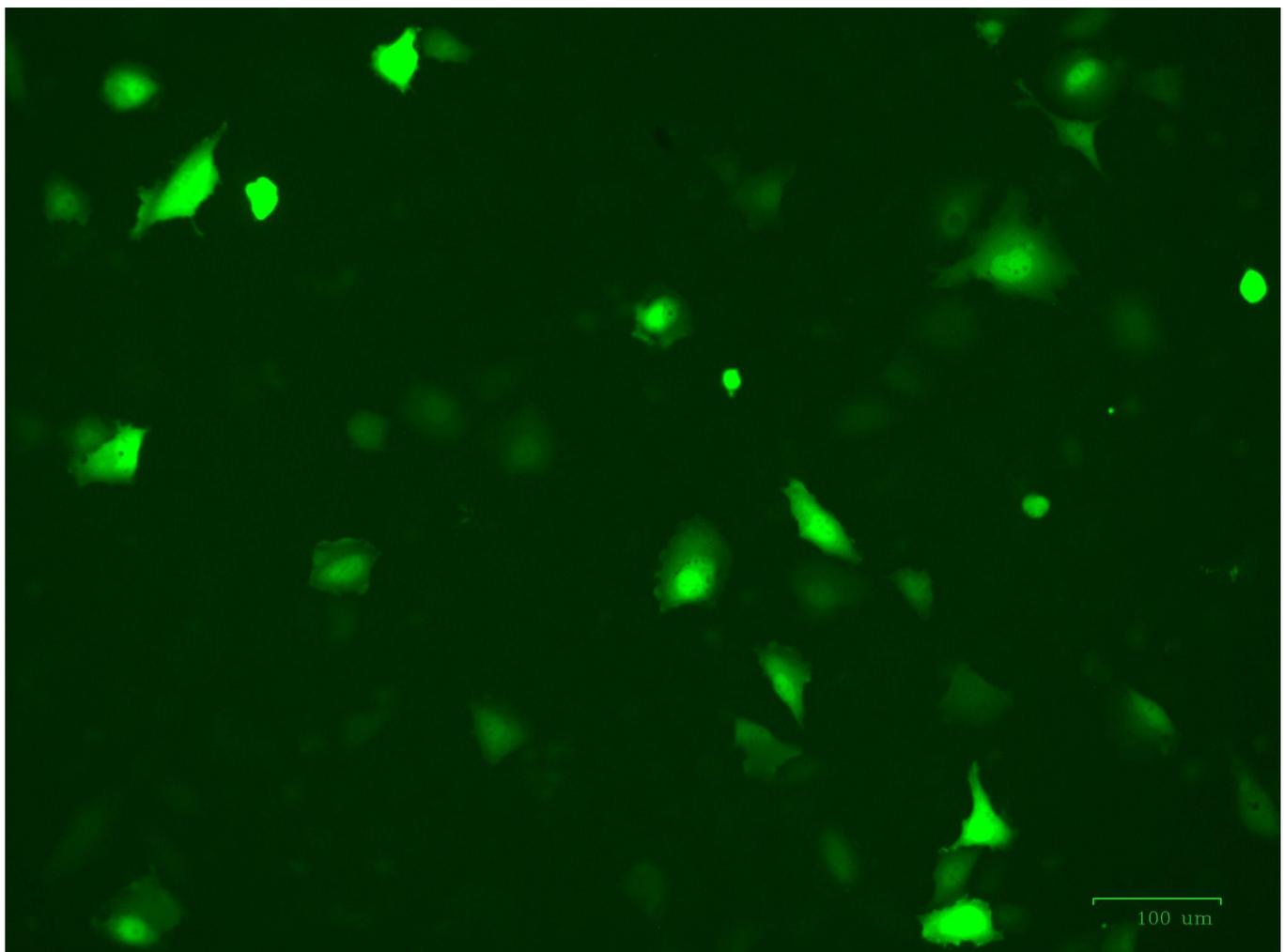


Tesina para optar al Título de Licenciada en Ciencias Biológicas

**Optimización de la transfección de células HeLa para la
expresión de la fosfatasa OH1 del virus Orf y la evaluación
de cambios en la fosforilación
del factor de transcripción STAT-1**

Gabriela Morandi Cóppola



Tutora: Andrea Villarino

Co-tutora: Mabel Berois

*Montevideo,
Uruguay 2022*

Agradecimientos

A las Dras. Andrea Villarino y Mabel Berois, por aceptarme como estudiante, orientarme y compartir conmigo toda su experiencia.

Al hermoso grupo de la 314 de la Sección Bioquímica, que llenaron de alegría el día a día. En especial a Vivian Irving, amiga y compañera de todas las horas, y a Sebastián Vigo, con quien compartimos muchas horas de trabajo y risas.

A mi familia, en especial a mi madre, sin ellos nada de esto sería posible.

A Juan, Valentín y Tomás, mi todo.

Resumen

El virus Orf (familia *Poxviridae*, género *Parapoxvirus*) es el causante del Ectima Contagioso, enfermedad zoonótica que afecta principalmente ovinos y caprinos. Esta enfermedad provoca importantes pérdidas económicas en el sector agropecuario. Las re-infecciones son frecuentes, lo que lleva a suponer que la expresión de diferentes factores de virulencia le permiten al virus evadir el sistema inmune rápidamente, evitando que se desencadene una respuesta inmune adaptativa robusta. Entre dichas proteínas se encuentra la fosfatasa de tirosina OH1. Se ha reportado que la expresión de OH1 en células HeLa se corresponde con una disminución en el nivel de fosforilación (en la Tyr 701) del factor transcripcional STAT-1, de la vía JAK/STAT, factor relevante en la activación de la respuesta inmunitaria mediada por interferón. Además, la infección con el virus Orf de células HeLa estimuladas con INF γ , reprime la respuesta transcripcional, disminuyendo el nivel de fosforilación de STAT-1. Por otro lado, nuestro grupo constató la interacción *in vitro* entre OH1 y STAT-1. Además se observó el mismo nivel de inhibición en la translocación de STAT-1 al núcleo en células HeLa que expresan la fosfatasa OH1 viral salvaje o el mutante inactivo OH1-C112S. Este resultado nos permitió plantear como hipótesis que la etapa limitante de la reacción fosfatasa es el reclutamiento de STAT-1 por un sitio diferente al sitio activo de OH1. Esto se vió apoyado por resultados *in vitro* que muestran que el ortovanadato de sodio (inhibidor competitivo que compite por el sitio activo de OH1) no disocia la interacción de OH1 recombinante con STAT-1 de extractos celulares. En la presente tesina se buscó profundizar en el estudio de OH1 y la evaluación de cambios en la fosforilación del factor de transcripción STAT-1. Para ello se buscó en una primera etapa optimizar la transfección de células HeLa, utilizando para esto un plásmido control pHSV (pHSV-IRES-EGFP) portador del gen de la proteína verde fluorescente (EGFP) utilizada como reportero. Para llevar a cabo este primer objetivo, inicialmente se obtuvieron los plásmidos de interés necesarios para las transfecciones en cantidad y calidad adecuada, y se puso en funcionamiento el cultivo de las células HeLa, definiendo la cantidad de células a utilizar. Se lograron buenos resultados en cuanto a porcentajes de transfección (35%) con el vector control, aunque se podría haber seguido optimizando, pero se optó por seguir adelante con los siguientes objetivos. En una segunda etapa se aplicó el protocolo seleccionado en la transfección de células HeLa con los vectores portando el gen de OH1 salvaje y mutante (pHSV-OH1_{WT}-IRES-EGFP y pHSV-OH1_{C112S}-IRES-EGFP respectivamente). Se logró transfectar las células HeLa con los plásmidos previamente mencionados, obteniéndose menores porcentajes (del 11 al 29%) de transfección respecto a los obtenidos con el vector control. Posteriormente se evaluó el nivel de fosforilación de STAT-1 en los extractos proteicos obtenidos a partir de las células transfectadas. Como resultado esperado se observó el aumento del nivel de P-STAT-1 en las células inducidas con interferón no transfectadas. Además, se observó un resultado similar en el caso de las células transfectadas con el plásmido que porta el gen inactivo de OH1 y un menor aumento en el caso de las células transfectadas con el plásmido que porta el gen de OH1 salvaje. Esto va en acuerdo con lo que era esperado para nuestra hipótesis, pues si OH1 es activa y actúa sobre P-STAT-1 se espera disminuya el nivel de fosforilación, y para OH1 inactiva no debería afectar. Sin embargo, para las células transfectadas con el plásmido control (pHSV-IRES-EGFP) no se observó lo esperado. En este caso se esperaba un nivel de fosforilación de STAT-1 similar al obtenido para las células inducidas no transfectadas, pero se observó un nivel menor de fosforilación de STAT-1. En un futuro será importante realizar nuevas réplicas del experimento para poder determinar si estos cambios detectados son significativos. Así como evaluar otro tipo de aproximaciones como ser Cell sorting, de forma de analizar únicamente la población EGFP positiva.

Introducción

El virus Orf pertenece a la familia *Poxviridae*, sub-familia *Chordopoxvirinae*, género *Parapoxvirus*. Como representantes de esta misma familia, pero del género *Orthopoxvirus*, se encuentran el virus de la Viruela humana y el virus *Vaccinia* que afecta a bovinos. Este último virus fue utilizado para generar la vacuna utilizada para erradicar la Viruela humana (Henderson, 2011). Las consecuencias de la infección con los distintos tipos de *Poxvirus* pueden variar desde una enfermedad grave con alta mortalidad, a infecciones benignas que se resuelven en poco tiempo (Hosamani et al., 2009; Bratke et al., 2013). El virus Orf es un virus envuelto cuya estructura interna consta de un “core” donde se empaqueta el genoma de ADN viral, este “core” está rodeado a su vez por dos estructuras proteicas llamadas cuerpos laterales. Su genoma es de ADN lineal, doble hebra, de aproximadamente 140 kpb, con extremos cerrados covalentemente conteniendo secuencias repetidas invertidas (ITRs). Tiene un tamaño aproximado de 260 nm de largo y 160 nm de ancho, presenta forma ovoide y su superficie está cubierta por estructuras largas y tubulares que asemejan a un “ovillo de lana” (Figura 1) (Nandi et al., 2011).

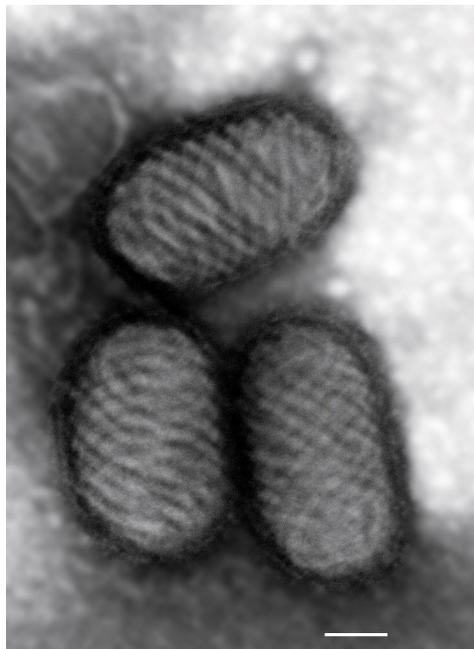


Figura 1: Microfotografía electrónica de partículas virales de ORFV. Se puede observar el patrón de “ovillo de lana”, característico de los *Parapoxvirus* (Imágen tomada de Olivero, 2012).

El Ectima contagioso (EC) es la enfermedad causada por el virus Orf, es una enfermedad zoonótica distribuida globalmente. El EC es una infección proliferativa de la piel y mucosas que afecta principalmente a ovinos y caprinos, pero al ser zoonótica también infecta animales domésticos, rumiantes salvajes e incluso humanos. Pudiendo estos últimos, contagiarse al estar en contacto con otros animales así como con el ambiente infectado (Fairley et al., 2008; Hosamani et al., 2009; Nandi et al., 2011). El ingreso del virus Orf a sus hospederos ocurre a través de abrasiones o lesiones en la piel, normalmente a nivel de la piel de los labios, mucosa oral, párpados y alrededor de las fosas nasales (Figura 2).

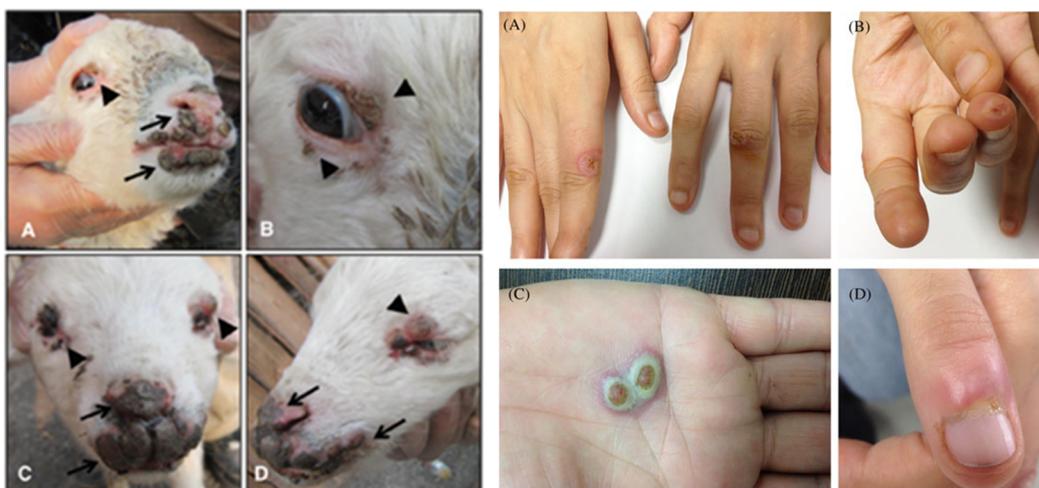


Figura 2: En la imagen se muestran lesiones típicas producidas por una infección de virus ORF tanto en ovinos como en manos de humanos. En ovinos se indica con flechas las lesiones a nivel de la boca y fosas nasales y con puntas de flechas las lesiones en los párpados. Para ovinos, las imágenes fueron extraídas del trabajo de Wang, R. y Luo, S. 2018 y para humanos fue extraída de Bergqvist et al., 2017

Las lesiones suelen comenzar como un eritema que evoluciona en vesícula, pústula y por último en costra (Bergqvist et al., 2017; Wang y Luo, 2018). Esta enfermedad presenta una alta morbilidad y baja tasa de mortalidad, sin embargo, la zona donde se producen las lesiones puede ocasionar en los animales la incapacidad de alimentarse, y a su vez, éstas pueden ser puerta de entrada a infecciones secundarias, dificultando que los animales alcancen el peso ideal y en muchos casos aumentando la tasa de mortalidad. Usualmente, la resolución de la infección en animales suele tomar de unas cuatro a seis semanas (Hosamani et al., 2009). Las costras formadas son ricas en partículas virales, que pueden desprenderse del animal y ser una fuente de contagio a partir del ambiente donde se encuentra el animal infectado (Bergqvist et al., 2017). El

virus Orf es resistente en el ambiente, resiste el secado y congelado permaneciendo viable en el suelo durante meses o años, particularmente si se mantiene asociado al material de las costras (Nandi et al., 2011).

Existen vacunas contra el virus Orf, pero estas son producidas en base a virus vivo atenuado por medio de múltiples pasajes en cultivo celular o *in vivo*. Sin embargo, si bien estas vacunas limitan la severidad de la infección, no son capaces de generar una inmunidad a largo plazo y las re-infecciones por el virus Orf son comunes incluso en animales vacunados (Bergqvist et al., 2017). De hecho, se han reportado brotes de EC a partir de cepas vacunales (Gilray et al., 1998). Estas características hacen que su presencia en rebaños suponga pérdidas económicas importantes. De hecho, se encuentra dentro de las primeras 20 enfermedades de mayor impacto en ovinos y caprinos en países en desarrollo (Hosamani et al., 2009). En Uruguay es una enfermedad que está ampliamente distribuida. Fue confirmada la presencia del virus desde el año 2007 por microscopía electrónica y desde el 2008 se diagnostica por PCR. En nuestro país existe vacunación, no obstante, se han detectado algunos casos de animales afectados en rebaños previamente vacunados (Olivero, 2012).

El virus Orf se caracteriza por tener un ciclo de replicación que ocurre en su totalidad en el citosol de la célula hospedera (Bratke et al., 2013; Nandi et al., 2011). En comparación a otros virus, presenta una gran autonomía respecto a la célula ya que codifica su propia maquinaria de transcripción y replicación de ADN (Nandi et al., 2011). Durante su ciclo, los poxvirus expresan una amplia gama de proteínas que modifican el ambiente extra e intracelular de la célula infectada. Estas proteínas virales modulan una gran cantidad de respuestas antivirales que son activadas por la infección viral, algunas de ellas con una función anti-inflamatoria, jugando esto un papel esencial para completar el ciclo viral en el hospedero. Las re-infecciones son frecuentes, lo que lleva a suponer que la expresión de los diferentes factores de virulencia le permiten al virus evadir el sistema inmune rápidamente, evitando se desencadene una respuesta inmune adaptativa robusta. Entre dichas proteínas se encuentra la fosfatasa de tirosina OH1 (Haig y McInnes, 2002).

Esta fosfatasa es una fosfatasa de fosfo-tirosina (Segovia, 2016; Segovia et al., 2017), homóloga a la fosfatasa VH1 del virus Vaccinia. En el caso de VH1, se ha demostrado que dicha proteína es transportada dentro de la partícula viral e introducida en el citosol durante la infección, donde actúa desfosforilando proteínas virales y celulares como el factor de transcripción STAT-1 (Liu et al., 1995; Mann et al.,

2008). La estructura y función de OH1 han sido caracterizadas *in vitro* por nuestro grupo, y constituye la primera estructura representante de las fosfatasa del género Parapoxvirus (Segovia, 2016). OH1 pertenece a la familia de las fosfatasa de especificidad dual, es decir, es capaz de desfosforilar tanto residuos de fosfo-tirosina como de fosfo-treonina o fosfo-serina. Nuestro grupo demostró que además de la especificidad dual, OH1 es capaz de desfosforilar fosfo-inositol fosfatos. Esto último resulta relevante ya que el virus Orf se espera deba modular el tráfico vesicular durante la generación de nuevas partículas virales recubiertas de membrana. El sitio activo de OH1 presenta los motivos conservados que caracterizan a los miembros de la familia de fosfo-tirosin fosfatasa (sigla en inglés PTPs), observándose el bucle de unión a fosfato que contiene la Cys 112 catalítica responsable del ataque nucleofílico de la P-Tyr del sustrato y el bucle conteniendo al aspartato catalítico Asp81 (Figura 3). La estructura cristalográfica y experimentos bioquímicos realizados por nuestro grupo demostraron que OH1 es un dímero covalente estabilizado por un puente disulfuro que involucra la Cys 15 de cada monómero. Además, al igual que el grupo de Harvey y colaboradores (Harvey et al., 2015; Porley, 2017) se demostró que la expresión de OH1 en células HeLa se correspondió con la desfosforilación del factor transcripcional STAT-1 en la Tyr 701. Este factor de transcripción constituye un componente esencial en la activación de la respuesta inmune generada por el interferón gamma (INF γ , así como el INF-I), la misma tiene un rol importante en la activación de la vía JAK/STAT del hospedero, al actuar sobre el factor de transcripción STAT-1 (Harvey et al., 2015).

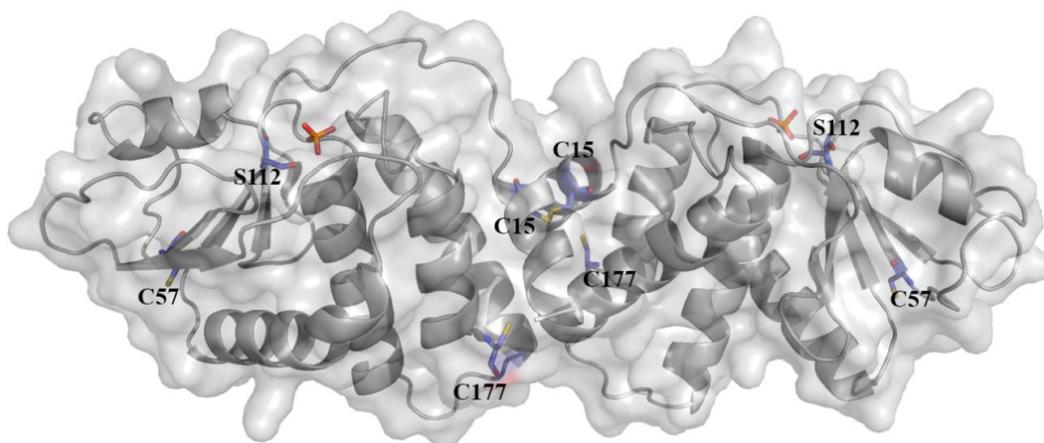


Figura 3: Representación en diagrama de cintas de la estructura del dímero de OH1 (mutante C112S). Se pueden apreciar las diferentes cisteínas de la proteína, incluyendo la implicada en la dimerización (C15). En el caso de la cisteína C112S, ésta fue reemplazada por una serina para evitar su oxidación, lo que facilitó la obtención de cristales que difractan los rayos X y permitió la resolución de la estructura cristalográfica (Segovia, 2016).

La vía de transducción de señales JAK/STAT transmite información recibida a partir de polipéptidos extracelulares (citoquinas como interferón) que se unen a receptores transmembrana, lo que activa una cascada de señalización que resulta en la activación de la transcripción de genes nucleares. La consecuencia de este reconocimiento (interacción) es una rápida reprogramación en la expresión de los genes de esta célula. Esta vía se encuentra conservada en organismos eucariotas, desde mohos, gusanos, moscas a vertebrados, pero está ausente en hongos y plantas. En mamíferos se encuentran siete tipos diferentes de proteínas de STAT, STAT-1, STAT-2, STAT-3, STAT-4, STAT-5A, STAT-5B, y STAT-6 y cuatro tipos de quinasas JAKs, JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2 lo que le da a las células una gran diversidad de respuesta a diferentes estímulos. El mensajero extracelular una vez reconocido por un receptor de superficie celular específico, activa la dimerización del mismo y la subsecuente activación de las quinasas en tirosina JAK, las que se encuentran constitutivamente asociadas al receptor. Residuos de tirosina específicos del receptor son entonces fosforilados por las JAKs activadas y sirven como sitios de anclaje para las proteínas STAT. Seguidamente, los STAT son fosforilados por las JAKs, y forman dímeros que dejan el receptor para ser translocados al núcleo celular, donde activan la transcripción de genes. Esto lleva a una rápida reprogramación de la expresión de genes en la célula (Figura 4) (Aaronson y Horvath, 2002).

La vía JAK-STAT está regulada en múltiples niveles. Algunos ejemplos son fosfatasas que remueven el fosfato del STAT fosforilado, proteínas supresoras de la señalización por citoquinas (SOCs) que se unen a JAKs e inhiben su actividad, proteínas que median la degradación de JAKs por la vía de ubiquitinación y proteínas Inhibidoras de STATs (PIAS) que actúan en el núcleo y median la inhibición de la activación de la transcripción por parte de STAT, entre otros (Shuai y Liu, 2003). En la activación de la vía de señalización JAK/STAT mediada por Interferón, se inducen genes implicados en la respuesta inmune innata que le permite al hospedero limitar la expansión viral, mientras que se desencadena la respuesta inmune adaptativa.

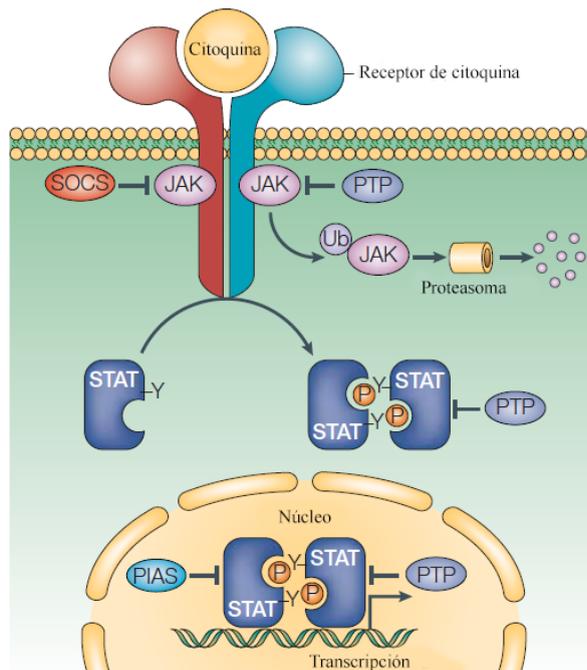


Figura 4. Esquema representando la vía de transducción de señales JAK/STAT. La unión de un ligando (en esta imagen la citoquina) al receptor, desencadena el reclutamiento de la proteína STAT al receptor, la cual es fosforilada por la quinasa en tirosina JAK. Una vez fosforilada, la proteína P-STAT forma un dímero (involucrando al dominio SH2 y la Tyr fosforilada) el que será translocado al núcleo celular donde activará la transcripción de genes implicados en la respuesta antiviral. La vía JAK/STAT es regulada en todos los niveles como se muestra en la figura (Shuai y Liu, 2003).

En el caso de STAT-1, las células estimuladas con interferón desencadenan una cascada de activación por fosforilación que resulta entre otras cosas en la fosforilación específica de la Tyr 701 de STAT-1 citoplasmática. Para actuar como factor de transcripción STAT-1 debe dimerizar y ser translocado desde el citosol al núcleo. La dimerización involucra la fosforilación de la Tyr 701 de STAT-1 y el dominio estructural capaz de reconocer la P-Tyr, denominado SH2 (Figura 5). Así, una vez fosforilada dicha Tyr, la P-Tyr de cada monómero es reconocida por el dominio SH2 del otro monómero de STAT-1, estabilizándose el dímero, el cual es translocado al núcleo donde activa la transcripción de múltiples genes relacionados a la respuesta antiviral celular (Aaronson y Horvath, 2002). En condiciones fisiológicas STAT-1 se encuentra en un equilibrio entre dos conformaciones diméricas llamadas paralela y anti-paralela. Se ha propuesto que en ausencia de estimulación por INF γ , STAT-1 se encuentra en el citoplasma en su forma anti-paralela inactiva. Cuando se estimulan las células eucariotas con INF γ , el STAT-1 anti-paralelo citoplásmico es fosforilado en la Tyr 701 (p-Tyr 701), lo que desplazaría el equilibrio hacia la forma paralela, la cual sería la responsable de interactuar con el ADN en el núcleo y funcionar como factor activador de la transcripción (Mao et al., 2005; Mertens et al., 2006).

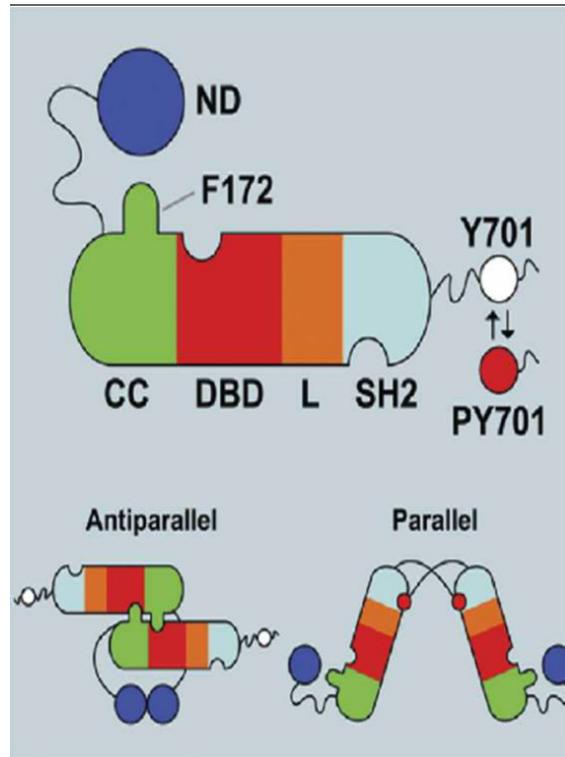


Figura 5. Esquema de dominios y estructuras de STAT1. Se indican los dominios N-terminal (ND), de hélice superenrollada (CC), dominio de unión al ADN (DBD), de unión (L) y SH2. En el extremo C-terminal de STAT-1 se indica la ubicación de la tirosina 701 (Tyr 701) en su estado desfosforilado (blanco) o fosforilado (rojo). En la parte inferior de la imagen se diagrama la forma anti-paralela y paralela de STAT1. Imagen adaptada de (Mertens et al., 2006).

El grupo de Harvey y colaboradores demostró que la infección con partículas virales de Orf en células HeLa estimuladas con INF γ , reprime la respuesta transcripcional, y correlaciona con una disminución del nivel de fosforilación de STAT-1 en la Tyr701. Sin embargo, este efecto se ve reducido al tratar las células con un inhibidor competitivo y reversible de fosfatasa (el ortovanadato de sodio), lo que indica la participación de una fosfatasa. Esto concuerda con el resultado de estos mismos autores, en el que muestran que la expresión transitoria de OH1 en células HeLa también correlaciona con una disminución en el nivel de fosforilación de STAT-1 en la Tyr701 (Harvey et al., 2015). Por otro lado, nuestro grupo demostró la interacción entre OH1 y STAT-1 *in vitro*, mostrando a nivel celular el efecto de OH1 en la inhibición de la translocación de STAT-1 al núcleo de células HeLa, lo que sugiere a STAT-1 como sustrato fisiológico de OH1 (Porley, 2017). Un aspecto relevante, es que el mutante inactivo de OH1-C112S también fue capaz de inhibir la translocación de STAT-1 al núcleo con la misma eficiencia que la forma salvaje de OH1. Esto llevó a nuestro grupo a plantear como hipótesis que la etapa limitante de la reacción es que OH1 reclute en una primera

etapa a STAT-1 por un sitio diferente al sitio activo de OH1, y que luego en una segunda etapa este sea desfosforilado. Esto se vio apoyado también por resultados que se obtuvieron que muestran que el ortovanadato de sodio (inhibidor competitivo que se une al sitio activo de OH1) no era capaz *in vitro* de disociar la interacción de OH1 con STAT-1 (Porley, 2017). En este contexto, era importante demostrar si el efecto de OH1 en la translocación de STAT-1 al núcleo se asocia también con la actividad de OH1 sobre STAT-1. Para ello, nuestro grupo realizó ensayos preliminares de transfección utilizando plásmidos pHSV en los cuales se introdujo la fosfatasa viral OH1 salvaje y al mutante inactivo OH1-C112S en células HeLa. Sin embargo los resultados no fueron concluyentes, lo que motivó a que en la presente tesina se busque optimizar la transfección en células HeLa con el vector que porta el gen de OH1 salvaje o su forma inactiva. De esta manera se podría contar con más experimentos que permitan evaluar si el estado de fosforilación de STAT-1 se correlaciona con la actividad de OH1.

Hipótesis

La expresión de la fosfatasa viral OH1 salvaje se correlaciona con la desfosforilación del factor de transcripción STAT-1.

Objetivo general

Avanzar en el estudio de la acción de la fosfatasa viral OH1 sobre el factor de transcripción eucariota STAT-1.

Objetivos específicos

- 1)** Poner a punto la transfección de células HeLa, utilizando el vector control pHSV-IRES-EGFP.
- 2)** Evaluar la transfección de las células HeLa con el plásmido pHSV portando el gen de la fosfatasa viral OH1 salvaje (pHSV-OH1_{WT}-IRES-EGFP) y plásmido portando el gen de OH1 inactiva (pHSV-OH1_{C112S}-IRES-EGFP).
- 3)** Evaluar en extractos proteicos obtenidos a partir de las células transfectadas si existen cambios en la fosforilación de STAT1 que correlacionen con la actividad de OH1.

Materiales y métodos

En el Anexo-C se describe la composición de *buffers* y soluciones utilizadas en la tesina. Todos los reactivos comerciales utilizados fueron de calidad analítica.

Para la puesta a punto del modelo de transfección en células HeLa fue necesario en primer lugar obtener los plásmidos de interés en cantidad y calidad adecuada, así como poner en cultivo las células HeLa. A continuación se describen las metodologías utilizadas.

i) **Producción y purificación de los plásmidos de interés**

Los plásmidos utilizados en este trabajo fueron: el plásmido control (pHSV-IRES-EGFP), plásmido portando el gen de la OH1 salvaje (pHSV-OH1_{WT}-IRES-EGFP) y plásmido portando el gen de la OH1 inactiva (pHSV-OH1_{C112S}-IRES-EGFP), todos ellos disponibles en el laboratorio, generados, secuenciados y verificados durante la tesis de maestría del Lic. D. Porley (Porley, 2017). El plásmido pHSV cuenta de 6248 pares de bases (pb) y contiene un bloque de expresión que permite la inserción del gen de interés bajo un promotor temprano del virus Herpes simple tipo 1 (HSV-1), seguido de un elemento IRES (sitio interno de entrada al ribosoma) que favorece el reclutamiento de ribosomas para la traducción, y el gen de la proteína verde fluorescente (EGFP) utilizada como reportero (Figura 6).

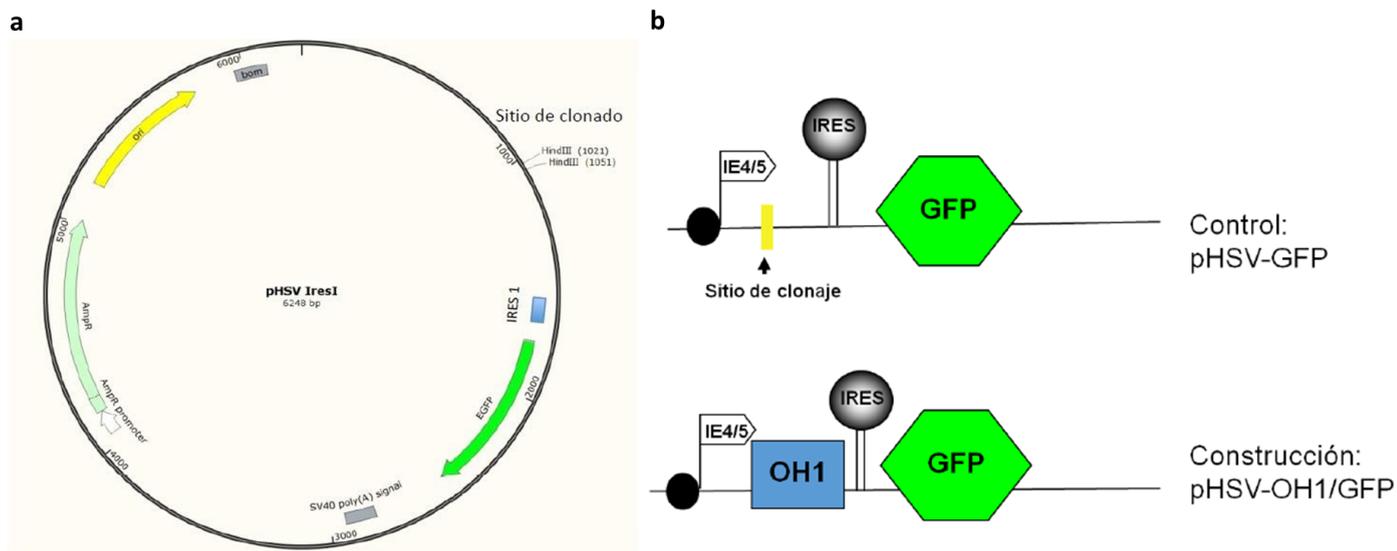


Figura 6. En (a) se muestra un esquema del plásmido pHSV-IRES-EGFP. En (b) se muestra un esquema de cassette de expresión del plásmido control pHSV-IRES-EGFP y del plásmido conteniendo el gen de OH1. Se indican las ubicaciones de las secuencias correspondientes a la fosfatasa OH1, el gen reportero de la proteína verde fluorescente (GFP), el sitio de entrada interno de ribosomas (IRES), el promotor inmediatamente temprano del virus Herpes (IE4/5) y el sitio de clonaje múltiple.

Para la expansión de dichos plásmidos se realizaron pre-cultivos en medio LB líquido utilizando los stocks disponibles de *Escherichia coli DH5α*, ya transformados y conservados en 20% Glicerol a -80°C. En cada caso, se inoculó un volumen de 50 mL de medio LB conteniendo 50 µg/mL de ampicilina, en un matraz de 250 mL. Se incubó a 37 °C, bajo agitación a 220 rpm durante toda la noche (ON). Transcurrido este tiempo, se recuperaron las células bacterianas mediante centrifugación a 4500 rpm a temperatura ambiente (TA) por 10 min y se descartó el sobrenadante (SN). El pellet de células obtenido se lisó para purificar los plásmidos siguiendo el protocolo de kit comercial *NucleoBond Xtra Maxi* (Macherey-Nagel Cód N° 740 416.50) o el protocolo de kit comercial *GeneJET Plasmid Miniprep* (Thermo, #K0503), dependiendo de la cantidad de material necesario. Dichos procedimientos fueron realizados numerosas veces en el correr de este trabajo para cubrir la necesidad de nanogramos necesarios de ADN a utilizar en cada transfección. El ADN plasmídico obtenido se cuantificó como se describe en el siguiente punto, se alicuotó, y se conservó a -20 °C hasta su utilización.

ii) *Cuantificación de ácidos nucleicos y análisis mediante electroforesis en geles de agarosa*

Las preparaciones de cada plásmido purificado se cuantificaron mediante espectrofotometría a 260 nm en un espectrofotómetro (equipo Nanodrop Lite, Thermo Scientific). Este equipo permite también determinar el nivel de pureza de cada muestra mediante el registro de la relación Abs_{260nm}/Abs_{280nm} , siendo el criterio aceptable de pureza un valor igual o mayor a 1,8. Por otro lado, para confirmar la integridad de los plásmidos se analizó el perfil electroforético de la digestión de éstos con la enzima Hind III (Fermentas FastDigest HindIII). En su maestría D.Porley utilizó esta enzima de restricción para clonar el gen de la fosfatasa viral (tanto la wt como la mutante) en el plásmido pHSV-IRES-EGFP (Porley, 2017), por lo cual al hacer la digestión con la misma se esperan 2 fragmentos, uno de 550 pb correspondiente al gen de OH1 y otro de 6248 pb correspondientes al plásmido pHSV-IRES-EGFP. En la tabla 1 se indican los volúmenes utilizados de los componentes involucrados en la reacción de digestión de los plásmidos con la enzima HindIII.

Tabla 1. Digestión de los plásmidos con Hind III. Se muestran los volúmenes utilizados de los componentes involucrados en la reacción de digestión con la enzima HindIII de los plásmidos pHSV-IRES-EGFP, pHSV-OH1_{WT}-IRES-EGFP y pHSV-OH1_{C112S}-IRES-EGFP. La última columna corresponde al control que se realizó con el plásmido control sin la enzima HindIII, adicionando en su lugar agua. La concentración de ADN en cada caso fue de 0,1 µg/µL de reacción.

	pHSV-IRES-EGFP	pHSV-OH1 _{WT} -IRES-EGFP	pHSV-OH1 _{C112S} -IRES-EGFP	pHSV-IRES-EGFP Sin digerir
H ₂ O	16 µL	15 µL	16 µL	16 µL
Buffer FD	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
ADN	1 µL	2 µL	1 µL	1 µL
Enzima FD Hind III	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL de H2O

Las muestras se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % preparado en *buffer* Tris-Acetato-EDTA 0,5x (TAE) y conteniendo 1 µL de reactivo GoodView (GoodView, SBS HGV-II) por cada 25 mL de gel. Este reactivo, es un agente intercalante de ácidos nucleicos que permite su visualización por exposición al UV o fluorescencia (530 nm). Las muestras sembradas se prepararon en *buffer* de carga 6x (6X DNA Loading Dye, Thermo Scientific #RO611) hasta alcanzar una concentración final 1x. Como marcador de pares de bases se utilizó GeneRuler 1 kb DNA Ladder (SM0314 Thermo Scientific). Las electroforesis se realizaron en una cuba Electrophoresis Cell (DZCP-31BN, #296-3) en *buffer* TAE 0.5x, a 80 V durante un tiempo promedio de 40 min. Luego de transcurrida la electroforesis, el gel se colocó sobre el transiluminador (Bromma LKB, 2011 Macrovue) y rápidamente se adquirieron las imágenes con una cámara fotográfica Gel Logic 112 (Carestream). Mediante análisis de las imágenes, también se pudo estimar la concentración de cada plásmido purificado, correlacionando la intensidad de las bandas de interés con las del marcador comercial con tamaño semejante y concentración conocida.

iii) **Cultivo de la línea celular HeLa**

La línea celular HeLa (ATCC CCL-2) deriva de células epiteliales de cuello uterino humano (*Homo sapiens*) con adenocarcinoma. Para la puesta en cultivo se descongeló una semilla del stock de células HeLa disponible en el laboratorio, preservada en nitrógeno líquido. El descongelamiento del criotubo se realizó en baño de agua a 37°C, luego se las colocó en una placa p100 con 10 mL de medio completo DMEM (Gibco #12320-032, stock 1x, conteniendo, antibióticos y antimicótico a una concentración final de 1x (Gibco #15240062, stock 100x), suero fetal bovino (SFB) a una concentración

final de 10% (descomplementado, 1h a 56 °C) y L-Glutamina a una concentración final de 1x (Gibco #25030081, stock 100x). Esto permite además diluir el criopreservante celular dimetil sulfóxido (DMSO), el cual es tóxico para las células a alta concentración y temperatura ambiente. Todos los medios de cultivo y otras soluciones utilizadas con las células fueron previamente termostatzadas a 37°C, para evitar cualquier estrés celular que pueda afectar la viabilidad y respuesta a evaluar. Posteriormente, se dejó incubando las células ON a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂. Al día siguiente se observó las células en el microscopio invertido (Nikon, eclipse TS100) para evaluar si estas se adhirieron a la placa (células vivas) y si presentan su morfología característica (comparando con imágenes de la ATCC y experiencia del grupo en esta línea). Además, se realizó un cambio de medio para eliminar completamente el DMSO del cultivo celular. Para el mantenimiento de la línea se observaron las células cada 24 o 48 hrs controlando su estado y crecimiento. Se procedió a realizar un cambio de medio siempre y cuando fuera necesario teniendo en cuenta el aspecto y la densidad celular observada. En los casos que la densidad era muy elevada, se bajó el número de células mediante un procedimiento que se denomina pasaje de células. Teniendo en cuenta, que las células HeLa se adhieren a la superficie y crecen en monocapa fue necesario disgregar las mismas mediante la incubación con una solución de Tripsina (Gibco, TrypLE™ Express Enzyme 1X, #12604013), una proteasa que rompe la matriz proteica que une a las células entre ellas y a la superficie de la placa. Para realizar los pasajes de células se retiró completamente el medio de cultivo, luego, se lavó la monocapa con 1 mL de solución de tripsina 1x, posteriormente se retiró el lavado y se volvió a colocar 1 mL de la misma solución y se incubó a 37°C por un tiempo de 3 min. Pasado este tiempo, se observaron las células a simple vista y en el microscopio invertido para verificar que se habían despegado de la superficie de la placa y entre ellas. Una vez logrado esto, se neutralizó la acción de la Tripsina agregando medio de cultivo DMEM completo. En los ensayos realizados en placas de 12 pocillos (p12), que fue necesario desprender las células para un posterior análisis, también se realizó el mismo procedimiento pero utilizando un volumen de 200 µL tanto de tripsina como de medio DMEM completo. Se evaluó cuando fue necesario la densidad del cultivo mediante conteo celular en cámara Neubauer (Marienfeld) utilizando un microscopio invertido. Para ello, se realizó una dilución de las células en suspensión (en este caso al tercio, 100 µL del cultivo en 200 µL de medio) y se tomó 20 µL, suficiente para cargar completamente la cámara Neubauer. Se observó en el microscopio invertido, y se realizó el conteo de células en los 4 cuadrantes laterales de la grilla de la cámara Neubauer.

Luego, el número total de células (suma de recuento de los cuatro cuadrantes) se divide entre 4 para obtener el número promedio de células que hay en 0,1 mm³ de suspensión. Para obtener el número promedio de células por cm³ o mL, se multiplica este valor por 10.000 y por el factor de dilución (en este caso 3).

Una vez obtenidos los plásmidos en cantidad y calidad adecuada, y puesto en funcionamiento el cultivo de células HeLa, se procedió a optimizar el ensayo de transfección.

iv) *Puesta a punto del ensayo de transfección de células HeLa con el plásmido control pHSV-IRES-EGFP*

Al inicio de este trabajo, se contaba con un protocolo inicial para la realización de la transfección en células HeLa en placas p24 (área pocillo de 2 cm²) con lipofectamina LTX y PLUS reagent utilizado por D.Porley (Porley, 2017). En esta tesina se buscó optimizar el mismo para un número mayor de células, por lo cual se utilizó placas p12 (área pocillo de 4 cm²). Esto tuvo como finalidad contar con un mayor número de células y así obtener más cantidad de proteína, necesaria para abordar el objetivo 3. Para ello, se realizaron en placas p12 transfecciones de células HeLa con el plásmido control pHSV-IRES-EGFP utilizando Lipofectamina LTX y PLUS reagent (Thermo Fisher, #15338100).

La transfección celular, es un método que permite incorporar ácidos nucleicos en células eucariotas. Se utilizó en este caso el método de lipofección, donde el reactivo de transfección a base de liposomas es una sustancia química que permite la formación de agregados lipídicos (lípidos-ADN) cargados positivamente, que podrían fusionarse sin problemas con la bicapa de fosfolípidos de la célula huésped, para permitir la entrada de materiales genéticos extraños con una resistencia mínima. Posteriormente, mediante un proceso de endocitosis el complejo de transfección entra al citoplasma celular (Jo y Tabata, 2008; Chong et al., 2021) y se transporta al núcleo. Ha sido sugerido que el mecanismo implicado en el transporte al núcleo involucra la difusión pasiva de los plásmidos a través del citoplasma y los poros nucleares. Sin embargo, existe evidencia que sugiere el uso de señales de importación del ADN al núcleo (Iglesias et al., 2015).

En la tabla 2 se indican las condiciones de cada transfección realizada en este trabajo de tesis. Los parámetros que se variaron fueron la confluencia celular de la monocapa de HeLa, la cantidad de ADN, la cantidad de lipofectamina y condiciones en la incubación con los complejos ADN/lipofectamina. El protocolo general consistió en

agregar en un tubo eppendorf, en el siguiente orden, 200 μ L de medio Optimem (Gibco #51985-034, stock 1x), junto a el volumen de ADN plasmídico necesario, conteniendo los nanogramos deseados. Esta mezcla se agitó vigorosamente y posteriormente se agregó el reactivo *PLUS reagent* a una relación de 1 μ l por cada μ g de ADN. Se mezcló suavemente y se dejó incubar dicha mezcla por 5 minutos a TA. Transcurrido este tiempo se agregó el volumen deseado de Lipofectamina LTX, se mezcló gentilmente y luego se dejó incubar durante 30 min a TA. En paralelo, unos 10 min antes de completarse el tiempo, se retiró el medio DMEM completo de los pocillos de la placa p12, se lavó con 1 mL de medio Optimem previamente termostatzado a 37 °C, y se colocó en cada pocillo 500 μ L de Optimem. Al completar los 30 min de incubación de la mezcla conteniendo el ADN con el *PLUS reagent* y la Lipofectamina LTX, se agregó ésta en cada pocillo de la placa p12, por goteo (utilizando una micropipeta) en forma cuidadosa y en espiral desde los bordes exteriores hacia el centro del pocillo. Finalmente, se incubó 24 hrs a 37 °C y 5 % CO₂, tiempo adecuado para permitir la expresión de la proteína EGFP. Una vez seleccionada la mejor condición de transfección se procedió a realizar los ensayos con los plásmidos portando el gen de la fosfatasa salvaje y el mutante inactivo (pHSV-OH1_{WT}-IRES-EGFP y pHSV-OH1_{C112S}-IRES-EGFP) y el plásmido control (pHSV-IRES-EGFP) (transfecciones 6, 7 y 8 de la tabla 2). En estos ensayos habiendo transcurrido 16h (*over night*, ON), tiempo necesario para la expresión de las proteínas de interés, se procedió a estimular las células con INF γ , con el fin de activar la respuesta inmune mediada por interferón y de esta manera promover la activación de la vía JAK/STAT. STAT-1 es un factor de transcripción el cual, al estimular las células con INF γ es fosforilado por las quinasas JAKs, se dimeriza y es translocado al núcleo donde actúa activando la expresión de genes implicados en la respuesta antiviral, cosa que no ocurrirá en las células sin estimular. Se utilizaron 2,5 unidades de INF γ por millón de células, diluido en PBS 1x - BSA 1%. Para ello, se realizaron diluciones del stock de INF γ (Gibco #PHC4031) conservado en hielo (1000 unidades/ μ L). Una vez pronta la dilución final de interferón a utilizar se procedió a retirar el medio de transfección de los pocillos (con una confluencia celular del 80%), se colocó 500 μ L de la dilución de interferón y se dejó incubar a 37°C entre 30 min-1hr. Luego de transcurrido dicho tiempo se realizaron dos lavados con PBS 1X, se retiró y agregó 100 μ L *buffer* de lisis a cada pocillo, se resuspendió y colocó dicho extracto en un tubo eppendorf almacenado a -20 °C hasta su tratamiento.

Tabla 2. Condiciones utilizadas en cada una de las transfecciones realizadas. Los experimentos 1, 2,3,4 y 5 se utilizaron para el objetivo 1 (optimización de transfección), y los experimentos 6, 7 y 8 para los objetivos 2 y 3.

Variaciones de las condiciones de Transfección						
Experimento de transfección No. <ul style="list-style-type: none"> ● ng de ADN ● μL Lipo ● μL Plus reagent ● % de confluencia celular final 	Al inicio del procedimiento se retiró medio DMEM completo de cada pocillo.	Previo al agregado de los complejos ADN/lipo se agregó o lavó cada pocillo con medio Optimem.	Condiciones de agregado e incubación con los complejos ADN/lipo.	Transcurridas 16h (ON) se agregó medio DMEM.	Procedimiento que se realizó con el SN de cada pocillo luego de la transfección.	Análisis que se realizó posteriormente con la muestra.
Experimento de transfección No. 1 con pHSV-IRES-EGFP <ul style="list-style-type: none"> ● ng de ADN: 750 ng ● μL Lipo: 0,75, 1,5 Y 2,5 μL ● μL Plus reagent: 0,75 μL ● % de confluencia celular:80% (400.000 células) 	No	No	- Se agregó sobre 1 mL de DMEM 10% SFB que ya tenía la monocapa.	No	-SN se descartó. -Monocapa se levantó con Tripsina y se analiza en citometría	- Citometría
Experimento de transfección No. 2 con pHSV-IRES-EGFP <ul style="list-style-type: none"> ● ng de ADN: 750 ng ● μL Lipo: 0,75, 1,5 y 2,5μL ● μL Plus reagent: 0,75 μL ● % de confluencia celular: 100% (500.000 células) 	Sí	-Se lavó con 1 mL de medio y se retiró.	-Se agregó directamente sobre la monocapa sin medio. -Se incubó por 2h a 37°C con el complejo ADN/lipo. -Luego se agregó 200 μ L de Optimem.	-Se agregó 1 mL de DMEM 10% SFB sin ATB.	- SN se descartó. -Monocapa se levantó con Tripsina y se analiza en citómetro	- Citometría - Dosificación de proteína (BCA)
Experimento de transfección No. 3 con pHSV-IRES-EGFP <ul style="list-style-type: none"> ● ng de ADN: 750 y 1500 ng ● μL Lipo: 1,5 y 2,5 μL ● μL Plus reagent: 0,75 y 1,5 μL respectivamente. ● % de confluencia celular: 50% (250.000 células) 	Sí	-Se lavó con 1 mL de medio y se retiró. - Se agregó 150 μ L.	- Se agregó sobre los 150 μ L de Optimem. - Se incubó por 4 hrs, con agitación manual cada 30 min, a 37°C con el complejo ADN/Lipo. -Luego se agregó 700 μ L DMEM 10% SFB sin ATB.	No	-SN se une a lo levantado con tripsina. y se analiza todo en citómetro	- Microscopía de epifluorescencia - Citometría - Dosificación de proteína (BCA)

<p>Experimento de transfección No. 4 con pHSV-IRES-EGFP</p> <ul style="list-style-type: none"> • ng de ADN: 1500 y 2500 ng • μL Lipo: 1,5 μL • μL Plus reagent: 1,5 y 2,5 μL respectivamente. • % de confluencia celular: 50% y 70% (250.000-300.000 células) 	Sí	<ul style="list-style-type: none"> - Se lavó con 1 mL de medio y se retiró. - Se agregó 500 μL. 	- Se agregó sobre 500 μ L de optimem	-Se agregó 1 mL de DMEM 10% SFB sin ATB	-SN se une a lo levantado con tripsina. y se analiza todo en citómetro	- Citometría
<p>Experimento de transfección No. 5 con pHSV-IRES-EGFP</p> <ul style="list-style-type: none"> • ng de ADN: 750, 1500 y 2500 ng • μL Lipo: 0.75 Y 1,5 μL • μL Plus reagent:0,75, 1,5 y 2,5 μL respectivamente. • % de confluencia celular:80% (400.000 células) 	Sí	<ul style="list-style-type: none"> - Se lavó con 1 mL de medio y se retiró. -Se agregó 500 μL. 	-Se agregó sobre 500 μ L de Optimem	No	<ul style="list-style-type: none"> - SN se descartó. -Monocapa se levantó con Tripsina y se analiza en citómetro 	<ul style="list-style-type: none"> - Microscopía de epifluorescencia - Citometría
<p>Experimento de transfección No. 6 con pHSV-IRES-EGFP pHSV-OH1_{WT}-IRES-EGFP pHSV-OH1_{C112S}-IRES-EGFP</p> <ul style="list-style-type: none"> • ng de ADN: 2500 ng • μL Lipo: 0,75 μL • μL Plus reagent: 2,5 μL • % de confluencia celular: 80% (400.000 células) 	Sí	<ul style="list-style-type: none"> - Se lavó con 1 mL de medio y se retiró. -Se agregó 500 μL. 	-Se agregó sobre 500 μ L de Optimem.	No	<ul style="list-style-type: none"> - SN se descartó. -Monocapa se levantó con Tripsina y se analiza en el citómetro. 	<ul style="list-style-type: none"> - Microscopía de epifluorescencia - Citometría
<p>Experimento de transfección No. 7 con pHSV-IRES-EGFP pHSV-OH1_{WT}-IRES-EGFP pHSV-OH1_{C112S}-IRES-EGFP</p> <ul style="list-style-type: none"> • ng de ADN: 2500 ng • μL Lipo: 0,75 μL • μL Plus reagent: 2,5 μL • % de confluencia celular: 80% (400.000 células) 	Sí	<ul style="list-style-type: none"> - Se lavó con 1 mL de medio y se retiró. -Se agregó 500 μL. 	-Se agregó sobre 500 μ L de Optimem	No	<ul style="list-style-type: none"> - SN se descartó. -Monocapa se levantó con Tripsina y se analiza en citómetro 	<ul style="list-style-type: none"> - Inducción con INFγ - Microscopía de epifluorescencia - Citometría - Dosificación de de proteína (BCA) - Electroforesis SDS-PAGE y Western blot
<p>Experimento de transfección No. 8 con pHSV-IRES-EGFP pHSV-OH1_{WT}-IRES-EGFP pHSV-OH1_{C112S}-IRES-EGFP</p> <ul style="list-style-type: none"> • ng de ADN: 2500 ng • μL Lipo: 0,75 μL • μL Plus reagent: 2,5 μL • % de confluencia celular: 80% (400.000 células) 	Sí	<ul style="list-style-type: none"> - Se lavó con 1 mL de medio y se retiró. -Se agregó 500 μL. 	-Se agregó sobre 500 μ L de Optimem	No	- SN se descartó.	<ul style="list-style-type: none"> - Inducción con INFγ - Microscopía de epifluorescencia

v) **Microscopía de epifluorescencia**

Luego de cada transfección se analizó el éxito de la misma mediante la evaluación de la presencia de focos fluorescentes en las células utilizando un

microscopio de epifluorescencia (BioRad, ZOE Fluorescent Cell Imager). La presencia de focos fluorescentes en verde indican la expresión de la EGFP debida a la transfección. En los casos en los que se utilizó el plásmidos portando el gen de la fosfatasa OH1 viral (pHSV-OH1_{WT}-IRES-EGFP y pHSV-OH1_{C112S}-IRES-EGFP) reflejará también, indirectamente, la expresión de la fosfatasa ya que este gen se encuentra clonado en el pHSV antes del gen de la EGFP. En cada ensayo, se registraron imágenes de diferentes campos representantes de lo observado en cada pocillo. Se tomaron dos imágenes, una en campo claro que permite obtener una foto de las células y otra utilizando el canal verde que permite visualizar los focos fluorescentes en verde. Una vez obtenidas estas imágenes, se generó con ellas una tercera imagen que combinó las dos anteriores, lo que permitió verificar y visualizar que los focos fluorescentes se encuentran dentro de las células y no se trata de partículas autofluorescentes presentes en el medio.

vi) ***Citometría de flujo***

En algunos de los ensayos se agregó el análisis por citometría de flujo para evaluar no solo la transfección sino también la viabilidad celular. Una de las ventajas de esta estrategia es que permite evaluar un número mayor de eventos que al utilizar el microscopio, lo que permite sacar conclusiones con mayor peso estadístico. Así, luego de la observación por microscopía de epifluorescencia y toma de imágenes, se despegaron las células con tripsina siguiendo el protocolo descrito en el punto (iii) para placas p12. Una alícuota de dicha suspensión celular (250 µL) se analizó en el citómetro BD Accuri C6, evaluando en cada muestra un total de 20.000 eventos.

La citometría de flujo es un método analítico que permite medir características físicas y químicas de células o partículas suspendidas en líquido, gracias a que estas partículas producen de forma individual una alteración en la dirección de la luz, al interferir con la fuente de esta. Esta luz se detecta en dos posiciones diferentes, por una parte se detecta la luz dispersa hacia adelante (en inglés "forward scattered light", FSC) brindando así la información sobre el tamaño de la partícula, y por otra parte la luz dispersa a un ángulo de 90 grados (en inglés "side scattered light", SSC) que informa sobre la complejidad o granulosidad de esa partícula (componentes celulares) (Barrera et al., 2004; March y Eiros, 2012). En cada muestra analizada se determinó el porcentaje de células transfectadas (células que expresan la EGFP) y porcentaje de células muertas.

Para conocer las características de dicha población y familiarizarnos con el equipo el análisis se inició con un cultivo de células HeLa sin transfectar. Se realizó como primer

paso una gráfica FSC-A (área) vs. FSC-H (altura) de forma de discriminar y eliminar del análisis los eventos que se corresponden con “dobletes” de células individuales, así como también los pequeños detritos celulares (eventos más cercanos al 0). Se le llama doblete al evento contabilizado como uno, que ocurre cuando dos células pasan al mismo tiempo frente al haz de luz, estos eventos tienen la misma altura que una única célula, pero el área es dos veces mayor. Así, se creó un *gate*, definido como P1, que consideró los eventos más cercanos a la diagonal de dicho gráfico lo que permite excluir los dobletes. Una vez seleccionado P1, se realizó el gráfico SSC vs FSC, donde se visualiza la granulosis vs tamaño de dicha población. En este gráfico se ajusta la selección de eventos, eliminando aquellos que se alejan de la nube de eventos más concentrada, nube que contiene los eventos con características más homogéneas. Así se define el *gate* de células intactas como “HeLa”. Los siguientes análisis serán siempre en base a los “eventos” que se encuentren dentro de este *gate* “HeLa”.

Para evaluar la viabilidad celular se incubó a las células con el marcador fluorescente Ioduro de Propidio (Propidium iodide, Invitrogen, #BMS500PI) (se utilizó 2 μ L para 400 μ L de muestra), el cual se intercala en el ADN de las células cuya membrana se encuentra comprometida (células no viables) dando lugar a una fluorescencia roja (detectable en el canal FL3 del citómetro) (Riccardi y Nicoletti, 2006). Inicialmente, se evaluó por citometría si el porcentaje de muerte era el mismo en células HeLa tratadas o no con PI. Esto permite evaluar si la concentración final que se utiliza de PI es adecuada y no resulta tóxica para las células. Para ello, se compararon los histogramas obtenidos en cada caso visualizados al graficar los eventos vs FL3-A. Esto permitió fijar un umbral inferior a partir del cual se considerarán que los eventos corresponden a células muertas (a la derecha de dicho umbral). El equipo informa el porcentaje de ambos lados del límite del umbral marcado en el histograma. Dado que el *gate* “HeLa” no contiene todos los eventos del *gate* P1 (y esto varía entre las diferentes transfecciones), fue necesario corregir los % que nos da el equipo, considerando el *gate* “HeLa” como 100%. Esta normalización permite comparar el resultado de las diferentes muestras. A continuación se analizaron todas las muestras correspondientes a los distintos ensayos de transfección y se calculó el porcentaje de células muertas. Para evaluar la fluorescencia en verde debida a la EGFP se procedió de manera similar, pero estableciendo el umbral en el canal FL1-A de los histogramas de los eventos vs FL1-A. Luego de ajustados los parámetros se analizaron las muestras de las células tratadas con las distintas condiciones de transfección. Los porcentajes de células muertas y de

fluorescentes en verde se calcularon eliminando previamente la contribución de células muertas o autofluorescentes presentes en los controles de las células sin transfectar.

vii) ***Cuantificación de la concentración proteica en los extractos obtenidos***

Se obtuvieron los extractos proteicos luego de lisar las células HeLa con *buffer* de lisis tipo Ripa. Se cuidó durante todo el procedimiento mantener la cadena de frío para enlentecer procesos como proteólisis y desfosforilación. A continuación se centrifugó a 12.000 rpm por 30 min a 4°C y se recuperó el SN el cual se utilizó para la cuantificación de proteínas. En los casos en los que no se analizó el mismo día dichos SN se conservaron a -20 °C. Para la cuantificación de la concentración proteica se utilizó inicialmente el método Bradford adaptado a placas de 96 pocillos. El método se basa en la interacción del azul de Coomassie G-250 con residuos de Arg, Trp, His y Phe, presentes en las proteínas. Esta interacción provoca un corrimiento en el espectro de absorción del azul de Coomassie desde el marrón hacia el color azul, el cual es detectable mediante la medida de la Abs_{595nm} . Sin embargo, debido a que verificamos que componentes del *buffer* de lisis interfirieron con el ensayo, se decidió utilizar el método del ácido bicinónico (BCA, protein assay kit, Thermo #23225) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ensayo de BCA combina la conocida reducción de Cu^{+2} a Cu^{+1} por las proteínas en un medio alcalino con la detección colorimétrica altamente sensible y selectiva del catión cuproso (Cu^{+1}) por BCA. El primer paso es la quelación del cobre con proteínas en un ambiente alcalino para formar un complejo azul claro. En esta reacción, conocida como reacción de biuret, los péptidos que contienen tres o más residuos de aminoácidos forman un complejo de quelato coloreado con iones cúpricos en un ambiente alcalino que contiene tartrato de sodio y potasio. En el segundo paso de la reacción de desarrollo del color, BCA reacciona con el catión reducido (cuproso) que se formó en el paso uno. El producto de reacción de color púrpura intenso resulta de la quelación de dos moléculas de BCA con un ion cuproso. El complejo BCA/cobre es soluble en agua y exhibe una fuerte absorbancia lineal a 562 nm con concentraciones de proteína crecientes. Para ambos ensayos se realizó en paralelo una curva de calibración (Abs vs mg/mL BSA) utilizando soluciones de concentración conocida de BSA (entre 0.1 mg/mL -1 mg/mL), se ajustaron los valores obtenidos a una recta y se utilizó la ecuación de la recta para determinar la concentración de las muestras problema.

viii) ***Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección de STAT-1***

Las proteínas de los extractos proteicos obtenidos se separaron según su peso molecular mediante SDS-PAGE utilizando cubas de electroforesis BioRad (Mini-PROTEAN Tetra Cell 165-8000). Se prepararon geles siguiendo el protocolo descrito en el manual BioRad de 1.5 mm de espesor, al 6% y 12% de acrilamida para el gel concentrador y separador, respectivamente. En los casos en los que la electroforesis no fue realizada el mismo día, el gel se guardó en cámara húmeda a 4 ° C, humedecido en *buffer* de corrida 1x. Las muestras se diluyeron hasta una concentración final 1x con *buffer* de carga 4X, se incubaron en un termoblock por 5 min a 95 °C, se dejaron que lleguen a TA para luego ser sembradas en los pocillos del gel de electroforesis. Se indica en la siguiente tabla 3 la preparación de las muestras a sembrar realizada en la primera electroforesis SDS-PAGE a modo de ejemplo. En el caso de la primer electroforesis se sembraron 10 µg de proteína total para cada muestra, en la segunda electroforesis se colocaron 20 µg.

Tabla 3. Preparación de muestras evaluadas por electroforesis. Se indica a modo de ejemplo la preparación de algunas de las muestras de los extractos proteicos obtenidos y evaluados en geles SDS-PAGE. Los diferentes volúmenes de muestra varían ya que el objetivo fue sembrar la misma cantidad de proteínas totales (10 µg).

Extractos proteicos de:	muestra	buffer carga 4x	PBS 1X	volumen total
Células HeLa transfectadas con pHSV-IRES-EGFP sin inducir con INF γ	12 µL	12.5 µL	25.5 µL	50 µL
Células HeLa transfectadas con pHSV-IRES-EGFP inducidas con INF γ (pool de dos pocillos)	30,2 µL del pool	12.5 µL	7.3 µL	50 µL
Células HeLa transfectadas con pHSV-OH1 _{WT} -IRES-EGFP sin inducir con INF γ	18 µL	12.5 µL	19.5 µL	50 µL
Células HeLa transfectadas con pHSV-OH1 _{WT} -IRES-EGFP inducidas con INF γ (pool de dos pocillos)	33,7 µL pool	12.5 µL	3.8 µL	50 µL
Células HeLa transfectadas con pHSV-OH1 _{c1125} -IRES-EGFP sin inducir con INF γ	17.1 µL	12.5 µL	20.4 µL	50 µL
Células HeLa transfectadas con pHSV-OH1 _{c1125} -IRES-EGFP inducidas con INF γ (pool de dos pocillos)	29,4 µL pool	12.5µL	8.1µL	50 µL
Células HeLa sin transfectar tratadas con OPTIMEM y sin inducir con INF γ	12.3 µL	12.5 µL	25.2 µL	50 µL
Células HeLa sin transfectar tratadas con OPTIMEM e inducidas con INF γ (pool de dos pocillos)	11,4 µL	12.5 µL	26.1 µL	50 µL

Junto a las muestras se sembró 6 µL de un marcador de peso molecular de proteínas preteñido (PM) (Thermo, mw #26619). La corrida electroforética se realizó a 60 V durante la entrada de las muestras al gel concentrador y a 200 V durante el pasaje por el gel separador. Previo a realizar la electrotransferencia, todo el material implicado en la misma, incluyendo el gel de electroforesis y la membrana PVDF (previamente activada en ETOH 95 %) se debió equilibrar en *buffer* de transferencia 1X a 4 °C durante 30 minutos. Se realizó una muesca en el borde, tanto al gel como a la membrana, de forma de tener clara su orientación. Se utilizó el sistema de transferencia húmeda de BioRad (Mini trans-blot cell module, # 1703810), y se transfirió en *buffer* de

transferencia 1X a 4 ° C durante 1 h a 100 V. Una vez finalizada la transferencia la membrana se bloqueó ON a 4°C con una solución comercial conteniendo seroalbúmina bovina (BSA) (Lifetechnologies, #000105) y en algunos casos durante 3 h a TA, agitando a 140 rpm. Posteriormente se realizaron tres lavados a TA de 5 a 10 min cada uno con TBS-T, bajo agitación de 140 rpm. Para la inmunodetección luego se incubó ON a 4 °C con el anticuerpo primario correspondiente (tabla 4), diluido en la solución bloqueante comercial descrita arriba. Seguidamente se hicieron tres lavados a TA con TBS-T de 10 min cada uno, agitando a 120 rpm. Luego se incubó a TA la membrana durante 1 h con el anticuerpo secundario diluido en TBS-T, bajo una agitación de 120 rpm. Luego se efectuaron tres lavados a TA con TBS-T de 10 minutos cada uno, a 140 rpm. En todos los ensayos el anticuerpo secundario utilizado fue α -Rabbit HRP (Sigma # A0545) conjugado a una peroxidasa. La señal, se reveló con el sustrato comercial *Super Signal West Pico Chemiluminescent substrate* (Thermo #34087). Para ello, se incubó la membrana en cámara oscura por 5 min con el sustrato quimioluminiscente, se retiró en exceso de reactivo y se colocó la membrana en el equipo GBOX Chemi System (SynGene). Se adquirieron 10 imágenes las que fueron acumulando 1 min de exposición cada vez.

Tabla 4. Anticuerpos utilizados a lo largo de la tesina.

Anticuerpo primario	Características	Procedencia	Factor dilución	diluido en
Anti-STAT-1	Monoclonal producido en conejo	Cell Signaling #14994	1/1000	
Anti P-STAT-1	Monoclonal producido en conejo	Cell Signaling #9167	1/1000	Solución bloqueante de membrana con BSA
Anti-Pan Actina	Monoclonal producido en conejo	Cell Signaling #D18C11	1/1000	
Anti-Actina	Policlonal producido en conejo	Sigma #A5060	1/1000	
Anticuerpo secundario	característica	procedencia	Factor dilución	diluido en
α -Rabbit HRP	Policlonal producido en cabra	Sigma #A0545	1/50.000	TBS-T

Una misma membrana se utilizó para evaluar más de una proteína (actina o STAT-1 o P-STAT-1). Utilizando como guía el marcador de peso molecular preteñido se dividió la membrana una vez transferida. Esto es posible ya que las proteínas a marcar tienen diferente masa molecular (STAT-1 91 kDa, actina 42 kDa). La parte superior de la membrana se utilizó para revelar a STAT-1, y la inferior para revelar la actina. La actina se utilizó como indicador de carga proteica, asumiéndose al inicio del trabajo que no se vería modulada por la actividad de OH1. Cuando fue necesario evaluar a STAT-1 o P-STAT-1 sobre la misma membrana, se procedió a remover los anticuerpos utilizados en el primer western-blot (WB) mediante *stripping* suave. Para ello se colocó la membrana en un recipiente limpio, con cantidad suficiente de solución de *stripping* de forma de cubrirla totalmente, se dejó bajo agitación suave por 10 min, se descartó y se repitió el procedimiento. Luego se realizaron 2 lavados con PBS 1X de 10 min, y por último 2 lavados con TBS-T de 5 min, bajo agitación suave. Todo el procedimiento fue realizado a TA. En los casos donde no se trabajó el mismo día con la membrana, se dejó la misma

cubierta con TBS-T a 4 °C. Después de realizado el *stripping* a la membrana se continúa con el paso de bloqueo, como se describió al comienzo del punto (xi). En las imágenes adquiridas de los WB realizados con cada uno de los anticuerpos se realizó un análisis del nivel de la señal utilizando el programa ImageJ (Schneider et al., 2012), con el objetivo de evaluar el % de P-STAT-1 respecto a STAT-1 total, y el nivel de actina detectado en las diferentes muestras. El software imageJ permite cuantificar la intensidad de las bandas. Como primer paso se seleccionó las bandas a analizar, el programa genera un histograma donde cuantifica el valor de los píxeles de la zona que se está analizando. Luego se calcula el área de los picos del histograma dando el valor de las intensidades de cada banda.

Resultados y discusión

1. Se obtuvieron los plásmidos de interés necesarios para las transfecciones en cantidad y calidad adecuada

Se obtuvieron los plásmidos pHSV-IRES-EGFP, pHSV-OH1_{WT}-IRES-EGFP y pHSV-OH1_{C112S}-IRES-EGFP en un alto grado de pureza ($A_{260/280}$) y concentración, tal como se detallan en la tabla 5. En algunos casos se prepararon más de un lote, tal como se especifica en dicha tabla. En la figura 7 se muestra a modo de ejemplo una de las tantas electroforesis en gel de agarosa realizada con los plásmidos purificados (pHSV-OH1_{WT}-IRES-EGFP y pHSV-OH1_{C112S}-IRES-EGFP) con el objetivo de evaluar la integridad de los mismos. En dicho gel, en los carriles donde se sembraron los plásmidos, se observa una banda principal de tamaño mayor a 10 kb que se corresponde con la conformación circular de dichos plásmidos, ya que migra menos que la conformación lineal (aprox. 6 kb), no se observó la conformación superenrollada en ninguno de los casos. No se observa fragmentación del mismo, indicando que las preparaciones fueron de buena calidad, teniendo en cuenta también que los valores de $A_{260/280}$ fueron en todos los casos ≥ 1.8 .

Tabla 5. Cuantificación por Nanodrop de los plásmidos empleados en esta tesina. Se muestran los valores de concentración de las extracciones plasmídicas cuantificadas por Nanodrop Lite (Thermo Scientific) y el grado de pureza $A_{260/280}$ en cada caso. * la extracción del plásmido control (pHSV-IRES-EGFP) fue realizada utilizando el kit NucleoBond Xtra Maxi (Macherey-Nagel Cód N° 740 416.50) y para los plásmidos portadores del gen OH1 mutante e inactivo (pHSV-OH1_{WT}-IRES-EGFP y pHSV-OH1_{C112S}-IRES-EGFP) la extracción fue realizada utilizando el protocolo de kit comercial GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo, #K0503). ** Estos 2 lotes fueron facilitados por D.porley obtenidos en su trabajo de Maestría. Los mismos contaban con un nivel de pureza mayor de 1.8 y su secuencias se habían verificado por secuenciación (Macrogen).

Plásmido	[ng/ μ L]	$A_{260/280}$	usado en transfección No
pHSV-IRES-EGFP *	749,0	1.9	usado en todas.
pHSV-OH1 _{WT} -IRES-EGFP	146,0	**	transfección No 6
pHSV-OH1 _{C112S} -IRES-EGFP	220,0	**	transfección No 6
pHSV-OH1 _{WT} -IRES-EGFP	142,2	1,9	transfección No 7
pHSV-OH1 _{C112S} -IRES-EGFP	110,5	1,8	transfección No 7
pHSV-OH1 _{C112S} -IRES-EGFP	85,6	1,8	transfección No 7
pHSV-OH1 _{WT} -IRES-EGFP	126,6	1,8	transfección No 8
pHSV-OH1 _{WT} -IRES-EGFP	117,9	1,8	transfección No 8
pHSV-OH1 _{C112S} -IRES-EGFP	157,9	1,8	transfección No 8

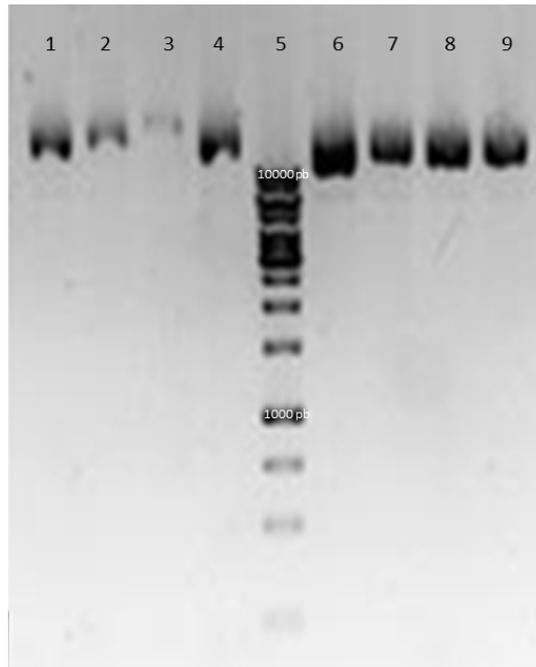


Figura 7. Electroforesis de plásmidos pHSV-OH1_{WT}-IRES-EGFP y pHSV-OH1C112S-IRES-EGFP. Carriles: 1-pHSV-OH1_{WT}-IRES-EGFP, 2-pHSV-OH1_{WT}-IRES-EGFP, 3-pHSV-OH1_{WT}-IRES-EGFP, 4-pHSV-OH1_{WT}-IRES-EGFP, 5-MPM SMO311, 6-pHSV-OH1_{C112S}-IRES-EGFP, 7-pHSV-OH1_{C112S}-IRES-EGFP, 8-pHSV-OH1_{C112S}-IRES-EGFP, 9-pHSV-OH1_{C112S}-IRES-EGFP

Posteriormente mediante digestión con Hind III se analizó la presencia del gen de la fosfatasa viral OH1. En la figura 8 se observa la electroforesis del plásmido pHSV-IRES-EGFP sin digerir junto a los diferentes plásmidos de interés tratados con Hind III. El plásmido control pHSV-IRES-EGFP cuenta con un sitio de corte para la enzima de restricción Hind III, y los plásmidos pHSV-OH1_{WT}-IRES-EGFP y pHSV-OH1_{C112S}-IRES-EGFP cuentan con dos sitios HindIII, lo que permiten la liberación del gen de la OH1. En el carril 1, se sembró el plásmido pHSV-IRES-EGFP sin digerir, observándose una banda que está por encima del tamaño del plásmido (6248 pb), que como describimos anteriormente se corresponde con la conformación circular del mismo. En el Carril 2, se sembró el mismo plásmido digerido con Hind III, observándose una banda por encima de 6000 pb, que se corresponde con la conformación lineal del mismo. En los carriles 3 y 4 se sembraron los plásmidos pHSV-OH1_{WT}-IRES-EGFP y pHSV-OH1_{C112S}-IRES-EGFP digeridos con HindIII, respectivamente. En estos carriles se observa en ambos casos una banda correspondiente a unos de los fragmentos esperados del plásmido linealizado y una banda más pequeña correspondiente al gen de OH1 (550 pb).

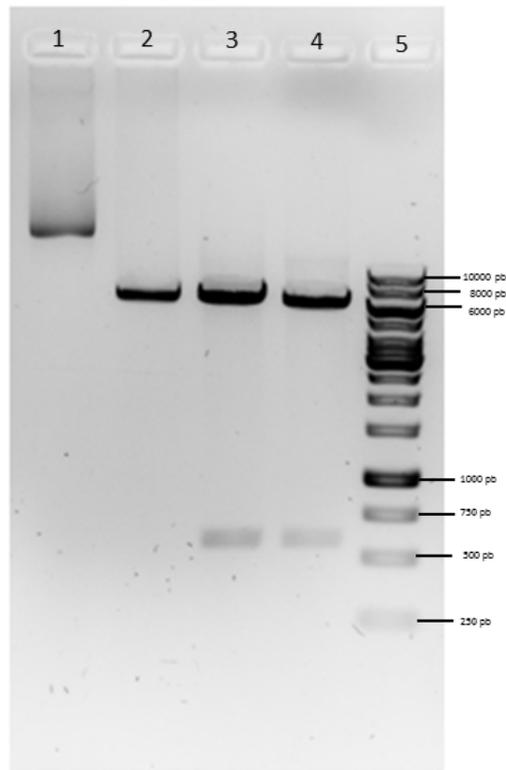


Figura 8. Electroforesis de los plásmidos tratados con Hind III. Se sembraron las muestras en un gel de agarosa 1% con 1 μ L de Goodview en el siguiente orden: Carril 1- pHSV-IRES-EGFP sin tratar con Hind III, Carril 2- pHSV-IRES-EGFP tratado con Hind III, Carril 3- pHSV-OH1_{WT}-IRES-EGFP tratado con Hind III, Carril 4- pHSV-OH1_{C112S}-IRES-EGFP tratado con Hind III, Carril 5- Marcador de pb 1kb SMO311.

Por lo tanto, se logró expandir, purificar y verificar las construcciones que fueron utilizadas en el presente trabajo.

2. Se puso en funcionamiento el cultivo de las células HeLa y se definió la cantidad de células a utilizar

Se descongeló una semilla de células HeLa y el cultivo derivado de esta se mantuvo con éxito. En la figura 9a se muestra la imagen tomada de células HeLa en una placa p100 en comparación con la imagen suministrada por la ATCC (figura 9b). La comparación de ambas imágenes muestra que en los cultivos realizados se observa el fenotipo característico de este tipo de células.

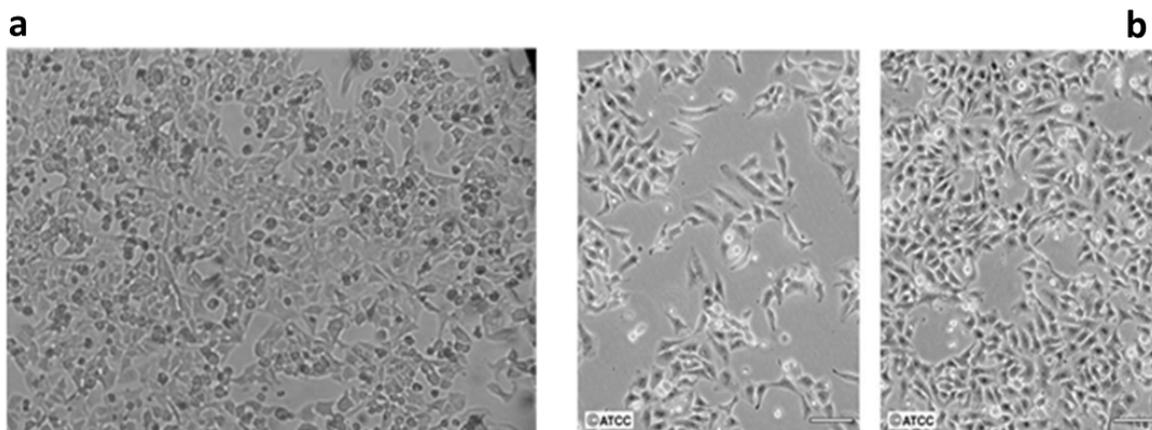


Figura 9. **a-** Imagen de células HeLa en cultivo crecidas en una placa p100 obtenida de uno de los cultivos realizados en el laboratorio, **b-** imagen de células HeLa de ATCC CCL-2. En ambas se ve la forma característica de esta línea celular y particularmente en la imagen b se indica como se ve la monocapa a una baja y a una alta densidad celular.

Luego de la puesta en funcionamiento del cultivo de células HeLa, se procedió a realizar ensayos preliminares en placa con la finalidad de determinar el número de células y tamaño óptimo de la placa de cultivo (p12 o p24) a utilizar en los posteriores ensayos de transfección. Estos ensayos nos permitieron seleccionar la placa p12. En dicha placa evaluamos en duplicado la formación de una monocapa confluyente al sembrar $1,0 \times 10^5$, $2,0 \times 10^5$ y $4,0 \times 10^5$ células luego de 24 h a 37°C . El resultado mostró que la concentración de $1,0 \times 10^5$ células no es suficiente para generar una confluencia total de la monocapa, en cambio la de $2,0 \times 10^5$ células/mL fue suficiente para obtener una monocapa de una confluencia del 80-100%. Por otro lado, la concentración mayor de células sembrada, dio lugar a un sobrecrecimiento del cultivo. Posteriormente, se procedió a lisar las células y realizar una extracción de las proteínas totales de aquellos pocillos de confluencia del 80-100%, utilizando un *buffer* de lisis. Este *buffer* se seleccionó con el objetivo de recuperar no solo proteínas citosólicas sino también aquellas asociadas a la membrana. Se cuantificaron las proteínas totales (en duplicado) por el método de Bradford (tal como se describe en el punto vii de la metodología) el cual no resultó adecuado debido a la interferencia de las altas concentraciones de detergentes del *buffer* de lisis. El método de Bradford tolera hasta 0,1 % de tritón 100X o desoxicolato de sodio (Grupo Merck, 2020). Por lo tanto, se decidió utilizar el método del ácido bicinónico (BCA, protein assay kit), el cual verificamos previamente era compatible con los componentes del *buffer* de lisis. Como resultado general se obtuvo del orden de 30-35 μg proteína/250000 células (confluencia del 50 %). Determinar esta relación era importante para saber cuántas células son necesarias para obtener una

cantidad de proteína adecuada para los ensayos posteriores de inmunodetección de STAT-1.

3. Se optimizó el ensayo de transfección de células HeLa utilizando el vector control pHSV-IRES-EGFP.

En la transfecciones No. 1 y No. 2 se observó un efecto citotóxico al agregar las diferentes cantidades del complejo ADN/lipofectamina (750 ng ADN/0,75 μ L o 1,5 μ L o 2,5 μ L Lipofectamina) sobre la monocapa de células HeLa (conteniendo medio DMEM o sin medio)(Tabla 2). Este efecto se vio reflejado en un aumento de células muertas, desprendidas de la monocapa, observado mediante análisis en microscopio invertido. A pesar de este resultado, las células que permanecieron adheridas se analizaron por citometría, detectándose un bajo porcentaje de transfección (2-9%) y un mayor % de muertas en el caso de las Transfección No. 2, con mayor Lipofectamina respecto a la 1 (pasó del 6% al 19-28%).

En la Transfección No.3 se decidió agregar el complejo ADN/Lipofectamina sobre la monocapa previamente cubierta con 150 μ L de Optimem (tabla 2), para ver si esto protege a las células del efecto tóxico observado en los experimentos descritos arriba. Además, con el objetivo de mejorar el % de transfección se decidió incluir una concentración de ADN más alta (1500 ng) además de la utilizada previamente (750 ng). En estos ensayos se utilizó las dos cantidades más altas de lipofectamina (1,5 y 2,5 μ L). En este caso para determinar de manera más certera el % de células muertas por citometría, se analizaron tanto las células que estaban adheridas como las desprendidas que se encontraban en el sobrenadante. Así, en todos estos ensayos, se observó un alto % de mortalidad que varió entre 49%-63%, no observándose un aumento al incrementar la cantidad de ADN o lipofectamina. Respecto al porcentaje de células transfectadas, se observó un mayor porcentaje para los ensayos realizados con menor cantidad de lipofectamina, pero no superó el 25%. Además dicho porcentaje aumentó un 10% (del 15% a 25%) al aumentar la cantidad de ADN de 750 ng a 1500 ng (tabla 6).

Tabla 6. Porcentajes de muerte y transfección de la transfección No.3 obtenidos por el análisis de citometría de flujo

Lipofectamina	ADN 750 ng		ADN 1500 ng	
	1,5µL	2,5µL	1,5µL	2,5µL
% de muerte	55	53	49	63
% de transfección	15	7	25	14

En la figura 10 se muestra la imagen tomada por microscopía de epifluorescencia de la mejor condición dentro del experimento de Transfección No. 3, en la cual se observan las células transfectadas expresando la EGFP.

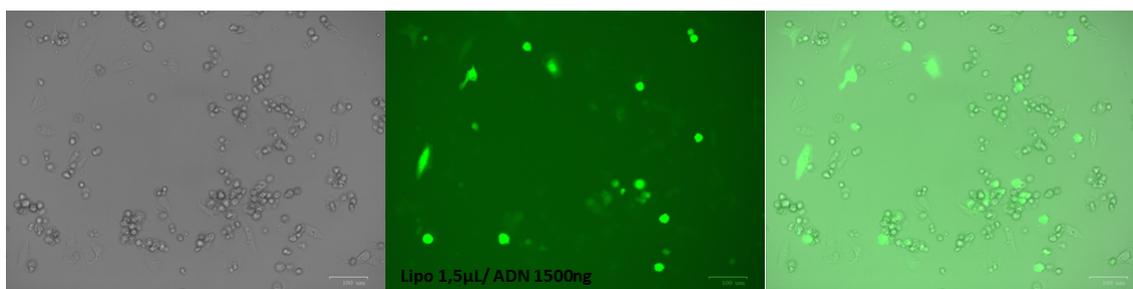


Figura 10. Las imágenes tomadas por microscopía de epifluorescencia de las células HeLa transfectadas con ADN 1500 ng (pHSV-IRES-EGFP) y Lipofectamina 1.5µL (Transfección No. 3). La primer imagen en campo claro permite observar las células, la segunda imagen utilizando el canal verde permite visualizar los focos fluorescentes en verde correspondientes a la EGFP y la tercera imagen combina las dos anteriores, lo que permite verificar y visualizar que los focos fluorescentes se encuentran dentro de las células. En este ensayo se detectó una mortalidad del 49 % y un porcentaje de transfección del orden del 25 %. En estos ensayos la confluencia de la monocapa fue del orden del 50%, siendo la concentración de proteínas recuperadas del orden del 35 µg totales (para 250000 células).

En la Transfección No. 4 se varió levemente el procedimiento respecto a la Transfección No. 3. En dichos ensayos, procurando mejorar el % de transfección, se aumentó el rango de ADN utilizado (1500 ng y 2500 ng) y se mantuvo la cantidad de lipofectamina en 1,5 µL. En cuanto a la confluencia de la monocapa, se realizaron los ensayos utilizando una confluencia del orden del 50 % y 70 %. En este ensayo, se observó que con una mayor confluencia de la monocapa, el efecto citotóxico fue menor. De hecho, las células con una confluencia del 70% presentaron una mortalidad del 39-42%, mientras que ésta aumentó al 61-75% en aquellas con una confluencia del 50%. Por lo cual, en los siguientes experimentos se buscó utilizar células que alcanzaran confluencias cercanas al 80%. Con respecto a la transfección, para ambas confluencias, el porcentaje obtenido fue similar, variando entre 38-48 %. Una vez más, se observa un

aumento del 10% en el % de transfección (de 38 % a 48%) al aumentar la cantidad de ADN de 1500 ng a 2500 ng de ADN.

En la transfección No. 5 se probó nuevamente las concentraciones de lipofectamina y ADN de la transfección anterior, y se evaluó también, disminuir la cantidad de lipofectamina. Por lo tanto, se incluyó una cantidad de lipofectamina menor además de la ya utilizada (0,75 y 1,5) y las 3 concentraciones de ADN que veníamos probando (750, 1500 Y 2500 ng). Estos ensayos se realizaron con las células en una confluencia de la monocapa de un 80%, ya que en la transfección anterior se vio que una confluencia menor no era adecuada. Se decidió descartar el sobrenadante con células muertas en suspensión para el análisis. El análisis por citometría de uno de estos ensayos se muestra a modo de ejemplo de los realizados en la tesina (figura 11).

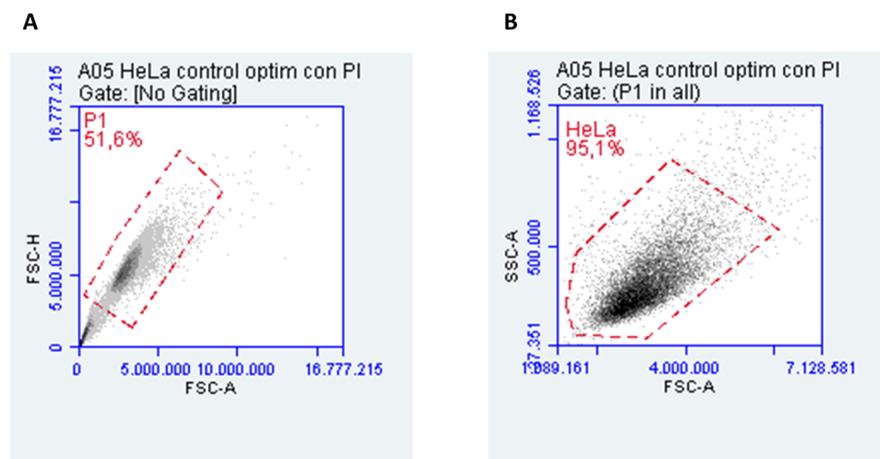


Figura 11. (A) En una primera etapa se realizó una gráfica FSC-A (área) vs. FSC-H (altura) y se creó un gate P1 que no incluya los dobletes y detritos celulares, procediendo como se especificó en el punto (VI) de la metodología. Se puede observar que P1 incluye 51,6% de los eventos totales detectados por el citómetro en las condiciones del análisis. (B) En una segunda etapa se realizó un gráfico SSC vs FSC que permite visualizar el tamaño vs granulosidad. Para esto, inicialmente se seleccionó sólo visualizar el gate P1, el cual se ajustó de manera de definir los eventos que se supone corresponden con células intactas, a dicho gate se le denominó "HeLa". Se puede observar que el gate "HeLa" corresponde a el 95,1% de los eventos definidos en P1. Los análisis siguientes serán siempre en base a los "eventos" que se encuentren dentro del gate "HeLa".

Una vez identificado cómo se visualizan las células HeLa en buen estado, y delimitado el gate "HeLa", se procedió a visualizarlas mediante un histograma, y de esta forma poder establecer el umbral límite tanto para el canal FL3 (donde se visualiza la fluorescencia en rojo del ioduro de propidio) como para el canal FL1 (donde se visualiza la fluorescencia en verde indicadora de la presencia de la proteína EGFP). Ambos límites

se establecen utilizando los controles de células sin transfectar, y son representados en el gráfico con una línea vertical sobre el eje FL3-A y FL1-A respectivamente.

Por otra parte, para establecer si el agregado de yoduro de propidio afectaba a las células, se visualizó el “comportamiento” de la población “Hela” frente al agregado de PI. Para ello se analizó por citometría el control de las células HeLa tratadas o no con PI y se compararon en el histograma. En la figura 12-A se observa que el histograma obtenido para las células tratadas o no con PI coinciden casi totalmente. En este se puede visualizar en color naranja los eventos detectados para el control de células HeLa sin tratar con PI, y en color verde los eventos correspondientes a las células tratadas con PI. En este caso, dicho umbral se representa en el gráfico con una línea vertical sobre el eje FL3-A. Hacia la derecha de ésta se encuentran las células muertas y a la izquierda las vivas. Por otra parte, en este mismo experimento, se estableció el umbral en el canal FL1, donde se puede detectar la fluorescencia en verde debida a la expresión de EGFP (figura 12-B). En dicho gráfico se puede observar que la autofluorescencia de las células tratadas o no con yoduro de propidio coinciden perfectamente (en color rosado los eventos de HeLa sin tratar con PI y en marrón tratadas con PI). En este caso, dicho umbral se representa en el gráfico con una línea vertical sobre el eje FL1-A. Hacia la derecha de ésta se espera detectar las células que fluorescen en verde por EGFP y a la izquierda las que son negativas para EGFP. A continuación, para analizar por citometría las células transfectadas con el plásmido portando EGFP, sin OH1 o con OH1 salvaje o el mutante inactivo OH1_{C112S}, se utilizó los umbrales definidos con los controles de células tratadas con PI previamente mencionados. Así mismo, las células transfectadas fueron marcadas con PI para evaluar la viabilidad (Figura 12-C y D).

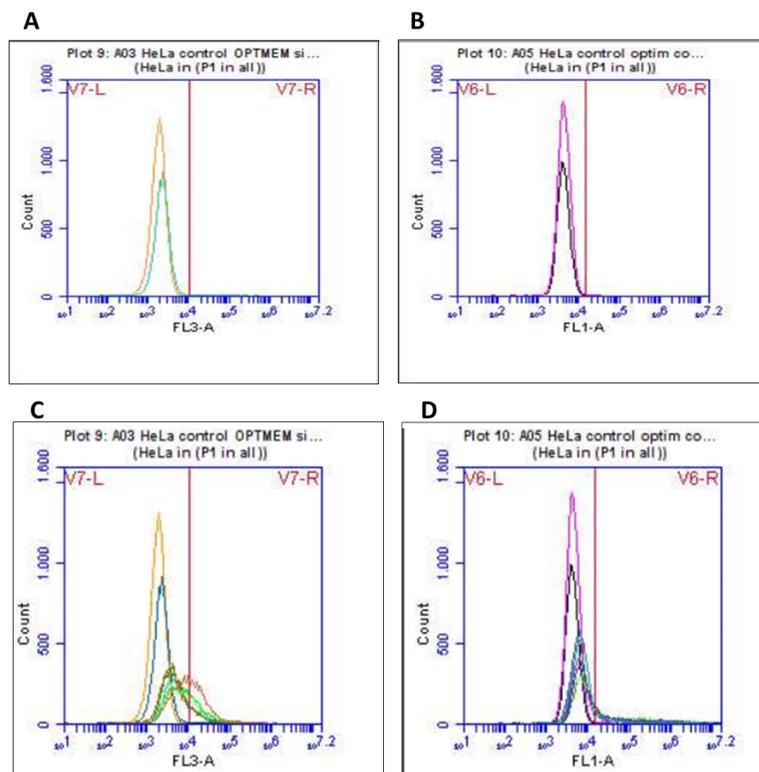


Figura 12. A- Histograma donde marcamos umbral límite en el canal FL3, para poder establecer los porcentajes de células muertas. B- Histograma donde marcamos umbral límite en el canal fl1. C- histograma donde se muestran los Eventos vs FL3 donde se mantienen los controles mostrados en A y se agregaron las muestras, las porciones que se encuentran pasando el umbral se consideran células no viables. D- Histograma donde se muestran los Eventos vs FL1, se muestra igualmente los controles indicados previamente en B y se adjuntan las muestras, de esta forma se vió que porción de la muestra fluoresce en verde (detectando EGFP).

Los resultados de la Transfección 5 se resumen en la tabla 7. En dicha tabla se observa claramente cómo al utilizar menor cantidad de lipofectamina se logra disminuir el % de muerte celular, variando entre 15-23% al utilizar 0,75 μ L de lipofectamina y entre 32%-47% al utilizar 1,5 de lipofectamina. Por otro lado se observa nuevamente como aumenta el % de transfección (alcanzando un 35-37%) al aumentar la cantidad de ADN, para ambas concentraciones de lipofectamina utilizadas.

Tabla 7. Porcentajes de muerte y transfección de la transfección No.5 obtenidos por el análisis de citometría de flujo

	ADN 750 ng		ADN 1500 ng		ADN 2500 ng	
	0,75 μ L	1,5 μ L	0,75 μ L	1,5 μ L	0,75 μ L	1,5 μ L
Lipofectamina						
% de muerte	15	47	19	34	23	32
% de transfección	8	11	20	28	35	37

Se complementó el análisis con la observación de las células al microscopio. En la figura 13-A,B y C se muestran imágenes representativas de las diferentes condiciones utilizadas en la Transfección No. 5, las cuales se condicen con los resultados obtenidos por citometría de flujo descritos previamente. En la figura 13-A se muestran las células no transfectadas, correspondientes al control negativo del ensayo, por lo cual es esperable no observar focos fluorescentes en las células correspondientes a la EGFP. En la figura 13-B se indican las imágenes de las células tratadas con 0,75 μ L de Lipofectamina y en 13-C con 1,5 μ L de Lipofectamina. Tanto en B como en C se observa un aumento de dichos focos fluorescentes al aumentar la cantidad de ADN utilizado en el ensayo, independientemente de la cantidad de lipofectamina utilizada. Por otro lado observamos que al utilizar 0,75 μ L de Lipofectamina y 2500 ng de ADN las células que presentan focos fluorescentes mantiene su morfología típica de HeLa, en cambio algunas de las células tratadas con las misma cantidad de ADN pero con 1,5 μ L de Lipofectamina, aparecen redondeadas y casi despegadas de la monocapa, lo que se corresponde con el aumento de la mortalidad detectado y descrito en la tabla 7. Por lo tanto, teniendo en cuenta los resultados de citometría y el análisis microscópico, se seleccionó 0,75 μ L de lipofectamina y 2500 ng de ADN como la condición a ser utilizada en los ensayos con los plásmidos portando el gen de OH1_{wt} y OH1_{C112S}. Si bien se podría seguir optimizando dicha condición, dado los tiempos de la tesina se resolvió seguir adelante.

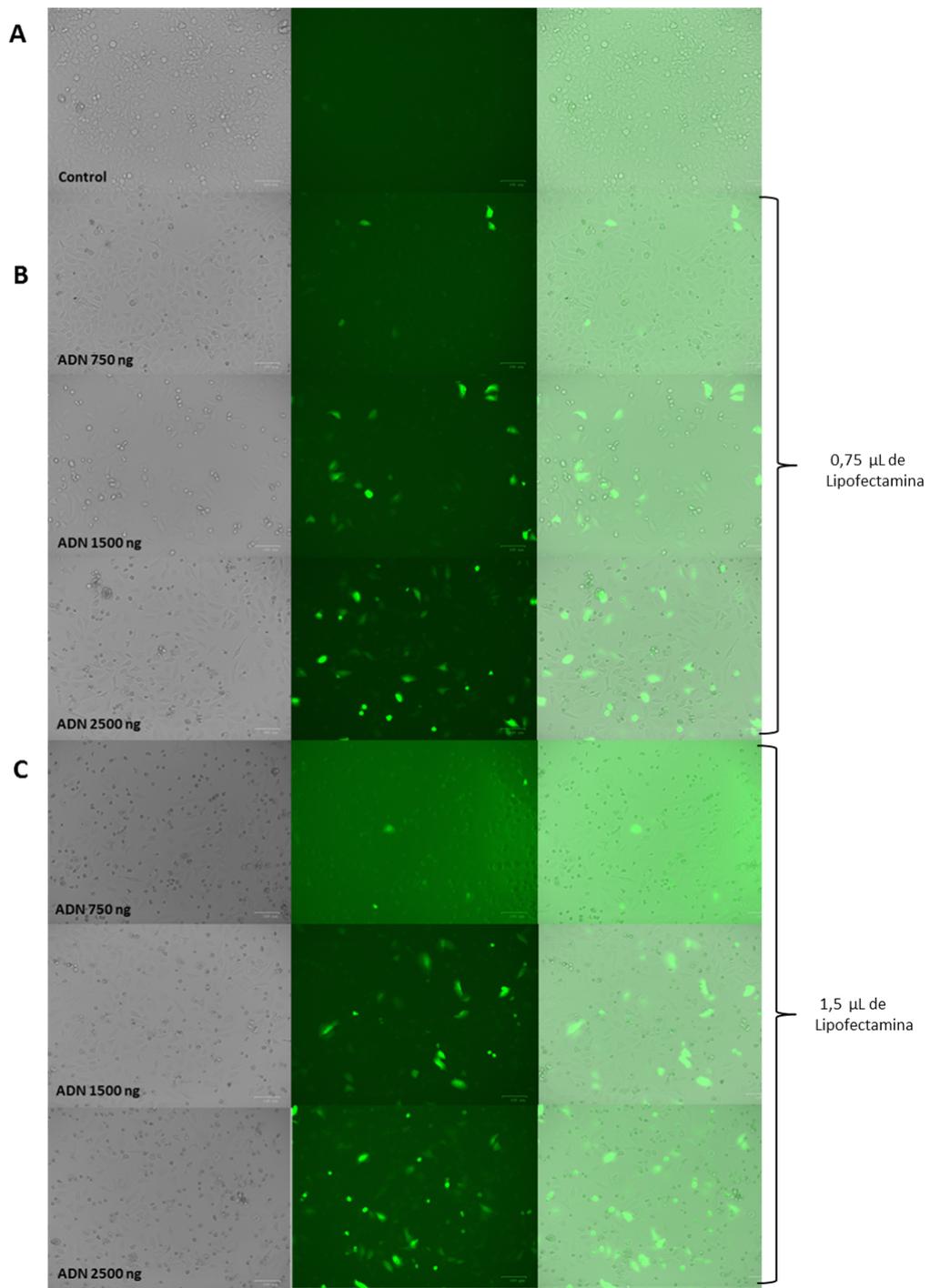


Figura 13. Imágenes obtenidas en microscopio de epifluorescencia representando los resultados obtenidos luego de las diferentes condiciones utilizadas en la Transfección No. 5. Para cada condición se muestran 3 imágenes, la primera en campo claro, la segunda utilizando el canal verde (que permite visualizar los focos fluorescentes en verde) y la tercera generada al combinar las dos antes mencionadas. **(A)** Se muestra el control negativo del ensayo, células no transfectadas. **(B)** En las condiciones aquí mostradas se utilizó el volumen de 0,75 µL de lipofectamina y se indica en cada caso las concentraciones utilizadas de ADN. **(C)** Se muestran las condiciones en las que se utilizó 1,5 µL de lipofectamina y las concentraciones de ADN se indican en cada caso.

4. Se aplicó el protocolo seleccionado en la transfección de células HeLa con los vectores portando el gen de OH1 salvaje o el mutante inactivo OH1 C112S

En la primera transfección (No. 6) se obtuvo un % de muerte más bajo (4-8%) (tabla 8) que el observado (para esta condición) en la Transfección 5 (23%). El menor % de muerte se correlacionó con un menor % de transfección. Este % de transfección, determinado por citometría, fue la mitad de lo observado en el ensayo No. 5 (35%) y similar entre los vectores utilizados. Siendo de 16% con el vector control pHSV-IRES-EGFP, 15% con el vector pHSV-OH1_{WT}-IRES-EGFP y 13% con el vector pHSV-OH1_{C112S}-IRES-EGFP. No encontramos una explicación técnica de porqué en la transfección con el vector control no se logró replicar lo observado en la Transfección 5 (35 %), ya que se procedió de igual manera. Si bien el aspecto de las células era saludable previo al tratamiento, una posibilidad es que los sucesivos pasajes del cultivo contribuyan a explicar el resultado observado. Por otro lado, el análisis por microscopía de epifluorescencia de las diferentes transfecciones muestra un comportamiento diferencial entre las células transfectadas con el vector control portando el gen de la EGFP, respecto a las transfectadas con el vector portando el gen de OH1_{WT} o OH1_{C112S} además de la EGFP (figura 14). En estas imágenes se observa claramente que en las células transfectadas con el vector control los focos fluorescentes son más intensos respecto a los observados al transfectar con el vector conteniendo la OH1_{WT} o OH1_{C112S}. Este efecto de menor intensidad de los focos fluorescentes debidos a la expresión de la EGFP, cuando se expresa otra proteína, ya ha sido descrito al utilizar dichos plásmidos en vectores virales (Laimbacher et al., 2012). Se ha sugerido que podría estar reflejando una menor expresión de la EGFP al quedar el gen de dicha proteína en segunda posición en el transcripto, dependiendo del IRES para su traducción, o a una mayor degradación de la EGFP, por cambios celulares debidos a la transfección.

Tabla 8. Porcentajes de muerte y transfección de la transfección No.6 obtenidos por el análisis de citometría de flujo

Transfección utilizando el plásmido	pHSV-IRES-EGFP	pHSV-OH1 _{WT} -IRES-EGFP	pHSV-OH1 _{C112S} -IRES-EGFP
% de muerte	8	4	5
% de transfección	16	15	13

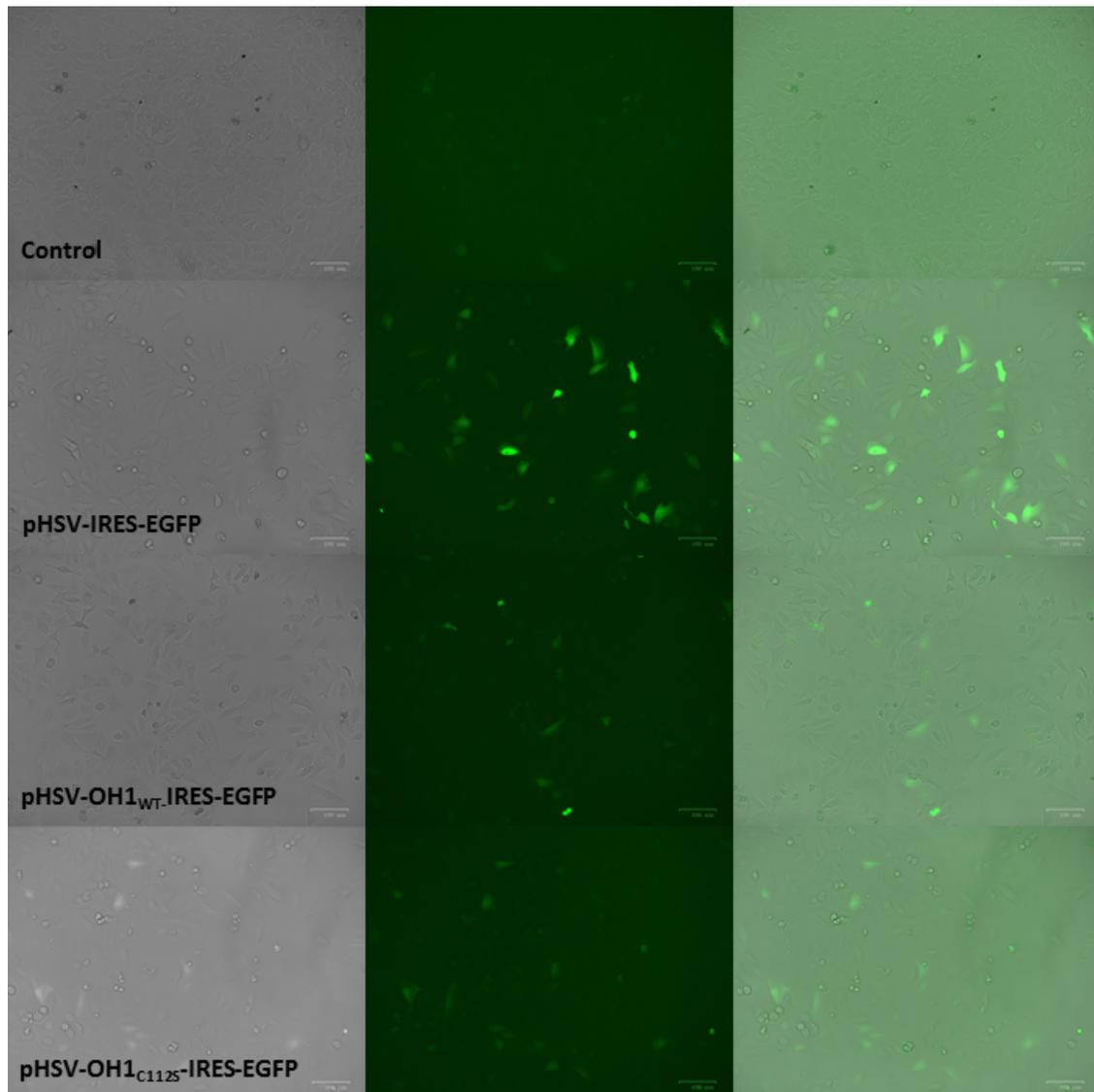


Figura 14. Imágenes obtenidas en microscopio de epifluorescencia representando los resultados obtenidos en la Transfección No 6. Para cada condición se muestran 3 imágenes, la primera en campo claro, la segunda utilizando el canal verde (que permite visualizar los focos fluorescentes en verde) y la tercera generada al combinar las dos antes mencionadas. En primera línea se muestra el control negativo del ensayo, como es de esperar no se ven focos fluorescentes en las células. Luego se ven las transfecciones donde se utilizaron los diferentes vectores, el vector control pHSV-IRES-EGFP, el vector pHSV-OH1_{WT}-IRES-EGFP y el vector pHSV-OH1_{C112S}-IRES-EGFP.

En una segunda transfección (No. 7) con los vectores control y portando el gen de OH1_{WT} y OH1_{C112S}, se realizaron triplicados para cada condición. En una de las réplicas se analizó el % de transfección y mortalidad por citometría. En las dos réplicas restantes se realizó la inducción con INF γ para activar la vía JAK/STAT e inducir la fosforilación de STAT-1 para luego de la transfección obtener los extractos celulares necesarios para la inmunodetección de STAT-1/P-STAT-1. Cabe recordar que nuestro grupo demostró que tanto la OH1_{WT} como el mutante OH1_{C112S} son capaces de interactuar con STAT-1 a nivel celular, afectando su translocación al núcleo de manera similar (Porley, 2017). Esta

observación llevó a nuestro equipo a postular que OH1 recluta a STAT1 a través de un sitio diferente al sitio activo y que dicho reclutamiento es la etapa limitante de la reacción enzimática.

En la tabla 9 se muestran los resultados de este ensayo. Independientemente del vector utilizado, el % de mortalidad fue del orden del 21-24%, mayor que lo observado en la transfección anterior (4-8%) y similar al de la transfección Nro 5 (23%). Por otro lado, si bien en algunos casos el % de transfección mejoró, el mismo no alcanzó lo observado en la transfección Nro 5 (35%), variando entre 11%-29%. En la figura 15 se muestran las imágenes representativas de dicho ensayo. Nuevamente se observa como en el ensayo No. 6 correspondiente a la transfección con el vector control, el estado general de las células remanentes es mejor y los focos de la EGFP son más intensos, respecto a los focos observados en las transfecciones con el vector conteniendo el gen de OH1 (WT o C112S).

Tabla 9. Porcentajes de muerte y transfección de la transfección No.7 obtenidos por el análisis de citometría de flujo

Transfección utilizando el plásmido	pHSV-IRES-EGFP	pHSV-OH1 _{WT} -IRES-EGFP	pHSV-OH1 _{C112S} -IRES-EGFP
% de muerte	21	24	23
% de transfección	17	29	11

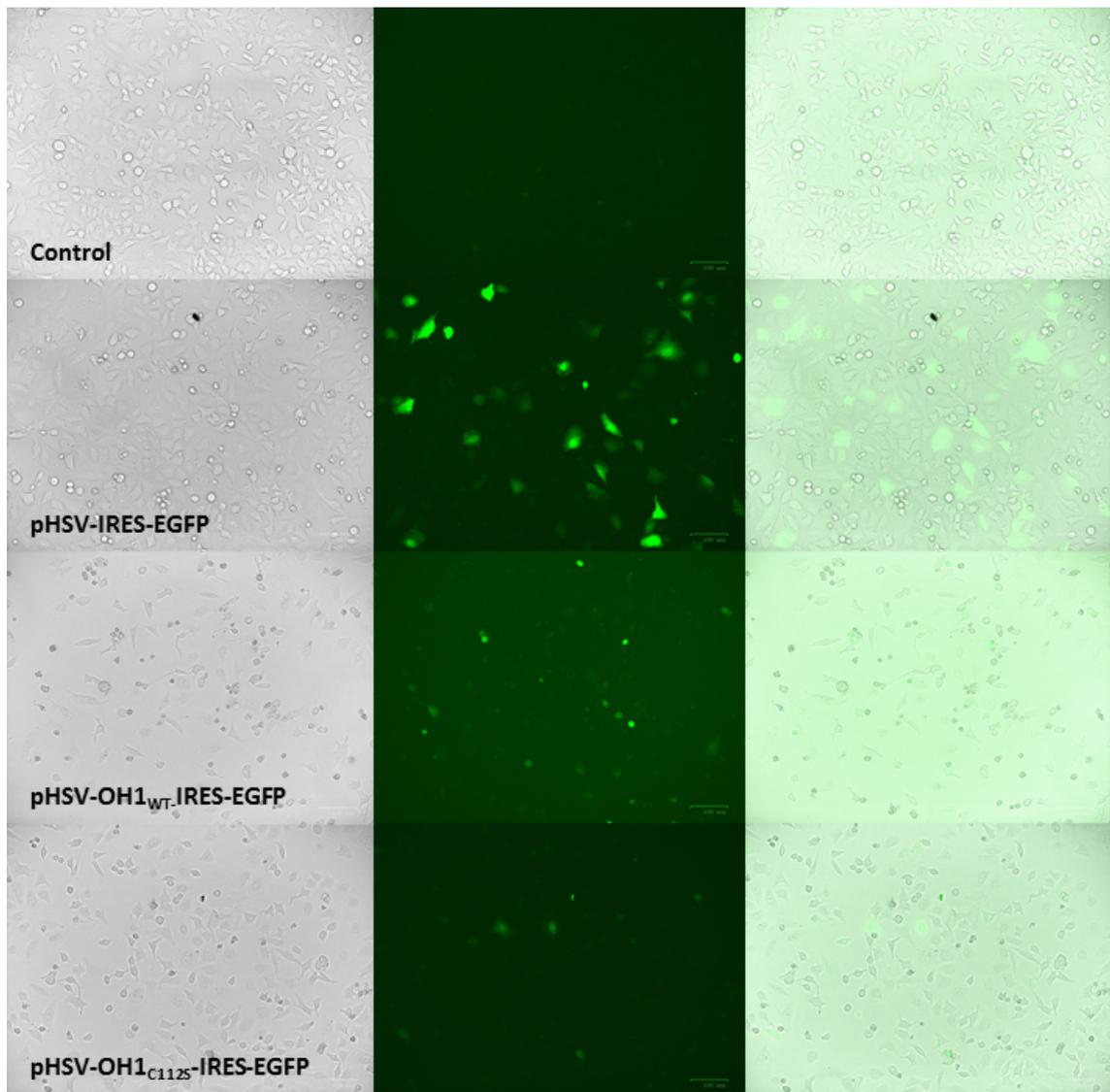


Figura 15. Imágenes obtenidas en microscopio de epifluorescencia representando los resultados obtenidos en la **Transfección No 7**. Para cada condición se muestran 3 imágenes, la primera en campo claro, la segunda utilizando el canal verde (que permite visualizar los focos fluorescentes en verde) y la tercera generada al combinar las dos antes mencionadas. En primera línea se muestra el control negativo del ensayo, como es de esperar no se ven focos fluorescentes en las células. Luego se ven las transfecciones donde se utilizaron los diferentes vectores, el vector control pHSV-IRES-EGFP, el vector pHSV-OH1_{WT}-IRES-EGFP y el vector pHSV-OH1_{C112S}-IRES-EGFP.

Con respecto a los extractos proteicos, la tabla 10 resume los μg totales obtenidos en las dos réplicas analizadas. Las muestras y diferentes concentraciones del estándar de BSA (100-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se analizaron por duplicado. Con los valores de absorbancia del estándar de BSA se realizó una curva de calibración la cual se ajustó a la ecuación $y = 1,0465x + 0,0371$, siendo $y = \text{Abs}$ y $x = \mu\text{g}$ de BSA por μL . En la Tabla 10 se puede observar que en el control estimulado con INF γ , la cantidad de proteína recuperada es el doble de la recuperada en las células transfectadas y estimuladas. Esto seguramente refleja cómo afecta la viabilidad celular el proceso de transfección. Además en el control se observa que la variación en la cantidad de proteína recuperada

a partir de las células de dos pocillos independientes es baja. En cambio, la variación entre las réplicas de las células transfectadas es mucho mayor. En experimentos futuros se aumentarán las réplicas de este tipo de ensayo. Si bien se parte del mismo inóculo de células que se reparte en cada pocillo, el tratamiento de transfección (agregado de lipofectamina y ADN) parece no ser siempre homogéneo entre los pocillos, lo que puede explicar no sólo las variaciones entre la cantidad de proteína recuperada, sino también las variaciones en los % de muerte y transfección observados en los diferentes experimentos realizados a lo largo de la tesis.

Tabla 10. Proteína obtenida en las réplicas de la Transfecciones 7.

Condición	Control HeLa + INF γ	Control HeLa + INF γ	T _{C/GFP} + INF γ	T _{C/GFP} + INF γ	T _{OH1-WT} + INF γ	T _{OH1-WT} + INF γ	T _{OH1-C112S} + INF γ	T _{OH1-C112S} + INF γ
μg totales en cada réplica	61	70	21	30	16	38	18	45
μg promedio	65		25		27		31	

Condición	Control HeLa - INF γ	T _{C/GFP} - INF γ	T _{OH1-WT} - INF γ	T _{OH1-C112S} - INF γ
μg totales en cada réplica	20	21	14	15

Los extractos proteicos obtenidos fueron utilizados posteriormente en los ensayos de inmunodetección que se describen a continuación. Se realizó una Transfección 8 adicional para la obtención de nuevos extractos, los cuales están disponibles en el laboratorio para el análisis por WB. Las imágenes correspondientes a este ensayo se muestran en la figura 1 del Anexo A.

5. Se evaluó el nivel de fosforilación de STAT-1 en los extractos proteicos obtenidos a partir de las células transfectadas.

Se describen los resultados de dos ensayos de WB realizados con las proteínas provenientes de un único ensayo de transfección (transfección No. 7). Se separaron por SDS-PAGE las proteínas de dichos extractos y se transfirieron a una membrana de PVDF, para luego inmunodetectar STAT-1 total, P-STAT-1 y actina. En la primer electroforesis se sembró 10 μg de proteína total de cada muestra. Se evaluó el uso de la actina como control de carga proteica ya que se trata de una proteína constitutiva que es de esperar no se vea modulada por OH1. La membrana fue cortada en dos, el corte se realizó en la

banda correspondiente a 55 kDa, de forma de poder incubar cada mitad con distintos anticuerpos. La parte superior se utilizó para revelar con el Ac anti P-Tyr 701 de STAT-1 y con un Ac anti-STAT-1 total (Mw= 91 KDa) y la inferior para el revelado con un Ac anti-actina (Mw= 42 KDa).

En la figura 16-A podemos observar que en las muestras inducidas con INF γ se observa una banda correspondiente al tamaño esperado para P-STAT-1 y también bandas de menor masa molecular pero todas ellas de intensidad muy baja. Las bandas reveladas con el Ac anti P-STAT-1 no se observaron en las células no estimuladas con INF γ , lo que es de esperar ya que la forma fosforilada de STAT-1 aparece sólo al inducir las células con INF γ , lo que permite la activación de la vía Jak/STAT y consecuente fosforilación de STAT-1 en la Tyr 701. Se observa también el marcado inespecífico de ciertas bandas del marcador de peso molecular. Esta señal se observó únicamente cuando se utiliza este anticuerpo primario anti P-STAT-1 y no los otros anticuerpos primarios contra STAT-1 o actina, o cuando se utiliza únicamente el anticuerpo secundario.

Posteriormente esta misma membrana se utilizó para ensayar la detección de STAT-1 total (previo *stripping*, figura 16-B). En dicha figura podemos observar una leve detección de STAT-1, pero no en todas las muestras. Estos resultados indican, que en futuros ensayos debemos aumentar la cantidad de muestra analizada o evaluar el uso del anticuerpo primario más concentrado u otro anticuerpo comercial contra la forma total de STAT-1. Se descartó que hubiéramos perdido la muestra transferida a la membrana pues se repitió la detección de P-STAT-1 (previa realización de un nuevo *stripping*) logrando el mismo resultado mostrado en la figura 16-A.

En la figura 16-C vemos el primer resultado obtenido al detectar la actina utilizando el anticuerpo Anti-Pan Actina (Cell Signaling #D18C11, tabla 4). Si bien era de esperar detectarla en todas las muestras, no fue lo observado, ya que casi no se visualizan las bandas en las muestras no inducidas con interferón. Por lo tanto, decidimos evaluar en la misma membrana otro anticuerpo anti actina (Sigma #A5060), logrando un mejor resultado figura 16-D. En este caso sí se visualizaron bandas en todos los carriles, a la misma altura donde se reveló la pan-actina, lo que confirma que fue un problema en la inmunodetección y no de carga o transferencia de las muestras. En todos los casos se observa más de una banda de actina. Comparando la intensidad de las bandas de actina en las diferentes muestras, no se observa una intensidad homogénea entre ellas. Esto podría estar sugiriendo, si el resultado se repite con nuevas muestras en un nuevo WB,

que sería necesario utilizar otra proteína como control de carga. Una alternativa podría ser utilizar un anticuerpo anti tubulina.

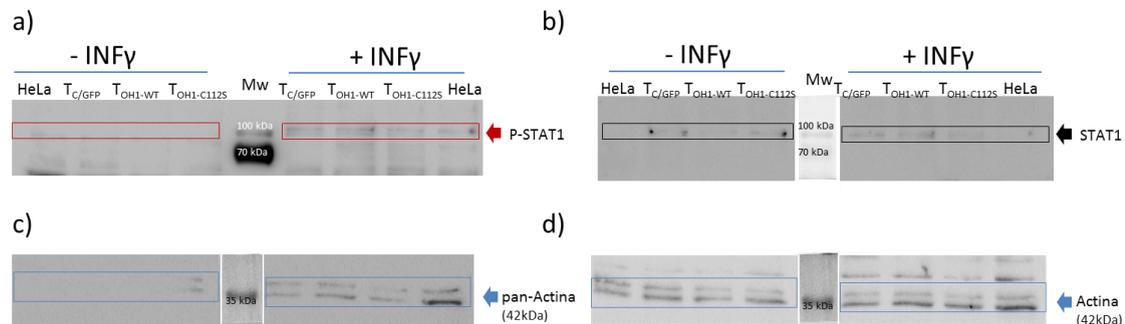


Figura 16. Se sembró en el gel de proteínas, los extractos celulares correspondientes a las siguientes condiciones en orden: carril 1-Células HeLa sin transfectar y sin inducir con INF γ , carril 2- células transfectadas con pHSV-IRES-EGFP y sin inducir con INF γ , carril 3- células transfectadas con pHSV-OH1_{WT}-IRES-EGFP y sin inducir con INF γ , carril 4- células transfectadas con pHSV-OH1_{C112S}-IRES-EGFP y sin inducir con INF γ , carril 5- MPM thermo 26619, carril 6- pool de células transfectadas con pHSV-IRES-EGFP e inducidas con INF γ , carril 7-pool de células transfectadas con pHSV-OH1_{WT}-IRES-EGFP e inducidas con INF γ , carril 8 - pool de células transfectadas con pHSV-OH1_{C112S}-IRES-EGFP e inducidas con INF γ y carril 9- pool de células sin transfectar e inducidas con INF γ . En todos los casos se señala con recuadro y flecha la posición de las bandas. **A-** Revelado utilizando anticuerpo α -P-STAT1. **B-** Revelado utilizando anticuerpos α -STAT1, **C-** Revelado utilizando anticuerpos α -Pan-Actina y **D-** Revelado utilizando anticuerpos α - Actina. Todos los anticuerpos utilizados se indican en la tabla 4.

Como se disponía de más extracto proteico se decidió repetir el ensayo sembrando el doble de muestra en cada carril (20 μ g), lo que claramente mejoró el resultado de la inmunodetección. En la figura 17 se resumen los resultados obtenidos. Al igual que en el primer experimento, al revelar con el Ac anti P-STAT-1 se observó una banda de mayor señal que se corresponde con P-STAT-1, presente claramente como era de esperar solo en las muestras inducidas con INF γ (figura 17-A). Además se observan nuevamente bandas de menor tamaño reconocidas por dicho Ac, que seguramente se corresponden con formas de dicha proteína con diferente grado de degradación.

Al igual que el ensayo anterior, esta misma membrana se utilizó para detectar STAT-1 total (figura 17-B), mejorando su detección respecto al WB anterior. Se observa una señal principal del tamaño esperado en todas las muestras (tanto inducidas como no inducidas). Esto es lo esperado ya que STAT-1 se encuentra presente tanto en las células sin inducir como inducidas. Por otro lado, se observan bandas adicionales que posiblemente explican la detección de otras formas de STAT-1 presentes en la muestra, como sugerimos más arriba al revelar con el Ac anti P-STAT-1. Por último, la detección de actina también mejoró en este nuevo WB (figura 17-C), observándose una señal más

intensa y pareja en todas las muestras. En esta figura si bien se muestra la banda más intensa, igualmente se detectaron múltiples bandas como en el WB anterior.

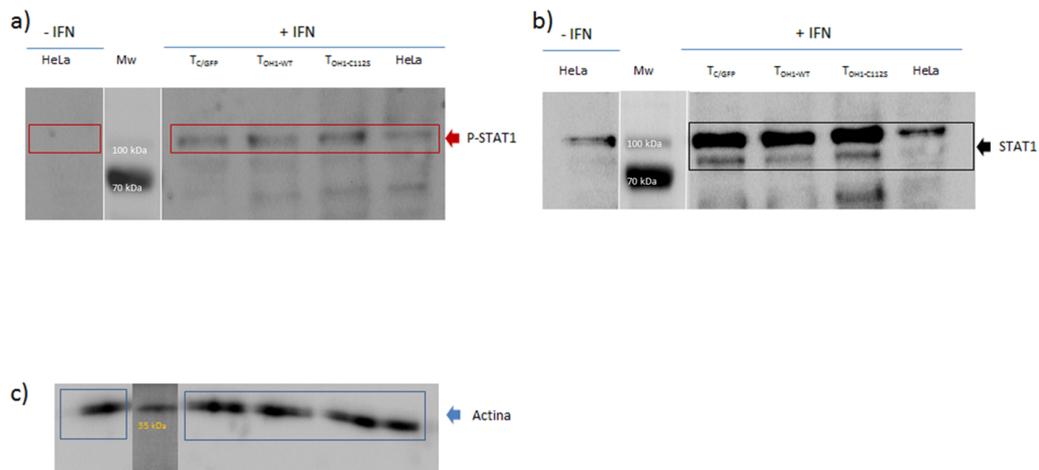


Figura 17. Se sembró en el gel de proteínas, los extractos celulares correspondientes a las siguientes condiciones en orden: carril 1-Células HeLa sin inducir con INF γ , carril 2- MPM thermo 26619, carril 3- células transfectadas con pHSV-IRES-EGFP e inducidas con INF γ , carril 4- células transfectadas con pHSV-OH1_{WT}-IRES-EGFP e inducidas con INF γ , carril 5- células transfectadas con pHSV-OH1_{C112S}-IRES-EGFP e inducidas con INF γ , carril 6- células sin transfectar e inducidas con INF γ . **A-** Revelado utilizando anticuerpo α -P-STAT-1, **B-** Revelado utilizando anticuerpo α -STAT-1 y **C-** Revelado utilizando anticuerpos α - Actina. Los anticuerpos utilizados se indican en la tabla 4.

Las imágenes obtenidas en este segundo WB se utilizaron para el análisis del nivel de fosforilación de STAT-1. Para ello, tal como se describe en la metodología, se utilizó el programa ImageJ con el objetivo de evaluar en cada carril el porcentaje de P-STAT-1 respecto a STAT-1 total, o respecto al nivel de actina detectado en las diferentes muestras. En el anexo B se resume el procedimiento de análisis utilizado, ejemplificado para P-STAT-1 y STAT-1 total, y en la tabla 11 se observan los valores obtenidos utilizando imagej.

Tabla 11. Valores obtenidos utilizando ImageJ.

	Área P-STAT-1	Área STAT-1	P-STAT1/STAT1	Área Actina	P-STAT1/Actina
Control HeLa (-IFN)	2610	3973	0,7	33191	0,1
Control HeLa (+IFN)	14617	5090	2,9	14099	1,0
Transfección EGFP (+IFN) (17%)	16472	30289	0,5	34991	0,5
Transfección OH1 _{WT} (+IFN) (29%)	17352	23316	0,7	26983	0,6
Transfección OH1 _{C112S} (+IFN) (11%)	24000	33839	0,7	22651	1,1

En la figura 18 y tabla 11 se muestra la relación entre P-STAT-1/STAT-1 detectado para las células HeLa sin inducir e inducidas con INF γ . La cuantificación muestra el aumento de dicha relación (aproximadamente 4 veces mayor) en las células no transfectadas e inducidas con INF γ respecto a las no inducidas. Esto refleja el aumento de la forma fosforilada de STAT-1 en la Tyr 701 (P-STAT-1) respecto al STAT-1 total. En el caso de las células transfectadas (no importa con que plásmido) y estimuladas con INF γ , la relación P-STAT-1/STAT-1 fue similar a la observada para el control de células no transfectadas y sin inducir con INF γ . Este resultado no es lo que realmente se esperaba, pues en el caso de las células que expresan únicamente la EGFP o el mutante inactivo OH1_{C112S} se esperaba que dicha relación fuera similar a la observada con las células HeLa no transfectadas y estimuladas con INF γ . En cambio, en el caso de las células que expresan OH1 salvaje sí era de esperar que la relación P-STAT-1/STAT-1 disminuyera, lo que podría indicar la desfosforilación de STAT-1 por OH1. Algo que pensamos explica que la relación P-STAT-1/STAT-1 sea tan baja en las células transfectadas es el aumento que se observa de los niveles de STAT-1 total (tabla 11) en las células transfectadas respecto a las no transfectadas, claramente visible en las imágenes del segundo WB. Si bien se trata de un único experimento, esto podría sugerir que existió una inducción de STAT-1 total durante el ensayo de transfección. Sin embargo, este aumento de STAT-1 total en las células inducidas y transfectadas (aproximadamente 6 veces mayor que el valor de STAT-1 para

las células inducidas y no transfectadas) no se acompañó de un mayor aumento del nivel de P-STAT-1.

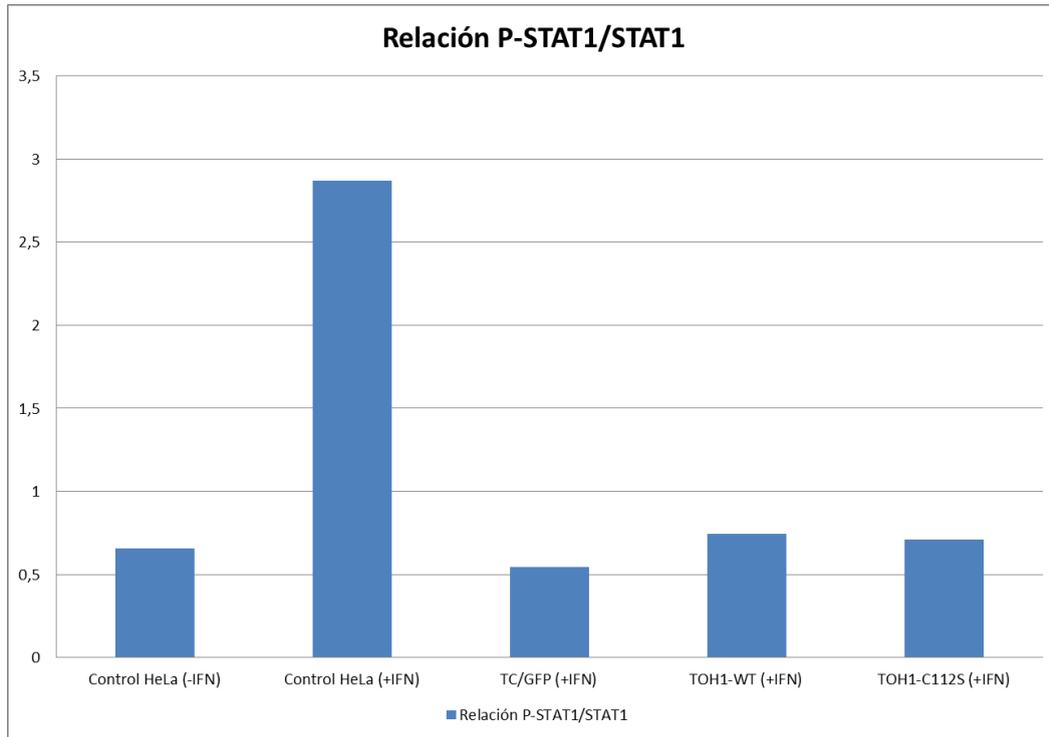


Figura 18. En el siguiente gráfico se muestra la relación entre P-STAT-1/STAT-1.

En resumen, estas observaciones impiden sacar conclusiones al realizar este análisis comparativo de los niveles de P-STAT-1/STAT-1 de células no transfectadas en comparación con las transfectadas. Por lo tanto, dado que en las muestras transfectadas como en las no transfectadas el nivel de la actina se mostró bastante estable se decidió realizar el análisis normalizando P-STAT-1 respecto al nivel de actina, obteniéndose el resultado mostrado en la figura 19 y tabla 11. En este caso, nuevamente se observa en las células no transfectadas un aumento del nivel de P-STAT-1 cuando estas son inducidas con interferón (lo esperado). Además se ve un aumento similar a este en el caso de las células transfectadas con el plásmido que porta el gen inactivo de OH1 y un menor aumento en el caso de las células transfectadas con el plásmido que porta el gen de OH1 salvaje. Esto va en acuerdo con lo que era esperado de acuerdo a nuestra hipótesis, pues si OH1 es activa y actúa sobre P-STAT-1 se espera disminuya la relación P-STAT-1/actina, y para OH1 inactiva no debería afectar la relación P-STAT-1/actina. Sin embargo, lo extraño es que en las células transfectadas con la EGFP se esperaría una relación similar a la del control sin transfectar y estimulado, pero se observa un efecto

menor, similar al observado al transfectar con OH1 salvaje. En un futuro será importante realizar nuevas réplicas del experimento para poder determinar si los cambios son significativos, y agregar como control adicional una transfección de las células con el plásmido sin la EGFP, para determinar si la expresión de esta proteína podría estar afectando de alguna manera la vía JAK-STAT-1.

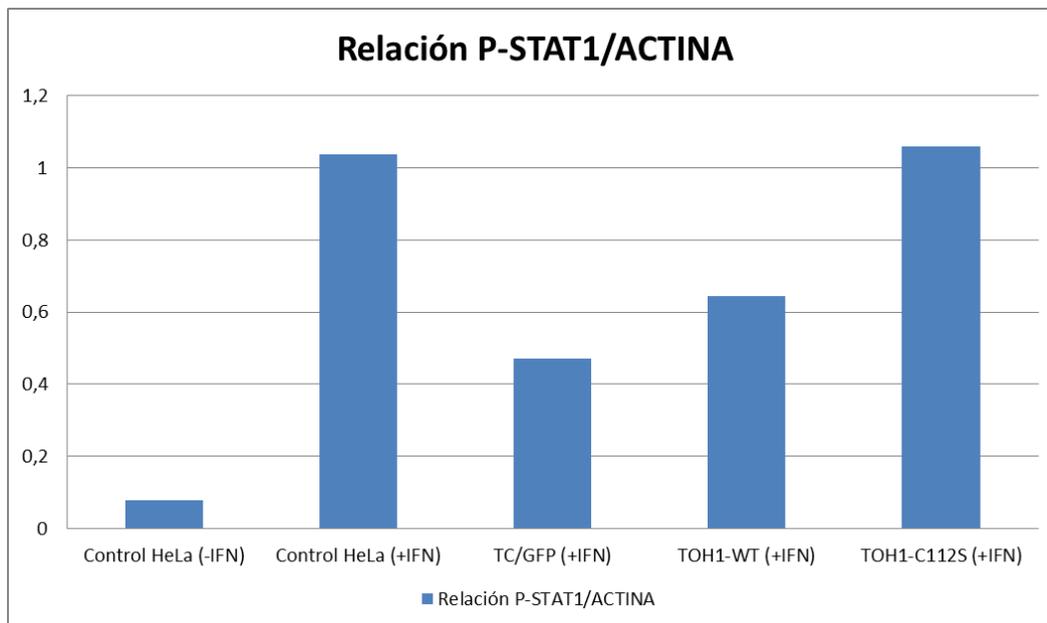


Figura 19. En el siguiente gráfico se muestra la relación entre P-STAT-1/ACTINA.

4. Conclusión y Perspectivas

Con respecto al primer objetivo podemos concluir que se logró llevar adelante los ensayos de transfección de células HeLa, avanzando en la puesta a punto del ensayo utilizando el vector control pHSV-IRES-EGFP. Sin embargo, debido a los efectos que observamos al expresar la OH1, creemos que el trabajo debe ser continuado, y en especial entendimos que sería más adecuado realizar la optimización directamente con el plásmido problema, es decir con el que porta el gen de la OH1 salvaje. Además es importante que se agreguen réplicas a los ensayos de transfección, pues observamos que a pesar de partir de un mismo inóculo de células HeLa el % de transfección y los μg de proteína total recuperados varió entre los pocillos de células. Otro aspecto a tener en cuenta es al momento de purificar los plásmidos a utilizar, seleccionar un kit que tenga una etapa de inactivación de endotoxinas, y evaluar si la falta de esa instancia en nuestros ensayos afectaron la viabilidad celular y porcentajes de transfección. Así

mismo, se podría evaluar el cambio del plásmido, pudiendo ser éste el utilizado por Harvey (pEGFP-057), y realizar la inducción con INF- γ .

Con respecto al segundo objetivo, podemos concluir que se logró evaluar la transfección de las células HeLa con el plásmido pHSV IRES-EGFP portando el gen de la fosfatasa viral OH1 salvaje (pHSV-OH1_{WT}-IRES-EGFP) y plásmido portando el gen de OH1 inactiva (pHSV-OH1_{C112S}-IRES-EGFP). Los % de transfección alcanzados no fueron tan altos. Una dificultad adicional a la hora de interpretar los resultados es que el % de transfección con los diferentes vectores no fue similar, lo que agrega una variable más al estudio y deberá ser considerada en estudios futuros. Esto causa que tengamos un % de células no transfectadas que varía y que agrega ruido a las cuantificación del efecto de OH1 sobre los niveles de P-STAT-1/actina realizados, ya que puede diluir el efecto de OH1 en las células.

Por último, se logró iniciar el abordaje del tercer objetivo, evaluando cambios en la fosforilación del factor de transcripción STAT-1 potencialmente modulados por OH1, en extractos proteicos obtenidos a partir de las células transfectadas. Si bien hasta ahora pudimos analizar un único ensayo, este fue relevante para determinar las dificultades de este tipo de aproximación. Como perspectivas, el grupo se encuentra llevando a cabo una nueva aproximación, basada en citometría de flujo que nos permite analizar un mayor número de eventos que por microscopia y a su vez permite centrarnos únicamente en las población de células transfectadas. En la misma se analizará únicamente la población EGFP positiva, y en ésta el nivel de fosforilación en la Tyr 701 de STAT-1. Otra posibilidad es realizar *cell sorting*, buscando recuperar una cantidad suficiente de células transfectadas (EGFP positivas) y a partir de estas preparar extractos que permitan evaluar por WB cambios en los niveles de fosforilación de P-STAT-1.

Finalmente debo destacar que durante el desarrollo de la tesina pude conocer como es el trabajo en el laboratorio, familiarizarme con diversas técnicas tanto de cultivos celulares como de biología molecular, lo que claramente contribuyó a mi formación.

ANEXOS

A-

En la figura 1 se muestran las imágenes representativas de la transfección número 8. En este caso se observa mayor fluorescencia tanto para el control como para las transfecciones con el con el vector conteniendo el gen de OH1 (WT o C112S). Los extractos proteicos de dicho ensayo se encuentran disponibles en el laboratorio.

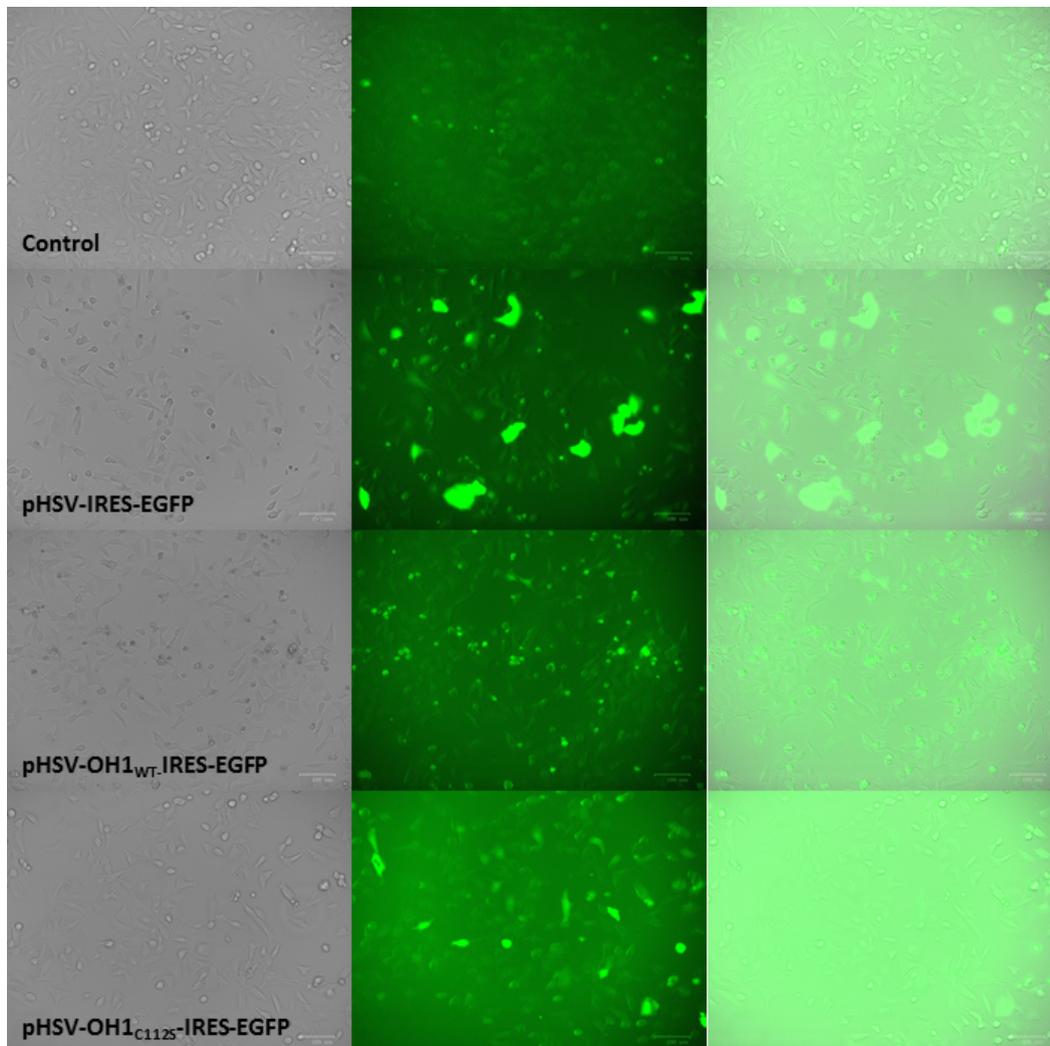


Figura 1. Se muestran imágenes de epifluorescencia representativas de las transfecciones realizadas. Para cada transfección se muestran 3 imágenes, la primera en campo claro, la segunda utilizando el canal verde (que permite visualizar los focos fluorescentes en verde) y la tercera generada al combinar las dos antes mencionadas. En primera línea se muestra el control negativo del ensayo, como es de esperar no se ven focos fluorescentes en las células.

Luego se ven las transfecciones donde se utilizaron los diferentes vectores, el vector control pHSV-IRES-EGFP, el vector pHSV-OH1_{WT}-IRES-EGFP y el vector pHSV-OH1_{C112S}-IRES-EGFP.

B-

CUANTIFICACIÓN CON IMAGE J

Se muestra a modo de ejemplo los histogramas generados al analizar las imágenes de los western blot, tanto para P-STAT-1 (imagen 2) como para STAT-1 total (imagen 3) y en la tabla 11 se observan los valores para cada área.

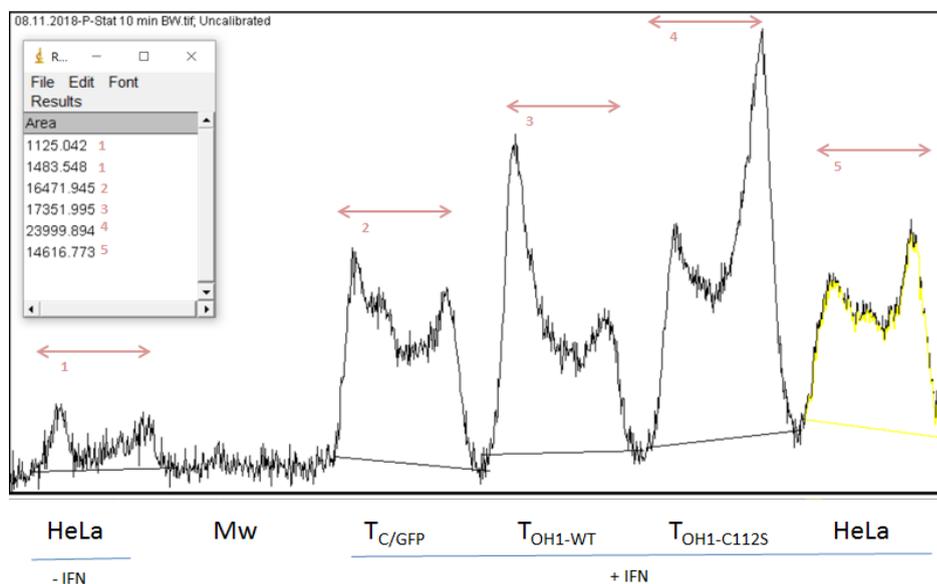


Figura 2. Histograma realizado con el software imagej al analizar las imágenes de western blot del revelado con el anticuerpo anti P-STAT-1.

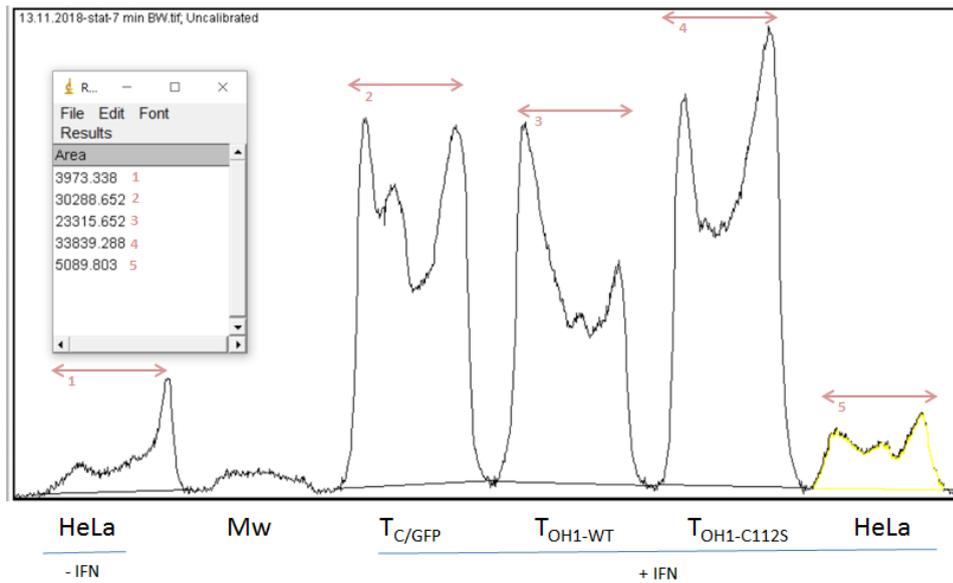


Figura 3.: Histograma realizado con el software imagej al analizar las imágenes de western blot del revelado con el anticuerpo anti STAT-1

C-

SOLUCIONES

- **Buffer de lisis**

150 mM NaCl

1% tritón 100x

0,5 % Deoxicolato de sodio 10x

0,1% SDS

50 mM TRIS (Ph 8) tris HCl

Glicerol 1%

1 mM EDTA

1 mM DTT

Inhibidor de proteasas (cocktail sigma) 1x

Inhibidores de fosfatasa (ortovanodato de sodio) 4mM

- **Buffer de corrida 10x**

30,3 g TRIS- base

144 g glicina

10 g SDS

Csp 1L H₂O miliQ.

- **Buffer de carga (solución stock 4X)**

1,52 g de Tris base

2 g SDS

1 mg azul de bromofenol

2 mL beta mercaptoethanol

20 mL glicerol

ajustar a pH 6,8 con HCl

csp 50 ml H₂O miliQ conservar a -20 °C

- **Buffer de transferencia 1X**

100 mL de *buffer* de corrida 10X

200 mL de ETOH 95%

csp 1L H₂O miliQ.

- **TBS-T**

Tris-HCl 50 mM pH 7.5

NaCl 150 mM

Tween-20 al 0.1%

- **Stripping suave (Abcam)**

15 g/L glicina

1 g/L SDS

1% Tween20, pH=2.2

- **Buffer Tris *buffer* Tris-Acetato-EDTA 0,5 X (TAE)**

20 mM Tris-base pH 7.6, 20 mM ácido acético y 1 mM EDTA

Bibliografía

- Aaronson, D. S. y Horvath, C. M. 2002. **A road map for those who don't know JAK-STAT**. Science (New York, N.Y.), v. 296(5573), pp. 1653–1655. DOI: 10.1126/science.1071545.
- Barrera Ramírez, L. M., Drago Serrano, Ma. E., Pérez Ramos, J., Sainz Espuñes, T., Zamora, A. C., Gómez Arroyo, F. y Mendoza Pérez, F. 2004. **Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica**. Rev. Inst. Nal. Enf. Resp., v. 17(1), pp. 42-55. ISSN 0187-7585.
- Bergqvist, C., Kurban, M. y Abbas, O. 2017. **Orf virus infection**. Rev. Med. Virol., v. 27(4), pp. 1932–1941. DOI: 10.1002/rmv.1932.
- Bratke, K. A., McLysaght, A. y Rothenburg, S. 2013. **A survey of host range genes in poxvirus genomes**. Infect. Genet. Evol., v. 14, pp. 406–425. DOI: 10.1016/j.meegid.2012.12.002.
- Chong, Z. X., Yeap, S. K., y Ho, W. Y. 2021. **Transfection types, methods and strategies: a technical review**. PeerJ., v. 9, pp. e11165. DOI: 10.7717/peerj.11165.
- Fairley, R. A., Whelan, E.M., Pesavento, P.A. y Mercer, A.A. 2008. **Recurrent localised cutaneous parapoxvirus infection in three cats**. N. Z. Vet. J., v. 56(4), pp. 196–201. DOI: 10.1080/00480169.2008.36833.
- Gilray, J. A., Nettleton, P. F., Pow, I., Lewis, C. J., Stephens, S. A., Madeley, J. D. y Reid, H. W. 1998. **Restriction endonuclease profiles of orf virus isolates from the British Isles**. The Veterinary record, v. 143(9), pp. 237–240. DOI: 10.1136/vr.143.9.237.
- Grupo Merck, 2020. 1.10306.0500 Protein (Bradford Method) [Internet], Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany. Disponible desde: https://www.merckmillipore.com/INTL/es/product/Protein-Kit,MDA_CHEM-110306#anchor_PL [Acceso 26 de abril de 2022].
- Haig, D. M. y McInnes, C. J. 2002. **Immunity and counter-immunity during infection with the parapoxvirus orf virus**. Virus Research, v. 88(1–2), pp. 3–16. DOI: 10.1016/s0168-1702(02)00117-x.
- Harvey, R., McCaughan, C., Wise, L. M., Mercer, A. A. y Fleming, S. B. 2015. **Orf virus inhibits interferon stimulated gene expression and modulates the JAK/STAT signalling pathway**. Virus research, v. 208, pp. 180–188. DOI: 10.1016/j.virusres.2015.06.014.

- Henderson, D. A. 2011. **The eradication of smallpox – An overview of the past, present, and future.** Vaccine, v. 29(4), pp. D7–D9. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.06.080.
- Hosamani, M., Scagliarini, A., Bhanuprakash, V., McInnes, C.L. y Singh, R.K. 2009. **Orf: an update on current research and future perspectives.** Expert Rev. Anti. Infect. Ther., v. 7(7), pp. 879–893. DOI: 10.1586/eri.09.64.
- Iglesias Artola, J. M., Villamonte, G. y Gonzales Molfino, H. M. 2015. **Transfección de ADN a células de animales como herramientas utilizadas en biotecnología animal.** The Biologist (Lima), v. 13(1), pp. 125-142. ISSN Versión en línea 1994-9073.
- Jo, J. y Tabata, Y. 2008. **Non-viral gene transfection technologies for genetic engineering of stem cells.** European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 68(1), pp. 90-104. DOI: 10.1016/j.ejpb.2007.04.021.
- Laimbacher, A. S., Esteban, L. E., Castello, A. A., Abdusetir Cerfoglio, J. C., Argüelles, M. H., Glikmann, G., D'Antuono, A., Mattion, N., Berois, M., Arbiza, J., Hilbe, M., Schraner, E. M., Seyffert, M., Dresch, C., Epstein, A. L., Ackermann, M., & Fraefel, C. 2012. **HSV-1 amplicon vectors launch the production of heterologous rotavirus-like particles and induce rotavirus-specific immune responses in mice.** Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy, v. 20(9), pp 1810–1820. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.108>.
- Liu, K., Lemon, B., y Traktman, P. 1995. **The dual-specificity phosphatase encoded by vaccinia virus, VH1, is essential for viral transcription in vivo and in vitro.** Journal of virology, v. 69(12), pp. 7823–7834. DOI: 10.1128/JVI.69.12.7823-7834.1995.
- Mann, B. A., Huang, J. H., Li, P., Chang, H. C., Slee, R. B., O'Sullivan, A., Anita, M., Yeh, N., Klemsz, M. J., Brutkiewicz, R. R., Blum, J. S. y Kaplan, M. H. 2008. **Vaccinia virus blocks Stat1-dependent and Stat1-independent gene expression induced by type I and type II interferons.** J. Interferon Cytokine Res., v. 28(6), pp. 367–380. DOI: 10.1089/jir.2007.0113.
- Mao, X., Ren, Z., Parker, G. N., Sondermann, H., Pastorello, M. A., Wang, W., McMurray, J. S., Demeler, B., Darnell, J. E., Jr, y Chen, X. 2005. **Structural bases of unphosphorylated STAT1 association and receptor binding.** Molecular cell, v. 17(6), pp. 761–771. DOI: 10.1016/j.molcel.2005.02.021.
- March Rosselló, G. A. y Eiros Bouza, J. M. 2012. **Citometría de flujo: fundamento, instrumentación y aplicaciones en microbiología clínica.** Rev. Electron. Biomed., v. 3, pp. 45-53. ISSN: 1697-090X.
- Mertens, C., Zhong, M., Krishnaraj, R., Zou, W., Chen, X. y Darnell, J. E., Jr. 2006. **Dephosphorylation of phosphotyrosine on STAT1 dimers requires extensive spatial reorientation of the monomers facilitated by the N-terminal domain.** Genes & development, v. 20(24), pp. 3372–3381. Doi: 10.1101/gad.1485406.

- Nandi, S., De, U.K. y Chowdhury, S. 2011. **Current status of contagious ecthyma or orf disease in goat and sheep-A global perspective**. Small Ruminant Research, v. 96(2–3), pp. 73–82. DOI:10.1016/J.SMALLRUMRES.2010.11.018.
- Olivero, N. 2012. **Estudio de los mecanismos genéticos implicados en la variabilidad del virus causante del Ectima Contagioso en ovinos**. Tesis de Maestría, Universidad de la República.
- Porley, D. 2017. **Expresión en células HeLa de la única fosfatasa de fosfo-tirosina del virus Orf: hacia la validación de interactores**. Tesis de maestría, Universidad de la República.
- Riccardi, C y Nicoletti, I. 2006. **Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry**. Nature protocols, v. 1(3), pp 1458–1461. DOI: 10.1038/nprot.2006.238.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., y Eliceiri, K. W. 2012. **NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis**. Nature methods, v 9(7), pp.671–675. DOI: 10.1038/nmeth.2089.
- Segovia, D. 2016. **Caracterización estructural y funcional de la única fosfatasa del virus Orf**. Tesis de Maestría, Universidad de la República.
- Segovia, D., Haouz, A., Porley, D., Olivero, N., Martínez, M., Mariadassou, M., Berois, M., André-Leroux, G. y Villarino, A. 2017. **OH1 from Orf Virus: A New Tyrosine Phosphatase that Displays Distinct Structural Features and Triple Substrate Specificity**. Journal of molecular biology, v. 429(18), pp. 2816–2824. DOI: 10.1016/j.jmb.2017.07.017.
- Shuai, K. y Liu, B. 2003. **Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system**. Nature reviews. Immunology, v. 3(11), pp. 900–911. DOI: 10.1038/nri1226.
- Wang, R. y Luo, S. 2018. **Orf Virus: A New Class of Immunotherapy Drugs**. En: Vlachakis, D. (ed.). Systems Biology. IntechOpen, London, 17 pp. DOI: 10.5772/intechopen.81535.