



FACULTAD DE
CIENCIAS

UDELAR | fcienc.edu.uy



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Estudio de potenciales
inhibidores de la únicas
fosfatasas en tirosina de
Mycobacterium tuberculosis:
PtpA y PtpB

Br. LUCÍA RODRÍGUEZ

Tutora: ANDREA VILLARINO
Sección Bioquímica y Biología Molecular

Tesina de grado-Licenciatura en Bioquímica
Facultad de Ciencias Universidad de la República
Montevideo
2012

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a todas aquellas personas que de un modo u otro estuvieron conmigo estos años.

En especial quiero agradecer a Andrea por darme la oportunidad de crecer profesional y personalmente en su laboratorio. Por su confianza, paciencia y ayuda en todo momento. También al grupo TB: Anne-Marie y Mariana que me ayudaron en mis primeras etapas dentro del laboratorio. Y a la buena onda de la 305.

A mis amigos de facultad, Flopy, Toma, Santiyan, Nadia, Stepha, Pauli, Pau, Lucy y Maru con quien compartí largo momentos de estudio y diversión. Y a mis amigas de la vida, Maite y Magui por el aguante.

A Mauri por el apoyo incondicional, la paciencia y el cariño en todo momento.

A mi linda familia por estar siempre: Claudia y Toty, y mis hermanos Tamara, Camilo, Facundo, y Mateo.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	v
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS.....	18
Objetivo General.....	18
Objetivos específicos.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
1. Obtención de las proteínas recombinantes PtpA y PtpB de <i>M. tuberculosis</i>	19
1.1 Transformación química	19
1.2 Expansión y purificación del vector conteniendo el gen de interés	20
1.3 Preparación del stock de células transformadas de <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	22
1.4 Expresión de PtpA y PtpB en <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	22
1.5 Purificación de PtpA y PtpB por cromatografía de afinidad (IMAC)	24
1.5.1. Preparación de la matriz.....	24
1.5.2. Inmovilización y elución de las proteínas inmovilizadas.....	25
1.6 Eliminación del imidazol por diálisis gradual y concentración de la proteína obtenida.....	25
1.7 Purificación de PtpA/PtpB por cromatografía de exclusión molecular	27
8 Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	27
2. Determinación de la actividad específica de PtpA y PtpB	28
2.1 Determinación de la concentración proteica.....	28
2.2 Ensayos de la actividad fosfatasa de PtpA y PtpB	29
3. Evaluación del efecto de las chalconas en la actividad fosfatasa de PtpB	30
3.1 Chalconas a ser evaluadas	30
3.2 Selección de la concentración final de chalcona ser utilizada en los ensayos de actividad fosfatasa	33
3.3 Actividad de PtpB en presencia de cada chalcona	33
4. Ensayos de acoplamiento molecular entre PtpB y cada una de las chalconas ..	35
RESULTADOS	38

1. Obtención de las proteínas recombinantes PtpA y PtpB de <i>M. tuberculosis</i>	38
2. Determinación de la actividad específica de las fosfatasa purificadas	43
3. Estabilidad de las chalconas en el ensayo de actividad fosfatasa	45
4. Efecto de las chalconas en la actividad fosfatasa de PtpB y PtpA	46
5. Ensayos de acoplamiento molecular entre PtpB y cada una de las chalconas ..	50
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	56
BIBLIOGRAFÍA	67
ANEXO	76

Comentario [U1]: parentesis actividad especifica

Comentario [U2]:

Comentario [U3]:

RESUMEN

La tuberculosis causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* es una enfermedad infecto-contagiosa que afecta principalmente el aparato respiratorio. A nivel mundial la situación es alarmante, registrándose por año 8,7 millones de nuevo casos y más de 1,4 millones de muertos. A pesar de la existencia de tratamiento contra la tuberculosis se estima que un tercio de la población mundial se encuentra infectada por la forma latente de *M. tuberculosis* y que sólo un 5-10% de la población manifiesta la enfermedad. La aparición de cepas multi-resistentes a las drogas tradicionales, el prolongado tratamiento de la quimioterapia, junto con los problemas asociados a la personas inmunocomprometidas (edad avanzada, mala nutrición y co-infección con VIH) estimulan a la investigación de nuevos blancos terapéuticos. PtpA y PtpB de *M. tuberculosis*, secretadas dentro de las células infectadas, son las dos únicas fosfatasas en tirosina, las cuales alterando las vías de señalización del huésped participarían impidiendo la maduración del fagolisosoma para lograr la sobrevivencia dentro de las células infectadas. Ambas fosfatasas son consideradas blancos atractivos para el diseño de nuevas drogas reportándose un gran número de moléculas inhibidoras. Entre los inhibidores se encuentra la familia de las chalconas, cuya síntesis usa como modelo la estructura de los flavonoides e isoflavonoides encontrados en plantas. Las chalconas (1,3 difenilacetopropeno) constan de dos anillos aromáticos unidos a una cadena que contiene un doble enlace y un grupo cetona. En la literatura estos compuestos han sido reportados como inhibidores competitivos de PtpA y PtpB con constantes de inhibición del orden de 5-8 μM , inclusive se ha visto que provocan una disminución de la carga bacteriana en ensayos con macrófagos infectados con *M.tb*. En el presente trabajo se evaluó el potencial poder inhibitorio de 25 nuevas chalconas aún no estudiadas, sobre la actividad fosfatasa de PtpB y PtpA. Para ello se expresaron y purificaron las proteínas recombinantes y se optimizó el ensayo de actividad fosfatasa en un sistema de microplaca. En paralelo se realizaron ensayos *in silico* con las 25 chalconas para predecir el sitio de unión de estas moléculas a las fosfatasas y correlacionar los datos experimentales con los teóricos. Los resultados obtenidos permitieron seleccionar un grupo de chalconas, que si bien no causan una gran inhibición de PtpB, podrán ser utilizadas como base para diseñar nuevas moléculas con mejor poder inhibitorio que las obtenidas actualmente.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*) es una enfermedad infecto-contagiosa que afecta principalmente el aparato respiratorio. A nivel mundial la situación es alarmante, registrándose por año 8,7 millones de nuevo casos y más de 1,4 millones de muertos [1]. En Uruguay la TB no ha dejado de ser un problema de salud nacional, registrándose más de 600 nuevos casos por año y una mortalidad del 12 % (www.chlaep.org.uy). El ciclo infectivo de *M.tb* comienza con la inhalación de partículas de aerosol que contienen una carga de bacterias suficientes para penetrar en los pulmones (Vida extracelular, Fig. 1). Allí, en los macrófagos alveolares, células inmunitarias de la primer línea de defensa del tejido infectado por *M.tb*., se produce la fagocitosis y se desencadenan los efectos bactericidas como lo son la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la producción de óxido nítrico a través de la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa y otras especies reactivas del nitrógeno (Vida intracelular, Fig. 1). Los altos niveles de citoquinas como el interferón gamma (INF γ) y el factor de necrosis tumoral (TNF α) contribuyen a la formación del granuloma, una masa de células inmunitarias que rodean a los macrófagos infectados por *M.tb*. para evitar que se siga expandiendo hacia otros tejidos (Latencia, Fig 1). De esta manera, *M.tb* puede permanecer latente e inadvertida por años dentro de diferentes tipos celulares como ser macrófagos, neumocitos alveolares o células dendríticas [2-5]. Posteriormente en aquellas personas

inmunocomprometidas (edad avanzada, malnutrición, co-infección con VIH) puede reactivarse comenzando un ciclo de replicación para su diseminación. El riesgo de infección está asociado a varios factores como la carga bacteriana, el estado inmunológico de la persona y la susceptibilidad de cada individuo [6-10].

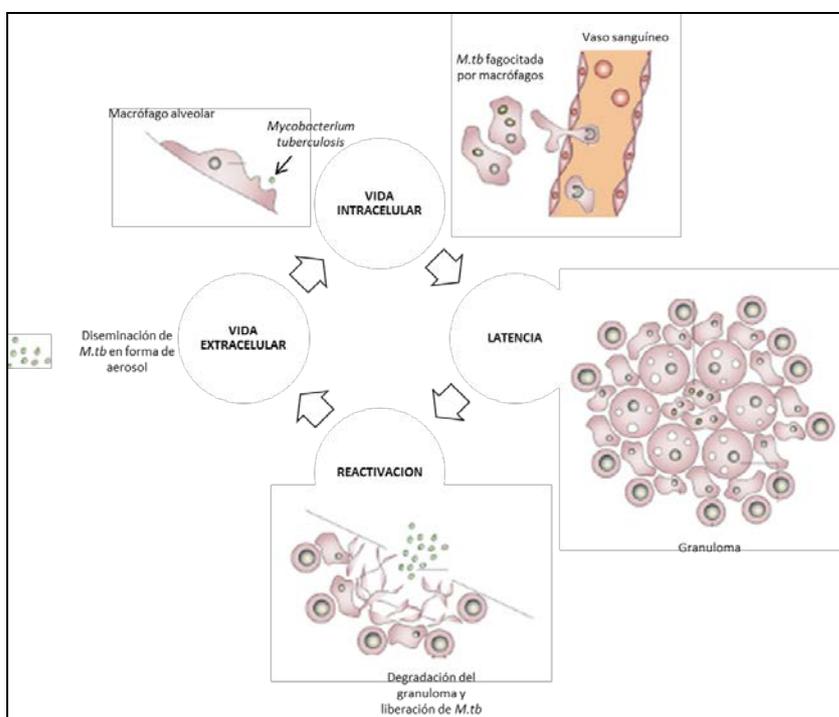


Figura 1- Esquema representativo del ciclo de vida de *Mycobacterium tuberculosis*. Versión adaptada de Russell, 2001 [9]

Para la detección de la tuberculosis se realizan dos tipos de ensayos, uno conocido como test TST (“*TuberculinSkin Test*”) o PPD (“*Purified Protein Derivative*”) que consiste en administrar en la piel al paciente proteínas purificadas de extractos de micobacterias, y observar al cabo de

unas horas la formación de una erupción con una determinada magnitud, para considerar el test como positivo. La desventaja de este test son los falsos positivos que se producen como consecuencia de reacciones cruzadas contra antígenos de otras micobacterias no patógenas. El otro ensayo, se basa en la detección de dos antígenos micobacterianos específicos (ESAT-6 y CFP-10) liberados por la bacteria luego de la activación de los linfocitos T en respuesta a INF- γ . Ambos métodos tienen la desventaja de no poder diferenciar entre la forma latente y activa de la enfermedad [11-13].

La vacuna existente contra la tuberculosis es la BCG (Bacille-Calmette-Guérin) realizada con *Mycobacterium bovis* atenuada; es de bajo costo y alta seguridad y protege bien a los niños pero no tiene buena respuesta en personas adultas. La disminución del efecto de la BCG se puede deber a que la persona se encuentre expuesta a ambientes donde existen otras micobacterias o a la presencia de infección con otros patógenos, lo que interferirían con la vacuna debilitando la respuesta inmune. A pesar de la existencia de quimioterapia contra la tuberculosis se estima que un tercio de la población mundial se encuentra infectada por la forma latente de *M. tb.* y que un 5-10% de la población manifiesta la enfermedad [14]. La quimioterapia actual combina el uso, durante dos meses, de las drogas isoniazida (inhibidor de la síntesis del ácido micólico), rifampicina (inhibidor de la transcripción a través de la interacción con la ARN polimerasa), pirazinamida y etambutol (inhibidor de la síntesis de

arabinogalactano), seguido de cuatro meses de isoniazida y rifampicina [15-17]. El largo período de quimioterapia, que provoca el abandono del tratamiento, y/o la mala administración de estas drogas, son factores que han favorecido la aparición de cepas resistentes (*"Multi-and extensively-drugresistant-tuberculosis"*, MDR-TB y XDR-TB) que hacen aún más difícil el control de la tuberculosis. Las cepas de *M. tb.*, MDR-TB se caracterizan por resistir a la primera línea de antibióticos (isoniazida y rifampicina), mientras que las cepas XDR-TB son resistentes también a los antibióticos de segunda línea, como la amikacina, kanamicina y capreomicina [13,18-21].

Con el objetivo de evadir el sistema inmune del huésped, varios patógenos bacterianos han desarrollado estrategias como la secreción de moléculas efectoras para modificar vías de señalización del huésped, logrando la supervivencia y el mantenimiento dentro de ese entorno [22]. La fosforilación de proteínas desempeña un papel importante en la detección de señales extracelulares producidas por la presencia de patógenos y permite desencadenar señales intracelulares con el objetivo de la eliminación de los mismos [23]. Por este motivo, varias quinasas y fosfatasa de patógenos bacterianos han sido descritas como factores de virulencia [24,25] capaces de modular dichas señales producidas por el huésped, y así lograr sobrevivir dentro del mismo. Un ejemplo de ello es YopH, una fosfatasa en tirosina de *Yersinia pseudotuberculosis* para la que existen evidencias de su rol en interferir con la fagocitosis defosforilando dos proteínas implicadas en la vía de adhesión celular [26-29]. De la misma forma, se ha visto que la fosfatasa

SptP de *Salmonella typhimurium* juega un papel importante en el reordenamiento del citoesqueleto logrando la internalización de la bacteria en células no fagocíticas como las epiteliales [30]. *Mycobacterium tuberculosis* presenta 11 quinasas en serina/treonina de tipo eucariota, dos de ellas son solubles (PknG y PknK) y el resto son proteínas transmembrana [31,32]. Además presenta una fosfatasa en serina/treonina (Pstp), una fosfatasa capaz de desfosforilar fosfoinositol (SapM) y dos fosfatasas en tirosina (PtpA y PtpB). Por otro lado, recientemente el grupo de Av-Gay ha reportado la existencia en *M. tb.* de la única quinasa en tirosina (PtkA) perteneciente a una nueva familia de quinasas, la cual según los autores, en ensayos *in vitro*, tendría como sustrato a PtpA [33].

PtpA y PtpB no son esenciales para la vida de la bacteria pero son consideradas factores de virulencia, necesarios para la adaptación y el crecimiento de *M. tb.* en modelos de infección en células e *in vivo* [34,35]. Koul y colaboradores han demostrado por “western blot” la presencia de ambas fosfatasas tanto fuera como dentro de la bacteria en las cepas de *M. tb.* H₃₇Rv (cepa virulenta) y H₃₇Ra (cepa menos virulenta) [36]. Además, demostraron por “Southern blot” la presencia del gen PtpA en dichas cepas H₃₇Rv y H₃₇Ra de *M. tuberculosis* y en diferentes especies de micobacterias (*M. bovis*, *M. smegmatis*,) [36]. Sin embargo, el gen de PtpB no se detectó en *M. smegmatis* (micobacteria no patógena) y sí en las otras especies patógenas analizadas. Ante esta evidencia, los autores sugieren un posible rol específico de PtpB en las especies patógenas. Por otro lado, el grupo de

Av-Gay, a través de ensayos de transcripción con un gen reportero, ha observado la expresión de PtpA en especies patógenas de lento crecimiento como *M. bovis* en condiciones de infección en monocitos humanos, pero no observaron una expresión de PtpA en *M. smegmatis*[37]. En ambos trabajos se sugiere que PtpA y PtpB son secretadas por la bacteria, aunque aún no es claro el mecanismo sin la presencia característica de una señal de secreción en el extremo N-terminal de dichas proteínas.

Ensayos de infección con *M.tb*"knockout" para el gen de PtpB realizados en un modelo animal (cobayo) mostraron una reducción de 70 veces la carga bacteriana inicial luego de seis semanas de infección comparado con animales infectados con la bacteria portando el gen salvaje de PtpB. En un modelo celular de macrófagos no estimulados no se observaron diferencias en la sobrevivencia de *M.tb*"knockout" para el gen de PtpB respecto a la cepa salvaje. Sin embargo, ensayos en los que se infectaron macrófagos previamente activados con INF γ , se observó que la sobrevivencia de *M.tb*"knockout" para el gen de PtpB se reduce 7 veces respecto a la cepa salvaje [38]. Es más, en un modelo celular de infección con *M. tb*., Zhou y colaboradores han observado un aumento en la fosforilación de las quinasas p38 y ERK1/2 de macrófagos activados con INF γ [39]. Los autores sugieren un rol de PtpB en las vías de señalización mediadas por INF γ , causando la disminución de la producción de IL-6, citoquina estimulada por INF γ y necesaria para activar la respuesta inmune innata frente a la infección por *M.tb*. [39,40]. Sumado a esto, la expresión de PtpB en macrófagos se ha

correlacionado con la sobrevivencia de los mismos a través del aumento en los niveles de la quinasa Akt, enzima que promueve la sobrevivencia del huésped, y la disminución de la actividad caspasa-3, proteína involucrada en la apoptosis (Figura 2).

En estudios en la línea celular THP-1 diferenciada a macrófagos infectada con la cepa de *M.tb.* "knockout" para el gen de PtpA, se ha observado una disminución de 2 logaritmos en las unidades formadoras de colonias (ufc) en 48 horas y 3 logaritmos luego de 72 horas post infección, respecto al experimento realizado con la cepa salvaje [34]. Estudios más recientes del mismo grupo dirigido por Av-Gay sugieren que PtpA tiene un rol central en la inhibición de la fusión del fagosoma con el lisosoma, lo cual evitaría el proceso normal de destrucción de la bacteria en el fagolisosoma[34,41]. Según los autores, la defosforilación de la quinasa VPS33B ("*human vacuolarproteinsorting 33B*") y la capacidad de reclutar a la V-ATPasa del macrófago por parte de PtpA desencadenarían la inhibición de la fusión del fagosoma con el lisosoma y por ende la acidificación del mismo (Figura 2).

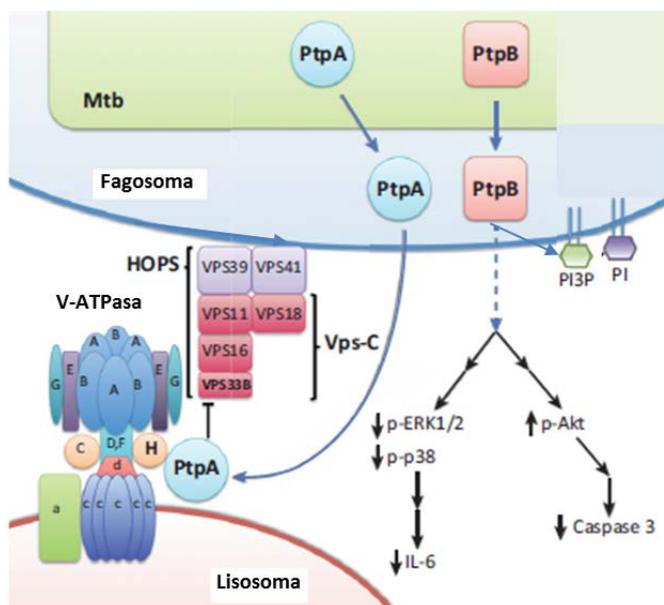


Figura 2- Esquema representativo de las vías de señalización que se verían alteradas por PtpA y PtpB. **PtpB:** defosforilación de las quinasas ERK-1/2 y p38 y aumento en los niveles de la quinasa Akt, alterando la producción de IL-6 necesaria para desencadenar la respuesta inmune innata y disminución de la actividad caspasa-3 para promover la supervivencia de la célula huésped [39]. Otra vía que puede estar modificada está relacionada al metabolismo lipídico, PtpB es capaz de defosforilar fosoinositol, por lo cual podría estar alterando el proceso de maduración normal del fagosoma, inhibiendo la fusión del mismo con el lisosoma. **PtpA:** actuaría defosforilando VPS33B y reclutando la V-ATPasa para evitar la fusión del fagosoma con el lisosoma. Versión adaptada de Av-gay 2012 [42].

PtpA y PtpB pertenecen a la familia de las fosfatasa en tirosina (PTP “*Protein Tyrosine Phosphatases*”) la cual se divide en tres grupos de acuerdo a la masa molecular y a la especificidad por sustrato que presentan:

- i) PTP de alto peso molecular, alrededor de 30 kDa
- ii) PTP de doble especificidad (DSP), presentan actividad tanto con sustratos fosforilados en tirosina como en serina y/o treonina
- iii) PTP de bajo peso molecular (LMW), alrededor de 18 kDa

Todos estos grupos de fosfatasas presentan una baja identidad de secuencia, excepto en el motivo del sitio activo CX₅R S/T (P-loop) donde se une el fosfato para ser removido. En las PTP-DSP el motivo CX₅R (S/T) se localiza en la región central de una secuencia que abarca aproximadamente 250 aminoácidos. En las PTP-LMW el motivo CX₅R (S/T) se localiza cercano al extremo N-terminal de una secuencia de unos 140 aminoácidos[43-47]. Todos los miembros de la familia de las fosfatasas en tirosina (PTP) utilizan el mismo mecanismo catalítico básico. El mecanismo de defosforilación se da en dos etapas:(i) ataque nucleofílico de la cisteína en forma de tiolato, presente en el motivo CX₅R (S/T) al fosfato unido a la tirosina, formando un intermediario cisteinil-fosfato seguido de la protonación del grupo saliente tirosil por un aspartato conservado del sitio catalítico que actúa como ácido (Figura 3-A),(ii) hidrólisis del intermediario cisteinil-fosfato asistido por una glutamina o arginina que estabilizan las cargas negativa del fosfato (grupo saliente), una molécula de agua que interacciona con el aspartato catalítico el cuál ahora actúa como base, permitiendoregenerar el sitio activo (Figura 3-B) [44,48].

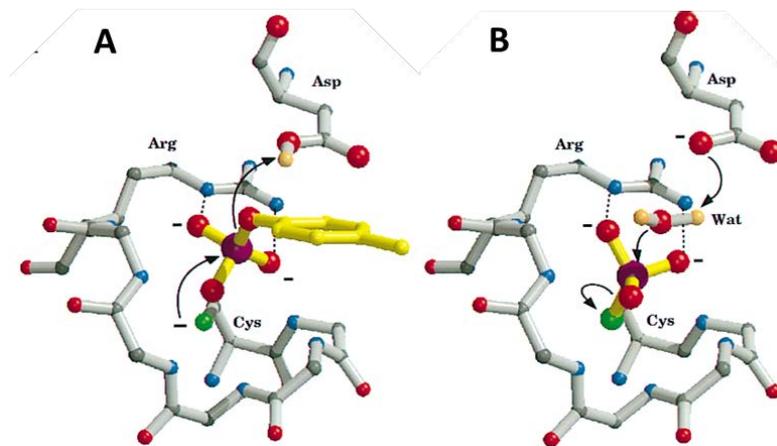


Figura 3- Mecanismo catalítico general de las fosfatasa en tirosina (PTPs), extraído de Denu, 1996 [44].

Inicialmente en base a su secuencia y estructura PtpB había sido clasificada como una fosfatasa de doble especificidad (DSP) ya que presentaba el motivo característico del sitio activo de una fosfatasa y era capaz de desfosforilar *in vitro* sustratos fosforilados en Ser/Thr al igual que en Tyr[49,50]. Sin embargo, un nuevo estudio estructural, bioinformático y de actividad *in vitro* realizado por el grupo de L. Tabernero posicionaron a PtpB dentro de una nueva familia a la cual denominaron “*Atypical lipid phosphatase*” (ALP) Figura 4 [51].

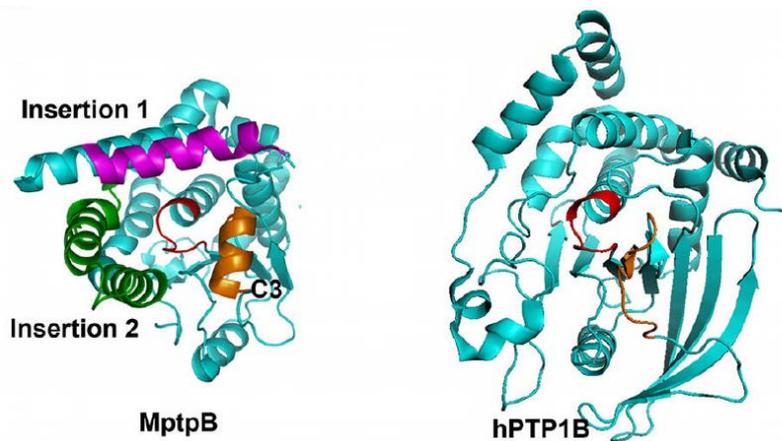


Figura 4 – Características estructurales de la ALP. La estructura de PtpB de *M.tb* (PDB ID 2OZ5) a la izquierda muestra dos inserciones características de PtpB de *M.tuberculosis*, $\alpha 7$ - $\alpha 8$ en verde y la $\alpha 3A$ en magenta, junto con la hélice C3 ($\alpha 3$) conservada en las ALP (naranja). A la derecha se muestra la fosfatasa humana PTP1B (PDB ID 1AAX) donde se observa que la región C3 adopta una conformación en hélice alfa. El motivo conservado del sitio activo (CX₅R) denominado P-loop se detalla en rojo. Extraído de Tabernero *et al.*[51].

Según esta nueva clasificación PtpB no presenta homólogo en humanos, lo cual junto con las evidencias de su rol como factor de virulencia, la hacen aún más interesante como blanco para la búsqueda de nuevas drogas. Esta fosfatasa, se caracteriza por tener la secuencia consenso en el sitio activo (HCXXGKDR[TA]G) que comparte características con las fosfatasas DSP (HCX₅RS/T) y con las fosfatasas lipídicas (AGK y DRT) capaces desfosforilar fosfoinositol (PTEN y MTM). Además presenta dos inserciones características: α -hélices ($\alpha 7$ y $\alpha 8$) y la $\alpha 3A$ (figura 4). *In vitro* PtpB es capaz de desfosforilar distintos fosfoinositoles:

PI(3)P;PI(3,5)P₂;PI(3,4)P₂;PI(4,5)P₂;PI(3,4,5)P₃, presentando mayor actividad contra el PI(3,5)P₂. Estas nuevas evidencias sugieren un nuevo rol

de PtpB alterando las vías de señalización del hospedero, en este caso relacionadas al metabolismo lipídico, deteniendo el proceso de maduración del fagosoma(Figura 2) [51].PtpA pertenece a la familia de las fosfatasa de bajo peso molecular (PTP-LMW) presentando sólo 33-38% de homología de secuencia con las LMW PTP humanas (HCPTPA, BPTP, LTP1) pero una alta similitud estructural [52,53]. En los análisis estructurales se observaron diferencias entre PtpA y sus homólogos humanos a nivel del tipo de aminoácido que rodea la entrada al sitio activo, encontrándose en PtpA una superficie de entrada menos cargada que en sus homólogos humanos, esta evidencia se piensa podrían llegar a definir la especificidad por diferentes sustratos, Figura5.

Comentario [U4]: compaginación

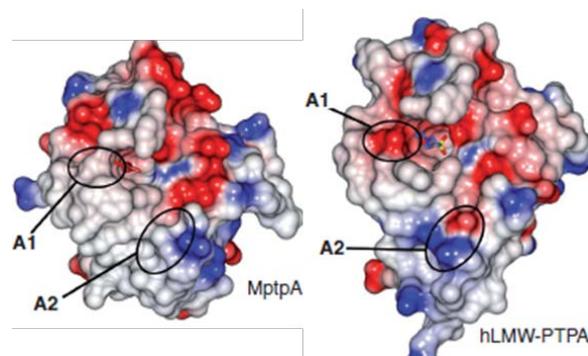
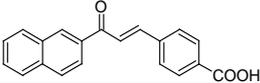
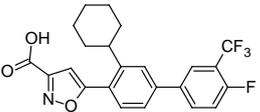
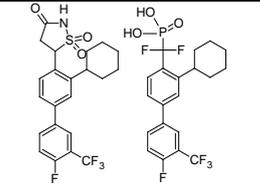
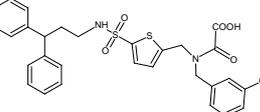
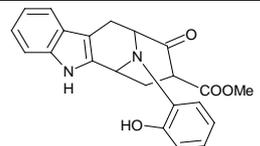
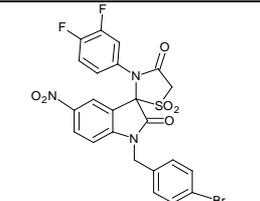
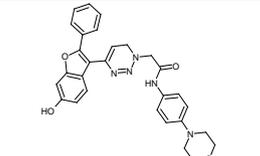
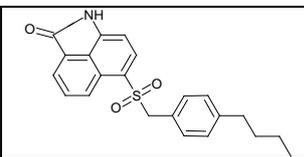
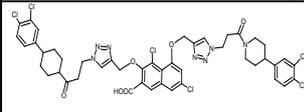
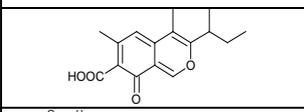
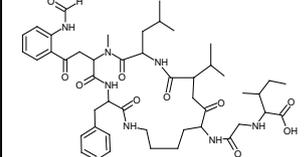
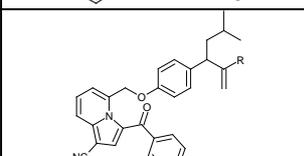
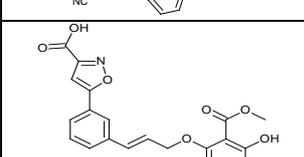
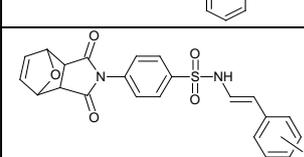
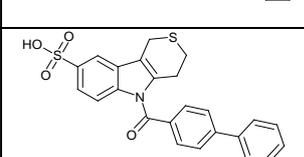


Figura5- Comparación de la distribución de cargas superficiales entre PtpA de *M.tb* (PDB ID 1U2Q) y la fosfatasa humana hLMW-PTPA (PDB ID 5PNT) a nivel de la entrada al sitio activo. A pesar de ser muy similares estructuralmente, se diferencian zonas con una distribución de cargas distintas entre ambas proteínas (A1 y A2). Extraído de Taberero *et al.* [53].

Debido a la importancia de PtpA y PtpB como factores de virulencia de *M. tuberculosis* se ha constatado un aumento en el número de nuevos inhibidores contra estas fosfatasas. Es así que la revisión bibliográfica que realicé al inicio de la tesina me permitió agrupar los inhibidores reportados hasta el momento en las tablas 1 y 2, identificar los grupos que trabajan en esta área, analizar si reportaban parámetros como IC₅₀, Ki, tipo de inhibición, y si habían o no estudios en modelos celulares o animales con cada uno de ellos. Diferentes estrategias han sido utilizadas para buscar inhibidores de estas fosfatasas, desde la evaluación de productos naturales al diseño racional. Como la estrategia "FragmentBasedDrugDiscovery (FBDD)" que consiste en mejorar una molécula que previamente mostro afinidad por el blanco, agregando nuevos sustituyentes hasta alcanzar una mayor inhibición. Se registra un mayor número de inhibidores reportados para PtpB, seguramente debido a que no presenta homólogo humano, lo que la hace más atractiva como blanco para nuevas drogas anti tuberculosis. De todos los trabajos publicados, 16 inhibidores fueron descritos para PtpB y 8 para PtpA, y dentro de ellos se encuentran las chalconas como inhibidores competitivos de ambas fosfatasas con una constante de inhibición del orden de 5-8 μ M [54-56]. Ensayos en macrófagos infectados con *M.tb* en presencia de inhibidores de la familia de las chalconas, inhibidoras de PtpA, produjeron una disminución en el número de bacterias dentro de los macrófagos infectados.

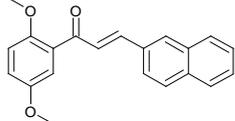
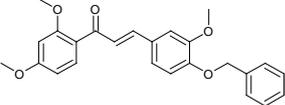
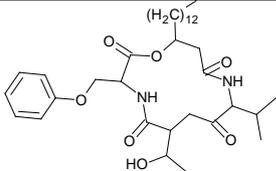
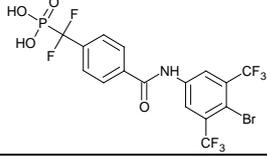
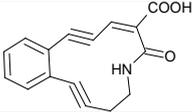
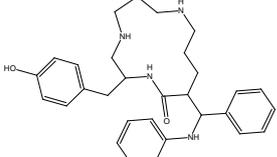
Tabla 1- Inhibidores reportados para PtpB

Inhibidor*	Estructura	IC ₅₀ (μ M)	Ki (μ M)	Ensayos <i>in vivo</i>	Ref
Chalcone		12	8		[54]
Isoxazole			0.22		[57]
Isothiazolidinone (IZD), Difluoromethylphosphonic acid (DFMP)			1.3/ 0.7		[58]
(oxalylamino-methylene)- thiophenesulfonamide (OMTS)		0.44			[59]
Macroline		7.04			[60]
Thiazolidinones Spiro-Fused to indolin-2-ones			0.2		[61]
Benzofuran Salicylic acids		1.26	1.08	Ensayo con macrófagos	[39]

2-oxo-1,2-dihydrobenzo[cd]indole-6-sulfonamide		1.3	1.1	Ensayo con macrófagos	[62]
Alkyne+azidotriente		0.16	0.162		[63]
Polyketides		11.5			[64]
Brunsvicamides		7.3			[65]
Indolizines		7.5			[66]
Isoxazole-salicylate		7	1.5	Ensayo con macrófagos	[67]
Sulfonyl-hydrazones of cyclic imides		21	2.5		[68]
Indoloquinolizidine		0.36			[69]

*El nombre de los inhibidores se reporta en inglés

Tabla 2-Inhibidores reportados para PtpA

Inhibidor*	Estructura	IC ₅₀ (μ M)	K _i (μ M)	Ref
Chalcone			8.4	[56]
Chalcone		15		[70]
Stevastelin			8	[71]
DFPM(Difluoromethylphosphonic acid)		0.44		[72]
CEMA		110	22.5	[73]
Lactama			0.2	[74]

*El nombre de los inhibidores se reporta en inglés

Las chalconas derivan de plantas y son consideradas precursores de los flavonoides e isoflavonoides. Los diferentes tipos o familias se diferencian estructuralmente en el patrón de sustitución de los anillos A y B. En este sentido, se clasifican en chalconas, flavanonas, flavonas, etc. Las chalconas

(1,3-difenil-cetopropeno) pueden ser sintetizadas químicamente en el laboratorio mediante reacciones de condensación entre un aldehído y una cetona catalizada por una base o ácido y constan de dos anillos aromáticos (A y B) unidos a una cadena que contiene un doble enlace y un grupo cetona, Figura 6. Las mismas pueden ser modificadas químicamente mediante estrategias relativamente simples [75,76].

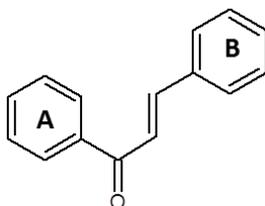


Figura 6- Estructura de la chalcona (1,3 difenil-cetopropeno), presenta dos anillos (A y B) unidos a una cadena con un doble enlace y un grupo cetona.

Teniendo en cuenta las evidencias existentes de las chalconas como inhibidores tanto de PtpA como de PtpB y la disponibilidad en Uruguay de otras variantes de chalconas aún no evaluadas como posibles inhibidores se planteó extender el estudio de esta familia de moléculas mediante ensayos de actividad fosfatasa y de acoplamiento molecular (“docking”) para la búsqueda de nuevos candidatos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el poder inhibitorio de 25 chalconas sobre la actividad de PtpB y PtpA de *M.tb.* mediante estudios *in vitro* e *in silico*

Objetivos específicos

- Obtener las fosfatasas PtpA y PtpB de *M. tuberculosis* activas y puras
- Evaluar el efecto de las chalconas en la actividad fosfatasa de PtpB y PtpA
- Realizar estudios de acoplamiento molecular entre PtpB y cada una de las chalconas buscando correlacionarlos con los resultados de actividad

O

E

R

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención de las proteínas recombinantes PtpA y PtpB de *M. tuberculosis*

1.1 Transformación química

Se transformó con el vector pET28a conteniendo el gen de PtpA o PtpB células de *Escherichia coli* quimiocompetentes disponibles en el laboratorio y preparadas según Mandel,[77]. El procedimiento consistió en descongelar en hielo una alícuota de 100 µl de células competentes durante 10 minutos, pasado ese tiempo se agregaron 3 µl del stock de vector correspondiente, se incubó 20 minutos en hielo, 90 segundos en baño de agua a 42°C y 2 minutos nuevamente en hielo. Luego se agregaron 500 µl de medio de cultivo LB (Lysogenybroth) y se incubó 1 hora a 37°C bajo agitación a 200 rpm. El vector pET28a (Figura 7) porta un gen de resistencia a la kanamicina, por lo cual se sembraron 200 µl de la mezcla de transformación en placas de LB Agar conteniendo 50 µg de kanamicina por ml de LB. Las placas se incubaron en una estufa a 37°C por 16 horas para posterior evaluación del crecimiento de colonias transformantes.

Para la expansión del vector conteniendo el gen de interés se transformó la cepa *E. coli* XL-1blue y para los ensayos de expresión del gen de interés se transformó la cepa *E. coli*/BL21(DE3).

1. 2 Expansión y purificación del vector conteniendo el gen de interés

Para la expansión del vector conteniendo el gen de PtpA o PtpB se inoculó unacolonias de *E. coli* XL1-blue transformante en 3 ml de medio LB-kanamicina para la obtención de un precultivo. Dicho procedimiento se repitió para varias colonias aisladas de la placa, éstos se incubaron a 37°C bajo agitación a 200 rpm por 16 horas, se centrifugaron 2 minutos a 12.000 rpm y se descartaron los sobrenadantes. El "pellet" se resuspendió en 200 µl de Solución I (Tris-HCl 25 mM pH 8. 0, EDTA 10 mM) y se agregaron 2 µl de ARNasa a 10 mg/ml para degradar el ARN. Posteriormente se agregaron 200 µl de Solución II (NaOH 200 mM, SDS 1%) y se mezcló por inversión suavemente, incubando 5 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se agregaron 150 µl de Solución III (Acetato de Potasio frío 3 M, pH=4.8) observándose la aparición de turbidez blanca al precipitar las proteínas y el ADN cromosómico. Se mezcló por inversión y posteriormente se centrifugó a 12000 rpm por 20 minutos recuperándose en el sobrenadante el ADN plasmídico. A dichos sobrenadantes se les agregaron 0. 7 volúmenes de isopropanol para concentrar el ADN plasmídico por precipitación. Se volvieron a centrifugar a 12000 rpm esta vez a 4°C por 25 minutos descartándose los sobrenadantes y se lavaron los "pellets" con 750 µl de Etanol 70 % frío. Se centrifugaron a 12.000 rpm 5 minutos a temperatura ambiente, descartándose todo los sobrenadantes restantes y se secaron los "pellets" bajo lámpara para finalmente resuspenderlos en 35 µl de agua miliQ. La pureza del stock de plásmidos se analizó en gel de agarosa al 1% y las alícuotas se almacenaron a -20°C, la secuencia del gen

1.3 Preparación del stock de células transformadas de *E. coli*/BL21(DE3).

Se inocularon varias colonias de las placas conteniendo los transformantes de *E. coli*/BL21(DE3) en 50 ml de medio LB-kanamicina y se incubó a 37°C por 16 horas. Dicho cultivo se centrifugó, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en glicerol estéril hasta alcanzar una concentración final de glicerol del 50 %. El stock de células transformantes se almacenó a -80°C y fue utilizado para inocular los precultivos a ser utilizados en la expresión de las proteínas PtpA y PtpB recombinantes.

1.4 Expresión de PtpA y PtpB en *E. coli* BL21 (DE3)

Se realizó un precultivo inoculando 3 ml de LB-Kanamicina con el stock glicerol de la cepa *E. coli*/BL21(DE3) transformada, descrita en el punto anterior. El precultivo se dejó a 37°C durante 16 horas bajo agitación a 200 rpm y luego se utilizó para inocular medio LB-kanamicina a una relación de 1.5 ml de precultivo por cada 1500 ml de medio fresco. El cultivo se mantuvo a 37°C y 200 rpm a hasta llegar a una DO_{600nm} entre 0.6-0.8, la cual corresponde al final de la fase exponencial de crecimiento bacteriano[78]. Alcanzada la DO_{600nm} óptima, se dejó alcanzar los 20°C y luego se indujo la expresión del gen PtpA y PtpB con 0.5 mM de IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) durante 16 horas a dicha temperatura. El IPTG es un inductor análogo no-hidrolizable de la alolactosa que promueve la inducción de la expresión del gen de interés (PtpA/PtpB) al unirse al *operador*

lac presente en el vector utilizado (Figura 7). Finalizada la inducción, el cultivo se centrifugó a 4°C a 5.000 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se determinaron los gramos de células húmedas obtenidas por litro de cultivo. Se prosiguió con la lisis celular resuspendiendo el "pellet" de células en un buffer lisis (20 mM Tris-HCl pH=8, 0.5 M NaCl, 1 mM DTT y 10% Glicerol), manteniendo una relación de 0.05 g de células húmedas/ml de buffer lisis. La suspensión celular fue suplementada con 1mM de PMSF, 1mM de benzamidina (inhibidor de proteasas), 0.1 mg/ml de lisozima para debilitar la pared celular, y se mantuvo en frío por 30 minutos para finalmente completar la lisis celular por sonicación (Branson digital sonifer). La sonicación se realizó a 4°C aplicando 10 ciclos de 1 minuto cada uno a 25% de amplitud, con intervalos de 1 minuto de descanso entre cada ciclo durante el cual se mezcla la suspensión. Luego se agregó ADNasa a una concentración final de 0.01 mg/ml durante 30 minutos, y se procedió a centrifugar a 10000 rpm durante 1 hora a 4°C. Se recuperó el sobrenadante al cuál se le verificó el pH, ajustándose a pH=8 si este no se había mantenido y posteriormente se filtró con jeringa utilizando un filtro de 0.22µm. Dicho sobrenadante de lisis se almacenó a 4°C hasta el momento que se procedió con la purificación por cromatografía de afinidad (realizada en el mismo día de la lisis).

1. 5 Purificación de PtpA y PtpB por cromatografía de afinidad (IMAC)

Las proteínas recombinantes PtpA y PtpB expresadas como se describió anteriormente presentan en el N-terminal una cola de seis histidinas (His-tag), lo que permite su purificación por cromatografía de afinidad por metales (IMAC)Figura 8.

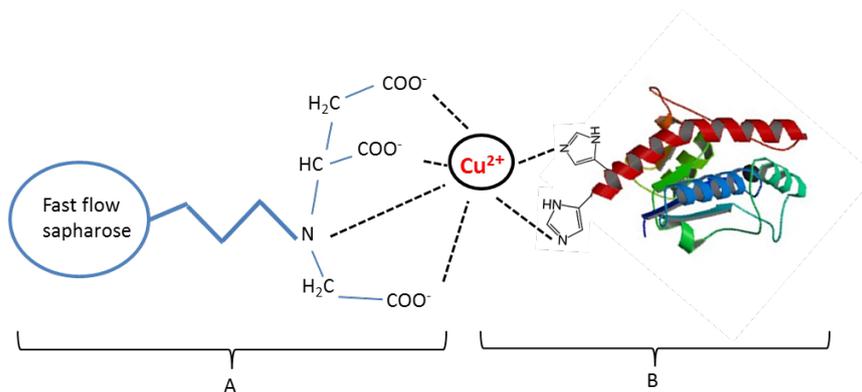


Figura 8- Esquema representativo del principio fisicoquímico de la cromatografía por afinidad con metales (IMAC). **A)** Matriz de sefarosaconteniendo que unen iones cobre. **B)** Proteína de interés con histidinas en el extremo N-terminal (His-tag) que se une reversiblemente a los complejos metálicos la matriz

1. 5. 1. Preparación de la matriz

Se colocó 1 ml de la matriz comercial “fastflowsepharose” (Sigma) en una columna PD-10 vacía a la cual se le cargó el metal mezclando la matriz con 600µl de 0.2 M CuSO₄. Posteriormente para eliminar el exceso de metal se lavó la matriz con suficientemente agua y con 0.02 M acetato de sodio a pH=4 conteniendo 1M de NaCl, hasta que el pH a la salida de la columna alcanzara un valor de pH=4. Finalmente se equilibró con 2 volúmenes de columna (VC) de buffer de lisis (20 mM Tris-HCl pH=8, 0.5 M NaCl, 1 mM DTT y 10% Glicerol).

1. 5. 2. Inmovilización y elución de las proteínas inmovilizadas

El sobrenadante de lisis preparado como se describió anteriormente se mezcló con la matriz cargada de cobre en un falcón de 50ml (relación 1ml de matriz + 40 ml de sobrenadante) y se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente bajo leve rotación. Transcurrido el tiempo se recuperó la matriz en una columna PD-10 vacía y se procedió a los lavados pasando por la columna 5 ml de cada solución de lavado. Se realizaron 3 lavados de 5ml con buffer lisis sin imidazol (L₀), 3 lavados de 5ml de buffer lisis suplementado con 10 mM de imidazol (L₁), 3 lavados de 5ml de buffer lisis suplementado con 20 mM de imidazol (L₂). A continuación se prosiguió con la elución de proteína inmovilizada por afinidad mediante competencia con imidazol a una concentración final de 300 mM, se realizaron 6 eluciones de 3ml cada una. Este protocolo había sido previamente definido en el laboratorio[78].

1. 6 Eliminación del imidazol por diálisis gradual y concentración de la proteína obtenida

El "pool" de las eluciones obtenidas por cromatografía de afinidad fue dializado a 4°C con el objetivo de disminuir casi en su totalidad la concentración de imidazol. La eliminación se realizó gradualmente ya que en el laboratorio se había observado que la eliminación brusca da lugar a la precipitación de la proteína de interés. El "pool" de eluciones se colocó en una membrana de diálisis de un k_{off} de 6.5 kDa ("DialysisTubingCelluloseMembrane"-Sigma Aldrich) previamente hidratada

con agua MiliQ. La primera diálisis se hizo contra un buffer diálisis (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) suplementado con 150 mM de imidazol durante 2 horas a 4°C y bajo agitación magnética. Transcurrido el tiempo se diluyó al medio dicho buffer para llegar a una concentración final de orden de 75 mM de imidazol, dejándose dializar durante 16 horas a 4°C bajo agitación. Se repitió el procedimiento de dilución al medio para llegar a un concentración final de imidazol de 35 mM, se dejó durante 2 horas a 4°C y finalmente la última diálisis se realizó contra el buffer que denominamos buffer de gel filtración (20 mM de Tris-HCl pH= 8.0, 50mM de NaCl, 10 % de Glicerol, 3 mM de DTT y 5 mM de EDTA), a ser utilizado en la cromatografía de exclusión molecular. El "pool" dializado, se centrifugó a 10.000 rpm a 4°C por 5 minutos de manera de eliminar posibles precipitados formados durante la diálisis y el sobrenadante se concentró por centrifugación a 5.000g utilizando un concentrador de K_{off} 10 kDa (Amicon Ultra15-Millipore) hasta un volumen al cual no se observó precipitado. Para evaluar el grado de pureza de las muestras obtenidas las mismas se evaluaron en una electroforesis SDS-PAGE. Mientras, el concentrado fue guardado a 4°C hasta su posterior purificación por cromatografía de exclusión molecular.

1.7 Purificación de PtpA y PtpB por cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía por exclusión molecular se llevó a cabo en un AKTA (GH healthcare) y se utilizó una columna preparativa Superdex 200-16/60, la cual se lavó con 180 ml de agua MiliQ correspondiente a un volumen y medio de columna (VC) para eliminar el etanol 20% y posteriormente se equilibró con 2 VC de buffer de gel filtración. El volumen de inyección de muestra fue de 5 ml y el flujo de la cromatografía de 0.8 ml/min. Esta misma columna fue previamente calibrada por integrantes de nuestro grupo y determinado el volumen de elución de PtpA (95.7 ml) y de PtpB (85 ml)[79]. Las fracciones correspondientes a los picos de elución de PtpA y PtpB fueron recolectadas concentradas a 4°C tal como se describió anteriormente, y la concentración proteica determinada por el método de Bradford. Alícuotas a 2 mg/ml fueron almacenadas a -20°C en el buffer de gel filtración suplementado con glicerol a una concentración final de 50%. El grado de pureza fue evaluado por electroforesis (SDS-PAGE).

1.8 Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para analizar las fracciones obtenidas de la cromatografía por afinidad se prepararon geles de acrilamida/bisacrilamida al 15% de 1 mm de espesor siguiendo las instrucciones del manual de la cuba de electroforesis utilizada (Tetra Cell-Bio-rad). La electroforesis se realizó utilizando el sistema de buffer SDS-PAGE propuesto por Laemmli[80], la corrida se realizó a 200 V durante 45 min en un buffer Tris-HCl 25 mM pH= 8.3, 192 mM glicina y 0,1% SDS.

2. Determinación de la actividad específica de PtpA y PtpB

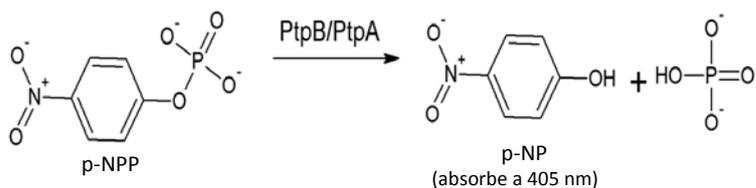
2.1 Determinación de la concentración proteica

La concentración de proteína fue determinada por el método de Bradford, que se basa en la detección de la interacción del Azul de Coomassie con ciertos aminoácidos presentes en la proteína (Arg,Lys,His), lo que provoca un corrimiento en el espectro de absorción del compuesto de un color rojo/ amarronado al color azul fácilmente detectado a 595nm. Previamente, se realizó una curva de calibración utilizando como proteína estándar la seroalbúmina bovina (BSA) a 1mg/ml. Se prepararon concentraciones de dicho estándar de 1000, 800, 600, 400, 200, 100, 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, en una placa de 96 pocillos por triplicado. A 10 μl de cada concentración de BSA estándar se le agregaron 200 μl del reactivo de Bradford (50 ml de Etanol-95 %, 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250, 100 ml de Ácido Fosfórico-85 % (w/v) y agua miliQc.s.p un volumen final de 200 ml). Posteriormente a la mezcla de reacción se le midió la absorbancia a 595nm en un lector de placas. En la misma placa se agregaron 10 μl por triplicado de la muestra a analizar o diluciones de la misma y se procedió igual que con la BSA estándar. Con los valores de absorbancia de las concentraciones del estándar de BSA se realizó una curva de calibración la cual se ajustó a una ecuación cuadrática de la forma $y=ax^2+bx+c$ siendo $y= \mu\text{g BSA}/\mu\text{l}$ y $x= \text{Abs}_{595\text{nm}}$ tal como recomiendan Olson, B.J. & Markwell [81]. A partir de dicha ecuación se determinó la concentración proteica de las muestras problema afectando, si

corresponde, por el factor de dilución utilizado. Utilizando la masa molecular que tiene en cuenta el His-tag introducido de PtpA (19. 886 kDa) y PtpB (32. 180 kDa), se determinó la concentración μM de los stocks de cada proteína.

2.2 Ensayos de la actividad fosfatasa de PtpA y PtpB

La actividad fosfatasa se evaluó utilizando un sustrato artificial, para-nitro fenilfosfato (p-NPP) que presenta un grupo fosfato en posición para con respecto al nitro. La reacción de hidrólisis del grupo fosfato ocasionado por la actividad fosfatasa se puede seguir en el tiempo detectando el aumento de la absorbancia a 405nm debido a la liberación del producto de la reacción de color amarillo, el para-nitro fenol (p-NP), tal como se muestra en el siguiente esquema:



Para el cálculo de la actividad específica los ensayos se realizaron en una cubeta de espectrofotómetro de 1 cm de camino óptico. Se expresó la actividad fosfatasa en μmoles de p-NP formado/min. mg de

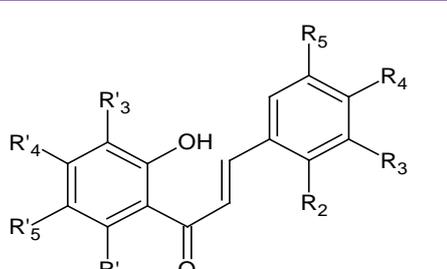
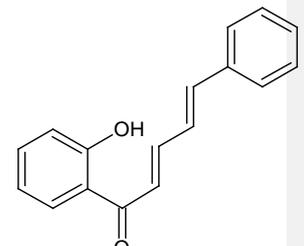
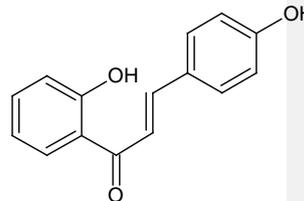
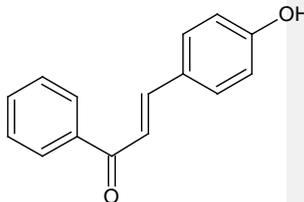
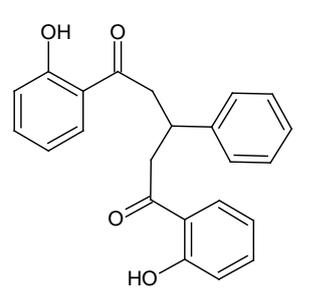
enzima, utilizando para el cálculo de los μ moles de p-NP el coeficiente de extinción molar del p-NP $12.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3. Evaluación del efecto de las chalconas en la actividad fosfatasa de PtpB

3.1 Chalconas a ser evaluadas

Los compuestos fueron proporcionados por Gabriel Sagrera y Gustavo Seoane, Facultad de Química-Uruguay (Tabla 3). Una cantidad de 1mg de cada chalcona disponible se disolvió en DMSO (solvente orgánico en el que se disuelven este tipo compuesto poco soluble en agua) hasta una concentración final de 7.5 mM (Stock de chalcona) y se almacenaron a 4°C. Previamente a su utilización se retiran de la heladera y se dejan llegar a temperatura ambiente y solubilizar en la mesada. En cada ensayo se realizó una dilución de trabajo de chalcona en DMSO de 0.75 mM, correspondiendo a un décimo de la concentración stock de chalcona (7.5 mM). Esta solución de trabajo fue utilizada en los ensayos de actividad fosfatasa.

Tabla 3 Estructura de las 25 chalconas(1,3 Difenil-cetopropeno)a ser evaluadas

	R ₂	R ₃	R ₄	R' ₄	R' ₅	R' ₆		
	 <p>1,3 Difenil-cetopropeno (Chalcona)</p>						22	
1	H	H	H	H	H	H	23	
2	H	H	O-Me	H	H	H		
3	H	O-Me	O-Me	H	H	H		
4	H	H	O-Me	O-Me	H	O-Me		
5	O-Me	H	O-Me	H	H	H		
6	H		O-Me-O	H	H	H		
7	H	H	O-n-hexilo	H	H	H		
8	H	H	O-n-nonilo	H	H	H		
9	H	H	O-n-butilo	O-n-butilo	H	H		
10	Br	H	H	H	H	H		
11	Br	H	H	O-Me	O-Me	H		
12	H	NO ₂	H	H	H	H		
13	H	H	NO ₂	H	H	H		
14	H	H	O-NMe ₂	H	H	H		
15	H	H	O-Bn	H	H	H		
16	H	H	H	O-Bn	H	H		
17	H	H	O-Bn	H	H	H		
18	H	O-Bn	O-Me	H	H	H		
19	O-Bn	H	H	H	H	H		
20	H	I	O-Bn	O-Bn	H	O-Bn	25	
21								

3.2 Selección de la concentración final de chalcona ser utilizada en los ensayos de actividad fosfatasa

Para realizar una evaluación primaria del efecto de las chalconas en la actividad de PtpB se seleccionó como concentración final 25 μM de chalcona en el buffer de actividad fosfatasa. La selección se realizó en base a:

- (i) resultados previos de solubilidad en el buffer de actividad de chalconas similares.
- (ii) observación de aparición de precipitado en el buffer de actividad fosfatasa al disolver las chalconas a concentraciones mayores de 25 μM
- (iii) la ausencia de correlación entre el aumento de la concentración de algunas de las chalconas en el buffer de actividad y el espectro de absorción característico de cada chalcona. Estos compuestos presentan un espectro de absorción característica entre 260-560nm, Esta propiedad permitió evaluar algunas chalconas a 75 y 50 μM en el buffer de actividad y en el DMSO dentro de ese rango de longitud de onda, en el lector de placa UV-visible Varioskan flash (ThermoScientific)[82].

3.3 Actividad de PtpB en presencia de cada chalcona

Para evaluar el posible poder inhibitorio de las chalconas sobre la PtpB se optimizaron las condiciones del ensayo cinético adaptándolo a una placa de 96 pocillos. Se debió optimizar el material volumétrico, los volúmenes de reacción, los tiempos de pre incubación y de actividad, así

como el número de chalconas a ser analizadas en cada microplaca de 96 pocillos. El procedimiento consistió en agregar:

- I. 5 μ l de la dilución de trabajo de PtpB (52 nM fue la concentración final de fosfatasa en el ensayo)
- II. 265 μ l de buffer de actividad (20mM Tris-HCl pH=8.0, glicerol 5%, 3mM EDTA, 1mM DTT, 0.05 M NaCl, 0.005% de tween20%)
- III. 10 μ l de chalcona 0.75 mM disuelta en DMSO (25 μ M fue la concentración final de chalcona en el ensayo). En el caso del control, es decir en ausencia de chalcona, se agregaron 10 μ l de DMSO (3.33 % concentración final) y se denominó Control-DMSO.
- IV. Se incubó durante 15 minutos a 37°C
- V. Se adicionaron 20 μ l del sustrato p-NPP con pipeta multicanal (20 mM de sustrato fue la concentración final en el ensayo), se trabajó en condiciones de saturación $10K_M$, teniendo en cuenta el valor de k_M (2mM) determinado por nuestro grupo en condiciones similares de reacción[78].
- VI. Se registraron las absorbancias a 405nm en función del tiempo en los pocillos seleccionados en el lector de placa UV-visible Varioskan flash (ThermoScientific).

Una vez obtenidos los datos, se graficaron las absorbancias a 405nm en función del tiempo y se determinaron las pendientes $\Delta Abs/\Delta t$ para cada ensayo en presencia de la chalcona, los que fueron comparados con el ensayo control-DMSO (en ausencia de chalcona pero en presencia de 3.33% final de DMSO). La actividad fosfatasa de PtpB remanente se calculó

como el cociente entre la actividad fosfatasa en presencia de chalcona y la actividad del control-DMSO, expresado en %. En cada ensayo, cada chalcona se evaluó en triplicado con su respectivo control-DMSO se reportaron con su respectiva desviación estándar que reflejan la variación intra-experimento.

Con el objetivo de evaluar la variabilidad inter-experimento, para algunas chalconas seleccionadas se repitió completamente el ensayo utilizando una nueva dilución de enzima así como una nueva dilución de chalcona preparada a partir del stock 7.5mM. Los resultados fueron expresados con sus respectivas desviaciones estándares que dará la idea de la variación inter-experimento y facilitará la toma de decisiones posteriores de acuerdo al efecto o no de cada chalcona en la actividad de la fosfatasa. Como control positivo se utilizó el ortovanadato de sodio que es un inhibidor competitivo general de fosfatasas. La concentración final en el ensayo fue de 200 μ M ya que el IC_{50} calculado para PtpB fue del orden de 600 μ M.

4. Ensayos de acoplamiento molecular entre PtpB y cada una de las chalconas.

Los ensayos de acoplamiento molecular (en inglés “docking”) permiten obtener una aproximación teórica del sitio de unión de las chalconas a la PtpB. Se obtiene como resultado posibles sitios de unión para

cada chalcona con sus respectivas energías de unión en kcal/mol. Comparando la energía de unión de los complejos se puede obtener el sitio de unión más probable. El análisis visual de estos complejos formados permite identificar además los posibles contactos entre los compuestos y los aminoácidos de la proteína. Para el estudio se utilizó la estructura cristalográfica de PtpB (PDB ID 2OZ5) reportada en la base de datos "Protein Data Bank" correspondiente a la estructura de la fosfatasa ligada a un inhibidor competitivo (OMTS).

Las estructuras 3D de las chalconas fueron modeladas a partir de previa representación en 2D con el programa ChemSketch. Se utilizó un protocolo de optimización de geometría de las moléculas con el programa HyperChem profesional en donde primero se les realizó una minimización de energía utilizando mecánica molecular con el campo de fuerza MM+ y finalmente se las minimizó nuevamente pero esta vez por el método semi-empírico cuántico PM3 para obtener la conformación de menor energía, es decir, la más estable para cada molécula.

El cálculo del acoplamiento molecular se realizó en 2 etapas: (i) primero se definió la región de la proteína sobre la cual se pretende ligar a las moléculas (chalconas) la cual se denomina grilla de interacción y se mapea sobre esta región el potencial de interacción de cada tipo de átomo del ligando con la proteína. El cálculo de la grilla se realizó con el programa AutoGrid y se limitó sobre la región que contiene al sitio activo (donde estaba el inhibidor OMTS en la PDB ID 2OZ5). Se utilizó una grilla de 126 puntos

sobre cada uno de los ejes X, Y, Z, con un espaciado de 0.429 Å. Como centro de la caja de la grilla se tomó el centro de masa del inhibidor en la estructura 2OZ5 ($x=42.2$; $y=75.52$; $z=4.56\text{Å}$); (ii) finalmente se realiza el cálculo de “docking” propiamente dicho en el programa Autodock.4 utilizando un algoritmo genético Lamarckiano y se realizaron 100 corridas de “docking” para cada chalcona.

En cada corrida se realizan cambios conformacionales al azar del ligando (rotación, traslación y conformación) y cada uno de estos nuevos movimientos inducen un cambio energético en el sistema que se evalúa durante la corrida de “docking” hasta que alcanza la convergencia del sistema (un mismo resultado que no varía entre iteraciones) o un número máximo de evaluaciones energéticas, este proceso se repite 100 veces. A los 100 resultados se los agrupa en clústeres con un criterio de 1Å de RMS y luego se analiza el complejo que resultó de menor energía en el clúster más poblado. Con los resultados obtenidos se ordenaron las chalconas en base a su energía de interacción con la PtpB. Por otro lado, con el objetivo de analizar con cuáles aminoácidos interacciona la chalcona se obtuvieron las representaciones en tres dimensiones de los complejos PtpB-chalconas generados en el programa Autodock.4. A partir de dichos archivos PDB posteriormente se obtuvieron las representaciones en 2D utilizando el programa MOE (Molecular Operating Environment). Estas actividades fueron realizadas en el marco de una pasantía en el laboratorio de Modelado Molecular, UNL, Argentina, bajo la dirección del Dr. Fernando Herrera.

RESULTADOS

1. Obtención de las proteínas recombinantes PtpA y PtpB de *M. tuberculosis*

Las proteínas recombinantes PtpA y PtpB fueron purificadas por cromatografía de afinidad y posterior cromatografía de exclusión molecular. En la figura 9 se muestra el resultado de la electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) de las fracciones recolectadas en la cromatografía por afinidad (IMAC-Cu⁺²). En el sobrenadante de lisis (SN) se observa el perfil de las proteínas presentes antes de pasar por la columna de cromatografía por afinidad, y se diferencia del percolado (FT) el cual representa la fracción de las proteínas que no fueron retenidas por dicha columna. En el FT respecto al SN se observa una banda muy tenue alrededor del peso molecular de PtpA (19kDa) lo que sugiere que la mayor parte de la fosfatasa recombinante fue retenida en la columna de afinidad. En los lavados con buffer, Lo (sin imidazol), L1 (10 mMimidazol), L2 (20 mMimidazol) se observa la eliminación de varias proteínas de mayor masa molecular sin pérdida sustancial de la PtpA. Como era de esperar en las eluciones con 300 mM de imidazol (E1-E5) se observa principalmente una banda a la altura correspondiente al peso molecular de PtpA (19kDa). Todas estas eluciones fueron agrupadas, dializadas y concentradas para ser posteriormente purificadas por exclusión molecular.

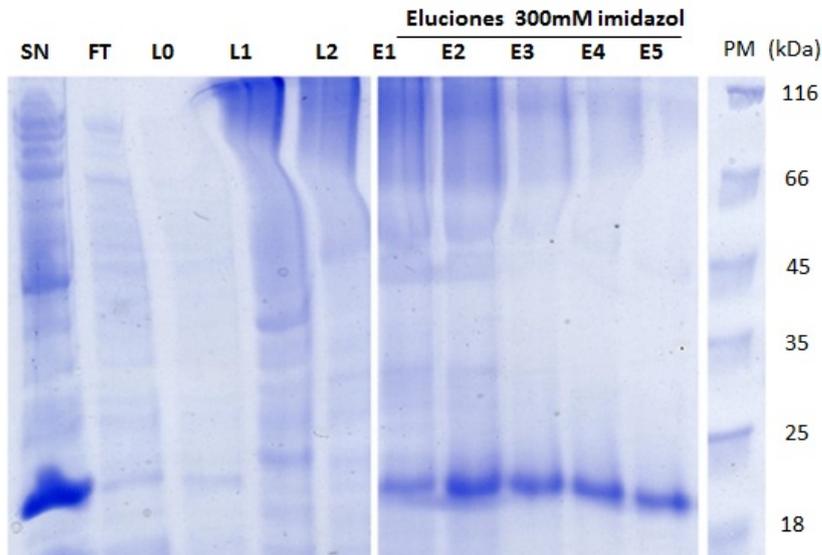


Figura 9- Electroforesis SDS-PAGE (15%) de las diferentes fracciones obtenidas durante la purificación de PtpA por cromatografía de afinidad (IMAC-Cu⁺²). SN: sobrenadante de lisis celular, FT: percolado, Lo: lavado con buffer lisis (20 mM Tris-HCl pH8, 0.5 M NaCl, 1 mM DTT y 10% Glicerol), L1: lavado con buffer lisis conteniendo 10mM de imidazol, L2: lavado con buffer lisis conteniendo 20mM de imidazol, E1-E5 eluciones de PtpA con 300mM de imidazol. En cada carril se sembraron 12 μ l (10 μ l de cada muestra sin diluir más 2 μ l de buffer carga 6X). La presencia de una burbuja entre el vidrio y el gel durante la polimerización afecto la calidad de la electroforesis, sin embargo no afecto la interpretación de los resultados cuando estos fueron comparados con geles obtenidos previamente en el laboratorio para la purificación de PtpA.

El protocolo para la purificación de PtpB no estaba optimizado en el laboratorio así que al inicio se procedió de la misma manera que para la purificación por afinidad de PtpA. En la figura 10 se muestra el gel SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en la purificación por cromatografía de afinidad. En este caso, si bien la banda correspondiente al peso molecular de PtpB (30kDa) se observa en las fracciones eluidas con 300 mM de

imidazol (E1-E6), ésta se detectó con mayor intensidad en los lavados con baja concentración de imidazol (L1 y L2). Teniendo en cuenta este resultado se agruparon dichos lavados además de las fracciones eluídas (E1-E6) para ser dializados, concentrados y purificados por exclusión molecular.

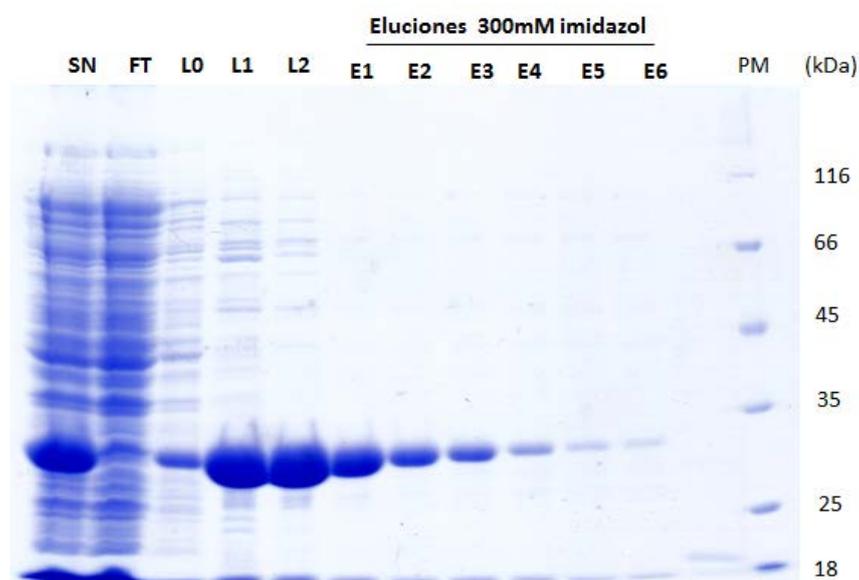


Figura 10- Electroforesis SDS-PAGE (15%) de las diferentes fracciones obtenidas durante la purificación de PtpB por cromatografía de afinidad (IMAC-Cu⁺²). SN: sobrenadante de lisis celular, FT: percolado, Lo: lavado con buffer lisis (20 mM Tris-HCl pH8, 0.5 M NaCl, 1 mM DTT y 10% Glicerol), L1: lavado con buffer lisis conteniendo 10mM de imidazol, L2: lavado con buffer lisis conteniendo 20mM de imidazol, E1-E6 eluciones de PtpB con 300mM de imidazol. En cada carril se sembraron 12 µl (10µl de cada muestra sin diluir más 2µl de buffer carga 6X).

Para obtener PtpA y PtpB con un mayor grado de pureza, se procedió a una cromatografía de exclusión molecular con el objetivo de analizar la posibilidad de eliminar aquellas proteínas de mayor masa molecular observadas en la electroforesis desnaturizante y evaluar la presencia de

agregados de proteína. En la figura 11 se muestra el gráfico con el perfil de elución de las proteínas (Abs 280nm en función del volumen elución) obtenido en la cromatografía de exclusión molecular durante la purificación de PtpA. En el mismo se observa un pico principal (Pico 1) a un volumen de elución de 95.7 ml, el cual corresponde al esperado para el monómero de PtpA, teniendo en cuenta los resultados previos de nuestro grupo en los cuales se calibró la columna utilizada con estándares de masa molecular[78]. Se observan también otros picos de menor volumen de elución (V_e), seguramente correspondientes a proteínas y/o agregados de mayor peso molecular. Por último se observa un último pico de mayor V_e que representa los restos de imidazol remanente en la muestra inyectada no eliminados totalmente durante la diálisis. En el inserto de la figura 11 se muestra el SDS-PAGE de la muestra proveniente del pico 1, previamente concentrada, donde se observa una banda principal de aproximadamente 19 kDa correspondiente a PtpA, identidad confirmada por espectrometría de masa (muestra analizada por la Unidad de Bioquímica Analítica y Proteómica).

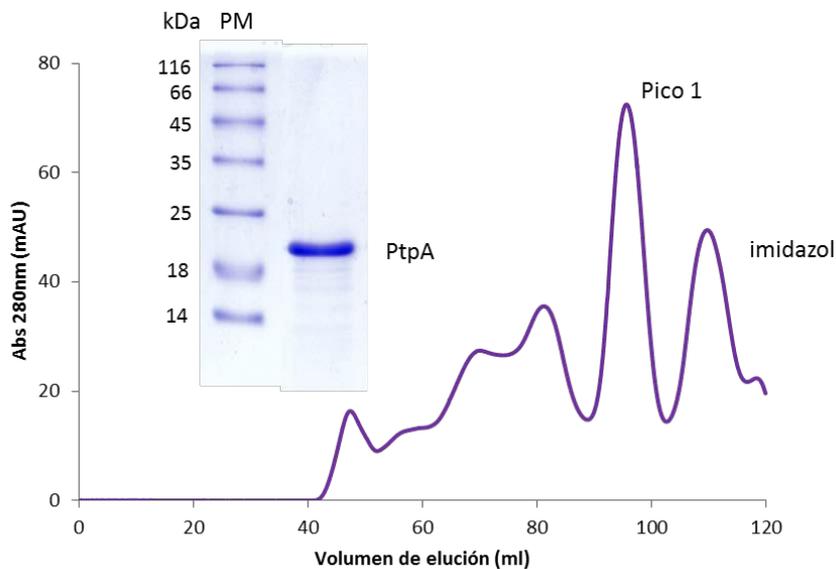


Figura 11- Perfil de elución de la cromatografía por exclusión molecular realizado durante la purificación de PtpA. El pico 1 contiene a PtpA ($V_e=95.7\text{ml}$). La columna utilizada fue la Superdex 200-16/60, se inyectaron 5 ml de muestra y la cromatografía se realizó bajo un flujo de 0.8 ml/min. Inserto: SDS-PAGE de la muestra obtenida en el pico 1 previamente concentrada antes de ser sembrada en el gel de electroforesis.

La elución de PtpB durante la cromatografía de exclusión molecular fue a los 85 ml (pico 2) como era de esperar para la forma monomérica (figura 12). En el inserto de la figura se observa el SDS-PAGE de la muestra proveniente del pico 2 previamente concentrada, donde se observa una banda que corresponde a la masa aproximada de PtpB (30 kDa).

Tanto para PtpA como a PtpB se logró obtener la fosfatasa con un alto grado de pureza y en forma monomérica.

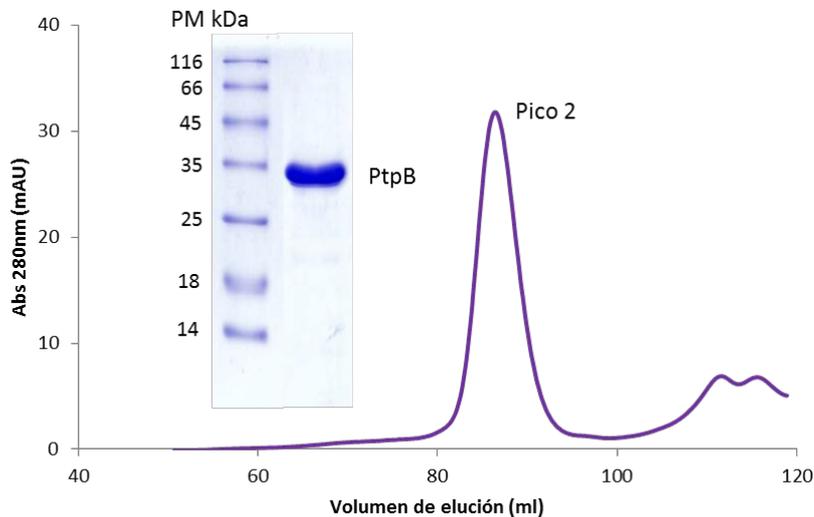


Figura 12- Perfil de elución de la cromatografía por exclusión molecular realizado durante la purificación de PtpB. El cromatograma corresponde a la inyección del pool de las eluciones (E1-E6) previamente concentrado. El pico 2 contiene a PtpB ($V_e=85\text{ml}$). La columna utilizada fue la Superdex 200-16/60, se inyectaron 5 ml de muestra y la cromatografía se realizó bajo un flujo de 0,8 ml/min. Inserto: SDS-PAGE de la muestra obtenida en el pico 2 previamente concentrada antes de ser sembrada en el gel de electroforesis.

2. Determinación de la actividad específica de las fosfatasas purificadas

Para determinar la actividad específica de las dos fosfatasas purificadas y concentradas se procedió a cuantificar los miligramos de proteína obtenidos por el método de Bradford y se realizaron ensayos de actividad utilizando el p-NPP como sustrato artificial. La figura 13 muestra la curva de calibración obtenida por el método de Bradford y la ecuación utilizada para el cálculo de la concentración proteica[81]. La concentración para las fosfatasas purificadas fue de 2.2 mg/ml para PtpA y 2.0 mg/ml para

PtpB. Esto nos permitió calcular el rendimiento de la purificación en mg de proteína recombinante por litro de cultivo, el cual fue de 5mg/L para PtpA y de 6 mg/L para PtpB. Ambas fosfatasas presentaron actividad fosfatasa utilizando como sustrato el p-NPP, siendo la actividad específica para PtpB 4.75 μ moles de p-NP/min. mg de proteína. El valor de actividad específica de PtpB fue el habitualmente obtenido en el laboratorio y el mismo se mantuvo estable en todas las alícuotas del stock utilizadas. Sin embargo para PtpA, la actividad inicial del stock a -20°C (del orden de 3 μ moles de p-NP/min. mg de proteína) disminuyó a 0.1 μ moles de p-NP/min. mg al cabo de tres meses. Debido a esto, si bien se purificaron ambas fosfatasas, se centró el estudio en PtpB, procediéndose al análisis del efecto de las chalconas en la actividad fosfatasa.

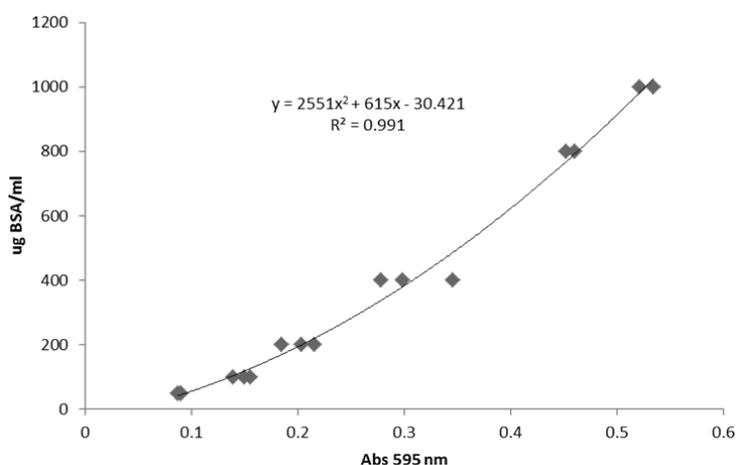


Figura 13- Curva de calibración realizada con los estándares de seroalbúmina bovina (BSA) utilizada para la determinación de concentración proteica por el método de Bradford. Protocolo y gráfico realizado según se sugiere en el capítulo "AssaysforDetermination of ProteinConcentration" del *CurrentProtocols in ProteinScience*[81]. Cada concentración de estándar se analizó en triplicado, al igual que la muestra problema.

3. Estabilidad de las chalconas en el ensayo de actividad fosfatasa

Antes de proceder a la evaluación del efecto de las chalconas en la actividad fosfatasa se analizó la solubilidad de las mismas en el buffer de actividad. Las chalconas son solubles en solventes como el DMSO y poco solubles en soluciones acuosas como el buffer de actividad fosfatasa. Esto se puso en evidencia, no solo por la observación directa de precipitado al diluir la chalconas en el buffer de actividad a concentraciones finales de 75 μM o mayores, sino también mediante la evaluación de los espectros característicos de las chalconas entre 260-560nm. Cuando la chalcona está disuelta en DMSO para la mayoría de ellas se pudo visualizar el espectro característico y este no varió al transcurrir los 15 minutos de incubación a 37 ° C. Sin embargo, cuando la chalcona se encuentra en el buffer, en la mayoría no se detecta dicho espectro característico indicando que cambian las propiedades de absorción y/o que precipita la chalcona. Esta aproximación fue útil para poner en evidencia problemas de solubilidad para aquellas chalconas donde la formación de precipitado en el buffer de actividad era difícil de detectar a simple vista. Por ejemplo para las chalconas 15, 19 y 25 se observó el espectro característico de la chalcona cuando ésta se encuentra a concentraciones de 50 μM en el buffer, pero éste se altera (disminuyen los picos) al aumentar la concentración a 75 μM , efecto inverso al observado cuando la chalcona se encuentra disuelta en DMSO (Figura 14). Teniendo en cuenta estos resultados y la concentración usada para otras chalconas o recomendadas en la literatura en la búsqueda

de nuevos inhibidores [56,70,83], se decidió evaluar las 25 chalconas a una concentración final en el ensayo de actividad fosfatasa de 25 μ M.

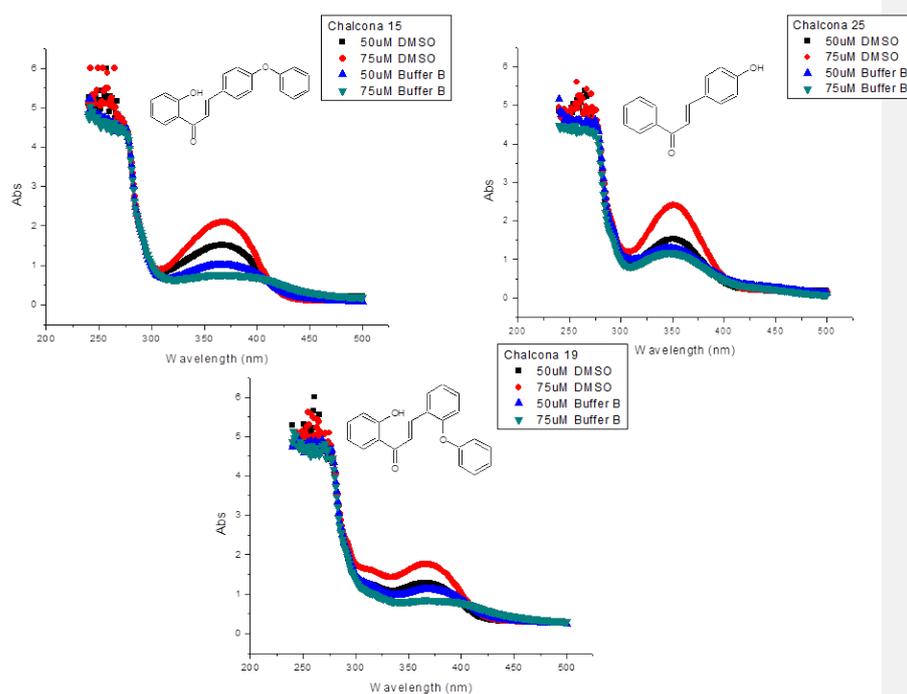


Figura 14- Espectros de absorción de las chalconas 15, 19 y 25 a 75 μ M y 50 μ M disueltas en el buffer de actividad y disueltas en DMSO.

4. Efecto de las chalconas en la actividad fosfatasa de PtpB y PtpA

La evaluación del efecto de las chalconas en la actividad fosfatasa PtpB fue realizada en un sistema de micro placa de 96 pocillos utilizando un

ensayo que previamente debí poner a punto. En cada ensayo de la actividad fosfatasa en presencia de chalcona realizado por triplicado se determinó la pendiente ($\Delta\text{Abs}/\Delta t$) con sus respectivos desvíos estándares. Con dichas pendientes se determinó los porcentajes de actividad remanente, el cual representa el cociente entre la pendiente en presencia de chalcona y la pendiente del control en ausencia de chalcona (control DMSO) tal como se describe en materiales y métodos. La figura 15 se muestra el gráfico de barras representando el porcentaje de actividad fosfatasa remanente de PtpB previamente incubada con cada chalcona (15 min a 37°C). El control-DMSO representa el 100% la actividad de PtpB (Figura 15, columna roja) y corresponde a la actividad fosfatasa en presencia de una concentración final de DMSO de 3.33 %, concentración de DMSO que aporta el agregado de cada chalcona al ensayo de actividad fosfatasa. Previamente verificamos que a dicha concentración de DMSO la actividad de PtpB no se veía afectada durante las condiciones de ensayo utilizadas. El ortovanadato de sodio, inhibidor competitivo de las PTP, se utilizó como control positivo a una concentración final en el ensayo de 200 μM , concentración a la cual se obtiene una actividad remanente de PtpB de 77% (Figura 15, columna verde). No se pudo evaluar a 25 μM , como las chalconas, porque que a esa concentración el ortovanadato de sodio no es capaz de inhibir a la PtpB (IC_{50} para PtpB del orden de 600 μM).

Al evaluar el efecto de las chalconas, se puede observar en la figura 15 que si bien hay compuestos que dan lugar a una actividad remanente menor que el control-DMSO, ninguna produjo una actividad remanente

menor al 75%, inclusive algunos compuestos presentaron un porcentaje que tiende a valores iguales o mayores del 100%. Como dicho gráfico representa los resultados de un único experimento con desviaciones que varían entre 1-12 %, se decidió analizar si las tendencias observadas se mantenían al realizar un total de tres experimentos independientes. En estos nuevos experimentos se utilizó una dilución fresca de la enzima a partir del stock (-20°C) de PtpB (2mg/ml) así como de chalcona, tal como se describe en materiales y métodos. Para este estudio se seleccionaron las chaconas: 3, 5, 1 representando el grupo que presentó una actividad remanente mayor del 100 %, y las chalconas 9, 17, 12 y 21 representando a las chalconas que presentaron valores de actividad remanente entre un 80-100%.

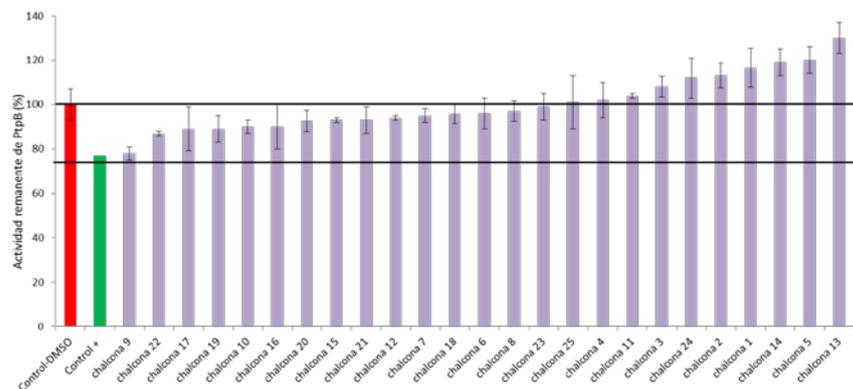


Figura 15-Efecto de las chalconas en la actividad de PtpB. En el eje y se representa el porcentajes de actividad fosfatasa remanente para PtpB en presencia de cada chalcona. La actividad del control-DMSO corresponde al 100 % (columna roja). El control positivo de inhibición (columna verde) se realizó con el inhibidor competitivo de fosfatasa, ortovanadato de sodio a una concentración final de 200 μ M. Las 25 chalconas fueron evaluadas a una concentración final de 25 μ M. Las barras de error representan el desvío estándar de los triplicados realizados en dicho experimento.

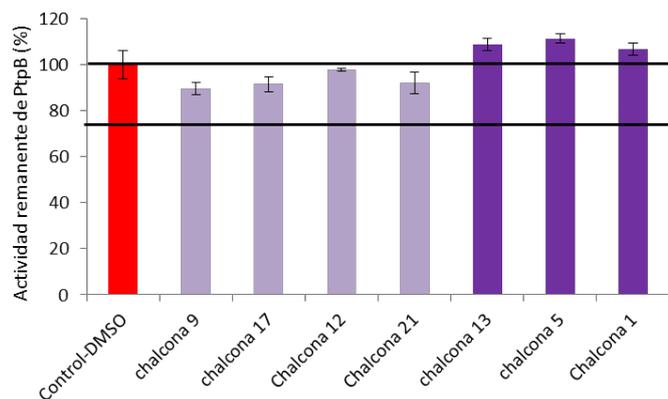


Figura 16 -Porcentaje de actividad remanente de PtpB para las chalconas seleccionadas y evaluadas en experimentos independientes. Las barras de error representan los desvíos estándares de los experimentos independiente los cuales variaron entre 1-5 %.

Los resultados obtenidos con estas nueve chalconas seleccionadas (Figura 16) reflejan las tendencias observadas en el primer ensayo realizado con las 25 chalconas (Figura 15). Esto permitió clasificar las chalconas en dos grupos, aquellas que causaron un aumento en la actividad fosfatasa de PtpB (valores mayores a 100%, chalcona 13, 5, 14, 1, 2, 24, 3, 4, 25, 23, 8, 6), y el grupo que produjo una disminución de la actividad de hasta un 18% (chalcona (9, 22, 17, 19, 10, 16, 20, 15, 21, 7, 8).

Para PtpA se realizó una evaluación preliminar del efecto de las 25 chalconas en la actividad fosfatasa (en algunos casos en duplicado y en otros una única medida de actividad, gráfico en Anexo). Este ensayo se realizó con la enzima fresca, antes de la inactivación observada del stock de PtpA que se describió anteriormente. Si bien estos resultados deben ser repetidos con una preparación nueva de PtpA, pudimos observar que las chalconas que inhiben a PtpA no se corresponderían con aquellas que inhiben a PtpB, siendo el mayor grado de inhibición de un 15%-13%, causado por la chalcona 7 y 6 respectivamente.

5. Ensayos de acoplamiento molecular entre PtpB y cada una de las chalconas

En paralelo a los ensayos de actividad, se realizaron ensayos de acoplamiento molecular (en inglés "docking") que permitieron obtener una aproximación teórica del sitio de unión de las chalconas a la PtpB. Se obtuvieron como resultado posibles sitios de unión para cada chalcona con sus respectivas energías de unión en kcal/mol (Tabla 4 en

Anexo). Posteriormente se realizó un gráfico relacionando los datos experimentales (actividad de PtpB remanente en %) con las energías de unión calculadas *in silico* (figura 17) y se lograron definir tres grupos. El grupo A de chalconas, que dieron lugar a una actividad fosfatasa menor del 100 % y presentaron las mejores energías de unión, entre - 10.5 y - 8.5 kcal/mol. En dicho grupo se encuentran las chalconas 21, 20, 12, 16, 19, 18, 17, 15, 10. Por otro lado, un grupo B (1, 2, 5, 3, 14) que agrupa a las chalconas que dan lugar a una actividad fosfatasa mayor al 100 % y que presentan un rango de energía mayor (entre - 8.5 y - 6.5 kcal/mol) con respecto al grupo A. Las chalconas 23, 7, 8, 25, (grupo C) presentan una actividad de 100 o muy cercana a este valor, con similar energía de unión al grupo B. Las chalconas 11, 13, 22, 9, 24, 4 no se pudieron definir en ningún grupo, sin embargo la 22 y 9 son interesantes por tener el mayor efecto inhibitorio en la actividad de PtpB.

Por lo tanto de este primer análisis podemos decir que las chalconas del grupo A junto con la 22 y 9 son las más interesantes para estudios posteriores de verificación de su efecto en la actividad y posteriormejoramiento de sus estructuras.

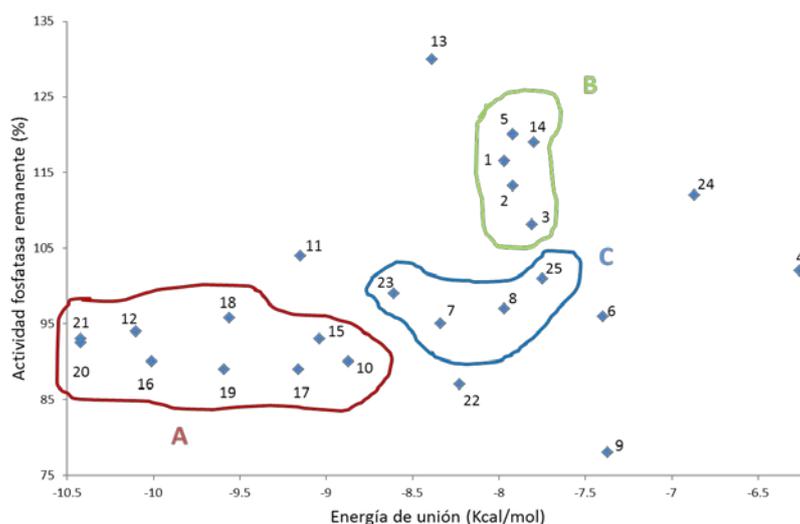


Figura 17- Búsqueda de correlación entre los resultados de actividad fosfatasa e *in silico*. Correlación entre la actividad fosfatasa remanente de PtpB (%) y las energías de unión (kcal/mol) obtenidas por el programa autodock4. **Grupo A:** chalconas que presentaron energía de unión entre -10.5 y -6.5 Kcal/mol y una actividad remanente de PtpB menor o igual a 100 %; **Grupo B:** chalconas que presentaron una energía de unión entre -8.5 y -6.5 kcal/mol y una actividad remanente de PtpB mayor a 100%; **Grupo C:** chalconas que presentaron una energía de unión igual que el grupo B pero con actividades de 100% o cercanas. Los clústeres se realizaron con StatistisXL, método de cluster: Nearestneighbour .

A partir de las imágenes 3D de cada complejo estructural PtpB-chalcona se generaron las imágenes 2D para las 25 chalconas (Anexo). Con esta información (2D y 3D) se pudo visualizar como se posicionaba la molécula en el sitio activo y con cuáles aminoácidos interaccionaba. Teniendo en cuenta la estructura general de las chalconas (anillo A y B) y el análisis de las estructuras de los complejos se puede decir que para la mayoría de las chalconas el anillo A se estabilizó mediante enlace de hidrógeno y en cambio el anillo B se estabilizó mediante otro tipo de interacciones de Van der Waals y/o efectos hidrofóbicos, dependiendo de los

sustituyentes. Podemos destacar también que la mayoría de los miembros del grupo A presentan en el anillo A y/o B de la chalcona al menos un anillo aromático como sustituyente.

Por otro lado, el programa MOE (figura 18) permitió determinar que aminoácido de PtpB estaría interaccionando mediante enlaces de hidrógeno, a través de la cadena lateral del aminoácido o del grupo imino del aminoácido con grupos de la chalcona. A simple vista en la Figura 18, se puede observar que 20 chalconas de un total de 25 se encuentran estabilizadas mediante al menos dos enlaces de hidrógeno con aminoácidos de la PtpB. Un grupo de 14 chalconas forma enlaces de hidrógeno con la cadena lateral de la Arg 166 y con el grupo imino de la Ala162, presentes en el sitio activo P-loop. Las chalconas 9 y 22 además de interaccionar con la Ala162 forman enlace de hidrógeno con el Asp165 catalítico al igual que la chalcona 6, pero ésta no forma enlace de hidrógeno con la Ala162, y sí con Arg 166. Por otro lado la chalcona 12 es la única que se encuentra formando tres enlaces de hidrógeno, con la His94, Tyr125 y Glu129 y se caracteriza por tener un grupo nitro en posición meta en el anillo B. Es interesante observar que la chalcona 13, similar a la 12 pero con el grupo nitro en posición para en el anillo B y la cual no forma éstos enlaces de hidrógeno se posicionó en un estado de energía mayor, menos favorable, lo que podría explicar por qué no inhibió a PtpB como lo hizo la chalcona 12.

La chalcona 8 involucra enlaces de hidrógeno con la His 94 y Arg 59. Sólo dos chalconas, la 17 y 24 se encuentran estabilizadas por un único

enlace de hidrógeno, con la Arg166 de la PtpB. La 4, 13 y la 20 son las únicas que no se encuentran estabilizadas por enlaces de hidrógeno. La 20 pertenece al grupo A y es de las más voluminosas al contar con el mayor número de anillos aromáticos como sustituyentes, los cuales pensamos contribuyen en estabilizar dicha molécula en el entorno no polar del sitio activo. Esto podría explicar la mejor energía de unión a PtpB calculada (-10,4 kcal/mol) y su efecto inhibitorio puede deberse a una obstrucción de la entrada al sitio activo y/o restringiendo el P-loop a una conformación desfavorable con la actividad.

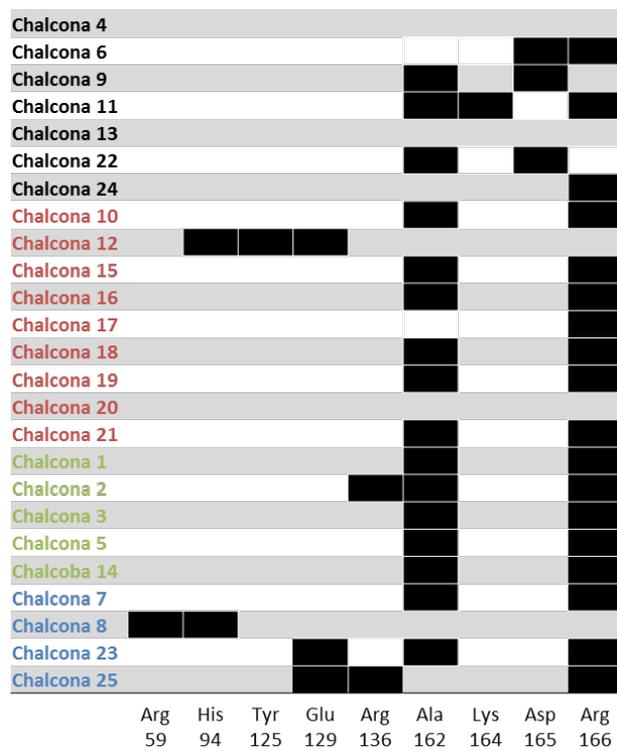


Figura 18- Representación esquemática de los aminoácidos de la PtpB que están interaccionado con la chalcona a menos de 4.5 Å, a través de enlaces de hidrógenos. Datos obtenidos con el programa MOE.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Con respecto a la purificación de las fosfatasas recombinantes podemos decir que para PtpA se logró reproducir el protocolo optimizado existente en el laboratorio obteniéndose el rendimiento esperado (5 mg de PtpA/L de cultivo). Estos rendimientos son más altos que los reportados en la literatura. Koul y colaboradores obtienen 2 mg de PtpA/L de cultivo y a pesar que inducen con la misma concentración de IPTG (0.5 mM) realizan sólo una etapa de purificación por cromatografía de afinidad por glutatión, y no por metal y exclusión molecular como en el presente trabajo [36]. En otro de los trabajos reportan 3.5 mg de PtpA/L de cultivo, pero la inducción fue realizada con una menor concentración de IPTG (0.1mM) y la purificación incluyó una etapa de cromatografía de afinidad y otra de intercambio iónico [52]. Para PtpB cuando aplicamos el mismo protocolo de cromatografía de afinidad por metal utilizado para PtpA, observamos que la mayoría de PtpBeluye en los lavados a baja concentración de imidazol (10mM y 20mM), por lo cual en las próximas purificaciones esta etapa deben ser eliminada. De todas formas recuperamos estas fracciones y fueron purificadas por exclusión molecular obteniéndose un rendimiento aceptable de 6 mg/L de cultivo.

Tanto para PtpA y PtpB, la etapa de purificación por exclusión molecular no solo permitió eliminar agregados y/o proteínas de alta masa molecular sino también los restos de imidazol que sabemos afectan la

estabilidad de dichas fosfatasa[83], así como verificar que las fosfatasa obtenidas se encontraban en forma monomérica. Si bien la actividad específica del stock a -20°C de PtpB realizado con la proteína purificada resultó estable a lo largo de todos los ensayos, el de PtpA se inactivó al cabo de 2 meses. Habitualmente, para mantener el stock de PtpA a -20°C, la proteína se almacenaba en el buffer de gel filtración (20 mM Tris-HCl pH=8.0, 50 mM de NaCl, 3 mM de DTT, 5mM de EDTA y 10% de glicerol) a una concentración del orden de 4mg/ml. Pero debido a que al descongelar las alícuotas del stock de PtpA y PtpB generalmente perdíamos proteína por precipitación, decidimos durante este trabajo almacenar el stock en buffer de GF conteniendo 50% de glicerol, el cual impide que las muestras se congelen a -20°C. Es posible que al no congelarse la muestra y al verse diluidos algunos de los componentes del buffer debido al agregado de glicerol (suplementamos con 5 mM final de DTT) los procesos de inactivación en el stock de PtpA se hayan visto favorecidos respecto al stock de PtpB. La experiencia de nuestro laboratorio con las PTP ha mostrado que la PtpA es mucho más inestable en solución que PtpB. PtpA tiene tres cisteínas (Cys 11 catalítica, Cys16, Cys53) en cambio PtpB tiene una única Cys (Cys 160 catalítica). Esta inactivación no parece deberse a la formación de agregados (perfil de gel filtración inalterado) y pensamos pueda deberse a la inactivación por oxidación irreversible (no recuperamos actividad al tratar con altas concentraciones de DTT) de alguna de las tres cisteínas presentes en PtpA.

Tanto la estructura cristalográfica de PtpA como la de PtpB han sido resueltas [49,52]. El grupo de T. Alber, describió la estructura de PtpB señalando la presencia dos hélices ($\alpha 7$ y $\alpha 8$, aminoácidos 211-224) que forma una tapa móvil (“lid”) hacia la entrada al sitio activo. Según los autores, la Phe222 se introduciría en el sitio activo mimetizando la P-tirosina del sustrato. A través de estudios por FRET “Förster (Fluorescence) resonance energy transfer” se verificó la dinámica entre la conformación abierta y la cerrada de dichas hélices. En el presente trabajo se utilizó la estructura abierta de PtpB (PDB ID 2OZ5) y no la cerrada (PDB ID 1WYF) de manera que el sitio activo de la misma se encontrara accesible a la entrada de los compuestos. La figura 19 muestra la estructura abierta de PtpB señalando las inserciones que están presentes PtpB y no en las PTP humanas: hélices $\alpha 7$ y $\alpha 8$ que forman una tapa “lid” cubriendo el sitio activo, y una $\alpha 3A$ (violeta). Además la hélice $\alpha 3$, característica de las ALP “*Atypical Lipid Phosphatase*”, que en la PTPs humana se encuentra no estructurada (amarillo), y por último el P-loop que es el sitio donde se encuentran los aminoácidos que participan en la catálisis.

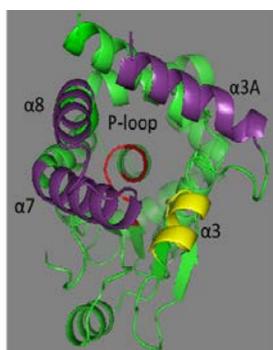


Figura 19- Estructura abierta de PtpB (PDB ID 2OZ5) señalando las inserciones que están presentes en PtpB y no en las PTP humanas: hélices $\alpha 7$ y $\alpha 8$ que forman una tapa “lid” cubriendo el sitio activo, y una $\alpha 3A$ (violeta). Además la hélice $\alpha 3$, característica de las ALP “*Atypical Lipid Phosphatase*”, que en la PTPs humana se encuentra no estructurada (amarillo), y por último el P-loop que es el sitio donde se encuentran los aminoácidos que participan en la catálisis, imagen modificada con el Pymol (DeLano Scientific LLC, EUA).

La estructura abierta fue resuelta gracias a los datos cristalográficos de la PtpB cristalizada con dos moléculas del inhibidor OMTS (ver tabla 1). Para el OMTS se reportó un IC_{50} de 0.44 μ M. La primera molécula de OMTS se unió en el sitio activo (P1), estabilizándose principalmente mediante siete enlaces de hidrógeno que involucran principalmente los residuos del motivo catalítico o P-loop (Cys 160, Phe 161, D165, Ala 162, Lys 164, Arg 166, Glu 129). La unión de una segunda molécula de OMTS, permitió detectar un sitio secundario de unión del inhibidor (P2) a PtpB en el cual están involucrados en la estabilización a través de enlaces de hidrogeno la Arg 210, Arg 59, Arg 64 y los aminoácidos Phe98, Leu 102, Phe 211 mediante interacciones no polares [49,59]. En el sitio secundario se encuentra la hélice α 3 la cual es típica de las ALP, y no se encuentra estructurada en la PTP humana y otras PTPs. Lo que hace a P2 interesante como sitio de anclaje de nuevas moléculas inhibitoras. Es así que, el grupo de L. Taberner, retomando las evidencias estructurales reportadas para PtpB, centró sus estudios en encontrar compuestos que se unieran tanto a P1 como a P2, como estrategia de búsqueda de mejores inhibidores, Figura 20. La estructura de estos compuestos es una combinación de un isoxazol con ácido salicílico. Para el mejor de estos compuesto Isoxazol-salicilato se reportó un IC_{50} de 0.36 μ M, el cual causó a 20 μ M una disminución del 42 % en el crecimiento de *M.tb.* dentro de los macrófagos infectados. Los ensayos de acoplamiento molecular confirmaron que el compuesto Isoxazol-salicilato de Taberner interaccionaría con el sitio activo (P1) y también con el sitio secundario (P2) descrito por el grupo de T. Alber. La región isoxazol del compuesto

interaccionaría a nivel de sitio activo mediante 4 enlaces de hidrógeno con los grupos amida de aminoácidos del P-loop (CX₅R/S) y la cadena lateral de la Arg 166, y estaría también estabilizada mediante interacción entre el anillo de la Phe 161 y uno de los anillos del compuesto. Por otro lado, la región salicilato estaría estabilizada en un segundo sitio de unión (P2) mediante enlaces de hidrógeno con la Arg63 de la hélice α_3 y la Arg 210 de la hélice α_7 [67], figura 21.

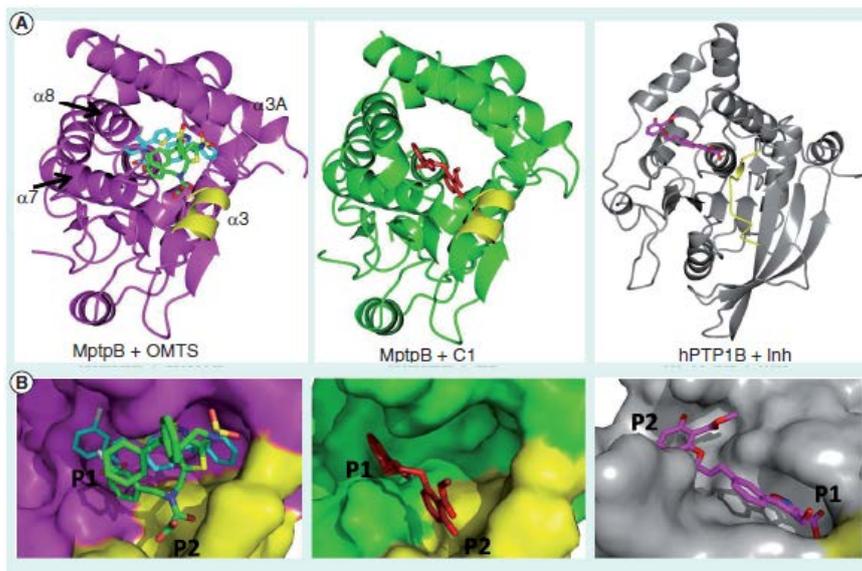


Figura 20- Diferencias en el modo de unión de los inhibidores para PtpB y para hPTP1B (fosfatasa humana). **A)** Complejo entre PtpB y el inhibidor OMTS (violeta), complejo entre PtpB y el isoxazol salicilato (verde), complejo entre hPTP1B y con su inhibidor. **B)** En PtpB, ambos inhibidores (OMTS e isoxazol salicilato) se unen de un modo similar, con una parte hacia el sitio P1 y la otra hacia el sitio P2. En cambio, en hPTP1B, el sitio P2 esta orienta 180° con respecto a P2 en PtpB. Taberner et al.2010.

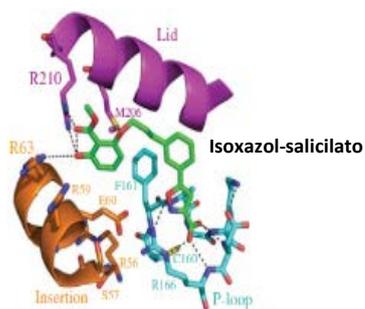


Figura 21- Inhibidor isoxazol-salicilato (verde) interaccionando con ambos sitios de unión, los aminoácidos del sitio activo (P1) están formando enlaces de hidrógeno con la región isoxazol del compuesto y el salicilato está estabilizado en un segundo sitio de unión (P2) entre la Arg 63 del a hélice $\alpha 3$ y la Arg 210 de la hélice $\alpha 7$.

En el presente trabajo se identificó un grupo de chalconas (grupo A y chalcona 9 y 22) interesantes que causan una disminución de la actividad de PtpB del orden del 4% al 18%. Sin embargo este resultado vienen de un único ensayo, por lo cual se deben realizar al menos dos ensayos más independientes para estar seguros que el pequeño efecto inhibitor observado no se encuentra dentro de la desviación estándar de ensayos independientes. Para aquellas chalconas con las que se realizaron tres experimentos independientes (9, 17, 12, 21, 13, 5, 1) se pudo observar que el valor obtenido de actividad remanente no hacía que la chalcona cambiara de grupo definido en función del efecto en la actividad y la energía de interacción (figura 17). Una vez completado el estudio para todas las chalconas, podremos estar seguros qué moléculas del grupo A pueden ser usadas como base para el diseño inhibidores más potentes.

Por lo tanto, en este estudio se decidió como estrategia preliminar analizar en profundidad sólo las mejores chalconas, es decir las que causaron mayor inhibición: la 17,19,10,16 dentro del grupo A, y la 9 y 22 no asignadas a ningún grupo. Para la chalcona 9 y 22, el anillo A se ubicó en

elsitio P1 tal como las moléculas Isoxazol-salicilato y el OMTS reportados como inhibidores, figura 22. En ambas chalconas, este anillo se encuentra estabilizado solo por dos enlaces de hidrógeno y no por 4 o más, como los inhibidores reportados.

Para la chalconas 9 el anillo B no está hacia P2, pero esta hacia la $\alpha 7$ que es uno de los elementos del "lid" presente en PtpB y no en las PTP humanas, figura 23. La chalcona 22 se encuentra también estabilizada por un enlace de hidrógeno que involucra el Asp catalítico y el iminodo de la Ala 162, pero el anillo B no se orienta hacia P2, sino que hacia el interior de la proteína estabilizándose por la presencia de los anillos de la Phe 80 y 133.

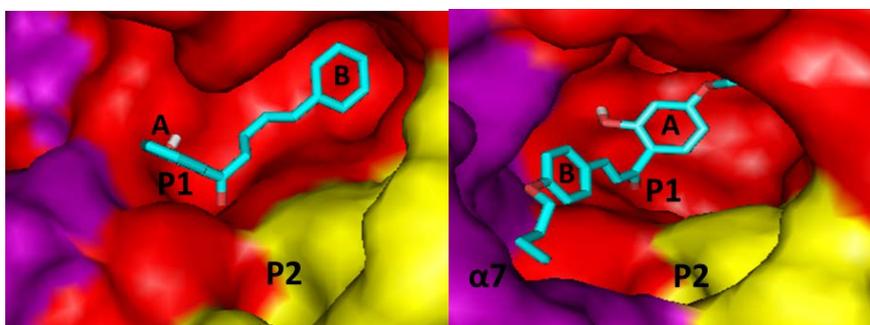


Figura 22-A la izquierda, se muestra la chalcona 22: anillo A se estabiliza en la zona del P-loop (P1) y el anillo B se ubica hacia el interior de la proteína. A la derecha se muestra la chalcona 9 con el anillo A estabilizado en la zona P-loop (P1) y el anillo B junto con su sustituyente hacia la región de la $\alpha 7$.

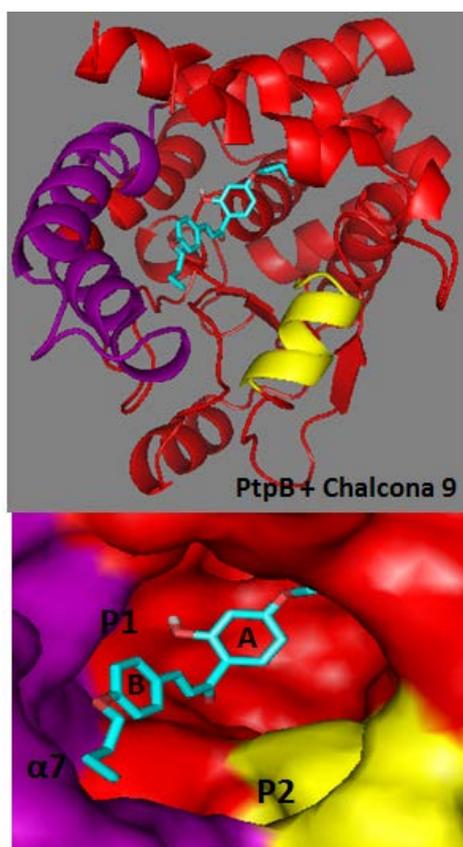


Figura 23-Chalcona 9 interaccionando con P1 a través del anillo A y el anillo B junto con su sustituyente con la $\alpha 7$ (violeta), P2 (amarillo).

La molécula 10 se orienta de manera similar a la 22, el anillo A hacia P1 y el anillo B hacia el interior de la proteína (Phe 133). La molécula 16, se orienta de manera similar a la 22 y la 10, el anillo A hacia P1 y el anillo B hacia el interior de la proteína (Phe 133), pero lo interesante es que el sustituyente del anillo A, a su vez contiene un tercer anillo que se orienta

hacia la $\alpha 7$ de la "lid". En las chalconas 17 y 19 el anillo A se estabiliza a nivel de P1, mientras que el anillo B de ambas junto a sus sustituyentes se orientan hacia la $\alpha 7$, estabilizándose mediante interacciones de Van der Waals con residuos no polares.

Por lo tanto, modificar el anillo B, agregándole sustituyentes que hagan mayor contacto con la hélice $\alpha 7$ y/o la $\alpha 3$ (P2), en donde el Isoxazol-salicilato y el OMTS se estabilizaron con mayor número de enlaces de hidrógeno, podría ser una estrategia para anclar futuras moléculas a la entrada del sitio activo. Cabe destacar que el sustrato artificial utilizado (p-NPP) es muy pequeño respecto a los sustratos fisiológicos que han sido postulados, por lo cual no descartamos que el efecto inhibitorio pueda ser mayor con un sustrato proteico o lipídico, sería interesante evaluar por ejemplo la actividad utilizando péptidos específicos fosforilados en tirosina de algún sustrato o con fosofinositol fosfato.

Uno de los objetivos, aún en curso, es obtener la chalcona 70-Brasil, para poder ver como se ubica respecto a las moléculas evaluadas en términos de efecto inhibitorio de la actividad de PtpB. Con dicha molécula se realizó un acoplamiento molecular con PtpB, y el complejo formado no concuerda con lo reportado en el artículo de H. Terenzi[54]. En dicho artículo el carbonilo del anillo A estaría estabilizándose mediante enlaces de hidrógeno con la Arg 210 junto con interacciones electroestáticas con el dipolo de la hélice $\alpha 5$. El anillo B establecería interacción con la cadena lateral de la Arg 166 e interacciones no polares la Phe80, Pro 81 y Phe133.

Según nuestro estudio, con el programa Autodock4, el anillo A de este inhibidor reportado que tiene un carboxilo como sustituyente se orienta hacia el sitio activo estableciendo enlace de hidrogeno con dos residuos catalíticos importantes, el Asp 165 y la Arg 166. En las moléculas evaluadas en este trabajo, sólo uno de estos aminoácidos catalíticos estuvo implicado en un enlace de hidrógeno, nunca los dos como en el caso de la chalcona 70-Brasil, Figura 24

La discrepancia *in silico* entre el complejo reportado y el que se obtuvo en este estudio, puede deberse a diferencia en los parámetros definidos y/o el programa utilizado. Sin embargo, en el artículo no se describe en detalle la selección del mejor complejo formado con la chalcona reportada como inhibidor. El complejo reportado por el grupo de Brasil fue observado con el programa Autodock4 pero según los parámetros utilizados en este trabajo no se encontró dentro de los complejos más representativos.

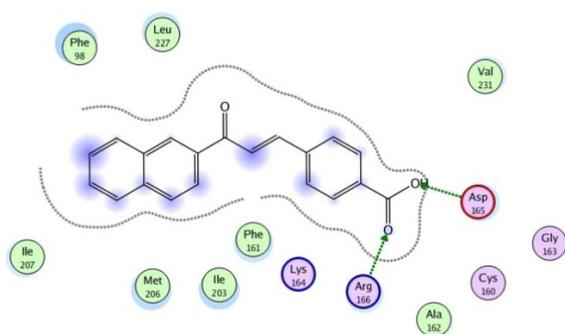


Figura 24- Representación en 2D del complejo chalcona 70-Brasil y PtpB, determinado por el programa Autodock4

Según nuestro estudio la energía de interacción de la chalcona 70-Brasil con la PtpB es del orden de la observada para compuestos del grupo A. Una vez que ésta sea sintetizada se podrá verificar si cae o no fuera de los grupos definidos en el presente trabajo, es de esperar que no, es decir que sea parte de un grupo debajo del A. La chalcona 70-Brasil se reportó como un inhibidor competitivo con un IC_{50} de 12 μM y k_i de 8 μM . Los ensayos de actividad fueron realizados en condiciones similares a las utilizadas en el presente trabajo (ensayo en microplaca, sustrato en condiciones de saturación, T 37°C, buffer similar), pero sin previa incubación con la chalcona.

Analizando todos los resultados obtenidos del presente trabajo y los comparados con la literatura, se podría continuar la búsqueda de mejores inhibidores de la familia de chalconas que presenten cambios en los anillos A y B de tal forma de lograr establecer mayor número de interacciones electrostáticas en especial enlaces de hidrógeno que se dirijan a los sitios reportados P1 y P2 e incluso hacia la hélice $\alpha 7$ como lugares selectivos para esta fosfatasa (PtpB).

BIBLIOGRAFÍA

- 1-WHO. Global Tuberculosis Report 2012. (2012).
- 2-Armstrong, J. y Hart, P. D. Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *The Journal of Experimental Medicine***134** 713-740 (1971).
- 3-Bermudez, L. E. y Goodman, J. *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within type II alveolar cells. *Infection and Immunity***64** 1400-1406 (1996).
- 4-Neyrolles, O., Hernández-Pando, R., Pietri-Rouxel, F., Fornès, P., Tailleux, L., Barrios Payán, J. A., Pivert, E., Bordat, Y., Aguilar, D., Prévost, M. C., Petit, C. y Gicquel, B. Is adipose tissue a place for *Mycobacterium tuberculosis* persistence? *PLoS One***1** e43 (2006).
- 5-Warner, D. F. y Mizrahi, V. The survival kit of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Medicine***13** 282-284 (2007).
- 6-Mathema, B., Kurepina, N., Fallows, D. y Kreiswirth, B. N. Lessons from molecular epidemiology and comparative genomics. *Semin Respir Crit Care Med***29** 467-480 (2008).
- 7-Frieden, T. R., Sterling, T. R., Munsiff, S. S., Watt, C. J. y Dye, C. Tuberculosis. *Lancet***362** 887-899 (2003).
- 8-Hill, P. C., Brookes, R. H., Fox, A., Fielding, K., Jeffries, D. J., Jackson-Sillah, D., Lugos, M. D., Owiafe, P. K., Donkor, S. A., Hammond, A. S., Otu, J. K., Corrah, T., Adegbola, R. A. y McAdam, K. P. Large-scale evaluation of enzyme-linked immunospot assay and skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection against a gradient of exposure in The Gambia. *Clin Infect Dis***38** 966-973 (2004).
- 9-Russell, D. G. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nature Review Molecular Cell Biology***2** 569-577 (2001).

- 10-Zuniga, J., Torres-García, D., Santos-Mendoza, T., Rodriguez-Reyna, T. S., Granados, J. y Yunis, E. J. Cellular and Humoral Mechanisms Involved in the Control of Tuberculosis. *Clinical and Developmental Immunology***2012** 18 (2012).
- 11-Brock, I., Munk, M. E., Kok-Jensen, A. y Andersen, P. Performance of whole blood IFN-gamma test for tuberculosis diagnosis based on PPD or the specific antigens ESAT-6 and CFP-10. *Int J Tuberc Lung Dis***5** 462-467 (2001).
- 12-Pai, M., Riley, L. W. y Colford, J. M., Jr. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis***4** 761-776 (2004).
- 13-Barry, C. E., 3rd, Boshoff, H. I., Dartois, V., Dick, T., Ehrt, S., Flynn, J., Schnappinger, D., Wilkinson, R. J. y Young, D. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nat Rev Microbiol***7** 845-855 (2009).
- 14-Anil, K., Eric, A., Nacer, L., Jerome, G. y Koen, A. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature***469** 483-490 (2011).
- 15-Basso, L. A. y Blanchard, J. S. Resistance to antitubercular drugs. *Adv Exp Med Biol***456** 115-144 (1998).
- 16-Basso, L. A., da Silva, L. H., Fett-Neto, A. G., de Azevedo, W. F., Jr., Moreira Ide, S., Palma, M. S., Calixto, J. B., Astolfi Filho, S., dos Santos, R. R., Soares, M. B. y Santos, D. S. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz***100** 475-506 (2005).
- 17-Schroeder, E. K., de Souza, N., Santos, D. S., Blanchard, J. S. y Basso, L. A. Drugs that inhibit mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Pharm Biotechnol***3** 197-225 (2002).
- 18-Dye, C. y Williams, B. G. The population dynamics and control of tuberculosis. *Science***328** 856-861 (2010).
- 19-Chao, M. C. y Rubin, E. J. Letting sleeping dogs lie: does dormancy play a role in tuberculosis? *Annu Rev Microbiol***64** 293-311 (2010).
- 20-Muñoz-Elías, E. J. y McKinney, J. D. *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate lyases 1 and 2 are jointly required for in vivo growth and virulence. *Nature Medicine***11** 638-644 (2005).

- 21-Russell, D. G. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nature Reviews Microbiology***5** 39-47 (2007).
- 22-DeVinney, R., Steele-Mortimer, O. y Finlay, B. B. Phosphatases and kinases delivered to the host cell by bacterial pathogens. *Trends Microbiol***8** 29-33 (2000).
- 23-Kennelly, P. J. y Potts, M. Fancy meeting you here! A fresh look at "prokaryotic" protein phosphorylation. *J Bacteriol***178** 4759-4764 (1996).
- 24-Guan, K. L. y Dixon, J. E. Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. *Science***249** 553-556 (1990).
- 25-Kaniga, K., Uralil, J., Bliska, J. B. y Galan, J. E. A secreted protein tyrosine phosphatase with modular effector domains in the bacterial pathogen *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol***21** 633-641 (1996).
- 26-Black, D. S. y Bliska, J. B. Identification of p130Cas as a substrate of *Yersinia* YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions. *EMBO J***16** 2730-2744 (1997).
- 27-Bliska, J. B. y Black, D. S. Inhibition of the Fc receptor-mediated oxidative burst in macrophages by the *Yersinia pseudotuberculosis* tyrosine phosphatase. *Infect Immun***63** 681-685 (1995).
- 28-Bliska, J. B., Guan, K. L., Dixon, J. E. y Falkow, S. Tyrosine phosphate hydrolysis of host proteins by an essential *Yersinia* virulence determinant. *Proc Natl Acad Sci U S A***88** 1187-1191 (1991).
- 29-Andersson, K., Carballeira, N., Magnusson, K. E., Persson, C., Stendahl, O., Wolf-Watz, H. y Fallman, M. YopH of *Yersinia pseudotuberculosis* interrupts early phosphotyrosine signalling associated with phagocytosis. *Mol Microbiol***20** 1057-1069 (1996).
- 30-Fu, Y. y Galan, J. E. A salmonella protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature***401** 293-297 (1999).
- 31-Av-Gay, Y. y Everett, M. The eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases of *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol***8** 238-244 (2000).

- 32-Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E., 3rd, Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J. E., Taylor, K., Whitehead, S. y Barrell, B. G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature***393** 537-544 (1998).
- 33-Bach, H., Wong, D. y Av-Gay, Y. *Mycobacterium tuberculosis* PtpA is a novel protein tyrosine kinase whose substrate is PtpA. *Biochem J***420** 155-160 (2009).
- 34-Bach, H., Papavinasasundaram, K., Wong, D., Hmama, Z. y Av-Gay, Y. *Mycobacterium tuberculosis* virulence is mediated by PtpA dephosphorylation of human vacuolar protein sorting 33B. *Cell Host & Microbe***3** 316-322 (2008).
- 35-Grundner, C., Cox, J. S. y Alber, T. Protein tyrosine phosphatase PtpA is not required for *Mycobacterium tuberculosis* growth in mice. *FEMS Microbiol Lett***287** 181-184 (2008).
- 36-Koul, A., Choidas, A., Treder, M., Tyagi, A. K., Drlica, K., Singh, Y. y Ullrich, A. Cloning and characterization of secretory tyrosine phosphatases of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol***182** 5425-5432 (2000).
- 37-Cowley, S. C., Babakaiff, R. y Av-Gay, Y. Expression and localization of the *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase PtpA. *Res Microbiol***153** 233-241 (2002).
- 38-Singh, R., Rao, V., Shakila, H., Gupta, R., Khera, A., Dhar, N., Singh, A., Koul, A., Singh, Y., Naseema, M., Narayanan, P. R., Paramasivan, C. N., Ramanathan, V. D. y Tyagi, A. K. Disruption of *mptpB* impairs the ability of *Mycobacterium tuberculosis* to survive in guinea pigs. *Molecular Microbiology***50** 751-762 (2003).
- 39-Zhou, B., He, Y., Zhang, X., Xu, J., Luo, Y., Wang, Y., Franzblau, S. G., Yang, Z., Chan, R. J., Liu, Y., Zheng, J. y Zhang, Z. Y. Targeting mycobacterium protein tyrosine phosphatase B for antituberculosis agents. *Proc Natl Acad Sci U S A***107** 4573-4578 (2010).
- 40-Saunders, B. M., Frank, A. A., Orme, I. M. y Cooper, A. M. Interleukin-6 induces early gamma interferon production in the infected lung but is not required for generation of specific immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun***68** 3322-3326 (2000).

- 41-Wong, D., Bach, H., Sun, J., Hmama, Z. y Av-Gay, Y. Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H⁺-ATPase to inhibit phagosome acidification. *Proc Natl Acad Sci U S A***108** 19371-19376 (2011).
- 42-Wong, D., Chao, J. D. y Av-Gay, Y. Mycobacterium tuberculosis-secreted phosphatases: from pathogenesis to targets for TB drug development. *Trends Microbiol* (2012).
- 43-Denu, J. M., Zhou, G., Guo, Y. y Dixon, J. E. The catalytic role of aspartic acid-92 in a human dual-specific protein-tyrosine-phosphatase. *Biochemistry***34** 3396-3403 (1995).
- 44-Denu, J. M., Stuckey, J. A., Saper, M. A. y Dixon, J. E. Form and function in protein dephosphorylation. *Cell***87** 361-364 (1996).
- 45-Denu, J. M., Lohse, D. L., Vijayalakshmi, J., Saper, M. A. y Dixon, J. E. Visualization of intermediate and transition-state structures in protein-tyrosine phosphatase catalysis. *Proc Natl Acad Sci U S A***93** 2493-2498 (1996).
- 46-Shi, L., Potts, M. y Kennelly, P. J. The serine, threonine, and/or tyrosine-specific protein kinases and protein phosphatases of prokaryotic organisms: a family portrait. *FEMS Microbiol Rev***22** 229-253 (1998).
- 47-Cozzzone, A. J., Grangeasse, C., Doublet, P. y Duclos, B. Protein phosphorylation on tyrosine in bacteria. *Arch Microbiol***181** 171-181 (2004).
- 48-Tonksy, N. K. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease *nature reviews molecular cell biology***11** 833-846 (2006).
- 49-Grundner, C., Ng, H. L. y Alber, T. Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase PtpB structure reveals a diverged fold and a buried active site. *Structure***13** 1625-1634 (2005).
- 50-Beresford, N., Patel, S., Armstrong, J., Szoor, B., Fordham-Skelton, A. P. y Taberner, L. MtpB, a virulence factor from Mycobacterium tuberculosis, exhibits triple-specificity phosphatase activity. *Biochem J***406** 13-18 (2007).
- 51-Beresford, N. J., Saville, C., Bennett, H. J., Roberts, I. S. y Taberner, L. A new family of phosphoinositide phosphatases in microorganisms: identification and biochemical analysis. *BMC Genomics***11** 457 (2010).

- 52-Madhurantakam, C., Rajakumara, E., Mazumdar, P. A., Saha, B., Mitra, D., Wiker, H. G., Sankaranarayanan, R. y Das, A. K. Crystal structure of low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis* at 1.9-Å resolution. *J Bacteriol***187** 2175-2181 (2005).
- 53-Silva, A. P. y Taberner, L. New strategies in fighting TB: Targeting *Mycobacterium tuberculosis*- secreted phosphatases MptpA & MptpB. *Future Medicinal Chemistry***2** 1325-1337 (2010).
- 54-Chiaradia, L. D., Alves Martins, P. G., Sechini Cordeiro, M. N., Carvalho Guido, R. V., Ecco, G., Andricopulo, A. D., Yunes, R. A., Vernal, J., Nunes, R. J. y Terenzi, H. n. Synthesis, Biological Evaluation, And Molecular Modeling of Chalcone Derivatives As Potent Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* Protein Tyrosine Phosphatases (PtpA and PtpB). *Journal of Medicinal Chemistry***55** 390-402 (2012).
- 55-Mascarello, A., Chiaradia, L. D., Vernal, J., Villarino, A., Guido, R. V. C., Perizzolo, P., Poirier, V., Wong, D., Martins, P. G. A., Nunes, R. J., Yunes, R. A., Andricopulo, A. D., Av-Gay, Y. y Terenzi, H. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* tyrosine phosphatase PtpA by synthetic chalcones: Kinetics, molecular modeling, toxicity and effect on growth. *bioorganic & Medicinal Chemistry***18** 3783-3789 (2010).
- 56-Chiaradia, L. D., Mascarello, A., Purificação, M., Vernal, J., Cordeiro, M. N. S., Zenteno, M. E., Villarino, A., Nunes, R. J., Yunes, R. A. y Terenzi, H. Synthetic chalcones as efficient inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase PtpA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters***18** 6227-6230 (2008).
- 57-Soellner, M. B., Rawls, K. A., Grundner, C., Alber, T. y Ellman, J. A. Fragment-based substrate activity screening method for the identification of potent inhibitors of the *Mycobacterium tuberculosis* phosphatase PtpB. *J Am Chem Soc***129** 9613-9615 (2007).
- 58-Rawls, K. A., Grundner, C. y Ellman, J. A. Design and synthesis of nonpeptidic, small molecule inhibitors for the *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase PtpB. *Org Biomol Chem***8** 4066-4070 (2010).
- 59-Grundner, C., Perrin, D., Hooft van Huijsduijnen, R., Swinnen, D., Gonzalez, J., Gee, C. L., Wells, T. N. y Alber, T. Structural Basis for Selective Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* Protein Tyrosine Phosphatase PtpB. *Structure***15** 499-509 (2007).
- 60-Noren-Muller, A., Wilk, W., Saxena, K., Schwalbe, H., Kaiser, M. y Waldmann, H. Discovery of a new class of inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* protein

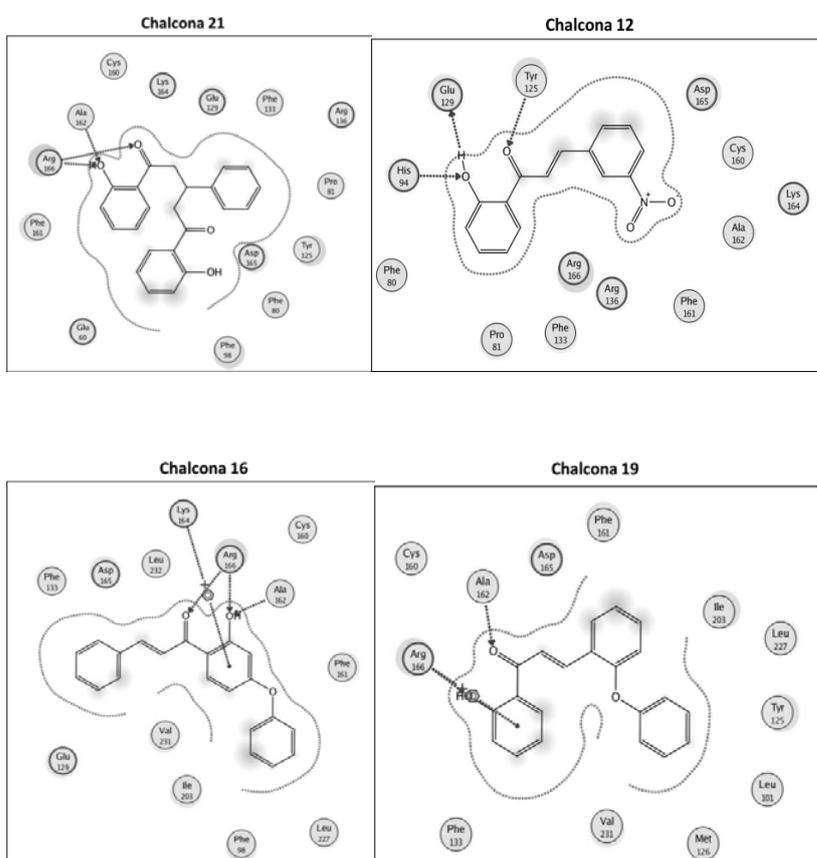
- tyrosine phosphatase B by biology-oriented synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl***47** 5973-5977 (2008).
- 61-Vintonyak, V. V., Warburg, K., Kruse, H., Grimme, S., Hübet, K., Rauh, D. y Waldmann, H. Identification of Thiazolidinones Spiro-Fused to Indolin-2-ones as Potent and Selective Inhibitors of the Mycobacterium tuberculosis Protein Tyrosine Phosphatase B. *Angewandte Chemie - International Edition***49** 5902-5905 (2010).
- 62-Chen, L., Zhou, B., Zhang, S., Wu, L., Wang, Y., Franzblau, S. G. y Zhang, Z. Y. Identification and characterization of novel inhibitors of mPTPB, an essential virulent phosphatase from Mycobacterium tuberculosis. *ACS Med Chem Lett***1** 355-359 (2010).
- 63-He, R., Yu, Z., He, Y., Zeng, L. F., Xu, J., Wu, L., Gunawan, A. M., Wang, L., Jiang, Z. X. y Zhang, Z. Y. Double click reaction for the acquisition of a highly potent and selective mPTPB inhibitor. *ChemMedChem***5** 2051-2056 (2010).
- 64-Seibert, S. F., Eguereva, E., Krick, A., Kehraus, S., Voloshina, E., Raabe, G., Fleischhauer, J. o., Leistner, E., Wiese, M., Prinz, H., Alexandrov, K., Janning, P., Waldmann, H. y König, a. G. M. Polyketides from the marine-derived fungus *Ascochyta salicorniae* and their potential to inhibit protein phosphatases. *Org Biomol Chem***4** 2233-2240 (2006).
- 65-Muller, D., Krick, A., Kehraus, S., Mehner, C., Hart, M., Kupper, F. C., Saxena, K., Prinz, H., Schwalbe, H., Janning, P., Waldmann, H. y König, G. M. Brunsvicamides A-C: sponge-related cyanobacterial peptides with Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase inhibitory activity. *J Med Chem***49** 4871-4878 (2006).
- 66-Weide, T., Arve, L., Prinz, H., Waldmann, H. y Kessler, H. 3-Substituted indolizine-1-carbonitrile derivatives as phosphatase inhibitors. *BIOORG MED CHEM LETT***16** 59-63 (2006).
- 67-Beresford, N. J., Mulhearn, D., Szczepankiewicz, B., Liu, G., Johnson, M. E., Fordham-Skelton, A., Abad-Zapatero, C., Cavet, J. S. y Taberner, L. Inhibition of MptpB phosphatase from Mycobacterium tuberculosis impairs mycobacterial survival in macrophages. *J Antimicrob Chemother***63** 928-936 (2009).
- 68-Navakoski de Oliveira, K., Domenechini, C. L., Alves Martins, P. G., Mascarello, A., Sechini Cordeiro, M. N., Carvalho Guido, R. V., Andricopulo, A. D., Yunes, R. A., Nunes, R. J. y Terenzi, J. V. a. H. Sulfonyl-hydrazones of cyclic imides derivatives as potent inhibitors of the Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase B (PtpB). *Med. Chem. Commun.***2** 500-504 (2011).

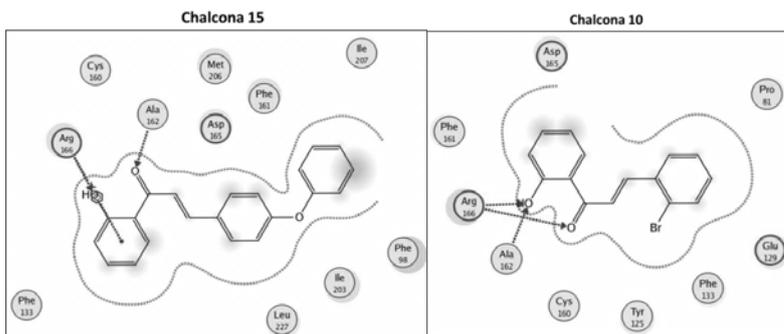
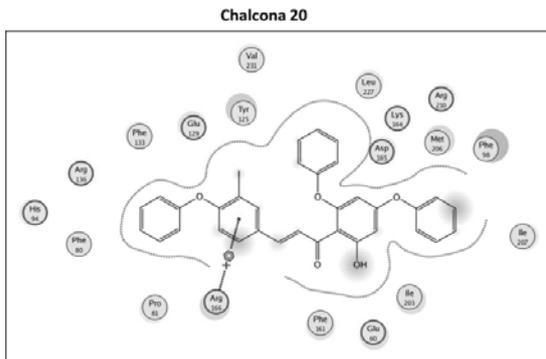
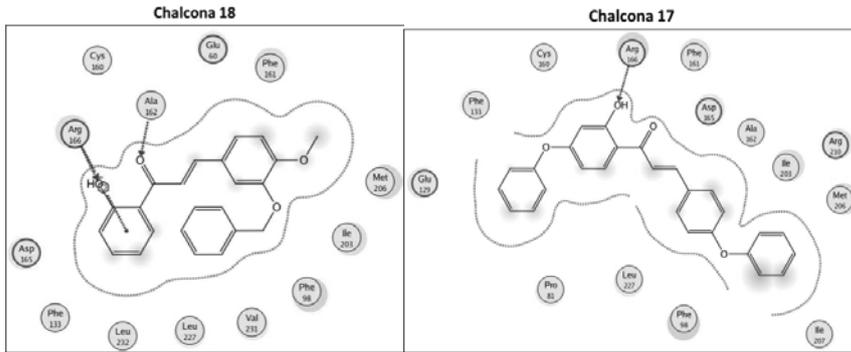
- 69-Noren-Muller, A., Reis-Correia, I. J., Prinz, H., Rosenbaum, C., Saxena, K., Schwalbe, H. J., Vestweber, D., Cagna, G., Schunk, S., Schwarz, O., Schiewe, H. y Waldmann, a. H. Discovery of protein phosphatase inhibitor classes by biology-oriented synthesis. *PNAS***103** 10606–10611 (2006).
- 70-Chiaradia, L. D., Martins, P. G., Cordeiro, M. N., Guido, R. V., Ecco, G., Andricopulo, A. D., Yunes, R. A., Vernal, J., Nunes, R. J. y Terenzi, H. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of chalcone derivatives as potent inhibitors of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatases (PtpA and PtpB). *J Med Chem***55** 390-402 (2012).
- 71-Manger, M., Scheck, M., Prinz, H., Von Kries, J. P., Langer, T., Saxena, K., Schwalbe, H., Fürstner, A., Rademann, J. y Waldmann, H. Discovery of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase A (MptpA) inhibitors based on natural products and a fragment-based approach. *Chembiochem***6** 1749-1753 (2005).
- 72-Rawls, K. A., Therese Lang, P., Takeuchi, J., Imamura, S., Baguley, T. D., Grundner, C., Alber, T. y Ellman, J. A. Fragment-based discovery of selective inhibitors of the Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase PtpA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters***19** 6851-6854 (2009).
- 73-Chandra, K., Dutta, D., Mitra, A., Das, A. K. y Basak, A. Design, synthesis and inhibition activity of a novel cyclic enediyne amino acid conjugates against MPtpA. *Bioorg Med Chem***19** 3274-3279 (2011).
- 74-Chandra, K., Dutta, D., Das, A. K. y Basak, A. Design, synthesis and inhibition activity of novel cyclic peptides against protein tyrosine phosphatase A from Mycobacterium tuberculosis. *bioorganic & Medicinal Chemistry***18** 8365-8373 (2010).
- 75-Chetana, B. P., Mahajan, S. K. y Suvarna, A. K. Chalcone: A versatile Molecule. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research***1** 11-22 (2009).
- 76-Sipos, G. Y. y Sirokman, F. Chalcon Formation of Different Substituted Acetophenones and p-Hydroxy-benzaldehyde. *Nature***202** 489-489 (1964).
- 77-Mandel, M. y Higa, A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol***53** 159-162 (1970).
- 78-Purificação, M. (2008) **Identificação de potenciais suvstratos de PtpA, tirosina-fosfatase de Mycobacterium tuberculosis** Maestría en Biotecnología, Universidade Federal de Santa Catarina.

- 79-Labandera, A. (2011) **Estudio de las únicas foafatasas de proteínas en tirosina de *Mycobacterium tuberculosis* PtpA y PtpB: sansibilidad de PtpB frente a diferentes agentes oxidantes y caracterización de la interacción entre el mutante ptpA D126A con extractos proteicos de macrófagos** Tesis de Grado, Universidad de la República
- 80-Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature***227** 680-685 (1970).
- 81-Olson, B. J. y Markwell, J.(2007) **Assays for Determination of Protein Concentration**. En *Current Protocols in Protein Science* 3.4.1-3.4.29.
- 82-Simões, C. M. O.(1999) **Flavonóides**. En *Farmacognosia : da planta ao medicamento* (Editora da Universidade) Florianópolis, SC [Brazil]; Porto Alegre, RS [Brazil] 507-513.
- 83-Zenteno, E. (2006) **Purificación y análisis de tirosin fosfatasas** Tesis de Grado, Universidad Nacional de Misiones.

ANEXO

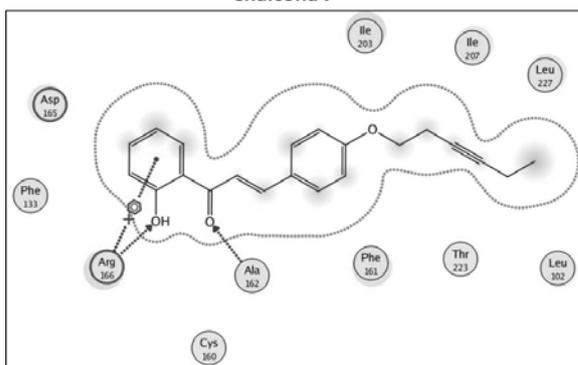
- Estructuras en 2D del Grupo A de chalconas 21, 12, 16, 19, 18, 17, 20, 15, 10, generadas con el programa MOE.



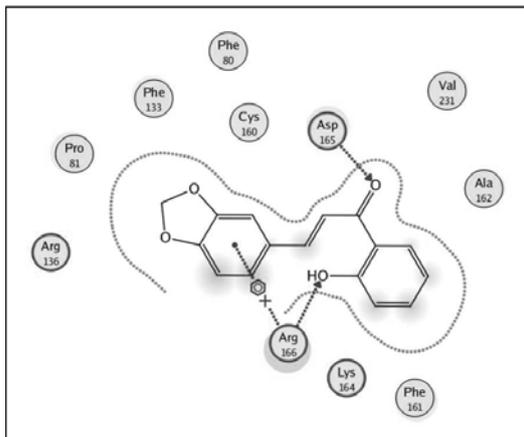


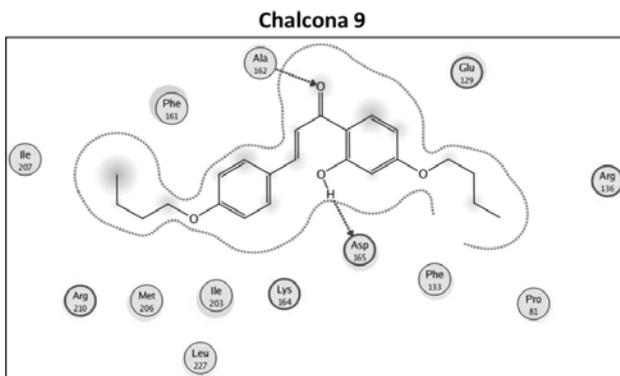
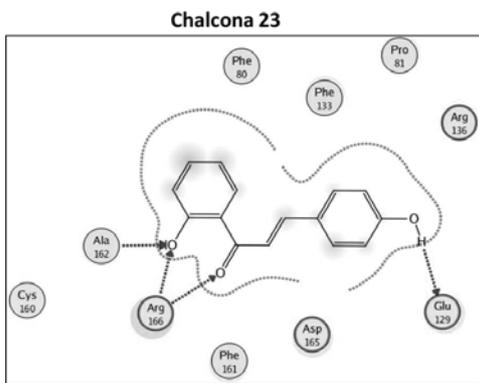
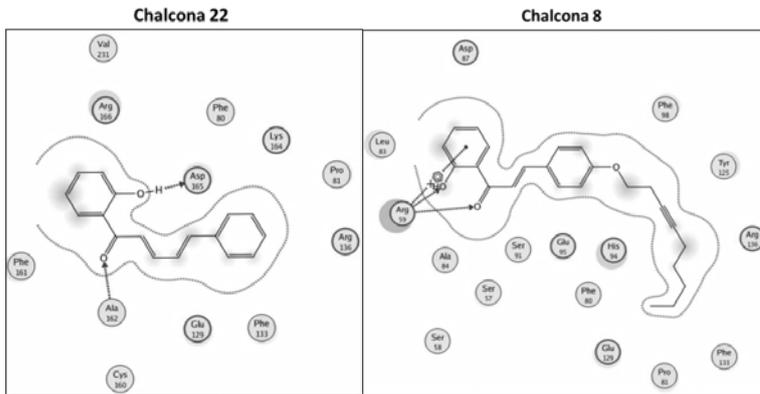
- Estructuras en2Ddel Grupo Bdechalconas6, 7, 22, 8. 23, 9 generadas con el programa MOE

Chalcona 7

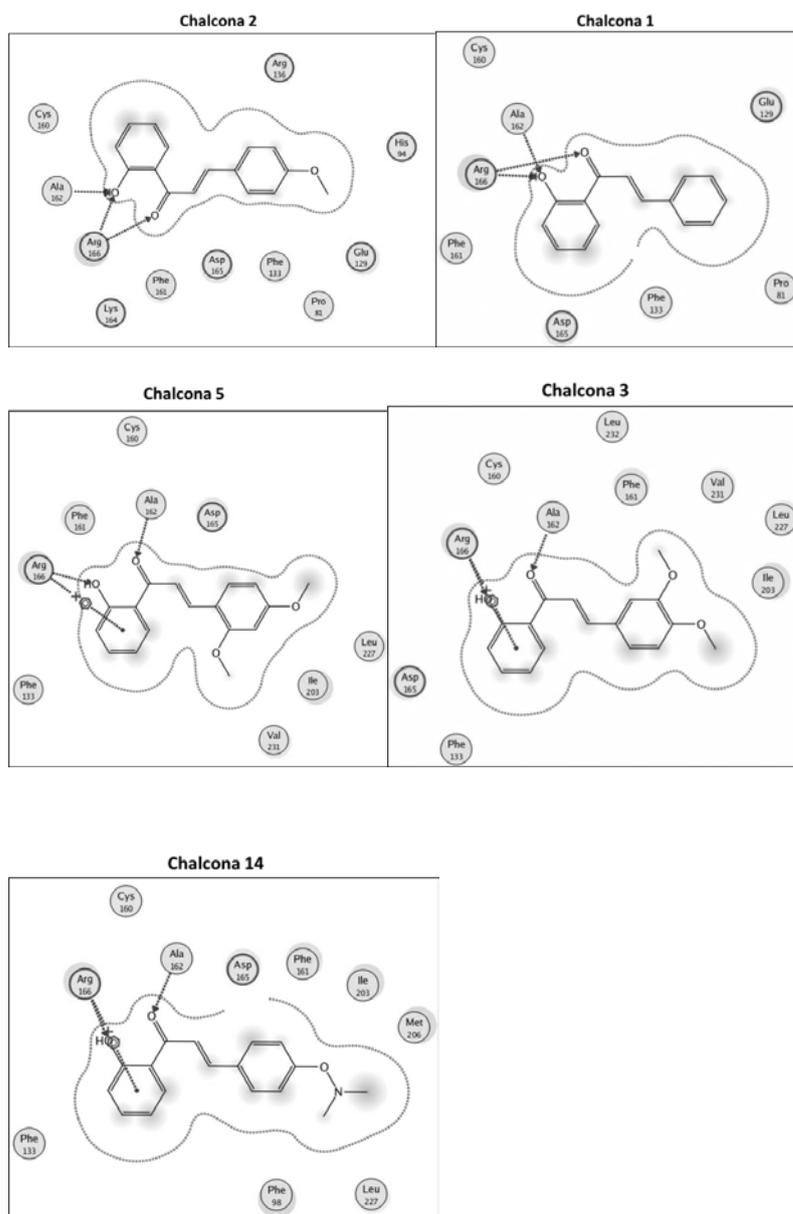


Chalcona 6

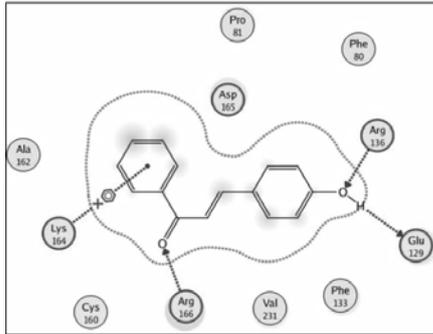




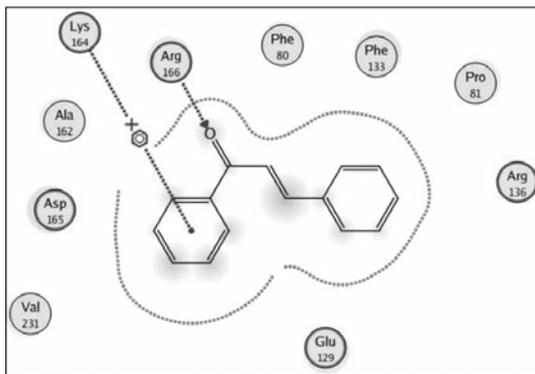
- Estructuras en 2D del Grupo C de chalconas 1, 2, 5, 3, 14, 25, 24 generadas con el programa MOE



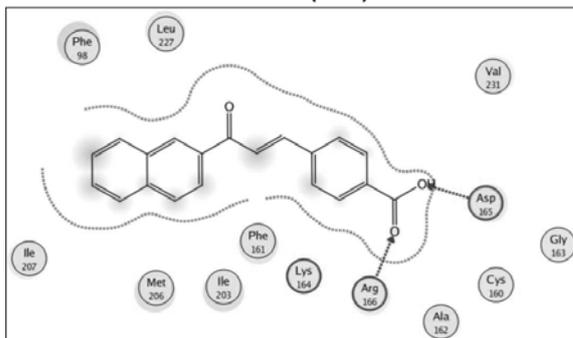
Chalcona 25



Chalcona 24



Chalcona 70 (Brasil)



- **Tabla 4-** Energías de unión de los complejos chalcona-PtpB, obtenidas con el programa Autodock4

	Energía de unión (Kcal/mol)	Actividad remanente de PtpB (%)
chalcona 20	-10.42	93
chalcona 21	-10.42	93
chalcona 12	-10.1	94
chalcona 16	-10.01	90
chalcona 19	-9.59	89
chalcona 18	-9.56	96
chalcona 70,Brasil	-9.5	
chalcona 17	-9.16	89
chalcona 11	-9.15	104
chalcona 15	-9.04	93
chalcona 10	-8.87	90
chalcona 23	-8.61	99
chalcona 13	-8.39	130
chalcona 7	-8.34	95
chalcona 22	-8.23	87
chalcona 1	-7.97	117
chalcona 8	-7.97	97
chalcona 2	-7.92	113
chalcona 5	-7.92	120
chalcona 3	-7.81	108
chalcona 14	-7.8	119
chalcona 25	-7.75	101
chalcona 6	-7.4	96
chalcona 9	-7.37	78
chalcona 24	-6.87	112
chalcona 4	-6.26	102

- Resultados preliminares de la evaluación del efecto en la actividad de PtpA con las 25 chalconas

