D., Cheng, Y., Rosenberg, W., Dusheiko, G., Gilson, R., ChinAleong, J., Kennedy, P., & Maini, M. K. (2012). Upregulation of the Tim-3/galectin-9 pathway of T cell exhaustion in chronic hepatitis B virus infection. *PloS one*, 7(10), e47648. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047648>
155. Niki, T., Tsutsui, S., Hirose, S., Aradono, S., Sugimoto, Y., Takeshita, K., Nishi, N., & Hirashima, M. (2009). Galectin-9 is a high affinity IgE-binding lectin with anti-allergic effect by blocking IgE-antigen complex formation. *The Journal of biological chemistry*, 284(47), 32344–32352. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.035196>
156. Nobumoto, A., Nagahara, K., Oomizu, S., Katoh, S., Nishi, N., Takeshita, K., Niki, T., Tominaga, A., Yamauchi, A., & Hirashima, M. (2008). Galectin-9 suppresses tumor metastasis by blocking adhesion to endothelium and extracellular matrices. *Glycobiology*, 18(9), 735–744. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwn062>
157. Nyman, T. A., Matikainen, S., Sareneva, T., Julkunen, I., & Kalkkinen, N. (2000). Proteome analysis reveals ubiquitin-conjugating enzymes to be a new family of interferon-alpha-regulated genes. *European Journal of Biochemistry*, 267(13), 4011–4019. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01433.x>
158. O'Flanagan, R. A., Paillard, G., Lavery, R., & Sengupta, A. M. (2005). Non-additivity in protein-DNA binding. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 21(10), 2254–2263. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti361>
159. Ohtsubo, K., Takamatsu, S., Minowa, M. T., Yoshida, A., Takeuchi, M., & Marth, J. D. (2005). Dietary and genetic control of glucose transporter 2 glycosylation promotes insulin secretion in suppressing diabetes. *Cell*, 123(7), 1307–1321. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.041>
160. Opal, S. M., & DePalo, V. A. (2000). Anti-inflammatory cytokines. *Chest*, 117(4), 1162–1172. <https://doi.org/10.1378/chest.117.4.1162>
161. Pabo, C. O., & Nekludova, L. (2000). Geometric analysis and comparison of protein-DNA interfaces: why is there no simple code for recognition?. *Journal of molecular biology*, 301(3), 597–624. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3918>
162. Panne, D., Maniatis, T., & Harrison, S. C. (2004). Crystal structure of ATF-2/c-Jun and IRF-3 bound to the interferon-beta enhancer. *The EMBO journal*, 23(22), 4384–4393. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600453>

163. Panne, D., Maniatis, T., & Harrison, S. C. (2007). An atomic model of the interferon-beta enhanceosome. *Cell*, 129(6), 1111–1123. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.019>
164. Park, W. S., Jung, W. K., Park, S. K., Heo, K. W., Kang, M. S., Choi, Y. H., Kim, G. Y., Park, S. G., Seo, S. K., Yea, S. S., Liu, K. H., Shim, E. B., Kim, D. J., Her, M., & Choi, I. W. (2011). Expression of galectin-9 by IFN- $\gamma$  stimulated human nasal polyp fibroblasts through MAPK, PI3K, and JAK/STAT signaling pathways. *Biochemical and biophysical research communications*, 411(2), 259–264. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.06.110>
165. Pawlowski, M., Bogdanowicz, A., & Bujnicki, J. M. (2013). QA-RecombineIt: a server for quality assessment and recombination of protein models. *Nucleic acids research*, 41(Web Server issue), W389–W397. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt408>
166. Pearson W. R. (2016). Finding Protein and Nucleotide Similarities with FASTA. *Current protocols in bioinformatics*, 53, 3.9.1–3.9.25. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0309s53>
167. Pestka, S., Krause, C. D., & Walter, M. R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological Reviews*, 202(1), 8–32. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00204.x>
168. Pioche-Durieu, C., Keryer, C., Souquère, S., Bosq, J., Faigle, W., Loew, D., Hirashima, M., Nishi, N., Middeldorp, J., & Busson, P. (2005). In nasopharyngeal carcinoma cells, Epstein-Barr virus LMP1 interacts with galectin 9 in membrane raft elements resistant to simvastatin. *Journal of virology*, 79(21), 13326–13337. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.21.13326-13337.2005>
169. Platanitis, E., Demiroz, D., Schneller, A., Fischer, K., Capelle, C., Hartl, M., Gossenreiter, T., Müller, M., Novatchkova, M., & Decker, T. (2019). A molecular switch from STAT2-IRF9 to ISGF3 underlies interferon-induced gene transcription. *Nature communications*, 10(1), 2921. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10970-y>
170. Prieto-Martínez, F.D., Arciniega, M., & Medina-Franco, J. L. (2018). Molecular docking: current advances and challenges. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 21(Supl. 1), e20180143. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.143>
171. Qin, B. Y., Liu, C., Lam, S. S., Srinath, H., Delston, R., Correia, J. J., Derynck, R., & Lin, K. (2003). Crystal structure of IRF-3 reveals mechanism of autoinhibition and virus-

induced phosphoactivation. *Nature structural biology*, 10(11), 913–921.  
<https://doi.org/10.1038/nsb1002>

172. Rabinovich, G. A., Liu, F.-T., Hirashima, M., & Anderson, A. (2007). An Emerging Role for Galectins in Tuning the Immune Response: Lessons from Experimental Models of Inflammatory Disease, Autoimmunity and Cancer. *Scandinavian Journal of Immunology*, 66(2-3), 143–158. doi:10.1111/j.1365-3083.2007.01986.x

173. Reddy, P. B., Sehrawat, S., Suryawanshi, A., Rajasagi, N. K., Mulik, S., Hirashima, M., & Rouse, B. T. (2011). Influence of galectin-9/Tim-3 interaction on herpes simplex virus-1 latency. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 187(11), 5745–5755. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.11021054>

174. Remesh, S. G., Santosh, V., & Escalante, C. R. (2015). Structural Studies of IRF4 Reveal a Flexible Autoinhibitory Region and a Compact Linker Domain. *The Journal of biological chemistry*, 290(46), 27779–27790. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.678789>

175. Robinson, S. W., Afzal, A. M., & Leader, D. P. (2014). Bioinformatics: Concepts, Methods, and Data. *Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine*, 259–287. doi:10.1016/b978-0-12-386882-4.00013-x

176. Robledo, C., Robledo, C., Ruiz, J., Rodrigo, E., Val, F., & Arias, M. (2011). Glomerulonefritis rápidamente progresiva con coexistencia de anticuerpos antimembrana basal glomerular y anticitoplasma de neutrófilo. *Nefroplus*, 4(1), 44–49. <https://doi.org/10.3265/NefroPlus.pre2010.Dec.10378>

177. Roitberg, A., & Elber, R. (1991). Modeling side chains in peptides and proteins: Application of the locally enhanced sampling and the simulated annealing methods to find minimum energy conformations. *The Journal of Chemical Physics*, 95(12), 9277–9287. <https://doi.org/10.1063/1.461157>

178. Saita, N., Goto, E., Yamamoto, T., Cho, I., Tsumori, K., Kohrogi, H., Maruo, K., Ono, T., Takeya, M., Kashio, Y., Nakamura, K., & Hirashima, M. (2002). Association of galectin-9 with eosinophil apoptosis. *International archives of allergy and immunology*, 128(1), 42–50. <https://doi.org/10.1159/000058002>

179. Sanchez-Cuellar, S., de la Fuente, H., Cruz-Adalia, A., Lamana, A., Cibrian, D., Giron, R. M., Vara, A., Sanchez-Madrid, F., & Ancochea, J. (2012). Reduced expression of

galectin-1 and galectin-9 by leucocytes in asthma patients. *Clinical and experimental immunology*, 170(3), 365–374. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2012.04665.x>

180. Sarai, A., & Kono, H. (2005). Protein-DNA recognition patterns and predictions. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 34, 379–398. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.34.040204.144537>

181. Sato, M., Nishi, N., Shoji, H., Seki, M., Hashidate, T., Hirabayashi, J., Kasai, K., Hata, Y., Suzuki, S., Hirashima, M., Nakamura, T. (2002). Functional analysis of the carbohydrate recognition domains and a linker peptide of galectin-9 as to eosinophil chemoattractant activity. *Glycobiology*. 12, 191-197

182. Savitsky, D., Tamura, T., Yanai, H., & Taniguchi, T. (2010). Regulation of immunity and oncogenesis by the IRF transcription factor family. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*, 59(4), 489–510. <https://doi.org/10.1007/s00262-009-0804-6>

183. Schaefer, B. C., Paulson, E., Strominger, J. L., & Speck, S. H. (1997). Constitutive activation of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1 gene transcription by IRF1 and IRF2 during restricted EBV latency. *Molecular and cellular biology*, 17(2), 873–886. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.2.873>

184. Schilling, E. M., Scherer, M., & Stamminger, T. (2021). Intrinsic Immune Mechanisms Restricting Human Cytomegalovirus Replication. *Viruses*, 13(2), 179. <https://doi.org/10.3390/v13020179>

185. Schlötzer-Schrehardt, U., André, S., Janko, C., Kaltner, H., Kopitz, J., Gabius, H. J., & Herrmann, M. (2012). Adhesion/growth-regulatory galectins in the human eye: localization profiles and tissue reactivities as a standard to detect disease-associated alterations. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 250(8), 1169–1180. <https://doi.org/10.1007/s00417-012-2021-9>

186. Schmid, S., Sachs, D., & tenOever, B. R. (2014). Mitogen-activated protein kinase-mediated licensing of interferon regulatory factor 3/7 reinforces the cell response to virus. *The Journal of biological chemistry*, 289(1), 299–311. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.519934>

187. Schneider, G., Henrich, A., Greiner, G., Wolf, V., Lovas, A., Wiczorek, M., Wagner, T., Reichardt, S., von Werder, A., Schmid, R. M., Weih, F., Heinzl, T., Saur, D., & Krämer,

- O. H. (2010). Cross talk between stimulated NF-kappaB and the tumor suppressor p53. *Oncogene*, 29(19), 2795–2806. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.46>
188. Seki, M., Sakata, K. M., Oomizu, S., Arikawa, T., Sakata, A., Ueno, M., Nobumoto, A., Niki, T., Saita, N., Ito, K., Dai, S. Y., Katoh, S., Nishi, N., Tsukano, M., Ishikawa, K., Yamauchi, A., Kuchroo, V., & Hirashima, M. (2007). Beneficial effect of galectin 9 on rheumatoid arthritis by induction of apoptosis of synovial fibroblasts. *Arthritis and rheumatism*, 56(12), 3968–3976. <https://doi.org/10.1002/art.23076>
189. Sharma, S., Sundararajan, A., Suryawanshi, A., Kumar, N., Veiga-Parga, T., Kuchroo, V. K., Thomas, P. G., Sangster, M. Y., & Rouse, B. T. (2011). T cell immunoglobulin and mucin protein-3 (Tim-3)/Galectin-9 interaction regulates influenza A virus-specific humoral and CD8 T-cell responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(47), 19001–19006. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107087108>
190. Shen, M. Y., & Sali, A. (2006). Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 15(11), 2507–2524. <https://doi.org/10.1110/ps.062416606>
191. Shimizu, Y., Kabir-Salmani, M., Azadbakht, M., Sugihara, K., Sakai, K., & Iwashita, M. (2008). Expression and localization of galectin-9 in the human uterodome. *Endocrine journal*, 55(5), 879–887. <https://doi.org/10.1507/endocrj.k08e-111>
192. Sievers, F., & Higgins, D. G. (2018). Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 27(1), 135–145. <https://doi.org/10.1002/pro.3290>
193. Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology*, 7, 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
194. Silverman R. (1997) Dependent RNase L: a regulated endoribonuclease in the interferon system. In: D'Alessio GRJ, editor. *Ribonucleases: Structure and Functions*. 1997. pp. 515–551.
195. Skariyachan, S., & Garka, S. (2018). Exploring the binding potential of carbon nanotubes and fullerene towards major drug targets of multidrug resistant bacterial pathogens

and their utility as novel therapeutic agents. *Fullerens, Graphenes and Nanotubes*, 1–29. doi:10.1016/b978-0-12-813691-1.00001-4

196. Song, Y., DiMaio, F., Wang, R. Y., Kim, D., Miles, C., Brunette, T., Thompson, J., & Baker, D. (2013). High-resolution comparative modeling with RosettaCM. *Structure* (London, England: 1993), 21(10), 1735–1742. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.08.005>

197. Spitzenberger, F., Graessler, J., & Schroeder, H. E. (2001). Molecular and functional characterization of galectin 9 mRNA isoforms in porcine and human cells and tissues. *Biochimie*, 83(9), 851–862. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(01\)01335-9](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(01)01335-9)

198. Spyraakis, F., Cozzini, P., Bertoli, C., Marabotti, A., Kellogg, G. E., & Mozzarelli, A. (2007). Energetics of the protein-DNA-water interaction. *BMC structural biology*, 7, 4. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-7-4>

199. Stancic, M., van Horssen, J., Thijssen, V. L., Gabius, H. J., van der Valk, P., Hoekstra, D., & Baron, W. (2011). Increased expression of distinct galectins in multiple sclerosis lesions. *Neuropathology and applied neurobiology*, 37(6), 654–671. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2011.01184.x>

200. Steelman, A. J., Smith, R., 3rd, Welsh, C. J., & Li, J. (2013). Galectin-9 protein is up-regulated in astrocytes by tumor necrosis factor and promotes encephalitogenic T-cell apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 288(33), 23776–23787. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.451658>

201. Stormo G. D. (2013). Modeling the specificity of protein-DNA interactions. *Quantitative biology* (Beijing, China), 1(2), 115–130. <https://doi.org/10.1007/s40484-013-0012-4>

202. St-Pierre Y. (2021). Towards a Better Understanding of the Relationships between Galectin-7, p53 and MMP-9 during Cancer Progression. *Biomolecules*, 11(6), 879. <https://doi.org/10.3390/biom11060879>

203. Strauss, G., Osen, W., & Debatin, K. M. (2002). Induction of apoptosis and modulation of activation and effector function in T cells by immunosuppressive drugs. *Clinical and experimental immunology*, 128(2), 255–266. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2002.01777.x>

204. Studer, G., Tauriello, G., Bienert, S., Waterhouse, A. M., Bertoni, M., Bordoli, L., Schwede, T., & Lepore, R. (2019). Modeling of Protein Tertiary and Quaternary Structures

- Based on Evolutionary Information. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1851, 301–316. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8736-8\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8736-8_17)
205. Studer, G., Rempfer, C., Waterhouse, A. M., Gumienny, R., Haas, J., & Schwede, T. (2020). QMEANDisCo-distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics* (Oxford, England), 36(6), 1765–1771. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz828>
206. Sundararaj, S., Seneviratne, S., Williams, S. J., Enders, A., & Casarotto, M. G. (2021). Structural determinants of the IRF4/DNA homodimeric complex. *Nucleic acids research*, 49(4), 2255–2265. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1287>
207. Sziksz, E., Vannay, A., & Haczku, A. (2012). Galectin-9: a suppressor of food allergy? *Allergy*, 67(3), 293–295. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02774.x>
208. Tadokoro, T., Morishita, A., Fujihara, S., Iwama, H., Niki, T., Fujita, K., Akashi, E., Mimura, S., Oura, K., Sakamoto, T., Nomura, T., Tani, J., Miyoshi, H., Yoneyama, H., Himoto, T., Hirashima, M., & Masaki, T. (2016). Galectin-9: An anticancer molecule for gallbladder carcinoma. *International journal of oncology*, 48(3), 1165–1174. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3347>
209. Tahirov, T. H., Sato, K., Ichikawa-Iwata, E., Sasaki, M., Inoue-Bungo, T., Shiina, M., Kimura, K., Takata, S., Fujikawa, A., Morii, H., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Ishii, S., & Ogata, K. (2002). Mechanism of c-Myb-C/EBP beta cooperation from separated sites on a promoter. *Cell*, 108(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00636-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00636-5)
210. Takahasi, K., Suzuki, N. N., Horiuchi, M., Mori, M., Suhara, W., Okabe, Y., Fukuhara, Y., Terasawa, H., Akira, S., Fujita, T., & Inagaki, F. (2003). X-ray crystal structure of IRF-3 and its functional implications. *Nature structural biology*, 10(11), 922–927. <https://doi.org/10.1038/nsb1001>
211. Takayanagi, H., Kim, S., Matsuo, K., Suzuki, H., Suzuki, T., Sato, K., Yokochi, T., Oda, H., Nakamura, K., Ida, N., Wagner, E. F., & Taniguchi, T. (2002). RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta. *Nature*, 416(6882), 744–749. <https://doi.org/10.1038/416744a>
212. Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6), 805–820. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>

213. Tang, Z. H., Liang, S., Potter, J., Jiang, X., Mao, H. Q., & Li, Z. (2013). Tim-3/galectin-9 regulate the homeostasis of hepatic NKT cells in a murine model of nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 190(4), 1788–1796. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202814>
214. Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A., & Tanaka, N. (2001). IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annual Review of Immunology*, 19, 623–655. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.623>
215. Tanikawa, R., Tanikawa, T., Okada, Y., Nakano, K., Hirashima, M., Yamauchi, A., Hosokawa, R., & Tanaka, Y. (2008). Interaction of galectin-9 with lipid rafts induces osteoblast proliferation through the c-Src/ERK signaling pathway. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 23(2), 278–286. <https://doi.org/10.1359/jbmr.071008>
216. The UniProt Consortium (2017). UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic acids research*, 45(D1), D158–D169. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1099>
217. Thijssen, V.L., Hulsmans, S., Griffioen, A.W. (2008). The galectin profile of the endothelium altered expression and localization in activated and tumor endothelial cells. *Am J Pathol.* 172, 545-553.
218. Thijssen, V. L., Heusschen, R., Caers, J., & Griffioen, A. W. (2015). Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review. *Biochimica et biophysica acta*, 1855(2), 235–247. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.03.003>
219. Tipping, P. G., Kitching, A. R., Huang, X. R., Mutch, D. A., & Holdsworth, S. R. (1997). Immune modulation with interleukin-4 and interleukin-10 prevents crescent formation and glomerular injury in experimental glomerulonephritis. *European journal of immunology*, 27(2), 530–537. <https://doi.org/10.1002/eji.1830270226>
220. Toscano, M. A., Campagna, L., Molinero, L. L., Cerliani, J. P., Croci, D. O., Ilarregui, J. M., Fuertes, M. B., Nojek, I. M., Fededa, J. P., Zwirner, N. W., Costas, M. A., & Rabinovich, G. A. (2011). Nuclear factor (NF)- $\kappa$ B controls expression of the immunoregulatory glycan-binding protein galectin-1. *Molecular immunology*, 48(15-16), 1940–1949. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2011.05.021>
221. Totrov M (2011) Loop simulations. *Homology Modeling: Springer*. pp. 207–229.

222. Türeci, O., Schmitt, H., Fadle, N., Pfreundschuh, M., & Sahin, U. (1997). Molecular definition of a novel human galectin which is immunogenic in patients with Hodgkin's disease. *The Journal of biological chemistry*, 272(10), 6416–6422. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.10.6416>
223. van den Hoogen, L. L., van Roon, J., Mertens, J. S., Wienke, J., Lopes, A. P., de Jager, W., Rossato, M., Pandit, A., Wichers, C., van Wijk, F., Fritsch-Stork, R., & Radstake, T. (2018). Galectin-9 is an easy to measure biomarker for the interferon signature in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Annals of the rheumatic diseases*, 77(12), 1810–1814. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-213497>
224. van Zundert, G.C.P., Rodrigues, J.P.G.L.M., Trellet, M., Schmitz, C., Kastiris, P.L., Karaca, E., Melquiond, A.S.J., van Dijk, M., de Vries, S.J. & Bonvin, A.M.J. Van Zundert, G. C. P., Rodrigues, J. P. G. L. M., Trellet, M., Schmitz, C., Kastiris, P. L., Karaca, E., Bonvin, A. M. J. J. (2016). The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. *Journal of Molecular Biology*, 428(4), 720–725. doi:10.1016/j.jmb.2015.09.014)
225. Vangone, A., Rodrigues, J. P., Xue, L. C., van Zundert, G. C., Geng, C., Kurkcuoglu, Z., Nellen, M., Narasimhan, S., Karaca, E., van Dijk, M., Melquiond, A. S., Visscher, K. M., Trellet, M., Kastiris, P. L., & Bonvin, A. M. (2017). Sense and simplicity in HADDOCK scoring: Lessons from CASP-CAPRI round 1. *Proteins*, 85(3), 417–423. <https://doi.org/10.1002/prot.25198>
226. Vasta, G. R., Ahmed, H., Nita-Lazar, M., Banerjee, A., Pasek, M., Shridhar, S., Guha, P., & Fernández-Robledo, J. A. (2012). Galectins as self/non-self-recognition receptors in innate and adaptive immunity: an unresolved paradox. *Frontiers in immunology*, 3, 199. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00199>
227. Veals, S. A., Schindler, C., Leonard, D., Fu, X. Y., Aebersold, R., Darnell, J. E., Jr, & Levy, D. E. (1992). Subunit of an alpha-interferon-responsive transcription factor is related to interferon regulatory factor and Myb families of DNA-binding proteins. *Molecular and cellular biology*, 12(8), 3315–3324. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.8.3315-3324.1992>
228. Vriend, G. (1990). WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *Journal of molecular graphics*, 8(1), 52–29. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(90\)80070-v](https://doi.org/10.1016/0263-7855(90)80070-v)

229. Wada, J., Ota, K., Kumar, A., Wallner, E. I., & Kanwar, Y. S. (1997). Developmental regulation, expression, and apoptotic potential of galectin-9, a beta-galactoside binding lectin. *The Journal of clinical investigation*, 99(10), 2452–2461. <https://doi.org/10.1172/JCI119429>
230. Wang, F., Xu, J., Liao, Y., Wang, Y., Liu, C., Zhu, X., Chen, Z. K., & Sun, Z. (2011). Tim-3 ligand galectin-9 reduces IL-17 level and accelerates *Klebsiella pneumoniae* infection. *Cellular immunology*, 269(1), 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2011.03.005>
231. Wang, H. X., Liu, M., Weng, S. Y., Li, J. J., Xie, C., He, H. L., Guan, W., Yuan, Y. S., & Gao, J. (2012). Immune mechanisms of Concanavalin A model of autoimmune hepatitis. *World journal of gastroenterology*, 18(2), 119–125. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i2.119>
232. Wang, Q., Canutescu, A. A., & Dunbrack, R. L., Jr (2008). SCWRL and MolIDE: computer programs for side-chain conformation prediction and homology modeling. *Nature protocols*, 3(12), 1832–1847. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.184>
233. Wang, W. H., Lin, C. Y., Chang, M. R., Urbina, A. N., Assavalapsakul, W., Thitithanyanont, A., Chen, Y. H., Liu, F. T., & Wang, S. F. (2020). The role of galectins in virus infection - A systemic literature review. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*, 53(6), 925–935. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2019.09.005>
234. Wang, Z., Ji, J., Peng, D., Ma, F., Cheng, G., & Qin, F. X. (2016). Complex Regulation Pattern of IRF3 Activation Revealed by a Novel Dimerization Reporter System. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 196(10), 4322–4330. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502458>
235. Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, T., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic acids research*, 46(W1), W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
236. Webb, B., & Sali, A. (2014). Protein structure modeling with MODELLER. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1137, 1–15. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0366-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0366-5_1)

237. Wedemeyer, J., & Vosskuhl, K. (2008). Role of gastrointestinal eosinophils in inflammatory bowel disease and intestinal tumours. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, 22(3), 537–549. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2007.12.001>
238. Wiederstein, M., & Sippl, M. J. (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic acids research*, 35(Web Server issue), W407–W410. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm290>
239. Wiersma, V. R., de Bruyn, M., Helfrich, W., & Bremer, E. (2013). Therapeutic potential of Galectin-9 in human disease. *Medicinal research reviews*, 33 Suppl 1, E102–E126. <https://doi.org/10.1002/med.20249>
240. Williams B. R. (2001). Signal integration via PKR. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, 2001(89), re2. <https://doi.org/10.1126/stke.2001.89.re2>
241. Wong, D., Teixeira, A., Oikonomopoulos, S., Humburg, P., Lone, I. N., Saliba, D., Siggers, T., Bulyk, M., Angelov, D., Dimitrov, S., Udalova, I. A., & Ragoussis, J. (2011). Extensive characterization of NF-κB binding uncovers non-canonical motifs and advances the interpretation of genetic functional traits. *Genome biology*, 12(7), R70. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-7-r70>
242. Xie, J. H., Zhu, R. R., Zhao, L., Zhong, Y. C., & Zeng, Q. T. (2020). Down-regulation and Clinical Implication of Galectin-9 Levels in Patients with Acute Coronary Syndrome and Chronic Kidney Disease. *Current medical science*, 40(4), 662–670. <https://doi.org/10.1007/s11596-020-2238-5>
243. Xu, D., Zhang, J., Roy, A., & Zhang, Y. (2011). Automated protein structure modeling in CASP9 by I-TASSER pipeline combined with QUARK-based ab initio folding and FG-MD-based structure refinement. *Proteins*, 79 Suppl 10(Suppl 10), 147–160. <https://doi.org/10.1002/prot.23111>
244. Yanai, H., Negishi, H., & Taniguchi, T. (2012). The IRF family of transcription factors: Inception, impact and implications in oncogenesis. *Oncoimmunology*, 1(8), 1376–1386. <https://doi.org/10.4161/onci.22475>
245. Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature methods*, 12(1), 7–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>

246. Yang, R. Y., Rabinovich, G. A., & Liu, F. T. (2008). Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert reviews in molecular medicine*, 10, e17. <https://doi.org/10.1017/S1462399408000719>
247. Ye, P., Garvey, P. B., Zhang, P., Nelson, S., Bagby, G., Summer, W. R., Schwarzenberger, P., Shellito, J. E., & Kolls, J. K. (2001). Interleukin-17 and lung host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 25(3), 335–340. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.25.3.4424>
248. Yoneyama, M., Suhara, W., & Fujita, T. (2002). Control of IRF-3 activation by phosphorylation. *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 22(1), 73–76. <https://doi.org/10.1089/107999002753452674>
249. Yoshida, H., Imaizumi, T., Kumagai, M., Kimura, K., Satoh, C., Hanada, N., Fujimoto, K., Nishi, N., Tanji, K., Matsumiya, T., Mori, F., Cui, X. F., Tamo, W., Shibata, T., Takanashi, S., Okumura, K., Nakamura, T., Wakabayashi, K., Hirashima, M., Sato, Y., ... Satoh, K. (2001). Interleukin-1beta stimulates galectin-9 expression in human astrocytes. *Neuroreport*, 12(17), 3755–3758. <https://doi.org/10.1097/00001756-200112040-00030>
250. Yu, J., Zhu, R., Yu, K., Wang, Y., Ding, Y., Zhong, Y., & Zeng, Q. (2020). Galectin-9: A Suppressor of Atherosclerosis? *Frontiers in immunology*, 11, 604265. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.604265>
251. Zahran, A. M., Youssef, M., Elsayh, K. I., Embaby, M. M., & Ibrahim, A. (2018). Clinical Significance of T-Cell Immunoglobulin Mucin 3 Expression on Peripheral Blood Mononuclear Cells in Pediatric Acute Immune Thrombocytopenia. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis: official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 24(6), 936–943. <https://doi.org/10.1177/1076029617730638>
252. Zhang, J. M., & An, J. (2007). Cytokines, inflammation, and pain. *International anesthesiology clinics*, 45(2), 27–37. <https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e>
253. Zhang, Q., Luan, H., Wang, L., He, F., Zhou, H., Xu, X., Li, X., Xu, Q., Niki, T., Hirashima, M., Xu, G., Lv, Y., & Yuan, J. (2014). Galectin-9 ameliorates anti-GBM glomerulonephritis by inhibiting Th1 and Th17 immune responses in mice. *American journal of physiology. Renal physiology*, 306(8), F822–F832. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00294.2013>

254. Zhang, X. M., & Shan, N. N. (2014). The role of T cell immunoglobulin and mucin domain-3 in immune thrombocytopenia. *Scandinavian journal of immunology*, 79(4), 231–236. <https://doi.org/10.1111/sji.12153>
255. Zheng, G., Lu, X. J., & Olson, W. K. (2009). Web 3DNA-a web server for the analysis, reconstruction, and visualization of three-dimensional nucleic-acid structures. *Nucleic acids research*, 37(Web Server issue), W240–W246. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp358>
256. Zhu, C., Anderson, A. C., Schubart, A., Xiong, H., Imitola, J., Khoury, S. J., Zheng, X. X., Strom, T. B., & Kuchroo, V. K. (2005). The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nature immunology*, 6(12), 1245–1252. <https://doi.org/10.1038/ni1271>
257. Zhuo, Y., Zhang, Y. F., Wu, H. J., Qin, L., Wang, Y. P., Liu, A. M., & Wang, X. H. (2017). Interaction between Galectin-9/TIM-3 pathway and follicular helper CD4+ T cells contributes to viral persistence in chronic hepatitis C. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 94, 386–393. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.134>

## APÉNDICES Y ANEXOS

### *Apéndice A: descripción de las herramientas computacionales utilizadas*

Clustal Omega: herramienta computacional que permite el alineamiento de secuencias de proteínas. <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

Discovery Studio 2020: herramienta de visualización de gráficos para el análisis de estructuras y modelos de proteínas. <https://www.3ds.com/products-services/biovia/products/molecular-modeling-simulation/biovia-discovery-studio/>

EPD: base de datos de promotores eucariotas. <https://epd.epfl.ch//index.php>

EMBL-EBI: Base de datos del Instituto Europeo de Bioinformática. <https://www.ebi.ac.uk/>

HADDOCK 2.4: Servidor en línea el cual permite realizar un acoplamiento basado en información indexada por el usuario <https://bianca.science.uu.nl/haddock2.4/>

JASPAR CORE VERTEBRATES: base de datos de acceso abierto de perfiles de enlace de factores de transcripción curados y no redundantes almacenados como matrices de frecuencia de posición (PFMs) <http://jaspar.genereg.net/>

LASAGNA-Search 2.0: es una herramienta web para la búsqueda y visualización de sitios de enlace de FT. Incorpora una colección de modelos construidos a partir de TFBS o matrices de peso posicionales (PWM, por sus siglas en inglés de *Position weight matrix*) recopilados de bases de datos como TRANSFAC, JASPAR, UniPROBE, ORegAnno y PAZAR. [https://biogrid-lasagna.engr.uconn.edu/lasagna\\_search/index.php](https://biogrid-lasagna.engr.uconn.edu/lasagna_search/index.php)

MolProbity: servicio web de validación de estructuras tridimensionales que proporciona una evaluación de la calidad del modelo, tanto para proteínas como para ácidos nucleicos. <http://molprobity.biochem.duke.edu/index.php>

PDB (*Protein Data Bank*): base de datos que alberga la estructura tridimensional de proteínas y ácidos nucleicos. Estos datos han sido obtenidos mediante técnicas como cristalografía de rayos-X, espectroscopia de resonancia magnética nuclear, y criomicroscopía electrónica. <https://www.rcsb.org/>

PROCHECK: herramienta que evalúa la geometría de los residuos en una estructura de proteína dada, en comparación con los parámetros estereoquímicos derivados de estructuras refinadas y de alta resolución. <https://saves.mbi.ucla.edu/>

ROSIE; servidor en línea que aloja múltiples protocolos de uso académico, incluyendo una herramienta de acoplamiento simétrico de proteínas. <https://rosie.graylab.jhu.edu/>

SWISS-MODEL: servidor de modelado por homología de estructuras de proteínas. <https://swissmodel.expasy.org/>

TRANSFAC: base De datos de factores de transcripción eucarióticos, sus sitios de unión a genoma y sus perfiles de unión a ADN. <http://genexplain.com/transfac/>

UCSF Chimera: programa computacional que permite la visualización y edición de estructuras biológicas tridimensionales en distintos formatos. <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>

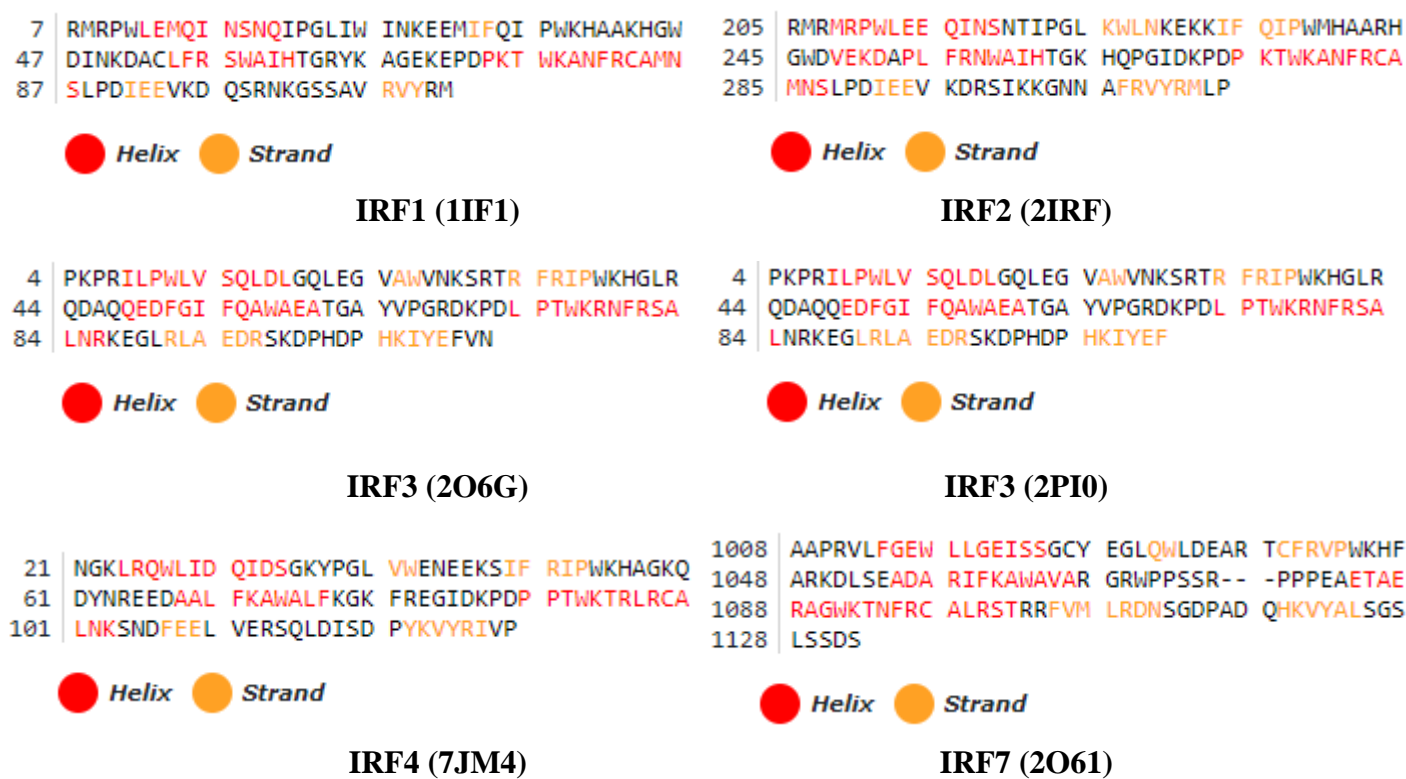
UniProtKB: repositorio de datos con información funcional sobre proteínas. <https://www.uniprot.org/uniprot/>

w3DNA 2.0: servidor para el análisis, visualización y modelado tridimensional de estructuras que contienen ácidos nucleicos. Las estructuras se modelan con base en modelos disponibles en la base de datos PDB. <http://web.x3dna.org/>

*Apéndice B: residuos activos detectados por HADDOCK 2.4*

Uno de los pasos previos más importantes para llevar a cabo un acoplamiento en HADDOCK es la definición manual de los residuos activos en las estructuras indexadas. En el servidor, los residuos que conforman una hélice- $\alpha$  son resaltados en rojo, y los residuos que conforman una hoja- $\beta$  son resaltados en amarillo.

*Residuos activos para las estructuras empleadas en la prueba de parámetros*



**Fig. B1.** Residuos activos detectados por HADDOCK 2.4 para estructuras elegidas para la prueba de parámetros.

*Residuos activos para las estructuras empleadas en la prueba de controles*

139 KRRIRRERNK MAAAKSRNRR RELTDTLQAE TDQLEDEKSA  
 179 LQTEIANLLK EKEKLEFILA -----  
 259 -----RKR MRNRIAASKS RKRKLERIAR LEEKVKTLKA  
 299 QNSELASTAN MLREQVAQLK QKVM

 Helix  Strand

**C-Fos/C-jun**

155 SRRNAWGNLS YADLITKAIE SSAEKRLTLS QIYEWVKS  
 195 PYFKDKGDSN SSAGWKNSIR HNLSSLHSKFI RVQNEGTGKS  
 235 SMMMLNP

 Helix  Strand

**FoxO1**

399 WPLSSQSGSY ELRIEVQPKP HHRAYETEG SRGAVKAPTG  
 439 GHPVVQLHGY MENKPLGLQI FIGTADERIL KPFAFYQVHR  
 479 ITGKTVTTTS YEKIVGNTKV LEIPLKPKNN MRATIDCAGI  
 519 LKLRNADIEL RKGETDIGRK NTRVRLVFRV HIPESSGRIV  
 559 SLQTASNPIE CSQSAHELP MVERQDTDSC LVYGGQMIL  
 599 TGQNFTSESK VVFTEKTTDG QQIWEMEATV DKDKSQPNML  
 639 FVEIPEYRNK HIRTPVKVNF YVINGKRKRS QPQHFTYHPV

 Helix  Strand

**NFAT**

39 GKTRWTREED EKLKLLVEQN GTDDWKVIAN YLPNRTDVQC  
 79 QHRWQKVLNP ELIKGPWTK EDRVIKLVQ KYGPKRWSVI  
 119 AKHLKGRIGK QCRERWHNHL NPEVKKTSWT EEEDRIIYQA  
 159 HKRLGNRWAE IAKLLPGRTD NAIKNHWNST MR

 Helix  Strand

**C-Myb**

**Fig. B2.** Residuos activos detectados por HADDOCK 2.4 para estructuras elegidas para la prueba de controles.

*Residuos activos para los modelos de IRF obtenidos por modelado por homología*

1 RMRMRPWLEM QINSNQIPGL IWINKKEEMIF QIPWKHAAKH  
 41 GWDINKDAKL FRSWAIHTGR YKAGEKEPDP KTWKANFRCA  
 81 MNSLPDIEEV KDQSRNKGSS AVRVRMLP

 Helix  Strand

**IRF1**

5 KPRILPWLVS QLDLGQLEGV AAVNKSRTRF RIPWKH----  
 45 ----EDFGIF QAWAEATGAY VPGRDKPDLP TWKRNFRSAM  
 85 NRKEGLRLAE DRSKDPHDPH KIYEF

 Helix  Strand


**IRF3**

3 RLKPWLVAQV NSCQYPGLQW VNGEKKLFCI PWRHATRHGP  
 43 SQDGDNTIFK AWAKETGKYT EGVDEADPAK WKANLRCALN  
 83 KSRDFRLIYD GPRDMPPQPY KIYEV

 Helix  Strand

**IRF5**

1 RVLFGEWLLG EISSGCYEGV QWLDEARTCF RVPWKHFARK  
 41 DLSEADARIF KAWAVARGRW PPSSRGGGPP PEAETAERAG  
 81 WKTNFRCALR STRRFVMLRD NSGDPADPHK VYALSR

 Helix  Strand

**IRF7**

3 RLRQWLIEQI DSSMYPGLIW ENEEKSMFRI PWKHAGKQDY  
 43 NQEVDAIFK AWAVFKGKFK EGDKAEPATW KTRLRCALNK  
 83 SPDFEVTDK SQLDISEPYK VYRIVP

 Helix  Strand

**IRF8**

3 KLRNWWVEQV ESGQFPGVCW DDTAKTMFRI PWKHAGKQDF  
 43 REDQDAFFK AWAIKFKGKYK EGDGTPAVW KTRLRCALNK  
 83 SSEFKEVPER GRMDVAEPYK VYQLLP

 Helix  Strand

**IRF9**

**Fig. B3.** Residuos activos detectados por HADDOCK 2.4 para DBD de IRF.

*Residuos activos para las subunidades de NF-κB (heterodímero p50/p65)*

37	MDGPYLQILE	QPKQRGFRFR	YVCEGPSHGG	LPGASSEKNK
77	KSYPQVKICN	YVGPAAKIVIQ	LVTNGKNIHL	HAHSLVGKHC
117	EDGICTVTAG	PKDMVVGAFAN	LGILHVTKKK	VFETLEARMT
157	EACIRGYNPG	LLVHPDLAYL	QAEGGGDRQL	GDREKELIRQ
197	AALQQTKEMD	LSVVRLMFTA	FLPDSTGSFT	RRLEPVVSDA
237	IYDSKAPNAS	NLKIVRMDRT	AGCVTGGEEI	YLLCDKVQKD
277	DIQIRFYEEE	ENGGVWEGFG	DFSPTDVHRQ	FAIVFKTPKY
317	KDINITKPAS	VFVQLRRKSD	LETSEPKPFL	YYPE

 *Helix*  *Strand*

**p50 (NF-κB1)**

19	GYVEIIEQPK	QRGMRFRYKC	EGRSAGSIPG	ERSTDTTKTH
59	PTIKINGYTG	PGTVRISLVT	KDPPHRPHPH	ELVGKDCRDG
99	FYEAELCPDR	CIHSFQNLGI	QCVKRRDLEQ	AISQRIQTNN
139	NPFQVPIEEQ	RGDYDLNAVR	LCFQVTVRDP	SGRPLRLPPV
179	LSHPIFDNRA	PNTAELKICR	VNRNSGSCLG	GDEIFLLCDK
219	VQKEDI E V Y F	TGPGWEARGS	FSQADVHRQV	AIVFRTPPYA
259	DPSLQAPVRV	SMQLRRPSDR	ELSEPMEFQY	LPD-----
1019	-G-----	-----A--	-----	-----
2099	-----	--N		

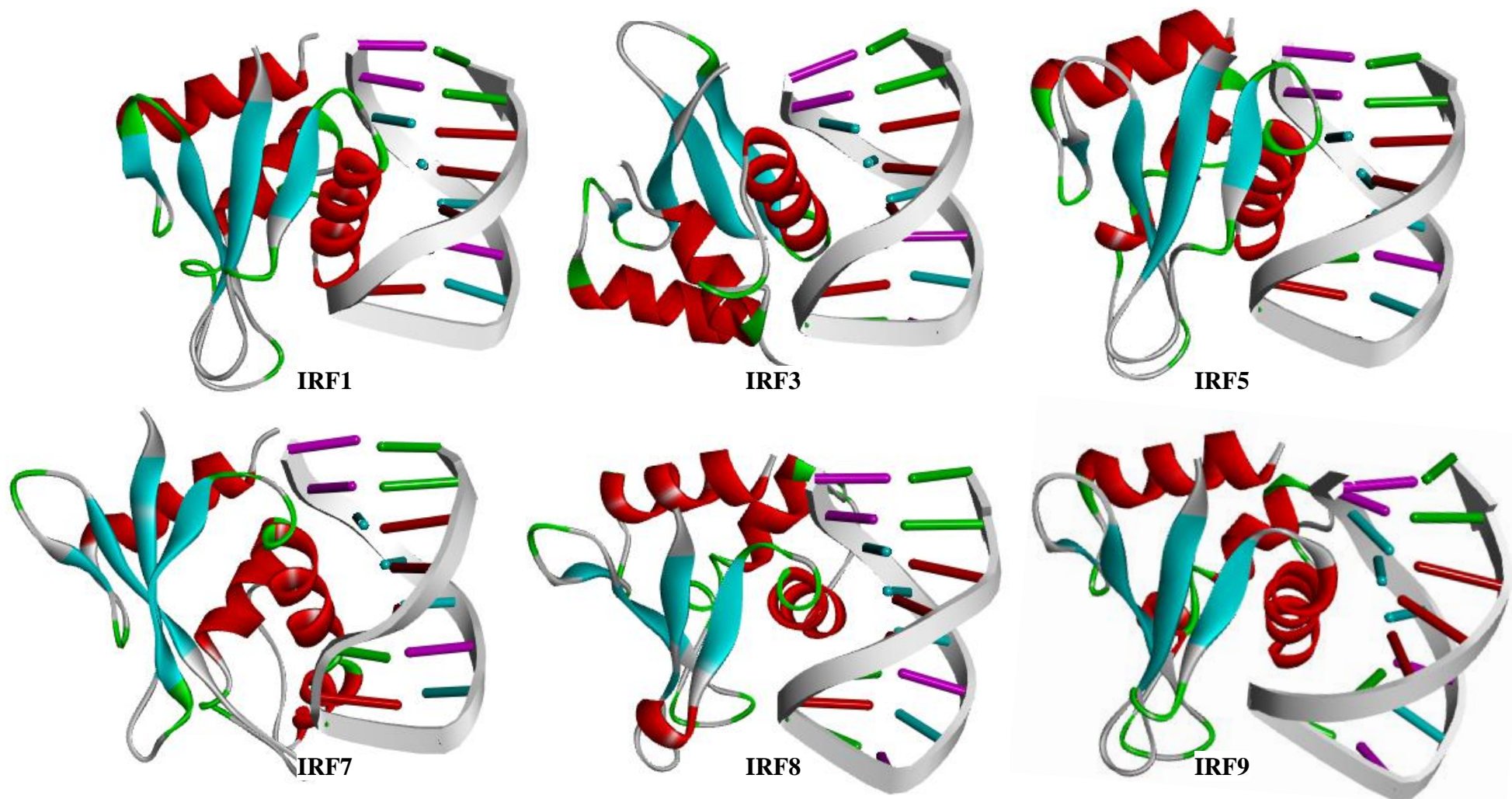
 *Helix*  *Strand*

**p65 (RelA)**

**Fig. B4.** Residuos activos detectados por HADDOCK 2.4 para DBD de IRF.

Apéndice C: resultados de acoplamiento entre IRF-IRE

Acoplamiento IRF-GGGAAAGG

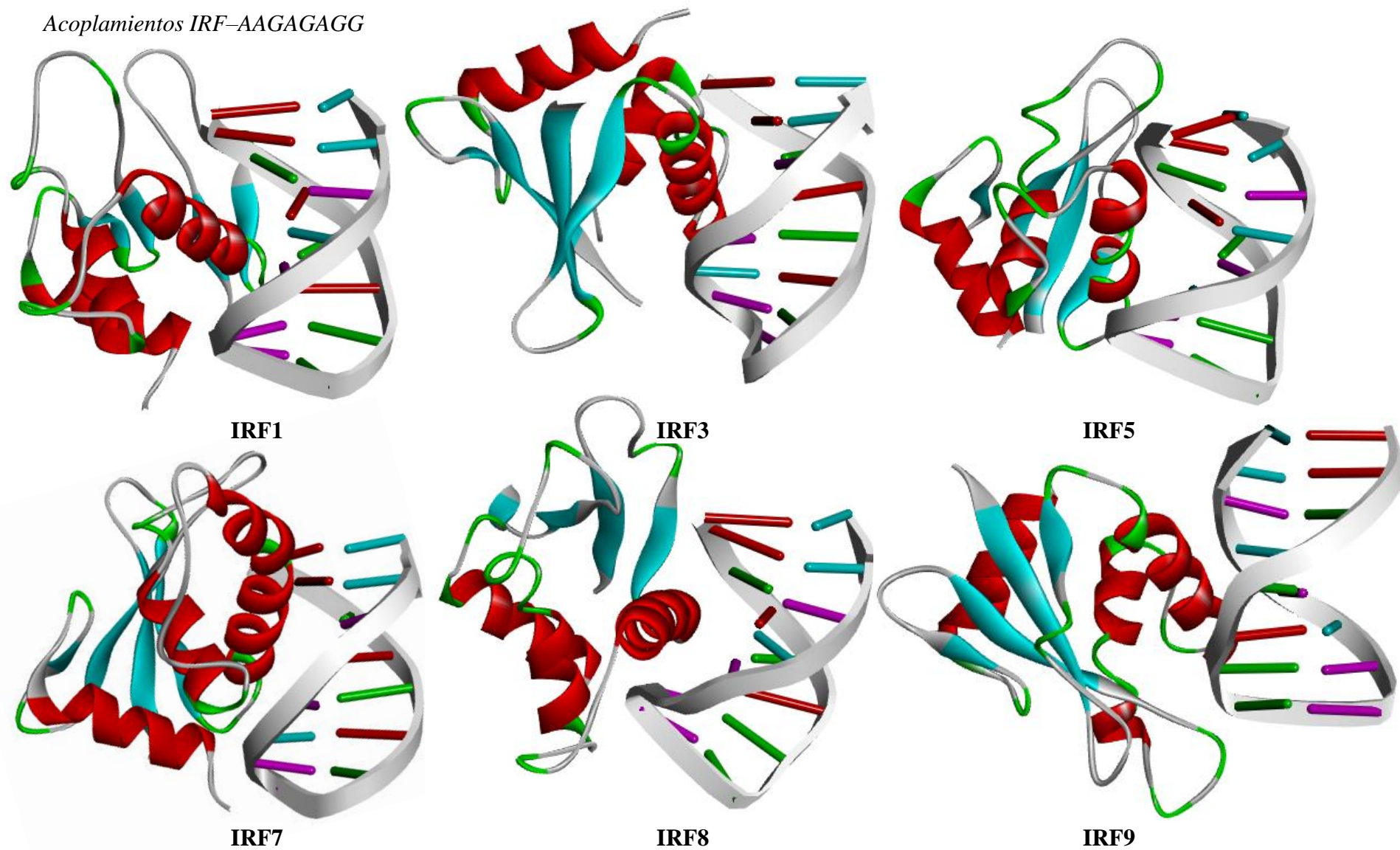


**Fig. B1.** Acoplamiento resultante entre DBD de IRF y la secuencia IRE canónica GAAA.

**Tabla B1.** Valores obtenidos de los acoplamientos entre DBD de IRF y la secuencia IRE canónica GAAA (GGGAAAGG) (mejores resultados de cada clúster obtenido en HADDOCK).

	HADDOCK Score	Cluster	Cluster size	RMSD from the overall lowest-energy structure	Van der Waals energy	Electrostatic energy	Desolvation energy	Restrains violation energy	Buried surface area	Z - score
IRF1	-88.0 +/- 5.7	1	10	1.7 +/- 1.0	-44.9 +/- 8.5	-478.9 +/- 21.7	11.4 +/- 1.7	412.2 +/- 69.2	1478.7 +/- 118.8	-2.3
IRF3	-108.2 +/- 3.5	4	7	1.3 +/- 1.0	-62.5 +/- 4.2	-545.9 +/- 24.3	21.9 +/- 2.3	415.0 +/- 46.8	1805.2 +/- 26.0	-1.9
IRF5	-96.5 +/- 10.2	1	13	1.4 +/- 0.8	-47.8 +/- 4.4	-572.7 +/- 30.9	17.5 +/- 1.6	482.9 +/- 31.3	1629.5 +/- 81.8	-1.7
IRF7	-54.5 +/- 12.1	2	6	8.8 +/- 0.3	-49.0 +/- 5.6	-409.1 +/- 62.4	15.2 +/- 2.5	610.4 +/- 62.6	1646.7 +/- 35.2	-1.5
IRF8	-91.1 +/- 7.9	1	19	1.1 +/- 0.9	-40.5 +/- 4.3	-547.8 +/- 29.5	16.0 +/- 1.5	429.1 +/- 63.0	1516.4 +/- 24.8	-1.3
IRF9	-108.7 +/- 10.8	1	20	1.3 +/- 0.8	-44.9 +/- 6.1	-604.4 +/- 32.8	17.4 +/- 3.1	397.4 +/- 10.4	1604.8 +/- 52.6	-2.2

*Acoplamiento IRF-AAGAGAGG*

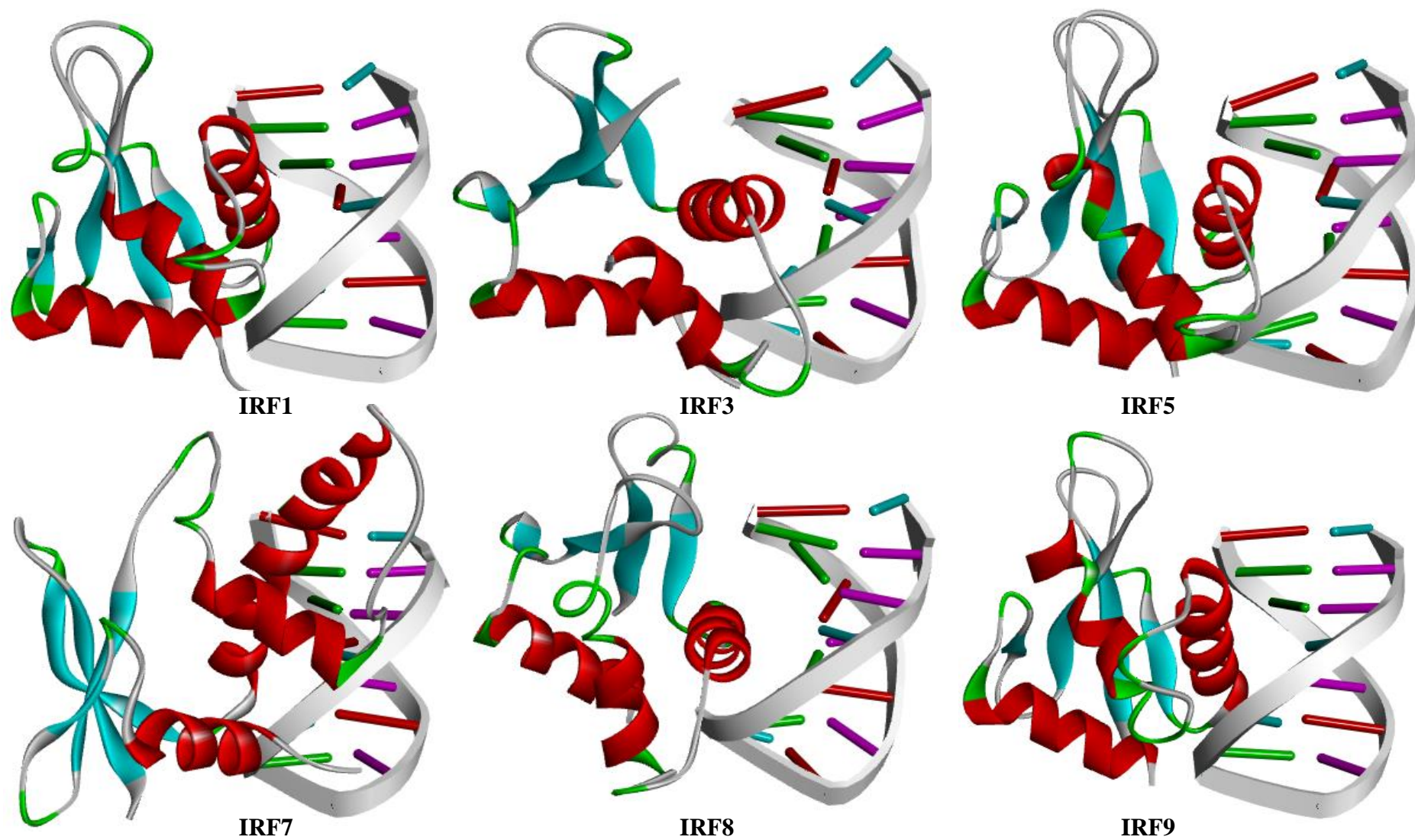


**Fig. B2.** Acoplamiento resultante entre DBD de IRF y la secuencia IRE alternativa GAGA.

**Tabla B2.** Valores obtenidos de los acoplamientos entre DBD de IRF y la secuencia IRE alternativa GAGA (AAGAGAGG) (mejores resultados de cada clúster obtenido en HADDOCK).

	HADDOCK Score	Cluster	Cluster size	RMSD from the overall lowest-energy structure	Van der Waals energy	Electrostatic energy	Desolvation energy	Restrains violation energy	Buried surface area	Z - score
IRF1	-87.5 +/- 8.6	1	11	5.6 +/- 0.9	-52.7 +/- 8.7	-451.3 +/- 36.5	12.6 +/- 0.5	428.3 +/- 180.1	1559.8 +/- 54.8	-1.7
IRF3	-76.5 +/- 9.7	8	5	9.1 +/- 0.1	-51.5 +/- 6.0	-380.9 +/- 24.2	11.1 +/- 1.7	400.7 +/- 68.9	1464.2 +/- 99.6	-1.3
IRF5	-89.8 +/- 3.6	3	9	8.9 +/- 0.2	-52.0 +/- 4.9	-460.1 +/- 25.5	9.9 +/- 3.5	443.4 +/- 87.5	1653.9 +/- 72.1	-1.9
IRF7	-71.9 +/- 7.8	2	7	1.5 +/- 1.2	-54.5 +/- 2.0	-460.4 +/- 76.8	17.3 +/- 4.2	573.9 +/- 89.3	1602.3 +/- 177.0	-2.0
IRF8	-95.2 +/- 4.7	2	19	8.5 +/- 0.1	-41.6 +/- 9.4	-526.2 +/- 55.0	13.7 +/- 1.9	379.0 +/- 49.3	1550.7 +/- 101.8	-1.9
IRF9	-87.7 +/- 11.0	13	4	8.4 +/- 0.1	-44.9 +/- 9.8	-490.9 +/- 39.9	6.4 +/- 2.7	490.0 +/- 122.7	1426.4 +/- 90.9	-1.0

*Acoplamiento IRF-AGGACACA*



**Fig. B3.** Acoplamiento resultante entre DBD de IRF y la secuencia IRE alternativa GACA.

**Tabla B3.** Valores obtenidos de los acoplamientos entre DBD de IRF y la secuencia IRE alternativa GACA (AGGACACA) (mejores resultados de cada clúster obtenido en HADDOCK).

	HADDOCK Score	Cluster	Cluster size	RMSD from the overall lowest-energy structure	Van der Waals energy	Electrostatic energy	Desolvation energy	Restrains violation energy	Buried surface area	Z - score
IRF1	-76.6 +/- 8.7	1	10	1.0 +/- 0.6	-45.9 +/- 7.7	-412.1 +/- 64.7	14.1 +/- 2.3	376.9 +/- 109.3	1509.5 +/- 117.5	-2.0
IRF3	-95.7 +/- 6.6	6	5	1.9 +/- 1.1	-52.5 +/- 5.6	-528.3 +/- 45.6	20.5 +/- 3.6	419.7 +/- 68.6	1708.5 +/- 48.3	-1.8
IRF5	-81.1 +/- 23.4	15	4	2.6 +/- 0.8	-40.0 +/- 4.1	-543.5 +/- 80.9	17.6 +/- 4.9	499.0 +/- 145.3	1677.3 +/- 101.4	-1.4
IRF7	-58.1 +/- 20.6	11	4	1.2 +/- 0.7	-43.2 +/- 7.5	-505.2 +/- 39.0	19.4 +/- 0.8	667.6 +/- 64.2	1693.0 +/- 83.8	-1.8
IRF8	-97.0 +/- 7.1	2	19	0.6 +/- 0.3	-42.7 +/- 2.7	-524.1 +/- 39.5	17.8 +/- 1.6	327.3 +/- 57.0	1521.0 +/- 34.3	-2.0
IRF9	-95.0 +/- 5.1	2	15	8.3 +/- 0.1	-37.0 +/- 3.7	-596.9 +/- 15.7	20.3 +/- 2.1	411.0 +/- 40.8	1541.7 +/- 34.1	-2.1

Apéndice D: resultados de acoplamientos entre dímeros de IRF–ISRE

**Tabla C1.** Valores obtenidos de los acoplamientos entre los diez mejores modelos obtenidos en ROSIE de dímeros de IRF1–ISRE.

Mejor conformación (Número de modelo de ROSIE)	HADDOCK Score	Cluster	Cluster size	RMSD from the overall lowest-energy structure	Van der Waals energy	Electrostatic energy	Desolvation energy	Restrains violation energy	Buried surface area	Z score
IRF1-1	-60.6 +/- 17.8	3	5	16.3 +/- 0.2	-74.1 +/- 4.5	-728.6 +/- 74.7	-728.6 +/- 74.7	1331.7 +/- 82.8	2413.2 +/- 96.0	-1.7
IRF1-2	-47.0 +/- 5.8	2	6	13.6 +/- 0.2	-41.8 +/- 4.5	-776.6 +/- 46.9	23.1 +/- 0.9	1270.5 +/- 71.6	2161.6 +/- 185.3	-1.3
IRF1-3	-25.4 +/- 26.0	1	4	10.7 +/- 0.2	-48.5 +/- 13.3	-682.4 +/- 93.7	21.4 +/- 6.0	1382.3 +/- 141.7	1984.7 +/- 207.9	0.0
IRF1-4	-31.0 +/- 13.5	8	4	14.5 +/- 0.0	-18.0 +/- 4.7	-874.2 +/- 59.6	23.3 +/- 4.3	1385.9 +/- 103.8	2179.0 +/- 94.3	-1.5
IRF1-5	-29.7 +/- 19.4	2	6	13.2 +/- 0.2	-54.7 +/- 21.3	-636.0 +/- 39.4	17.7 +/- 4.0	1345.4 +/- 97.4	2161.8 +/- 225.8	-1.6
IRF1-6	-29.2 +/- 18.4	6	4	12.9 +/- 0.1	-42.0 +/- 2.7	-704.6 +/- 65.7	20.1 +/- 1.9	1336.5 +/- 78.3	2138.0 +/- 103.4	-1.5
IRF1-7	-47.3 +/- 20.9	2	5	1.6 +/- 0.9	-52.1 +/- 13.1	-771.7 +/- 30.0	27.4 +/- 2.6	1316.8 +/- 114.0	2323.5 +/- 195.2	-1.5
IRF1-8	-28.4 +/- 5.2	3	5	13.2 +/- 0.1	-46.0 +/- 7.0	-708.0 +/- 71.8	27.8 +/- 2.1	1313.6 +/- 79.0	2249.9 +/- 101.7	-1.7
IRF1-9	-61.0 +/- 7.3	1	6	1.8 +/- 1.1	-72.8 +/- 4.8	-767.5 +/- 67.7	28.1 +/- 3.3	1371.3 +/- 156.5	2339.7 +/- 58.0	-1.5
IRF1-10	-29.8 +/- 15.1	5	4	14.2 +/- 0.2	-46.8 +/- 12.6	-754.0 +/- 31.0	22.6 +/- 2.4	1452.2 +/- 11.8	2098.3 +/- 253.7	-1.0

**Tabla C2.** Valores obtenidos de los acoplamientos entre los diez mejores modelos obtenidos en ROSIE de dímeros de IRF3–ISRE.

Mejor conformación (Número de modelo de ROSIE)	HADDOCK Score	Cluster	Cluster size	RMSD from the overall lowest-energy structure	Van der Waals energy	Electrostatic energy	Desolvation energy	Restrains violation energy	Buried surface area	Z score
IRF3-1	-66.2 +/- 6.3	4	9	13.1 +/- 0.2	-56.9 +/- 5.0	-799.0 +/- 22.1	25.7 +/- 0.5	1247.7 +/- 107.4	2416.8 +/- 170.4	-1.4
IRF3-2	-30.4 +/- 7.9	5	4	14.1 +/- 0.1	-43.4 +/- 5.2	-631.3 +/- 47.8	26.1 +/- 3.9	1131.4 +/- 88.0	2094.0 +/- 36.1	1.5
IRF3-3	-35.2 +/- 12.6	10	4	20.4 +/- 0.1	-59.4 +/- 8.3	-565.0 +/- 27.9	36.0 +/- 2.3	1012.4 +/- 42.6	2241.8 +/- 155.9	-1.0
<b>IRF3-4</b>	-76.0 +/- 8.1	5	6	1.5 +/- 1.0	-69.2 +/- 4.6	-734.3 +/- 42.8	31.2 +/- 3.4	1089.0 +/- 131.3	2483.7 +/- 88.5	-1.8
IRF3-5	-21.7 +/- 2.4	3	7	9.2 +/- 0.6	-89.5 +/- 2.8	-252.5 +/- 32.6	-4.2 +/- 2.8	1224.4 +/- 29.1	2375.8 +/- 74.0	-1.6
IRF3-6	-24.4 +/- 7.3	1	7	13.5 +/- 0.3	-43.4 +/- 5.8	-610.6 +/- 48.7	22.1 +/- 4.2	1189.1 +/- 97.5	1924.8 +/- 56.4	-1.1
IRF3-7	-21.0 +/- 5.9	1	6	10.6 +/- 0.1	-63.8 +/- 11.4	-422.7 +/- 34.4	0.2 +/- 2.4	1271.2 +/- 43.4	2368.4 +/- 265.8	-1.2
IRF3-8	-68.4 +/- 13.6	3	4	8.6 +/- 0.4	-91.5 +/- 12.0	-568.3 +/- 66.0	24.6 +/- 2.5	1121.7 +/- 64.4	2777.0 +/- 51.0	-1.5
IRF3-9	-41.1 +/- 19.5	2	5	1.7 +/- 1.0	-69.1 +/- 14.6	-422.3 +/- 112.3	22.0 +/- 3.3	22.0 +/- 3.3	2349.3 +/- 140.4	-1.5
IRF3-10	-65.2 +/- 16.9	10	4	2.0 +/- 1.2	-57.4 +/- 6.4	-764.6 +/- 84.0	26.8 +/- 1.0	1182.7 +/- 48.8	2516.0 +/- 164.5	-1.8

**Tabla C3.** Valores obtenidos de los acoplamientos entre los diez mejores modelos obtenidos en ROSIE de dímeros de IRF5–ISRE.

Mejor conformación (Número de modelo de ROSIE)	HADDOCK Score	Cluster	Cluster size	RMSD from the overall lowest-energy structure	Van der Waals energy	Electrostatic energy	Desolvation energy	Restrains violation energy	Buried surface area	Z score
IRF5-1	-61.9 +/- 8.1	1	10	1.6 +/- 1.0	-96.4 +/- 7.4	-634.0 +/- 32.4	22.8 +/- 4.7	1384.3 +/- 35.1	2898.9 +/- 94.2	-2.4
IRF5-2	-49.6 +/- 6.1	2	8	19.8 +/- 0.1	-96.2 +/- 8.2	-371.3 +/- 26.0	12.3 +/- 1.8	1086.1 +/- 86.4	2443.7 +/- 115.2	-1.9
IRF5-3	-20.1 +/- 11.2	2	7	19.1 +/- 0.2	-79.5 +/- 8.8	-367.5 +/- 57.3	20.3 +/- 3.8	1126.0 +/- 62.6	2607.1 +/- 124.1	-1.8
IRF5-4	-43.5 +/- 7.3	1	16	13.5 +/- 0.1	-84.9 +/- 7.4	-369.5 +/- 17.9	8.8 +/- 1.1	1064.9 +/- 64.9	2437.3 +/- 48.8	-1.5
IRF5-5	-19.1 +/- 8.7	2	8	13.2 +/- 0.1	-74.4 +/- 5.7	-461.1 +/- 40.2	20.0 +/- 1.2	1275.4 +/- 104.3	2434.1 +/- 72.0	-1.0
IRF5-6	-12.7 +/- 13.1	3	6	19.6 +/- 0.1	-85.0 +/- 15.8	-346.9 +/- 25.1	26.3 +/- 3.0	1153.6 +/- 3.4	2500.5 +/- 217.0	-0.9
IRF5-7	-15.2 +/- 7.4	7	5	3.3 +/- 0.4	-90.1 +/- 3.2	-340.4 +/- 52.7	23.5 +/- 3.5	1194.7 +/- 27.9	2620.1 +/- 54.8	-1.4
IRF5-8	-16.0 +/- 7.8	4	7	7.8 +/- 0.1	-59.7 +/- 2.9	-453.7 +/- 34.9	17.6 +/- 3.5	1168.7 +/- 27.4	2181.3 +/- 79.5	-1.0
IRF5-9	-20.8 +/- 26.0	10	4	1.5 +/- 0.9	-86.9 +/- 8.2	-336.6 +/- 54.5	10.0 +/- 2.0	1234.8 +/- 128.8	2401.6 +/- 124.3	-2.1
IRF5-10	-34.4 +/- 10.4	14	4	1.0 +/- 0.6	-84.9 +/- 9.2	-419.0 +/- 55.9	27.1 +/- 4.0	1072.2 +/- 52.3	2494.9 +/- 128.0	-1.5

**Tabla C4.** Valores obtenidos de los acoplamientos entre los diez mejores modelos obtenidos en ROSIE de dímeros de IRF7–ISRE.

Mejor conformación (Número de modelo de ROSIE)	HADDOCK Score	Cluster	Cluster size	RMSD from the overall lowest-energy structure	Van der Waals energy	Electrostatic energy	Desolvation energy	Restrains violation energy	Buried surface area	Z score
IRF7-1	-22.8 +/- 11.8	1	8	16.9 +/- 0.1	-95.1 +/- 7.9	-380.1 +/- 26.3	17.5 +/- 1.4	1308.5 +/- 92.0	2607.3 +/- 47.3	-1.8
IRF7-2	20.7 +/- 22.9	10	4	12.8 +/- 0.1	-77.6 +/- 6.6	-410.4 +/- 54.8	20.0 +/- 2.6	1604.0 +/- 184.5	2371.6 +/- 124.0	-1.8
IRF7-3	43.4 +/- 7.2	2	6	12.0 +/- 0.5	-74.5 +/- 8.9	-225.9 +/- 11.7	10.9 +/- 3.3	1521.5 +/- 51.1	2096.5 +/- 56.7	-1.7
IRF7-4	-27.3 +/- 3.9	2	9	17.5 +/- 0.1	-61.7 +/- 7.1	-645.3 +/- 30.3	23.4 +/- 1.4	1400.8 +/- 28.6	2532.9 +/- 80.8	-2.1
IRF7-5	-18.5 +/- 12.7	2	8	12.6 +/- 0.1	-61.4 +/- 12.8	-631.0 +/- 20.5	17.3 +/- 3.5	1518.7 +/- 74.9	2071.3 +/- 180.4	-1.7
IRF7-6	-36.8 +/- 0.9	2	7	7.0 +/- 0.2	-74.9 +/- 5.2	-544.0 +/- 41.4	16.1 +/- 1.7	1308.0 +/- 111.5	2472.9 +/- 94.1	-1.3
IRF7-7	-6.0 +/- 36.1	1	4	1.4 +/- 0.9	-47.2 +/- 6.3	-661.3 +/- 102.5	24.1 +/- 3.3	1493.8 +/- 147.7	2104.6 +/- 218.7	0.0
<b>IRF7-8</b>	-63.1 +/- 16.6	4	8	1.4 +/- 1.0	-65.0 +/- 2.8	-850.5 +/- 44.9	27.9 +/- 3.7	1441.7 +/- 86.8	2899.7 +/- 47.1	-2.3
IRF7-9	-42.0 +/- 10.8	10	6	12.6 +/- 0.1	-64.5 +/- 5.6	-667.3 +/- 46.6	24.8 +/- 4.7	1311.2 +/- 189.6	2487.8 +/- 66.7	-2.2
IRF7-10	-4.2 +/- 8.4	9	4	18.3 +/- 0.2	-67.3 +/- 5.9	-553.6 +/- 19.6	22.7 +/- 2.5	1511.6 +/- 49.7	2509.1 +/- 126.3	-1.5

**Tabla C5.** Valores obtenidos de los acoplamientos entre los diez mejores modelos obtenidos en ROSIE de dímeros de IRF8–ISRE.

Mejor conformación (Número de modelo de ROSIE)	HADDOCK Score	Cluster	Cluster size	RMSD from the overall lowest-energy structure	Van der Waals energy	Electrostatic energy	Desolvation energy	Restrains violation energy	Buried surface area	Z score
IRF8-1	-30.6 +/- 13.6	8	4	13.4 +/- 0.1	-29.4 +/- 10.3	-779.5 +/- 29.8	32.3 +/- 2.8	1224.2 +/- 100.6	2206.1 +/- 132.4	-1.2
IRF8-2	-32.4 +/- 9.3	5	4	8.8 +/- 0.6	-40.2 +/- 11.2	-755.5 +/- 50.2	33.9 +/- 3.6	1249.9 +/- 74.7	1985.6 +/- 112.2	-1.0
IRF8-3	-20.5 +/- 23.2	4	4	16.1 +/- 0.1	-49.1 +/- 12.9	-627.6 +/- 32.7	26.0 +/- 2.9	1281.5 +/- 134.4	2127.8 +/- 343.3	-1.2
IRF8-4	-21.7 +/- 12.9	8	4	13.3 +/- 0.0	-70.8 +/- 2.0	-580.2 +/- 61.5	24.5 +/- 2.0	1405.8 +/- 20.2	2507.3 +/- 107.8	-1.3
IRF8-5	-38.6 +/- 22.7	1	5	13.8 +/- 0.1	-44.6 +/- 11.9	-633.8 +/- 28.9	15.6 +/- 7.7	1171.6 +/- 121.9	2123.4 +/- 145.7	-1.3
IRF8-6	-32.9 +/- 8.3	5	13	19.6 +/- 0.2	-72.7 +/- 8.8	-466.1 +/- 24.4	18.0 +/- 2.2	1149.7 +/- 30.1	2347.7 +/- 181.4	-1.3
IRF8-7	-3.9 +/- 11.1	6	5	13.9 +/- 0.3	-52.7 +/- 6.6	-490.2 +/- 54.2	20.0 +/- 1.7	1268.7 +/- 81.7	2154.9 +/- 35.2	-1.5
IRF8-8	7.5 +/- 1.1	2	6	4.4 +/- 0.2	-86.8 +/- 7.9	-241.4 +/- 49.3	16.0 +/- 1.5	1265.9 +/- 79.5	2624.1 +/- 59.4	-1.3
IRF8-9	-9.4 +/- 10.5	3	13	13.5 +/- 0.1	-95.2 +/- 8.0	-166.8 +/- 33.7	15.8 +/- 4.0	1033.4 +/- 51.5	2664.0 +/- 130.7	-2.1
<b>IRF8-10</b>	-86.8 +/- 6.3	7	7	13.5 +/- 0.2	-71.6 +/- 10.6	-808.1 +/- 81.6	32.4 +/- 4.8	1140.2 +/- 73.5	2840.9 +/- 192.7	-2.0

**Tabla C6.** Valores obtenidos de los acoplamientos entre los diez mejores modelos obtenidos en ROSIE de dímeros de IRF9–ISRE.

Mejor conformación (Número de modelo de ROSIE)	HADDOCK Score	Cluster	Cluster size	RMSD from the overall lowest-energy structure	Van der Waals energy	Electrostatic energy	Desolvation energy	Restrains violation energy	Buried surface area	Z score
IRF9-1	-40.8 +/- 10.3	5	5	9.5 +/- 0.3	-54.6 +/- 2.5	-562.0 +/- 39.4	22.8 +/- 3.4	1034.7 +/- 134.8	2288.4 +/- 108.5	-1.5
IRF9-2	-21.0 +/- 8.3	3	8	7.1 +/- 0.2	-89.1 +/- 6.8	-216.5 +/- 33.1	18.3 +/- 4.0	932.0 +/- 121.0	2538.5 +/- 87.3	-1.8
IRF9-3	-58.9 +/- 11.5	2	4	11.9 +/- 0.3	-53.3 +/- 8.8	-806.3 +/- 49.9	35.2 +/- 2.9	1203.8 +/- 62.2	2291.8 +/- 142.6	-1.0
IRF9-4	-6.9 +/- 7.1	4	10	14.4 +/- 0.0	-74.0 +/- 2.3	-341.4 +/- 40.4	21.9 +/- 2.7	1135.2 +/- 86.9	2422.9 +/- 62.9	-2.2
IRF9-5	-54.9 +/- 15.9	2	5	1.2 +/- 0.7	-84.9 +/- 13.7	-623.5 +/- 46.9	31.3 +/- 2.2	1233.5 +/- 107.9	2605.2 +/- 140.4	-1.6
IRF9-6	-67.6 +/- 12.2	9	4	13.3 +/- 0.1	-56.2 +/- 4.4	-689.0 +/- 61.8	18.3 +/- 1.2	1080.8 +/- 25.9	2503.0 +/- 177.4	-2.1
IRF9-7	-21.6 +/- 8.5	1	7	6.6 +/- 0.3	-46.9 +/- 5.2	-563.1 +/- 77.7	5.8 +/- 4.0	1320.7 +/- 22.0	2139.0 +/- 91.7	-1.6
IRF9-8	-9.6 +/- 6.4	1	19	20.1 +/- 0.1	-80.5 +/- 3.3	-234.4 +/- 39.0	15.1 +/- 0.6	1026.6 +/- 110.5	2283.8 +/- 72.5	-1.4
IRF9-9	15.6 +/- 13.6	5	5	14.2 +/- 0.9	-64.5 +/- 8.5	-279.4 +/- 28.9	18.1 +/- 4.1	1178.7 +/- 86.9	2190.6 +/- 116.5	-1.5
<b>IRF9-10</b>	-112.8 +/- 21.8	4	13	0.8 +/- 0.6	-90.0 +/- 4.1	-847.2 +/- 85.3	21.4 +/- 3.1	1252.7 +/- 51.7	2669.8 +/- 60.1	-2.3

*Anéxo I: constancias*

La Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería  
Delegación Yucatán  
otorga la presente

## Constancia

**S M B B**  
**DELEGACIÓN**  
**YUCATÁN**

a:

# María José Vega del Real

por su participación como Ponente con el trabajo titulado  
“*Análisis in silico de factores reguladores de interferón (IRF) y sus correspondientes interacciones ADN-proteína en el contexto del promotor del gen LGALS9*” en la modalidad CARTEL, presentado en el **X Congreso de Biotecnología y Bioingeniería del Sureste** el 11 de Febrero de 2021 a través de medios electrónicos.

Mérida, Yucatán, México, 12 de febrero de 2021

Dr. Juan Sandoval Gio  
Presidente de la SMBB Yucatán

Dr. José Efraín Ramírez Benítez  
Presidente del Comité Científico X CBBS



El Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica,  
la Universidad Nacional Autónoma de México, a través del  
Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología y la Facultad de Medicina,  
la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla,  
la Universidad Iberoamericana Puebla y  
la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla

otorgan la presente

## CONSTANCIA

a:

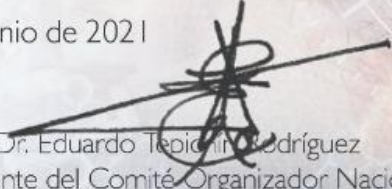
María José Vega Del Real, Jesús Aparicio Flores,  
Lorena Milflores Flores, Verónica Vallejo Ruiz

por su valiosa participación en el XI Congreso Nacional y I Internacional de Tecnología  
Aplicada a ciencias de la salud, con la presentación del cartel intitulado

“Análisis in silico de factores reguladores del interferón (IRFS) y sus correspondientes interacciones  
adn-proteína en el contexto del promotor del gen LGALS9”

Ciudad de México, 10, 11 y 12 de junio de 2021

  
Dra. Maquina Campos Castolo  
Presidente del Comité Organizador Local  
FACMED-UNAM

  
Dr. Eduardo Tepicini Rodríguez  
Presidente del Comité Organizador Nacional  
INAOE



Congreso  
Virtual  
Congress

XXII  
Congreso  
Nacional  
de Ingeniería  
Bioquímica  
Biochemical Engineering  
National Congress

XVIII  
Jornadas  
Científicas  
de Biomedicina y  
Biotecnología  
Molecular  
Biomedicine and Molecular  
Biotechnology Scientific  
Meetings

XI  
Congreso  
Internacional  
de Ingeniería  
Bioquímica  
Biochemical Engineering  
International Congress

# COLEGIO MEXICANO DE INGENIEROS BIOQUÍMICOS, A.C.

Biochemical Engineering Mexican Association

## CERTIFICATE OF PARTICIPATION

It is certified, that:

**María José Vega del Real, Jesús Aparicio Flores, Verónica Vallejo  
Ruiz, Lorena Milflores Flores**

Authors of the work:

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

Keyword: **MBT380VEG20210430**

Participated in the **poster** session of the Virtual Congress  
In the área: **Molecular Biotechnology, Bioinformatics and Nanotechnologies**

**June 30, July 01 and 02, 2021  
CDMX, México**

Raúl Chávez Alvirco, M. en R.I.  
President

Deifilia Ahuatzi Chacón, PhD  
Chair Scientific Committee