

# Estudio de las únicas fosfatasa de proteínas en tirosina de *Mycobacterium tuberculosis*, **PtpA y PtpB:**

sensibilidad de PtpB frente a diferentes  
agentes oxidantes y caracterización de la  
interacción entre el mutante PtpA D126A  
con extractos proteicos de macrófagos

Anne-Marie Labandera

Tutor: Dra. Andrea Villarino

Licenciatura en Bioquímica

Facultad de Ciencias - Universidad de la República

# Agradecimientos

En primera instancia agradezco a la Dra. Andrea Villarino por dejarme realizar la pasantía de grado bajo su tutoría, por su paciencia, amistad y especialmente, por haberme ayudado a crecer profesional y personalmente.

A las demás integrantes del grupo, Mariana Margenat y Lucía Rodríguez y a toda la Sección Bioquímica y Biología Molecular, en especial a los integrantes del laboratorio 305 por su gran compañerismo.

A Madia Trujillo, Gerardo Ferrer-Sueta, Mabel Berois, Natalia Olivero y Federico Carrión por la ayuda y consejos brindados en la realización e interpretación de los experimentos.

A mis amigas por estar siempre en todos estos años alentándome en este camino.

Y por último, pero no menos importante, a mi esposo, mis padres, hermanos y sobrino por estar en todo momento, en los altibajos de este camino recorrido.

## Resumen

La tuberculosis, enfermedad infecto-contagiosa causada por *Mycobacterium tuberculosis*, es un problema de Salud Pública Mundial por lo que es imprescindible comprender los mecanismos de la bacteria que median la interacción con su hospedero, el macrófago. Este trabajo está enfocado en avanzar en la caracterización del rol de las dos únicas fosfatasa de proteínas en tirosina de *M. tuberculosis*, PtpA y PtpB. Se utilizó la técnica de Resonancia Plasmónica de Superficie con el mutante PtpAD126A, para determinar las características de su interacción con extractos proteicos de macrófagos y optimizar las condiciones a utilizar en el aislamiento de sustratos de PtpA. En este ensayo se observó que la interacción detectada no es de carácter principalmente iónico y que PtpA D126A interacciona en mayor grado con los componentes del extracto proteico de macrófagos activados que sin activar. PtpA posee tres cisteínas (Cys11 catalítica, Cys16 y 53) y PtpB solamente una (Cys160) y como parte de la caracterización de estas fosfatasas se intentó determinar el pKa de sus cisteínas. Se encontraron tres pKa para PtpA ( $4.90 \pm 0.33$ ,  $6.19 \pm 0.52$  y  $8.55 \pm 0.48$ ) y tres para PtpB ( $4.90 \pm 0.50$ ,  $5.43 \pm 0.71$  y  $8.20 \pm 0.56$ ). Además, se estudió la sensibilidad de PtpB a dos agentes oxidantes, peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) determinando las constantes de inactivación ( $k_{inact}$ ). La  $k_{inact}$  de PtpB con  $H_2O_2$  es de  $10.72 \pm 0.08 M^{-1}s^{-1}$  y con  $ONOO^-$  es  $(1.22 \pm 0.08) \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ . Por último, buscando extender el estudio a otras fosfatasas de patógenos intracelulares se intentó clonar el gen *Imo0938* de *Listeria monocytogenes* que codifica una posible fosfatasa homóloga a la PtpA de *M. tuberculosis* sin tener éxito por el momento.

# Índice

1- Introducción .....	6
2- Objetivos generales y específicos .....	18
2.1- Optimizar las herramientas de aislamiento de sustratos de PtpA, utilizando el mutante PtpA D126A.....	18
2.2- Extender el estudio de sensibilidad a peróxido de hidrógeno y peroxinitrito para PtpB de M. tuberculosis. ....	18
2.3- Comenzar la caracterización de un homólogo de la PtpA de M. tuberculosis presente en L. monocytogenes. ....	18
3- Materiales y métodos.....	19
3.1- Expresión y purificación de PtpA wt, PtpA D126A y PtpB wt .....	19
3.1.1- Transformación química .....	19
3.1.2- Expansión y extracción de ADN plasmídico .....	19
3.1.3- Expresión de las proteínas recombinantes y lisis celular .....	21
3.1.4- Purificación por cromatografía de afinidad .....	22
3.1.5- Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	22
3.1.6- Diálisis.....	23
3.1.7- Purificación por Cromatografía de Exclusión Molecular .....	23
3.1.8- Determinación de la concentración de proteínas .....	24
3.1.9- Determinación de la actividad fosfatasa de las proteínas recombinantes .....	24
3.2- Resonancia Plasmónica de Superficie (SPR) .....	25
3.2.1- Acondicionamiento y activación del chip.....	25
3.2.2- Inmovilización y bloqueo .....	25
3.2.3- Ensayos de interacción proteína - proteína .....	26
3.3- Determinación del pKa de las cisteínas .....	27
3.3.1- Método del monobromobimano .....	27
3.3.2- Detección de grupos -SH libres con DTDPy.....	29
3.4- Sensibilidad de PtpB wt a diferentes agentes oxidantes .....	29

3.4.1- Sensibilidad de PtpB wt al peróxido de hidrógeno .....	29
3.4.2- Sensibilidad de PtpB wt al peroxinitrito .....	30
3.5- Clonado del gen <i>Imo0938</i> de <i>Listeria monocytógenes</i> .....	31
3.5.1- Diseño de Oligos y Reacción en cadena de la Polimerasa.....	31
3.5.2- Purificación de productos de PCR.....	32
3.5.3- Digestión con enzimas de restricción .....	32
3.5.4- Ligación del fragmento con el vector pET28a .....	33
3.5.5- Transformación de <i>E.coli</i> con el producto de ligación. ....	33
4- Resultados.....	35
4.1- Expresión y purificación de PtpA wt, PtpA D126A y PtpB wt .....	35
4.2- Estudio de la interacción entre PtpA D126A con extractos proteicos de macrófagos. .....	37
4.3- Evaluación del pKa de las cisteínas .....	41
4.4- Sensibilidad de PtpB wt a diferentes agentes oxidantes .....	45
4.5- Clonado del gen <i>Imo0938</i> de la cepa EGD-e de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	48
5- Discusión.....	52
6- Bibliografía.....	60

## Lista de abreviaturas

TB: tuberculosis

LB: Medio de cultivo Luria - Bertani

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

PTP: Proteína-Tirosina Fosfatasa

D: Aspartato

A: Alanina

C: Cisteína

R: Arginina

S: Serina

Y: Tirosina

IPTG: Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido

IPMon: Institut Pasteur de Montevideo

DTT: Ditiotreitól

DTPA: ácido dietilentriaminopentaacético

MES: (2-N-Morfolina) Ácido Etanosulfónico

DTPy: ditiopirimida

pNPP: p-Nitrofenil Fosfato

NHS: N-Hidroxisuccinimida

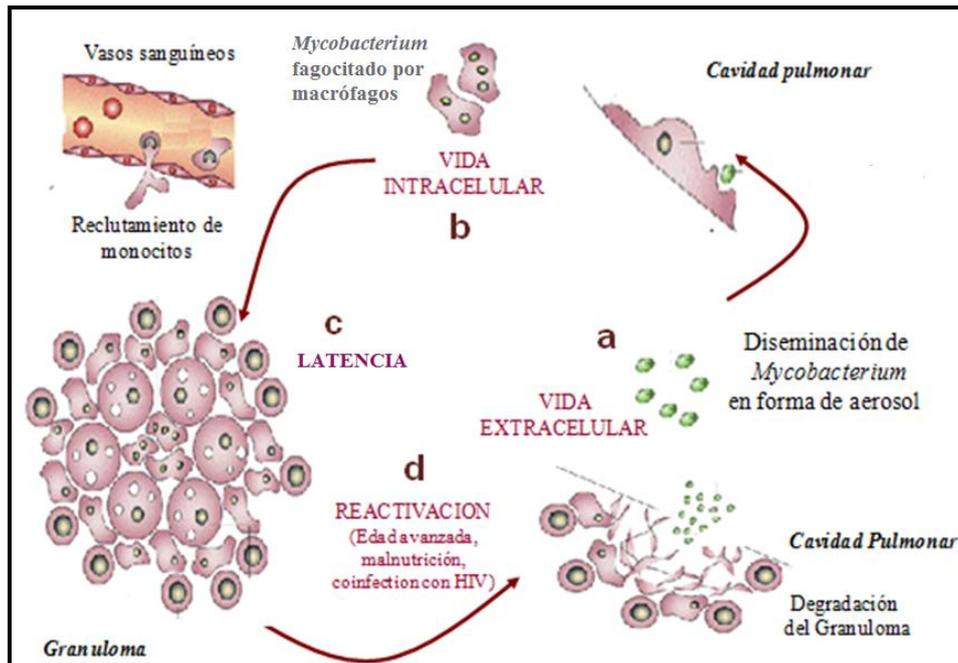
EDC: 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

wt: "wild type", tipo salvaje

# 1- Introducción

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa y contagiosa que ha estado presente en la humanidad desde tiempos inmemorables. Investigadores encontraron manifestaciones de esta enfermedad en momias egipcias (1,2). La TB provoca más de 1.5 millones de muertes por año (Global TB control WHO: report 2010, [www.who.int](http://www.who.int)). En Uruguay se registran más de 600 nuevos casos y 150 muertes por año, concentrándose en especial en las zonas de mayor tránsito como Montevideo, Canelones y Maldonado, así como en las zonas fronterizas con Brasil ([www.chlaep.org.uy](http://www.chlaep.org.uy)). En Brasil, se registran por año aproximadamente 80.000 nuevos casos de TB y 6.000 muertes ([www.datasus.gov.uy](http://www.datasus.gov.uy)). El agente causante de esta enfermedad es *Mycobacterium tuberculosis*, bacteria aeróbica y patógena intracelular, identificada por Robert Koch en 1882 (1,3,4). La infección comienza por la inhalación de aerosoles que contienen *M. tuberculosis* provenientes de la tos de pacientes con TB pulmonar activa. Durante esta fase de vida extracelular (Figura 1a) las bacterias se encuentran en gotas muy pequeñas, logran vencer las primeras barreras inmunológicas en los bronquios (mucus y cilias) y son capaces de llegar a los alveolos en donde son fagocitados, principalmente por los macrófagos (Figura 1b) (2). El riesgo de que un individuo se contagie depende del grado de contacto con la persona enferma, de la carga bacteriana inhalada y de su estado inmunológico. La mayor parte de los individuos infectados desarrolla una respuesta inmune efectiva mediada por células de 2 a 8 semanas pos-infección, la cual impide que la bacteria se siga multiplicando. Los macrófagos infectados junto con otras células del sistema inmune forman el granuloma, el cual se rodean de tejido necrótico para evitar que continúen expandiéndose las bacterias. Allí la mayor parte de las bacterias muere aunque en algunas personas *M. tuberculosis* es capaz de evadir el sistema inmune logrando sobrevivir en el hospedero en un estado no replicativo, normalmente denominado latencia (Figura 1c). *M. tuberculosis* puede permanecer en este estado de latencia por muchos años hasta su reactivación por edad avanzada de la persona infectada, malnutrición o condiciones que comprometen el sistema inmune como la co-infección con VIH, diabetes mellitus, falla renal o terapias con inmunosupresores (Figura 1d) (2,5,6,7).



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Mycobacterium tuberculosis* (Adaptado de Russell, 2001) (7).

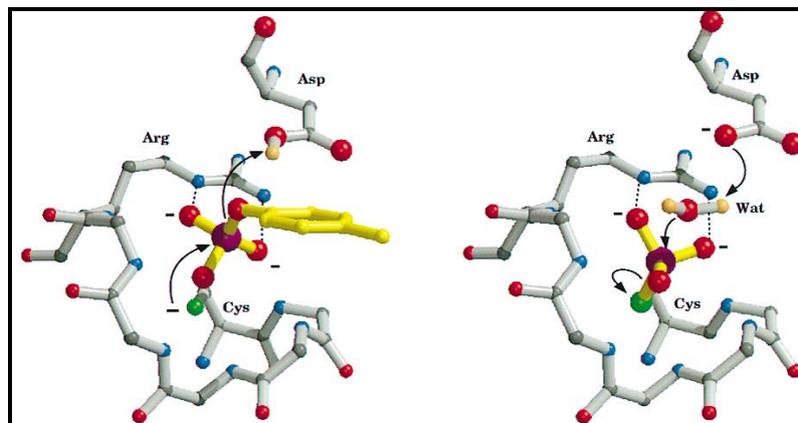
La vacuna que existe contra la tuberculosis es la Bacille Calmette-Guérine (BCG). Esta vacuna se ha usado por décadas, sin embargo, no previene en forma satisfactoria la enfermedad en adultos. Se ha observado que la exposición a micobacterias ambientales debilita la respuesta inmune provocada por la vacuna BCG, muchas personas eliminan la BCG antes de que se pueda desarrollar una respuesta inmune protectora y diferentes cepas de *M. tuberculosis* han logrado adaptarse a sus hospederos a lo largo de la evolución, aumentando así su grado de virulencia y persistencia (3). Actualmente se utiliza una quimioterapia de una duración de 6 meses como tratamiento de esta enfermedad. Se basa en una fase inicial de 2 meses que combina el uso de isoniazida (inhibidor de la síntesis de ácido micólico), rifampicina (inhibidor de la síntesis de ácidos nucleicos), pirazinamida (afecta el transporte y el potencial de la membrana) y estambutol (inhibidor de la síntesis de arabino-galactano). La segunda fase del tratamiento tiene una duración de 4 meses y combina sólo el uso de isoniazida y rifampicina. En ese tiempo el 95% de las personas se curan. Sin embargo existen cepas de *M. tuberculosis* con diferentes grados de sensibilidad a las drogas utilizadas. Los individuos infectados con cepas resistentes a los antibióticos descritos deben realizar un tratamiento prolongado de hasta 24 meses combinando de 8 a 10 drogas y sólo entre el 50-70% de las personas se curan. Es más, a causa de los largos y costosos tratamientos, la

falta de suministro de estas drogas por parte de muchos sistemas de salud, así como la inconstancia o abandono de la toma diaria de los antibióticos ha favorecido la aparición de cepas resistentes a algunos de los antibióticos descritos anteriormente (“Multidrug Resistant TB” – MDR-TB) e incluso a todas las drogas existentes (“Extensive Drug Resistant TB” – XDR-TB) lo que genera una alta mortalidad entre los que las poseen (4,8) En conclusión, la tuberculosis continúa siendo un problema de Salud Pública Mundial a causa de la inexistencia de una vacuna efectiva, de quimioterapias más cortas, menos costosas, disponibles para toda la población infectada y sobre todo efectivas contra las cepas de *M. tuberculosis* multi-resistentes y en estado de latencia. La búsqueda de nuevos tratamientos permanece abierta y para ello estudiar y comprender los mecanismos de acción de la bacteria que median la interacción con el hospedero es fundamental, en especial el rol de enzimas responsables de los procesos de señalización celular, como las fosfatasas y quinasas.

Las fosfatasas son componentes claves en todos los organismos participando junto a las quinasas en la regulación por defosforilación/fosforilación de numerosos mecanismos de señalización celular. Estas proteínas se clasifican según su secuencia en tres grandes grupos. El primer grupo actúa sobre sustratos fosforilados en serina o treonina el cual se divide en dos familias: las fosfatasas específicas de serina y treonina (“Ser/Thr-specific phosphoprotein phosphatase”-Ser/Thr-PPP) y la familia de fosfatasas dependientes de  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  para su actividad (“ $Mg^{2+}/Mn^{2+}$ -dependent phosphoprotein phosphatase”-PPM). El segundo grupo corresponde a las proteínas fosfatasas basadas en aspartato, residuo conservado en el sitio activo que actúa como nucleófilo en la hidrólisis del fosfo-sustrato. Algunos miembros de este grupo tienen actividad fosfatasa de proteínas fosforiladas en tirosina o serina. El tercer grupo es el de la familia de fosfatasas que actúan sobre sustratos fosforilados en tirosina (“protein tyrosine phosphatase”-PTP) (9,10). La familia de las PTPs posee un dominio catalítico conservado cuya secuencia es  $CX_5RS/T$ . Se clasifican en dos clases: (i) una clase que incluye las PTPs clásicas que defosforilan sustratos fosforilados en tirosina, las PTPs con doble especificidad (“dual-specificity phosphatases”-DSP) las cuales pueden defosforilar sustratos fosforilados tanto en tirosina como en serina/treonina. Esta clase está

constituida por proteínas de aproximadamente 250 aminoácidos, de peso molecular cercano a 30 kDa; (ii) las PTPs de bajo peso molecular (“low molecular weight PTPs”-LMW PTPs) constituidas por proteínas de aproximadamente 150 aminoácidos y peso molecular cercano a 18 kDa. Los miembros de esta clase poseen, además de la secuencia conservada de las PTPs, otra secuencia conservada (DPY) en la que el aspartato es el catalítico. (11,12,13).

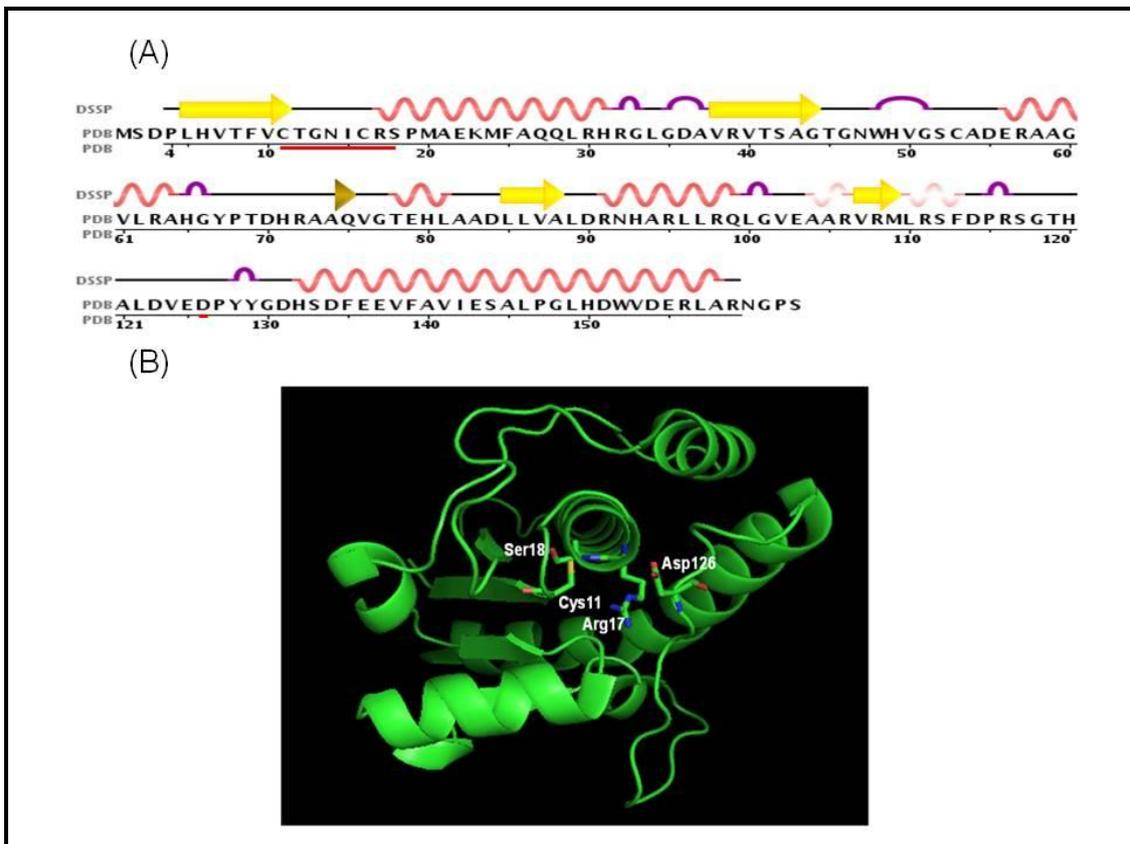
Todas las PTPs poseen un mecanismo catalítico común que se puede describir en dos etapas (Figura 2). En la primer etapa la cisteína catalítica, cuyo grupo tiol (-SH) existe como tiolato (-S<sup>-</sup>), realiza un ataque nucleofílico al grupo fosfato unido a la tirosina del sustrato formándose un intermediario cisteinil-fosfato. El grupo saliente tirosil es protonado por un residuo catalítico de aspartato. La segunda etapa es la hidrólisis del intermediario cisteinil-fosfato mediada por un residuo de arginina o glutamina el cual coordina una molécula de agua, y el residuo catalítico de aspartato, el cual funciona ahora como base resolviendo la liberación del grupo fosfato y regenerando la PTP (14).



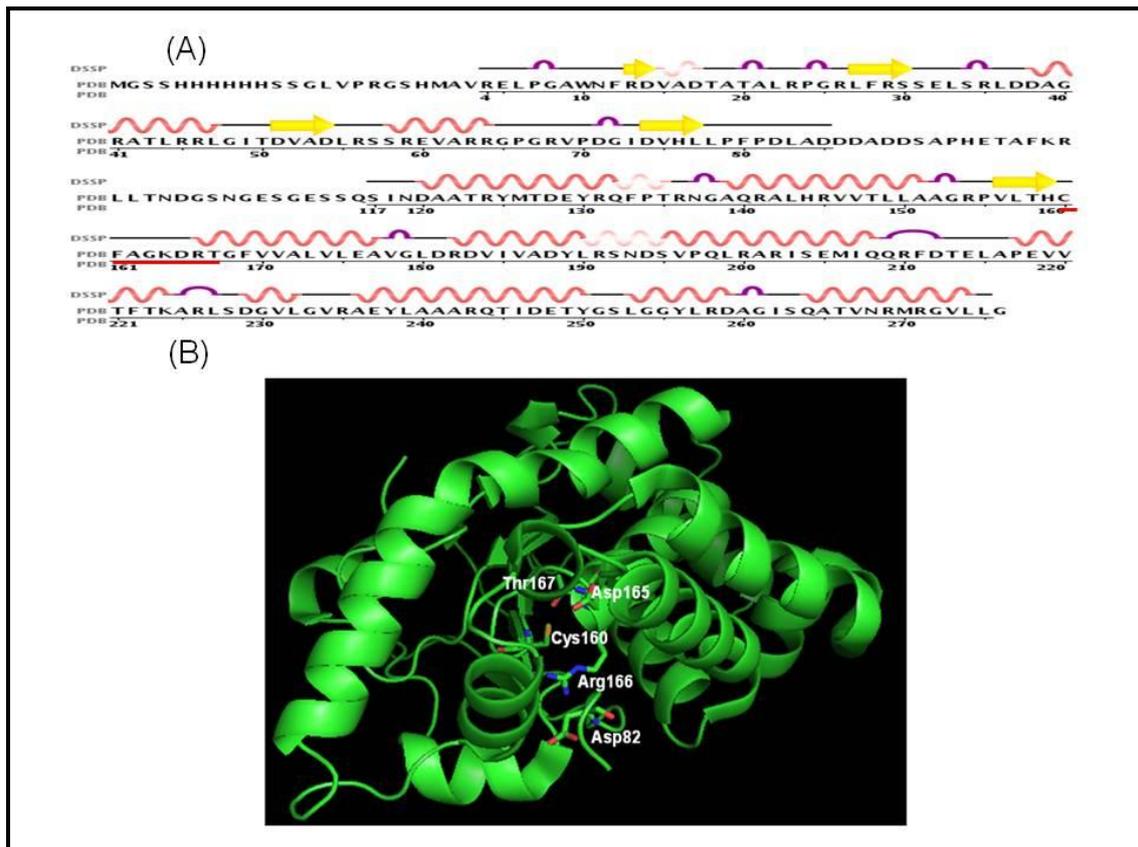
**Figura 2.** Esquema del mecanismo catalítico de las PTPs, fosfatasas que actúan sobre sustratos fosforilados en tirosina (PTP); extraída de Denu *et al.*, 1996 (15).

*M. tuberculosis* posee únicamente dos PTPs, PtpA (Figura 3) y PtpB (Figura 4). PtpA pertenece a la familia de las LMW PTPs y está presente en todas las actinobacterias. Esta PTP defosforila únicamente sustratos fosforilados en tirosina (16). Posee sólo un 37 % de homología de secuencia con la PTP humana 1BPTP pero una alta similitud estructural (17,18). PtpB no posee un homólogo humano e inicialmente fue descrita como una DSP-PTP con actividad sobre sustratos

fosforilados en tirosina y serina/treonina (19). Posteriormente, se descubrió que esta fosfatasa también tiene actividad fosfatasa sobre fosfoinositol sustratos. Hoy en día, se cree que PtpB forma parte de una nueva familia de fosfoinositol fosfatasas (“Atypical Lipid Phosphatase”-ALP) que contiene una secuencia consenso en el sitio activo (HCXXGKDR) que comparte características con las fosfatasas lipídicas eucariotas (KDR) y con las PTPs (CX<sub>5</sub>RS/T) (20,21).



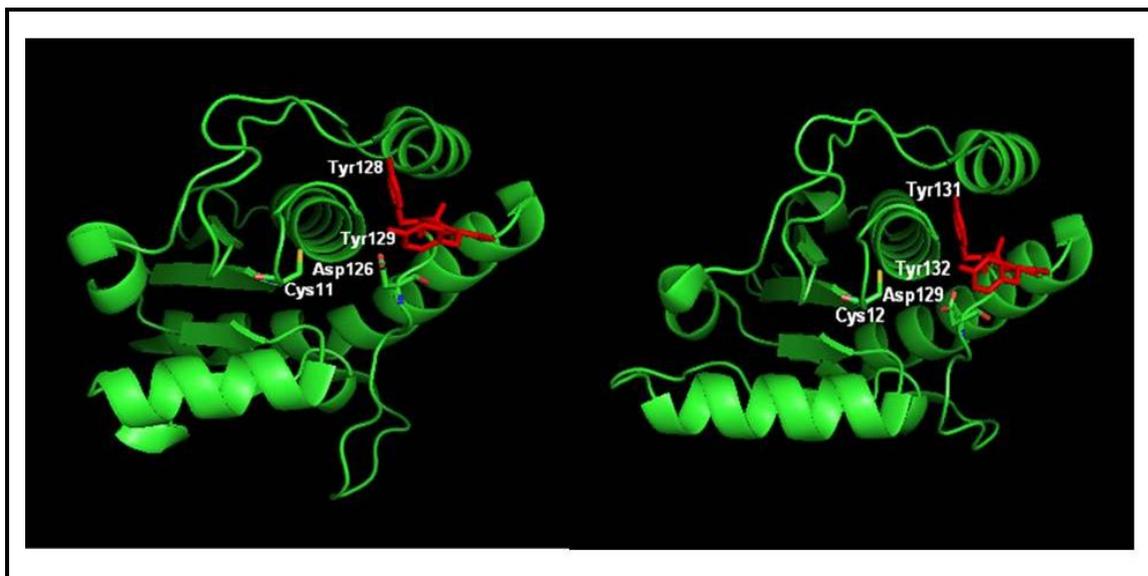
**Figura 3.** (A) Estructura primaria y secundaria de PtpA de *M. tuberculosis* (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>). Los residuos subrayados en rojo indican en la región N-terminal la secuencia conservada de las PTPs (CX<sub>5</sub>RS/T) conteniendo la Cys 11 catalítica y hacia el extremo C-terminal el Asp126 catalítico en la región conservada DPY. (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>) (B) Diagrama en cintas de la estructura cristalográfica de PtpA de *M. tuberculosis* (PDB 1U2P), realizada utilizando el programa PyMol (DeLano Scientific LLC, EUA).



**Figura 4.** (A) Estructura primaria y secundaria de PtpB de *M. tuberculosis* (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>). Los residuos subrayados en rojo indican la secuencia conservada de las DSP PTPs (CX<sub>5</sub>RS/T) conteniendo la Cys 160 catalítica y el Asp 165 catalítico y la secuencia conservada de las fosfatasa con actividad sobre fosfoinositol sustratos (KDR). (B) Diagrama en cintas de la estructura cristalográfica de PtpB de *M. tuberculosis* (PDB 1YWF) realizada utilizando el programa Pymol (DeLano Scientific LLC, EUA).

Estudios de localización subcelular utilizando anticuerpos contra PtpA y PtpB demuestran que ambas se encuentran tanto dentro como fuera de la bacteria, lo que sugiere que son secretadas dentro del hospedero (células de macrófagos). Sin embargo, en la secuencia de PtpA y PtpB no se detecta péptido señal y no se conoce aún el mecanismo implicado para que la secreción ocurra (22,23,16). También, se observó que durante la infección de macrófagos humanos con *M. tuberculosis*, el uso de anticuerpos neutralizantes contra PtpA, expresados en el citosol de macrófagos, reduce la supervivencia de la bacteria. Los sustratos de PtpA y PtpB podrían ser, entonces, proteínas (y/o lípidos para PtpB) que se encuentren dentro del macrófago, no pudiéndose descartar también, moléculas de la bacteria. Por otro lado, hasta el año 2009, esto se veía apoyado por la ausencia en el

genoma de *M. tuberculosis* de una tirosin-quinasa típica (“phospho-tyrosine kinase”–PTK), pero en ese año fue demostrada la actividad PTK del producto de un gen contiguo a PtpA denominada como PtkA. Esta proteína no contiene los motivos conservados característicos de las PTK típicas, sin embargo tiene la capacidad de autofosforilarse y es capaz de fosforilar *in vitro* a PtpA en los residuos de tirosina 128 y 129, ambas localizadas en el mismo loop que el aspartato catalítico (Figura 5). El rol de cómo la fosforilación de dichas tirosinas afecta la actividad de la PtpA no fue aún evaluado, aunque se sugiere podría ser necesaria para regular su actividad o como señal para indicar su secreción (24). En el caso del homólogo humano de PtpA, 1BPTP se ha descrito la fosforilación de los residuos de tirosina 131 y 132, y se sabe que dicha fosforilación es esencial para el mantenimiento de la actividad fosfatasa (Figura 5) (25).



**Figura 5.** Diagrama en cintas de las estructuras cristalográficas de PtpA de *M. tuberculosis* a la izquierda (PDB 1U2P) y su homólogo humano PTPB1 a la derecha (PDB 1XWW). Puede observarse en ambas las dos tirosinas citadas en el texto, que se encuentran en el mismo loop que el aspartato catalítico. Las figuras fueron realizadas utilizando el programa Pymol (DeLano Scientific LLC, EUA).

Si bien ni PtpA ni PtpB son esenciales para el crecimiento de la bacteria en medios ricos, lo que sí parece claro es su efecto en la virulencia de la bacteria durante la infección. Para PtpA se observó que la supresión del gen que codifica para esta PTP disminuye la supervivencia en 2 log luego de 48 horas pos-infección, con la micobacteria, de macrófagos humanos THP-1 y de 3 log en 72 horas pos-infección

(26). Para PtpB al infectar macrófagos murinos activados J774A.1 con la cepa  $\Delta ptpB$  de *M. tuberculosis* también se observó una disminución en la supervivencia de la bacteria pero de 1 log y sólo a los 4 días pos-infección. Sin embargo, en el experimento *in vivo* en cobayos se ve la misma disminución recién a las 6 semanas (27). Asimismo, la importancia de PtpB para la sobrevivencia intracelular de *M. tuberculosis* se confirmó mediante un estudio en el cual inhibidores específicos de PtpB disminuyeron sustancialmente la sobrevivencia de la micobacteria dentro de los macrófagos murinos (28).

Dada la dificultad metodológica para encontrar sustratos de fosfatasa, el conocimiento de las vías de señalización en las que ellas participan se ha visto limitado. Un método que se ha utilizado para aislar sustratos de tirosín fosfatasa es el llamado "Substrate-Trapping mutants" basado en el uso de un mutante puntual del sitio activo de la tirosín fosfatasa para atrapar potenciales sustratos. Dependiendo de la mutación introducida, la enzima pierde totalmente la actividad ( $Cys_{\text{catalítica}} \rightarrow Ser$ ), o presenta una disminución en su constante catalítica ( $Asp_{\text{catalítico}} \rightarrow Ala$ ); lo que permite atrapar el sustrato en el sitio activo y aislar el complejo enzima-sustrato. La magnitud de la disminución de la constante catalítica depende del sustrato que se utiliza para evaluar la actividad enzimática (un sustrato artificial, un péptido fosforilado o una proteína fosforilada) (29,30). Utilizando ésta metodología se aisló un sustrato de PtpA a partir de extractos proteicos de macrófagos no activados (26). El mismo fue identificado como una tirosín-quinasa del macrófago llamada VPS33B ("Human Vacuolar Protein Sorting 33B"). Según los autores PtpA defosforila VPS33B, lo que desencadenaría la inhibición de la fusión del fagosoma con el lisosoma en el macrófago. Si se analiza dicho trabajo con detenimiento, puede observarse que durante el ensayo de "substrate-trapping" son aisladas numerosas proteínas y dicho resultado no se discute en profundidad. En efecto, esta metodología presenta como desventajas la probabilidad de capturar proteínas abundantes, proteínas que no estén interaccionando específicamente a través del sitio activo de la fosfatasa, que se atrapen mucho más de una proteína, e incluso que se pierda especificidad debido a la alteración del sitio activo como consecuencia de la introducción de la mutación en la fosfatasa (31,32). Estudios preliminares de nuestro grupo demuestran que utilizar la técnica de Resonancia

Plasmónica de Superficie (SPR) previo a la técnica de “Substrate-Trapping” puede ser una estrategia útil para recaudar información de las características de la interacción entre la fosfatasa y el extracto proteico que pueda luego ser utilizada en disminuir la aparición de interacciones no específicas (33). Sin embargo dichos resultados deben ser confirmados para darles la validez que corresponde. En efecto, una de las aplicaciones de la técnica de SPR es el estudio de las interacciones entre proteínas y consiste en inmovilizar covalentemente en un chip la proteína en estudio la cual luego, se pone en contacto con una fase móvil conteniendo la segunda proteína o una mezcla de proteínas simulando el ambiente fisiológico (34).

Para PtpB no se han aislado sustratos aún, sin embargo se ha propuesto que su rol sería interferir con la señalización mediada por interferón gamma en macrófagos. Mediante evidencias indirectas, se sugiere que PtpB defosforilaría dos quinasas del macrófago (ERK1/2 y p38), bloqueando la producción de IL-6 e inhibiendo así la respuesta inmune innata del hospedero. Asimismo, PtpB activaría en paralelo la vía mediada por la quinasa Akt, inhibiendo la apoptosis de los macrófagos, lo que permitiría la persistencia de la bacteria dentro de las células eucariotas (35). Además, como se describió anteriormente, PtpB podría defosforilar fosfoinositol sustratos por lo que se postuló que PtpB podría ser capaz de alterar el metabolismo del fosfoinositol, y las vías de señalización asociadas que juegan un rol importante en la maduración del fagosoma (21).

Otro aspecto de las PTPs, descrito principalmente en fosfatasas eucariotas, y que ha cobrado importancia en los últimos tiempos es la inhibición de la actividad fosfatasa a través de la oxidación de su cisteína catalítica. Dicha oxidación cuando es reversible se postula como un nuevo nivel de regulación de las tirosín fosfatasas implicadas en procesos de señalización celular (36,37,38). Hoy en día, es aceptada la idea de que las modificaciones pos-traduccionales mediadas por especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y NOS) juegan un papel crítico en la actividad biológica de ciertas proteínas y existen evidencias que muestran que los residuos de cisteínas en las proteínas podrían actuar como sensores redox en respuesta a ROS que se encuentran cercanos (39). Es así que se cree que las PTPs actuarían como mediadores de la relación entre los niveles celulares de ROS



El peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) es un agente oxidante y nitrante muy potente que se forma a partir de la reacción entre el óxido nítrico (NO) y el anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ). El  $\text{ONOO}^-$  al igual que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es capaz de atravesar membranas biológicas y puede interaccionar con sus moléculas blanco en células adyacentes. Puede oxidar las moléculas en forma directa, en su mayoría tioles y centros hierro-sulfurados de proteínas, o en forma indirecta a través de la generación de radicales libres muy reactivos que luego modifican otros residuos de la proteína. Se ha observado que el residuo de cisteína conservado de las PTPs es muy sensible a la oxidación e inactivación por  $\text{ONOO}^-$  lo que podría potenciar la señalización a través de fosfotirosinas (43,44,45,46,47). Como antecedente de nuestro grupo, y gracias al trabajo realizado por la Dra. Madia Trujillo y el MSc. Martín Hugo, contamos con un primer valor de  $k_{\text{inact}}$  con  $\text{ONOO}^-$  para PtpA de *M. tuberculosis* dos o tres órdenes menor ( $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) que los reportados en la literatura para otras PTPs (Tabla 2). Estos resultados han motivado ampliar el estudio para la PtpB de *M. tuberculosis*.

PTP	$k_{\text{inact}} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	Ref.
CD45	$2.0 \times 10^8$	(47)
LAR	$2.3 \times 10^7$	(47)
PTP1B	$2.2 \times 10^7$	(47)

**Tabla 2.** Constantes de inactivación de distintas PTPs con  $\text{ONOO}^-$ .

Por último, existen diversos patógenos intracelulares bacterianos como *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia* y virales como *Vaccinia* que utilizan quinasas o fosfatasa para interferir con la señalización celular del hospedero, favoreciendo su supervivencia y propagación mediante la alteración del tráfico y maduración vesicular, la organización del citoesqueleto o la inhibición de la expresión de genes implicados en la respuesta inmunitaria (48,49,50,51,52). En este sentido nuestro grupo se encuentra extendiendo el estudio a otras fosfatasa de patógenos intracelulares, en particular *Listeria monocytogenes*. Recientemente se ha caracterizado el producto del gen *Imo1800* de *Listeria monocytogenes* como una tirosín-fosfatasa, LipA, que presenta actividad *in vitro* sobre sustratos proteicos y lipídicos, tal como fue demostrado por PtpB de *M. tuberculosis*, con quien comparte gran homología estructural a pesar de la baja homología de secuencia (27%) (51). El homólogo de PtpA codificado por el gen *Imo0938* de *Listeria monocytogenes*, que

presenta una homología de secuencia de 32% con PtpA de *M. tuberculosis* y posee la secuencia de aminoácidos conservados CX<sub>5</sub>SR/T y DPY de las LMW PTPs (Figura 7) aún no ha sido caracterizado, por lo cual sería interesante hacerlo.

```

MPtpA 5 LHVTFVCTGNICRSPMAEKMFQQLRHRGLGDAVRVTSAGTGNWHVHGSCADERAAGVLR 64
Lmo938 2 VKVVEVCLGNICRSPMAEGLFRKEVANAGLTDEIKIDSAATGTWNLGKPPHRGTQEV LKK 61

MPtpA 65 HGYPTDHRAAQV---GTEHLAADLLVALDRNHARLLRQLGVEA-ARVRMLRSFDPRSGT 119
Lmo938 62 HG--VDYQAMRARKISDADEFKEADFIIGMDQQNLADLNALNNNPV IIRSLMSF--VSGQ 117

MPtpA 120 HALDVEDPYYGDHSDFEFVFAVIESALPGLHDWVDER 156
Lmo938 118 EDKDIPDPYY--TGDFDETERMVTEGVKALLAYITKK 152

```

**Figura 7.** Comparación mediante la realización de un Blast de la secuencia de aminoácidos de PtpA de *M. tuberculosis* y la posible fosfatasa de proteínas en tirosina de *L. monocytogenes*. En rojo se muestra la secuencia conservada de las LMW PTPs (CXXXXCRS/T), la secuencia DPY siendo D126 en *M. tuberculosis* el aspartato catalítico.

## **2- Objetivos generales y específicos**

### **2.1- Optimizar las herramientas de aislamiento de sustratos de PtpA, utilizando el mutante PtpA D126A.**

Aplicar el uso de la técnica de Resonancia Plasmónica de Superficie para determinar las características de la interacción entre el mutante PtpA D126A de *M. tuberculosis* y diferentes extractos de proteínas de macrófagos.

### **2.2- Extender el estudio de sensibilidad a peróxido de hidrógeno y peroxinitrito para PtpB de *M. tuberculosis*.**

Determinar para PtpB wt de *M. tuberculosis* la constante de inactivación con peróxido de hidrógeno y peroxinitrito.

### **2.3- Comenzar la caracterización de un homólogo de la PtpA de *M. tuberculosis* presente en *L. monocytogenes*.**

Clonar el gen de *L. monocytogenes* que codifica una posible fosfatasa homóloga a la PtpA de *M. tuberculosis*.

## 3- Materiales y métodos

### 3.1- Expresión y purificación de PtpA wt, PtpA D126A y PtpB wt

#### 3.1.1- Transformación química

Se transformó el vector pET28a conteniendo el gen de *ptpA wt*, *ptpA D126A* y *ptpB wt* en *Escherichia coli* BL-21-DE3 quimiocompetentes preparadas según Mandel *et al*, 1970 (53). El procedimiento consistió en descongelar en hielo una alícuota de 100  $\mu$ L de células competentes durante 10 minutos, pasado ese tiempo se agregó 3  $\mu$ L del plásmido correspondiente, se incubó 20 minutos en hielo, 90 segundos a 42°C y 2 minutos nuevamente en hielo. Luego se agregaron 500  $\mu$ L de medio LB y se incubó 1 hora a 37°C bajo agitación de 200 r.p.m. El plásmido pET 28a porta un gen de resistencia a la kanamicina, por lo cual se sembraron 200  $\mu$ L de las células transformadas en placas de LB Agar conteniendo 50  $\mu$ g de antibiótico por mL de medio de cultivo. Las placas se incubaron en estufa a 37°C por 16 horas para el crecimiento de las colonias. La figura 8 muestra el vector utilizado pET 28a y el sitio en dónde se encuentra clonada la *ptpA wt*, *ptpA D126A* y *ptpB wt* (construcciones obtenidas previamente por la Dra. Andrea Villarino en el Institut Pasteur de Paris). El gen resultante codifica la proteína conteniendo en el extremo N-terminal un His-tag seguido de un sitio de corte para trombina.

#### 3.1.2- Expansión y extracción de ADN plasmídico

El stock de plásmidos, el vector pET 28a conteniendo los genes de *ptpA wt*, *ptpA D126A* y *ptpB wt*, se expandió mediante transformación de células quimiocompetentes de *Escherichia coli* XL-1 blue, utilizando el mismo protocolo de transformación de las células de *Escherichia coli* BL-21-DE3. Posteriormente, una colonia de la placa conteniendo transformantes se inoculó en 3 mL de medio LB-kanamicina, dicho procedimiento se repitió para varias colonias aisladas de la placa. Los precultivos se incubaron a 37°C bajo agitación de 200 r.p.m. por 16 horas, se centrifugó 2 minutos a 12000 r.p.m. y se descartó el sobrenadante. El pellet se



sobrenadante y se lavó el pellet con 750  $\mu$ L de Etanol 70 % frío. Se centrifugó a 12,000 r.p.m. 5 minutos a temperatura ambiente, descartándose todo el sobrenadante restante y se secó el pellet bajo lámpara para finalmente resuspenderlo en 35  $\mu$ L de agua mQ. El stock de plásmido se analizó en gel de agarosa al 1% y las alícuotas se almacenaron a -20°C.

### 3.1.3- Expresión de las proteínas recombinantes y lisis celular

Se realizó un precultivo en medio LB-kanamicina inoculando unas cinco colonias de *E.coli* BL21 DE3 de la placa conteniendo transformantes preparada como se describe en el punto 3.1.1. Los tubos se incubaron a 37°C bajo agitación de 200 r.p.m. por 16 horas. Pasado ese tiempo se diluyó el precultivo en medio LB-kanamicina fresco (1.25 mL de precultivo: 1.25 L de medio). El cultivo se incubó a 37°C bajo agitación 180 r.p.m. hasta llegar a una DO a 600 nm de entre 0.7-0.9, correspondiente al final de la fase exponencial, tal como fue optimizado previamente (33). El vector de expresión utilizado contiene el promotor del operón lac, por lo cual se activó la expresión de la proteína de interés mediante el agregado de 0.5 mM final de un inductor no metabolizable, el Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). La inducción se realizó a 15°C bajo agitación de 180 r.p.m. por 16 horas. El IPTG debe adicionarse una vez que el cultivo llega a 15 °C, no antes. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 4°C y 6000 r.p.m. por 15 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 1 mL de tampón de lisis por cada 0.05 gramos de pellet húmedo. Para este paso se preparó tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, 1 mM final de  $\beta$ -Mercaptoetanol y 10% Glicerol). La suspensión celular fue suplementada con inhibidores de proteasas libre de EDTA (una pastilla cada 50 mL de tampón de lisis) y 0.1 mg/mL final de lisozima, esta última con la finalidad de debilitar las paredes celulares. Las células fueron lisadas por sonicación a 4°C con una amplitud de 25 % y 10 pulsos de 1 minuto con descansos de 1 minuto entre cada pulso manteniendo en todo momento el frío y homogeneizando cada vez la suspensión. Luego, la suspensión se centrifugó a 4°C y 15000 r.p.m. por 1 hora recuperándose el sobrenadante de la lisis el cual se filtró por 0.22  $\mu$ m. Resultados previos del grupo demostraron que en estas condiciones la proteína expresa principalmente en la fracción soluble (33).

### 3.1.4- Purificación por cromatografía de afinidad

La presencia de una cola de histidinas (His-tag) en las proteínas recombinantes producidas permitió su purificación por cromatografía de afinidad ("Immobilized metal ion affinity chromatography"-IMAC) la cual se basa en la interacción del grupo imidazol de las histidinas, quien actúa como dador de electrones, al metal inmovilizado ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  o  $\text{Ni}^{2+}$ ) al grupo ácido iminodiacético presente en la matriz de Sefarosa (54). Así, la proteína de interés queda retenida en la columna separándose de las demás proteínas. Para eluir la proteína de la matriz se debe romper la interacción por afinidad con un competidor como el imidazol o por disminución del pH (55). Como matriz se utilizó Sefarosa comercial ("Chelating Sepharose"-GE Healthcare) a la cual se le realizó un preacondicionamiento como indica el fabricante. Un volumen de 3 mL de matriz se colocaron en una PD-10 vacía y se lavó con 2 volúmenes de columna (VC) de agua y luego se pasaron 0.2 VC de una solución de  $\text{Cu}^{2+}$  0.2 M. El exceso de metal se eliminó con 5 VC de agua y 5 VC de tampón Acetato de Sodio 0.02 M, pH 4 conteniendo 1M de NaCl. Al finalizar dicho procedimiento la matriz se equilibró con 2 VC de tampón de inmovilización (Tris-HCl 0.05 M, pH 7.0, NaCl 1.0 M,) y se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente bajo agitación por rotación en un falcon de 50 mL con el sobrenadante de lisis filtrado y previamente su pH ajustado a 8. Se recolectó el percolado, el cual contiene las proteínas que no quedaron retenidas en la matriz. Luego, en una PD-10 vacía se realizaron 3 lavados de la matriz con 5 mL de tampón de lisis (L0), 3 lavados con tampón de lisis suplementado con 10 mM final de Imidazol (L1) y 3 lavados con tampón de lisis suplementado con 20 mM final de Imidazol (L2). La elución de las proteínas recombinantes se realizó con tampón de lisis suplementado con 300 mM final de imidazol. Se realizaron 6 eluciones (E1 a E6) de 3 mL cada una. Las diferentes fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE.

### 3.1.5- Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se prepararon geles de poliacrilamida para analizar las distintas alícuotas obtenidas durante la purificación de las proteínas recombinantes. Los geles fueron de 1 mm de espesor siendo el gel concentrador al 4 % y el gel separador al 12 o 15 %. Las corridas electroforéticas se realizaron con tampón de corrida 25 mM Tris pH

8.3, 192 mM Glicina, 0.1% SDS, en una cuba de electroforesis (Tetra Cell-Bio-rad) a 200 V por 45 minutos. El gel se tiñó con una solución de Coomassie blue R250 0.2% (w/v), 30% (v/v) etanol, 7% (v/v) ácido acético y luego se decoloró con una solución de 30% (v/v) etanol y 7% (v/v) ácido acético (56).

### 3.1.6- Diálisis

Con las alícuotas conteniendo la proteína recombinante se realizó un pool (18 mL) el cual se colocó en una membrana de diálisis con un  $k_{off}$  de 6.5 kDa ("Dialysis Tubing Cellulose Membrane"-Sigma Aldrich). Para la diálisis se utilizó un tampón 20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 0.5 M de NaCl, 10 % de Glicerol, 3 mM de DTT y 5 mM de EDTA, conteniendo además concentraciones decrecientes de imidazol. La primera fase de la diálisis se realizó por 16 horas con tampón suplementado con 150 mM de imidazol. La segunda fase tuvo una duración de 2 horas y se realizó en tampón con 75 mM de imidazol seguido por otra de 2 horas con tampón de diálisis suplementado con 35 mM de imidazol. La última diálisis se realizó por 2 horas, contra un tampón de diálisis sin imidazol y una concentración de NaCl de 50 mM. Todas las diálisis se realizaron a 4°C con agitación. Luego de dializar, el pool se centrifugó a 12,000 r.p.m. a 4°C y posteriormente se concentró la proteína recombinante en concentradores con un  $k_{off}$  de 10 kDa (Amicon Ultra15-Millipore) hasta un volumen de aproximadamente 5-10 mL, dependiendo la aparición de precipitación. La proteína concentrada fue almacenada a 4°C hasta su análisis por SDS-PAGE y purificación por cromatografía de exclusión molecular.

### 3.1.7- Purificación por Cromatografía de Exclusión Molecular

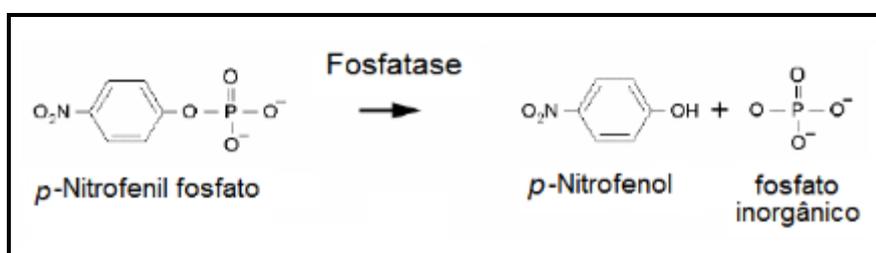
Se le realizó una gel filtración (AKTA- Basic System del IPMon) para eliminar contaminantes de alto peso molecular observados en el gel SDS PAGE. Se utilizó una columna Superdex 200-16/60 (GE). La columna de 120 mL fue lavada con al menos 1 VC de agua mQ y equilibrada con 2 VC del último tampón que se utilizó en la diálisis (Punto 3.1.6). Se trabajó a un flujo de 0.5 mL/minuto y se inyectó 5 ml de muestra. La proteína recolectada se concentró y se guardó en alícuotas a -20°C de aproximadamente 2 mg/mL.

### 3.1.8- Determinación de la concentración de proteínas

Se determinó la concentración de las proteínas por el método de Bradford en microplaca de 96 pocillos (57). En primera instancia se realizó una curva de calibración con BSA utilizando diluciones en agua de 0 a 120  $\mu\text{g/mL}$  preparadas a partir de un stock de BSA de 1  $\text{mg/mL}$ . En cada pocillo se colocó 140  $\mu\text{L}$  de cada concentración de BSA o de la muestra a una dilución adecuada y 20  $\mu\text{L}$  de NaOH 1 M. Posteriormente se adicionó a todos los pocillos 40  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford filtrado por 0.22  $\mu\text{m}$  (50 mL de Etanol 95 %, 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250, 100 mL de Ácido Fosfórico 85 % (w/v) y c.s.p. 200 mL de Agua mQ). Se incubó la placa por 5 a 30 minutos y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm en un lector de placas (Molecular Research Center-MRC).

### 3.1.9- Determinación de la actividad fosfatasa de las proteínas recombinantes

Para corroborar que las proteínas recombinantes fueran activas se midió su actividad utilizando el sustrato artificial pNPP (p-Nitrofenil Fosfato) el cual al ser defosforilado por la fosfatasa produce un compuesto coloreado, el pNP (p-Nitrofenol) el cual absorbe a 405 nm ( $\epsilon_{\text{pNP a } 405\text{nm}} = 12.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Figura 9). La actividad se determinó en el tampón 20 mM Tris-HCl pH 7.5 suplementado con 1mM de DTT, 3 mM de EDTA, 5% de glicerol, 0.005% de Tween 20 y 50 mM de NaCl. La concentración de pNPP utilizada fue 20 mM, teniendo en cuenta los valores de  $K_m$  determinado para ambas fosfatasas (PtpA wt 3.4 mM y PtpB wt 2.3 mM) (33).

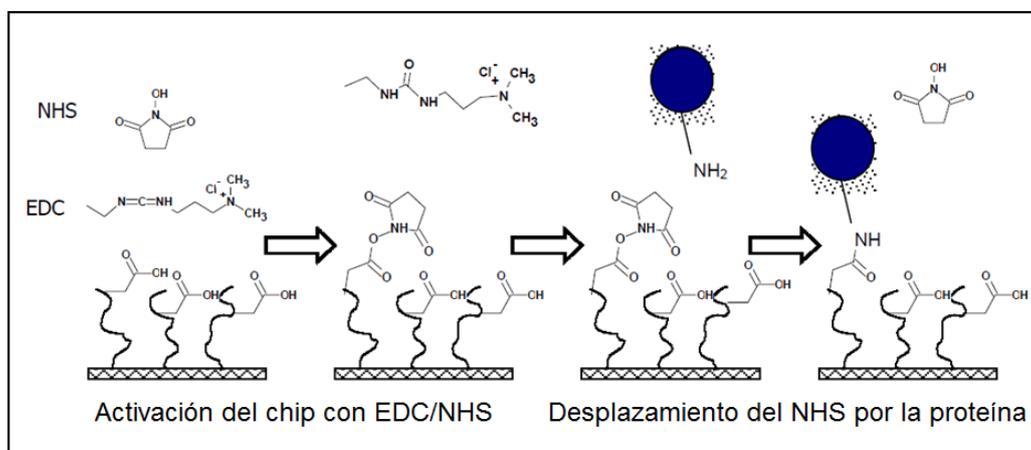


**Figura 9.** Defosforilación del p-Nitrofenil Fosfato por la actividad fosfatasa.

## 3.2- Resonancia Plasmónica de Superficie (SPR)

### 3.2.1- Acondicionamiento y activación del chip

Este trabajo se realizó en el equipo BIAcore 3000 (GE Healthcare) de la Unidad de Biofísica de Proteínas del Institut Pasteur de Montevideo. El chip utilizado fue el Sensor chip CM5 (carboximetil dextrano). El mismo está formado por un soporte de vidrio recubierto de una fina capa de oro a la cual está unida covalentemente una matriz de carboximetil dextrano. Este chip está dividido en cuatro canales de superficies iguales (Fc1, Fc2, Fc3 y Fc4) y se conserva a 4°C. El tampón de corrida utilizado en todo el ensayo fue HEPES 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, 0.005% Tween 20 y DTT 1 mM. El acondicionamiento se realizó en todas las superficies del chip y consiste en realizar sucesivos lavados con HCl 10 mM, NaOH 50 mM, SDS 0.1%, tampón de corrida y glicerol 70%. La activación del chip se realizó con 35  $\mu$ L de una mezcla en igual proporción de NHS (N-Hidroxisuccinimida) 0.05 M y EDC (1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) 0.2 M (Figura 10).



**Figura 10.** Química de activación de un chip con EDC/NHS e inmovilización de una proteína a través de un grupo amino ("Amine-coupling reaction") (Traducido de Protocolo de IAsys – Labsystems Affinity Sensors-www.affinity-sensors.com).

### 3.2.2- Inmovilización y bloqueo

Luego de activar el chip con NHS/EDC se preparó la PtpA D126A para la inmovilización cambiándole por centrifugación el tampón Tris por el tampón de

corrida, siendo la concentración final de la proteína 0.25 mg/mL. Para la inmovilización se diluyó la PtpA D126A en una relación 1/80 (3.1 µg/mL finales) en tampón Acetato de Sodio pH 4.5 para que la proteína se encuentre por debajo de su punto isoeléctrico teórico (6.55) y se encuentre con carga neta positiva para favorecer la inmovilización. Se realizaron tres inyecciones, dos de 35 µL (110 ng c/u) y una de 16 µL (50 ng), en el equipo (canal Fc4) a un flujo de 5 µL/min. Posteriormente, se bloquearon los grupos remanentes de la superficie del chip con etanolamina 1.0 M pH 8.5 y se lavó la superficie con NaCl 1.0 M. A continuación, se inyectó tampón de corrida hasta estabilizar la superficie. El canal Fc3 fue utilizado como control (sin fosfatasa inmovilizada).

El equipo registra en directo un perfil de asociación y disociación el cuál varía al detectarse modificaciones en la masa que interacciona sobre la superficie del chip, lo que causa un aumento o disminución proporcional en el índice de refracción, el cual se observa en un cambio del ángulo de resonancia. Estos cambios el equipo los registra en un aumento o disminución de unidades relativas (UR), siendo 1UR aproximadamente 1pg/mm<sup>2</sup> (Nomadics inc-www.nomadics.com).

### 3.2.3- Ensayos de interacción proteína - proteína

Los extractos de proteínas de macrófago inyectados fueron preparados por la integrante de nuestro grupo la MSc. Mariana Margenat y se realizó en el Instituto de Higiene, Universidad de la República, bajo la supervisión de la Dra. Ana Ferreira, investigadora que participa en el proyecto general del grupo. Se prepararon tres extractos de macrófagos diferentes en condiciones no desnaturizantes utilizando: (i) macrófagos activados con LPS 0.2 µg/mL por 30 min a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, (ii) macrófagos activados con LPS 0.2 µg/mL e INF-γ 500 U/mL, durante 30 min a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, (iii) macrófagos sin activar. Los mismos se conservan a -80°C y se encuentran en el tampón 25 mM Hepes pH 7.4, conteniendo EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, 1% Tritón X-100, 10% glicerol, benzamidina 1 mM, inhibidor de tripsina 1 µg/mL y PMSF 1 mM. Las concentraciones de los stocks de los diferentes extractos proteicos de macrófagos utilizados fueron 4.8 µg/µL, 3.8 µg/µL, 3.6 µg/µL, para

macrófagos no activados, macrófagos activados con LPS, macrófagos activados con LPS e  $\text{INF}\gamma$ , respectivamente.

En la superficie del canal Fc4 y Fc3 se inyectaron 50  $\mu\text{L}$  del extracto de proteínas de macrófagos a un flujo de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ , previamente diluido 1/150 (24  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en el tampón de corrida. Se evaluó la existencia de interacción a través de la detección de curvas de asociación y disociación en UR. Se estudió la estabilidad de la interacción detectada inyectando dos pulsos de 30 segundos a 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  de  $\text{NaCl}$  1 M. Las condiciones de regeneración de la superficie se estudiaron realizando la inyección de 2 pulsos de 40 segundos a 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  de Glicina 10 mM pH 2.0. Posteriormente, se evaluó qué acontecía al inyectar ortovanadato de sodio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), inhibidor competitivo de las PTPs por su gran similitud estructural con el fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). El stock de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  que se encontraba a 200 mM fue diluido en tampón de corrida a una concentración final de 25 mM. En primera instancia, se inyectó el extracto de proteínas de macrófago (50  $\mu\text{L}$  a 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ ), se regeneró la superficie y se inyectó al mismo flujo 25  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  y posteriormente nuevamente el extracto (50  $\mu\text{L}$  a 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ ), se regeneró y luego se inyectó nuevamente el extracto.

### 3.3- Determinación del pKa de las cisteínas

#### 3.3.1- Método del monobromobimano

El pKa de las cisteínas fue evaluado por alquilación de las cisteínas con monobromobimano (mBBBr) a diferentes pHs. El método se basa en la reacción del tiolato de la proteína con una molécula de mBBBr, el aducto formado fluoresce a una longitud de onda de 482 nm al excitarlo a una longitud de onda de 396 nm (Figura 11) (58). Para evaluar el pKa de las cisteínas de las proteínas se determina la velocidades iniciales de reacción con mBBBr (variación de la fluorescencia/tiempo) al variar el pH de la reacción, ya que la reactividad del tiol varía con el pH.

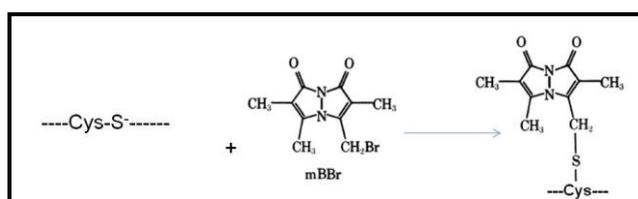


Figura 11. Reacción del tiolato con el monobromobimano (58).

En primera instancia se cambió el tampón donde se encontraba la enzima porque la misma estaba almacenada con DTT. Es imprescindible que en la reacción no haya DTT, porque el mismo puede reaccionar con el mBBr. El cambio de tampón se realizó en una PD-10 previamente equilibrada con el tampón de trabajo (30 mM Tris, 15 mM MES, 15 mM Ácido Acético, 20 mM NaCl, 0.1 mM DTPA, pH 7) (59). Se colocaron en la columna una mezcla de 600  $\mu\text{L}$  de proteína y 1.9 mL de tampón. Se realizó la elución con solo 2 mL de tampón descartándose el resto. Al eluido se le midió absorbancia a 280 nm y utilizando la ley de Lambert-Beer ( $\text{Abs} = \epsilon \cdot b \cdot c$ ) se determinó la concentración siendo la absortividad molar de cada proteína ( $\epsilon_{280\text{PtpAwt}}$  y  $\epsilon_{\text{PtpAD126A}}=15470 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $\epsilon_{280\text{PtpBwt}}=14440 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). El experimento se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos en el equipo Varioskan Flash (Thermo Electron corp). Las muestras se sembraron por cuadruplicado. Se trabajó a temperatura ambiente y a 12 valores de pHs diferentes en un rango entre 2.5 y 9. En cada pocillo se colocaron, como se muestra de ejemplo en la tabla 3, 65  $\mu\text{L}$  de tampón, las cantidades necesarias de HCl 60 mM, NaOH 60 mM para cubrir el rango de pH, y agua para completar un volumen final en el pocillo de 200  $\mu\text{L}$ , 35  $\mu\text{L}$  de enzima y por último con el inyector del equipo 50  $\mu\text{L}$ , en el rango bajo de pH, o 20  $\mu\text{L}$  de mBBr 20  $\mu\text{M}$  para los pocillos de pH altos.

Pocillo	V PTP ( $\mu\text{L}$ )	V Tampón ( $\mu\text{L}$ )	V mBBr ( $\mu\text{L}$ )	V HCl 60 mM ( $\mu\text{L}$ )	V NaOH 60 mM ( $\mu\text{L}$ )	V H <sub>2</sub> O ( $\mu\text{L}$ )
1	35	65	50	50	---	---
2	35	65	50	45	---	5
3	35	65	50	40	---	10
4	35	65	50	35	---	15
5	35	65	50	30	---	20
6	35	65	50	20	---	30
7	35	65	50	10	---	40
8	35	65	50	5	---	45
9	35	65	20	---	---	80
10	35	65	20	---	10	70
11	35	65	20	---	20	60
12	35	65	20	---	30	50

**Tabla 3.** Ejemplo de los volúmenes que se colocan en la placa en el ensayo de alquilación de la PTP con mBBr. El pocillo 9 corresponde a las cantidades necesarias de cada compuesto para alcanzar un pH 7.

En cada pocillo el equipo registró la variación de fluorescencia vs tiempo con cuyos datos se determinaron las velocidades iniciales. Al finalizar el ensayo se verificó el

pH en cada pocillo utilizando un microelectrodo (Accumet Electrode-Fisher Scientific). Para calcular los pKas se realizaron gráficos de velocidad inicial de la reacción en función del pH utilizando el Software OriginPro8.

### 3.3.2- Detección de grupos -SH libres con DTPy

En paralelo se determinó cuántos tioles reducidos había por molécula de fosfatasa. Se mezclaron, por duplicado, 50  $\mu\text{L}$  de la misma PTP utilizada en el ensayo anterior con 50  $\mu\text{L}$  de DTPy 30  $\mu\text{M}$  y se mide la absorbancia 324 nm. El compuesto 4-ditiopiridina (DTPy) reacciona con Cys-SH para producir 4-tiopiridona, que absorbe a 324 nm, siendo el  $\epsilon_{\text{TPy a } 324 \text{ nm}}$  de 21400  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

PtpA contiene tres Cys (Cys11 catalítica, Cys16, Cys53) y PtpB sólo una (Cys 160 catalítica), por lo cual si todas ellas se encuentran reducidas, es de esperar dosificar 3-SH/molécula de PtpA wt y PtpA D126A y 1-SH/molécula de PtpB wt.

## 3.4- Sensibilidad de PtpB wt a diferentes agentes oxidantes

### 3.4.1- Sensibilidad de PtpB wt al peróxido de hidrógeno

El experimento consistió en poner en contacto PtpB wt con diferentes concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y durante diferentes tiempos de pre-incubación. La reacción se cortó mediante el agregado de catalasa quién cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. Posteriormente se determinó la actividad fosfatasa residual de la PtpB wt utilizando pNPP como sustrato, para cada tiempo de pre-incubación y concentración de peróxido utilizada. Los ensayos se realizaron en una placa de 96 pocillos y las lecturas fueron ejecutadas en un Varioskan Flash (Thermo Electron Corp.) a 25°C.

En primera instancia se determinó la concentración del stock de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) almacenado a 4°C, se midió la absorbancia a 240 nm ( $\epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2 \text{ a } 240\text{nm}} = 43.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Una vez determinada la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se diluyó en agua hasta a las concentraciones utilizadas en el ensayo: 500  $\mu\text{M}$ , 550  $\mu\text{M}$ , 600  $\mu\text{M}$ , 700  $\mu\text{M}$  y 800  $\mu\text{M}$ , conservándose a temperatura ambiente hasta el comienzo del mismo. Se descongeló una alícuota del stock de PtpB wt a 187  $\mu\text{M}$  en tampón 20 mM de Tris-HCl, 50 mM de NaCl, 10 % de Glicerol, 3 mM de DTT y 5 mM de EDTA. Se

centrifugó a 10,000 r.p.m por 5 minutos a temperatura ambiente y se diluyó a una concentración del orden de 1.5  $\mu\text{M}$  en tampón Tris 50 mM pH 8. Se conservó en hielo hasta el comienzo del experimento.

En cada pocillo se colocó 140  $\mu\text{L}$  de tampón Tris 50 mM pH 8, 20  $\mu\text{L}$  de PtpB y 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El agregado de peróxido se realizó con pipeta multicanal para minimizar el tiempo de espera. En el caso de los pocillos controles, en lugar de colocar  $\text{H}_2\text{O}_2$  se agregó 20  $\mu\text{L}$  de agua. Transcurrido 0, 3, 6, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos de exposición de la proteína al  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el equipo inyectó 20  $\mu\text{L}$  de pNPP 100 mM suplementado con 1000 U/mL de Catalasa para frenar la reacción y comenzar a medir la velocidad de reacción de defosforilación del pNPP por la PtpB wt, la cual se obtiene a través de la pendiente de la aparición de pNP a 405 nm en función del tiempo. Para cada concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  utilizada se graficaron las velocidades en función del tiempo de preincubación los cuales se ajustaron a una función exponencial  $y = y_0 + Ae^{(R_0 \cdot x)}$  siendo  $R_0$  la constante de inactivación observada ( $k_{\text{obs}}$ ) de PtpB wt a cada concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La constante de inactivación ( $k_{\text{inact}}$ ) se calculó a partir de la pendiente del gráfico  $k_{\text{obs}}$  en función de la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $[\text{H}_2\text{O}_2]$ ) ya que  $k_{\text{obs}} = k_{\text{inact}} [\text{H}_2\text{O}_2]$ .

### 3.4.2- Sensibilidad de PtpB wt al peroxinitrito

El experimento consistió en medir el consumo de peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de fosfatasa PtpB wt. El  $\text{ONOO}^-$  se consume naturalmente, por tanto lo que se determinó es la aceleración de ese consumo en un equipo de Stopped Flow midiendo la absorbancia del  $\text{ONOO}^-$  a 312 nm.

En primer lugar, preparamos la enzima PtpB wt, eliminando el DTT por gel filtración en HPLC (Gilson) con una columna HiTrap (Amersham Bioscience) y detección Uv-Vis a 280 nm, cambiando a un tampón Tris-HCl 100 mM pH 7.14, DTPA 0.1 mM. A la enzima eluída se le midió absorbancia a 280 nm y se determinó su concentración como se describió anteriormente en el punto 3.3.1. En paralelo el stock de  $\text{ONOO}^-$  se diluyó 100 veces en NaOH 10 mM y se calculó la concentración del mismo por absorbancia a 302 nm ( $\epsilon_{\text{ONOO}^-}$  a 302nm = 1670  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). En el equipo de Stopped Flow (Applied Photophysics SX-20 stopped-flow spectrophotometer) se

trabajó a 17 °C y en presencia de 1 mM final de DTT, preparado en el momento. En este equipo se mezcló 20 μM final de ONOO<sup>-</sup> con diferentes concentraciones de PtpB wt (0, 2, 4, 6 y 8 μM final). Se registró la velocidad del consumo de ONOO<sup>-</sup> al ponerlo en contacto con PtpB wt siguiendo la absorbancia a 312 nm ( $\epsilon_{\text{ONOO}^-}$  a 312nm = 1600 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>).

Los gráficos resultantes se ajustaron a una función exponencial obteniendo para cada uno una constante de inactivación observada ( $k_{\text{obs}}$ ) siendo  $k_{\text{obs}} = k_{\text{inact}} [\text{PtpB wt}]$ . A partir de la pendiente del gráfico de  $k_{\text{obs}}$  en función de la concentración de PtpB wt se obtuvo la  $k_{\text{inact}}$  de PtpB wt con ONOO<sup>-</sup>.

### 3.5- Clonado del gen *Imo0938* de *Listeria monocytogenes*

#### 3.5.1- Diseño de Oligos y Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Según la comparación de secuencias realizadas por Blast en el sitio web de ListiList ([genolist.pasteur.fr/ListiList](http://genolist.pasteur.fr/ListiList)), la secuencia del gen *Imo0938* probablemente codifica para una tirosín-fosfatasa (Figura 7). Para poder llegar a corroborar esto por PCR, se diseñaron y compraron los oligos (Integrated DNA Technologies) para amplificar este gen a partir del ADN cromosómico de *L. monocytogenes cepa EGD-e*. Los oligos se diseñaron conteniendo los sitios de restricción para la enzima NdeI y SacI. El ADN de *L. monocytogenes EGD-e* se obtuvo de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas del Institut Pasteur de Montevideo. En el tubo de PCR se mezclaron 12.8 μL de agua, 2 μL del Tampón 10X de la polimerasa a utilizar (SBS Genetech), 2.5 μL de dNTPs 0.2 mM final cada uno, 0.2 μL de cada oligo 0.5 μM final, 0.3 μL (1.5 U) de ADN polimerasa U-taq (SBS Genetech) y 2 μL de ADN molde 3 ng/μL final. Se realizó, en paralelo, un control negativo sin ADN molde agregando 2 μL de agua. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador con gradiente de temperatura (Palmcycler-Corbett) por lo que se incubó cada reacción junto con su control negativo correspondiente para cada condición de “annealing” ensayada. La PCR se realizó en las siguientes condiciones: (i) 1 ciclo de desnaturalización inicial de 1 minuto a 95°C, (ii) 40 ciclos de desnaturalización a 95°C de 30 segundos, (iii) 40 ciclos de “annealing” a 40 – 41.9 – 43.8 – 46.3 – 48.1 – 50 °C de 20 segundos, (iv) 40 ciclos de extensión a 74 °C por 20 segundos y (v) 1 ciclo de extensión final a 74°C por 8 minutos. Los productos de la reacción se analizaron en gel de agarosa

1% utilizando “good view” (SBS Genetech) como revelador y el marcador de pares de bases de 100 bp (Bioron). Según la secuencia del gen *Imo0938* el producto esperado de amplificación es de 519 pares de bases incluyendo los extremos de los oligos.

### 3.5.2- Purificación de productos de PCR

La purificación de los productos de PCR se realizó enteramente con las soluciones de un kit de purificación de ADN (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System-Promega). Al pool de todos los productos de PCR positivos se le agregó el mismo volumen de “Membrane Binding Solution”. Se transfirió esta mezcla en una minicolumna del kit y se incubó 1 minuto a temperatura ambiente. Se centrifugó a 16,000 g por 1 minuto y se descartó el percolado. A continuación, se agregó 700  $\mu\text{L}$  de “Membrane Wash Solution” y se volvió a centrifugar a 16,000 g por 1 minuto descartándose el percolado. Se agregó nuevamente 500  $\mu\text{L}$  de “Membrane Wash Solution” y se centrifugó 2 veces a 16,000 g por 5 minutos. Luego de transferir la minicolumna a un eppendorf de 1.5 mL se agregó 20  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas, se incubó 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 16,000 g por 1 minuto. Se guardó esa elución (E1) y se repitió el último paso con 15  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas (E2). Las eluciones fueron analizadas en gel de agarosa como se describió en el punto anterior.

### 3.5.3- Digestión con enzimas de restricción

Las digestiones del producto de PCR y del vector pET28a se realizaron con las enzimas de restricción NdeI (NE Biolabs) y SacI (SBS biotech). El tampón utilizado fue el 4 de NE Biolabs ya que se verificó en el manual de NE Biolabs ([www.neb.com](http://www.neb.com)) que las dos enzimas funcionan en un 100% con ese tampón. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ . Se mezclaron 5  $\mu\text{L}$  de Tampón 4 10X (NE Biolabs), 0.5 $\mu\text{L}$  de BSA 100X (NE Biolabs) y 32  $\mu\text{L}$  de agua mQ filtrada, 10  $\mu\text{L}$  del inserto (24 ng/ $\mu\text{L}$ ) o de pET28a (3000ng), 1.5  $\mu\text{L}$  (9 U) de SacI y 1  $\mu\text{L}$  (20 U) de NdeI. Se incubaron las reacciones a 37°C por 1 hora y luego se inactivaron las enzimas a 65°C por 20 minutos. Se purificaron los productos de

digestión con el kit de purificación de ADN (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System-Promega) descrito anteriormente y se visualizaron en un gel de agarosa 1%.

#### 3.5.4- Ligación del fragmento con el vector pET28a

Para ligar el gen *Imo0938* al vector de expresión pet28a se utilizó la T4 DNA Ligasa de 5 U/ $\mu$ L (Fermentas). En la mezcla de reacción se debería colocar el inserto con el vector en una proporción molar de 3:1 pero en el gel de agarosa no se pudo cuantificar el inserto por lo que se colocó todo el inserto digerido y purificado (13  $\mu$ L) en un tubo conteniendo 2  $\mu$ L de tampón de ligación 10X (Fermentas), 1  $\mu$ L de agua, 3  $\mu$ L de vector (15 ng/ $\mu$ L) y 1  $\mu$ L de T4 DNA Ligasa. Se incubó la reacción a 22°C por 1 hora y se inactivó la enzima a 65°C por 10 minutos.

#### 3.5.5- Transformación de *E.coli* con el producto de ligación.

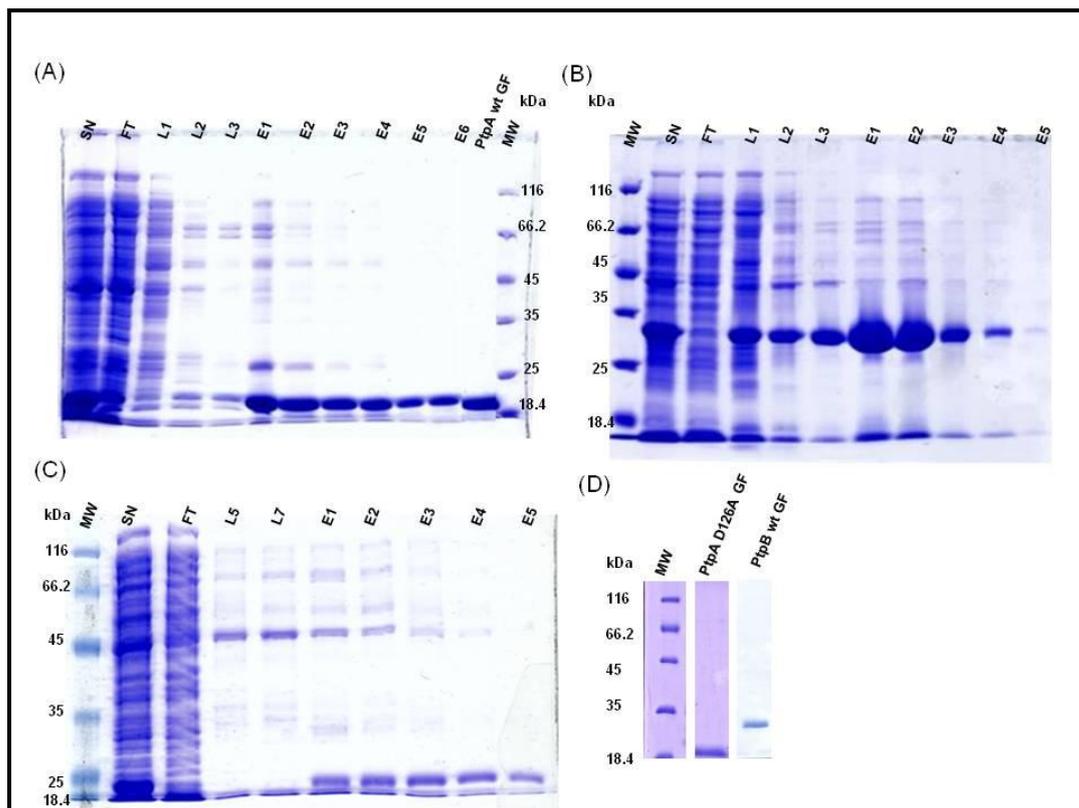
Un volumen de 5  $\mu$ L del producto de ligación fue utilizado para transformar 50  $\mu$ L de células quimiocompetentes *E.coli* DH5 $\alpha$  como descrito en el punto 3.1.1. Este procedimiento se realizó por duplicado y en paralelo con un control negativo sin producto de ligación. Para la transformación por electroporación, se descongeló en hielo durante 10 minutos una alícuota de 50  $\mu$ L de células electrocompetentes *E.coli* DH5 $\alpha$  preparadas en el laboratorio. Mientras tanto se colocó un tubo eppendorf vacío de 1.5 mL y una cubeta de electroporación de 0.2 cm en hielo. Luego, se agregaron 40  $\mu$ L de las células y 2  $\mu$ L del producto de ligación en el tubo eppendorf y se incubó por 1 minuto en hielo. Se transfirió la mezcla a la celda de electroporación fría y se dio un pulso de 2.5 kV (Bio-rad). Inmediatamente se agregó a la celda 400  $\mu$ L de medio LB resuspendiendo las células suavemente. Luego, se transfirió la suspensión en un tubo eppendorf y se incubó a 37°C y 225 r.p.m. por 1 hora. Pasado el tiempo de incubación se plaquearon 200  $\mu$ L de las células transformadas en placas de LB Agar con 50  $\mu$ g/mL de kanamicina y se incubaron las placas en estufa a 37°C por 16 horas. Este procedimiento, también se realizó por duplicado y con el control negativo sin producto de ligación. Se obtuvieron una centena de transformantes y se seleccionaron 10 colonias. Se realizó una extracción

del ADN plasmídico de la misma manera que se explica en el punto 3.1.2. Finalmente se realizó la digestión del plásmido obtenido luego de la extracción de ADN plasmídico para liberar el fragmento de interés. Se mezclaron 0.8  $\mu\text{L}$  de agua, 2  $\mu\text{L}$  del Tampón 4 10X (NE Biolabs), 0.2  $\mu\text{L}$  de BSA 100X y 15  $\mu\text{L}$  de cada extracción de ADN plasmídico con 1  $\mu\text{L}$  de SacI y 1  $\mu\text{L}$  de NdeI. Se incubó la reacción a 37°C por 1 hora y se desactivaron las enzimas, pasado ese tiempo, a 65°C por 20 minutos. Se realizó un gel de agarosa al 1% para verificar la liberación del inserto.

## 4- Resultados

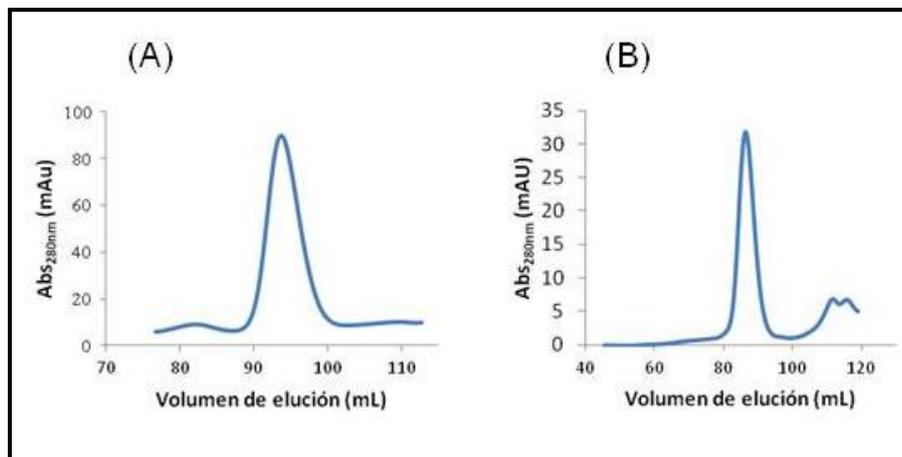
### 4.1- Expresión y purificación de PtpA wt, PtpA D126A y PtpB wt

Las distintas fracciones recolectadas durante la purificación por afinidad de PtpA wt, PtpA D126A y PtpB wt se visualizan en los geles SDS-PAGE de la figura 12. En las eluciones con imidazol 300 mM (E1-E5 o E6) se puede observar una banda principal de aproximadamente 19 kDa correspondiente a PtpA (Figura 12A PtpA wt, Figura 12C PtpAD126A). En la figura 12B se observa, en las eluciones (E1-E5), una banda mayoritaria de aproximadamente 32 kDa correspondiente a PtpB wt. En todos los casos, se observan contaminantes de mayor peso molecular que se pueden apreciar principalmente en los eluidos de E1 a E4.



**Figura 12.** Electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% mostrando las fracciones recolectadas durante la purificación por afinidad de PtpA wt (A), PtpB wt (B), PtpA D126A (C). En la figura (A) se observa también la proteína PtpA wt gel filtrada (GF) y en (D) la proteína gel filtrada PtpA D126A y PtpB wt. SN = sobrenadante. FT = percolado. L = lavados. E = eluciones, MW = marcador de peso molecular.

Mediante un paso de purificación adicional de gel filtración (cromatografía de exclusión molecular) se logró eliminar dichos contaminantes tal como se observa en la Figura 12A (PtpA wt GF) y 12D (PtpAD126A GF y PtpB wt GF), que muestra el perfil de la proteína sembrada luego de ser gel filtrada y concentrada. En la figura 13 A y B, se observa el cromatograma de elución mostrando el pico correspondiente a PtpA wt y PtpB wt, luego de realizada la gel filtración. Los volúmenes de elución de PtpA wt (95.7 mL), PtpA D126A (93.8 mL) y PtpB (85.0 mL) concuerdan con los obtenidos por nuestro grupo. El rendimiento en mg de proteína recombinante por Litro de cultivo también estuvo entre los valores habituales obtenidos en el laboratorio (4-6 mg/L) así como la actividad específica (del orden de 3  $\mu$ moles de pNP  $\text{min}^{-1}$   $\text{mg}^{-1}$  de enzima).

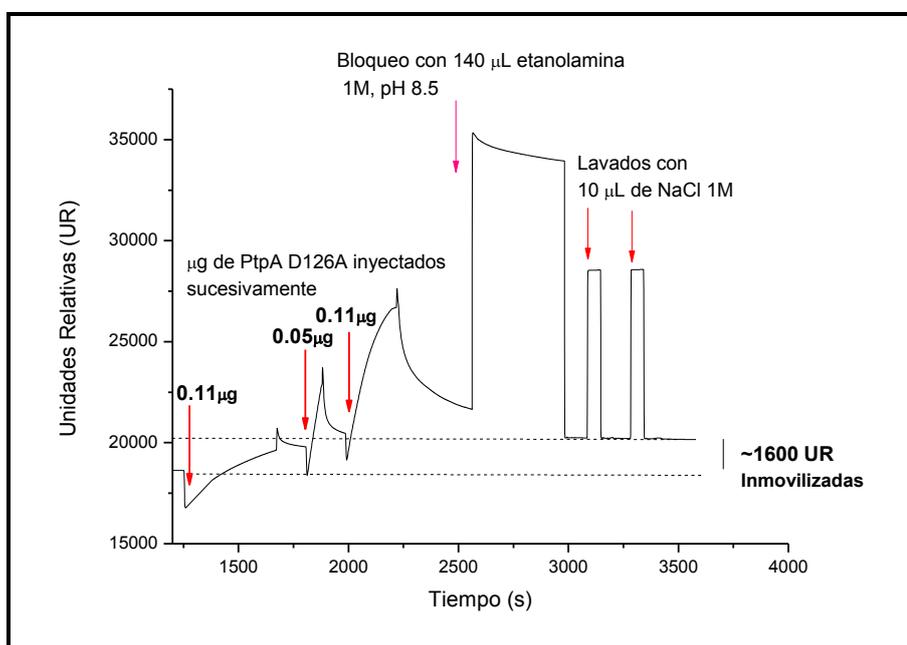


**Figura 13.** Cromatograma de elución mostrando el pico correspondiente a PtpA wt (A) y PtpB wt (B). El volumen de elución de PtpA wt fue 95.7 mL y de PtpB wt 85.0 mL, utilizando la columna Superdex 200 16/60 a un flujo de 0.5 mL/min.

Las fosfatasa producidas en forma pura y activa fueron utilizadas en los experimentos que se describen a continuación. El mutante PtpA D126A fue utilizado para los experimentos de estudio de la interacción con extractos proteicos de macrófagos. La PtpA wt, PtpA D126A y PtpB wt, fueron utilizadas en los experimentos de determinación del  $pK_a$  de las cisteínas y por último, la PtpB wt fue utilizada en los experimentos de sensibilidad a diferentes agentes oxidantes.

## 4.2- Estudio de la interacción entre PtpA D126A con extractos proteicos de macrófagos.

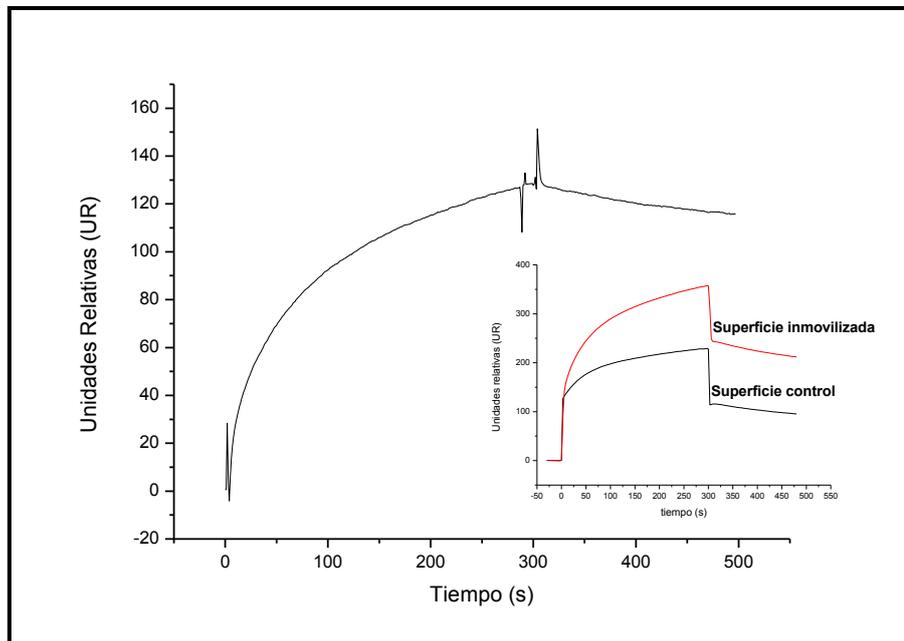
Como se especificó en la metodología para este estudio se utilizó la técnica de SPR. En la primera etapa, luego del preconditionamiento y la activación del chip CM5 se procedió a la inmovilización de PtpA D126A en la superficie 4 (Fc4) del mismo seguido del bloqueo y lavado de la misma (Figura 14). Se ofreció a la superficie 27  $\mu\text{g}$  de PtpA D126A, lográndose inicialmente inmovilizar del orden de 3500 Unidades Relativas (UR). Luego de bloquear con etanolamina los grupos remanentes y lavar la superficie del chip con 1 M de NaCl se obtuvieron del orden de 1600 UR de PtpA D126A inmovilizadas. Teniendo en cuenta que 1 UR corresponde aproximadamente a  $1\text{pg}/\text{mm}^2$  de proteína (Nomadics inc. - [www.nomadics.com](http://www.nomadics.com)) y la superficie de cada carril del chip CM5 tiene un área de  $1.2\text{mm}^2$ , por estimar que se lograron inmovilizar aproximadamente unos 2 ng de PtpA D126A.



**Figura 14.** Sensograma del ensayo de SPR en el que se muestra la inmovilización de PtpA D126A, el bloqueo de los grupos remanentes con etanolamina y el lavado de la superficie.

Al inyectar el extracto proteico de macrófagos activados con LPS e  $\text{INF}\gamma$  (1.2  $\mu\text{g}$  totales) se observó una interacción de entre 100 y 130 UR. Estas unidades surgen

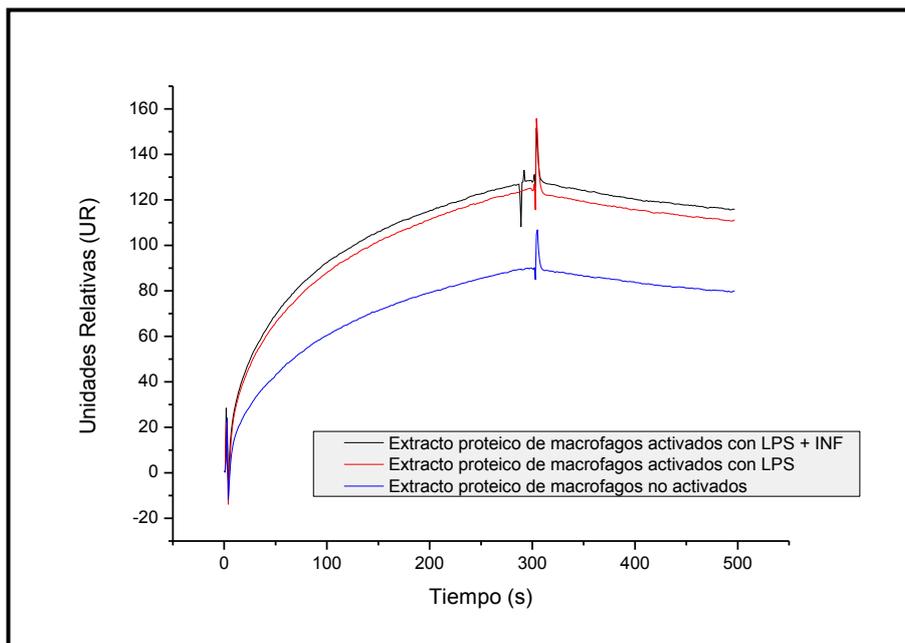
de la resta entre la superficie inmovilizada (Fc4) y la superficie control (Fc3), (Figura 15).



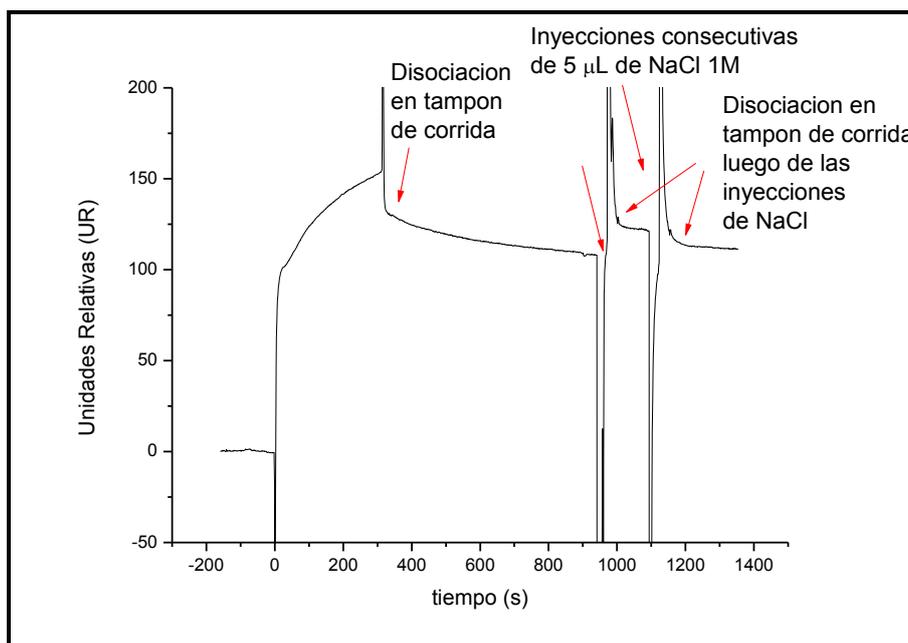
**Figura 15.** Sensograma del ensayo de SPR mostrando las curvas de asociación y disociación al inyectar, a un flujo de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 50  $\mu\text{L}$  a 24  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de extracto de proteínas de macrófagos activados con LPS e  $\text{INF}\gamma$ . El gráfico resulta de la resta del registro de la superficie con PtpA D126A inmovilizada (Roja) y no inmovilizada (negra) observado en gráfico inserto en la figura.

La Figura 16 muestra las UR de la asociación al inyectar los mismos  $\mu\text{g}$  de extracto de proteínas macrófagos activados con LPS e  $\text{INF}\gamma$ , activados solo con LPS y no activados todos a 24  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se observó que los tres extractos interactúan con PtpA D126A. Sin embargo, el extracto de macrófagos no activado presentó una asociación menor a las demás.

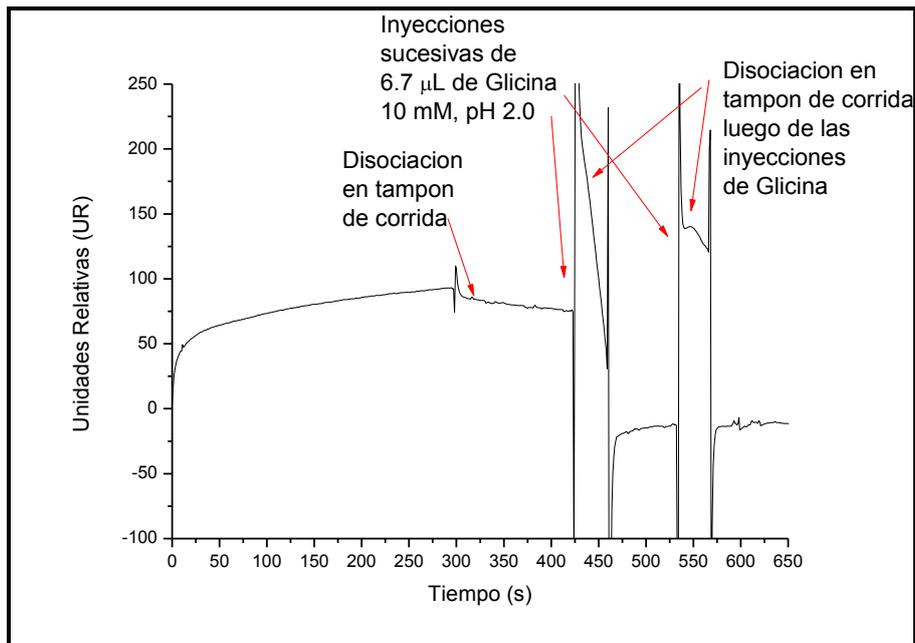
Para estudiar si esta interacción es de naturaleza iónica se realizaron dos inyecciones consecutivas de  $\text{NaCl}$  1 M (Figura 17). Luego de las inyecciones se observa que la disociación es básicamente similar, respecto a cuando la fase móvil es el tampón de corrida. No se detecta un aceleramiento en la disociación que cause una llegada rápida a la línea de base como sería de esperar si la interacción es fundamentalmente iónica.



**Figura 16.** Sensograma del ensayo de SPR al inyectar, a un flujo de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 50  $\mu\text{L}$  a 24  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de extracto de macrófago activado con LPS e  $\text{INF}\gamma$  (negro), LPS (rojo) y no activado (azul).

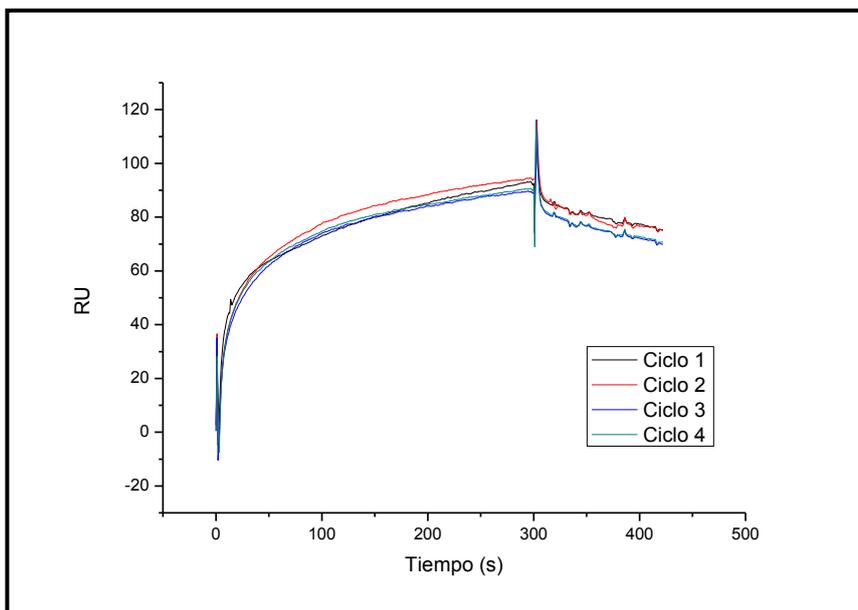


**Figura 17.** Sensograma del ensayo de SPR mostrando curvas de asociación y disociación al inyectar a 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 50  $\mu\text{L}$  de extracto de proteínas de macrófagos activados con LPS e  $\text{INF}\gamma$  a 90  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y posteriormente dos inyecciones de 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaCl}$  1M.



**Figura 18.** Sensograma del ensayo de SPR mostrando curvas de asociación y disociación al inyectar a 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 50  $\mu\text{L}$  de extracto de proteínas de macrófagos activados con LPS e  $\text{INF}\gamma$  a 24  $\mu\text{g}/\text{mL}$  seguido de dos inyecciones de 6.7  $\mu\text{L}$  de Glicina 10 mM, pH 2.0.

Sin embargo en la figura 18, se observa que al realizar dos inyecciones de tampón glicina 10 mM, pH 2 se detecta una disociación rápida, alcanzando la línea de base.



**Figura 19.** Sensograma del ensayo de SPR representando las curvas de asociación y disociación luego de cada ciclo de regeneración de la superficie del chip que contiene PtpA D126A inmovilizada. Se inyectaron a 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 50  $\mu\text{L}$  de extracto de proteínas de macrófagos a 24  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y posteriormente, dos inyecciones de 6.7  $\mu\text{L}$  de Glicina 10 mM, pH 2.0.

Para evaluar la posibilidad de reutilizar la superficie que contiene PtpA D126A inmovilizada, se realizaron a continuación cuatro ciclos que constan cada uno de la inyección del extractos de proteínas de macrófagos activados con LPS e INF $\gamma$  seguido por dos inyecciones rápidas de Glicina 10 mM, pH 2. En la figura 19 se observa que luego de cada ciclo el perfil de asociación y disociación fue igual así como el nivel de asociación en UR. En paralelo la MSc. Mariana Margenat evaluó que una disminución del pH a 2 no afecta la actividad de la enzima lo que concuerda con la recuperación de una interacción similar en el cuarto ciclo de regeneración con respecto al primero.

Al inyectar Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> seguido de una mezcla conteniendo Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> y extracto proteico de macrófagos activados, se observó una disminución en las UR (70 UR) con respecto a cuándo se inyectó extracto de proteínas sin Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (130 UR). Luego de regenerar, al inyectar nuevamente extracto de proteínas las UR obtenidas fueron tan solo 24. Solamente se logró obtener este efecto con 25 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. En estudios previos, se observaba un efecto del Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> a concentraciones de 2.5, 5 y 10 mM (33).

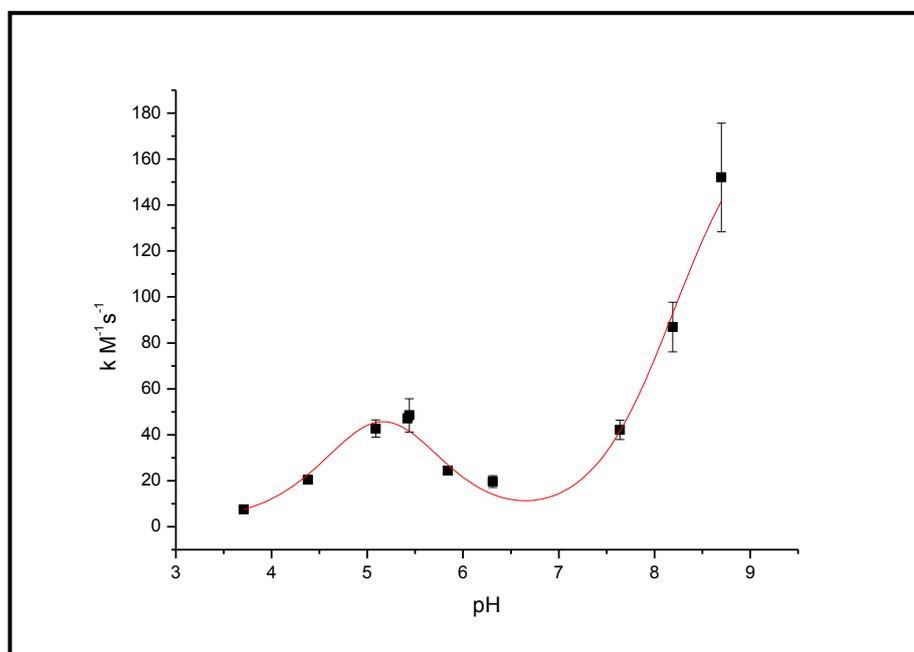
### 4.3- Evaluación del pKa de las cisteínas

El pKa de las cisteínas de las proteínas recombinantes se estudió por alquilación con mBBr como descrito en materiales y métodos (3.3.1). La velocidad de la reacción para cada concentración de mBBr se determinó de los gráficos de fluorescencia a 482 nm en función del tiempo. La constante de primer orden (k) se obtuvo realizando el cociente de la velocidad con la concentración de mBBr. Posteriormente se graficó k en función del pH ajustando las curvas a la función correspondiente dependiendo de la cantidad de pKas observados. PtpB consta de una única cisteína, por lo cual se esperaba observar un único pKa, sin embargo en la curva obtenida (Figura 20) se detectaron 3 pKa:

- pKa<sub>1</sub> = 4.90 ± 0.50
- pKa<sub>2</sub> = 5.43 ± 0.71
- pKa<sub>3</sub> = 8.20 ± 0.56

La ecuación utilizada para ajustar esta curva fue (60):

$$y = \frac{a_1}{1 + \frac{K_{a1}}{[H^+]} + \frac{K_{a1}K_{a2}}{[H^+]^2} + \frac{K_{a1}K_{a2}K_{a3}}{[H^+]^3}} + \frac{a_2}{\frac{[H^+]}{K_{a1}} + 1 + \frac{K_{a2}}{[H^+]} + \frac{K_{a2}K_{a3}}{[H^+]^2}} + \frac{a_3}{\frac{[H^+]^2}{K_{a1}K_{a2}} + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + 1 + \frac{K_{a3}}{[H^+]}} + \frac{a_4}{\frac{[H^+]^3}{K_{a1}K_{a2}K_{a3}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a2}K_{a3}} + \frac{[H^+]}{K_{a3}} + 1}$$



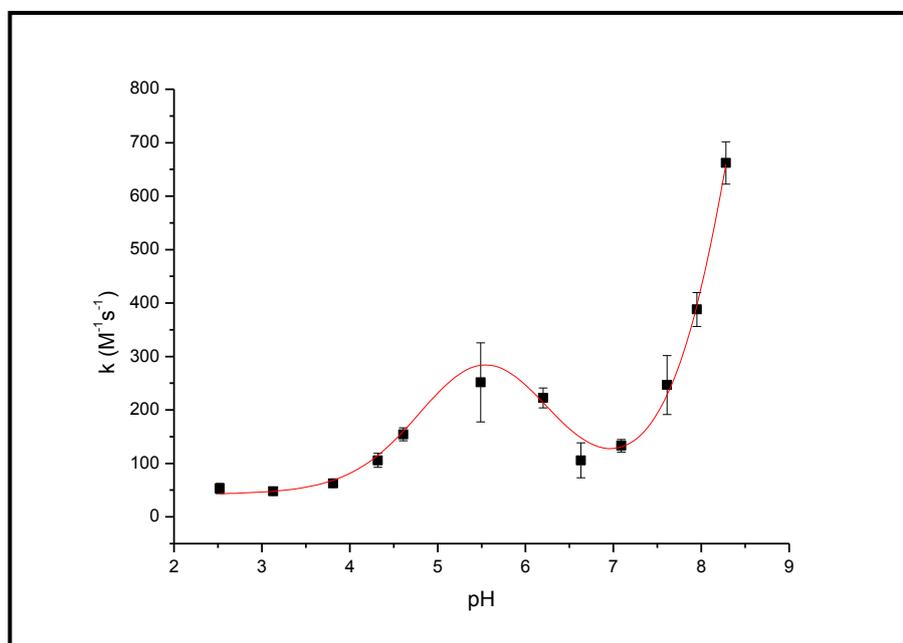
**Figura 20.** Gráfico de constantes de velocidad de reacción con mBBr en función del pH para PtpB wt. La concentración de PtpB wt en los pocillos fue de 1.7  $\mu$ M. Se trabajó por cuadruplicado a diez pHs entre 3.71 y 8.70.

Para evaluar si todas las moléculas de PtpB tenían el tiol reducido durante el ensayo con mBBr, se dosificaron los mismos utilizando ditiopiridina tal como describe en el punto 3.3.2. La concentración de PtpB wt luego de eliminar el DTT fue 10  $\mu$ M. PtpB wt tiene una sola Cisteína por molécula por lo que es de esperar 1-SH/molécula, sin embargo se detectaron 0.5-SH/molécula lo que representa el 50% de los tioles reducidos.

PtpA wt posee tres cisteínas (Cys11, Cys16 y Cys53), siendo la Cys11 la catalítica. Por lo tanto se esperaba observar 2 pKa, uno de ellos correspondiente a la cisteína catalítica y otro para las demás cisteínas.

Los pKa calculados fueron (Figura 21):

- $pK_{a1} = 4.90 \pm 0.33$
- $pK_{a2} = 6.19 \pm 0.52$
- $pK_{a3} = 8.55 \pm 0.48$



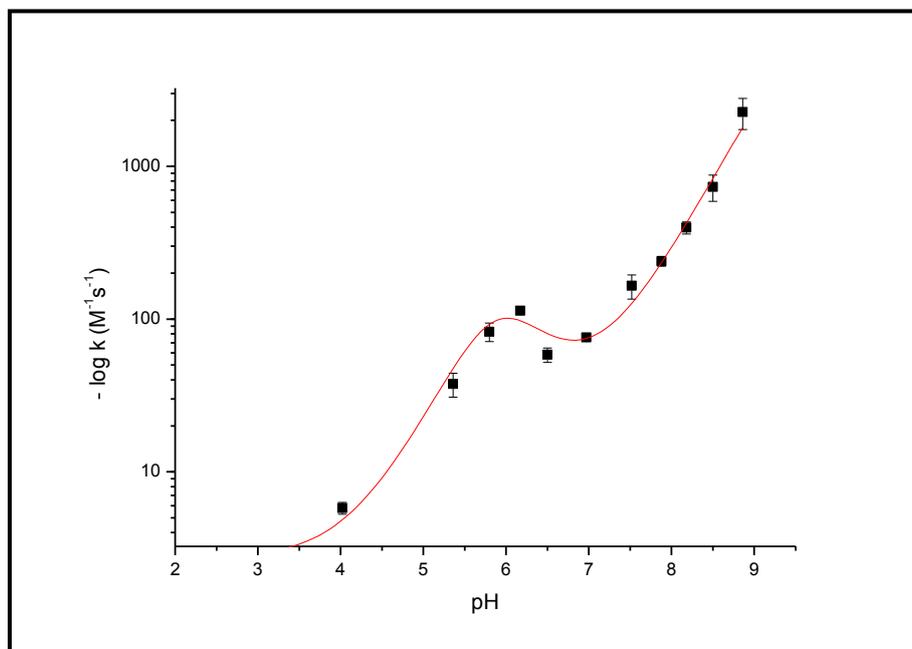
**Figura 21.** Gráfico de constantes de velocidad de reacción con mBBr en función del pH para PtpA wt. La concentración de PtpA wt en los pocillos fue de 1.1  $\mu\text{M}$ . Se trabajó por cuadruplicado a doce pHs entre 2.52 y 8.28.

Para evaluar si todas las moléculas de PtpA wt tenían los tioles reducidos durante el ensayo con mBBr, se dosificaron los mismos utilizando ditiopiridina tal como describe en el punto 3.3.2. La concentración de PtpA wt luego de eliminar el DTT fue 7.9  $\mu\text{M}$  por lo que era de esperar que hubiera 23.7  $\mu\text{M}$  de tioles (3-SH/molécula), sin embargo se detectaron 2.7-SH/molécula lo que representa el 88.6% de los tioles reducidos.

Es conocido que la reactividad del tiolato puede ser diferente dependiendo del entorno, es decir con la presencia de otros residuos con cadenas laterales de pKa bajo capaces de desprotonarse tales como aspartato y glutamato. Esto podría cambiar el ambiente del tiolato y causar una reactividad diferente del tiolato con el mBBr. Así es que, como se contaba con el mutante en el sitio activo de PtpA

D126A, se realizó la determinación del  $pK_a$  para ver si pasaba de 3 valores a 2 valores de  $pK_a$ . Sin embargo no fue el caso, los  $pK_a$ s calculados fueron (Figura 22):

- $pK_{a1} = 4.73 \pm 17.80$
- $pK_{a2} = 7.08 \pm 18.52$
- $pK_{a3} = 10.03 \pm 6.50$



**Figura 22.** Gráfico de constantes de velocidad de reacción con mBBr en función del pH para PtpA D126A. La concentración de PtpA D126A en los pocillos fue de  $1.1 \mu M$ . Se trabajó por cuadruplicado a doce pHs entre 2.60 y 8.86.

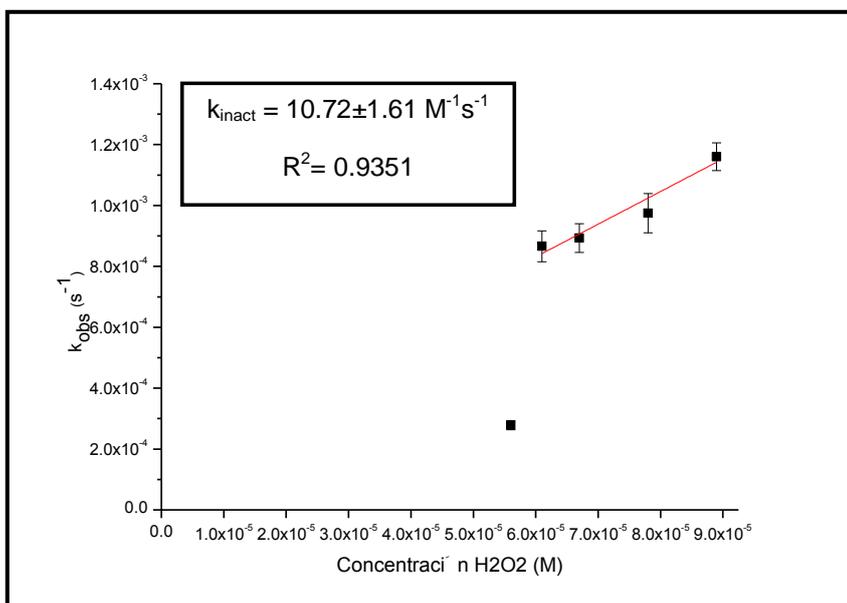
La concentración de PtpA D126A luego de eliminar el DTT fue  $6.1 \mu M$  por lo que era de esperar que hubiera  $18.3 \mu M$  de tioles (3-SH/molécula), sin embargo se detectaron  $1.8$ -SH/molécula lo que representa el 60% de los tioles reducidos.

Como al dosificar tioles, se encontró que una gran parte no estaba reducida en el momento del experimento, se realizó en paralelo, un ensayo en el que las proteínas se desnaturalizaron con SDS 2%. La dosificación no presentó diferencias con respecto a la dosificación en condiciones no desnaturalizantes. Esto indicaría que parte de la proteína antes del ensayo se encontraba oxidada a un estado no reversible con DTT.

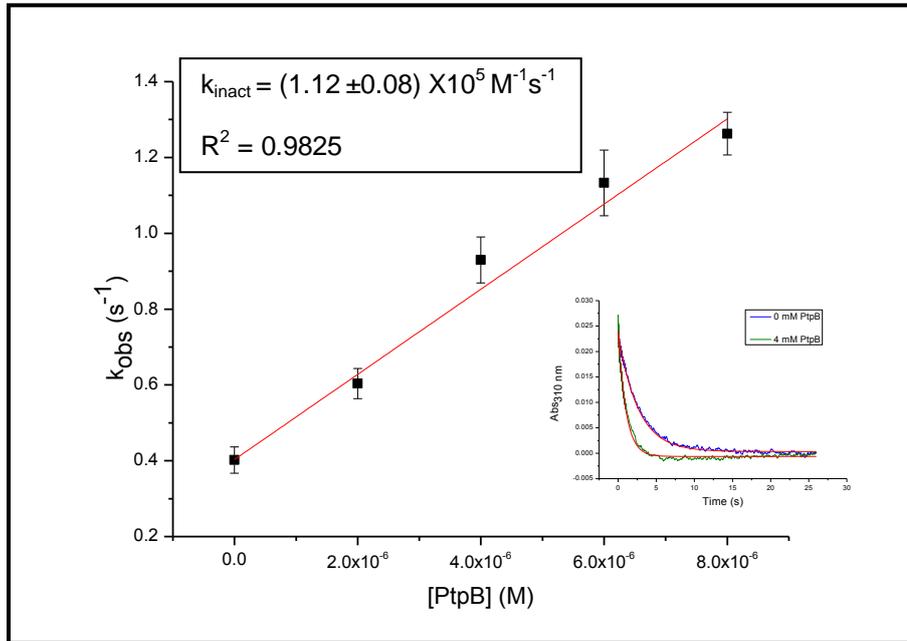
#### 4.4- Sensibilidad de PtpB wt a diferentes agentes oxidantes

A partir del gráfico de  $k_{obs}$  en función de la concentración de  $H_2O_2$  (Figura 23) se determinó la  $k_{inact}$  de PtpB wt con  $H_2O_2$  cuyo valor fue de  $10.72 \pm 1.61 M^{-1}s^{-1}$ .

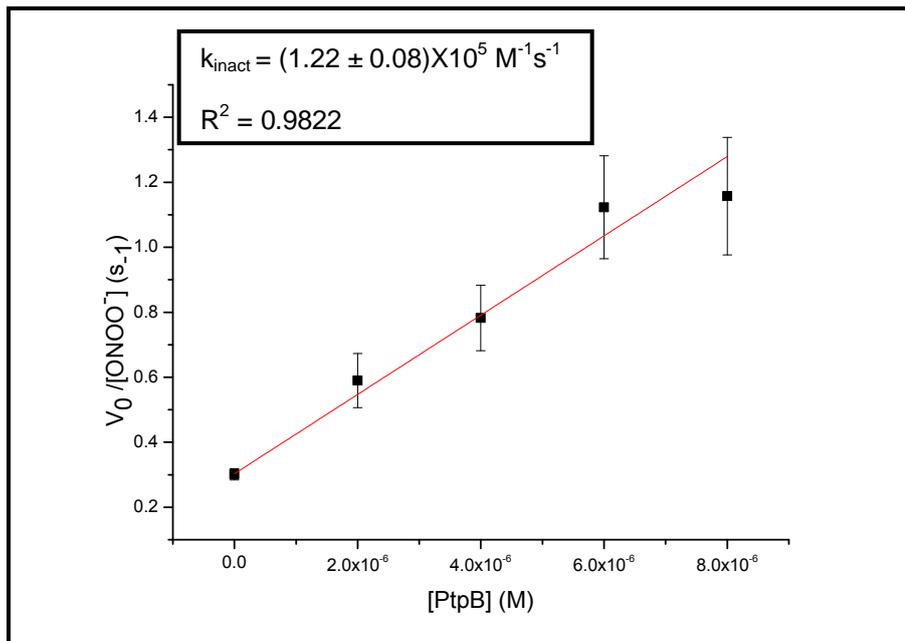
La figura 24 muestra las  $k_{obs}$  de inactivación de PtpB wt con  $ONOO^-$  en función de las concentraciones de PtpB wt utilizadas. La pendiente de este gráfico corresponde a la constante de inactivación del  $ONOO^-$  para PtpB wt cuyo valor fue de  $(1.12 \pm 0.08) \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ . En paralelo, se calculó la  $k_{inact}$  determinando las velocidades iniciales ( $V_0$ ) de la descomposición del  $ONOO^-$  en función del tiempo. Los valores se obtuvieron utilizando la ecuación de Lambert-Beer:  $Abs/t = \epsilon_{ONOO^- \text{ a } 312 \text{ nm}} \cdot b \cdot [ONOO^-]/t$ . Como el  $ONOO^-$  se encuentra en una proporción de 0.8 con respecto al  $ONOOH$  (ácido peroxinitroso) y a 312 nm lo que se mide es la absorbancia del  $ONOO^-$ , los valores de  $V_0$  se multiplicaron por 1.25. Por último, como la velocidad de la reacción de inactivación ( $v$ ) =  $k_{inact} [PtpB wt] [ONOO^-]$  se realizó el gráfico de  $V_0/[ONOO^-]$  en función de la concentración de PtpB wt. (Figura 25).



**Figura 23.** Gráfico de  $k_{obs}$  en función de la concentración de  $H_2O_2$ . Para realizar el ajuste lineal se descartó el primer punto del gráfico ya que queda por fuera de la tendencia lineal y si la recta pasara por ese punto no tendería a 0 ya que en ausencia de  $H_2O_2$   $k_{inact}$  es igual a 0.

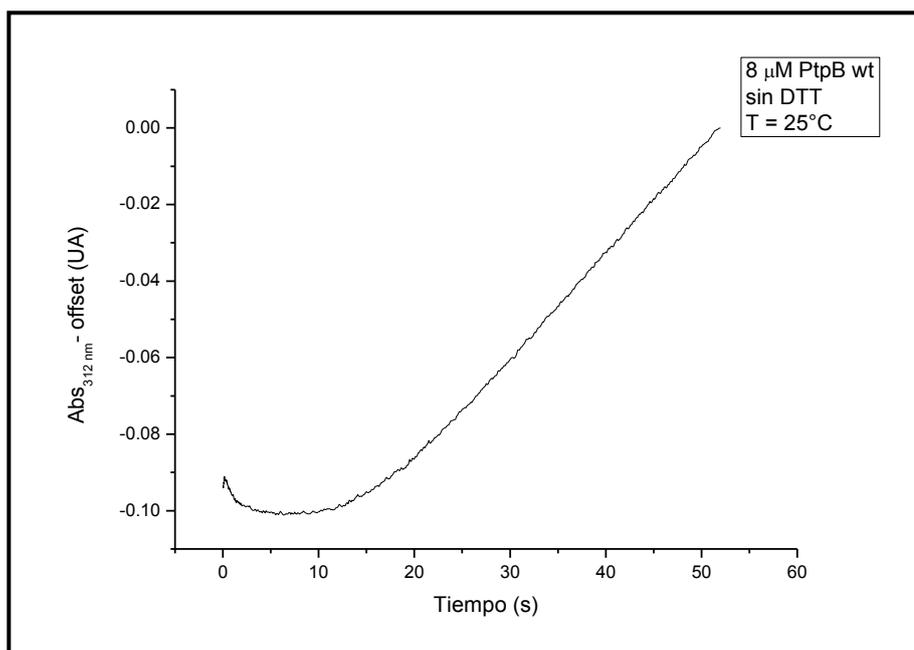


**Figura 24.** Gráfico de  $k_{obs}$  de inactivación de PtpB wt en función de la concentración de PtpB wt.



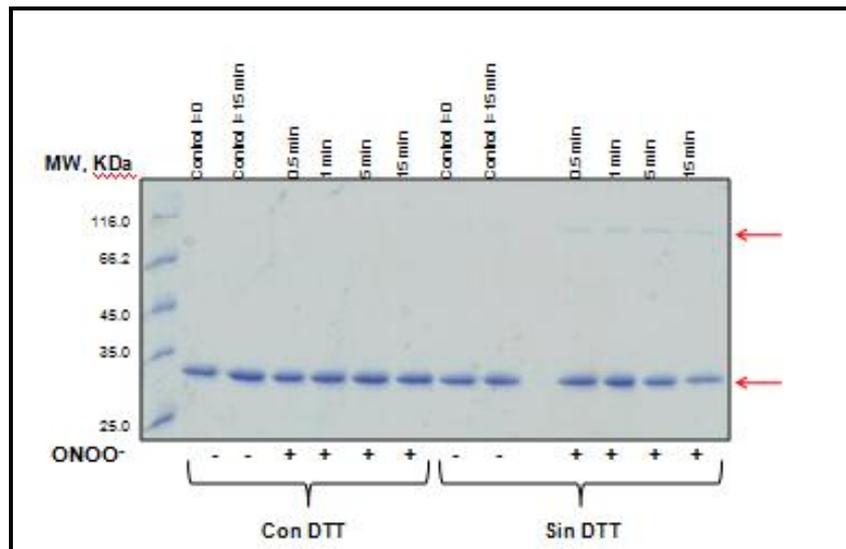
**Figura 25.** Gráfico de  $V_0/[ONOO^-]$  en función de la concentración de PtpB wt.

Todos los experimentos con  $ONOO^-$  se realizaron a  $17^\circ C$  y en presencia de DTT ya que se observó que trabajando a temperatura mayores ( $25$  y  $37^\circ C$ ) y sin DTT la proteína precipitaba; se observó esto en el gráfico de la figura 26 y luego macroscópicamente.



**Figura 26.** Gráfico de absorción a 312 nm del ONOO<sup>-</sup> en función del tiempo utilizando 8 μM de PtpB wt sin DTT y a 25 °C estudiado por Stopped Flow.

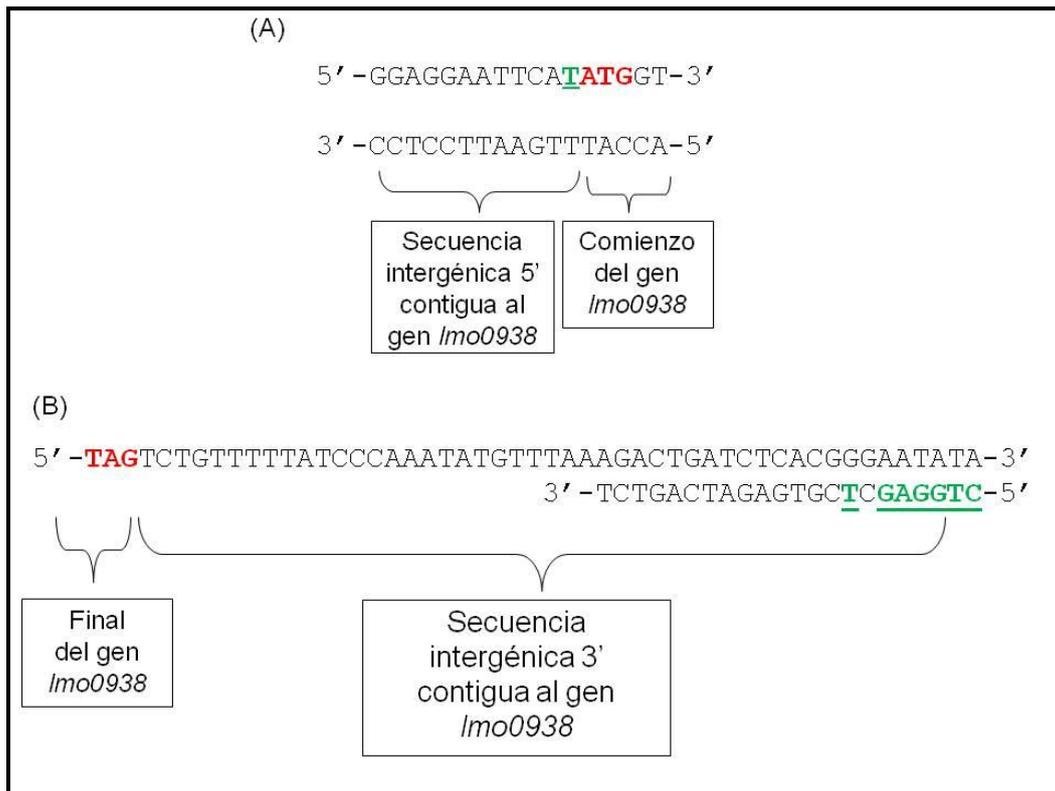
Para averiguar si esta precipitación se debió a la formación de algún dímero o agregados que involucre la cisteína de PtpB wt, se realizó el mismo experimento a mayor escala y las muestras fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras y no reductoras (Figura 27). Se contaba con información previa que tanto PtpA wt como PtpB wt son monómeros en solución (33). En presencia de DTT no se observó ningún aglomerado luego de la exposición con ONOO<sup>-</sup>. En ausencia de reductor no hay grandes cambios del perfil observado con DTT. Sólo se observa una banda tenue de entre 66-116 kDa desde 0.5 minutos de incubación con ONOO<sup>-</sup>. Sin embargo, en los controles sin ONOO<sup>-</sup> también se observan pero con menor intensidad.



**Figura 27.** Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% para el estudio de la naturaleza covalente o no covalente de la precipitación de PtpB wt observada por Stopped Flow. MW = marcador de peso molecular. Control t=0 min y t= 15 min no contienen ONOO<sup>-</sup>. Las muestras se corrieron en condiciones reductoras (con DTT) y no reductoras (sin DTT).

#### 4.5- Clonado del gen *Imo0938* de la cepa EGD-e de *Listeria monocytogenes*

Para diseñar buenos oligos es deseable que el porcentaje de contenido de Guaninas (G) y Citosinas (C) se encuentre entre 50-60 % del total de bases del oligo y que el extremo 5' comience con al menos 1 o 2 G o C. La temperatura de "melting" (T<sub>m</sub>) se busca se encuentre entre 55-80°C. El gen *Imo0938* está compuesto por secuencias muy ricas en Timinas (T) y Adeninas (A) por lo que los oligos que fueron posible diseñar utilizando sólo las bases de este gen, tenían una T<sub>m</sub> muy baja. Por lo tanto, como se muestra en la figura 28, para poder diseñar los oligos fue imprescindible utilizar las secuencias intergénicas 5' y 3' contiguas al gen *Imo0938* así como insertar algunos cambios de base (en verde), para colocar los sitios de corte para las enzimas de restricción.



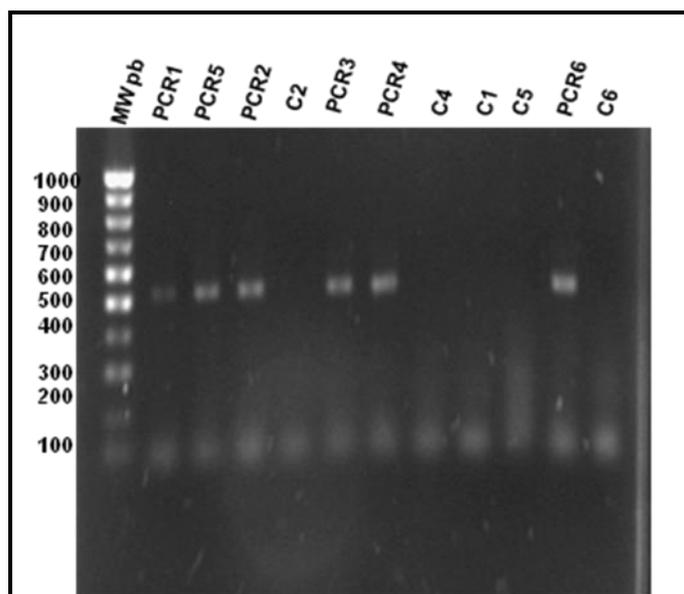
**Figura 28.** Diseño de oligos utilizando las secuencias intergénicas 5' en (A) y 3' en (B) contiguas al gen *lmo0938*.

La figura 29 muestra los oligos que se lograron diseñar finalmente. El “forward primer” que contiene el sitio de restricción para NdeI, tiene una T<sub>m</sub> de 45.1°C y un porcentaje de GC de 41% y el “reverse primer” con el sitio de restricción para SacI, tiene una T<sub>m</sub> de 58°C y 54% de GC.

Forward primer: 5' -GGAGGAATTCATATGGT-3'

Reverse primer: 5' -CTGGAGCTCGTGAGATCAGTCT-3'

**Figura 29.** Oligos diseñados para realizar la PCR del gen *lmo0938*. En rojo se muestran las secuencias correspondientes a los sitios de restricción para NdeI en el forward primer y SacI en el reverse primer.

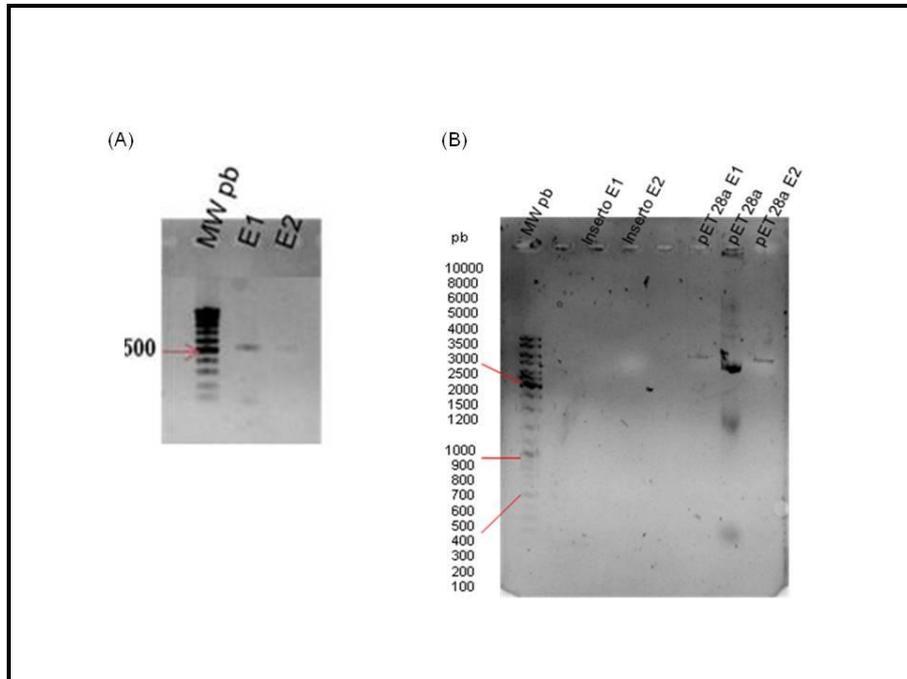


**Figura 30.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando el resultado de las PCRs del gen *Imo0938* de *L. monocytogenes*. PCR1, PCR2, PCR3, PCR4, PCR5 y PCR6 corresponde al revelado de las PCR a las diferentes temperaturas (41.9, 43.8, 46.3, 48.1 y 50°C respectivamente. C1, C2, C4 C5 y C6 corresponden a los controles sin ADN genómico. MW pb: marcador de pares de bases (100pb, Bioron).

La figura 30 muestra el resultado de las PCRs realizadas, la cuales fueron positivas, observándose la banda esperada en cada una de ellas de alrededor de 500 pb. Se juntaron todas las PCRs y se purificó la mezcla. En la figura 31A se observa el fragmento purificado de tamaño esperado el cual fue cuantificado en aproximadamente 25 ng/  $\mu\text{L}$  de DNA (500 ng totales) para E1 y 16 ng/  $\mu\text{L}$  (240 ng totales) para E2.

El producto de la reacción de digestión con las enzimas de restricción del vector pET28a y del producto de PCR del gen *Imo0938* purificados fueron sembrados en un gel de agarosa al 1% (Figura 31B). El vector digerido y purificado fue cuantificado en aproximadamente 15 ng/  $\mu\text{L}$  tanto para E1 (300 ng) como para E2 (225 ng). Sin embargo, el inserto digerido y purificado no pudo observarse en el gel. De todas formas, a partir de estos productos se realizó una ligación y posteriormente, transformación de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  quimiocompetentes y electrocompetentes. Se obtuvieron más de 100 colonias por placa de las cuales se seleccionaron 10 para realizar la extracción de ADN plasmídico y digestión para liberar el inserto, pero sin éxito. Se intentó preparar más inserto por PCR, pero

surgieron problemas que antes no se habían observado, no logrando reproducir el PCR descrito observándose en los geles de agarosa grandes cantidades de ADN de todos los tamaños. Una posibilidad es que los oligos se hayan contaminado, ya que se probaron todas las demás variantes, como cambiar la ADN polimerasa y utilizar un nuevo stock de dNTPs.



**Figura 31.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando en (A) las eluciones E1 y E2 resultantes de la purificación del pool de los fragmentos obtenidos por PCR. MW pb: marcador de pares de bases (100 bp, Bioron) y en (B) las eluciones E1 y E2 resultantes de la purificación de la digestión del inserto y del pET28a. MW: marcador de pares de bases (1 kb, Fermentas).

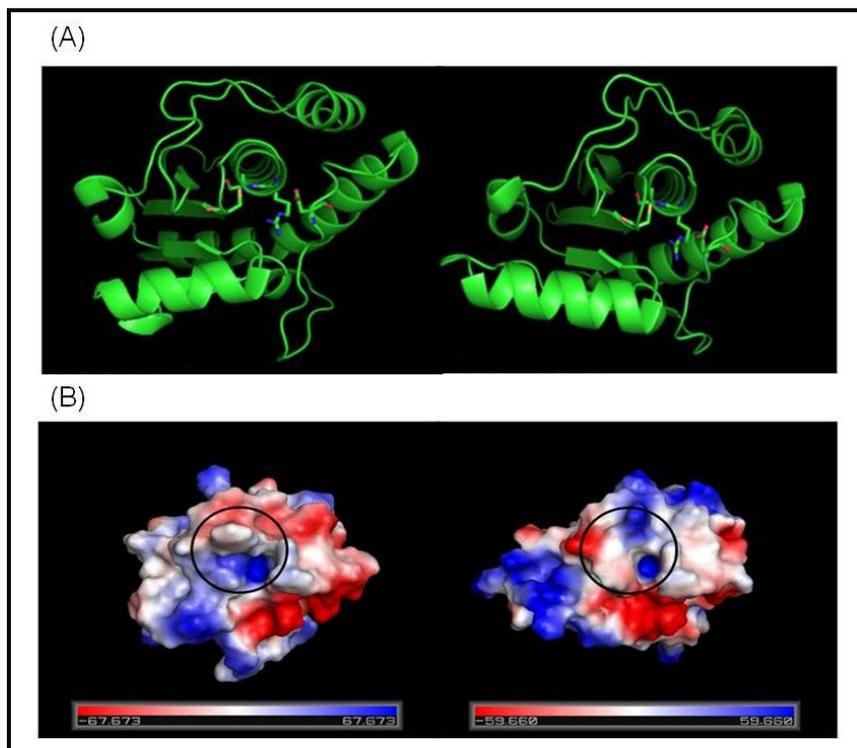
## 5- Discusión

El primer objetivo fue alcanzado ya que se logró repetir los ensayos de SPR realizados en el año 2007, utilizando un nuevo stock de extractos de proteínas de macrófagos y de PtpA D126A, llegándose a la misma conclusión. La interacción observada entre componentes del extracto proteico de macrófagos y PtpA D126A no es de naturaleza principalmente iónica, ya que la misma no se logra desplazar con altas concentraciones salinas pero sí al disminuir el pH. PtpA de *M. tuberculosis* posee sólo un 37 % de homología de secuencia con la PTP humana 1BPTP pero comparten una alta similitud estructural (17,18) (Figura 32A). Sin embargo, se observan diferencias en la distribución de cargas a nivel de la superficie del sitio activo (Figura 32B) que se piensan están implicadas en definir la especificidad por el sustrato (17). Esta superficie, en la PtpA de *M. tuberculosis* es menos cargada lo que podría estar indicando que para reclutar el sustrato participarían interacciones débiles no iónicas o hidrofóbicas, lo que concuerda con lo que sugiere los resultados de SPR. Es interesante observar que para otro homólogo de PtpA, en la bacteria *Staphylococcus aureus*, se observa la misma diferencia a nivel de la superficie del sitio activo (Figura 33) respecto al homólogo humano 1BPTP.

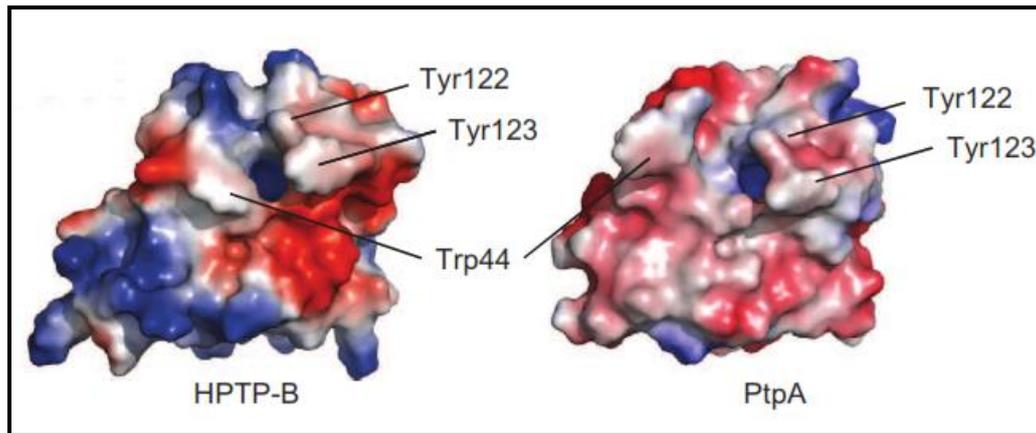
Por otro lado se observó una disminución en la interacción del extracto de proteínas de macrófago con la PtpA D126A, luego de inyectar  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , inhibidor competitivo de las fosfatasas. Es más, en trabajos previos del grupo se observó que dicho efecto es dependiente de la concentración de vanadato inyectada junto al extracto (33). Este resultado podría estar indicando que al menos parte de la interacción observada en ausencia de vanadato se está dando a través del sitio activo de la fosfatasa. Toda esta información, está siendo útil en la realización del escalado del proceso, en especial en la definición de las condiciones de lavado y elución luego del “substrate trapping”, trabajo de doctorado de la MSc Mariana Margenat.

En los estudios preliminares realizados por nuestro grupo, si bien se había evaluado la interacción de los tres extractos proteicos de macrófagos, no se había inyectado las mismas concentraciones de cada uno de ellos, lo que no permitía una comparación entre las UR obtenidas. En este trabajo inyectamos los mismos  $\mu\text{g}$  de

cada uno de los extractos y detectamos una diferencia de aproximadamente 40 UR entre los extractos proteicos de macrófagos activados y no activados, manteniéndose un perfil de asociación/disociación similar. La idea de evaluar diferentes extractos surge de la posibilidad de que los eventuales sustratos se encuentren representados de diferente manera, dependiendo que el macrófago se encuentre en situación de defensa (activado) o no. Es más, ha sido reportado que al infectar macrófagos murinos J774A.1 con la cepa  $\Delta ptpB$  de *M. tuberculosis* se observa una disminución en la supervivencia de la bacteria, sólo cuando son utilizados macrófagos activados y no cuando se utilizan macrófagos no activados (27). Esto podría indicar la existencia de componentes claves de defensa del macrófago que se producirían sólo en situación de defensa, los cuales podrían ser blancos de PtpB. Por otro lado, el sustrato reportado para PtpA fue aislado de extractos de proteínas de macrófagos no activados, por lo que será interesante conocer la identidad de los sustratos que nuestro grupo logre identificar por “Substrate-trapping”.



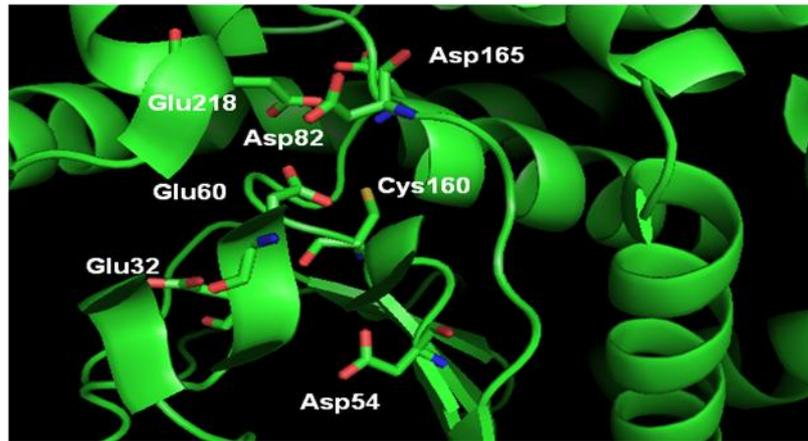
**Figura 32.** (A) Diagrama en cintas de las estructuras cristalográficas de PtpA de *M. tuberculosis* a la izquierda (PDB 1U2P) y su homólogo humano PtpB1 a la derecha (PDB 1XWW). Puede observarse la alta homología estructural. (B) Diferencia en la distribución de cargas observada entre las estructuras de PtpA de *M. tuberculosis* y PtpB1 humana. Las imágenes fueron realizadas utilizando el programa Pymol (DeLano Scientific LLC, EUA).



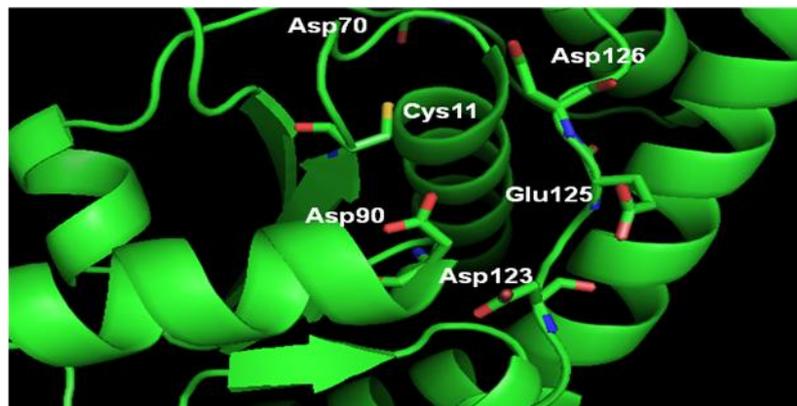
**Figura 33.** Diferencia en la distribución de cargas observada entre las estructuras de PtpA de *S. aureus* (PDB 3ROF) y PtpB1 (PDB 1XWW) humana. Se muestran los residuos hidrofóbicos conservados en las dos PTPs los cuales también están conservados en PtpA de *M. tuberculosis*. (61).

Todas las PTPs presentan un sitio activo conservado, caracterizado, como se describió en la introducción, por la presencia de una cisteína catalítica, responsable del ataque nucleofílico de un fosfo-sustrato. Con la finalidad de caracterizar la reactividad de dicha cisteína, se buscó determinar, como primera aproximación, el  $pK_a$  de cada una de las cisteínas presentes en PtpA (Cys11 catalítica, Cys16 y Cys53) y de la única presente en PtpB (Cys160 catalítica). Generalmente el  $pK_a$  de las cisteínas libres o presentes en péptidos cortos o proteínas desnaturizadas se encuentra entre 8-9 (40), sin embargo es común observar valores de  $pK_a$  más bajos cuando se trata de cisteínas catalíticas. Estos  $pK_a$  inusuales son importantes para la catálisis ya que un  $pK_a$  bajo implica una mayor disponibilidad del tiolato a pH neutros. Entre los factores que pueden influir en el  $pK_a$  de los tioles, es decir, en su acidez, se encuentra la distribución de cargas positivas orientadas alrededor del tiolato formando un “bolsillo positivo” lo que promueve por ejemplo la formación de pares iónicos entre el tiolato y residuos como histidina y arginina, y enlaces de hidrógeno que estabilizan el tiolato. Además de estos factores moleculares, existen factores estructurales que favorecen la formación de estados de transición cíclicos, interacción con una  $\alpha$ -hélice que estabilizaría la carga negativa del tiolato que se encuentra en el extremo N-terminal de la misma; y ambientales como la solvatación que afectan la nucleofilicidad del tiolato (62,63,64). Hoy en día, en la caracterización de las diferentes PTPs procariontas es más bien una excepción la determinación experimental del  $pK_a$  de la cisteína catalítica siendo muy pocos los trabajos que lo

reportan. Un ejemplo donde sí lo determinan es el estudio de la PTP de *Yersinia enterocolitica* utilizando como estrategia la inactivación de la enzima con iodoacetato a diferentes pHs, resultando en un  $pK_a$  de 4.67 (65). En el caso de las PTPs de *M. tuberculosis* fue una sorpresa detectar, mediante la metodología utilizada de alquilación con mBBBr, tres  $pK_a$  para PtpB wt, quien posee una sola cisteína, y tres para PtpA wt, quien posee tres cisteínas. En ambos casos detectamos un  $pK_a$  que correspondería a una cisteína libre, en el caso de PtpA podría corresponder al  $pK_a$  de las dos no catalíticas (Cys 53 y Cys16). En cambio en el caso de PtpB, podría representar el  $pK_a$  de una fracción de la muestra que se encuentra alterada, estructuralmente, y que se comporta como una cisteína libre de mayor  $pK_a$ . Los otros dos  $pK_a$  determinados fueron bajos (4.90 y 6.19 para PtpA y 4.90 y 5.43 para PtpB) y podrían explicarse debido a un cambio en la reactividad del tiolato con mBBBr, causado por un cambio en el microambiente del sitio activo debido a la desprotonación de un grupo ácido cercano, como aspartato o glutamato (66). Las figuras 34 y 35 muestran la distribución de los aspartatos y glutamatos cercanos a la cisteína catalítica de PtpB y PtpA respectivamente (6 residuos ácidos cercanos a la cisteína catalítica de PtpB y 5 cercanos a la cisteína catalítica de PtpA), la mayoría ubicados en regiones flexibles de la estructura. Al contar con el mutante de PtpA, D126A, pudimos descartar que el efecto fuera causado por la desprotonación de éste aspartato ya que se obtuvieron básicamente los mismos  $pK_a$  que con la forma PtpA wt. Claramente, es imprescindible evaluar el  $pK_a$  de las cisteínas por algún método alternativo ya que como se ha visto con otras enzimas, muchas veces, los diferentes métodos dan resultados distintos (67). Un método que podría utilizarse es la reactividad dependiente de pH del tiol con iodoacetamida (68). En paralelo en el grupo ya se obtuvieron los mutantes puntuales en las cisteínas, tanto de PtpA y PtpB, proteínas recombinantes que serán producidas a la brevedad.



**Figura 34.** Diagrama en cintas de la estructura cristalográfica de PtpB de *M. tuberculosis* (PDB 1YWF) mostrando un acercamiento del sitio activo donde se observan los residuos de Asp y Glu cercanos a la cisteína catalítica. La figura fue realizada en Pymol (DeLano Scientific LLC, EUA)



**Figura 35.** Diagrama en cintas de la estructura cristalográfica de PtpA de *M. tuberculosis* (PDB 1U2P) mostrando un acercamiento del sitio activo donde se observan los residuos de Asp y Glu cercanos a la cisteína catalítica. La figura fue realizada en Pymol (DeLano Scientific LLC, EUA)

Muchas investigaciones se han realizado con  $H_2O_2$  ya que se asume es un compuesto oxidante fisiológicamente relevante. Sin embargo, recientemente, se ha desafiado este concepto debido a que se ha encontrado que hay reacciones de  $H_2O_2$  con los tiolatos de las cisteínas de PTPs relativamente lentas, lo que generó la postulación de que es improbable que estas reacciones coincidan con el proceso de consumo del  $H_2O_2$  en las células (69,70). Esto puede corroborarse al analizar la tabla 1 descrita en la introducción, los valores reportados de constantes de inactivación ( $k_{inact}$ ) con  $H_2O_2$  se encuentran todos entre  $2-18 M^{-1}s^{-1}$ . Por tanto, se ha sugerido que la oxidación de las PTPs sea altamente compartimentada en áreas de la célula donde el  $H_2O_2$  es consumido más lentamente o que ocurra por acción de otros oxidantes (40). En el presente trabajo el valor obtenido de  $k_{inact}$  de PtpB con  $H_2O_2$  se encuentra entre los

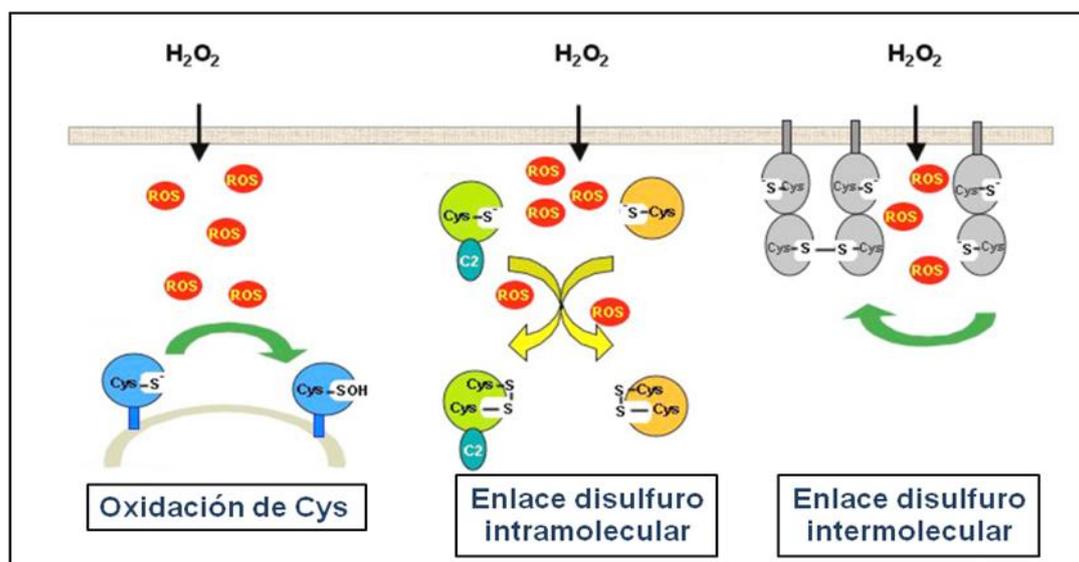
valores reportados. Cuando se contrarresta el valor obtenido para PtpB con el valor ya publicado (42) podemos constatar que el reportado es un orden menor que el obtenido en el presente trabajo. Analizando en detalle la metodología utilizada, se puede observar que en dicho trabajo no eliminaron el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> antes de evaluar la actividad fosfatasa, y dicha actividad la determinan a punto final, lo que consideramos podría llevar a subestimar el valor de la  $k_{inact}$ . En este artículo, se discute que la menor susceptibilidad observada entre PtpA y PtpB de *M. tuberculosis* frente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se debería a una protección, en el caso de PtpB, del sitio activo gracias a un elemento de la estructura que mimetizaría el sustrato, para corroborarlo pretendemos realizar el experimento descrito en esta tesis, también para PtpA wt. (42)

En la literatura se encuentran diversos estudios bioquímicos en los que se han mostrado diferencias en la susceptibilidad de las diferentes PTPs a la oxidación *in vitro*. Por ejemplo, Groen *et al*, 2004 estudiaron la susceptibilidad de los dos dominios fosfatasa de la proteína humana RPTP $\alpha$  (RPTP $\alpha$ -D1 y RPTP $\alpha$ -D2) al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. RPTP $\alpha$ -D1 es el dominio que posee la mayor parte de la actividad catalítica, sin embargo, el dominio D2 es más sensible a la oxidación. Esa oxidación en el dominio D2 produciría un cambio conformacional el cual resulta en una forma inactiva de la enzima. Por otro lado, testearon la sensibilidad frente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de una PTP que posee dos dominios: LAR-D1 (catalíticamente activo) y LAR-D2 (no activo) y de una PTP de zebrafish homóloga a la PTP humana 1BPTP la cual posee un solo dominio fosfatasa. Los resultados mostraron que tanto LAR-D1 y LAR-D2 como 1BPTP fueron oxidadas a niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> similares a los observados para RPTP $\alpha$ -D2. Por tanto, no parece existir una correlación directa o inversa entre la oxidabilidad y la actividad catalítica de las PTPs (36).

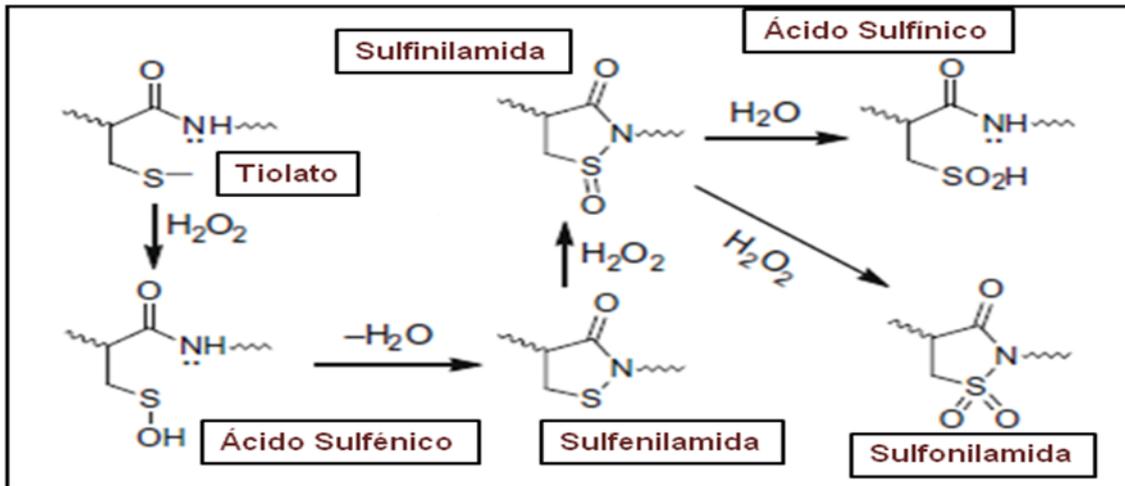
Con respecto a los ensayos con peroxinitrito, como se indicó en la introducción, ya se contaba con un primer valor de  $k_{inact}$  de PtpA wt de *M. tuberculosis* con ONOO<sup>-</sup>, del orden de 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, dicho valor es del mismo orden del obtenido en el presente trabajo para PtpB y si bien aún debemos obtener el valor de un duplicado del ensayo, el mismo es tres órdenes menor, que los

valores reportadas hasta ahora para otras PTPs (47). En los ensayos publicados la estrategia utilizada fue diferente, ya que utilizaron medidas de actividad fosfatasa de la enzima luego de tratarla con  $\text{ONOO}^-$  y no siguieron la aceleración de la descomposición del peroxinitrito en presencia de la fosfatasa.

No logramos entender aún la causa de la precipitación observada a temperaturas mayores de  $17^\circ\text{C}$  y ausencia de DTT, observada tanto para PtpB wt como PtpA wt. Teniendo en cuenta que el ácido sulfénico formado por oxidación puede reaccionar rápidamente con residuos aminoacídicos próximos, se supuso que en el caso de PtpB lo que podría ocurrir es la formación de agregados intermoleculares o cambios conformacionales que favorezcan la agregación. Se ha descrito en la literatura que esto puede generar productos secundarios como un enlace disulfuro entre la cisteína catalítica y otra cisteína de la misma molécula (intramolecular) o de otra molécula vecina (intermolecular) (Figura 36) o formarse, también, sulfenilamidas por la reacción del tiolato con el grupo amino de algún aminoácido vecino (Figura 37). Estas estructuras se han observado en cristales de PTPs oxidadas. Todos estos productos son reversibles y se postula que su rol es estabilizar el tiol para que no sufra sobreoxidación (40). Sin embargo para PtpB wt no logramos evidenciar la formación neta de agregados luego del tratamiento con peroxinitrito.



**Figura 36.** Formación de enlaces disulfuro intra e intermoleculares por oxidación con  $\text{H}_2\text{O}_2$ . (Adaptado de Meng *et al.*, 2006) (39)



**Figura 37.** Formación de Sulfenilamida y sus derivados. (Adaptado de Sivaramacrishnan *et al.*, 2010) (71)

Por último, el gen *Imo0938* de *L. monocytogenes* no se ha logrado clonar aún probablemente a causa de la poca cantidad de producto de PCR del gen, debido a la baja temperatura de “melting” de los oligos diseñados. Para poder lograrlo se decidió cambiar la estrategia de clonado y utilizar la técnica llamada “RF-Cloning”. La misma se basa en insertar un fragmento de ADN en el lugar deseado de un plásmido en forma independiente del uso de sitios de restricción y ligación. La técnica consiste en una etapa de generación de grandes oligos (unas 50 pb) que contienen los extremos del gen a clonar y una parte del vector, con los cuales se realiza una PCR del gen de interés a partir del ADN genómico. Posteriormente con dicho producto se realiza una nueva PCR utilizando como molde el vector de expresión, se digiere el ADN parental con Dpn1 y se transfecta directamente con el vector amplificado conteniendo el gen de interés (72). El análisis de la secuencia de *L. monocytogenes* muestra la presencia de cuatro genes que codificarían posibles tirosín fosfatasa, dos homólogas al gen que codifica PtpA (*Imo0938* y *Imo2540*) y dos homólogas al gen que codifica PtpB de *M. tuberculosis*, *Imo1935* y *Imo1800*, de los cuales sólo éste último ha sido caracterizado (51).

## 6- Bibliografía

- 1- Gay Ducati R, Ruffino-Netto A, Augusto Basso L, Santiago Santos D. 2006. "The resumption of consumption – A review on tuberculosis", Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 101 (7): 697-714
- 2- Ahmad, S. 2010. "Pathogenesis, Immunology, and Diagnosis of Latent *Mycobacterium tuberculosis* Infection", Clinical and Developmental Immunology, 2011 (814943): 1-17
- 3- Thaiss C, Kaufmann S. 2010. "toward novel Vaccines Against tuberculosis: current Hopes and obstacles", Yale J Biol. Med., 83: 209-215
- 4- Koul A, Arnoult E, Lounis N, Guillemont J, Andries K. 2011. "The challenge of new drug discovery for tuberculosis", Nature, 469: 483-490
- 5- Hussein M, Mooij J, Roujouleh H. 2003. "Tuberculosis and Chronic Renal Disease", Sem. Dial., 16(1): 38-44
- 6- Dooley K, Chaisson R. 2009. "Tuberculosis and diabetes mellitus: convergence of two epidemics", Lancet Infect Dis, 9(12): 737-746
- 7- Russell D. 2001. "*Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow", Macmillan Magazines Ltd, Nature Rev., Molecular Cell Biology, 2: 1-9
- 8- Zhang Y, Wade MM, Scorpio A, Zhang H, Sun Z. 2003. "Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid", J. Antimicrob. Chemother., 52: 790-795
- 9- Moorhead G, Trinkle-Mulcahy L, Ulke-Lemée A. 2007. "Emerging roles of nuclear protein phosphatases", Nature Pub. Group, 8: 234-244

- 10- Kerk D, Templeton G, Moorhead G. 2008. "Evolutionary Radiation Pattern of Novel Protein Phosphatases Revealed by Analysis of Protein Data from the Completely Sequenced Genomes of Humans, Green Algae, and Higher Plants", *Plant Physiol.*, 146: 351-367
- 11- Moorhead G, De Wever V, Templeton G, Kerk D. 2009. "Evolution of protein phosphatases in plants and animals", *Biochem. J.*, 417: 401-409
- 12- McCain D, Catrina I, Hengge A, Zhang Z. 2002. "The Catalytic Mechanism of Cdc25A Phosphatase", *J. Biol. Chem.*, 277(13): 11190-11200
- 13- Shi L, Potts M, Kennelly P. 1998. "The serine, threonine, and/or tyrosine-specific kinases and phosphatases of prokaryotic organisms: a family portrait", *FEMS Microbiol. Rev.*, 22: 229-253
- 14- Tonks N. 2006. "Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease", *Nature rev. – Molecular Cell Biology*, 7: 833-846
- 15- Denu J, Stuckey J, Saper M, Dixon J. 1996. "Form and Function in Protein Dephosphorylation", *Cell*, 87:361-364
- 16- Cowley S, Babakaiff R, Av-Gay Y. 2002. "Expression and localization of the *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase PtpA", *Res. Microbiol.*, 153: 233-241
- 17- Madhurantakam C, Rajakumara E, Mazumdar P, Saha B, Mitra D, Wiker H, Sankaranarayanan R, Das A. 2005. "Crystal Structure of Low-Molecular-Weight Protein Tyrosine Phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis* at 1.9-Å Resolution", *Am. Soc. Microbiol.*, 187(6): 2175-2181
- 18- Barford D, Flint AJ, Tonks NK. 1994. "Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase 1B", *Science*, 263(5152): 1397-1404

- 19- Grundner C, Ng HL, Alber T. 2005. "*Mycobacterium tuberculosis* Protein Tyrosine Phosphatase PtpB Structure Reveals a Diverged Fold and a Buried Active Site", *Structure*, 13(11): 1625-1634
- 20- Beresford N, Patel S, Armstrong J, Szoor B, Fordham-Skelton A, Tabernero L. 2007. "MtpB, a virulence factor from *Mycobacterium tuberculosis*, exhibits triple-specificity phosphatase activity", *Biochem. J.*, 406: 13-18
- 21- Beresford NJ, Saville CH, Bennett H, Roberts I, Tabernero L. 2010. "A new family of phosphoinositide phosphatases in microorganisms: identification and biochemical analysis", *BMC genomics*, 11:457
- 22- Koul A, Choidas A, Treder M, Tyagi A, Drlica K, Singh Y, Ullrich A. 2000. "Cloning and Characterization of Secretory Tyrosine Phosphatases of *Mycobacterium tuberculosis*", *Am. Soc. Microbiol.*, 182 (19):5425-5432
- 23- Koul A, Herget T, Klebl B, Ullrich A. 2004. "Interplay between mycobacteria and host signalling pathways", *Nature rev. microbiol.*, 2: 189-202
- 24- Bach H, Wong D, Av-Gay Y. 2009. "*Mycobacterium tuberculosis* PtkA is a novel protein tyrosine kinase whose substrate is PtpA", *Biochem. J.*, 420(2): 155-160
- 25- Tailor P, Gilman J, Williams S, Couture C, Mustelin T. 1997. "Regulation of the Low Molecular Weight Phosphotyrosine Phosphatase by Phosphorylation at Tyrosines 131 and 132", *J. Biol. Chem.*, 272(9): 5371-5374
- 26- Bach H, Papavinasasundaram KG, Wong D, Hmama Z, Av-Gay Y. 2008. "*Mycobacterium tuberculosis* virulence is mediated by PtpA dephosphorylation of human vacuolar protein sorting 33b", *Cell Host & Microbe*, 3(5): 316-322
- 27- Singh R, Rao V, Shakila H, Gupta R, Khera A, Dhar N, Singh A, Koul A, Singh Y, Narayanan P, Paramasivan C, Ramanathan V, Tyagi A. "Disruption of MtpB impairs

the ability of *Mycobacterium tuberculosis* to survive in guinea pigs”, *Molec. Microbiol.*, 50: 751-762

28- Beresford NJ, Mulhearn D, Szczepankiewicz B, Liu G, Johnson ME, Fordham-Skelton A, Abad-Zapatero C, Cavet JS, Taberner L. 2009. “Inhibition of MptpB phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis* impairs mycobacterial survival in macrophages”, *J. Antimicrob. chemother.*, 63(5): 928-936

29- Flint A, Tiganis T, Barford D, Tonks N. 1997. “Development of “substrate-trapping” mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases”, *PNAS*, 94: 1680-1685

30- Blanchetot C, Chagnon M, Dube N, Halle M, Tremblay M. 2005. “Substrate-trapping techniques in the identification of cellular PTP targets” *Methods*, 35: 44-53

31- Pannifer A, Flint A, Tonks N, Barford D. 1998. “Visualization of the cysteinylphosphate intermediate of a protein-tyrosine phosphatase by x-ray crystallography”, *J. Biol. Chem.* 273: 10454-10462

32- Scapin G, Patel S, Patel V, Kennedy B, Asante-Appiah E. 2001. “The structure of apo protein-tyrosine phosphatase 1B C215S mutant: more than just an S --> O change”, *Protein Sci.*, 10(8): 1596-1605

33- Purificação M. 2008. “Identificação de potenciais substratos de Ptpa, tirosina-fosfatase de *Mycobacterium tuberculosis*”, tesis de maestría, [www.dominiopublico.gov.br](http://www.dominiopublico.gov.br)

34- Zhukov A, Schürenberg M, Areskoug D, Jansson Ö, Buijs J. 2004. “Integration of Surface Plasmon Resonance with Mass Spectrometry: Automated Ligand Fishing and Sample Preparation for MALDI MS Using a Biacore 3000 Biosensor”, *J. Biomolec. Tech.*, 15:112-119

- 35- Zhou B, He Y, Zhang X, Xu J, Luo Y, Wang Y, Franzblau SG, Yang Z, Chan RJ, Liu Y, Zheng J, Zhang Z. 2010. "Targeting *Mycobacterium* protein tyrosine phosphatase B for antituberculosis agents" PNAS 107: 4573-4578
- 36- Groen A, Lemeer S, van der Wijk T, Overvoorde J, Heck AJR, Ostman A, Barford D, Slijper M, den Hertog J. 2004. "Differential oxidation of protein-tyrosine phosphatases", J. Biol. Chem., 280(11): 10298-10304
- 37- Savitsky PA, Finkel T. 2002. "Redox Regulation of Cdc25C", J. Biol. Chem., 277(23): 20535-20540
- 38- Weibrecht I, Böhmer SA, Dagnell M, Kappert K, Ostman A, Böhmer FD. 2007. "Oxidation sensitivity of the catalytic cysteine of the protein-tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2", Free Radic. Biol. Med., 43(1): 100-110
- 39- Meng T, Lou Y, Chen Y, Hsu S, Huang Y. 2006. "Cys-Oxidation of Protein Tyrosine Phosphatases: Its Role in Regulation of Signal Transduction and Its Involvement in Human Cancers", J Cancer Molec., 2(1): 9-16
- 40- Östman A, Frijhoff J, Sandin A, Böhmer F. 2011. "Regulation of protein tyrosine phosphatases by reversible oxidation", J. Biochem., 150(4): 345-356
- 41- Denu JM, Tanner KG. 1998. "Specific and Reversible Inactivation of Protein Tyrosine Phosphatases by Hydrogen Peroxide: Evidence for a Sulfenic Acid Intermediate and Implications for Redox Regulation", Biochem., 37: 5633-5642
- 42- Flynn EM, Hanson JA, Alber T, Yang H. 2010. "Dynamic active site protection by the *M. tuberculosis* protein tyrosine phosphatase PtpB lid domain", J. Am. Chem. Soc., 132(13): 4772-4780
- 43- Liaudet L, Vassalli G and Pacher P. 2009. "Role of peroxynitrite in the redox regulation of cell signal transduction pathways", Front Bioscience, 14: 4809-4814

- 44- Mallozzi C, Di Stasi AM, Minetti M. 1997. "Peroxynitrite modulates tyrosine-dependent signal transduction pathway of human erythrocyte band 3", *Faseb J.*, 11(14): 1281-90
- 45- Lopez CJ, Qayyum I, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. 2005. "Effect of nitration on protein tyrosine phosphatase and protein phosphatase activity in neuronal cell membranes of newborn piglets", *Neurosci. Lett.*, 386(2): 78-81
- 46- Caselli A, Camici G, Manao G, Moneti G, Pazzagli L, Cappugi G, Ramponi G. 1994. "Nitric oxide causes inactivation of the low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase", *J. Biol. Chem.*, 269 (40): 24878-24882
- 47- Takakura K, Beckman JS, MacMillan-Crow LA, Crow JP. 1999. "Rapid and irreversible inactivation of protein tyrosine phosphatases PTP1B, CD45, and LAR by peroxynitrite", *Arch. Biochem. Biophys.*, 369(2): 197-207
- 48- Galan JE. 2001. "*Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work", *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17: 53-86
- 49- Cozzone AJ, Grangeasse C, Doublet P, Duclos B. 2004. "Protein phosphorylation on tyrosine in bacteria", *Arch. Microbiol.*, 181:171-181
- 50- Nhieu GT, Enninga J, Sansonetti P, Grompone G. 2005. "Tyrosine kinase signaling and type III effectors orchestrating *Shigella* invasion", *Curr. Opin. Microbiol.* 8: 16-20
- 51- Kastner R, Dussurget O, Soulat D, Archambaud C, Cossart P, Kernbauer E and Decker T. 2011. "LipA, a Tyrosine and Lipid Phosphatase Involved in the Virulence of *Listeria monocytogenes*" *Am. Soc. Microbiol.*, 79(6): 2489-2498
- 52- Koksall A, Cingolani G. 2011. "Dimerization of Vaccinia Virus VH1 Is Essential for Dephosphorylation of STAT1 at Tyrosine 701", *J. Biol. Chem.*, 286(16): 14373-14382

- 53- Mandel M, Higa A. 1970. "Calcium-dependent bacteriophage DNA infection", J. Molec. Biol., 53(1): 159-162
- 54- Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G. 1975. "Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation", Nature, 258: 598-599
- 55- Voet D, Voet JG, Pratt C. 2009. "Fundamentos de Bioquímica, La vida a nivel molecular", segunda edición, ed. Médica Panamericana, 1260 pp., ISBN 978-950-06-2314-8
- 56- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. "Molecular Cloning-a laboratory manual", segunda edición, Cold Spring Harbor Lab. Press, ISBN 0-87969-309-6
- 57- Olson B, Markwell J. 2007. "Assays for Determination of Protein Concentration". Current Protocols in Protein Science, Vol. 3.4 John Wiley & Sons, Inc, 3.4.1-3.4.29
- 58- Kosower N, Kosower E, Newton G, Ranney H. 1979. "Bimane fluorescent labels: Labeling of normal human red cells under physiological conditions", Proc. Natl. Acad. Sci., 76(7): 3382-3386
- 59- Ellis K, Morrison J. 1982. "Methods in Enzymology-Buffers of constant Ionic Strength for Studying pH-Dependent Processes", Acad. Press, 38: 405-426
- 60- Zhang Z. 2002. "Protein Tyrosine Phosphatases: Structure and Function, Substrate Specificity, and Inhibitor Development", Ann. Rev. Pharm. Toxic., 42: 209-234
- 61- Vega C, Chou S, Engel K, Harrel ME, Rajagopal L, Grundner C. 2011. "Structure and Substrate Recognition of the *Staphylococcus aureus* Protein Tyrosine Phosphatase PtpA", J. Biol. Mol., 413(1): 24-31

- 62- Kortemme T, Creighton T. 1995. "Ionisation of Cysteine Residues at the Termini of Model  $\alpha$ -Helical Peptides. Relevance to Unusual Thiol pKa Values in Proteins of the Thioredoxin Family", *J. Mol. Biol.*, 253: 799-812
- 63- Peters GH, Frimurer TM, Olsen OH. 1998. "Electrostatic Evaluation of the Signature Motif (H/V)CXR(S/T) in Protein-Tyrosine Phosphatases", *Biochem.*, 37: 5383-5393
- 64- Ferrer-Sueta G, Manta B, Botti H, Radi R, Trujillo M, Denicola A. 2011. "Factors Affecting Protein Thiol Reactivity and Specificity in Peroxide reduction", *Chem. Res. Toxicol – Am. Chem. Soc.*, 24: 434-450
- 65- Zhang ZY, Dixon JE. 1993. "Active Site Labeling of the *Yersinia* Protein Tyrosine Phosphatase: The Determination of the pKa of the Active Site Cysteine and the Function of the Conserved Histidine 402", *Biochem.*, 32: 9340-9345
- 66- Sardi F, Manta B, Portillo S, Knoop B, Comini M, Ferrer-Sueta G. "Acidity and nucleophilicity in thiols by reaction with monobromobimane and fluorescence detection". Trabajo en proceso de publicación.
- 67- Mössner E, Huber-Wunderlich M, Glockshuber R. 1998. "Characterization of *Escherichia coli* thioredoxin variants mimicking the active-sites of other thiol/disulfide oxidoreductases", *Prot. Science*, 7: 1233-1244
- 68- Kallis GB, Holmgren A. 1980. "Differential reactivity of the functional sulf-hydryl groups of cysteine-32 and cysteine-35 present in the reduced form of thioredoxin from *Escherichia coli*", *J. Biol. Chem.* 255:10261-10265
- 69- Winterbourn C. 2008. "Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen Species", *Nat. Chem. Biol.*, 4: 278-286
- 70- Stone JR and Yang S. 2006. "Hydrogen peroxide: a signaling Messenger", *Antiox. Redox Signal.*, 8: 243-270

71- Sivaramacrishnan S, Cummings A, Gates K. 2010. "Protection of a single-cysteine redox switch from oxidative destruction: On the functional role of sulfenyl amide formation in the redox-regulated enzyme PTP1B", *Bioorg. Med. Chem.*, 20: 444-447

72- Van den Ent F, Löwe J. 2006. "RF cloning: A restriction-free method for inserting target genes into plasmids", *J. Biochem. Biophys.*, 67: 67-74