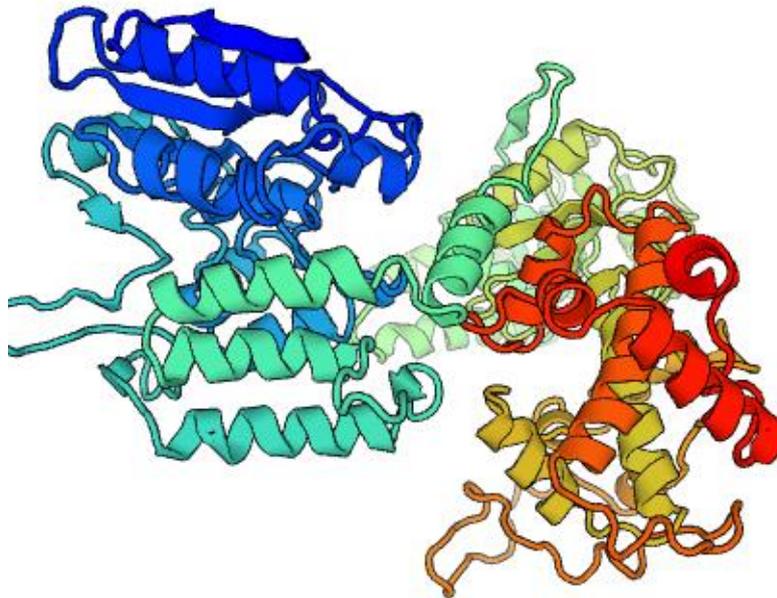


Tesina de Grado Licenciatura en Bioquímica
Bach. Natalia Faguaga

Sub-clonado del gen de la proteína eucariota *ECHA* en un *vector de expresión bacteriano* y aproximación a la metodología de doble híbrido.



Orientadoras: Dra. Andrea Villarino y Dra. Ana Ramón
Sección Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias, Udelar
Montevideo, 2018

A mi hijo Juan Cruz, el motor de mí vida, que llegó para llenarme de luz y enseñarme que con amor y perseverancia todo es posible y a mi abuela Teresa, que siempre tuvo la fe, que a mí me faltó para confiar en que podía lograrlo. Y se que donde esté ella tuvo que ver en esto.

Agradecimientos

En primer lugar agradezco de corazón a las Dras. Andrea Villarino y Ana Ramón por su paciencia y comprensión sabiendo desde el inicio de la pasantía que iba a ser mamá con todo lo que eso implica. Y a todos los compañeros de la 314 por su buena onda y alegría.

A mí madre, mi padre Gustavo y mis hermanos Charles y Camila a quienes amo con el alma, sin ellos, sin los sacrificios pasados y sin su confianza nada de esto sería posible.

A Yaita y el tata Jorge (mis suegros) a quienes adoro y agradezco, que desde el principio han estado al pie del cañón y siempre han creído en mí.

Y por último pero no menos importante, agradezco a la vida, y al universo por poner en mi camino a mi compañero de vida Rodrigo, quien ha sabido soportar y entender mis llantos mis enojos mis frustraciones y miedos sin dejar un día de tener un gesto de amor y ternura conmigo.

Contenido

Abreviaturas.....	- 6 -
1.0 Introducción.....	- 8 -
2.0 Objetivos.....	- 15 -
3.0 Metodología.....	- 16 -
3.1. Sub-clonado de ECHA en un vector de expresión bacteriano.	- 16 -
3.1.1 Metodología de RF-cloning.	- 17 -
3.1.2 Evaluación de la presencia de clones positivos para el gen ECHA.....	- 20 -
3.1.3 Clonado de ECHA mediante enzimas de restricción.....	- 22 -
3.2 Aproximación al ensayo de doble híbrido en levadura.....	- 22 -
3.2.3. Expansión, cuantificación y evaluación de la pureza de los plásmidos de interés.	- 27 -
3.2.1 Preparación de células competentes de levadura.....	- 28 -
3.2.2. Co-transformaciones del ensayo de doble híbrido.....	- 29 -
4.0 Resultados.....	- 31 -
4.1. Dificultades en el sub-clonado del gen ECHA en el vector de expresión bacteriano.....	- 31 -
4.1.1. Sub- clonado mediante RF-cloning.....	- 31 -
4.1.2. Sub-clonado mediante enzimas de restricción.....	- 37 -
4.2 Aproximación al ensayo de doble híbrido en levadura.....	- 40 -
5.0 Discusión.....	- 46 -
ANEXO A.....	- 53 -
Clonado de ECHA y evaluación de clones.....	- 53 -
Transformación de células de <i>E. coli</i>	- 53 -
Lisis alcalina de las colonias transformantes de <i>E. coli</i>	- 53 -
Electroforesis en gel de agarosa 1%.....	- 54 -
Digestiones de los plásmidos.....	- 54 -
Sistema doble híbrido:.....	- 54 -
ANEXO B.....	- 56 -
ANEXO C.....	- 58 -
ANEXO D.....	- 59 -

Resumen

Recientemente la subunidad alfa (ECHA) de la proteína trifuncional (TFP) humana, enzima clave de la oxidación de los ácidos grasos, ha sido reportada por nuestro grupo como un posible sustrato fisiológico de la fosfatasa PtpA de *Mycobacterium tuberculosis*. Se demostró que *in vitro* PtpA es capaz de desfosforilar la ECHA, esta última inmunopurificada a partir de células de macrófago. Sin embargo, las cantidades de ECHA obtenidas mediante inmunopurificación no fueron suficientes para realizar ensayos de actividad fosfatasa en condiciones cinéticas adecuadas y profundizar en los ensayos de interacción proteína-proteína. Por lo tanto el objetivo central de esta tesina ha sido el sub-clonado del gen ECHA en un vector de expresión bacteriano, en primera instancia abordado por el método de RF-cloning y (o) luego por el método clásico basado en el uso de enzimas de restricción. Al aplicar ambas estrategias nos enfrentamos a dificultades que intentamos superar y que si bien no permitieron llegar al sub-clonado planteado, el camino ha sido muy formativo, y el trabajo será continuado por el grupo. Por otro lado, como segundo objetivo se buscó avanzar en el estudio de interacción entre ECHA y PtpA en un contexto celular eucariota, mediante el uso de la estrategia de doble híbrido en levadura. Esta técnica proporciona un método de detección de interacción proteína-proteína basado en la co-transformación con dos plásmidos pSos y pMyr portando el gen de la PtpA y la ECHA, respectivamente. La co-transformación se realiza en una cepa de levadura de *S. cerevisiae* cdc25H que posee una mutación puntual en un gen que le impide crecer a 37°C, no afectando su crecimiento a 25°C. El plásmido pMyr contiene un gen que expresa una pequeña secuencia de miristilación (myr) fusionada a la proteína ECHA, dicha señal permite que la proteína de fusión se ancle a la membrana plasmática. El plásmido pSos contiene el gen de la proteína hSOS fusionado al gen de la fosfatasa PtpA. Si PtpA interacciona con ECHA, hSOS será capaz de llegar a la membrana plasmática, logrando activar la vía de señalización Ras, complementando el defecto de crecimiento de la levadura a 37°C. Los resultados obtenidos permitieron conocer mejor el sistema de doble híbrido, caracterizando mejor el funcionamiento de sus controles positivos y negativos, lo que permitirá su aplicación inmediata para profundizar en el estudio de la interacción entre la ECHA y PtpA.

Abreviaturas

Abs: absorbancia

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

BK: bacilo de Koch

cdc25H: cepa de *Saccharomyces cerevisiae* mutante. Esta cepa contiene una mutación puntual en el aminoácido 1328 del gen cdc25

Col I: fragmento de proteína colagenasa tipo IV de ratón (aminoácidos 148-375)

dNTP: desoxinucleótidos trifosfato

DO: densidad óptica

E. coli: *Escherichia coli*

ECHA (HADHA): subunidad α de la proteína trifuncional humana

ECHB: subunidad β de la proteína trifuncional humana

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

GAL1: promotor inducible por galactosa

GFP: gen de la green fluorescent protein

GSK3 α : Glycogen Synthase Kinase 3, subunit alpha

GTP: Guanosín trifosfato

His: aminoácido Histidina

hs: horas

hSos: proteína Sos humana, factor de intercambio de nucleótido de guanina

IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

Lac: lactosa

LB: Lysogeny broth

LEU2: gen que codifica una de las enzimas necesarios para la síntesis de leucina

M. bovis: *Micobacterium bovis*

MAFB: factor de transcripción humano MAFB

MBP: Maltose Binding Protein

min: minutos

Mtb: *Micobacterium tuberculosis*

OMS: Organización Mundial de la Salud

ON: “over night”

P-ADH1: promotor de expresión constitutiva

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PCR1: primer reacción de PCR del método de RF- clonng

PCR2: segunda reacción de PCR del método de RF-clonng

pMyr: plásmido Myr

pSos: plásmido Sos

PTP: proteína fosfatasa en tirosina

PtpA: Proteína fosfatasa en tirosina A de *Mycobacterium tuberculosis*

S. cerevisiae: Saccharomyces cerevisiae

SB: Sos binding protein, proteína de unión a Sos

SD/Galactosa (-UL): medio mínimo con galactosa-agar sin uracilo y leucina

SD/Glucosa (-UL): medio mínimo con glucosa-agar sin uracilo y leucina

seg: segundo

TA: temperatura ambiente

TB: tuberculosis

TE/LiAc/PEG: Tampón Tris-EDTA con Acetato de litio y polietilenglicol

TFP: proteína trifuncional

Tm: temperatura de fusión del oligonucleótido.

TRIS: tris (hidroximetil) aminometano

Tyr: tirosina

U o URA: uracilo

URA3: gen que codifica una de las enzimas para la síntesis de uracilo

UV: Ultra Violeta

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

YPAD: “Yeast extract-peptone-adenine-dextrose medium”

1.0 Introducción

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), y constituye una de las diez principales causas de mortalidad en el mundo. En 2016, 10,4 millones de personas contrajeron la enfermedad y 1,8 millones murieron, entre ellos 0,4 millones de personas con VIH (siendo la TB la causa principal de muerte en este tipo de pacientes) [OMS, <http://www.who.int/es/>]. *Mtb* se denomina también bacilo de Koch (BK), en honor a quien la descubrió el 24 de marzo de 1882 el Dr. Robert Koch (**Figura 1**).

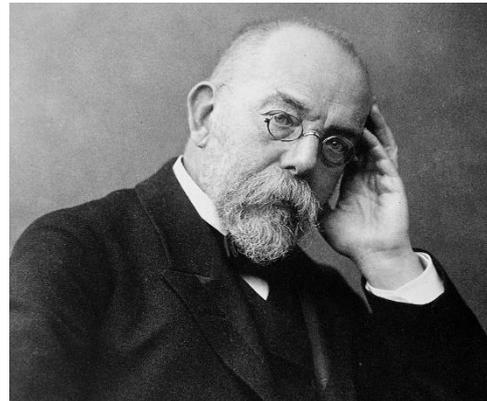


Figura 1. Fotografía del Dr. Robert Koch, médico y microbiólogo alemán, descubridor en 1882 del bacilo responsable de provocar la tuberculosis. Premio nobel en Medicina y Fisiología en 1905 por sus trabajos en tuberculosis. Imagen extraída de https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Robert_Koch.jpg

Mtb es una bacteria que posee una pared celular particular que comparte algunas características presentes en las bacterias Gram positivas, es aerobia estricta, de crecimiento lento, muy resistente a las condiciones de frío, congelación y desecación. Por el contrario, es muy sensible al calor, luz solar y la luz ultravioleta. La pared celular compleja se caracteriza por ser rica en lípidos, con un alto contenido de ácidos micólicos y otros lípidos que por fuera de la capa de peptidoglicano le confiere su capacidad ácido-alcohol resistente característica, observable a través de la tinción Ziehl-Neelsen [Kieser et al. 2014] (técnica de tinción diferencial rápida y económica, usada para la identificación de estas bacterias en muestras de pacientes) [Van Deun et al 2008]. La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que un proceso es tuberculoso cuando se confirma la presencia de *Mtb* en cualquier parte del organismo a través de esta técnica o mediante el cultivo en medios específicos para su detección. El reservorio natural de *Mtb* es el ser humano, tanto el sano infectado como el enfermo. Es un patógeno que puede causar enfermedad en cualquier órgano del cuerpo, siendo lo más frecuente la infección pulmonar. De ahí, por vía sanguínea o linfática, se propaga a otros órganos. Los síntomas apa-

recen cuando las lesiones son ya muy extensas. En estas condiciones, el diagnóstico se establece cuando el padecimiento está muy avanzado [OMS, <http://www.who.int/es/>].

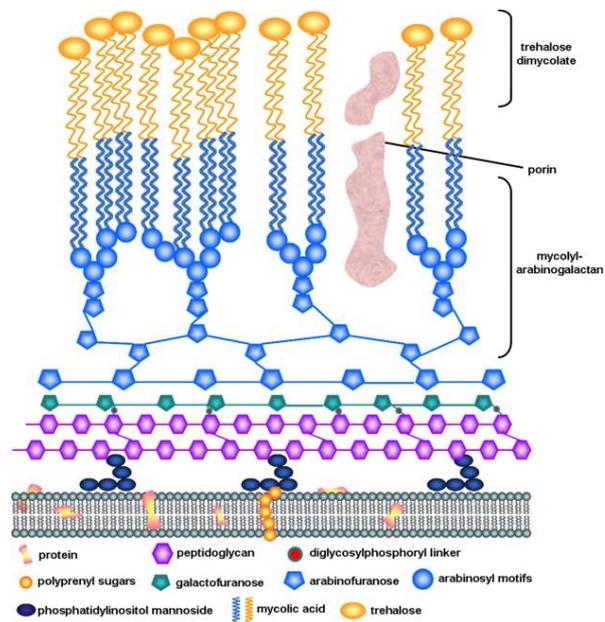


Figura 2. Esquema de la envoltura celular de *Mtb*. Se muestran los componentes clave de la membrana celular *Mtb* y su envoltura cerosa externa. Imagen extraída de McLean K J et al Archives of Biochemistry and Biophysics 464 (2007).

La infección con *Mtb* se transmite de persona a persona a través del aire (**Figura 3**). Cuando un enfermo de tuberculosis pulmonar tose, estornuda o saliva expulsa gotitas que contienen los bacilos y que quedan en suspensión en el aire, basta con que otra persona inhale esas gotitas para quedar infectada, activándose así una infección activa o latente, dependiendo en gran medida del estado de salud de la persona infectada.

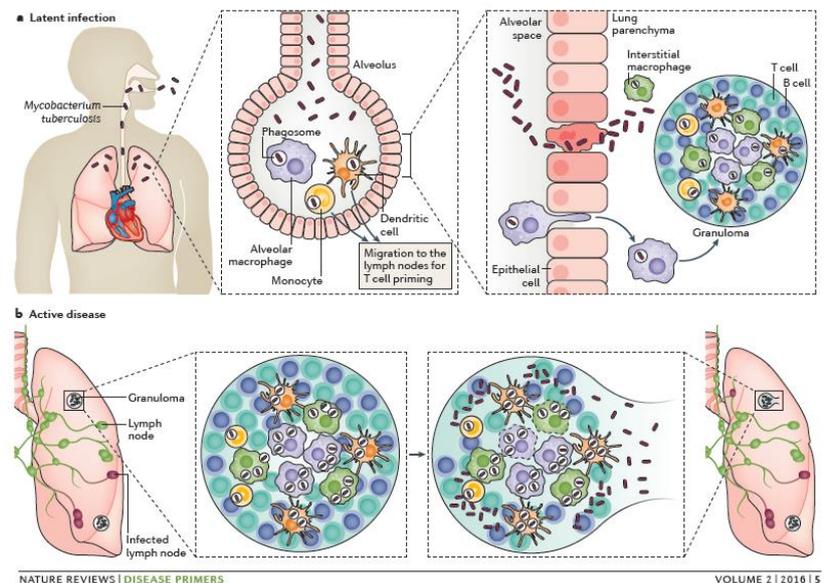


Figura 3: Infección con *Mtb* latente y activa. Imagen extraída Pai et al. Nature Review 2 (2016).

Se calcula que un tercio de la población mundial tiene tuberculosis latente, esto significa que están infectadas pero no han desarrollado ni transmiten la enfermedad. Las personas infectadas con *Mtb* tienen un riesgo de enfermar a lo largo de la vida de un 10%. Este porcentaje aumenta si se trata de personas inmunodeprimidas, por ejemplo las que padecen VIH, desnutrición o diabetes, y los consumidores de tabaco. Los grupos de riesgo son: personas privadas de libertad, personas con VIH positivo y personas que conviven con personas con tuberculosis. En nuestro país desde 1980 hasta mediados de la década del noventa se registró un descenso en el número de casos de TB, luego se estabilizó hasta el año 2011 cuando se comenzó a registrar un marcado aumento en el número de casos. En 2016 se registraron en Uruguay 883 nuevos casos, observándose que el rango etario afectado corresponde principalmente a la población laboralmente activa (entre 25 y 40 años), algo que inquieta a las autoridades de la salud, ya que los afectados no eran necesariamente personas inmunocomprometidas [Global tuberculosis report 2017, OMS].

La OMS se planteó como objetivo para el siglo XXI la erradicación de la TB, sin embargo dos factores han imposibilitado alcanzar este objetivo: por un lado el aumento de casos desde la década de los noventa (hasta volver a ser considerada una pandemia mundial) y la aparición a partir de 2006 de cepas resistentes a varios o todos los fármacos de primera línea empleados hasta el momento (cepas multirresistente o MDR-TB y ultra resistente o XDR-TB) (Las drogas de primera línea actualmente disponibles para el tratamiento antituberculoso son: isoniacida (INH), rifampicina (R/AMP), pirazinamida (PZA), etambutol (EMB) y estreptomina (SM). Son las drogas más efectivas, con un perfil de eventos adversos aceptable y relativamente baratas. INH y R/AMP son las más importantes al punto que cuando un paciente enferma con bacilos resistentes a ambas, el hecho se denomina multi-resistencia. Las drogas de segunda línea (etionamida, protionamida, kanamicina, cicloserina, capreomicina, ácido p-aminosalicílico, quinolonas fluoradas (ciprofloxacina, ofloxacina, moxifloxacina) son mucho menos efectivas, con un perfil de seguridad menos favorable y mucho más costosas [OMS, <http://www.who.int/es/>].

En la infección latente por *Mtb*, el organismo controla la enfermedad mediante la activación de una respuesta inmune que desencadena la formación del granuloma. Durante este proceso muchas bacterias mueren y otras logran sobrevivir dentro del granuloma acti-

vando diferentes mecanismo de evasión del sistema inmune del portador. Cuando los macrófagos fagocitan un patógeno (intracelular), el fagosoma se fusiona con el lisosoma, lo que conlleva a la acidificación del fagolisosoma y la destrucción de la bacteria. *Mtb* tiene la habilidad de inhibir esta fusión o la acidificación y esto le permite sobrevivir y replicarse lentamente dentro de los macrófagos [Koul et al 2004] [Russell 2011]. Estudios demuestran que *Mtb* produce entre otros factores, quinasa y fosfatasa que alteran la maduración del fagosoma, entre ellas la fosfatasa en tirosina PtpA estudiada por el grupo en el que se enmarca esta tesina [Scherr et al. 2009].

PtpA no es esencial para el crecimiento *in vitro* de *Mtb*, sin embargo constituye un factor de virulencia esencial, el cual es secretado al citosol del macrófago durante la infección y se ha demostrado es importante para la sobrevivencia de *Mtb* tanto en macrófagos infectados en cultivo como en modelos animales [Bach et al. 2008] [Wang et al. 2015]. Inicialmente se postuló que PtpA se expresaba sólo en micobacterias patógenas con tasa de división lenta, como *Mtb* y *M. bovis* [Cowley et al. 2002]. Sin embargo, recientemente se observó que también la cepa de alta tasa de división *M. smegmatis* expresa PtpA, pero una forma menos activa respecto a la expresada por *Mtb* [Chatterjee et al. 2015]. En cepas como *M. smegmatis* o cepas *Mtb* no virulentas como *Mtb* H37Ra, la fosfatasa PtpA no alcanzaría el citosol del macrófago ya que el sistema sugerido para su secreción, es disfuncional [Jamwal et al. 2013], por lo cual estas cepas no son adecuadas para observar el efecto de PtpA en el citosol del macrófago.

Han sido reportados numerosos sustratos eucariotas para PtpA. El primer sustrato reportado en 2008 es la proteína eucariota Vacuolar Protein sortin 33B (VPS33B), constituyente de un complejo proteico requerido para el tráfico y fusión de las membranas vesiculares de la vía endocítica. PtpA desfosforila a VPS33B e interacciona con la subunidad H de la V-ATPase, lo que evita que se active el proceso normal acidificación del fagosoma así como su fusión al lisosoma [Bach et al 2008]. En el 2014 se reportó un segundo sustrato de PtpA: la proteína “*Glycogen Synthase kinase 3 subunit alpha*” (GSK3 α) una quinasa de serina/treonina. PtpA afecta el patrón de fosforilación de la GSK3 α desfosforilando *in vitro* la Tyr279, esta alteración modificaría la vía apoptótica, favoreciendo la sobrevivencia del patógeno dentro del macrófago [Poirier et al 2014]. En 2015, encontraron que PtpA interacciona de forma no covalente con la ubiquitina a través de un motivo de PtpA nunca antes descrito

(en inglés ubiquitin-interacting motif-like o UIML). Esta interacción incrementa la actividad de PtpA hacia sustratos reportados, como VPS33B, y hacia dos nuevos sustratos, las quinasas eucariotas Jnk y p38. Los autores demuestran que la desfosforilación de Jnk y p38 por PtpA desencadena una reducción de la inducción de citoquinas proinflamatorias como TNF α , IL-1 β , IL-12, y un aumento en la sobrevivencia de la bacteria en células de pulmón de ratones infectados, y también regularía otras moléculas corriente abajo involucradas en la apoptosis, autofagia, respuesta al estrés y proliferación [Wang et al. 2015]. Este mismo grupo demostró recientemente que PtpA es capaz de interactuar con el represor transcripcional TRIM27, a través del dominio E3 ubiquitin-ligasa, disminuyendo así la respuesta inmune mediada por las vías Jnk/p38 y la apoptosis celular [Wang et al. 2015]. También en 2015 estudios realizados en la tesis de doctorado de nuestra compañera Mariana Margenat se lograron identificar cuatro nuevos posibles sustratos eucariotas de PtpA implicados directa o indirectamente con el metabolismo energético y producción de ATP del macrófago [Margenat, M. et al. 2015 y 2016]. Tres de ellos son proteínas sintetizadas en el citosol, posteriormente transportadas y translocadas a la mitocondria: (i) la enzima trifuncional TFP (subunidades alfa ECHA y beta ECHB) clave en la beta-oxidación de ácidos grasos, cuyos productos alimentan directa e indirectamente la cadena respiratoria para la producción de ATP por fosforilación oxidativa [Eaton et al., 2000]; (ii) la subunidad alfa de la ATP sintasa (ATPA) componente clave del dominio catalítico de la ATP sintasa [Beke-Somfai et al., 2013] y (iii) la quinona oxidoreductasa (SQRD) responsable de la oxidación de sulfuro de hidrógeno, capaz de transferir los electrones de dicha oxidación a la cadena respiratoria [Goubern, 2007]. La cuarta es la 6-fosfofructoquinasa (K6PP o PFK) localizada en el citoplasma y que cataliza la conversión irreversible de fructosa 6-fosfato y ATP a fructosa 1,6-bisfosfato y ADP, la etapa de control más importante de la glucólisis en mamíferos [Evans et al. 1981, Luther&Lee 1986, Coelho et al. 2007].

Curiosamente, tres de los cuatro candidatos a sustrato de PtpA identificados por nuestro grupo, TFP (ECHA), ATPA y SQRD dejan de ser detectadas en la mitocondria de macrófagos infectados con la cepa virulenta Mtb H37Rv, pero no en aquellos infectados con la cepa avirulenta MtbH37Ra (cepa que tiene afectado entre otras cosas el sistema de secreción sugerido como responsable de introducir la PtpA en el citosol de la célula eucariota) [Jamwal et al. 2013]. El o los efectores bacterianos responsables de este efecto aún no se han determinado y tampoco se ha profundizado en conocer las consecuencias metabólicas

que causaría la ausencia de estas proteínas vinculadas al metabolismo energético del macrófago.

Estudios muy recientes demuestran que durante la infección por *Mtb* ocurre una transición en el macrófago desde un metabolismo en el cual el ATP es producido fundamentalmente por fosforilación oxidativa hacia un metabolismo en el que los niveles de ATP son mantenidos mediante la activación de la vía glucolítica y el poder reductor es regenerado mediante la conversión de piruvato en lactato, aún en condiciones de aerobiosis (fenómeno descrito como efecto Warburg). Esta hipótesis se ve apoyada por estudios metabólicos realizados en un modelo de infección por *Mtb* en cobayo y ratón que demuestra que en todos los tejidos infectados (granulomatosos o no) hay acumulación de lactato [Shin et al. 2011, Somashekar et al. 2011 y 2012]. Esta transición metabólica que causaría menor actividad mitocondrial podría proteger a la bacteria de especies reactivas de oxígeno y favorecer la acumulación de fuentes de energía celulares como los lípidos, importantes nutrientes para *Mtb* durante la infección [Daniel et al. 2011].

En este contexto, de los candidatos identificados por nuestro grupo el que ha llamado nuestra atención en primer lugar es la subunidad alfa (ECHA) de la proteína humana trifuncional (TFP), enzima clave de la β -oxidación de los ácidos grasos [Margenat et al 2015]. La TFP humana es un octámero de cuatro subunidades alfa (ECHA) y cuatro subunidades beta (ECHB), ambas sintetizadas en el citosol y luego transportadas a la mitocondria, donde catalizan tres de las cuatro reacciones de la β -oxidación de los ácidos grasos, siendo la ECHA responsable de dos de estas reacciones [Eaton et al. 2000]. Podemos suponer que una disminución de ECHA en la mitocondria tendrá consecuencias metabólicas importantes en el metabolismo lipídico y energético del macrófago. Esto sería relevante si consideramos que existen estudios que sugieren que *Mtb* posee la capacidad de sintetizar carbohidratos a partir de ácidos grasos a través de la vía del glioxilato, para su uso como fuente de energía durante su vida intracelular [McKinney, et al. 2000]. Por lo cual, una disminución de ECHA en la mitocondria podría causar, además de una disminución de la síntesis de ATP a partir de esta fuente energética, una reducción de la beta oxidación, dando lugar a la acumulación de lípidos en el citosol del macrófago, disponibles para la bacteria. Nuestro grupo maneja la hipótesis que la localización celular y/o la actividad fisiológica de la ECHA pueda estar modificada debido a la desfosforilación por la PtpA. En la literatura no existen aún reportes sobre la regulación de la TFP por fosforilación/desfosforilación. Sin embargo, este podría ser

un mecanismo ya que la ECHA posee diez residuos de Tyr fosforiladas a lo largo de su secuencia, reportadas hasta ahora en la base de datos experimental PhosphositePlus [Hornbeck et al 2014]. Además, en la secuencia de ECHA el péptido señal de translocación a la mitocondria posee una tirosina, pero ésta aún no ha sido reportada como fosforilada (ver **tabla 1**).

Tabla1: Tirosinas reportadas de la secuencia de ECHA humana fosforiladas y sin fosforilar.

Nombre	Péptido señal*	Tyr en péptido señal	Tyr en sec completa	Tyr fosforiladas**
Trifunctional enzyme subunit alfa	MVACRAIGILSRFSAFRILRSR GYICRNFTGSSALL	Y 24	Y24, Y43, Y158, Y239, Y271, Y283, Y298, Y320, Y343, Y435, Y499, Y546, Y637, Y639, Y724, Y736, Y740, Y762	Y239, Y283, Y298, Y343, Y435, Y499, Y546, Y637, Y639, Y724

*Extraído de la fuente online UniProt (The UniProt Consortium 2013). ** Información de Phosphosite [<https://www.phosphosite.org>].

Además de la identificación de ECHA como potencial sustrato fisiológico de PtpA, nuestro grupo demostró *in vitro* que la TFP, inmuno purificada a partir de extractos de macrófagos humanos, interacciona con la PtpA con una constante de afinidad de 5 μ M (evaluado por resonancia plasmónica de superficie o SPR), y que dicha interacción involucra el sitio activo de la fosfatasa [Margenat et al 2016]. Además se demostró que *in vitro* la PtpA es capaz de dosfosforilar la ECHA inmunopurificada [Czikora et al 2011] y actualmente estamos avanzando en modelos *in silico* de interacción entre la TFP y la PtpA, que sugieren a la Tyr271 como la candidata a ser desfosforilada por PtpA (colaboración en curso con el Dr. F. Herrera de la Universidad de Santa Fé, Argentina). Sin embargo, las cantidades obtenidas mediante inmunopurificación son muy bajas como para realizar ensayos de actividad fosfatasa en condiciones cinéticas adecuadas (concentraciones de sustrato elevadas respecto a la concentración de enzima) y profundizar en los ensayos de interacción. Por lo tanto el objetivo central de esta tesina será el clonado del gen ECHA en un vector de expresión bacteriano.

Por otro lado, la interacción en un modelo celular eucariota entre la PtpA y la ECHA humana fue puesto a punto por nuestra compañera Lic. Vivian Irving en su tesina de graduación [Irving et al 2016] utilizando el método de doble híbrido en levadura [CytoTrap Vector Kit (Stratagen, #217438). En la misma, V. Irving reporta la dificultad en la obtención de los resultados esperados con varios de los controles del ensayo, además de la necesidad de aumentar las réplicas del mismo para lograr un resultado estadísticamente significativo, que

ponga en evidencia si existe o no interacción entre PtpA y ECHA en un contexto celular. Con este fin, se realizará en el marco de esta tesina, una expansión y verificación de los plásmidos utilizados en el ensayo y una evaluación de las co-transformaciones, con el objetivo de obtener en futuro resultados más fiables.

2.0 Objetivo general:

Caracterizar las interacciones de PtpA con uno de sus potenciales sustratos.

Objetivos específicos.

Teniendo en cuenta los antecedentes descritos, en esta tesis nos planteamos los siguientes objetivos

1. Clonar el gen ECHA humana en el vector de expresión bacteriano pT7-MBP-GFP.
2. Profundizar en el estudio de la interacción proteína-proteína PtpA-ECHA mediante la estrategia de doble híbrido.

3.0 Metodología

A continuación se describen las metodologías utilizadas, la preparación de las soluciones se describen en el Anexo A.

3.1. Sub-clonado de ECHA en un vector de expresión bacteriano.

En este trabajo se buscó clonar el gen ECHA en un vector de expresión derivado de pT7, cedido por Agustín Correa del Instituto Pasteur de Montevideo, descrito en la literatura [Correa et al. 2014]. Este tipo de vector fue generado a partir de pET32 plásmido que posee el promotor de la ARN polimerasa del fago T7. Dada la gran selectividad de esta enzima por su promotor, sumado a su elevado nivel de actividad, con este sistema se puede obtener niveles de proteínas recombinantes cercanos al 50% de la proteína total de la célula [Segovia et al. 2014]. El vector utilizado posee determinadas características, entre las que destacamos: (i) confiere resistencia a ampicilina, (ii) agrega a la proteína clonada una cola de histidina (His-Tag) en N-terminal que puede ser utilizada para purificar la proteína de interés por cromatografía de afinidad y facilitar su reconocimiento mediante el uso de anticuerpos anti-poli-His), (iii) permite fusionar la proteína de interés a diferentes proteínas de fusión que pueden mejorar la solubilidad de la proteína de interés como la MBP “Maltose Binding Protein”, utilizada en este trabajo), (iv) además en el sitio dónde se introducirá el gen a clonar el vector cuenta con el gen de la proteína verde fluorescente (GFP), lo que es de esperar pueda facilitar la evaluación de la presencia de clones positivos ya que si el clonado es exitoso el gen de la GFP se pierde.

Se utilizó como primera estrategia de clonado, la metodología de RF cloning [Bond et al. 2012], recomendada para este tipo de vectores. Sin embargo, cada uno de los cebadores utilizados incluyen el agregado de un sitio de restricción para la enzima BamHI, lo que permitió también la utilización de la metodología clásica de clonado mediante el uso de enzimas de restricción.

3.1.1 Metodología de RF-cloning.

El método de RF-cloning (“Restriction Free cloning”) [Bond et al. 2012] es una técnica que permite la inserción de una secuencia de interés dentro de cualquier plásmido mediante PCR sin la necesidad de utilizar enzimas de restricción. La técnica se inicia con el diseño de un par de cebadores de mayor tamaño de los utilizados en una PCR clásica. Cada uno de ellos cuenta con una región de la secuencia complementaria para los extremos del gen de interés (en nuestro caso del gen ECHA), y otra complementaria al sitio de clonado del vector de destino (en nuestro caso el plásmido pT7). Dichos cebadores se utilizan en una primera PCR (PCR1) utilizando como molde el ADN que contiene el gen de interés (el plásmido pMyr-ECHA disponible en nuestro laboratorio). El producto de este PCR constituye un mega-cebador que contiene al gen de interés flanqueado de regiones complementarias al vector de clonado. Este mega-cebador se utiliza en una segunda PCR (PCR2) utilizando como molde el vector de clonado pT7-Histag-GFP en un primer ensayo y luego pT7-MBP-GFP. En este paso, cada hebra de los cebadores se hibrida con el vector de destino en la posición prediseñada, y es extendido en una reacción de amplificación lineal. Las dos nuevas hebras de ADN forman un plásmido doble hebra con una mella. ADN parental es removido con la endonucleasa DpnI, y el plásmido sintetizado es transformado en células *E. coli* competentes [Unger et al. 2010] (**Figura 4**). A continuación se detalla el diseño de los cebadores y las condiciones del PCR1 y PCR2.

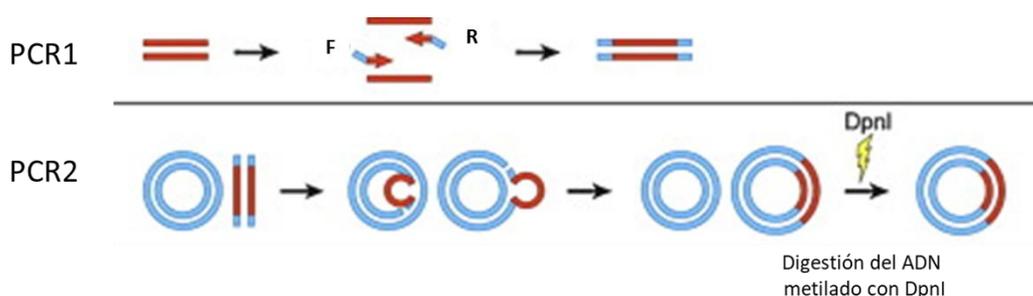


Figura 4. Esquema mostrando las etapas de clonado mediante la estrategia de RF-cloning.

3.1.1.1 Diseño de los cebadores y condiciones del PCR1 y PCR2

Para el diseño de los cebadores se necesitó contar con la secuencia del gen de la proteína ECHA (obtenida por la Lic. Vivian Irving [Irving et al. 2016], Anexo B) y la secuencia del vector pT7-MBP-GFP (secuencia parcial disponible en el artículo de Correa et al 2014). Se diseñaron cebadores que permitan el clonado del gen ECHA completa, incluyendo el péptido señal de transporte del citosol a la mitocondria, o sin dicho péptido. Los mismos fueron verificados utilizando el programa RF-cloning (www.rf-cloning.org) el cual si es necesario permite modificarlos de manera de obtener pares de cebadores con Tm similares, teniendo en cuenta si se trata del PCR1 (donde una región del cebador se apareará con la región complementaria al gen ECHA) o del PCR2 (donde la otra parte del cebador se apareará con la región complementaria al vector de clonado). Una vez diseñados se obtuvieron comercialmente en Macrogen. Una vez recibidos se preparó un stock 100 μM suspendiendo los mismos en un volumen adecuado de agua MilliQ filtrada por 0,2 μm . A continuación se preparó una dilución de trabajo 10 μM .

La reacción de PCR1 se realizó con la ADN polimerasa de alta fidelidad *Phusion* de *Thermo Scientific* (F-530S), en un volumen final de 50 μL , conteniendo 10 μL de 5x *Phusion HF Buffer*, 1 μL de dNTPs (mix 50X 10mM de cada uno, Invitrogen), 2,5 μL de cada cebador (10 μM), 1 μL de ADN polimerasa (2U/ μL), 50 ng de ADN molde y agua MilliQ hasta completar el volumen de reacción. Se utilizó el siguiente programa de ciclado: desnaturalización inicial a 98°C 2min, seguida de 35 ciclos de repetición de desnaturalización a 98°C durante 30seg, hibridación de los cebadores a 65°C durante 30seg, extensión a 72 °C durante 1min 20seg, y finalmente una extensión a 72°C durante 10min. Se evaluó la obtención del producto obtenido por electroforesis en gel de agarosa 1%, se prepararon las muestras utilizando 1 μl de cada una de ellas, diluyéndolas a 1x en buffer de carga (Thermo Scientific 6X DNA Loading Dye). Se sembró también 6 μL de un marcador de pares de bases (pb) de ADN de 1Kb (Thermo Scientific GeneRuler, #SM0311). La separación se realizó en tampón TAE 1x a 80V por aproximadamente 30min. Para detectar la presencia de ácidos nucleicos, culminada la corrida electroforética se agregó 2 μL del agente intercalante del ADN Good View (SBS Gene-*tech*) a 50ml de TAE 1x y se incubó el gel en dicha mezcla durante 15min a TA. Pasado este tiempo se realizó un lavado con agua miliRho, se escurrió el gel y se colocó en un transilu-

minador-UV que permite detectar este agente intercalante unido al ADN, las imágenes se adquirieron y registraron utilizando la cámara fotográfica Gel Logic 112 y el programa Carestream MI.

En caso de obtener el producto esperado, se purificó el ADN mediante extracción a partir del gel utilizando un kit comercial (Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit) siguiendo el protocolo del fabricante. Posteriormente se cuantificó el ADN obtenido midiendo la Abs_{260nm} con un espectrofotómetro de micro volúmenes (NanoDrop Lite de *Thermo Scientific*). El grado de pureza de las preparaciones se evaluó determinando el coeficiente de absorbancias: Abs_{260nm}/Abs_{280nm} (teniendo en cuenta que una pureza de ADN aceptable corresponde a valores entre 1.8 y 2).

En la PCR2, la mezcla de reacción se realizó de la misma manera que para la PCR1 pero esta vez se utilizó como megacebador el producto purificado de la PCR1 (120 ng totales) y como molde 30 ng del vector de clonado pT7. En este caso se utilizó el siguiente programa de ciclado: desnaturalización inicial a 98°C 1min, seguida de 20 ciclos de repetición de desnaturalización a 98°C durante 10seg, hibridación de los cebadores a 60°C durante 1min, extensión a 72 °C durante 10min, y finalmente una extensión a 72°C durante 10min. En este primer ensayo de RF-cloning se utilizó como temperatura de hibridación la recomendada en el artículo donde se describe el vector que utilizamos para el clonado [Correa et al. 2014]. Finalmente, para digerir el ADN metilado, correspondiente al molde utilizado en la PCR2, se trató el producto obtenido con 0,3U de DpnI (Thermo Scientific, #ER1701) por μ l de producto de PCR, incubando la reacción a 37°C ON, tal como recomienda el fabricante. Posteriormente se inactivó la enzima a 80°C por 20min y se almacenó la digestión a -20°C hasta proceder a la transformación. Para la transformación se utilizó el protocolo descrito a continuación, sembrando la transformación en placas de LB-agar conteniendo ampicilina (100 μ g/mL). En un segundo ensayo de RF-cloning se disminuyó la temperatura de hibridación de los cebadores de la PCR2 a 50°C (temperatura de hibridación entre 5-10 grados por debajo de la T_m de los cebadores) y se aumentó las unidades de DpnI a 2U por μ l de producto de PCR, tal como lo recomienda la literatura [Bond et al. 2012] y [Correa et al. 2014].

3.1.1.2 Transformación de células quimiocompetentes de E.coli DH5 α

La transformación se realizó por shock térmico [Sambrook et al. 2011] de bacterias *E. coli* DH5- α quimio competentes obtenidas por el método de Inoue [Inoue et al 1990]. Se tomaron las alícuotas necesarias de células quimiocompetentes almacenadas a -80°C y se colocaron en un baño de hielo durante 10min. Luego para cada transformación se mezcló 50 μ L de células quimiocompetentes con 50 ng de ADN (en un volumen máximo de 5 μ L) en un tubo eppendorf de 1.5mL mantenido en hielo. Se incubaron en hielo durante 20min, y luego se realizó un shock térmico a 42°C durante 90seg, seguido de una incubación en hielo durante 90seg. Transcurrido este tiempo se agregó a cada tubo de transformación 500 μ L de medio LB estéril y se incubaron a 37°C con agitación suave durante 1 hora. Finalizado este tiempo, se sembró en LB agar conteniendo el antibiótico adecuado para cada caso. Para esto se concentró por centrifugación a 6000rpm durante 2min, se descartó unos 300 μ L del sobrenadante y se sembró el resto del material. Las placas se incubaron a 37°C ON.

3.1.2 Evaluación de la presencia de clones positivos para el gen ECHA.

3.1.2.1 Evaluación mediante PCR en colonia

Se realizó PCR en colonia en aquellas colonias obtenidas en las placas de la transformación. Para ello se suspendieron los clones seleccionados de las placas de transformación en 10 μ l de agua MilliQ (en algunos casos se seleccionó una colonia y en otros hasta cinco). Se utilizó la DNA polimerasa Toptaq (Qiagen 1.25 U/reacción), en un volumen final de 50 μ L, conteniendo 5 μ L de 10x Toptaq PCR buffer, 1 μ L de dNTPs (mix 50X 10mM de cada uno, Invitrogen), 2.5 μ L de los cebadores utilizados en el PCR1 del RF-cloning (10 μ M), y 1 μ l del clon suspendido y agua MilliQ hasta completar el volumen de reacción. Se utilizaron las mismas condiciones que en el PCR1 de RF-cloning excepto que el tiempo de extensión en este caso fue de 3min, debido a que para la polimerasa utilizada se recomienda 1min/kb de ADN (gen ECHA = 2.3kb). En el control positivo se utilizó como molde el plásmido conteniendo el gen de interés ECHA (pMyr-ECHA) y en el control negativo no se agregó ADN molde. Se evaluó la obtención del producto deseado (2.3kb) analizando las muestras por electroforesis en gel de

agarosa 1% y comparando las bandas obtenidas con el marcador de pares de bases (Thermo Scientific GeneRuler, #SM0311).

3.1.2.2 Evaluación mediante liberación del inserto por digestión con BamHI

Previamente en los clones seleccionados de las transformaciones de interés se realizó una purificación del ADN plasmídico, siguiendo el método de lisis alcalina [Sambrook et al. 2011]. Para ello se inoculó cada colonia en 3mL de LB/amp, dejando crecer estos preclivados a 37°C ON bajo agitación de 200 rpm. Luego de recuperaron todas las células en un único tubo eppendorf de 1.5mL mediante centrifugación a 12.000rpm y TA. Se eliminó el sobrenadante y se suspendió el pellet en 200µL de la solución I conteniendo 5µL de ARNasa stock (10mg/mL), luego se agregó 200µL de la solución II (preparada en el momento). Se mezcló por inversión suavemente e incubó a TA durante 5min, luego se agregó 200µL de la solución III fría (en este paso se debe observar una precipitación blancuzca). Se mezcló por inversión y se incubó en hielo por 5min, se centrifugó a 12000 rpm durante 20min, se recuperó el sobrenadante (donde se encuentra presente el ADN plasmídico) y se transfirió a un nuevo tubo eppendorf. Se le agregó 0.6 volúmenes de isopropanol 100% (concentra el ADN plasmídico por precipitación) incubando 15min en hielo, luego se centrifugó a 12000 rpm a 4°C durante 20min, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1ml de etanol 70% frío. Se centrifugó a la misma velocidad pero durante 5min a TA, se descartó el sobrenadante y se secó el pellet en lámpara. Por último se suspendió el pellet en 50µL de agua MilliQ. Para la cuantificación del ADN obtenido, se midió la absorbancia a 260nm como se mencionó anteriormente. Las muestras cuantificadas se conservan a -20°C hasta su utilización en la digestión con BamHI. Para evaluar la presencia de inserto se realizó la digestión con BamHI (Thermo Cientific #ER0051). Se mezcló 16µL de agua MilliQ, 2µL de buffer 10X BamHI, 0,5µL de enzima BamHI 10U/µL, y en cada caso se agregó 200ng de cada plásmido. La reacción se llevó a cabo a 37°C ON. Para verificar la liberación del inserto de interés las muestras de ADN digeridas se separaron y evaluaron por electroforesis en gel de agarosa 1%.

3.1.3 Clonado de ECHA mediante enzimas de restricción

Para el clonado del gen de ECHA mediante el uso de enzimas de restricción se utilizó la misma enzima BamHI descrita en el punto anterior, siguiendo el mismo protocolo. En este caso se digirió 1 µg del producto del PCR1 obtenido en el desarrollo de la metodología de RF-cloning, el cual contiene el gen ECHA y una secuencia en cada extremo que cuenta un sitio de corte para BamHI. Se digirió también el vector de destino (T7-MBP-GFP y T7-MBP-WAP). El vector T7-MBP-WAP porta en el sitio BamHI de la secuencia de policlonado el gen de esturión WAP (cedido por nuestro compañero Lic. Mauricio Castellano). Para verificar el resultado de la digestión las muestras se separaron mediante electroforesis en agarosa 1%, se analizó el tamaño de los fragmentos obtenidos. El ADN digerido y contenido en las bandas del gel se purificaron siguiendo el protocolo del kit de purificación de ADN a partir del gel (Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction, #K0832). Los vectores digeridos se trataron con la fosfatasa FastAP (thermosensitive alkaline phosphatase, Thermo Scientific #EF0651). Esta fosfatasa cataliza la liberación de grupos fosfato 5' y 3' del ADN del vector, evitando que este se cierre nuevamente. Una vez obtenidos el gen y el vector se realizó la ligación incubando con la enzima T4 DNA ligasa (5U/µL, Thermo Scientific). Se mezcló en los diferentes ensayos unos 12-17 ng de vector con 20-100 ng de inserto, 2µl de Buffer 10X T4 DNA, 1U de T4 DNA ligasa y agua MilliQ hasta completar los 20µl. La reacción se incubó 15min a TA u ON a 4°C. Luego se transformó células de *E. coli* DH5α quimiocompetentes siguiendo protocolo descrito en el punto 3.1.1.2

3.2 Aproximación al ensayo de doble híbrido en levadura

Se utilizó el método de doble híbrido comercial Cytotrap Vector. Éste es un método de detección de interacción proteína-proteína *in vivo*, que consiste en la co-transformación con dos plásmidos pSos y pMyr conteniendo los diferentes genes de interés. El método fue puesto en marcha en el laboratorio por la Lic. Vivian Irving, quien realizó el clonado de los genes de la fosfatasa PtpA de *Mtb* y la ECHA humana, en los respectivos vectores, verificando la ausencia de mutaciones mediante secuenciación (Macrogen) [Irving et al 2016]. El gen que codifica PtpA de *Mtb* se clonó en el vector pSos lo que permite generar una proteína de

fusión hSOS-PtpA, y el gen que codifica para ECHA se clonó en el vector pMyr, lo que permite generar la proteína ECHA fusionada a una secuencia de miristilación que le permite su anclado a la membrana plasmática. En el ensayo de interés, estas proteínas se co-expresan en una cepa de levadura *cdc25H* y se incuban a la temperatura restrictiva de 37°C. Si las proteínas clonadas (PtpA y ECHA) interactúan físicamente, la proteína hSOS se acerca a la membrana, activando de este modo la vía de señalización de Ras, permitiendo que la cepa de levadura *cdc25H* crezca a 37°C. De hecho, la cepa de levadura *cdc25H* posee una mutación puntual en el aminoácido 1328 del gen *cdc25* que no afecta su crecimiento a 25°C pero le impide crecer a 37°C. Este gen es homólogo al gen *Sos* humano (hSOS) que codifica para un factor de intercambio de nucleótido de guanina que une y activa la GTPasa Ras, favoreciendo la unión de GTP. Ras es una proteína que actúa a nivel de la membrana plasmática como interruptor-regulador molecular muy importante en una gran variedad de rutas de transmisión de señales celulares que permiten entre otras el crecimiento a 37°C. Este sistema de doble híbrido se basa entonces en la habilidad que tiene la proteína hSOS, codificada por *pSos*, de complementar el defecto de la cepa de levadura *cdc25* y activar la vía de señalización Ras. De esta forma, si existe interacción entre la fosfatasa PtpA y la proteína humana ECHA, la proteína hSOS será localizada en la membrana haciendo posible la activación de la vía de señalización Ras, permitiendo que la cepa de *S. cerevisiae cdc25H* crezca a 37°C ver esquema de **Figura 5**.

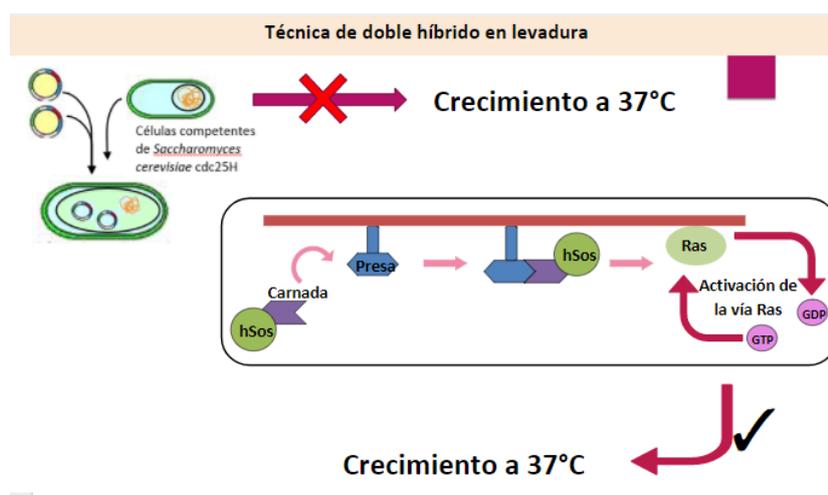


Figura 5 Técnica de doble híbrido se observa lo que ocurre cuando luego de una co-transformación con plásmidos cuyos proteínas presa y carnada interaccionan entre sí hSOS es reclutada en la membrana activando así la vía de señalización Ras, haciendo posible el crecimiento de la levadura a la temperatura restrictiva 37°C.

En la **Figura 6** se observan las características que poseen los vectores pSos y pMyr. Como se puede observar también tienen genes de selección útiles durante las transformaciones de la cepa de *S. cerevisiae* cdc25H. Los plásmidos pSos, portan como marcador de selección el gen *LEU2* (que codifica uno de los genes necesarios para la síntesis de leucina) lo que permite seleccionar a los transformantes en medios carentes de leucina. Los plásmidos pMyr, portan como marcador de selección el gen *URA3* (que codifica uno de los genes para la síntesis de uracilo) lo que permite seleccionar a los transformantes en medios carentes de uracilo. También contienen genes de resistencia a antibióticos que permiten la selección de los transformantes en *E. coli* durante la construcción de los plásmidos. Los plásmidos pSos, portan un gen de resistencia a ampicilina (Amp); y los plásmidos pMyr, portan un gen de resistencia a cloranfenicol (Clor).

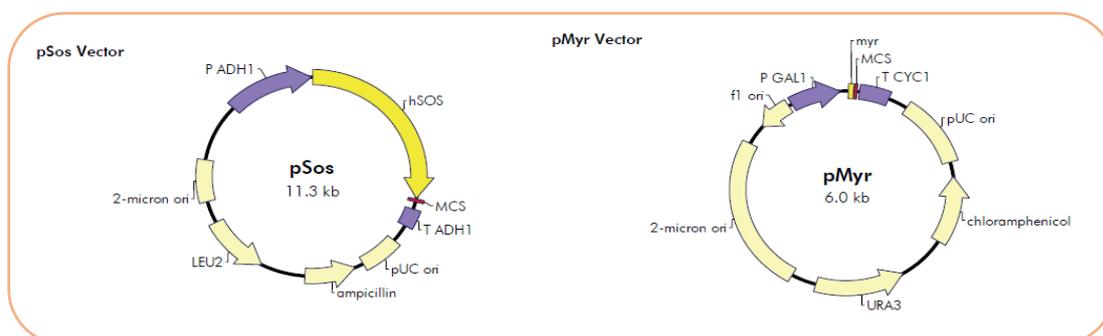


Figura 6. Esquema de los vectores pSos y pMyr utilizados en el sistema CytoTrap Vector. pSos posee un gen de resistencia a ampicilina, y como marcador de selección en levadura el gen *LEU2* que codifica un gen implicado en la síntesis de leucina. *hSOS* es un gen homólogo al gen *Sos* humano (*hSOS*) que codifica para un factor de intercambio de nucleótido de guanina que une y activa la GTPasa Ras, favoreciendo la unión de GTP. pMyr posee un gen de resistencia a cloranfenicol, y como marcador de selección en levadura, el gen *URA3* que codifica la síntesis de uracilo. *myr* es un gen que expresa una pequeña secuencia de miristilación. Esquemas extraído del manual Cytotrap kit vector.

El sistema CytoTrap Vector cuenta también con 5 plásmidos pSos Col I, pMyr Lamin C, pSos MAFB, pMyr MAFB, pMyr SB utilizados en los controles negativos y positivos representados en la **Figura 7**. El plásmido pSos Col I (pSos Collagenasa) expresa la proteína hSOS fusionada a un fragmento de una collagenasa tipo IV de ratón (aminoácidos 148-375). El plásmido pMyr Lamin C expresa la señal de miristilación fusionada a un fragmento de la pro-

teína Lamin C humana (aminoácidos 67-230), pSos MAFB expresa la proteína Sos fusionada al factor de transcripción humano MAFB (MAFB-HUMAN), pMyr MAFB expresa la señal de miristilación fusionada a la misma proteína MAFB descrita anteriormente, pMyr SB expresa la señal de miristilación fusionada a una proteína de unión a Sos denominada SB.

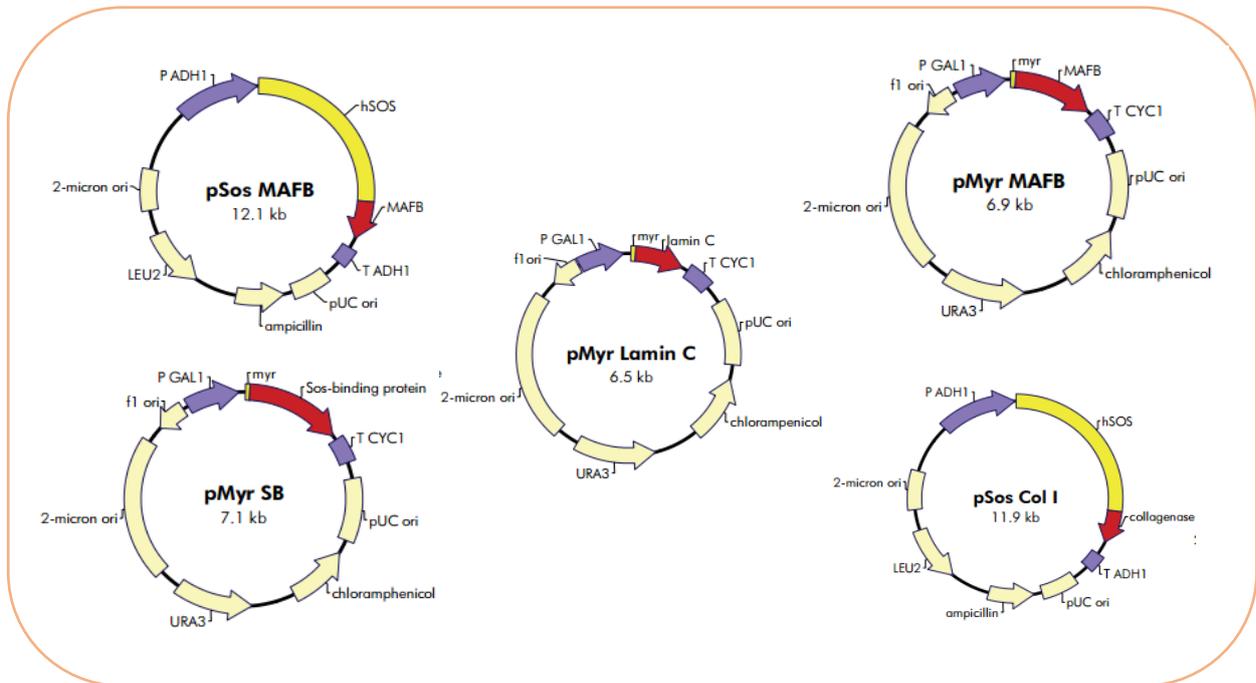


Figura 7: Plásmidos provistos por el Kit utilizados para los controles positivos y negativos del ensayo de doble híbrido en la co-transformación de levadura *S. cerevisiae* cdc25H. Cada plásmido cuenta con un promotor para la expresión del gen codificante para la proteína fusionada, secuencias necesarias para la replicación del plásmido, un gen como marcador de selección y un gen que le confiere resistencia a un antibiótico.

Con los plásmidos antes descritos, se realizan las siguientes cotransformaciones: T1: pSos + pMyr para realizar el cálculo de la eficiencia de la transformación; T2: pSos-MAFB + pMyr MAFB control positivo ya que MAFB-MAFB interactúan entre sí *in vivo*; T3: pSos-MAFB + pMyr-laminC control negativo dado que MAFB y laminC no interactúan entre si *in vivo*; T4: pSos-Coll + pMyr-MAFB control negativo dado que Coll y MAFB no interactúan ente si *in vivo*; T5: pSos-MAFB + pMyr-SB control positivo ya que MAFB-SB interactúan entre sí *in vivo*; T6: pSos-PtpA + pMyr-laminC, control negativo que verifica la ausencia de interacción entre PtpA y la señal de miristilación; T7: pSos-PtpA + pMyr-SB control positivo con crecimiento a 37º C, control verifica la correcta ubicación de PtpA en el citosol que permite la interacción de hSOS con SB; T8 pSos-PtpA + pMyr-ECHA ensayo de interés , para evaluar la

interacción en un contexto celular entre PtpA de *Mtb* y ECHA; T9: pSos-PtpA + pMyr control negativo que demuestra la ausencia de interacción inespecífica entre PtpA y la señal de mi-ristilación; y por último T10: pSos + pMyr-ECHA control negativo que demuestra la ausencia de interacción inespecífica entre hSOS y ECHA. Estos últimos 2 controles no han sido evaluados aún por nuestro grupo. En la **tabla 2** se detallan las co-transformaciones de los controles y el rol de cada una.

Tabla 2: Co-transformaciones del ensayo de doble híbrido. En cada una de ellas se puede observar los diferentes plásmidos utilizados y su función en el ensayo.

Co-transformaciones		Función
T1	pSos + pMyr	Control para el calcular eficiencia de la transformación
T2	pSos-MAFB + pMyr-MAFB	<u>Control positivo:</u> MAFB y MAFB interactúan entre sí <i>in vivo</i> .
T3	pSos-MAFB + pMyr-LaminC	<u>Control negativo:</u> MAFB y laminin C no interactúan entre sí <i>in vivo</i> .
T4	pSos-Coll + pMyr-MAFB	<u>Control negativo:</u> Coll y MAFB no interactúan entre sí <i>in vivo</i> .
T5	pSos-MAFB + pMyr-SB	<u>Control positivo:</u> MAFB y SB interactúan entre sí <i>in vivo</i> .
T6	pSos-PtpA + pMyr-LaminC	<u>Control negativo:</u> valida, la no interacción entre PtpA y Lamin C.
T7	pSos-PtpA + pMyr-SB	<u>control de ubicación de PtpA</u> en el citosol para poder interaccionar hSOS con SB (crecimiento a 37°C)
T8	pSos-PtpA + pMyr-ECHA	Ensayo de interés, evaluación de la interacción <i>in vivo</i> entre PtpA de <i>Mtb</i> y ECHA
T9	pSos-PtpA + pMyr	Control negativo: demuestra ausencia de interacción inespecífica.
T10	pMyr-ECHA + pSos	Control negativo: demuestra ausencia de interacción inespecífica.

3.2.3. Expansión, cuantificación y evaluación de la pureza de los plásmidos de interés.

Los plásmidos utilizados en el sistema de doble híbrido se amplificaron mediante transformación por shock térmico [Sambrook et al. 2011] de bacterias *E. coli* DH5- α químico competentes obtenidas por el método de Inoue [Inoue et al 1990] descrito anteriormente en el punto 3.1.1.2. Se sembró en LB agar conteniendo el antibiótico adecuado (para pSos ampicilina y para pMyr cloranfenicol, en ambos casos a 100 μ g/mL de medio, concentración final). Para esto se concentró por centrifugación a 3000 rpm durante 2min, se descartó unos 300 μ L del sobrenadante y se sembró el resto del material. Las placas obtenidas se incubaron a 37°C ON. Transcurrido este tiempo se observó la presencia o no de colonias, se seleccionaron colonias de cada placa y cada una se inoculó en 3mL de LB conteniendo el antibiótico adecuado, incubándose estos pre-cultivos a 37°C ON y bajo agitación de 200 rpm. Los cultivos que mostraron crecimiento se centrifugaron a 6000 rpm por 5min y a partir de las células obtenidas se procedió a realizar la extracción del ADN plasmídico mediante el uso del GeneJet Plasmid Miniprep Kit (#k0503) siguiendo las instrucciones del fabricante o siguiendo el protocolo de lisis alcalina [Sambrook et al. 2011]. La cuantificación, separación y visualización del ADN obtenido, se realizó siguiendo el protocolo descrito en el punto 3.1.1.1. Se evaluaron muestras de los plásmidos purificados y también previamente digeridos con la enzima de restricción HindIII durante 2hs, enzima que corta en un solo sitio a los plásmidos del sistema de doble híbrido y por lo tanto permite obtener el plásmido en su conformación lineal. Para dicha digestión se colocaron en un tubo 2 μ L de buffer de enzima 10X (1X final, Fermentas R10X) en 15.5 μ L de agua miliQ, 2 μ L del plásmido purificado y 0.5 μ L de HindIII (Thermo Cientific #ER0501 10U/ μ l).

3.2.1 Preparación de células competentes de levadura

Se preparó células competentes de *Saccharomyces cerevisiae* cdc25H siguiendo el protocolo descrito en la tesis de grado de Danilo Segovia [Segovia et al. 2014]. Este procedimiento se realiza en el día que las células serán utilizadas, no recomendándose el almacenamiento de las mismas. A partir del stock a -80°C se plaqueó en medio YPAD agar, se incubó a 22°C no más de 4 días y se seleccionó 5 colonias con las cuales se inoculó 10mL de YPAD caldo. Este precultivo se incubó a 23°C ON, luego se realizó una dilución 1/20 (50 μL de precultivo en 950 μL de medio YPAD caldo) a la cual se le midió la densidad óptica a 600nm ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) y dependiendo de este valor se realizó una dilución hasta alcanzar una $\text{DO}_{600\text{nm}}=0.3$. El volumen final a preparar depende de la cantidad de transformaciones a realizar, teniendo en cuenta que se necesita 10mL por cada transformación. Posteriormente esta dilución se incubó a 23°C y 200 rpm hasta llegar a una $\text{DO}_{600\text{nm}}= 0.6-0.8$ (aproximadamente 3h 30min). Una vez alcanzada la DO, sembrar 75 μL en YPAD agar e incubar a 37°C durante 4-6 días para controlar si aparecen o no mutantes de reversión. Se podrán utilizar las células competentes sólo si después de la incubación de estas placas se observan menos de 30 colonias. El resto del precultivo se centrifugó a 4000 rpm en 3 tubos de 50mL, a temperatura ambiente (TA) y durante 15min. Luego se descartó el sobrenadante y se suspendió el pellet en 1mL de solución TE/LiAc, se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL, se centrifugó a 4000 rpm a TA y durante 5min. A continuación se descartó el sobrenadante y se suspendió nuevamente en TE/LiAc (se realiza un único pool considerando que se necesitan 100 μL de células por cada transformación). En paralelo, se desnaturalizó ADN de esperma de salmón (10mg/mL) (SIGMA) (10 μL por cada transformación a 10mg/mL final) incubándolo 5min a 95°C , el cual posteriormente se conservó en hielo y se procedió a realizar las transformaciones.

3.2.2. Co-transformaciones del ensayo de doble híbrido

Las co-transformaciones se detallaron previamente en la **tabla 2**. En un primer ensayo se realizaron las primeras 8 transformaciones con los plásmidos disponibles en el laboratorio utilizados por la estudiante Vivian Irving durante la puesta en marcha de la metodología de doble híbrido [Irving et al. 2016]. Las concentraciones de cada stock disponibles al comienzo de este trabajo se detallan en la **tabla 3**. Teniendo en cuenta resultados previos del grupo en este ensayo se agregaron dos nuevos controles descritos en la **tabla 2** (T9 y T10). En un segundo ensayo se realizaron solamente los controles positivos T2 y T5 utilizando nuevos stocks de cada plásmido, obtenidos en esta tesina (sus concentraciones se detallan en los resultados).

Tabla 3: Plásmidos stock, utilizados en la puesta a punto de la metodología de doble híbrido. Se cuantificaron en espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop Lite.

Plásmidos stock y sus concentraciones (ng/μL)			
pSOS	277	pMyr	48
pSOS-MAFB	137	pMyr-MAFB	112
pSOS-Coll	111	pMyr-LaminC	205
pSOS-PtpA	212	pMyr-SB	133
		pMyr ECHA	202

En las diferentes transformaciones se procedió al agregado en el siguiente orden y cantidad de: 100μL de células competentes de levadura, 10μL de esperma de salmón, 300ng de plásmido (en primer ensayo) o 600ng de plásmido (en el segundo ensayo) y 550μL de TE/LiAc PEG. A continuación se agitó 30min a TA, se realizó un shock térmico de 15min a 42°C, se centrifugó a 4000 rpm por 5min, se descartó el sobrenadante y se suspendió el pellet en 200μL de MM para finalmente sembrar 100μl de las transformaciones T2 a T8 en placas de SD-glucosa (-UL) e incubarlas a 25°C. En el caso de la T1, para calcular la eficiencia de la transformación se sembró 10 y 100μl en placas de SD-glucosa (-UL) incubándolas a

25°C, y para realizar el control de reversión se sembró 90µl en el mismo medio pero incubándolas a 37°C. Las placas se incuban durante 4 a 6 días (preferentemente 4 días), pasados este lapso de tiempo se calculó la eficiencia de transformación con el crecimiento obtenido en T1 y se seleccionaron 6 colonias de cada una de las transformaciones T2 a T8, las cuales cada una se suspendió en 25µL de agua miliRho filtrada. Estas se sembraron por duplicado en forma de spot (2.5µL de la suspensión) en dos placas de SD/Glucosa (-UL) (una se incubaba a 25 °C y otra a 37 °C) y dos placas de SD/Galactosa (-UL) (una se incubaba a 25 °C y otra a 37 °C). Se controló el crecimiento diariamente, incubando las mismas entre 6 y 10 días como máximo, evaluándose el resultado obtenido, comparando el mismo con el esperado para el caso de los controles.

El medio SD/Glucosa (-UL) es utilizado para seleccionar los co-transformantes en el ensayo de doble híbrido, mientras que SD/Galactosa (-UL) es un medio utilizado para evaluar el éxito del doble híbrido. Al igual que en el medio SD/Glucosa (-UL), este medio también carece de LEU y URA, y en él crecerán solo aquellas levaduras que hayan sido co-transformadas con ambos plásmidos. Este medio que contiene galactosa permite la expresión de la proteína de interés fusionada a la señal de miristilación presente en el plásmido pMyr, la cual se encuentra bajo control del promotor GAL1 inducible por galactosa. El plásmido pSos contiene el promotor P-ADH1 el cual permite la expresión constitutiva de pSos y por ende permitirá la expresión de la hSos fusionada a la fosfatasa PtpA. Es de esperar que si las proteínas fusionadas se expresan e interaccionan, las colonias transformadas serán capaces de crecer en este medio a 37°C.

4.0 Resultados

4.1. Dificultades en el sub-clonado del gen ECHA en el vector de expresión bacteriano

4.1.1. Sub- clonado mediante RF-cloning

Como se detalló en la metodología la estrategia de RF-cloning permite insertar una secuencia de ADN en un plásmido mediante PCR (ver Figura 4). Como primer paso se diseñaron los cebadores de manera tal que cuenten con una región complementaria para los extremos del gen ECHA y otra complementaria al sitio de clonado del vector pT7. Estos cebadores son utilizados luego en la PCR1 cuyo ADN molde en nuestro caso es el plásmido pMyr-ECHA [Irving et al 2016]. El producto de amplificación constituye un megacebador que se utiliza luego en la PCR2 en la cual el ADN molde es el vector de expresión bacteriano pT7-MBP-GFP. En esta segunda PCR se espera obtener el plásmido doble hebra con una mella conteniendo el gen de la ECHA. El ADN parental es removido con la endonucleasa DpnI, y finalmente el plásmido sintetizado es transformado en células *E. coli* DH5- α quimiocompetentes. En la **tabla 4**, se muestran los cebadores diseñados para el clonado del gen ECHA en el vector de expresión bacteriano pT7-MBP-GFP. Se verificó que estos cebadores tengan al menos 40 pb de largo y una Tm de al menos 55°C para la PCR1, tal como lo recomienda la literatura [Bond et al 2012]. Como se observa en dicha tabla se han diseñado dos cebadores iniciadores diferentes (forward – ECHA), uno denominado F-ECHA-P cuya secuencia de ADN no posee la región codificante del péptido de tránsito a la mitocondria y otro denominado F-ECHA-T que sí lo contiene. Por lo tanto se utilizaron en la PCR1 dos pares de cebadores diferentes: F-ECHA-P/R-ECHA y F-ECHA-T/R-ECHA. En las secuencias descritas se resalta en violeta la región complementaria al vector de destino y en rosa la complementaria al gen ECHA. Además en negrita e itálica se resalta el sitio de corte introducido para la enzima BamHI. Esto último permite aplicar el clonado con enzimas de restricción utilizando BamHI si se presentaran problemas con el RF-cloning.

Tabla 4 Cebadores diseñados para el clonado del gen ECHA en el vector bacteriano pT7-MBP-GFP. Tm obtenidas utilizando el programa online <http://www.rf-cloning.org>.

F-ECHA-P	5'GGATCGGAAAACCTGTATTTTCAG GGATCC ACCAGAACCCATATTAACCTATGGAG 3'	Tm: 55°C, largo 55pb
F-ECHA-T	5'GGATCGGAAAACCTGTATTTTCAG GGATCC ATGGTGGCCTGCCGGGCG 3'	Tm: 66 °C, largo 48pb
R-ECHA	5'GAACTCGGGTGGCTCCAGCTGCC GGATCC TCACTGGTAGAACTTCTTGTAGG 3'	Tm: 55°C, largo 54pb

F-ECHA-P cebador diseñado sin la señal de transporte a la mitocondria, F-ECHA-T cebador diseñado incluyendo la señal de transporte a la mitocondria, Reverse-ECHA R-ECHA, **GGATCC**: sitio de corte para BamHI.

En la **Figura 8** se muestra la separación por electroforesis del producto obtenido luego de realizar la PCR1 por duplicado, utilizando los dos pares de cebadores descritos. En el carril 1, 2, 4 y 5 se observa una banda conteniendo ADN del tamaño esperado para el gen ECHA (2.3 kb). Por lo tanto se obtuvo con éxito los megacebadores necesarios para la segunda amplificación por PCR del RF-cloning.

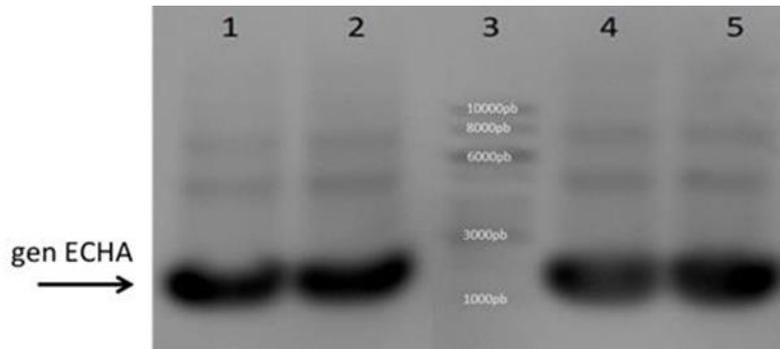


Figura 8: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de la PCR1 del método de Rf-cloning. Pocillos 1 y 2: amplificación de ECHA-T (contienen la secuencia codificante del péptido de tránsito a la mitocondria; pocillo 3: Marcador de pares de bases GeneRuler 1Kb DNA Ladder #SM0311; pocillos 4 y 5: ECHA-P (secuencia codificante del péptido de tránsito a la mitocondria).

El ADN de dichas bandas se extrajo del gel y se cuantificó, obteniéndose las concentraciones descritas en la **tabla 5** para cada megacebador.

Tabla 5: Concentraciones de los megacebadores necesarios para la PCR2 del RF-cloning

Secuencia *	Concentración	Secuencia	Concentración
T-ECHA1	98.1 ng/μL	P-ECHA1	81.3ng/μL
T-ECHA2	89.6ng/μL	P-ECHA2	142ng/μL

(*) 1 y 2 corresponde a los duplicados de la PCR1.

Para la PCR2 se utilizaron los stock de megacebadores de menor concentración, el producto obtenido se trató con DpnI con el objetivo de eliminar el ADN molde metilado. Posteriormente una fracción de esta digestión se utilizó para transformar células quimicompetentes de *E. coli* DH5α, tal cómo se describió en el punto 5.1.1.2 de la metodología. Se obtuvieron 16 clones, los que fueron re-aislados en placas de LB/Amp, observándose crecimiento para 15 de ellos. En estos últimos se evaluó la presencia del inserto de interés mediante PCR en colonia. En la **Figura 9** se muestra la electroforesis de dichas muestras dónde se observa el

resultado negativo obtenido para los 15 clones evaluados. Como podemos observar, en el gel no se detectó la banda de tamaño esperado (2.3 kb), visualizándose solamente la bandas correspondiente a los megacebadores y a las del marcador de pares de bases utilizado.

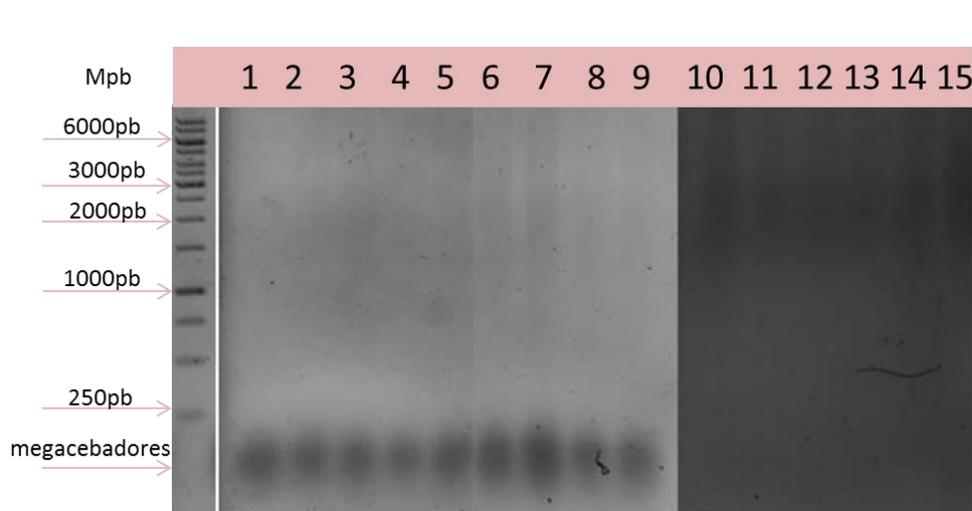


Figura 9 PCR en colonia y posterior electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se realiza la corrida electroforética de las muestras obtenidas luego de la PCR en colonia de los clones obtenidos luego de un primer ensayo de Rf- cloning. Mpb GeneRuler 1Kb DNA Ladder #SM0311; pocillos 1-3, 6-15 muestras obtenidas del ensayo en el que se utilizaron los megacebadores ECHA-T; pocillos 4 y 5: muestras obtenidas del ensayo en el que se utilizaron los megacebadores ECHA-P.

Si bien la polimerasa utilizada en este ensayo de PCR estaba siendo utilizada por miembros del grupo sin dificultad, decidimos verificar su actividad. Para ello se realizó un nuevo ensayo de PCR, utilizando la misma enzima y como molde un vector en el cuál sabemos se encuentra el gen de ECHA (plásmido pMyr-ECHA secuenciado y disponible en nuestro laboratorio). En la **Figura 10** se observa la electroforesis en la que se separó el producto de dicha PCR, observándose una banda cuyo tamaño se corresponde al esperado para el gen de ECHA (2.3kb), confirmando que la enzima utilizada funciona correctamente.

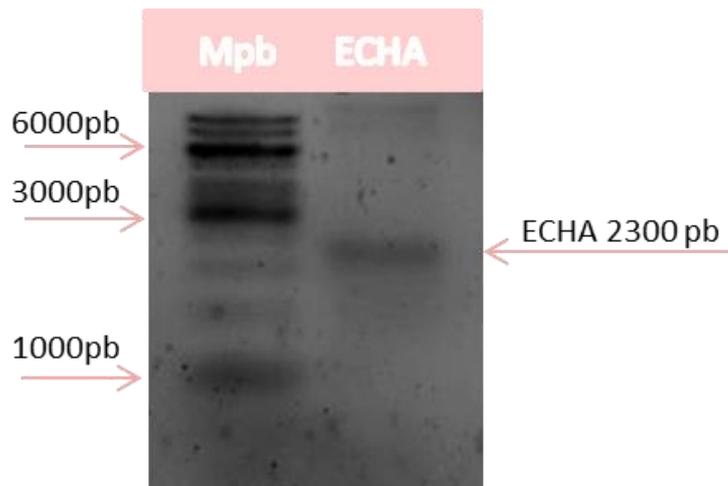


Figura 10 Corrida electroforética del producto de PCR, realizado para probar la efectividad de la Toptaq DNA polimerasa Quiagen utilizando como ADN molde pMyr-ECHA. Mbp: GeneRuler 1Kb DNA Ladder #SM0311.

Una vez verificado el buen funcionamiento de la enzima, se repitió la transformación y la evaluación de los clones obtenidos por PCR de colonia, esta vez realizando un pool de los clones obtenidos con la finalidad de simplificar y economizar en reactivos. En la **Figura 11** (carril 1) se observa nuevamente la ausencia del producto de PCR esperado, observándose solamente las bandas correspondientes a los cebadores y molde utilizados. En el carril 2 se muestra el resultado de la PCR realizada para el control positivo, observándose una banda principal del tamaño esperado, demostrando nuevamente la actividad de la polimerasa utilizada en este ensayo y las correctas condiciones de amplificación. En el carril 3 se muestra la ausencia de banda al realizar el control negativo de la PCR (sin molde), el cual demuestra que no existe contaminación con ADN en las reacciones.

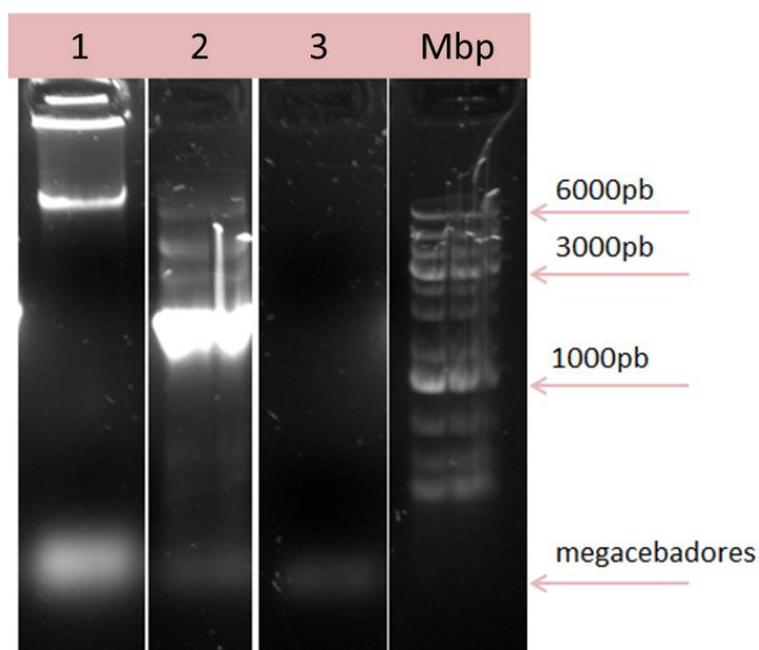


Figura 11: Electroforesis de las PCR en colonia de los clones obtenidos tras una nueva transformación. Carril 1: PCR en colonia utilizando el pool de colonias obtenidos luego de la repetición de la transformación utilizando el producto de PCR2 inicial; carril 2: control positivo utilizando como ADN molde el plásmido pMyr-ECHA; carril 3: control negativo donde no se colocó ADN molde. Mbp: GeneRuler 1Kb DNA Ladder #SM0311.

Para estar seguros de la ausencia de clones positivos se decidió analizar los clones evaluando la liberación del inserto mediante digestión con BamHI. Como se mencionó anteriormente en el diseño de cebadores se incluyó este sitio para que se localice a ambos lados de la secuencia amplificada del gen ECHA. Para proceder a dicha evaluación en primera instancia se realizó una purificación del ADN plasmídico y posterior cuantificación de 9 de los 15 clones obtenidos (**tabla 6**).

Tabla 6 Concentración de los plásmido extraídos y purificados a partir de las colonias crecidas en LB/Amp.

Clones	[plásmido]ng/ μ L
1	6.1
2	156.1
3	40.6
4	417.7
5	311.1
6	245.7
7	149.4
8	62.8
9	212.9

Luego de la digestión con BamHI se separaron las muestras por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, sembrando as muestras digeridas y sin digerir (**Figura 12**), estas últimas resaltadas en la figura con un asterisco. En la figura se observa la linearización del vector lo que comprueba la actividad de la enzima de restricción utilizada, además se observa una clara diferencia de migración al comparar las muestras digeridas y sin digerir. El vector digerido migra como una única banda de unos 6kb, sin embargo el no digerido migra como dos bandas, una de menor tamaño correspondiente al ADN plasmídico en su conformación superenrollada y una de mayor tamaño correspondiente a su conformación circular. Sin embargo en ninguno de las muestras analizadas se observó la liberación del inserto (gen ECHA de 2.3kb) cuya posición esperada se señala en el gel con una flecha.

Por otro lado, en los carriles 10 y 10* se sembró el vector utilizado en el primer ensayo de RF-cloning (pT7-Histag-GFP) previamente digerido y sin digerir con BamHI, respectivamente. Esto se realizó con la finalidad de verificar el perfil de digestión esperado para dicho vector. Este vector, según el artículo que lo describe [Correa et al 2014] cuenta con dos sitios BamHI a cada lado del gen de la GFP, por lo cual, la digestión con BamHI debe permitir la liberación de dicho gen (700pb). Sin embargo, la banda correspondiente a la liberación del gen de la GFP no se observó. Teniendo en cuenta que este vector fue cedido por el Instituto Pasteur de Montevideo y no contábamos con su secuencia, se decidió enviar a secuenciar el mismo a la empresa Macrogen (Anexo D, secuencia parcial de pT7-Histag-GFP analizada en SnapGeneViewer). La secuencia confirmó que posee el gen de la GFP, sin embargo contrariamente a lo descrito, posee un único sitio de corte para la enzima BamHI, lo que impide la liberación del gen de la GFP. Frente a este resultado, preferimos cambiar de vector y pasar a utilizar otro de los vectores de este tipo (pT7-MBP-GFP) descrito en la metodología, secuenciado y utilizado con éxito por nuestro grupo en el clonado de numerosos genes de proteínas de esturión, para el cuál sabemos contiene los dos sitios BamHI flanqueando el gen de la GFP.

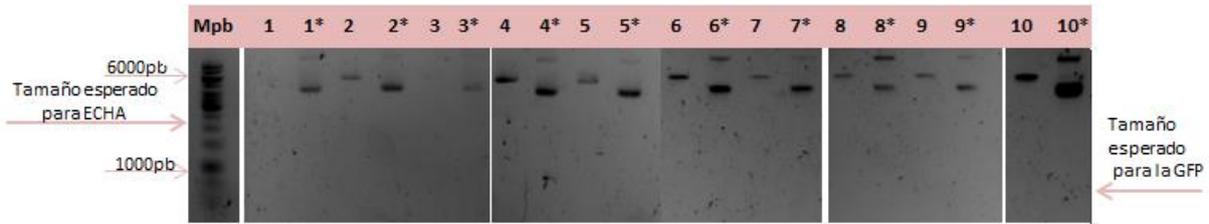


Figura 12: Electroforesis de los plásmidos purificados tratados o no con BamHI. Carriles 1 al 9 (con asterisco): ADN plasmídico obtenido de los 9 clones analizados y digeridos con la enzima BamHI. En el carril 1 y 3 no se observa muestra debido a la baja concentración obtenida como resultado de la miniprep (ver **tabla 6**). Carriles 10 y 10* pT7-Histag-GFP digerida y sin digerir con BamHI, respectivamente.

Teniendo en cuenta estos resultados negativos se repitió la PCR1 (**Figura A en Anexo C**) y se procedió a realizar la PCR2 cambiando algunas de las condiciones de esta reacción (se utilizó como plásmido destino pT7-MBP-GFP y se disminuyó la temperatura de hibridación de 65°C a 50°C). Además el producto obtenido se trató con más unidades de DpnI con el objetivo de favorecer la eliminación del ADN metilado, siguiendo sugerencias descritas en la literatura [Bond et al 2012]. El pool de los clones obtenidos se analizó por PCR en colonia sin observar nuevamente el producto esperado (**Figura B, carril 1 en Anexo C**). Se realizó también una nueva digestión con DpnI el mismo día de transformación de las células bacterianas, pero esto no permitió revertir el resultado negativo (**Figura B, carril 2, Anexo C**).

Teniendo en cuenta las dificultades encontradas al aplicar la metodología de RF-cloning para el clonado del gen ECHA se decidió realizar el clonado mediante la metodología clásica utilizando enzima de restricción.

4.1.2. Sub-clonado mediante enzimas de restricción

Para el clonado del gen ECHA mediante el uso de enzima de restricción se utilizó como vector el pT7-MBP-WAP y T7-MBP-GFP disponibles en el laboratorio. Ambos vectores cuentan con dos sitios de corte para la enzima BamHI flanqueando el gen de esturión WAP (1500pb) o el gen de la GFP (700pb). Como inserto se utilizó el megacebador, producto del PCR1 de la metodología de RF-cloning, el cual posee la secuencia del gel ECHA flanqueado de sitios de corte para BamHI. En una primera etapa se realizó la digestión con BamHI del megacebador y de ambos vectores, mostrándose los resultados obtenidos en la **Figura 13**.

En el carril 1, se puede observar el éxito de la digestión del pT7-MBP-WAP con BamHI, ya que se puede observar una banda mayor correspondiente al plásmido lineal y otra banda de aproximadamente 1500pb correspondiente al gen WAP liberado como consecuencia de la digestión. Un resultado similar se observa en el carril 2 al analizar el producto de la digestión de pT7-MBP-GFP, pero en este caso el fragmento liberado corresponde al gen de la GFP (700pb). Además, en el carril 3 se observa la digestión del megacebador conteniendo el gen de la ECHA, observándose una banda principal que se corresponde con el tamaño esperado para el gen de la ECHA (2.3kb) y una banda menor correspondiente a los extremos del megacebador digerido. El ADN digerido (vector e inserto) se purificaron, se cuantificaron y se utilizaron en los ensayos de ligación con T4 DNA ligasa, tal como se describe en la metodología.

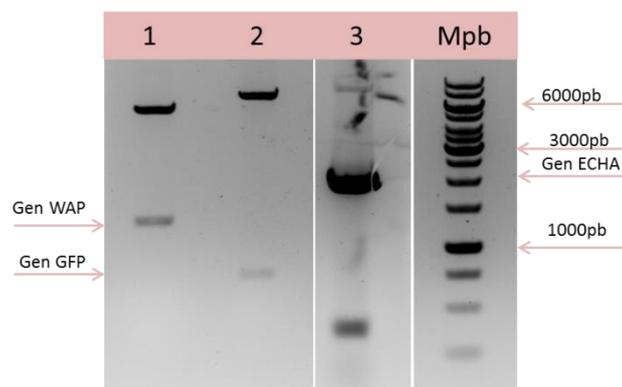


Figura 13: Electroforesis de los productos de digestión del vector y el inserto con BamHI. Carril 1: pT7-MBP-WAP digerido, la banda superior correspondiente al plásmido lineal y la banda de aprox. 1500pb al gen WAP; carril 2: pT7-MBP-GFP digerido, la banda superior corresponde al plásmido lineal y la banda inferior al gen de la GFP; carril 3: digestión del megacebador ECHA, la banda principal se corresponde al tamaño del gen de la ECHA y la banda inferior a los extremos del megacebador digerido. Mpb: GeneRuler 1Kb DNA Ladder #SM0311.

Previo a la ligación el vector digerido con BamHI se trató con la fosfatasa FastAP para evitar que éste se ligue sobre sí mismo. Posteriormente se realizó la reacción de ligación utilizando dicho vector y el inserto digerido con BamHI y se transformó la células de *E.coli* quimicompetentes siguiendo el protocolo descrito en 5.1.1.2. Luego de incubar a 37°C ON no se observaron clones en las placas de LB/Amp. Se repitió la transformación lográndose observar colonias pero recién transcurridas más de 24 hs de incubación a 37°C. Se analizaron dichos clones por PCR en colonia, no lográndose un resultado positivo ya que en nin-

guno de los casos se observó una banda del tamaño esperado para el gen de la ECHA (**Figura 14**).

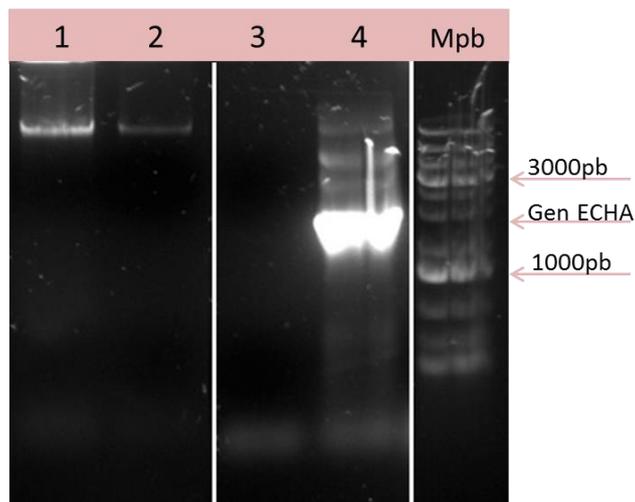


Figura 14: Electroforesis de las muestras de PCR en colonia de los clones obtenidos al realizar la transformación con el producto de la ligación. Carril 1: PCR en colonia realizado con el pool de los clones obtenidos al transformar con producto de la ligación pT7-MBPΔWAP y gen ECHA; carril 2: PCR en colonia realizado con el pool de los clones obtenidos al transformar con producto de la ligación pT7-MBPΔGFP y gen ECHA; carril 3: control negativo sin ADN molde; carril 4: control positivo cuyo ADN molde es pMyr-ECHA.

Teniendo en cuenta este resultado se repitió la obtención del inserto (PCR1, digestión con BamHI, purificación) y del vector (digestión con BamHI, purificación) así como la ligación y posterior transformación. Nuevamente sólo al cabo de más de 24 hs de incubación a 37°C se observó crecimiento de unos pocos clones, los cuales están siendo evaluados por PCR en colonia. Por otro lado, debido a resultados recientes negativos obtenidos por otra estudiante del grupo que se encuentra utilizando las mismas células quimicompetentes, se está sospechando que lo que esté contribuyendo al resultado negativo sea una descenso de la eficiencia de las células utilizadas, las que venían siendo utilizadas en 2017 por diferentes miembros del grupo sin dificultad. Por lo cual su eficiencia se evaluará en estos días, a la vez de testear otros “stocks” de células quimicompetentes.

Por lo tanto hasta ahora no hemos logrado sub-clonar el gen de la ECHA en el vector de expresión bacteriano. En la discusión se plantearán diferentes hipótesis de acuerdo a las dificultades encontradas.

4.2 Aproximación al ensayo de doble híbrido en levadura

Como se describió en la metodología el método CytoTrap (ver **Figura 5**) permite evaluar la interacción proteína-proteína en un contexto celular eucariota. El mismo consiste en la co-transformación de una cepa de levadura particular con dos plásmidos pSos y pMyr conteniendo los diferentes genes de interés. En nuestro caso pSos posee el gen que codifica para la fosfatasa PtpA de *Mtb*, mientras que pMyr posee el gen ECHA. Cabe destacar que nuestro interés es evidenciar si existe interacción entre PtpA- ECHA en un contexto celular eucariota, para reforzar la evidencia de su interacción *in vitro* demostrada por nuestro grupo [Margenat et al 2015].

4.2.1 Primer ensayo: transformaciones T1 a T8

En el primer ensayo de doble híbrido se siguió el protocolo puesto en marcha por la Lic. V. Irving durante su tesis de grado [Irving et al 2016], realizándose todas las transformaciones de la cepa de levadura cdc25 descritas el punto 5.2 de la metodología (ver **tabla 2**). Estas incluyen la co-transformación 1 (T1) para el cálculo de la eficiencia de la co-transformación, las co-transformaciones correspondientes a los controles positivos (co-transformaciones T2, T5 y T7) , las co-transformaciones correspondientes a los controles negativos (co-transformaciones T3, T4, T6) y el ensayo de interés para evidenciar si existe interacción entre PtpA y ECHA (co-transformación T8).

Con el resultado obtenido en T1 se calculó la eficiencia de la transformación utilizando la siguiente ecuación (siendo n° ufc, las unidades formadoras de colonias).

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ ufc x vol total de suspensión}}{\text{vol plaqueado x } \mu\text{g ADN utilizado}}$$

El número de ufc fue de 10 y 63 ufc para 10 y 100 ul de volumen plaqueado, respectivamente. El volumen total de suspensión fue 667μL y los microgramos de ADN utilizados 0.3μg. Con estos datos se calculó la eficiencia, siendo el valor medio obtenido de 1.8×10^3 ufc/μg de ADN. Teniendo en cuenta que el rango sugerido por el método de doble híbrido es de 0.51×10^3 - 10×10^4 ufc/μg de ADN, podemos concluir que se trabajó dentro de los límites requeridos.

En la **tabla 7**, se detallan los resultados esperados y los observados en este primer ensayo.

Tabla 7 Resultado obtenidos y esperados de las transformaciones realizadas en el primer ensayo según las diferentes condiciones de incubación y medio utilizado

Co-transformaciones		25°C				37°C			
		SD-Glu (-UL)		SD-Gal (-UL)		SD-Glu (-UL)		SD-Gal (-UL)	
		Esp	Obt	Esp	Obt	Esp	Obt	Esp	Obt
T2	pSOS-MAFB pMyr-MAFB	+	+	+	+	-	-	+	-
T3	pSOS-MAFB pMyr-LaminC	+	+	+	+	-	-	-	-
T4	pSOS-ColI pMyr-MAFB	+	+	+	+	-	-	-	-
T5	pSOS-MAFB pMyr-SB	+	+	+	+	-	-	+	+/-
T6	pSOS-PtpA pMyr-LaminC	+	+	+	+	-	-	-	-
T7	pSOS-PtpA pMyr-SB	+	+	+	+	-	-	+	-
T8	pSOS-PtpA pMyr-ECHA	+	+	+	+	-	-	+	-?

Como podemos observar en la tabla anterior, de manera general se obtuvo el resultado esperado para los controles negativos. Sin embargo, los controles positivos del ensayo T2, T5 y T7 no dieron como se esperaba (resaltados en amarillo) y el resultado del ensayo de interés (T8) fue difícil de interpretar. A continuación analizamos cada uno de estos resultados.

Resultado de los controles negativos

Los controles negativos se realizaron co-transformando plásmidos tales que sus productos proteicos no interaccionen entre sí (T3 y T4), impidiendo el rescate de la vía RAS de crecimiento a 37°C de la levadura *S. cerevisiae* cdc25H. En T3 se co-transformó las células cdc25H competentes con pSOS-MAFB y pMyr-LaminC. En la tabla anterior se observa que no se logró observar crecimiento en el medio SD/Gal (-UL) a 37°C. Esto se debe a que la proteína hSOS-MAFB no llega a la membrana para poder activar la vía RAS, debido a que MAFB y la proteína localizada en la membrana (Lamin C) no interaccionan entre sí. En T4 se co-transformó con pSOS-Col I y pMyr-MAFB. Nuevamente se obtuvo el resultado esperado, demostrándose que Col I no interacciona con MAFB. En T6, donde se co-transformó con pSOS-PtpA y mMyr-LaminC tampoco se observó crecimiento en SD/Gal (-UL) a 37°C, tal como se esperaba. El mismo permite verificar la ausencia de interacción directa entre PtpA y la señal de miristilación que está fusionada a LaminC.

Resultado de los controles positivos

Los controles positivos se realizan co-transformando con plásmidos tales que sus productos de expresión proteica interaccionen entre sí, pudiendo rescatar la vía de crecimiento a 37°C de la levadura *S. cerevisiae* cdc25H (activación vía RAS). Para ello se realizaron dos co-transformaciones T2 y T5. En T2 al co-transformar las células cdc25H competentes con pSosMAFB y pMyrMAFB, no se observó crecimiento en el medio SD/ Gal (-UL) a 37°C. Este resultado no coincide con lo esperado ya que estas proteínas se conoce interaccionan entre sí como se mencionó anteriormente. Como en el caso de T2, en la T5 (co-transformación con pSos-MAFB y pMyr-SB) tampoco se observó lo esperado, indicando que no logramos poner en evidencia la interacción de MAFB con SB. Tampoco en la T7 se logró obtener el resultado esperado en un control positivo adicional sugerido en el kit Cytotrap. En este caso se co-transforma con pSos-PtpA y pMyr-SB, con la finalidad de verificar la interacción de hSOS con la proteína SB, lo que indirectamente pone en evidencia la localización de PtpA en el citosol de la levadura.

Resultado del ensayo de interés co-transformando con pSOS-PtpA y pMyr-ECHA

El primer problema, es que al no contar con controles positivos que hayan funcionado, el resultado de la T8 queda invalidado. Sin embargo describiré lo observado en esta co-transformación lo cual no fue fácil en este trabajo ya que en ocasiones era difícil distinguir si lo observado correspondía al inóculo sembrado o a la colonia en crecimiento (cabe recordar que la cepa de levadura cdc25H, debe crecer en los casos de los controles positivos a su temperatura restrictiva, lo que es más dificultoso).

Frente a esta situación, se resolvió repetir el ensayo incluyendo sólo los controles positivos T2 y T5. Previamente, se procedió a realizar una nueva expansión, purificación, cuantificación y evaluación de la pureza de todos los plásmidos utilizados en el ensayo de doble híbrido. En primer lugar se transformaron células de *E.coli* quimicompetentes y posteriormente se realizó la extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina. El resultado de la cuantificación se muestra en la **tabla 8** mostrando sus concentraciones y respectivos tamaños.

Tabla 8 Concentración y tamaño de los plásmidos necesarios para el ensayo de doble híbrido.

	Plásmido	Concentración (ng/μL)	Tamaño (Kb)*
1	pSos	536.2	11.3
2	pSos-MAFB	400.5	12.1
3	pSos-Coll	524.5	11.9
4	pMyr	353.0	6.0
5	pMyr-MAFB	433.8	6.9
6	pMyr-LaminC	492.2	6.5
7	pMyr-SB	482.6	7.1
PtpA₁	pSos-PtpA ₁	370.8	11.8**
PtpA₂	pSos-PtpA ₂	330.7	
ECHA₁	pMyr-ECHA ₁	486.2	8.3**
ECHA₂	pMyr-ECHA ₂	420.6	

(*)Tamaño descrito en el manual de doble híbrido CytoTrap Vector Kit, (**) Tamaño calculado teniendo en cuenta los pb que poseen los insertos (ECHA = 2292pb; PtpA= 500pb).

Una vez cuantificados los plásmidos, se procedió a analizar su perfil electroforético sin digerir (**Figura 15 A**). En este caso el tamaño no puede ser evaluado ya que los pesos no son comparables debido a que los plásmidos no se encuentran en su conformación lineal, sino que se observan en sus conformaciones circular y superenrollado. Sin embargo en todos los casos las purificaciones fueron de un grado de pureza adecuado. A continuación, para confirmar los tamaños se analizaron muestras previamente digeridas con HindIII, enzima que corta en un solo sitio a los plásmidos de este sistema de doble híbrido (**Figura 15 B**), en este caso se observa una única banda correspondiente al plásmido lineal, con tamaños que concuerdan con el descrito en la **tabla 8**. En el carril 10 y 11 se visualiza la digestión del plásmido pMyr ECHA, observándose un patrón de 2 bandas, esperable ya que en este caso existen 2 sitios de corte para HindIII, uno situado en el plásmido pMyr y otro dentro del gen de ECHA.

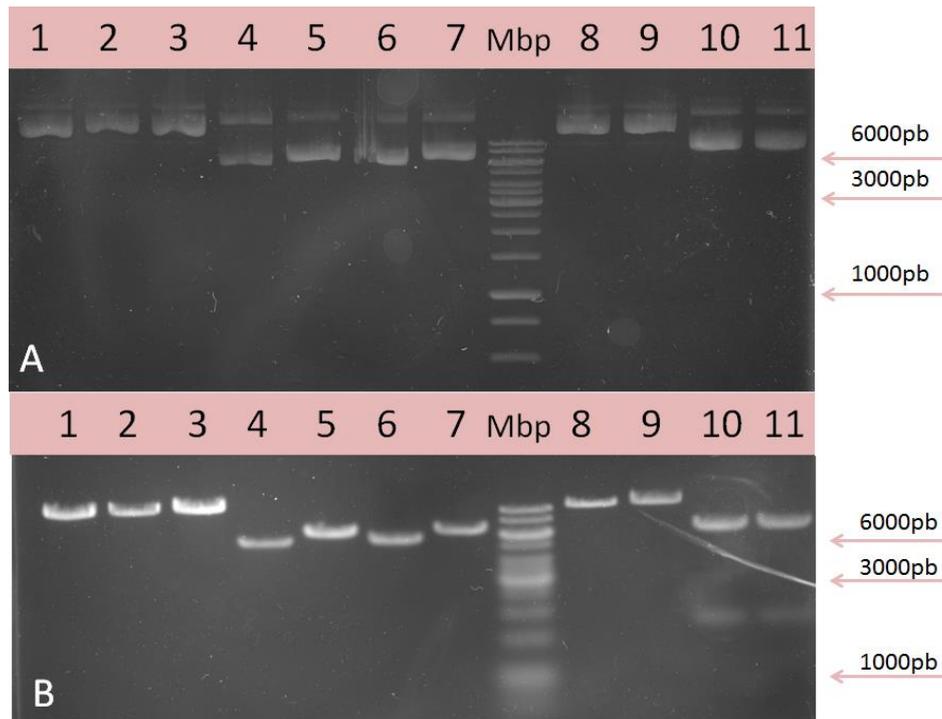


Figura 15 (A) Electroforesis en gel de agarosa 1% de los plásmidos purificados, donde se pueden visualizar las diferentes conformaciones que puede adquirir el plásmido sin digerir: carril 1 pSos, carril 2 pSos-MAFB, carril 3 pSos Coll, carril 4 pMyr, carril 5 pMyr-MAFB, carril 6 pMyr-LaminC, carril 7 pMyr-SB, carril 8 y 9 pSos PtpA, carril 10 y 11 pMyr ECHA. Mbp: Thermo Scientific GeneRuler 1Kb DNA ladder 0.5µg/µL (#SM0311).

4.2.3 Repetición de controles positivos del sistema de doble híbrido

Como se describió anteriormente, se decidió no repetir el ensayo completo hasta que los controles funcionen como es de esperar, sobre todo considerando que es un ensayo en el que se utilizan reactivos costosos (medios de cultivo mínimos, etc). Además de T2 y T5 también se repitió la T1 para el cálculo de la eficiencia de la transformación, no sólo porque se utilizaría otro lote de plásmidos sino también porque se decidió aumentar la cantidad de ADN a utilizar en las transformaciones de 300 ng a 600ng. A pesar de estas modificaciones la eficiencia no mejoró siendo incluso menor (0.58×10^3 ufc/µg de ADN) que la determinada previamente, aunque aún en los rangos aceptables para la validación del ensayo. En este segundo ensayo se logró el resultado esperado para los controles positivos T2 y T5.

Para el control T2 se observó crecimiento en las placas SD-Glu(-UL) y SD-Gal(-UL) incubadas a 25 °C, lo cual concuerda con lo esperado ya que la levadura *S. cerevisiae* cdc25H crece sin impedimento a esa temperatura. A la temperatura restrictiva de crecimiento de la levadura

(37°C) no se observó crecimiento en las placas con medio SD-Glu(-UL). Sin embargo, sí se observó crecimiento en las placas con medio SD-Gal(-UL). En este caso el plásmido pMyr posee el promotor GAL1, lo que permitirá la expresión de la proteína de fusión Myr-MAFB (en este caso) en presencia de galactosa, y por ende su anclaje a la membrana citoplasmática. De esta forma MAFB puede interactuar con MAFB fusionada a hSOS. La interacción entre MAFB-MAFB se evidencia con crecimiento a 37°C en el medio en presencia de galactosa. En nuestro ensayo se observó el crecimiento en SD-Gal (-UL) a 37°C de 4 de los 6 clones obtenidos y evaluados de la co-transformación T2. En la transformación T5 se observó el crecimiento en SD-Gal (-UL) a 37°C de 5 de los 6 clones obtenidos. En la **Figura 16**, a modo de ejemplo se muestran imágenes de estas placas de la evaluación de T2 y T5. Las placas superiores corresponden a las placas incubadas a 25°C donde se observa el notorio crecimiento de las colonias, ya que esta temperatura no impide el crecimiento de la levadura, mientras que en las placas inferiores incubadas a la temperatura restrictiva evidencia el leve crecimiento, pero posee una marcada diferencia con el resto en donde no hay crecimiento a 37°.

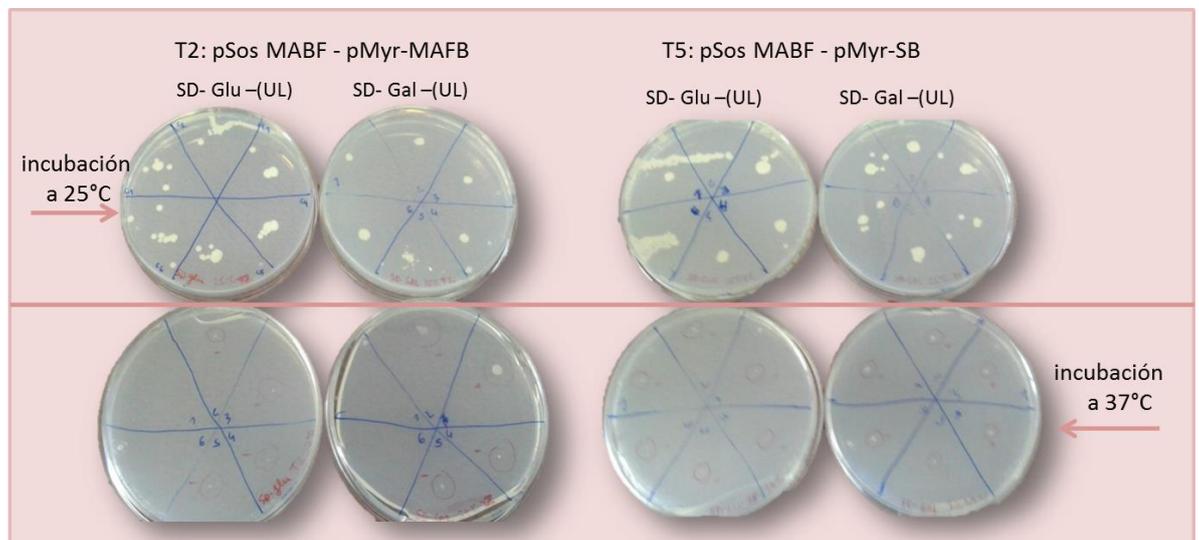


Figura 16: Placas de la evaluación de clones obtenidos en las transformaciones T2 y T5. A la izquierda placas de correspondientes a T2 y a la derecha placas correspondientes a T5, en los diferentes medios y condiciones de incubación descritos en el panel.

Estos resultados alentadores, permitirán en un futuro próximo la repetición del ensayo de doble híbrido completo.

5.0 Discusión

Sub-clonado de ECHA en un vector de expresión bacteriano

La TFP (ECHA/ECHB) humana resulta un candidato interesante como potencial sustrato fisiológico de la PtpA de *Mtb* ya que juega un rol clave en la beta-oxidación de los ácidos grasos catalizando tres de las cuatro reacciones de esta vía [Eaton et al 2000]. Como ya hemos mencionado la subunidad ECHA de la TFP es una de las proteínas que se ha observado deja de detectarse en la mitocondria de macrófagos infectados con la cepa virulenta de *Mtb* H37Rv, pero no en aquellos infectados con la cepa avirulenta *Mtb* H37Ra [Jamwal et al. 2013]. Hasta el momento no hay evidencias acerca de cuál es el factor bacteriano responsable de la disminución de los niveles ECHA en la mitocondria, por lo tanto la posibilidad de que PtpA participe en dicho efecto es sumamente interesante, más aun teniendo en cuenta que nuestro grupo demostró que *in vitro* PtpA y ECHA interactúan y que ECHA es sustrato de PtpA [Margenat et al 2016.]. La escasa cantidad de TFP obtenida al purificarla a partir de los extractos de macrófagos, nos llevó a fijar como objetivo central de esta tesina el sub-clonado del gen ECHA en un vector de expresión bacteriano. Esto es importante para disponer de mayor cantidad de proteína que posibilite realizar nuevos ensayos de actividad fosfatasa y así determinar parámetros que definan la interacción entre PtpA-ECHA. Hasta el momento no se pudo realizar con éxito el sub-clonado del gen ECHA. Pero a continuación se discuten cuáles pueden ser las razones por las cuales no fue posible.

Al analizar las dificultades al aplicar la metodología de RF-cloning surgió la duda si una limitante podía ser el tamaño del inserto. El trabajo de van den Ent et al [van den Ent et al 2006] describe la posibilidad de clonar mediante esta estrategia fragmentos entre 0.5-3.5kb, sin embargo en este trabajo se observa que al aumentar el tamaño la probabilidad de obtener clones positivos baja considerablemente (de 50-100% a 8-55%). Por otro lado, en este mismo trabajo sugieren que el tamaño total de la construcción no supere 15 kb. En nuestro caso, el tamaño del inserto es de 2.3kb y la construcción total no superó los 10kb, por lo tanto esta no sería la causa que explicaría que no se obtuvo clones positivos.

Estudios que describen las condiciones óptimas para la reacción de PCR2 de la estrategia de RF-cloning [Bryksin et al 2010, Bond et al 2010], sugieren usar 20-50ng de plásmido parental

como material de partida, 18-20 ciclos de amplificación (teniendo en cuenta que más de 20 ciclos tiene un significativo efecto perjudicial aumentando la posibilidad de introducción de errores) y establecer la temperatura de hibridación entre 5-10°C por debajo de la T_m . El producto, debe tratarse con 20U de DpnI durante 2hs a 37°C seguido de una inactivación de 20min a 80°C (DpnI está activo en el buffer de PCR de la Phusion ADN polimerasa). Cabe destacar que en nuestro ensayo se siguieron las recomendaciones antes mencionadas y aún así no obtuvimos con éxito el resultado esperado, por lo cual pasamos al sub-clonado utilizando enzimas de restricción. Como describimos en los resultados, al aplicar esta estrategia tampoco logramos obtener clones positivos, destacando que en las placas solo obteníamos entre 1 y 5 colonias como máximo en los casos en que se recuperaron transformantes. Esto demuestra una baja eficiencia de la transformación.

Ambos resultados negativos al aplicar dos estrategias para el sub-clonado, nos hace dudar de la eficiencia de las células quimicompetentes utilizadas en las transformaciones. La estrategia de RF-cloning es inherentemente de baja eficiencia, por lo cual se sugiere utilizar bacterias súper competentes, de eficiencia $> 10^6$ UFC / μg de plásmido [Bond et al 2010]. En cambio al transformar con el producto de ligación esperábamos mejores resultados. Cabe agregar que recientemente en la sección se han utilizado las mismas cepas de *E. coli* DH5 α quimicompetentes sin resultados positivos. Esta ineficiencia de las células puede ser consecuencia del tiempo de preparado (1 año) sumado a algunos percances sufridos en el laboratorio (cambios de freezer donde se conservaban). Actualmente nuestro equipo tiene como objetivo la preparación de nuevas células de *E. coli* DH5 α quimicompetentes y la comparación de la eficiencia con las utilizadas previamente. Es de esperar lograr el sub-clonado del gen ECHA, para su futura expresión recombinante en un sistema bacteriano. De hecho, analizando la literatura, podemos ver que ha sido clonada utilizando enzimas de restricción en el vector pET-Duet bacteriano y expresada en *E. coli* Rosetta-2 (DE3) en su forma recombinante y purificada de la fracción soluble [Fould et al 2010]. No se descarta contactar a este grupo para solicitarles dicha construcción. Este grupo no detectó en la ECHA sitios de tyr fosforiladas, sugiriendo que la expresión en la cepa utilizada no dio lugar a la proteína fosforilada, posiblemente porque no cuenta con una quinasa en tirosina que la fosforile. Nuestro grupo utiliza para la expresión la cepa *E. coli* BL21 (DE3) la cual ha demostrado ser capaz de fosforilar en tirosina otras proteínas que se han estudiado en el laboratorio. Por

otro lado, no se descarta abordar la estrategia de expresión en sistemas eucariotas, o en bacterias que co-expresen una fosfotirosinquinasa poco específica, o alternativamente fosforilarla *in vitro* mediante la utilización de extractos de macrófagos o una quinasa comercial poco específica.

Aproximación al ensayo de doble híbrido en levadura

Como antecedente a la presente tesis, la estudiante Vivian Irving, en su tesina realizó un primer ensayo completo que incluyó las co-transformaciones de la T1 a la T8. En esa oportunidad se obtuvo de manera general los resultados esperados para los controles del ensayo, excepto para uno de los controles negativo (T6), aún así los resultados obtenidos para el ensayo de interacción PtpA-ECHA fue promisorio, pero al realizarse un único ensayo era necesario aumentar las réplicas.

En la réplica de este ensayo, realizado en la presente tesis, tuvimos problemas con los controles positivos, lo que invalida el ensayo, impidiendo la comparación entre ambos. Por esta razón se repitieron los controles positivos provistos por el kit cytotrap T2 y T5.

Antes de repetir el ensayo, se procedió a realizar una nueva propagación y purificación de los plásmidos con la finalidad de obtener mejores resultados, tal como se describió y discutió en los resultados. En el segundo ensayo se obtuvieron los resultados esperados lo que sugiere la importancia de trabajar con plásmidos recientemente purificados. Estos resultados son preliminares, ya que un detalle no menor es que en nuestro caso se realizó una única transformación (de cada co-transformación), a partir de la cual se realizaron réplicas de los clones obtenidos. Un mejor procedimiento, según nos recomendó el Dr. Uriel Koziol (quien ha trabajado con la técnica de doble híbrido en levadura), conlleva la realización de 3 transformaciones de cada co-transformación. De esta forma estaremos aumentando la probabilidad de tener co-transformaciones exitosas. Además, sigue siendo necesario aumentar las réplicas de dicho experimento y adquirir experiencia en la lectura de los resultados obtenidos.

Si en futuras réplicas del ensayo, se siguen generando dudas al respecto de la interacción entre PtpA y ECHA, una variante (ya llevada a cabo por otros en el uso del método de doble híbrido [Heinrich et al 2016]) es realizar un intercambio de roles de las proteínas de

interés como carnada (en este caso PtpA) o presa (en este caso ECHA), es decir, realizar los ensayos de doble híbrido donde PtpA esté en el plásmido pMyr y ECHA en el plásmido pSOS.

Otra alternativa al uso del sistema de doble híbrido en levadura, es el uso de la técnica de doble híbrido en células de mamíferos (“mammalian two hybrid”), recomendado para el estudio de la interacción entre proteínas que presentan modificaciones post traduccionales como la fosforilación [He et al 2008]. Esto podría ser importante si la ECHA, no estuviera siendo fosforilada en la levadura y sobre todo si la fosforilación es importante para que este potencial sustrato sea reclutado por la enzima. Un control que debemos realizar es verificar la expresión de la ECHA y su fosforilación en tirosina en las células de levadura utilizadas. Esto es posible realizarlo ya que contamos con un anticuerpo específico para ECHA y anticuerpos específicos para fosfotirosin-proteínas.

En resumen, primero es importante poder contar con el gen ECHA sub-clonada en un plásmido de expresión para en el futuro continuar con los ensayos de interacción y cinética con PtpA. Por último lo que respecta a la estrategia de doble híbrido, sigue siendo necesario aumentar las réplicas de dicho experimento y adquirir experiencia en la lectura de los resultados tal como se mencionó anteriormente.

Bibliografía

- Bach, H., Papavinasasundaram, K. G., Wong, D., Hmama, Z. & Av-Gay, Y. Mycobacterium tuberculosis Virulence Is Mediated by PtpA Dephosphorylation of Human Vacuolar Protein Sorting 33B. *Cell Host and Microbe* **3**, 316-322 (2008).
- Beke-Somfai, T., Lincoln, P. & Norden, B. Rate of hydrolysis in ATP synthase is fine-tuned by ϵ -subunit motif controlling active site conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 2117-2122 (2013).
- Bergman, L. W. Growth and Maintenance of Yeast. *Two-Hybrid Systems* **177**, 009-014
- Bond, S. R. & Naus, C. C. RF-Cloning.org: An online tool for the design of restriction-free cloning projects. *Nucleic Acids Research* (2012). doi:10.1093/nar/gks396
- Bryksin, A. V. & Matsumura, I. Overlap extension PCR cloning: A simple and reliable way to create recombinant plasmids. *BioTechniques* **48**, 463-465 (2010).
- Chatterjee, A. *et al.* Biochemical and functional characterizations of tyrosine phosphatases from pathogenic and nonpathogenic mycobacteria: indication of phenyl cyclopropyl methyl-/phenyl butenyl azoles as tyrosine phosphatase inhibitors. *Applied Microbiology and Biotechnology* **99**, 7539-7548 (2015).
- Coelho, W. S., Costa, K. C. & Sola-Penna, M. Serotonin stimulates mouse skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase through tyrosine-phosphorylation of the enzyme altering its intracellular localization. *Molecular Genetics and Metabolism* **92**, 364-370 (2007).
- Correa, A. *et al.* Generation of a vector suite for protein solubility screening. *Frontiers in microbiology* **5**, 67 (2014).
- Cowley, S. C., Babakaiff, R. & Av-Gay, Y. Expression and localization of the Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase PtpA. *Research in Microbiology* **153**, 233-241 (2002).
- Czikora, I. *et al.* Characterization of the effect of TIMAP phosphorylation on its interaction with protein phosphatase 1. *Biochimie* **93**, 1139-45 (2011).
- Daniel, J., Maamar, H., Deb, C., Sirakova, T. D. & Kolattukudy, P. E. Mycobacterium tuberculosis uses host triacylglycerol to accumulate lipid droplets and acquires a dormancy-like phenotype in lipid-loaded macrophages. *PLoS Pathogens* **7**, (2011).
- Eaton, S. T., Bursby, M., Middleton, M., Pourfarzam, K., Mills, A. W., Johnson, A. W. & Bartlett, K. Unit Budihardjo, D. Human trifunctional protein deficiency. 93-98 (2000).
- Evans, P. R., Farrants, G. W., Hudson, P. J. & Britton, H. G. Phosphofructokinase: Structure and Control [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **293**, 53-62 (1981).
- Fould, B. *et al.* Structural and functional characterization of the recombinant human mitochondrial trifunctional protein. *Biochemistry* **49**, 8608-8617 (2010).

- Goubern, M., Andriamihaja, M., Nubel, T., Blachier, F. & Bouillaud, F. Sulfide, the first inorganic substrate for human cells. *The FASEB Journal* **21**, 1699-1706 (2007).
- Heinrich, J. N. *et al.* Disruption of ShcA signaling halts cell proliferation - Characterization of ShcC residues that influence signaling pathways using yeast. *Cellular Signalling* **18**, 795-806 (2006).
- Hornbeck, P. V. *et al.* PhosphoSitePlus, 2014: Mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Research* **43**, D512-D520 (2015).
- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* **96**, 23-28 (1990).
- Irving, B. V., Dra, O., Villarino, A. & Ramón, A. Avances en la utilización de la estrategia de doble híbrido para la validación de la interacción entre la fosfatasa de tirosina PtpA de Mycobacterium tuberculosis y sus potenciales sustratos identificados . 1-63 (2016).
- Jamwal, S. *et al.* Characterizing virulence-specific perturbations in the mitochondrial function of macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis. *Scientific reports* **3**, 1328 (2013).
- Kieser, K. J. & Rubin, E. J. How sisters grow apart: Mycobacterial growth and division. *Nature Reviews Microbiology* **12**, 550-562 (2014).
- Koul, A. *et al.* Cloning and Characterization of Secretory Tyrosine Phosphatases of Mycobacterium tuberculosis Cloning and Characterization of Secretory Tyrosine Phosphatases of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of bacteriology* **182**, 5425-5432 (2000).
- Margenat, M. *et al.* New potential eukaryotic substrates of the mycobacterial protein tyrosine phosphatase PtpA: hints of a bacterial modulation of macrophage bioenergetics state. *Scientific reports* **5**, 8819 (2015).
- Margenat, M., Dra, O., Villarino, A., Ana, D. & Ferreira, M. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas Fosfatasas en * rosina de Mycobacterium tuberculosis : avances en la iden * ficación de sustratos y posible rol en la adaptación de la bacteria al macrófago. (2016).
- McKinney, J. D. *et al.* Persistence of Mycobacterium tuberculosis in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* **406**, 735-738 (2000).
- Poirier, V., Bach, H. & Av-Gay, Y. Mycobacterium tuberculosis promotes anti-apoptotic activity of the macrophage by PtpA protein-dependent dephosphorylation of host GSK3 α . *Journal of Biological Chemistry* **289**, 29376-29385 (2014).
- Russell, D. G. Mycobacterium tuberculosis: here today, and here tomorrow. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* **2**, 569-577. (2001).
- Sambrook, J. Green, M. [*Molecular cloning of Tupaia belangeri chinensis neuropeptide Y and homology comparison with other analogues from primates*]. *Zool. Res.* **33**, (2012).
- Scherr, N. *et al.* Survival of pathogenic mycobacteria in macrophages is mediated through autophosphorylation of protein kinase G. *Journal of Bacteriology* **191**, 4546-4554 (2009).
- Segovia, D. Caracterización estructural y funcional de la única fosfatasa del virus Orf. (2016).
- Shin, J. H. *et al.* 1H NMR-based metabolomic profiling in mice infected with Mycobacterium

- tuberculosis. *Journal of Proteome Research* **10**, 2238-2247 (2011).
- Somashekar, B. S. *et al.* Metabolic profiling of lung granuloma in Mycobacterium tuberculosis infected guinea pigs: ex vivo 1H magic angle spinning NMR studies. *Journal of proteome research* **10**, 4186-95 (2011).
- Somashekar, B. S. *et al.* tuberculosis. (2012).
- Unger, T., Jacobovitch, Y., Dantes, A., Bernheim, R. & Peleg, Y. Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression. *Journal of Structural Biology* **172**, 34-44 (2010).
- Van Den Ent, F. & Löwe, J. RF cloning: A restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **67**, 67-74 (2006).
- Wang, J. *et al.* Mycobacterium tuberculosis suppresses innate immunity by coopting the host ubiquitin system. *Nature immunology* **16**, 237-45 (2015).

ANEXO A

3.2. Reactivos, medios y soluciones.

Clonado de ECHA y evaluación de clones

ADN polimerasa

- **Enzima High Fidelity Phusion DNA polimerasa** en una concentración final de 0.02U/ μ L y su buffer de enzima HF Phusion buffer 5X que ya contiene 7.5mM MgCl₂ (Thermo Scientific)
- **Enzima Toptaq DNA polimerasa** Qiagen 1.25 U/reacción y el buffer de enzima 10x Toptaq

Desoxinucleotidos trifosfato (dNTPs) mix 50X (Invitrogen)

Enzima DpnI 10U/ μ L (Thermo Scientific, #ER1701)

IPTG 1M isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (p.m 238.3): disolver 2g de IPTG en 8mL de agua destilada, ajustar luego el volumen de la solución a 10mL con agua destilada. Esterilizar por filtro de 0.22 μ m, separar en alícuotas de 1mL y conservar a -20°C

Fosfatasa FastAP thermosensitive alkaline phosphatase (Thermoscientific #EF0651)

Enzima T4 DNA ligasa 5U/ μ L (Thermo Scientific) y el buffer de enzima Buffer 10X T4 DNA

Transformación de células de *E. coli*

Medio LB (Lisogenic broth): medio utilizado para crecer *Escherichia coli* DH5- α .

Para 1 litro de medio: 10g de triptona, 5g de extracto de levadura, 10g de NaCl. Disolver en agua, ajustar volumen a 1L. Esterilizar en autoclave a 120°C durante 20min.

Medio LB agar (Lisogenic broth + agar): a 1L de LB agregar 15g de agar en polvo. Autoclavar.

Para obtener placas con agar 0.5 cm de espesor, estimar unos 30mL de medio de cultivo por placa.

Antibióticos Ampicilina Amp (10mg/mL) y Cloranfenicol Clor (10mg/mL)

Lisis alcalina de las colonias transformantes de *E. coli*

Solución I: 25 mM Tris-HCl pH 8.0 10 mM EDTA pH 8.0

Solución II: NaOH 200mM SDS 1%

Solución III: 3 M Acetato de Potasio. 11.5% (v/v) Ácido acético glacial

ARNasa 5µL del stock 10mg/mL

Isopropanol 100%

Etanol 70%

Agua MilliQ

Electroforesis en gel de agarosa 1%

Gel de agarosa 1% Agarosa 1 gramo cada 100mL de TAE 1X

TAE 1X: -Tris Acetato 20 mM, EDTA 2 mM, pH 8 - a partir de un stock 50x.

Reactivo Good View (SBS Genetech) 2µL por cada 50mL de gel para detectar la presencia de ácidos nucleicos por exposición al UV,

Buffer de carga 6X: glicerol 50%, azul de bromofenol 0.02%, xilencianol 0.002%

Marcador de pares de bases de ADN Thermo Scientific GeneRuler 1Kb DNA ladder 0.5µg/µL

Digestiones de los plásmidos

Enzimas de restricción

- HindIII (Thermo Cientific #ER0501 10U/µl) y el buffer de enzima 10X
- BamHI Thermo Cientific #ER0051 10U/µL y el buffer 10X de la enzima BamHI

Sistema doble híbrido:

Preparación de células de levadura competentes:

Medio YPAD: medio utilizado para el crecimiento de la levadura en medio líquido. Su composición es: extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2% y sulfato de adenina 0.4%. El mismo se esteriliza autoclavando 20min a 121°C.

Medio YPAD-agar: medio utilizado para el crecimiento de la levadura en placa. Su composición es igual al medio YPAD pero se le adiciona agar 2%.

Tampón Tris-EDTA/Acetato de litio (TE/LiAc): se preparó una solución de Tris-EDTA 10x definida como TE (40mL Tris-HCl 1 M pH 7.5, 8mL EDTA 0.5 M, csp 400mL de agua MiliQ) y una solución de acetato de litio 1M (PM: 102 g/mol). Se autoclavó por 20min a 121°C. Pos-

teriormente se mezclaron 10% acetato de litio 1 M, 10% TE y 80% de agua MRho y se filtró por 0.22 μm . Esta solución se puede guardar por unas semanas.

ADN de espermatozoos de salmón (SIGMA D9156)

Transformación de las células de levadura competentes:

Medio Mínimo: 0.67% de base nitrogenada Yeast Nitrogen base código 291940

Tampón TE/LiAc/PEG40%: 2 g de polietilenglicol (PM: 3350 g/mol) se disolvieron en un volumen final de 5mL de tampón TE/LiAc. Para favorecer la disolución se puede calentar a 37°C dejándolo enfriar antes de usar. Finalmente se filtró por 0.22 μm . Esta solución debe ser preparada en el día.

Medio Mínimo con glucosa-agar [SD/Glucosa (-UL)]: Utilizado para seleccionar los co-transformantes en el ensayo de doble híbrido El medio contiene base nitrogenada sin aminoácidos 0.17%, sulfato de amonio 0.5%, glucosa 2% y agar 1.7%. El volumen se debe ajustar a 900mL y autoclavar a 121°C por 1min (respetar el tiempo para evitar que el medio cambie a una consistencia blanda, tal como describe en manual *Growth and Maintenance of Yeast* (Bergman et al 2001). Luego agregarle 100mL de 10x solución de aminoácidos sin uracilo (URA) y leucina (LEU) previamente preparada como se describe a continuación.

Solución de aminoácidos sin leucina y uracilo: se preparó la solución 10x a partir de la mezcla de exclusión de aminoácidos comercial Clontech Triple Dropout Supplements -His/-Leu/-Ura (código 630423) 0.65g/litro de cultivo, esta mezcla puede ser autoclavada a 121°C por 15min. Luego se le adiciona 0.2% de Histidina previamente filtrada por 0.2 μm . Esta solución se agrega luego de autoclavar el medio. La omisión de LEU o URA en la solución selecciona para el plásmido pSos o pMyr, respectivamente. La omisión de ambos selecciona ambos plásmidos pSos y pMyr.

Medio mínimo con Galactosa-agar [SD/Galactosa (-UL)]: Utilizado para evaluar el éxito del doble híbrido. Está compuesto de base nitrogenada sin aminoácidos 0,17%, sulfato de amonio 0.5%, galactosa 2%, rafinosa 1% y agar 1.7%. Cuando se prepara 1 litro de medio se debe ajustar a un volumen de 900mL, se autoclava por 15min 121°C (respetar el tiempo). Una vez que se enfríe, se agregan 100mL de 10x solución de aminoácidos sin URA ni LEU, previamente preparada como se describe anteriormente.

ANEXO B

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
ECHA ClonF	ATGGTGGCCTGCCGGGCATTGGCATTCTCAGCCGCTTTTCTGCCCTCAGGATCTCCGCTCCGAGGTTATATATGCCGCARTTTACAGGGTCTTCGTCTTGCTGACCCAGACCCATATTAACATATG GGGCATC-TCAGCCGCTTTTCTGCCCTCAGGATCTCCGCTCCGAGGTTATATATGCCGCARTTTACAGGGTCTTCGTCTTGCTGACCCAGACCCATATTAACATATG													
ECHA Fggcatc.tcagccgcttttctgccttcaggatcctccgctcccagggttatatatgcccaatlttacagggtcttctgctttgctgaccagaacctatlaactatg													
R Consen-	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
ELHM ClonF	GAGTCAAGGGGATGTGGCAGTTGTTGCAATTAACCTCCCAATCAAGGTAATACACTGAGTAAGAGCTACATTCAGAGTTCTCAGAGTTATGAATGAATCTGGGCTAGTGTCAATCAGAG GAGTCAAGGGGATGTGGCAGTTGTTGCAATTAACCTCCCAATCAAGGTAATACACTGAGTAAGAGCTACATTCAGAGTTCTCAGAGTTATGAATGAATCTGGGCTAGTGTCAATCAGAG													
ECHA F	gagtcaaggggatgtggcagttgttcgaattaactctccaattcaaggttaatacaactgagtaagagctacattcagagttctcagaagttatgaatgaaatctgggctagtatcaaatcagaag													
R Consen-	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
ECHA ClonF	TGCCGTCCTTATCTCATCAAGCCAGGCTGCTTTATTGCAAGGTGCTGATATCAACATGTTAGCCGCTTGCAGAGCCCTTCAGAGTACACAGCTATCACAGAAGCACAGAGATAGTTGAGAACTT TGCCGTCCTTATCTCATCAAGCCAGGCTGCTTTATTGCAAGGTGCTGATATCAACATGTTAGCCGCTTGCAGAGCCCTTCAGAGTACACAGCTATCACAGAAGCACAGAGATAGTTGAGAACTT													
ECHA F	tgccgtccttctcatcaaacaggctgctttattgcaggtgctgatatacaatgtagccgcttcaagaccctcaagaagtacacagctacacaagaagcacagagaatagttgagaactt													
R Consen-	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
ECHA ClonF	GAAAAGTCCACAAAGCCTATTGTGGTGCATCAATGGATCTGCCTGGGAGGAGGACTTGAGGTTGCCATTTATGCCAATACAGATAGCACAAAGACAGAAAACAGTATTAGGTACCCCTGAAG GAAAAGTCCACAAAGCCTATTGTGGTGCATCAATGGATCTGCCTGGGAGGAGGACTTGAGGTTGCCATTTATGCCAATACAGATAGCACAAAGACAGAAAACAGTATTAGGTACCCCTGAAG													
ECHA F	gaaaagtccacaagcctattgtggctgccatcaatggatcctgctgggaggaggacttgaggttgcatttcatgccaatacagaatagcaacaaaagacagaaaaacagatattagtagccctgaag													
R Consen-	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
ECHA ClonF	TTTTGCTGGGGGCTTACCAGGAGCAGGAGGCACACAAAGGCTGCCAAATGGTGGTGTGCTGCTCTTTGGACATGATGCTGACTGGTAGAGCATTCTGTCAGACAGGGCAAGAAATGGGACT TTTTGCTGGGGGCTTACCAGGAGCAGGAGGCACACAAAGGCTGCCAAATGGTGGTGTGCTGCTCTTTGGACATGATGCTGACTGGTAGAGCATTCTGTCAGACAGGGCAAGAAATGGGACT													
ECHA F	ttttgctgggggcttaccaggagcaggaggcacacaaaggctgccaaaatggtgggtgtgcctgctgctttggacatgatgctgactggtagaagcattcgtgcagacagggcaagaaaaaggact													
R Consen-														
ECHA F	ttttgctgggggcttaccaggagcaggaggcacacaaaggctgccaaaatggtgggtgtgcctgctgctttggacatgatgctgactggtagaagcattcgtgcagacagggcaagaaaaaggact													
R Consen-														
ECHA F	ggttgaccaactggtggaaccctgggaccaggactaaaacctccagaggaaacgacaatagaatacctagaagaagttgcaatlaactttgccaaggactagctgataagaagatctctcaaaagaga													
R Consen-														
ECHA F	ggttgaccaactggtggaaccctgggaccaggactaaaacctccagaggaaacgacaatagaatacctagaagaagttgcaatlaactttgccaaggactagctgataagaagatctctcaaaagaga													
R Consen-														
ECHA F	GACAGGGATTGGTGGAAAATTGACAGCGTATGCCATGACTATCCATTTGTCCAGGCACAGGTTTACAAAAGTGGAGAAAAGTGGCAAGCAGACTAAGGCCCTTATCTGCACCTCTGAAAA GACAGGGATTGGTGGAAAATTGACAGCGTATGCCATGACTATCCATTTGTCCAGGCACAGGTTTACAAAAGTGGAGAAAAGTGGCAAGCAGACTAAGGCCCTTATCTGCACCTCTGAAAA													
R Consen-	gacaaggattggtggaataattgacagcgtatgccatgactattccatttgcaggcaacaggttacaacaaaagtggaaagaaaagtcgaaagcagactaaaggccttattcctgcacctctgaaa													
ECHA F	GACAGGGATTGGTGGAAAATTGACAGCGTATGCCATGACTATCCATTTGTCCAGGCACAGGTTTACAAAAGTGGAGAAAAGTGGCAAGCAGACTAAGGCCCTTATCTGCACCTCTGAAAA GACAGGGATTGGTGGAAAATTGACAGCGTATGCCATGACTATCCATTTGTCCAGGCACAGGTTTACAAAAGTGGAGAAAAGTGGCAAGCAGACTAAGGCCCTTATCTGCACCTCTGAAAA													
R Consen-	gacaaggattggtggaataattgacagcgtatgccatgactattccatttgcaggcaacaggttacaacaaaagtggaaagaaaagtcgaaagcagactaaaggccttattcctgcacctctgaaa													
ECHA F	TAATTGATGTGGTAAGACTGGARTTGGCAGGGAGTGTGCGGGTATCTCTGTGARTCTCA-GAAATTTGGAGAG--CTTGTAATGACC-ARAAGAT-CAAGGGCTTG-ATGGGACTCT--ACCAT TAATTGATGTGGTAAGACTGGARTTGGCAGGGAGTGTGCGGGTATCTCTGTGARTCTCA-GAAATTTGGAGAG--CTTGTAATGACC-ARAAGAT-CAAGGGCTTG-ATGGGACTCT--ACCAT TCCGGAAATTA--GACCAAAAGGAGGATACCCGGTTTATTCT-TGAAATTTCAAGAAATTTGGAGAGGCTTGTAATGGCCAAAGARTCAAGGCCCTTGATGGGATTTTACCAT taatlgaigtggaagactggaatlgagcaggagtgatgcccgttattctctgtagaactca.gaaatTTGGAG..CTTGTAATGACC,ARAAGAT,CAAGGGCTTG,ATGGGACTct.,ACCAT													
R Consen-	taatlgaigtggaagactggaatlgagcaggagtgatgcccgttattctctgtagaactca.gaaatTTGGAG..CTTGTAATGACC,ARAAGAT,CAAGGGCTTG,ATGGGACTct.,ACCAT													
ECHA F	GGT-CAGGCTCTGTG--CAAGAAGAAATTAATTTGGAGCTCCACAGAGGATGTTAAGCAT-CTGGCTATTCTTGGTGACGGGCT-GATGGGAGC-AGGCATCGCCAG--TCTCCGTGGATAGGGGCT GGT-CAGGCTCTGTG--CAAGAAGAAATTAATTTGGAGCTCCACAGAGGATGTTAAGCAT-CTGGCTATTCTTGGTGACGGGCT-GATGGGAGC-AGGCATCGCCAG--TCTCCGTGGATAGGGGCT GGTCAAGTCTTGGCCAGAGAAATTAATTTGAGGCTCCACAGAGGATGTTAAGCATCTGCTATTCTTGGTGACGGGCTGATGGGAGCAGGCATCGCCAGGTTTCCGTGGATAGGGGCT GGT.CAGGtCtGtG.,CAAGAAGAAATTAATTTGAGGCTCCACAGAGGATGTTAAGCAT,CTGctTATTCTTGGTGACGGGCT,GATGGGAGC,AGGCATcGCCaAg.,TcTCCGTGGATAGGGGCT													
R Consen-	GGT.CAGGtCtGtG.,CAAGAAGAAATTAATTTGAGGCTCCACAGAGGATGTTAAGCAT,CTGctTATTCTTGGTGACGGGCT,GATGGGAGC,AGGCATcGCCaAg.,TcTCCGTGGATAGGGGCT													
ECHA F	AAGACTATCTTAAGATGCCACCTCTACTGCGCTAGACCGAGGACAGCAACAGTGTTCARAGGATTGARTGACARAGTGAGAGAAAGCTCTAATCATTTT-GAAGGGATTCCATCTT-CAGCA AAGACTATCTTAAGATGCCACCTCTACTGCGCTAGACCGAGGACAGCAACAGTGTTCARAGGATTGARTGACARAGTGAGAGAAAGCTCTAATCATTTTGAAGGGATTCCATCTT-CAGCA AAGACTATCTTAAGATGCCACCTCTACTGCGCTAGACCGAGGACAGCAACAGTGTTCARAGGATTGARTGACARAGTGAGAGAAAGCTCTAATCATTTT-GAAGGGATTCCATCTT-CAGCA AAGACTATCTTAAGATGCCACCTCTACTGCGCTAGACCGAGGACAGCAACAGTGTTCARAGGATTGARTGACARAGTGAGAGAAAGCTCTAATCATTTT-GAAGGGATTCCATCTT-CAGCA AAGACTATCTTAAGATGCCACCTCTACTGCGCTAGACCGAGGACAGCAACAGTGTTCARAGGATTGARTGACARAGTGAGAGAAAGCTCTAATCATTTT-GAAGGGATTCCATCTT-CAGCA													
R Consen-	AAGACTATCTTAAGATGCCACCTCTACTGCGCTAGACCGAGGACAGCAACAGTGTTCARAGGATTGARTGACARAGTGAGAGAAAGCTCTAATCATTTT-GAAGGGATTCCATCTT-CAGCA													

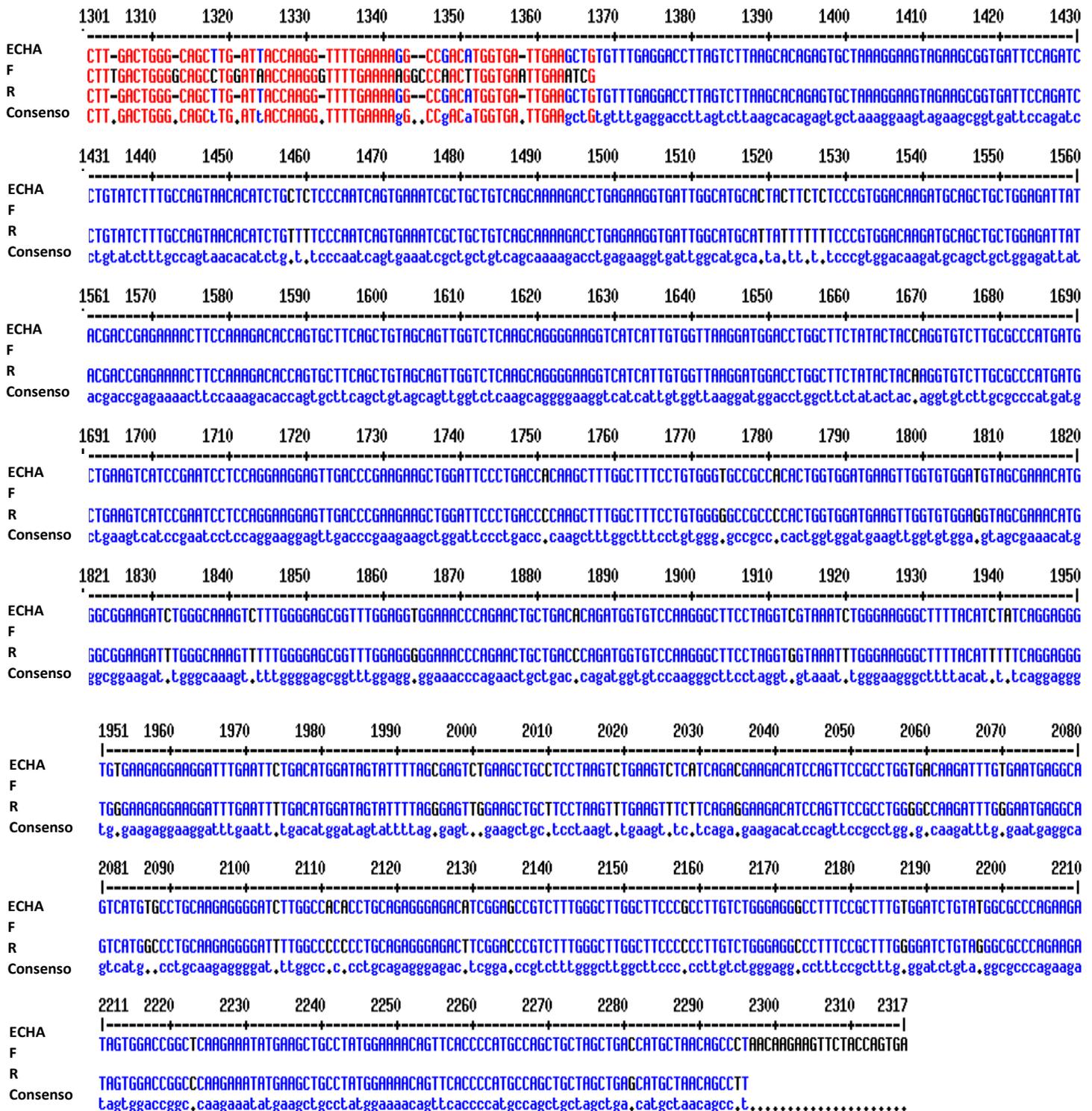


Figura x. Alineamiento de la secuencia de ECHA clonada en pMyr con la secuencia consenso de ECHA.

ECHA: secuencia consenso de gen de ECHA extraída de Uniprot (P40939).

F: producto secuenciación utilizando cebador directo específico de ECHA.

R: producto secuenciación utilizando cebador reverso específico de ECHA.

Figura tomada de la tesina de graduación de Lic. Vivian Irving [Irving et al 2016]

ANEXO C

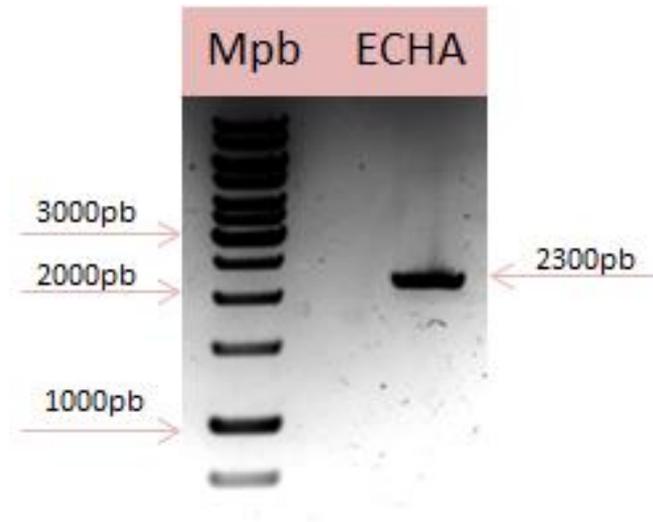


Figura A separación por electroforesis de repetición de la PCR1 de la metodología RF-Cloning carril 1: MPM: GeneRuler 1Kb DNA Ladder #SM0311, carril 2: producto de la PCR1

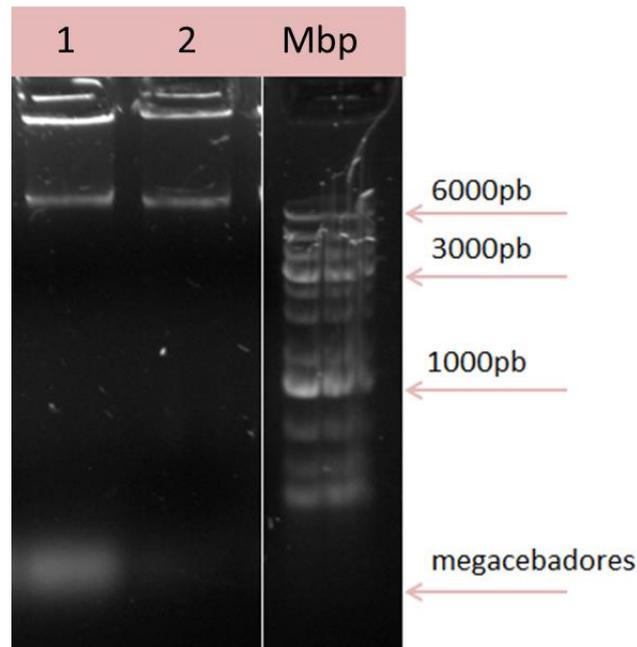


Figura B Electroforesis de las PCR en colonia de los clones obtenidos tras una nueva transformación. Carril 1: PCR en colonia utilizando el pool de colonias obtenido luego de la transformación con el producto de PCR2 tras la repetición completa (PCR1, PCR2) del ensayo de RF-cloning; carril 2: PCR en colonia utilizando el pool de colonias tratadas con DpnI y transformadas el mismo día; Mpb GeneRuler 1Kb DNA Ladder #SM0311

