

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA URUGUAY





Estudio del papel de la fosfatasa

PtpA de Mycobacterium tuberculosis

en el metabolismo energético de

células eucariotas THP-1

Tesis Maestría en Ciencias Biológicas

PEDECIBA Biología Lic. en Bioquímica Vivian Irving Iglesias

2022

Tutora Principal Dra. Andrea Villarino Co-tutora Dra. Celia Quijano





Dedicado a la memoria de mi madre.

"... Puedes hacer lo que a ella le gustaría: son reír, abrir los ojos, amar y seguir."

Agradecimientos

Agradezco a mis tutoras, Andrea y Celia, por aceptar recorrer éste camino juntas. Gracias por todos los conocimientos trasmitidos y los momentos compartidos.

Gracias a toda mifamilia por todo el apoyo incondicional a lo largo de todos estos años. En especial a mis padres, mi hermano y mi tía Pati por la energía y la fe puesta en mí para culminar este proceso. Un gracias más especial aún, a mi esposo Ramiro por ser un pilar más en mi vida y no permitirme caer en los momentos más difíciles.

Agradezco enormemente también a mis compañeros de la 314 con quienes compartimos mucho más que la pasión por la ciencia. A Juan, Lore, César, Célica y Susana gracias por su compañía y amistad en lo profesional y en lo personal. Al grupo de fosfatasas: Gabi, Tania, Seba, Mariana y Mabel, gracias por las colaboraciones y sin duda gracias por su amistad y apoyo cuando lo necesité. Entre todos hicieron de esto un proceso lleno de anécdotas hermosas y alegres que me acompañarán siempre.

Gracias atoda la sección Bioquímica, fue un gusto compartir todos estos años contodo el equipo.

Gracias a Marina Forrelad y a Fernando Herrera por recibirme en sus hogares y sus trabajos para compartir sus conocimientos y enriquecer mi proyecto de maestría.

Agradezco a PEDECIBA, por las becas para pasantías o cursos y por la comprensión en los tiempos que me llevó culminar esta etapa.

Finalmente Agradezco a la ANII y la CAP por las becas de maestría y finalización de maestría otorgadas.

Resumen

La PtpA es una fosfatasa de tirosina y un reconocido factor de virulencia de Mycobacterium tuberculosis. Esta proteína es introducida dentro del macrófago durante la infección, donde actúa sobre proteínas del hospedero contribuyendo a la evasión de la respuesta inmune. El grupo en el cual se enmarca ésta tesis reportó nuevos potenciales blancos de PtpA vinculados al metabolismo energético del hospedero: las proteínas mitocondriales, proteína trifuncional (TFP) subunidad alfa (ECHA), la ATP sintasa subunidad alfa (ATPA), la sulfuro quinoa oxidoreductasa (SQRD) y la proteína citosólica fosfofructo quinasa 1 (PFK1 o K6PP). Estas proteínas presentan todas tirosinas fosforiladas, pero el rol de estas en el metabolismo casi no se conoce. Así, buscando contar con un modelo para estudiar el efecto de Ptpa sobre del metabolismo celular de las células del huésped, el objetivo central de esta tesis fue evaluar diferentes estrategias que permitieran introducir la actividad PtpA en monocitos humanos o macrófagos. Una vez alcanzado este objetivo, se planteó analizar si la actividad PtpA se correlacionaba con cambios en el metabolismo energético de estas células. Para abordar estos objetivos se realizaron ensayos que apuntaron a introducir el gen de la PtpA mediante transducción viral y transfección con plásmidos específicos. Sin embargo, los resultados obtenidos al utilizar estas estrategias en macrófagos humanos no fueron buenos. Por lo tanto, se decidió explorar una nueva estrategia, basada en introducir la proteína de interés en el citosol de las células eucariotas mediante pinocitosis. Para ello se obtuvieron las proteínas recombinantes PtpA-wt, el mutante inactivo PtpA-C11S y la proteína fluorescente verde GFP (como control), en cantidades y pureza adecuadas. Una vez puesto a punto el ensayo de pinocitosis se estudió el posible impacto de la actividad de PtpA sobre la el consumo de oxígeno y acidificación extracelular de los monocitos THP1. Para ello, se realizaron experimentos, en células tratadas, o no, con PtpA-wt o el mutante inactivo PtpA-C11S. Los resultados preliminares obtenidos muestran que, en la ventana de tiempo analizada, no se detectan cambios en el consumo de oxígeno asociados a la actividad PtpA. Sin embargo, se observó una tendencia hacia una disminución de la velocidad de acidificación del medio extracelular en las células tratadas con PtpA-wt respecto a las tratadas con el mutante inactivo PtpA- C11S. Esperamos confirmar estos resultados y profundizar en los mecanismos moleculares detrás de este evento. Por otro lado, se trabajó en la obtención de la cepa de *M. tuberculosis* mutante para el gen de la PtpA, que será utilizada en ensayos futuros de infección de células eucariotas. Por último, se realizaron aproximaciones in silico, donde se estudió la interacción de PtpA con la subunidad alfa de la TFP mitocondrial, uno de los candidatos a sustrato identificados por nuestro grupo.



En la quinta tira publicada en la revista Sem@foro de Diciembre 2020, Coco y Fran durante la pandemia también se dedicaron a mirar películas, la que más les gustó fue "El plan de Tuberculosis".

GUIÓN E ILUSTRACIÓN: Alejandro Rodríguez Juele y Nicolás Peruzzo.

MATERIAL CIENTÍFICO/TÉCNICO: Andrea Villarino, Mariana Margenat, Vivian Irving, Tania García, Ana María Ferreira

ADAPTACIÓN: Daniela Arredondo, Valentina Carrasco, María José González y Paola Scavone.

Índice

1.	INTRODUCCIÓN					
1.1.	1.1. Situación actual dela Tuberculosis					
1.2.	1.2. Características de Mycobacterium tuberculosis 11					
1.3.	La fosfata	asa micobacteriana PtpA	13			
	1.3.1. La	fosfatasa PtpA es un factor de virulencia de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	. 16			
	1.3.2. Su	istratoseucariotas de PtpA y nuevos candidatos reportados por nuestro grupo	17			
1.4.	Cambios	metabólicos durante la infección	22			
2.	. OBJETIVO GENERAL					
2.1.	Objetivos	s Específicos	. 24			
3.	METODO	DLOGÍA	25			
3.1.	Reactivo	os químicos	25			
3.2.	Método	s generales de bioquímica y biología molecular	26			
	3.2.1.	Determinación de laconcentración proteica	26			
	3.2.2.	Electroforesis	26			
	3.2.3.	Electrotransferencia e inmunodetección	27			
	3.2.4.	Amplificación de ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	28			
	3.2.5. Ol	otención de células de <i>Escherichia coli</i> quimiocompetentes	29			
3.3.	3.3. Métodos generales debiología celular		29			
	3.3.1.	Cultivo de monocitos de la línea THP-1 humana	29			
	3.3.2.	Cultivo de la línea celular Vero 2.2	30			
	3.3.3.	Cultivo de la línea celular Hela	30			
3.4.	Estrateg	ias para introducir la actividad PtpA en las células eucariotas	31			
	3.4.1.	Sistema de transducción con vectores basados en el virus HSV1	31			
	3.4.1.1	Expansión de los plásmidos necesarios para la producción de los vectores virales	. 32			
	3.4.1.2	Producción del vector viral amplicón HSV-1	. 33			
	3.4.1.3	Transducción de los macrófagos con el vector control pHSV1-IRES-EGFP	34			
	3.4.2.	Transfección de células eucariotas con plásmidos pHSV1	35			
	3.4.2.1.	Producción del plásmido amplicón pHSV1-IRES-PtpA-C11S	35			
	3.4.3.	Introducción de proteínas recombinantes de interés en las células eucariotas	36			
	3.4.3.1.	Expresión y purificación de las proteínas recombinantes de interés	37			
	3.4.3.2.	Ensayo de pinocitosis	39			

3.5.	Evaluación de labioenergética celular	. 42		
3.6.	Obtención de un anticuerpo policional anti PtpA	. 43		
3.7.	Obtención y verificación del mutante <i>Mtb</i> -ΔPtpA	44		
3.8.	Estrategias <i>in silico</i> para predecir la tirosina de ECHA potencial blanco de PtpA	46		
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48		
4.1.	Transducción de células eucariotas con vectores tipo amplicón	48		
	4.1.1. Se obtuvieron los vectores virales de interés.	49		
	4.1.2. Transducción de macrófagos con el vector viral control	50		
4.2.	Transfección de macrófagos utilizando los plásmidos tipo pHSV	51		
	4.2.1. Obtención del plásmido portador de un gen de PtpA inactiva (pHSV-PtpA _{C115} -IRES-EGFP) 52			
	4.2.2. Transfección de células eucariotas con el plásmido control	55		
4.3.	Introducción de las proteínas de interés en las células eucariotas mediante pinocitosis	57		
	4.3.1. Obtención de las proteínas recombinantes necesarias para los ensayos de pinocitosis	58		
	4.3.2. Incorporación de la EGFP en las células eucariotas mediante pinocitosis	61		
	4.3.3. Incorporación de la proteína r PtpA-wtmicobacteriana en los macrófagos mediante			
	pinocitosis	. 65		
4.4.	Evaluación del metabolismo energético	71		
	4.4.1. Efecto de la pinocitosis y la incorporación de con r Ptpasobre el consumo de oxígeno			
	mitocondrial de los monocitos THP-1	71		
	4.4.2. Efecto de la pinocitosis y la incorporación de con rPtpA sobre la capacidad de acidificar el medi extracelular de las células THP-1	o 73		
4.5. Obtencióndelacepade Mtb mutantepara el gende PtpA, necesaria para la evaluación del rol de PtpA				
dura	ante la infección	. 76		
4.6.	$Estudios \textit{in silico} de interacci \circ on entre la fosfatasa micobacteriana PtpAylaTFP_{ECHA} \ldots constrained rechanced $	78		
	$4.6.1. \ Identificación de la Tyr-271 de TFP_{\text{ECHA}} como potencial blanco de PtpA \dots \\$	78		
5. Conclusiónyperspectivas				
6. ANEXO DIVULGACIÓN				
7. Bibliografía				



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Situación actual de la Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad de incidencia mundial (Figura 1.1) que afecta a humanos, bovinos y otras especies. El agente etiológico de la TB son las micobacterias del complejo TB, grupo que incluye al patógeno humano Mycobacterium tuberculosis (Mtb) [Vogelnest, 2013]. El bacilo responsable de esta enfermedad fue descubierto por el Dr. Robert Koch el 24 de marzo de 1882, por lo cual hoy nos referimos a *Mtb* también como "Bacilo de Koch". Mtb ha causado, en los últimos 20 años, la muerte de más de 30 millones de personas en el mundo a una tasa promedio de 1.5 millones por año. De hecho, la tuberculosis está entre las diez enfermedades que causa más muertes en el mundo, y hasta la llegada de la COVID-19 era la primera causa de muerte debida a enfermedades infecciosas [OMS, 2021]. Uruguay se sitúa en el contexto mundial y de la región de las Américas como un país con una tasa de incidencia media-alta (25-49/100,000 habitantes). La tendencia de la incidencia al ascenso progresivo en nuestro país comenzó en 2006 y continuó hasta 2019. Durante la pandemia de COVID-19 (2020- 2021) se observó un descenso de la incidencia de *Mtb* en el mundo, producto de un menor diagnóstico. De hecho, en un futuro cercano se piensa existirá un aumento de los casos de TB en el mundo, ya que la ausencia de diagnóstico temprano causa que la infección avance y a su vez se expanda con mayor facilidad entre las personas confinadas durante la pandemia. La tasa de incidencia de TB en Uruguay en el año 2021 fue 26.8 cada 100,000 habitantes correspondiente a 951 casos (casos nuevos más recaídas). Se notificaron 1031 casos, siendo la distribución por sexo: 70% en varones y 30% en mujeres. En relación a la distribución etaria, la población joven y activa, de 15 a 44 años fue la más a fectada (56% de los casos).

Las formas de TB pulmonar predominaron (89%) frente a las extra-pulmonares (11%). De los casos pulmonares, se confirmaron bacteriológicamente el 81% (691/951) y el 59% de los casos extrapulmonares (60/102), porcentajes mayores a los observados en años previos. Este aumento se asocia al incremento del uso de técnicas de diagnóstico molecular por parte de la Comisión Honoraria para la Lucha Antituberculosa y Enfermedades Prevalentes (CHLAEP). La incidencia de TB por departamento muestra que Montevideo tiene la mayor incidencia (38.6 casos/100,000 habitantes), concentrando el 56% del total de casos del país. Del total de departamentos del interior, destacan San José y Rivera con tasas de incidencia por encima de la media del país, desplazando a Maldonado y Paysandú que históricamente estaban en los primeros lugares (Figura 1.2) [CHLAEP, 2021].



Figura 1.1. Estimación de la situación mundial de la tuberculosis en el 2021. Se muestra la incidencia de la tuberculosis cada 10000 personas. Imagen extraída del Reporte Tuberculosis 2022 de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (www.who.int, visitada el 22 de agosto de 2022).



Figura 1.2. Situación de la Tuberculosis en Uruguay. Imagen extraída de Informe Nacional de la Situación de la Tuberculosis en Uruguay 2021, CHLAEP (chlaep.org.uy, visitada el 22 de agosto de 2022).

Desde el año 2000, se han salvado en el mundo más de 43 millones de vidas gracias al diagnóstico y quimioterapia efectiva de la enfermedad, que se basa en el uso de una combinación de cuatro antibióticos (isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida). En la Tabla 1.1 se describen los diferentes antibióticos utilizados en la quimioterapia. Estos se administran durante largos periodos y la gran mayoría de los enfermos pueden curarse si los medicamentos se suministran y se toman correctamente [OMS, 2015]. Sin embargo, la larga duración del tratamiento (unos seis meses) hace que muchos lo abandonen cuando se percibe una mejoría. Además, no todos los gobiernos del mundo pueden cumplir con las exigencias de la supervisión y solventar el costo de este tratamiento. Esto ha favorecido la aparición de cepas resistentes (Multidrug resistant TB, MDR-TB) a por lo menos dos medicamentos, la isoniazida y la rifampicina, que son los antibióticos más poderosos para el tratamiento de esa enfermedad [Glaziou et al., 2013; Balganesh et al., 2008; Koul et al., 2011; Weissenbacher et al., 2022.]. Además de la quimioterapia, existe una única vacuna disponible contra la TB, la Bacillus Calmette-Guérine que se trata de una cepa de Mycobacterium bovis atenuada luego de sucesivos pasajes en cultivo (*Mb*-BCG) [Fatima et al., 2020]. En Uruguay, en toda América del Sur, América Central, China, Japón, y África, para prevenir la TB se administra a los recién nacidos esta vacuna. La vacuna resulta efectiva en un 60-80 % de los niños, sin embargo en los adultos el porcentaje de protección es variable y menor.

Antibiótico	Blanco/Mecanismo	Resistencia
Rifampicina	Se une a la ARN polimerasa micobacteriana bloqueando la elongación del ARN que está siendo sintetizado.	Asociada a una mutación en el gen de la subunidad b de la ARN polimerasa (gen <i>rpoB</i>).
Isoniazida	Interfiere con numerosas vías metabólicas de <i>Mtb</i> . La isoniazida entra a la bacteria por difusión y es activada por la enzima catalasa- peroxidasa, codificada por <i>KatG</i> , de <i>Mtb</i> generándose una amplia variedad de especies reactivas con actividad bactericida que afectan la síntesis de ácido micólico, dañan el ADN, oxidan lípidos, y alteran el metabolismo del NAD ⁺ .	Asociada a mutaciones en los genes katG, inhA (NADH enoil acil carrier proteína reductasa), kasA (cetoacil ACP sintasa), ndh (NADH deshidrogenasa), ahpC (hidroperóxido reductasa).
Etambutol	Interfiere con la síntesis e integridad de la pared celular de la micobacteria inhibiendo las arabinosil transferasas codificadas por el locus <i>embCAB</i> esencial para la síntesis de arabinogalactano (<i>embA</i> y <i>embB</i>) y lipoarabinomannano (<i>embC</i>).	Asociada a mutaciones en el locus <i>embCAB</i> , principalmente en <i>embB</i> .

Tabla generada con información extraída de Shi et al. 2007 y Borssier et al. 2015.

1.2. Características de Mycobacterium tuberculosis

Las micobacterias como *Mtb* presentan una pared celular particular compuesta de una membrana citoplasmática cubierta por una capa extensa de peptidoglicanos unidos a polisacáridos esterificados con ácidos micólicos (60% del peso de la pared celular) [Kieser et al., 2014]. Además, la pared celular posee una gran proporción de lípidos libres y un compartimiento más externo llamado cápsula, compuesto por hidratos de carbono y proteínas con pequeñas cantidades de lípidos [Daffé et al., 1997]. Las Mtb son bacterias con un tamaño de 0.5 x 4 micras, ligeramente curvadas, inmóviles, no formadoras de esporas, aerobias estrictas y de crecimiento lento. Es una bacteria muy sensible al calor, la luz solar y la luz ultravioleta, pero es resistente al frío, la congelación y la desecación. Este bacilo es capaz de sobrevivir durante meses si es mantenido en un lugar fresco y oscuro, y durante semanas en materiales como alfombras, cadáveres, abonos, papel o ropa, o bien formando parte del polvo [INSST, 2021]. *Mtb* se transmite de persona a persona a través del aire, afecta principalmente los pulmones (TB pulmonar), pero también puede afectar otros órganos (TB extra-pulmonar). Cuando un enfermo de TB pulmonar tose, estornuda o expectora, expulsa bacilos tuberculosos al aire [Russell, 2001], que son inhalados en forma de pequeñas gotas, llegan a los alvéolos pulmonares donde son fagocitadas principalmente por los macrófagos alveolares (Figura 1.3.). El riesgo de que un individuo se infecte depende del grado de contacto con la persona enferma, de la carga bacteriana inhalada y de su estado inmunológico. En la primera etapa de infección, Mtb se replica intracelularmente dentro de los macrófagos alveolares. En la mayoría de los individuos infectados, se desarrolla una respuesta inmune celular efectiva entre las 2-8 semanas luego de la infección, que impide que la bacteria se siga multiplicando. Se forma una estructura compleja y ordenada llamada granuloma, que consiste en un núcleo de

macrófagos infectados y células necróticas producto de la infección, rodeado por una capa de células especializadas derivadas de los macrófagos, conocidas como células gigantes multinucleadas, células espumosas o células epiteloides. Por fuera de esta capa, se encuentran otras células del sistema inmune principalmente linfocitos T efectores, que se rodean de tejido fibroso y que contribuyen a limitar la replicación y propagación de la bacteria. Se calcula que una cuarta parte de la población mundial se encuentra infectada, sin embargo sólo una baja proporción (10%) de esta desarrolla la enfermedad [OMS, 2021]. *Mtb* puede permanecer en un estado de latencia por muchos años hasta su reactivación. Durante este período la persona no presenta síntomas de la enfermedad, y tampoco transmite la infección. Las personas infectadas con esta forma latente se estima tienen a lo largo de la vida un riesgo del 10% de enfermar de tuberculosis. Sin embargo, este riesgo aumenta en las personas cuyo sistema inmunitario se encuentra comprometido, como ocurre en personas de edad avanzada, casos de co-infección por el VIH, malnutrición o diabetes, o en quienes consumen tabaco [OMS, 2015]. Cuando la forma activa de la enfermedad se presenta, los síntomas (como tos, fiebre, sudores nocturnos, pérdida de peso) pueden ser leves durante muchos meses. Como resultado los pacientes tardan en buscar atención médica y transmiten la bacteria a otras personas. A lo largo de un año, un enfermo que está manifestando la enfermedad puede infectar a unas 10 a 15 personas por contacto estrecho. Si no reciben el tratamiento adecuado, dos terceras partes de los enfermos mueren.



Figura 1.3. Etapas de la infección por *M. tuberculosis.* La infección por *M. tuberculosis* se inicia cuando finas partículas conteniendo de una a tres bacterias son expelidas por un individuo con tuberculosis activa (enfermo bacilífero) e inhaladas por otro individuo y depositadas en el lóbulo pulmonar inferior. Allí, la bacteria activa el reclutamiento de macrófagos desde la superficie pulmonar y es fagocitada por estas células especializadas del sistema inmune. Una vez dentro de la célula fagocítica, la bacteria es transportada desde el epitelio pulmonar hacia tejidos más profundos donde comienza un nuevo ciclo de reclutamiento de células inmunes dando lugar al granuloma. En una etapa temprana, el granuloma permite que las bacterias se diseminen entre los macrófagos recién llegados, no obstante, una vez que comienza a desarrollarse la inmunidad adaptativa, el granuloma restringe el crecimiento bacteriano. En ciertas circunstancias ocurre la necrosis de los macrófagos infectados contenidos en el granuloma formándose un centro necrótico donde las bacterias vuelven a replicarse y son transmitidas a un nuevo hospedero. Tomada de [Cambier et al., 2014].

1.3. La fosfatasa micobacteriana PtpA

Mtb es capaz de evadir la respuesta inmune del hospedero, sobreviviendo y replicándose dentro de las células que infecta [Koul et al., 2000; Sullivan et al., 2012]. Hasta hace unos pocos años se pensaba que *Mtb* persistía exclusivamente dentro del fagosoma de las células infectadas, sin embargo el descubrimiento de micobacterias en el citosol desafió este paradigma [Houben et al., 2012]. Además, se ha demostrado que existe una correlación entre la patogenicidad y la translocación al citosol de *Mtb* así como con la secreción de factores de virulencia tempranos tales como el antígeno ESAT-6 (*Early Secretory Antigenic Target 6 kDa*). Es así que *Mtb* introduce en el citosol del huésped

efectores bacterianos capaces de modular la actividad de componentes implicados en vías de señalización asociadas a procesos celulares vitales. Entre estos efectores se encuentran las fosfatasas PtpA y PtpB, que constituyen las dos únicas fosfatasas de tirosina (*Protein Tyrosine Phosphatases* o PTPs) de *Mtb*. Existen evidencias experimentales que PtpA alcanza el citosol y núcleo del macrófago infectado [Bach et al., 2008; Cowley et al., 2002; Wang et al., 2017]. Se ha sugerido a los sistemas de secreción ESX/type VII como el sistema responsable de la secreción de PtpA. Este sistema es capaz de transportar proteínas que no cuentan con una secuencia señal de exportación, como ocurre con PtpA [Sullivan et al., 2012; Wong et al., 2013].

PtpA pertenece a la familia de PTPs de bajo peso molecular (LMW-PTP, 18 kDa), es monomérica y su estructura terciaria ya ha sido resuelta [Madhurantakam et al., 2005]. Las PTPs poseen un dominio catalítico conservado (CX₅RS/T, denominado bucle de unión a fosfato o Ploop) que incluye una cisteína catalítica (C11 en PtpA). Además, cuentan con un aspartato conservado (D126 en PtpA) ubicado en un bucle denominado D-loop [Denu et al., 1996], el cual es capaz de acercarse al sitio de reacción luego de unido el sustrato asistiendo la catálisis [Madhurantakam et al., 2008]. La Figura 1.4 muestra los diferentes niveles estructurales de la PtpA de *Mtb*, indicando los residuos conservados. El mecanismo de reacción de este tipo de fosfatasas (Figura 1.5) consiste en dos etapas: (i) En la primera la cisteína catalítica, cuyo grupo tiol (-SH) se encuentra como tiolato (-S⁻) realiza un ataque nucleofílico al grupo fosfato unido a la tirosina del sustrato, formando un intermediario cisteinil-fosfato. El grupo tirosil saliente es protonado por el residuo de aspartato conservado (Asp126 en PtpA) que actúa como ácido. (ii) En la segunda etapa ocurre la hidrólisis del intermediario cisteinil-fosfato mediada por una molécula de agua que se encuentra coordinada con un residuo de arginina o glutamina, liberando el grupo fosfato y la cisteína catalítica, el Asp126 en esta etapa actúa como base aceptando el hidrogenión, y regenerando el sitio activo de la fosfatasa [Madhurantakam et al., 2008].



Figura 1.4 Estructura primaria, secundaria y terciaria de la PtpA de *Mtb***.** En la leyenda de la figura se indica cómo se señalan las diferentes estructuras primarias (hoja beta, hélices alfa, bucles) y residuos catalíticos. En diagrama de cintas se representa la estructura cristalográfica de PtpA (pdb 1U2P), incluyendo una esfera verde que representa una molécula de fosfato que co-cristalizó con PtpA y se ubica en el sitio activo de la enzima. Imágenes extraídas de *Protein Data Banck* (PDB) y adaptadas para esta tesis.



Figura 1.5. Esquema del mecanismo catalítico de las PTPs. A) El tiol de la cisteína catalítica se encuentra como tiolato estabilizado mediante una interacción ion dipolo con el hidrógeno del grupo hidroxilo de la cadena lateral de la Thr/Ser conservada del P-loop. Seguido a la unión del sustrato, en la cual la Arg del P-loop participa en posicionar el sustrato, el grupo tiolato actúa como nucleófilo atacando al grupo fosfato del sustrato. La formación del intermediario cisteinil-fosfato es facilitada por el Asp (loop conservado DPYY- flanqueando el sitio activo en las LMW-PTP) que dona un protón al grupo tirosilo saliente. A continuación, el sustrato desfosforilado se disocia del sitio de unión. B) La hidrólisis del intermediario cisteinil-fosfato es mediada por una molécula de H₂O. Aquí, el Asp actúa como base aceptando un protón de la molécula de H₂O. En algunas clases de PTPs la molécula de agua es activada a través de puentes de hidrógeno con uno o dos aminoácidos polares, como se muestra en la figura para la interacción con la glutamina. Luego de aceptar el protón, el fosfato se disocia de la cisteína catalítica, y se regenera la conformación del sitio activo dela PTP. Figura adaptada de (Hobiger and Friedrich, 2015).

Por otro lado, PtpA posee 37% de identidad de secuencia y alta homología estructural con la fosfatasa humana hLMW-PTP o ACP1 [PDB 1u2q, Zhang et al., 1997]. A pesar de la alta homología estructural entre ambas fosfatasas, existen diferencias en la distribución de cargas superficiales en la región de entrada y cercanas al sitio activo. Estas regiones, menos cargadas en PtpA respecto a su ortólogo humano, podrían jugar un papel importante en la especificidad de sustrato(s) de PtpA [Wang et al., 2000; Zhang et al., 1998]. Estas características específicas de PtpA han motivado a numerosos grupos (entre ellos al nuestro) a buscar y desarrollar inhibidores de esta fosfatasa, considerada uno de los potenciales blancos terapéuticos contra la TB [Mascarello et al., 2010; Chiaradia et al., 2011; Wong et al., 2013; Sens et al., 2018; Savalas et al., 2020]. Inicialmente se postuló que PtpA se expresaba sólo en micobacterias patógenas con tasa de división lenta, como Mtb y M.bovis [Cowley et al., 2002]. Sin embargo, recientemente se observó que también la cepa de alta tasa de división M. smegmatis expresa PtpA, pero una forma menos activa a la expresada por Mtb [Chatterjee et al., 2015]. Además, no se ha demostrado que la PtpA de cepas no tan patógenas como *M. smegmatis* alcance el citosol del macrófago durante la infección. Esto se debe seguramente a que en las cepas no virulentas los sistemas de secreción implicados no son los mismos o no funcionan de igual manera que en las virulentas. Por lo tanto cepas como *M. smegmatis* o *Mtb* H37Ra avirulenta no son adecuadas para estudiar el efecto de PtpA en el citosol del macrófago.

1.3.1. La fosfatasa PtpA es un factor de virulencia de Mycobacterium tuberculosis

El gen de PtpA no es esencial para el crecimiento de *Mtb* en un medio de cultivo rico en nutrientes [Bach et al., 2008]. Sin embargo, existen estudios que demuestran que PtpA es necesaria tanto para la sobrevida de *Mtb* en macrófagos o modelos animales infectados [Bach et al., 2008; Wang et al., 2015]. Además, la cepa mutante *MtbΔmms*, en la cual se eliminaron los genes de las dos PTPs de *Mtb* (PtpA y PtpB) y el de la fosfatasa ácida secretada SapM, presentó una reducida capacidad para infectar y crecer en macrófagos derivados de la línea THP-1 y establecer una infección en conejillos de indias [Chauhan et al., 2013]. Luego de diez semanas post-infección no se recuperaron bacterias en el bazo ni en el pulmón de los animales, lo que sugiere que estas fosfatasas cumplen un rol importante de en la colonización de estos órganos. Estos resultados indican que esta cepa

mutante podría ser utilizada para el desarrollo de una nueva vacuna contra la tuberculosis. Sin embargo, la cepa mutante continuaba siendo virulenta, no lográndose controlar su propagación en el bazo luego de tiempos mayores de infección. Así, en 2018 [Bahal et al,, 2018] se generó una nueva variante de esta cepa que introducía además una mutación de un gen implicado en la síntesis de biotina (*Mtb*Δmmsb). Sin embargo, la protección impartida por esta cepa fue significativamente menor en comparación con la observada en animales inmunizados con la vacuna BCG. Por lo cual, la búsqueda de nuevas vacunas, mejores que la BCG, continúa siendo un desafío [Yousefi-Avarvand et al., 2018].

1.3.2. Sustratos eucariotas de PtpA y nuevos candidatos reportados por nuestro grupo

Las fosfatasas actúan generalmente sobre numerosos sustratos, por lo cual el uso de fosfatasas por Mtb proporciona al patógeno un mecanismo versátil para interferir con numerosas vías de señalización celular que se activan en respuesta a la infección. En la literatura existen ya varias proteínas eucariotas reportadas como sustratos fisiológicos o potenciales sustratos de PtpA de *Mtb* (Figura 1.6). El primer sustrato de PtpA reportado en la literatura es la proteína vacuolar protein sorting 33B (VPS33B), que forma parte del complejo proteico de clase C requerido para el tráfico y fusión de vesículas endocíticas [Bach et al., 2008; Wong et al., 2011]. PtpA desfosforila a VPS33B e interacciona con la subunidad H de la ATPasa vacuolar (V-ATPasa), evitando que se active el proceso de acidificación del fagosoma, así como su fusión al lisosoma. El segundo sustrato reportado de PtpA es la enzima *Glycogen synthase kinase-3 alpha* $(GSK3-\alpha)$ identificada a partir de un estudio fosfo-proteómico [Poirier et al., 2014]. En este estudio se compararon extractos proteicos de macrófagos infectados con una cepa de *Mtb* salvaje o mutante de PtpA (con el gen de *ptpa* interrumpido, cepa *Mtb*∆*ptpA*). Se observó que PtpA afecta el patrón de fosforilación de varias proteínas señalizadoras, en especial de GSK3-α, proteína cuya fosforilación en los residuos Tyr279 y Tyr216 es crítica para su activación como quinasa y para la inducción de vías apoptóticas. La desfosforilación de GSK3- α por PtpA bloquearía la apoptosis durante la infección temprana, favoreciendo así la sobrevida de Mtb en el macrófago. Por otra parte, recientemente se reportó que PtpA es capaz de interaccionar de forma no-covalente con la ubiquitina del hospedero, a través de un motivo nunca antes descrito (en inglés ubiquitin-interacting motif-like) [Wang et al., 2015]. Esta interacción incrementa la actividad de PtpA hacia VPS33B, y hacia las quinasas eucariotas Jnkyp38, dos

nuevos sustratos identificados. Los autores demuestran que la desfosforilación de Jnk y p38 por PtpA reduce la expresión de citoquinas proinflamatorias como TNF, IL-1-beta e IL-12, y conduce a un aumento en la sobrevida de la bacteria en células y pulmón de ratones infectados. La desfosforilación de JnK y p38 también regula otras moléculas corriente abajo en la vía de señalización, involucradas en la apoptosis, autofagia, respuesta al estrés y proliferación. Este mismo grupo demostró que PtpA es capaz de interaccionar con el represor transcripcional TRIM27, a través del dominio E3 ubiquitin-ligasa de dicho represor, disminuyendo así la respuesta inmune mediada por las vías Jnk/p38 y la apoptosis celular [Wang et al., 2016]. Debemos hacer notar que el grupo que identificó a GSK3- α como sustrato de PtpA no detectó que esta misma fosfatasa afecta los niveles de fosforilación de Jnk y p38 [Poirier et al., 2014]. Esto muestra que el uso de aproximaciones experimentales diferentes, no siempre conduce al mismo resultado, y enriquece la posibilidad de identificar nuevos sustratos ointeractores.

Nuestro grupo, también ha identificado cuatro nuevos potenciales sustratos fisiológicos de PtpA de *Mtb* mediante el uso de una estrategia clásica conocida como "mutant Substrat Trapping" (ST) acoplad a técnicas de espectrometría de masa [Margenat et al., 2015]. Ellos son cuatro proteínas involucradas directa o indirectamente con la síntesis de ATP: (i) la subunidad alfa de la enzima trifuncional TFP (ECHA) clave en la 🛛-oxidación de ácidos grasos de cadena larga (enoil-CoA hidratasa e hidoxiacil-CoA deshidrogenasa) [Eaton et al., 2000];

(ii) la subunidad alfa de la ATP sintasa (ATPA) un componente clave del dominio catalítico de la ATP sintasa [Beke-Somfai et al., 2013] y (iii) la sulfuro-quinona oxidoreductasa (SQRD), responsable de la oxidación de sulfuro de hidrógeno, capaz de transferir los electrones a ubiquinona en la cadena respiratoria [Goubern et al., 2007]; iv) la 6-fosfofructoquinasa (PFK1), enzima localizada en el citoplasma que cataliza la conversión irreversible de fructosa 6-fosfato y ATP a fructosa 1,6bisfosfato y ADP, la etapa de control más importante de la glucólisis en mamíferos [Evans et al., 1981; Coelho et al., 2007]. Estas proteínas fueron aisladas de extractos de macrófagos derivados de monocitos humanos enriquecidos en proteínas con tirosinas fosforiladas (p-Tyr). Las proteínas ECHA, ATPA y SQRD son sintetizadas a nivel citoplasmático para luego ser transportadas y translocadas a la mitocondria. Curiosamente, tres de los cuatro candidatos a sustrato de PtpA identificados por nuestro grupo, la ECHA, ATPA y SQRD, dejan de ser detectadas en la mitocondria de macrófagos infectados con la cepa virulenta de *Mtb* H37Rv [Jamwal et al., 2013]. Elo los

efectores bacterianos responsables de la disminución de estas enzimas en la mitocondria aún no se han determinado.



PtpA actúa sobre numerosas proteínas eucariotas

Figura 1.6 Esquema mostrando proteínas eucariotas reportadas como sustratos de la PtpA de *Mtb*. Se incluyen los potenciales sustratos identificados por nuestro grupo.

en las células infectadas

La TFP humana resulta un candidato interesante como potencial sustrato fisiológico de la PtpA de *Mtb* ya que juega un rol clave en la 🛛-oxidación de los ácidos grasos. Esta enzima cuenta con dos subunidades, la subunidad alfa (ECHA) con actividades enoil-CoA hidratasa e hidoxiacil-CoA deshidrogenasa y la subunidad beta (ECHB) con actividad cetoacil-CoA tiolasa. Por lo tanto TFP cataliza tres de las cuatro reacciones de esta vía. Ambas subunidades de este complejo enzimático son sintetizadas en el citosol de la célula y posteriormente son translocadas a la mitocondria, donde cumplen su función [Eaton et al., 2000]. De hecho, recordemos que la mayoría de las proteínas mitocondriales son sintetizadas por ribosomas citosólicos para luego ser importadas hacia la mitocondria. Estos antecedentes nos permiten proponer que la PtpA de *Mtb*, que ha sido localizada en el citosol del macrófago [Bach et al., 2008], podría encontrarse con la/las subunidades de la TFP en su tránsito a la mitocondria, afectando su destino final. Esto se ve apoyado por el resultado publicado que muestra la subunidad alfa de la TFP (ECHA), es una de las proteínas que dejan de ser detectadas en la mitocondria de macrófagos infectados con la cepa virulentade*Mtb* H37Rv, peronoenaquellosinfectadosconlacepaavirulenta*Mtb* H37Ra

[Jamwal et al., 2013]. Teniendo en cuenta todos estos antecedentes, nuestro grupo tiene como hipótesis de trabajo que PtpA es el factor bacteriano responsable de la disminución de la ECHA en la mitocondria. Esto traería consecuencias metabólicas importantes como la disminución en la actividad de la 🛛-oxidación, con la consecuente disminución de la síntesis de ATP a nivel mitocondrial y la acumulación de ácidos grasos en citosol (almacenadas como tracilglicéridos en gotas lipídicas). Estos ácidos grasos estarían a disposición de la bacteria y favorecerían su persistencia dentro de los macrófagos. Esto es relevante ya que existen evidencias que indican que los lípidos del hospedero constituyen la fuente principal de nutrientes para *Mtb* durante la infección [Daniel et al., 2011; Laval, et al., 2021]. Hasta ahora no existen evidencias acerca de cuál es el factor bacteriano responsable de la disminución de los niveles de ECHA en la mitocondria, por lo cual la posibilidad que PtpA participe en este proceso es sumamente interesante. La desfosforilación de ECHA por la PtpA, podría alterar su localización final dirigiéndola al proteasoma para su degradación, o reclutándola en algún otro compartimento celular. Nuestro grupo ya ha demostrado in vitro que la TFP interacciona y es sustrato de PtpA [Margenat, 2016], siendo la constante de disociación de 0.3 μ M, del orden del reportado para otras fosfatasas y sus sustratos [Czikora et al., 2011]. Además, los estudios con el inhibidor competitivo ortovanadato de sodio (Na₃VO₄) sugieren que la interacción con la TFP involucra al sitio activo de PtpA. Cabe destacar que la TFP cuenta con varias modificaciones pos-traduccionales, incluyendo fosforilación en Tyr, anotadas en la base de datos Phosphosite. Sin embargo, las quinasas/fosfatasas celulares involucradas y el rol de dichas modificaciones en la TFP aún no han sido estudiados.

La SQRD es el segundo candidato a sustrato identificado con alto *score* por espectrometría de masa. Esta enzima cataliza la oxidación del sulfuro de hidrógeno (H₂S) proveniente del metabolismo de aminoácidos que contienen azufre, y los electrones provenientes de dicha oxidación entran en la cadena respiratoria a nivel de la ubiquinona contribuyendo a la síntesis de ATP en la fosforilación oxidativa [Goubern et al., 2007]. El H₂S puede inhibir a la citocromo oxidasa, el complejo IV de la cadena respiratoria, por lo tanto la SQRD evita que los niveles de H₂S lleguen a niveles tóxicos e inhiban la producción de ATP mitocondrial [Cooper and Brown, 2008]. Por otro lado, en macrófagos inflamatorios la acumulación de H₂S disminuye los efectos nocivos del peroxinitrito, ya que puede reaccionar con este oxidante evitando la oxidación y nitración de componentes celulares

[Filipovic et al., 2012]. La SQRD se expresa en varios tejidos en mamíferos [Ackermann et al., 2014], sin embargo, los monocitos y macrófagos presentan una mayor capacidad de oxidación del H₂S dependiente de SQRD que otros tipos celulares que no pertenecen al sistema inmune [Lagoutte et al., 2010].

La ATPA es uncomponente clave del dominio catalítico F1 de la ATPsintasa, la enzima que cataliza la fosforilación del ADP a ATP en la mitocondria [Jonckheere et al., 2012]. Se han reportado varias modificaciones post-traduccionales para algunas de las subunidades de este complejo enzimático, incluyendo fosforilación en Tyr en la subunidad gamma [Di Pancrazio et al., 2006], lo que abre la posibilidad de que la desforilación de Tyr por PtpA cumpla un rol en la regulación de la actividad, aunque esto aún no se sabe [Kane and Van Eyk 2009].

La PFK fue la única proteína identificada como potencial sustrato de PtpA cuya ubicación no es mitocondrial [Margenat, 2016]. Hemos comentado ya que la PFK es una enzima clave en la regulación de la glucólisis en mamíferos y que resulta activada por fosforilación en Tyr, estimulando por tanto la glucólisis. La fosforilación en el dominio C terminal de la PFK, afecta su grado de oligomerización y la interacción con otras proteínas [Schöneberg et al., 2013; Harrahy et al., 1997; Cai et al., 1997], sin embargo el sitio específico de fosforilación responsable de esta modulación aún no se conoce [Zancan and Sola-Penna, 2005; Coelho et al., 2007; Coelho and Sola-Penna, 2013]. Además, curiosamente se ha postulado que altas concentraciones de lactato son capaces de disminuir la actividad de la PFK en todos los tejidos de ratón evaluados (hígado, riñón, tejido muscular esquelético y cardíaco) [Leite et al. 2011]. Estos autores sugieren al lactato como un metabolito relevante en la regulación de la actividad de la vía glucolítica, y presentan evidencias de que él mismo actuaría como antagonista del activador alostérico de la PFK, la fructosa-2,6-bisfosfato (molécula estimuladora de la glucólisis cuyos niveles aumentan por acción de lainsulina).



Figura 1.7. Vías metabólicas en las cuales están implicadas los potenciales sustratos de PtpA identificados por nuestro grupo. La fosfofructoquinasa (PFK) cataliza la conversión de fructosa 6-fosfato a fructosa 1,6-bifosfato, etapa de control más importante durante la glicólisis. La proteína trifuncional (TFP) cataliza 3 de las 4 etapas de la beta-oxidación de ácidos grasos: la subunidad alfa o ECHA posee dos dominios, uno con actividad 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (HACD) y otro con actividad enoil-CoA-hidratasa (ECH), y la subunidad beta posee actividad 3-cetoacil-CoA tiolasa (KACT). La sulfuro quinona oxidoreductasa (SQRD) cataliza la oxidación del H₂S, y los electrones producidos son transferidos a la cadena respiratoria. La subunidad α de la ATP (ATPA) cataliza la etapa final de producción de energía en la mitocondria.

1.4. Cambios metabólicos durante la infección

Estudios demuestran que durante la infección por *Mtb* ocurren cambios a nivel metabólico en los macrófagos. Algunos estudios sugieren que hay una transición "switch" en el macrófago desde un metabolismo en el cual el ATP es producido fundamentalmente por fosforilación oxidativa hacia un metabolismo fermentativo en el que el ATP se produce en la vía glucolítica y el piruvato es convertido en lactato, aún en condiciones de aerobiosis (fenómeno descrito como efecto Warburg). Esta hipótesis se apoya en estudios de metabolómica realizados en un modelo de infección por *Mtb* en cobayo y ratón que muestran que en todos los tejidos infectados (granulomatosos o no) hay acumulación de lactato [Shin et al., 2011, Somashekaretal.,2011y2012].Estatransición metabólicaque

causaría menor actividad de la cadena respiratoria mitocondrial podría proteger a la bacteria de especies reactivas de oxígeno y favorecer la acumulación de lípidos, importantes nutrientes para Mtb durante la infección [Daniel et al., 2011; Laval, et al., 2021]. Sin embargo, Cumming y colaboradores demostraron recientemente que durante la infección el macrófago adquiere un fenotipo quiescente, con una disminución de la fosforilación oxidativa y la glucólisis [Cumming B. et al., 2018]. En estos estudios se realizaron infecciones con *Mtb* en cultivos THP-1 y macrófagos derivados de monocitos humanos y se midió el consumo de oxígeno y acidificación extracelular utilizando un analizador de flujo extracelular (Seahorse XF96, Agilent). Por otro lado, existen evidencias que la infección de macrófagos por *Mtb* estimula el efecto Warburg y favorece la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-12) que contribuirían a eliminar el bacilo [Gleeson et al., 2016], por lo cual la modulación del metabolismo podría ser útil tanto a la bacteria como al hospedero. En este contexto, resulta fundamental demostrar si PtpA participa de alguna manera en alguno de los cambios metabólicos descritos, afectando el metabolismo energético del macrófago. Para ello es necesario contar con algún modelo en el laboratorio que nos permita abordar las hipótesis a nivel celular y no sólo *in vitro*. Por lo cual la presente tesis buscó evaluar diferentes estrategias para incorporar a la fosfatasa PtpA dentro de los macrófagos, lo que permitiría evaluar este factor de forma independiente. A su vez buscamos obtener la cepa de *M. tuberculosis* mutante para el gen de la PtpA, para estudios en un contexto de infección. Por último, llevamos a cabo aproximaciones in silico, para profundizar en la interacción de PtpA con la ECHA, uno de los candidatos a sustrato identificados por nuestrogrupo.

2. OBJETIVO GENERAL

Introducir la actividad de PtpA en células eucariotas y evaluar si la actividad de esta fosfatasa se correlaciona con cambios en el metabolismo energético.

2.1. Objetivos Específicos

- Evaluar diferentes estrategias para la introducción de la fosfatasa micobacteriana PtpA en monocitos humanos o macrófagos derivados de estos.
- Obtener el mutante ΔPtpA en una cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis*, para en un futuro evaluar el rol de PtpA durante la infección.
- Caracterizar la interacción *in silico* de PtpA con la proteína humana ECHA, uno de los candidatos a sustrato clave en la beta-oxidación de los ácidos grasos.



3. METODOLOGÍA

3.1. Reactivos químicos

Todas los productos que se detallan a continuación se obtuvieron de Sigma o AppliChem, o según se detalla.

Sales inorgánicas; compuestos utilizados en la preparación de soluciones amortiguadoras (buffer): ácido 4-(2-hidroxietil) -1-piperazina-etano sulfónico (HEPES), tris(hidroximetil) aminometano (TRIS).

PBS: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM. pH 7,0.

TBE: Tris acetato 20 mM, EDTA 2 mM, pH 8

Ditiotreitol (DTT); iodoacetamida (IAA); ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y etanolamina.

Inhibidores de proteasas: benzamidina, inhibidor de tripsina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), coctail de inhibidores de proteasas sin EDTA (Sigma S8830).

Sustrato artificial de fosfatasas: para-nitro fenil fosfato (p-NPP).

Agarosa, acrilamida, N,N'-metilen-bis-acrilamida, glicina, N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED), azul de bromofenol, azul de Coomasie R-250, azul de Coomasie G-250, seroalbúmina bovina (BSA), azida de sodio.

Solventes orgánicos: etanol, glicerol, formalina, acetonitrilo, dimetilsulfóxido (DMSO).

Reactivos utilizados en la preparación de medios de cultivo de bacterias: triptona, extracto de

levadura, Lysogeny broth (LB), agar.

Antibióticos: ampicilina, kanamicina, higromicina. Detergentes: lauril sulfato de sodio (SDS), polisorbato 20 (Tween 20). Tripsina

(Ginco, TrypLE[™]ExpressEnzyme1X, #12604013).

Inhibidores y desacoplantes del transporte electrónico y fosoforilación oxidativa: oligomicina, rotenona, antimicina A, carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona (FCCP).

Poli-L-lisina.

3.2. Métodos generales de bioquímica y biología molecular

3.2.1. Determinación de la concentración proteica

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford [Bradford, 1976], basado en la detección de la interacción del Azul de Coomasie G-250 con ciertos aminoácidos presentes en las proteínas (Arg, Trp, Tyr, His, Phe). Esta interacción provoca un corrimiento en el espectro de absorción del compuesto de un color rojo/amarronado al color azul, fácilmente detectable a 595nm. Se realizó un micro-Bradford, adaptado al uso de placas de 96 pocillos. A 10 µL de cada muestra se le agregaron 200 µL del reactivo de Bradford (Coomassie Brilliant Blue G-250 10% disuelto en 5 partes de etanol 95%, 10 partes ácido fosfórico 85% y 85 partes de agua Milli-Q). Se mezcló e incubó 5 min, y se midió la Abs_{595nm}. Las muestras y diferentes concentraciones del estándar de BSA (50-1000 µg/mL) se analizaron por triplicado. Con los valores de absorbancia del estándar de BSA se realizó una curva de calibración la cual se ajustó a una ecuación de segundo orden como recomiendan Olson et al. (y=ax²+bx+c siendo y= µg de BSA por µL y x= Abs_{595nm}) [Olson et al., 2007].

3.2.2. Electroforesis

En la electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) las proteínas se separaron según su peso molecular siguiendo el protocolo convencional [Laemmli, 1970]. Se utilizó un gel concentrador al 6% y un gel separador al 12% de acrilamida. Las muestras se diluyeron en de buffer muestra (1X) utilizando un stock 6X (Tris 0.35 M, SDS 10%, glicerol 30%, azul de bromofenol 0.02%), se les agregó DTT 50 mM final, se calentaron 5 min a 95°C y se dejaron enfriar previo a ser

sembradas en los pocillos del gel de electroforesis. La separación se realizó a 60 V durante el pasaje por el gel concentrador, y luego a 180 V durante el pasaje por el gel separador, en un buffer Tris glicina (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1% pH 8.3). El peso molecular de las muestras se estimó por comparación con estándares de peso molecular (PM, Thermo #26619). Dependiendo del experimento, los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250, o se transfirieron a membranas de PVDF para los ensayos deinmunodetección.

En la electroforesis en geles de agarosa al 1% las muestras de ADN se separaron según su conformación y tamaño. Las muestras se diluyeron en buffer de carga 1X final utilizando buffer de carga 6X (glicerol 50%, azul de bromofenol 0.02%, xilencianol 0.002%). Estas se sembraron junto a un marcador de pares de bases de ácidos nucleicos (pb, Thermo Fisher #SM0311). Se realizó la electroforesis en buffer TBE 0.5X a 80 V y posteriormente el gel se incubó con el agente intercalante de ADN GoodView (SBS Genetech, 2µL por cada 50 mL de TBE) para detectar la presencia de ácidos nucleicos por exposición a la luz UV. Para ello se utilizó un transiluminador (Biorad) conectado a una cámara fotográfica que permitió se adquieran y registren las imágenes.

3.2.3. Electrotransferencia e inmunodetección

Las muestras proteicas previamente separadas por SDS-PAGE se transfirieron durante 1 h a 100 V a una membrana de PVDF previamente activada con etanol (Thermo), utilizando el sistema de transferencia húmeda (BioRad). La transferencia se realizó en buffer de transferencia Tris-HCl 2 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%, etanol 20%. Una vez finalizada la transferencia, se llevó a cabo un *Western Blot* (WB), la membrana se bloqueó con bloqueante comercial (Membrane blocking solution 000105, Life technology) durante toda la noche a 4°C. Luego se lavó la membrana dos veces con TBS (Tris-Cl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM) conteniendo Tween-20 al 0.1% (TBS-T) y se incubó con el anticuerpo primario (Tabla 1) diluido en el bloqueante comercial durante toda la noche (ON) a 4°C. Luego de 3 lavados con TBS-T de 5 min cada uno se incubó la membrana con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 1) durante 1 h a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, luego de 4 lavados con TBS-T y un lavado con TBS se procedió al revelado. En los ensayos en que se utilizó el anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina (FA), se agregó el sustrato comercial BCIP/NBT (*blue liquid substrate system* Sigma #B3804) hasta la aparición de las bandas. Cuando se utilizó el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) se agregó el sustrato comercial *Super Signal West Pico Chemiluminescent substrate*

(Thermo). Luego se incubó la membrana 5 min con el mismo y se detectó la quimioluminiscencia en un equipo GBOX Chemi System (SynGene) realizando exposiciones de 10 s-2 min, según la muestra.

Algunas de las muestras fueron analizadas por *Dot blot,* para ello se sembró la muestra sobre la membrana de PVDF previamente activada y se dejó secar. A continuación se bloqueó con el agente bloqueante comercial y se procedió a la inmunodetección.

La detección de los candidatos eucariotas a sustrato de PtpA se evaluaron en extractos proteicos de fracciones sub-celulares mitocondriales y citosólicas previamente obtenidas a partir de 20x10⁶ células, utilizando un kit comercial (*Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells*, Thermo).

Anticuerpo	Fuente	Dilución
Anti-ECHA monoclonal (conejo)	Abcam ab200652	1/1000
Anti-ATPA monoclonal (ratón)	Abcam ab14748	1/1000
Anti-SQRD policlonal (ratón)	Abcam ab71978	1/500
Anti-PFK policlonal (conejo)	Abcam ab186132	1/2000
Anti-mouse-HRP (cabra)	Sigma #A4416	1/10000
Anti-ratón-FA (cabra)	Sigma #A3562	1/30000
Anti-Rabbit-HRP (cabra)	Sigma #A0545	1/5000
Anti-PtpA (conejo)	Producido y purificado en esta tesis	1/2000
Anti P-Tyr monoclonal en ratón	Cell Signalling #9411	1/2000

Tabla 1. Anticuerpos y diluciones utilizados

3.2.4. Amplificación de ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se realizó una mezcla de PCR de un volumen final de 50 μ L. Dicha reacción contiene 10 μ L del buffer de la polimerasa (5X HF Phusion Buffer conteniendo 2 mM MgSO₄), 1 μ L de dNTPs 10 mM, 2.5 μ L de cadacebador (directoyreverso, 10 μ M), 1 μ LdeADNmolde (50-100ng),

1 UE de la ADN polimerasa (Phusion, 0.02 U/ μ L), 1.5 μ L DMSO puro, y agua MilliQ autoclavada para completar el volumen. En paralelo se realizó un control negativo sin ADN. Las condiciones de cada PRC se detallan en la leyenda de las figuras correspondientes. Los

productos de PCR se verificaron por electroforesis en gel de agarosa 1%. Los cebadores específicosutilizadossedescribenenlametodologíacuandosenombracadaPCRrealizada.

3.2.5. Obtención de células de *Escherichia coli* quimiocompetentes

El protocolo utilizado para la producción de células quimiocompetentes se basó en el método que utiliza CaCl₂ [Mandel and Higa, 1970]. Se inoculó un tubo de 3mL de medio LB con una colonia fresca de la cepa de células *E.coli* DH5^[2]. Se dejó crecer durante toda la noche a 37°C con agitación de 200 rpm. Al día siguiente se inocularon 250 mL de LB en un matraz de 1 L con 2.5 mL del pre-cultivo (1/100). Se incubó a 37°C hasta que la densidad óptica (DO) a 620 nm alcanzara 0.3. Se centrifugó a 3500 rpm, durante 10 min a 4°C. A partir de ese momento las células y reactivos se mantuvieron en frío. Se descartó el sobrenadante, se lavó el pellet con 100 mL de CaCl₂ 0.1 M estéril, agregando de a poco hasta suspender el pellet. Posteriormente se centrifugó a 3500 rpm, durante 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se suspendió el pellet en 100 mL de CaCl₂ 0.1 M. Se incubó 1 ha 4°C en la solución de CaCl₂ 0.1 M. Se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min a 4°C y se suspendió el pellet en 3 mL de CaCl₂ con 20% glicerol estéril. Finalmente, la suspensión de células se alicuotó de a 50-100 μL en eppendorf pre-enfriados en hielo y se almacenó rápidamente a - 80°C.

3.3. Métodos generales de biología celular

3.3.1. Cultivo de monocitos de la línea THP-1 humana

La línea celular pre-monocítica humana THP-1 (American Type Culture Collection, ATCC TIB-

202) fue cedida por el grupo dirigido por la Dra. Ana María Ferreira del Instituto de Higiene. Dicha línea celular se cultivó en medio completo RPMI 1640 suplementado con Glutamax- HEPES (Invitrogen, #72400047), 10% final de Suero Fetal Bovino (SFB, Invitrogen) descomplementado 1h a 65°C y antibiótico-antimicótico al 1% final (ATB/AM: penicilina, estreptomicina, anfotericina B, Gibco #15240-062 o Sigma # A5955) a 37°C bajo atmósfera húmeda de 5% CO₂. Estas células crecen en suspensión y se deben mantener entre 0.3-1.0 x 10⁶ células/mL. Para iniciar el cultivo se partió de una semilla de 7x10⁶ células en DMSO, la cual se descongeló en un baño a 37°C. Luego todo el contenido del vial se transfirió a un falcon de 50 mL conteniendo 45 mL de medio completo termostatizado a 37°C y se centrifugó 10 min a 800 rpm (con frenado lento). Se eliminó el sobrenadante y se lavó el

pellet con 20 mL de medio completo a 37°C, se volvió a centrifugar y el pellet de células se suspendió muy suavemente en 7 mL de medio completo conteniendo 20% SFB. Se incubó a 37°C bajo una atmósfera húmeda de 5% CO₂ hasta alcanzar 1x10⁶ cel/mL. Posteriormente se realizaron los pasajes necesarios de dicho cultivo en medio completo. Para la diferenciación de los monocitos a macrófagos, los cultivos se estimularon con 50 ng/mL de éster de forbol miristato (PMA, Sigma) por 72 hs.

3.3.2. Cultivo de la línea celular Vero 2.2

La línea celular Vero 2-2 fue cedida por la Dra. Mabel Berois de la Sección Virología de la Facultad de Ciencias (cedida por el Dr. Cornel Fraefel del Instituto de Virología de la Universidad de Zurich, Suiza). Esta es una línea celular derivada de la línea Vero de epitelio de hígado de mono africano, a la cual se incorporó en su genoma ADN plasmídico conteniendo el promotor y el gen ICP27 de herpes simple tipo 1 (HSV-1). Dicha línea celular se cultivó en medio DMEM (Invitrogen) suplementado con SFB 10% (previamente descomplementado), ATB/AM 1%, Geneticina 500 @g/mL (Gibco G418 sulfato) (DMEM completo) a 37°C bajo una atmósfera húmeda de 5% CO₂. Las células Vero se adhieren a la superficie, por lo cual para mantener y/o expandir el cultivo las células previamente se disgregaron mediante tratamiento con Tripsina 0.25%-EDTA 0.02%. Para mantener la línea celular se realizaron 2 pasajes semanales realizando una dilución 1:5 de la suspensión con medio completo.

3.3.3. Cultivo de la línea celular Hela

La línea celular HeLa (ATCC CCL-2) deriva de células epiteliales de cuello uterino humano con adenocarcinoma. Dicha línea celular se cultivó en medio DMEM (Invitrogen) completo a 37°C bajo una atmósfera húmeda con 5% CO₂. Las células HeLa se adhieren a la superficie, por lo cual se mantuvieron y expandieron de la misma forma que descrito para las células Vero.

En todos los cultivos el número de células totales se determinó utilizando una cámara de Neubauer que permite el recuento en microscopio de las células presentes en medio líquido. Para la determinación de células viables se diluyeron estas en azul de tripano. En las células viables, con membrana intacta, no se incorpora el azul de tripano; por el contrario, sí atraviesa la membrana de las células muertas. En uno de los ensayos se utilizó también un kit de viabilidad (*Resazurin Cell Viability* Kit #11884, *cell signaling*). El reactivo resarzurina, azul no fluorescente, se reduce a resorufina altamente fluorescente mediante deshidrogenasas presentes en células metabólicamente activas. Esta conversión solo ocurre en células viables y, por lo tanto, la cantidad de resorufina producida es proporcional al número de células viables en la muestra. La resorufina formada en el ensayo se puede cuantificar midiendo las unidades relativas de fluorescencia (RFU) con un fluorómetro (Ex=530-570 nm, Em=590-620nm).

3.4. Estrategias para introducir la actividad PtpA en las células eucariotas

3.4.1. Sistema de transducción con vectores basados en el virus HSV1

Los vectores virales tipo amplicón basados en el virus Herpes Simple tipo 1 (HSV1) consisten en partículas que conservan las características estructurales del virus original y que al interior transportan un plásmido (con el gen de interés) en múltiples copias (Figura 3.1). La naturaleza de su diseño hace del mismo una partícula en principio inocua a nivel de toxicidad celular, capaz de ingresar a muchos tipos celulares [Saeki et al., 2001]. Para la producción de este vector HSV1 se realizó una transfección múltiple en células Vero 2.2 con:

(i) <u>el plásmido amplicón</u> pHSV1 con o sin el gen de interés. Este plásmido contiene la información para el empaquetamiento del genoma HSV1 y lleva un bloque de expresión que permite la inserción del gen de interés bajo el promotor temprano IE4/5 de HSV1, seguido de un elemento IRES que favorece el reclutamiento de ribosomas para la traducción y del gen de la proteína verde fluorescente (EGFP); (ii) <u>un cromosoma artificial bacteriano</u> (bácmido: fHSV1 Δpac ΔICP27) que contiene el genoma del HSV1 sin su señal de empaquetamiento en la partícula viral y sin el gen esencial ICP27, el cual debe aportarse como un plásmido separado. Este bácmido provee el genoma viral auxiliar que contiene toda la información requerida para la replicación del vector HSV-1 amplicón; (iii) <u>el plásmido pEBHICP27</u> que provee en trans el gen esencial ICP27. Este sistema se encontraba disponible en nuestro grupo gracias a la colaboración con la Dra. Mabel Berois de la Sección Virología, Facultad deCiencias.

Producción del vector viral de tipo HSV- amplicón



Figura 3.1. Esquema de la producción del vector viral tipo amplicón. En A se muestra un esquema de la producción del vector y en B sus características.

En el punto siguiente se describe la obtención de los componentes de este sistema.

3.4.1.1 Expansión de los plásmidos necesarios para la producción de los vectores virales

Los plásmidos pHSV1 y el pEBHICP27 se transformaron en células quimio-competentes *E. coli* DH5 α preparadas como ya se describió previamente en 3.2.5. Para las diferentes transformaciones 100 🛛 L de células DH5 α quimicompetentes se dejaron descongelar unos minutos en hielo. A cada tubo, se le agregó 1 🖾 L del plásmido correspondiente y se incubó en hielo por 30 min adicionales. Posteriormente se realizó un shock térmico de 90 s a 42°C y se dejó en hielo 2 min más. Luego se le agregó a cada tubo 500 🖾 de medio líquido LB estéril y se incubó una hora a 37°C, bajo agitación suave. Finalmente se sembraron las células en LB agar con ampicilina 50 $\bigcirc g/mL$ y se incubó ON a 37°C. La purificación de los plásmidos a partir de colonias transformantes se realizó utilizando un kit de extracción comercial (Plasmid Miniprep-Classic, ZymoResearch). En todos los casos se determinó la concentración de ADN y se evaluó la calidad de este (Abs₂₆₀/Abs₂₈₀>1.8) mediante espectrofotometría, utilizando un Nanodrop (Nanodrop Lite, Thermo Scientific). Además se analizaron las muestras por electroforesis en gel de agarosa 1% procediendo como se describe en el punto 3.2.2.

Para purificar el bácmido se utilizó el kit QIAGEN (Large-Construct Kit #12462) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Para ello previamente se sembró una placa de LBcloranfenicol con el stock de células *E.coli* DH5α transformadas con dicho bácmido (a partir de un stock conservado a -80°C) y se dejó crecer a 37°C. Posteriormente, a partir de una

única colonia se realizó un precultivo que se creció a 37°C con agitación a 240 rpm durante 8 h, con el cual se inoculó un cultivo de 500 mL. Este cultivo se detuvo al llegar a una densidad de células entre 3–4 x 10⁹ ufc/mL y se utilizó para la extracción y purificación del bácmido utilizando el kit mencionado.

3.4.1.2 Producción del vector viral amplicón HSV-1

Para generar y expandir el vector amplicón HSV-1 se sometieron las células Vero2-2 a una transfección múltiple con los plásmidos control pHSV1-IRES-EGFP o el plásmido pHSV1- PtpA-IRES-EGFP, el bácmido fHSV1 Δ pac Δ ICP27 y el plásmido pEBHICP27. Se utilizó un protocolo descrito previamente [Diefenbach et al., 2014], que consiste en las siguientes etapas:

(i) **Preparación de las células a ser transfectadas:** se partió de un cultivo de células Vero 2-2 en placas de 100 mm (p100) mantenidas en medio DMEM completo. Las células se disgregaron con Tripsina/EDTA como se describe en el punto 3.2.2 y se contaron en cámara de Neubauer. Se sembraron 1.2 x 10⁶ células en 3 mL de DMEM completo en una placa estéril de 6 cm y se incubaron toda la noche a 37 °C en atmosfera de 5% CO₂.

(ii) Co-transfección: se prepararon dos tubos de 15 mL: tubo D (para la mezcla de ADN) y tubo L (para la mezcla de lipofectamina LTX Plus Reagent (ThermoFisher #15338100)). Por cada placa de 100 mm de diámetro a ser transfectada se agregaron 250 \mathbb{P} L de Optimem (Gibco #514985-034) en cada tubo. Se agregaron 16.8 \mathbb{P} L lipofectamina LTX Plus Reagent al tubo L; y 2 \mathbb{Q} g bácmido (fHSV1- Δ pac- Δ Kn), 0.2 \mathbb{Q} g pEBHICP27 y 0.4 \mathbb{Q} g ADN amplicón (pHSV1- IRES-PtpA-wt o pHSV1-IRES control) al tubo D. Se agitaron ambos tubos vigorosamente y se agregó lentamente 10 \mathbb{P} L por placa del PLUS reagent (1 µl por cada µg de ADN) al tubo D, se incubó 5 min a Temperatura ambiente (TA). Luego se agregó el contenido del tubo L al tubo D y se incubó 30 min a TA. A continuación a la mezcla D-L se le agregó 0.9 mL de medio Optimen por cada placa a ser transfectada. En paralelo, unos 10 min antes de completarse el tiempo, se retiró el medio RPMI completo de los pocillos de la placa p12 con las células, se lavaron con 1 mL de medio Optimem previamente termostatizado a 37 °C y se colocó en cada pocillo 500 µL de Optimem. Al completar los 30 min de incubación de la mezcla conteniendo el ADN con el *PLUS reagent* y la Lipofectamina LTX Plus Reagent, se agregó un volumen de 1.3 mL de esta en cada pocillo de la placa p12 conteniendo las células (por goteo utilizando una micropipeta, en forma cuidadosa y en espiral desde los bordes

exteriores hacia el centro del pocillo). Se incubó la placa durante 4 h en incubadora a 37°C con atmósfera de 5% CO₂, agitando suavemente cada 1 h. Se aspiró el líquido de la placa, se hicieron 3 lavados con 2 mL de Optimem, se agregó 3.5 mL del medio de transfección (DMEM conteniendo SFBal 6%) y se incubó a 37°C con 5% CO₂ durante 3 o 4 días.

(iii) **Cosecha de los vectores amplicón:** previo a la cosecha, se confirmó la presencia del efecto citopático característico provocado por la replicación viral en las células Vero 2.2. Luego se despegaron las células de la placa empleando un *scraper* y se transfirieron a un tubo mantenido en hielo, se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 min a 4°C y se alicuotó el sobrenadante que contenía las partículas virales obtenidas a partir de las células ya lisadas. A su vez se dejó unos 100 🛛 del medio junto al pellet resultante al cual se le realizaron 3 ciclos de congelado en nitrógeno líquido y descongelado en baño de agua a 37°C. Finalmente, se centrifugó a 3500 rpm 10 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante, se alicuotó y se almacenó a -80 °C, para posteriormente ser titulado.

(*iv*) *Titulación del vector stock:* para ello se prepararon diluciones 1/10 y 1/100 del vector viral, en medio de titulación (DMEM conteniendo SFB 2% y antibiótico-antimicótico 1%). Se tomaron 10 IPL del stock del vector y diluciones y se llevaron a 250 IPL con medio de titulación. Se transfirieron las diluciones del vector a una placa de 24 pocillos conteniendo 1x10⁶ células Vero 2-2 por pocillo. Se incubó la placa a 37°C con 5% CO₂ durante 24 h. Las células positivas debido a la emisión de la EGFP, fueron contabilizadas a las 24 h posteriores al ensayo con la ayuda de un microscopio de epifluorescencia (Olympus IX81). El título se expresó como unidades transductantes por mL (UT/mL) y es igual al número de células fluorescentes contabilizadas por el recíproco de la dilución en la que se contabilizó y por el recíproco del volumen del inóculo expresado en mL.

3.4.1.3 Transducción de los macrófagos con el vector control pHSV1-IRES-EGFP

Se utilizaron macrófagos THP-1 diferenciados con PMA tal como se describió en 3.3.1, y colocadas en medio RPMI sin piruvato. Luego de lavar con medio RPMI sin SFB, se sembraron en pozos por duplicado partículas virales control pHSV1-IRES-EGFP, y como control medio RPMI sin piruvato y sin SBF. Se incubó la placa durante 2 h en estufa a 37^oC y 5% CO₂, para que transcurra la transducción. Luego de transcurridas las 2 h de transducción se ajustó el volumen final a 500 ^oL de RPMI, incluyendo la adición de SBF al 10%. Se mantuvo el cultivo durante 48 h

en estufa a 37[®]C y 5% CO₂. Transcurrido este tiempo, se observó el estado de las células en microscopio invertido (Nikon, Eclipce TS100) y se evaluó en microscopio de epifluorescencia (BioRad, ZOE Fluorescent Cell Imager) el éxito de la transducción, determinando el número de células que presentan focos fluorescentes debido a la expresión de la EGFP.

3.4.2. Transfección de células eucariotas con plásmidos pHSV1

La transfección celular, es un método que permite incorporar ácidos nucleicos en células eucariotas. En este caso se utilizó también el método de lipofección, que utiliza el principio de interacción de cargas entre los complejos lipofectamina-ADN de interés (complejos que presentarán carga positiva) con los grupos negativos de los fosfolípidos de la membrana celular. Dichos complejos son capaces de entrar al citoplasma celular mediante endocitosis y son transportados al núcleo [Jo and Tabata, 2008], donde ocurre la transcripción del ADN de interés. En estos ensayos se varió la cantidad de plásmido y de lipofectamina LTX Plus Reagent a utilizar. Se utilizaron los mismos plásmidos utilizados para la generación de los vectores virales (pHSV1-IRES-EGFP y pHSV1-PtpA_{wt}-IRES-EGFP). Se procedió siguiendo el protocolo que indica el fabricante. Finalmente, se incubó 24 h a 37 °C y 5% CO₂, tiempo adecuado para permitir la expresión de la proteína EGFP, que permitirá evaluar el éxito de la transfección.

3.4.2.1. Producción del plásmido amplicón pHSV1-IRES-PtpA-C11S

El plásmido amplicón conteniendo el gen de PtpA-wt fue obtenido por la Dra. Margenat en el marco de su tesis de doctorado [Margenat, 2016], y se encontraba disponible en el laboratorio. En la presente tesis se obtuvo el plásmido amplicón pHSV1-IRES-PtpA-C11S, conteniendo el gen de la fosfatasa PtpA inactiva. Ya se ha demostrado que este mutante en la cisteína catalítica (C11S) es completamente inactivo [Margenat, 2016], ya que la ausencia de la cisteína catalítica impide que la enzima realice el ataque nucleofílico sobre el sustrato fosforilado (P-sustrato). Para la obtención del mutante se amplificó por PCR el gen de la PtpA inactiva utilizando como molde el plásmido pet28a-PtpA-C11S ya disponible en el laboratorio. Dicha amplificación se realizó utilizando los cebadores que se indican a continuación. *Forward TbPptA* 5'-AGGAGGAACGTCCTCGTCGATAAGCTTGCAATGTCTGATCCGCTGCACGTCACAT-3' *Reverse TbPptA* 5'-GGTACAACCCCAGGCTGTTTTAAAAGCTTTCAACTCGGTCCGTTCCGCGCGAGA-3'

Enletranegroseindicalasecuencia complementaria al plásmidop HSV1-IRES-EGFP y en az ullasecuencia complementaria a PtpA-wt.
Los mismos contienen una parte de la secuencia complementaria al gen PtpA-C11S y otra complementaria al vector de destino pHSV1-IRES-EGFP, incluyendo el sitio de corte de la enzima de restricción HindIII. Esta estrategia permite el sub-clonado del gen sin enzimas de restricción (por *RF-cloning*), o con enzimas de restricción. En nuestro trabajo se realizó con enzimas de restricción. El producto de PCR se purificó, cuantificó y se evaluó su pureza por espectrofotometría (Abs₂₆₀/Abs₂₈₀) y análisis por electroforesis en gel de agarosa. El sub- clonado del gen de PtpA-C11S se realizó mediante enzimas de restricción. Para ello se realizó una digestión de 750 ng totales de plásmido pHSV1 y 400 ng de inserto PtpA-C11S con la enzima HindIII (Fast Digest, Fermentas). Los productos de digestión se separaron por electroforesis en gel de agarosa y se purificaron a partir de la banda del gel utilizando un kit comercial (Gene Jet Gel extraction, Thermo). Previo a la ligación, el plásmido pHSV1-IRES- EGFP fue tratado con fosfatasa FastAP (Thermo Scientific) para evitar que este se ligara. En la reacción de ligación se utilizó una relación 1:5 (plásmido:inserto) y se transformaron las células *E.coli* DH5 α , detectando colonias en todas las placas de LB con ampicilina. Se evaluó la presencia del plásmido por PCR de colonia en 5 pools de 6 clones, luego se abrieron los pools positivos y se enviaron a secuenciar a Macrogen, 4 de los clones positivos. Luego se realizó un stock de *E.coli* DH5_α-pHSV1-PtpA_{C115}-IRES-EGFP de uno de los clones confirmados por secuenciación y se almacenó a -80°C. En paralelo y como ejercicio de biología molecular, se realizó una búsqueda de enzimas que cortan tanto el plásmido como en el inserto, con el objetivo de identificar un patrón de digestión que permitiera diferenciar por electroforesis en gel de agarosa los clones que presentaran el inserto en la correcta dirección de clonado.

3.4.3. Introducción de proteínas recombinantes de interés en las células eucariotas

La estrategia elegida se basa en introducir por pinocitosis la proteína recombinante de interés en las células eucariotas. En nuestro caso las proteínas de interés son PtpA (wt y mutante inactivo C11S) y la EGFP. Para lograrlo se requiere la inducción de dos etapas de estrés osmótico celular, uno hiper-osmótico y el otro hipo-osmótico. La primera etapa permite la entrada de la proteína a la célula por pinocitosis, la segunda causa la liberación del contenido de las vesículas dentro del citosol de las células. Dicho protocolo se adaptó a nuestro sistema y número de células, utilizando como base el protocolo descrito por Gilmore KJ y colaboradores [Gilmore et al., 2001] basado en el método original de Okada [Okada et al., 1982]. Para la realización de dicho ensayo fue necesaria previamente la purificación de la fosfatasa recombinante PtpA-wt, el mutante inactivo PtpA-C11S y la proteína verde fluorescente EGFP. Esta última, de tamaño similar a PtpA, se utilizó para la optimización del protocolo y como un control negativo adicional a PtpA C11S. A continuación se describe la obtención de las proteínas recombinantes.

3.4.3.1. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes de interés

Se expresaron en forma recombinante PtpA-wt (rPtpA), PtpA-C11S (rPtpA-C11S) y la EGFP (rEGFP). Para ello se transformó células de E.coli BL21 (DE3) quimio-competentes con el vector pET28a conteniendo el gen de PtpA-wt, PtpA-C11S, o el vector T7 conteniendo el gen de la proteína EGFP, siguiendo el protocolo de transformación química detallado en el punto 3.4.1.1. Se utilizaron 100-200 ng de ADN plasmídico para realizar la transformación. Posteriormente se realizó un precultivo inoculando 3-5 colonias de E. coli BL21 (DE3) transformantes en medio LBkanamicina o ampicilina según el plásmido. Se incubó a 37°C por 16 h bajo agitación de 200 rpm. Pasado ese tiempo se diluyó el precultivo en medio LB- kanamicina fresco (1/1000) y se incubó a 37°C bajo agitación (180 rpm) hasta una DO_{600nm} de entre 0.7-0.8, correspondiente al final de la fase exponencial de crecimiento bacteriano [Purificação, 2013]. Alcanzada la DO_{600nm} óptima, se dejó alcanzar durante 20 min la temperatura de inducción (16°C para PtpA-wt y PtpA-C11S, 17°C para EGFP) [Correa et al., 2014]. Luego se agregó el inductor isopropil-β-D-1tiogalactopiranósido (IPTG, Sigma) a una concentración final de 0.5 mM y se incubó bajo agitación a 180 rpm. Transcurridas las 16 h el cultivo se centrifugó a 6000 rpm por 15 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se suspendió el pellet en buffer de lisis frío (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, y glicerol 10%) suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas sin EDTA (Sigma). Se utilizó 1 mL de buffer de lisis por cada 0.06 g de pellet húmedo. Se agregó 0.1 mg/mL de lisozima para debilitar la pared celular, y se mantuvo en hielo por 30 min. Las células se lisaron por sonicación en hielo realizando 10 ciclos de 1 min a 25% de amplitud y 1 min de descanso en hielo (Branson digital sonifer), luego se agregó ADNasa a una concentración final de 5 µg/mL, se incubó 15 min en hielo y posteriormente la suspensión se centrifugó a 12000 g durante 1 h a 4°C, y el sobrenadante de la lisis se filtró a través de una membrana de 0.22 µm. Las proteínas recombinantes expresadas presentan en el extremo N-terminal una cola de seis histidinas (Histag), lo que permite su posterior purificación por cromatografía de

afinidad por metales (IMAC) [Porath, 1992] Se preparó una columna utilizando 2 mL de la matriz comercial *Chelating sepharose fast flow* (GE Healthcare #28-4047-39 AC) a la cual se le cargó el metal mezclando la matriz con 600 μL de CuSO₄ 0.2 M. Para eliminar el exceso de metal se lavó la matriz con agua destilada y con acetato de sodio 0.02 M pH 4 conteniendo NaCl 1 M, hasta que el pH a la salida de la columna alcanzó un valor de 4. Finalmente se equilibró la matriz con buffer de lisis y se mezcló con el sobrenadante de lisis conteniendo las proteínas solubles (preparado como se describió anteriormente), incubándose durante

40 min a temperatura ambiente (TA) bajo agitación suave. Transcurrido el tiempo se recuperó la matriz en una columna tipo PD10 vacía y se guardó la fracción no pegada a la columna (Flow through, FT). Las proteínas no unidas o unidas de manera muy débil se removieron mediante3lavados de5mL con buffer de lisis sin imidazol (L1),3lavados de5mL con buffer de lisis con imidazol 10 mM (L2), 3 lavados de 5 mL con buffer de lisis con imidazol 20 mM (L3). A continuación se prosiguió con la elución de la proteína inmovilizada, con buffer de lisis conteniendo imidazol 300 mM, realizando 6 eluciones de 3 mL cada una. Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE y aquellas conteniendo la proteína recombinante purificada se mezclaron y dializaron a 4°C en 4 etapas de 2 h cada una contra buffer de elución en el cual se fue disminuyendo gradualmente la concentración de imidazol (150 mM, 75 mM, 35 mM y sin imidazol). La composición del último buffer de diálisis fue Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 50 mM, EDTA 5 mM, glicerol 10%, DTT 5 mM. Las proteínas se concentraron por ultrafiltración utilizando una membrana de corte 10 kDa (Amicon Ultra-15 Millipore). La concentración de proteínas se determinó utilizando el reactivo de Bradford (detallado en 3.2.1) y la muestra de proteínas dializadas se conservó a 4°C hasta la siguiente etapa de purificación por cromatografía de exclusión molecular. Esta etapa permite separar las especies agregadas de proteínas de las formas monoméricas de PtpA-wt, PtpA-C11S y EGFP. La misma se llevó a cabo en un sistema AKTA (GE Healthcare) utilizando una columna Superdex 200 16/60 (GE Healthcare) previamente equilibrada con dos volúmenes de columna del buffer de gel filtración (buffer GF) (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 50 mM, EDTA 5 mM, glicerol 10%, DTT 5 mM). La masa en solución de las proteínas contenidas en los picos principales se determinó utilizando la curva de calibración de la columna preparativa previamente obtenida inyenctando proteínas de masa molecular conocida (Gel filtration molecular weight markers, Sigma). La curva de calibración realizada ajustó a la recta log(PM)=-0.03995(volumen retención en mL) + 8.12882. Luego de la corrida se

determinó la concentración proteica por el método de Bradford en las muestras correspondientes a los picos de interés (detectados en los cromatogramas de Absorbancia a 280 nm vs volumen elución). A continuación se concentraron y se analizaron por SDS-PAGE. Para su conservación las proteínas purificadas se suplementaron con 20 mM de DTT final (lo que evita la oxidacióngradual de las cisteínas), se filtraron a través de una membrana de 0.22

Im y las alícuotas se almacenaron a −20°C.

En el caso de las fosfatasas recombinantes PtpA-wt y PtpA-C11S se realizó un ensayo de actividad utilizando el sustrato artificial p-nitrofenil fosfato (pNPP). Los ensayos de actividad se realizaron para verificar que la proteína PtpA-wt purificada presentara una actividad específica similar a otros lotes ya purificados en el laboratorio y para corroborar que el mutante inactivo PtpA-C11S no presentara actividad. Además se utilizó el ensayo para evaluar la actividad de PtpA-wt durante los cambios de buffer que implicó la aplicación de la estrategia de pinocitosis. El sustrato artificial pNPP presenta un grupo fosfato en posición *para* con respecto al grupo nitro, cuya hidrólisis se puede seguir en el tiempo midiendo el aumento de la absorbancia a 405 nm debido a la liberación del producto de color amarillo para-nitrofenol (p-NP). Se preparó un stock de pNPP 300 mM en agua miliQ, protegiéndolo de la luz con papel de aluminio. Como buffer de actividad se utilizó Tris 20 mM pH 8, glicerol 5%, EDTA 3 mM, DTD 1 mM, NaCl 50 mM, Tween 20 0.005%. El ensayo se realizó al menos en triplicado en una placa de 96 pocillos en un volumen total de reacción de 300 µL. Se utilizó una concentración final de PtpA de 50 nM y 20 mM del sustrato pNPP. La actividad se expresó en µmoles de pNP x min⁻¹ x mg⁻¹ de PtpA. Para ello se determinó previamente, en las condiciones de reacción, el valor del coeficiente de extinción molar del pNP por el camino óptico. Para ello se realizaron diluciones de pNP (Sigma) en el buffer de actividad en el volumen de reacción (300 µL), se determinó la Abs_{405 nm} y se graficó dicha Abs en función de la concentración de pNP, ajustando los puntos a una recta cuya pendiente (según la Ley de Lamber Beer) representa el valor del coeficiente de extinción molar del pNP por el camino óptico.

3.4.3.2. Ensayo de pinocitosis

En este ensayo se introdujo la proteína en las células por pinocitosis mediante la inducción de estrés osmóticos en dos etapas, una etapa en la que se utilizó un medio hiper-osmótico (Hepes 10 mM, PEG1000 10%, sacarosa 0.5 M (Filtrado a 0.22µm) conteniendo 40 µg de la

proteína recombinante (rPtpA-wt, rPtpA-C11S y/o rEGFP) y otra en la que se utilizó un buffer hipo-osmótico (60% DMEM o RPMI, 40% H₂O apirógena estéril). También se realizaron en paralelo controles tratados, pero en ausencia de proteína recombinante. En los primeros ensayos se utilizaron 2x10⁵ células por condición, y el protocolo se adaptó al tipo de cultivo celular utilizado (monocapa o suspensión). Para los ensayos realizados con las células THP-1 en suspensión, se partió de un cultivo de THP-1 de 8x10⁵ cel/mL, se tomaron 2x10⁵ células yse centrifugaron a 500g (sinfreno) durante 5 mina TA, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 30 µL de buffer hiperosmótico incubando en un bañode agua a 37°C durante 10min.Pasadoeltiempode incubación se agregó 1.5mL de buffer hiposmótico y se incubó a 37°C por 2 min. Se centrifugó a 500 g durante 5 min a TA, se realizó un lavado con PBS, se repitió el centrifugado y se suspendieron en 0.3 mL de medio RPMI conteniendo 5% SFB. Posteriormente se dejó recuperar las células durante 3h en incubadora de CO₂, antes de iniciar los ensayos de viabilidad o estudio del metabolismo. Para los ensayos realizados con macrófagos o con células Hela, cultivos en monocapa, se sembró 2×10^5 células por pocillo en placas de 12 pocillos durante 24 h previas al ensayo. En el caso de las THP-1 previamente se diferencian a macrófagos con PMA, como se describió en el punto 3.3.1. Una vez obtenida la monocapa se realizó un lavado con PBS estéril a distintos tiempos post-diferenciación (0, 1 y 2 días). Se colocaron 100 🗉 del medio hiperosmótico, se incubó durante 10 min a 37°C y posteriormente se colocó buffer hiposmótico hasta llegar a 2 mL. Se incubó a 37°C durante 2min. Finalmente se retiró el medio, se realizó un lavado con PBS estéril, se retiró y agregó medio completo pero con SFB 5% y se dejó recuperar en 3h en incubadora de CO₂ hasta la realización de los ensayos de viabilidad o estudios metabólicos.

En cada ensayo se realizó un control de células tratadas por pinocitosis pero en ausencia de la proteína recombinante PtpA, para descartar efectos producidos por el shock osmótico y no por la entrada de la proteína. A su vez, como se detalló anteriormente se realizaron ensayos también con la proteína EGFP. Estos últimos fueron como control de que la pinocitosis se estaba dando de forma exitosa ya que podíamos visualizar la entrada de la proteína a las células. En los ensayos realizados con EGFP se agregó un control extra que llamamos "control de adherencia" en donde se incuban las células en presencia de EGFP sin la realización de los shock osmóticos, para dilucidar si existen otros mecanismos de entrada que pudieran ser tenidos en

cuenta.

Una vez puesto en marcha el protocolo, se realizaron nuevos experimentos independientes, en los cuales se aumentó la cantidad de células (2x10⁶ células por condición) para que el material fuera suficiente para los ensayos que se realizaron posteriormente con las células tratadas. Además se mejoró la preparación de la proteína a ser introducida en las células, realizándose previamente el cambio de buffer en el que se encuentran las proteínas (buffer de GF) por el buffer necesario para el shock hiperosmótico. En una primera etapa se colocó la proteína en Hepes 10 mM pH 7.4, 0.5 M sacarosa previamente filtrado por 0.2 🗹 m, mediante centrifugación o filtración en gel utilizando una mini columna de Sephadex G-25. De esta manera se obtuvo un volumen de 100 µL conteniendo 240 µg de la proteína a ser introducida. Luego se diluyó al medio con el mismo buffer conteniendo 20% PEG 1000 y se agregó inmediatamente a las células. Como se especificó previamente se verificó que fosfatasa de PtpA-wt permaneciera activa en dichos buffers. Pasado el tiempo de incubación del shock hiperosmótico se agregó 10 mL de buffer hiposmóticoyse incubóa 37°C por 2 min. Secentrifugó las células a 500g (sinfreno) durante 5 mina TA, se realizó un lavado con PBS, se repitió el centrifugado y se suspendieron en 1.5 mL de medio RPMI conteniendo 5% SFB para su recuperación en estufa a 37°C con atmósfera de CO₂ durante 3-6 h. Luego de este tiempo se centrifugaron las células, se suspendieron en medio RPMI sin suero para la evaluación del éxito del tratamiento mediante la visualización de la EGFP en células, el recuento de células totales, determinación de la viabilidad celular, y para los ensayos de consumo de oxígeno y acidificación del medio extracelular.

Para la obtención de las proteínas totales, las células control y tratadas por pinocitosis se lavaron con PBS y se les agregó 100 µg de buffer de lisis (NaCl 150 mM, Triton 100x 1%, deoxicolato de sodio 10x 0.5%, SDS 0,1%, Tris-HCl 50 mM pH 8, glicerol 1%, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, Inhibidor de proteasas 1x (cocktail sigma) e inhibidores de fosfatasas 4 mM (ortovanodato de sodio), se congelaron a -20°C ON, se centrifugó la muestra, se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la concentración proteica. En dichos extractos proteicos se evaluó la inmunodetección de PtpA utilizando un anticuerpo anti PtpA obtenido en esta tesis. Además se evaluó el grado de fosforilación en tirosina de las proteínas eucariotas utilizando un anticuerpo comercial anti fosfo-tirosina (Tabla 1).

Para los ensayos de evaluación de respiración y acidificación del medio extracelular las células se colocaron en medio RPMI sin suero y se procedió como se describe a continuación.

3.5. Evaluación de la bioenergética celular

Se evaluó la velocidad de consumo de oxígeno mitocondrial y de acidificación extracelular en el analizador de flujo extracelular Seahorse XFe24 (Agilent). Los ensayos se realizaron en células humanas, luego de la introducción por pinocitosis de rPtpA-wt o el mutante inactivo rPtpA-C11S, y en los controles (células no tratadas y células tratadas con pinocitosis con o sin rEGFP). Las células fueron obtenidas como se describió en el punto 3.4.3.2, se colocaron

1.5 x 10^5 células en medio RPMI sin suero en la placa (Seahorse), previamente tratada con poli-Llisina 0.1 mg/ml (Sigma), se incubó durante 30 min en estufa de CO₂ a 37°C. Luego se verificó el pegado de las células a la placa mirando los pocillos al microscopio, se eliminó el medio con cuidado y se colocó el medio Seahorse (DMEM, Hepes 5 mM pH 7,4, glucosa 5 mM, piruvato 1 mM, glutamina 2 mM, NaCl 32 mM), se incubó 1 h a las células a 37°C en una estufa sin CO₂. Se realizaron medidas de velocidad de consumo de oxígeno y acidificación del medio extracelular antes y después del agregado secuencial de: (i) oligomicina 2.5 μ M final, un inhibidor de la ATP sintasa, (ii) FCCP (dos agregados de 1 μ M final), un agente desacoplante del transporte de electrones y la síntesis de ATP mitocondrial, (iii) rotenona 2.5 μ M junto a antimicina A 2.5 μ M, inhibidores de la cadena de transporte de electrones a nivel del complejo I y III, respectivamente. Al finalizar el ensayo se midió la cantidad de proteínas por medio del ensayo de ácido bicinconínico (BCA) en cada pocillo para normalizar las medidas obtenidas por \mathbb{Z} g de proteína [Brand and Nicholls, 2011].

A partir de las medidas de velocidad de consumo de oxígeno se determinaron los parámetros respiratorios [Brand and Nicholls, 2011]. El consumo de oxígeno no mitocondrial fue determinado luego del agregado de antimicina A y rotenona, éste valor fue restado a todas las medidas. La respiración basal fue determinada antes del agregado de oligomicina. La respiración independiente de la síntesis de ATP fue determinada luego del agregado de oligomicina. La respiración dependiente de la síntesis de ATP fue determinada como la diferencia entre la respiración basal y la respiración independiente de la síntesis de ATP. La respiración máxima fue determinada luego del agregado del agregado del desacoplante FCCP. Las

medidas en cada pocillo se realizaron por triplicado, evaluándose 3 a 5 pocillos por condición.

3.6. Obtención de un anticuerpo policional anti PtpA

Gracias a la colaboración con la Dra. Ana María Ferreira y la Dra. Valeria Silva pudimos disponer del suero de un conejo inmunizado con PtpA. Para purificar los anticuerpos anti-péptido-PtpA por cromatografía de afinidad primero se inmovilizó la PtpA (se realizó con una mezcla de PtpA-wt y PtpA-C11S). Para esto se utilizó agarosa activada (General Electric #71-500-14 AD), que contiene grupos N-hidroxisuccinimida (NHS) capaces de generar uniones covalentes con grupos amino libres de las lisinas y el amino terminal de las proteínas. La PtpA obtenida se dializó ON a 4°C contra el tampón de unión (PBS 100 mM pH 7.2, NaCl 0.5M, glicerol 10% m/v, Tween 20 0.05% m/v) para eliminar el Tris ya que éste reacciona con los grupos NHS. Finalizada la diálisis se centrifugó la muestra durante 10 min a 10000 g y 4°C para eliminar cualquier precipitado que se hubiese formado. La unión a la matriz se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se activó la matriz con 10 volúmenes de HCl 1 mM frío. Se equilibraron 0.5 mL de la matriz en el tampón de unión e inmediatamente se adiciona la solución de PtpA (4 mg totales a una concentración final de 0.6 mg/mL en el tampón de unión). La reacción se llevó a cabo en *batch* con agitación orbital a TA durante 2 h. Finalizada la reacción se separó el sobrenadante por decantación y se bloquearon los grupos reactivos libres de la matriz por incubación con tampón Tris-HCl 100 mM pH 8.5 durante 2 h a TA y con agitación orbital suave. Finalizado este bloqueo se realizaron 6 lavados alternando tampón Tris-HCl 100 mM pH 8.5, con tampón acetato 100 mM pH 8.5 NaCl 500 mM. Se cuantificaron las proteínas de la diálisis y del percolado por el método de Bradford (punto 3.2.1.) y se determinó el porcentaje de acoplamiento de la PtpA a la matriz. La matriz obtenida, PtpA-NHS-Sefarosa (conteniendo

3.8 mg de PtpA inmovilizada), se conservó a 4°C en etanol 20% (v/v).

Posteriormente, los anticuerpos de conejo anti-PtpA se purificaron mediante cromatografía de afinidad utilizando la matriz PtpA-NHS-Sefarosa preparada. A tales efectos, cada antisuero conteniendo anti-PtpA se diluyó 1:2 en tampón TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 150 mM) y centrifugó a 5000 g durante 20 min a 4°C. El sobrenadante límpido se aplicó en la columna PtpA-NHS-Sefarosa (0.5 mL) equilibrada en TBS. Se guardó el percolado y se realizaron lavados sucesivos delamatrizcon5mLdeTBS,10mLdeTBSconteniendoTween

200.2% (m/v) y 5 mL de TBS. Se eluyó los anticuerpos unidos a la matriz mediante cambio de pH utilizando 500 µl tampón glicina (glicina-HCl 200 mM pH 2.0, NaCl 150 mM). Rápidamente se neutralizó el pH ácido con 50 µl de tampón Tris (Tris-HCl 2M pH 8.5, NaCl 150mM). La matriz de eSAAr-NHS-Sefarosa se lavó con TBS hasta alcanzar un pH 7.4, luego con agua ultrapura y finalmente se equilibró en etanol 20% (v/v) y conservó a 4°C. La concentración proteica en las fracciones eluídas se cuantificó midiendo la Abs_{280nm} en un equipo Nanodrop (Thermo Scientific) y se preparó un pool con las fracciones que mostraron Abs_{280nm} mayor a 0.005. Se cuantificó la proteína total utilizando el kit Micro BCA (Thermo Scientific, #23235) siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente, se añadió BSA para alcanzar una concentración final de 1 mg/mL proteína total con el fin de contribuir a la estabilidad de los anticuerpos. Finalmente, los anticuerpos purificados se congelaron a - 20°C en alícuotas de 400 🛛 conteniendo 600 µg/ml de anticuerpo anti-PtpA. Para controlar la reactividad de los anticuerpos anti-PtpA purificados se realizaron Dot Blots colocando diferentes concentraciones de PtpA y utilizando diferentes diluciones del anticuerpo. También se evaluó si dicho anticuerpo anti PtpA reconocía alguna proteína de macrófagos humanos, para ello se realizó un WB de una muestra de extracto de macrófagos a la cual se le agregó o no una cantidad determinada de rPtpA. El anticuerpo obtenido anti PtpA se utilizó también en la inmunodetección de PtpA en diferentes muestras de interés que se describen a lo largo de la tesis, utilizando la dilución definida en los ensayos de Dot Blot.

3.7. Obtención y verificación del mutante *Mtb*-ΔPtpA

Estas actividades se realizaron en el marco de una pasantía en el grupo de micobacterias del INTA de Buenos Aires, Argentina, dirigido por la Dra. F. Bigi. Dicho grupo colaboró con la Dra. Villarino en el marco del proyecto Fondo Clemente Estable de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (FCE-ANII) en el que se enmarcó mi tesis. La pasantía se realizó con fondos de la beca que me fue otorgada por PEDECIBA Área Biología. Dicho mutante se generó utilizando un sistema de recombinación homóloga descrito para micobacterias [Murphy et al., 2015] Este sistema promueve la recombinación homóloga y hace más eficaz el intercambio alélico en cepas micobacterianas. En una primera etapa se obtuvo la cepa de *Mtb* transformada por electroporación con un plásmido que permitirá que se expresen altos niveles de las recombinasas RecE y RecT por medio de un sistema inducible [Van et al., 2007] y confiere resistencia a la kanamicina. De este

modo, se logró obtener una cepa transformada con frecuencias de recombinación elevadas, que facilitó el intercambio alélico necesario para la interrupción del gen de PtpA. Una vez realizada la electroporación de la cepa de *Mtb*, se dejó recuperando en medio líquido 7H9 (conteniendo ADC y Tween 80 0.05%) durante 24hs y luego se sembró en medio sólido y se incubó a 37°C hasta la aparición de transformantes. La segunda etapa consistió en electroporar la cepa obtenida con un casete portador de las secuencias flanqueantes (5') y (3') del gen de PtpA y entre estas el gen de resistencia a higromicina. Dicho casete se recombinó con el gen de PtpA presente en el genoma bacteriano y generó la interrupción del gen de PtpA. Esto permitió además la inserción del gen de resistencia a higromicina para la selección de la cepa mutante. Dicho casete fue obtenido por la Dra. F. Bigi mediante PCR con cebadores específicos. El mismo se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa y se purificó la banda amplificada utilizando un kit comercial. Luego de la segunda electroporación y aislamiento de los clones mutantes en placas de cultivo con medio sólido 7H9 con higromicina y kanamicina se procedió a verificar los mismos por PCR. Para ello se suspendió cada clon en 700 µL de agua apirógena e incubó a 90°C durante 1 h para inactivar la bacteria. Posteriormente se purificó el ADN genómico por medio de microesferas magnéticas para utilizarlo en las reacciones de PCR. Se realizaron dos PCR utilizando cebadores distintos para evaluar la ausencia del gen de PtpA en los clones y la inserción del casete de resistencia a higromicina (Figura 3.2). Una vez confirmada la obtención de un clon portador de la mutación (ausencia de amplificación *ptpA*, presencia de amplificación del gen de resistencia), se prepararon los medios y soluciones necesarias para realizar un stock del mismo.

Figura 3.2. Esquema mostrando los cabadores utilizados para la verificación de los clones *Mtb* mutantes para PtpA.

ADNg Mtb PtpA Res. Hygr		
Cebador río arriba gen <u>PtPA</u> 🔶	AGTTTCTGCTCGACCGTCAT	
Cebador dentro del gen resistencia a 🔶	CGTCGGGGAGTATAACTTCG	
Cebador río arriba gen <u>PtpA</u> , con secuencia de corte para <u>HindIII</u> ->>	AAGCTTATCGTATCCAGCTTCCGACA	
Cebador río abajo gen <u>PtpA</u> , con 🛛 🗲 secuencia de corte para <u>Noti</u>	GCGGCCGCATTGGATGCCATAGGACAGG	
Cebador río arriba gen <u>PtPA</u> → Cebador dentro del gen resistencia a higromicina ← Cebador río arriba gen <u>PtpA</u> , con secuencia de corte para <u>HindIII</u> → Cebador río abajo gen <u>PtpA</u> , con secuencia de corte para <u>NotI</u> ←	AGTTTCTGCTCGACCGTCAT CGTCGGGGAGTATAACTTCG AAGCTTATCGTATCCAGCTTCCGACA GCGGCCGCATTGGATGCCATAGGACAGG	

3.8. Estrategias in silico para predecir la tirosina de ECHA potencial blanco de PtpA

Esta etapa del trabajo la realicé en el marco de una pasantía en la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (UNL) en Santa Fe, Argentina. Junto al Profesor F. Herrera (PhD), realizamos estudios *in silico* para la predicción de la interacción entre la fosfatasa PtpA de *Mtb* y la tirosina fosforilada de la ECHA, una de las proteínas candidatas a sustrato fisiológico de la fosfatasa. Se realizaron ensayos de acoplamiento molecular, utilizando los datos de ambas estructuras cristalográficas disponibles en la base de datos *Protein Data Bank* (PDB) y aplicando las herramientas bioinformáticas Haddock y APBS. Se evaluó el acoplamiento entre PtpA y todas las tirosinas (Tyr) de TFP_{ECHA} expuestas al solvente (Tyr239, Tyr271, Tyr639, Tyr724) de forma de poder determinar el potencial blanco de PtpA. Para ello se realizó un protocolo, para cada una de las tirosinas por separado, que involucró tres diferentes pasos bioinformáticos como se detalla a continuación:

Generación de las estructuras de ECHA con cada una de las tirosinas expuestas fosforiladas. Estas estructuras fueron luego minimizadas energéticamente en solvente implícito, con el programa AMBER 2018, de forma de eliminar posibles contactos estéricos y de relajar completamente la estructura. El solvente implícito fue tenido en cuenta utilizando el modelo modificado de Born generalizado.

Simulación de acoplamiento molecular entre PtpA y cada estructura generada en (*i*). Para ello se utilizó la plataforma HADDOCK que permite determinar la configuración más probable del complejo ECHA fosforilada en las distintas tirosinas de interés con PtpA. Para ello, primero se actualizaron los nombres y tipos de átomos desde Amber a HADDOCK y se realizaron las simulaciones de acoplamiento utilizando el servidor *online* del programa. La estructura pdb de PtpA utilizada fue la 1U2P, de 1.9 ángstroms de resolución. Los residuos catalíticos de la misma fueron definidos como residuos activos para el acoplamiento mientras que para la ECHA se seleccionó como residuo activo a la tirosina fosforilada (p-Tyr). Los residuos pasivos para cada una de las proteínas fueron definidos como todos los residuos superficiales dentro de una distancia de 6.5 ángstroms desde los residuos activos. Para cada simulación se obtuvieron alrededor de 200 posibles complejos, los cuales fueron separados en clústeres utilizando un criterio basado en la

distancia de la desviación cuadrática media (en inglés *Root Mean Square Deviation* o RMSD) entre ellos. Las primeras 5 estructuras de cada clúster fueron seleccionadas para el paso siguiente.

Cálculos electrostáticos para determina el mejor complejo entre ambas proteínas. Con los resultados obtenidos del paso anterior, se utilizó el programa APBS para detectar, entre los complejos provenientes de HADDOCK, aquellos en los que realmente la p-Tyr de ECHA se encontraba dentro del sitio activo de la PtpA. Este programa realiza cálculos electrostáticos usando la aproximación de Poisson Boltzmann y tiene incorporado un método para calcular la energía libre de un complejo, comparándola con la energía libre de cada uno de sus componentes por separado. Por lo que si la variación de energía libre (energía libre de interacción o de unión) es negativa, esa interacción es muy probable. Este cálculo lo hace usando un solvente implícito, por lo que el efecto del mismo es también tenido en cuenta.



4. **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Para abordar el primer objetivo, destinado a introducir la fosfatasa bacteriana PtpA dentro de los macrófagos, se evaluaron tres estrategias: (i) la transducción con un vector viral tipo amplicón portando varias copias del gen de la PtpA; (ii) la transfección con el plásmido pHSV portando el gen de la PtpA; y (iii) la introducción directa de la PtpA recombinante (rPtpA) por pinocitosis.

4.1. Transducción de células eucariotas con vectores tipo amplicón

Esta aproximación se realizó aprovechando la colaboración de nuestro grupo con la Dra. Mabel Berois de Virología, quién nos suministró la información necesaria para la puesta en marcha de este modelo. Los vectores de tipo HSV-1 amplicón son considerados versátiles ya que en principio presentan varias ventajas: permiten la transferencia de genes a una amplia variedad de células, con baja inmunogenicidad y toxicidad, su manipulación es relativamente sencilla y no presentan riesgos para el operador [Diefenbach et al., 2014]. En la literatura existían evidencias del uso de la transducción con vectores virales en células de la línea monocítica, usando por ejemplo lentivirus, o vectores de tipo HSV [Bambacioni et al., 2001; Stripecke et al., 2000]. Además, el vector de tipo HSV-1 amplicón permitiría la incorporación de numerosas copias del gen de PtpA (aproximadamente 15 copias) por partícula viral (Figura 3.1, en Metodología). Estos vectores incluyen un sitio interno de entrada del ribosoma (IRES) que se encuentra entre el gen de interés y el gen de la EGFP, posibilitando la expresión simultánea de múltiples genes a partir de un único promotor. Así, el vector utilizado en esta tesis fue construido de manera que permitiera la expresión de PtpA-wt micobacteriana, seguida de la expresión de la proteína verde fluorescente EGFP.La

expresión de EGFP permite evaluar el éxito de la transducción, ya que posibilita detectar las células transfectadas por microscopía de fluorescencia. A su vez la expresión de EGFP indica que el gen de interés también se expresa ya que este se encuentra corriente arriba respecto al gen de EGFP. A continuación se describen los resultados obtenidos al evaluar esta aproximación.

4.1.1. Se obtuvieron los vectores virales de interés.

Primeramente se expandieron los plásmidos necesarios para la generación de los vectores, mediante transformación y expansión de los mismos en *E.coli*. De esta manera se obtuvieron stock de los plásmidos de interés de buena calidad (Abs_{260nm}/Abs_{280nm}>1.8) y concentración (Tabla 4.1). A modo de ejemplo se muestra el gel de agarosa donde se sembró el bácmido y el plásmido pEBHICP27 purificados (Figura 4.1). En dicho gel se observa para el bácmido una banda de tamaño esperado con una masa mayor a 10 kpb, siendo el tamaño del mismo de 157 kpb. Por otro lado para el plásmido pEBHICP27 de tamaño 4.8 kpb se observa una banda mayor a 10 kpb que podría corresponder a su conformación circular. No se observa la forma lineal o degradación del plásmido, ni su forma superenrollada. Esto último no es lo esperado, pero nuestro grupo ha observado que es una característica de estas construcciones, ya que se ha obtenido el mismo resultado al purificar los plásmidos con otros kits, incluso aquellos que incluyen inhibidores de nucleasas [Vigo, 2022].

Descripción	Nombre del plásmido	Concentración ng/μL (Volumen μL)
Plásmido pHSV control portando el gen de EGFP	pHSV-IRES-EGFP	750 ng/μL (500 μL)
Plásmido pHSV portando el gensalvaje de PtpA y de EGFP	pHSV-PtpA _{wt} -IRES-EGFP	450 ng/μL (200 μL)
Bácmido fHSV1 Δpac ΔICP27	bácmido	330 ng/μL (200 μL)

Tabla 4.1. Plásmidos necesarios para la generación de los vectores virales.

Plásmido auxiliar pEBHICP27	pEBHICP27	800 ng/μL
		(200 μL)



Figura 4.1. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del bácmido y plásmido pEBHICP27 purificados. Carril 1: producto de purificación del bácmido. **Carril 2:** producto de purificación del plásmido pEBHICP27. Se incluye marcador de pares de bases (pb)., #SM0311, Thermo Fisher.

Luego de esta etapa, siguiendo el protocolo descrito en el punto 3.4.1.2 de la metodología se buscó producir grandes cantidades de los vectores virales en células Vero 2.2 (ver esquema en Figura 3.1). Para ello se realizó una transfección múltiple de dichas células con:

(i) el plásmido amplicón pHSV-IRES-PtpA_{wt}-EGFP o pHSV-IRES-EGFP; (ii) el bácmido o cromosoma artificial bacteriano; (iii) y el plásmido pEBHICP27. Luego se cosecharon los vectores y se calculó el título de estos. El mismo fue de 5x10³ y 1x10³ unidades transductantes por mL (UT/mL) para el vector control y el vector portando el gen de la PtpA- wt, respectivamente.

4.1.2. Transducción de macrófagos con el vector viral control

Para realizar los ensayos de transducción se utilizaron cultivos de monocitos THP-1 humanos diferenciados a macrófagos. Se expandieron los cultivos de THP-1, y se diferenciación de monocitos a macrófagos con PMA como fue descrito en la metodología (punto 3.3.1). La Figura 4.2 muestra a modo de ejemplo una imagen de la diferenciación de los monocitos THP-1 a macrófagos. Para comenzar los ensayos de transducción celular se utilizaron placas de cultivo (p12, 22.1 mm de diámetro) y una densidad celular entre 100- 400 mil células por pocillo.



Figura 4.2 Diferenciación de monocitos humanos THP-1 a macrófagos. Se muestran imágenes representativas de microscopía óptica (200 X). En **(A)** se muestran los monocitos humanos THP-1 y en **(B)** los monocitos diferenciados a macrófagos mediante estimulación con 50 ng/mL de PMA durante 72 h.

Ensayos previos al inicio de la presente tesis, realizados durante el doctorado de Mariana Margenat mostraron que al utilizar una MOI de 1:1 se lograba alcanzar un porcentaje de transducción de los macrófagos cercano al 30% [Margenat, 2016]. Lamentablemente, en nuestro caso la concentración de los vectores obtenidos resultó muy baja para los ensayos de transducción planificados, siendo estas de 5x10³ y 1x10³ UT/mL para el vector control y el vector portando el gen de la PtpA-wt. De todas maneras, se decidió realizar un ensayo de transducción con el vector control, aunque fuera utilizando una MOI más baja que la deseada, siendo esta de 0.1. El resultado al utilizar esta MOI tan baja fue el esperado, se observaron al microscopio de epifluorescencia muy pocas células expresando la EGFP (< 1%). Este ensayo permitió que me familiarizara con la producción de vectores virales y la transducción de células eucariotas. En paralelo a estos ensayos el estudiante Sebastián Vigo, en el marco de su tesina de grado, analizó alternativas para concentrar los vectores virales. Lamentablemente, no tuvo resultados exitosos ya que los virus concentrados resultaron tóxicos para las células al ser utilizados en ensayos de transducción.

4.2. Transfección de macrófagos utilizando los plásmidos tipo pHSV

Frente a estas dificultades, decidimos intentar transfectar los macrófagos directamente con el plásmido pHSV, ya que el mimo puede ser utilizado en ensayos de transfección de células eucariotas. Se sabe que los macrófagos derivados de monocitos THP-1 son células

notoriamente difíciles de transfectar, para los cuales se reporta una muy baja eficiencia de transfección y pérdida de viabilidad en el proceso [Kusumawati et al., 1999]. Sin embargo, decidimos intentar la transfección en nuestro sistema en particular. Contábamos con el plásmido portador del gen salvaje de PtpA (pHSV-PtpA_{wt}-IRES-EGFP), por lo cual se decidió obtener el plásmido portador del gen de la PtpA inactiva (pHSV-PtpA_{C11S}-IRES-EGFP). El objetivo fue contar con las herramientas que permitieran un estudio comparativo del efecto de la presencia o ausencia de la actividad PtpA micobacteriana dentro de las células eucariotas.

4.2.1. Obtención del plásmido portador de un gen de PtpA inactiva (pHSV-PtpA_{C115}-IRES-EGFP)

Para la obtención del plásmido pHSV-IRES-PtpA_{C11S}EGFP se amplificó el gen de la fosfatasa inactiva (mutante PtpA-C11S) utilizando como molde el plásmido pet28a-PtpA-C11S disponible en el laboratorio (Figura 4.3A). La PCR se realizó utilizando cebadores conteniendo una parte de la secuencia complementaria al gen PtpA-C11S y otra complementaria al vector de destino pHSV-1-IRES-EGFP, incluyendo el sitio de corte de la enzima de restricción HindIII. Esta estrategia permite el sub-clonado del gen por *RF-cloning* o por enzimas de restricción. En nuestro caso se hizo directamente con enzimas de restricción debido a que en nuestro grupo ya se había intentado por RF-cloning sin éxito [Margenat, 2016]. El producto de PCR se purificó, cuantificó y evaluó su pureza por electroforesis y espectrofotometría, obteniéndose 60 IL a 170 ng/IL. Para el subclonado del gen de PtpA-C11S se realizó una digestión con la enzima HindIII de 750 ng totales de plásmido y 400 ng del inserto PtpA-C11S. Los productos de digestión se separaron por electroforesis y se purificaron a partir de la banda del gel. El rendimiento de la purificación fue de 10[®]La 16 ng/[®]Lpara el inserto PtpA-C11S y 13 ng/[®]Lpara el plásmido. Previoa la ligación enzimática, el plásmido linearizado pHSV-IRES-EGFP fue tratado con fosfatasa FastAP para evitar que este se ligara nuevamente. En la reacción de ligación se utilizó una relación 1:5 (inserto-plásmido) y se transformaron las células *E.coli*-DH5 α con el producto de la ligación, detectando numerosos clones en las placas sembradas. Analizamos por PCR de colonia, 5 pools de 6 colonias cada uno (Figura 4.3B), obteniéndose en todas las PCRs un único producto del tamaño esperado (~500 pb) para el gen PtpA-C11S. Posteriormente se seleccionaron un total de 4 clones representando a 4 de los *pooles* positivos, verificándose

por PCR, en todos ellos, la presencia de un único producto del tamaño esperado (Figura 4.3C).



Figura 4.3. Obtención del mutante pHSV-1-IRES-PtpA_{C115}-**EGFP** (**A**) Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando el producto de PCR obtenido del gen PtpA-C115 utilizando como molde el pET28a-PtpA-C115. Se utilizaron cebadores que contienen una parte de la secuencia complementaria al gen PtpA-C115 yla secuencia de corte para HindIII, lo que permitió el posterior clonado en el plásmido pHSV-IRES-EGFP. En los carriles 1-4 se sembraron los productos de PCR obtenidos utilizando como molde el pET28a-PtpA-C115, correspondientes a distintas réplicas del ensayo, luego se muestra el marcador de pares de bases (pb); en el carril 5 el control negativo sin ADN y en el carril 6 un control positivo utilizando como molde ADN genómico de *Mtb*. (**B**) Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando el producto de PCR obtenido del gen PtpA-C115, utilizando como molde extractos de ADN provenientes de 5 *pools* de colonias obtenidas al transformar *E.coli*-DH5α con pHSV-IRES-PtpA_{C115}-EGFP. En los carriles 1-5 se muestra el resultado obtenido al utilizar los distintos *pools*; luego se muestra el marcador de pares de bases (pb); en el carril 7 el control negativo sin ADN. (C) Electroforesis en gel de agarosa 1% mostrando el pHSV-IRES-PtpA_{C115}-EGFP expandido y purificado a partir de los clones seleccionados, los cuales fueron enviados a secuenciar. En los carriles 1-4 se muestra el plásmido purificado de cada clon seleccionado mostrando la banda observada que se corresponde con el plásmido en su forma circular del mismo >10 kpb. Se muestra también el marcador de pb. #SMO311, Thermo Fisher.

A partir de estos clones se expandió y purificó el plásmido obteniéndose en todos los casos una concentración suficiente para su secuenciación. Por otro lado, como se utilizó una única enzima de restricción en el clonado, era conveniente saber previamente si los clones que serían secuenciados contaban con el gen de PtpA-C11S clonado en la dirección correcta 5´- 3´. Para esto se diseñó una estrategia basada en la digestión con enzimas de restricción. Se realizó una búsqueda de enzimas que cortaran tanto el plásmido como el inserto, generando un patrón de digestión diferencial que permitiera detectar los clones con el inserto en una dirección correcta en el plásmido pHSV-IRES-EGFP. A partir de esta búsqueda se seleccionaron las enzimas Sall y Notl, que en los casos que el inserto esté en la dirección correcta generarían un fragmento de 670 pb y otro de 6000 pb, y en caso de que el

plásmido presente el inserto de forma incorrecta se generaría un fragmento de 1096 pb y otro de 5574 pb. Así se comprobó que los 4 clones presentaban el inserto en la dirección correcta, por lo cual fueron enviados a secuenciar. A modo de ejemplo se muestra el resultado obtenido para uno de ellos luego de la digestión con Notl y luego de la digestión doble con Notl y Sall (Figura 4.4).



Figura 4.4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando el plásmido pHSV-IRES-PtpA_{C115}-EGFP digerido con Notl (carril 1) y digerido con las enzimas de restricción Sall y Notl (carril 2). En el carril 2 se indica con una flecha el fragmento liberado (menor de 1000 pb) luego de la digestión doble. Se muestra también el marcador de pb #SM0311, Thermo Fisher.

En la figura Figura 4.5 se muestra el alineamiento de las secuencias de los clones incluyendo como referencia la secuencia del gen de PtpA-wt. En esta figura se puede observar la presencia en todos los clones del cambio de base G a C, que determina la incorporación de una serina en vez de la cisteína en la posición 11 de la proteína, y la ausencia de mutaciones adicionales (excepto para el clon 1). Además, este alineamiento permitió confirmar la correcta dirección del inserto en el plásmido. A continuación a partir de uno de los clones confirmados (clon 13) se realizó un stock del plásmido pHSV-PtpA_{C115}-IRES-EGFP (200 IL a 230 ng/IL) y de las células transformadas *E.coli*-DH5_I-pHSV-PtpA_{C115}-IRES-EGFP los cuales se almacenaron a -80°C.



Figura 4.5. Alineamiento de los clones incluyendo la secuencia de PtpA-wt de *Mtb.* Se muestran las secuencias de los clones obtenidas utilizando el cebador "*forward*". En el alineamiento de secuencias se puede observar el cambio de G a C que indica el éxito de la mutagénesis (flecha roja).

4.2.2. Transfección de células eucariotas con el plásmido control

En el primer ensayo se transfectaron las células THP-1 sin diferenciar a macrófagos (200 mil células) con 1 ⊠g del plásmido control pHSV-IRES-EGFP, 10 ⊠L de Lipofectamina LTX junto a 2 ⊠L del reactivo PLUS™Reagent. En este ensayo no se observaron al microscopio de epifluorescencia células que expresen la EGFP, indicando la ausencia de células transfectadas. De hecho, se observó al microscopio un deterioro de las células sometidas al tratamiento de transfección respecto a las células sin tratar (Figura 4.6A). Estas muestras se analizaron también por citometría, observándose en las células tratadas un aumento del *side scatter* (SSC, brinda información de la complejidad o granulosidad de las células) y una disminución del *forward scatter* (FSC, brinda información sobre el tamaño de las células), si se compara con las células sin tratar (Figura 4.6B) [Barrera et al., 2012]. El comportamiento observado en citometría, se asoció a una pérdida de viabilidad celular, y está de acuerdo a lo observado al microscopio, indicando un claro efecto tóxico del procedimiento de transfección sobre las células viables fue de 90,6% y luego de la transfección paso a 6,1%. Además, se confirmó

por citometría que las pocas células viables remanentes no presentaban una señal fluorescente verde, que reflejara la expresión de la EGFP.



Figura 4.6. Ensayos de transfección de células humanas THP-1. (A) Visualización de las células sin transfectar y transfectadas con el plásmido control pHSV-IRES-EGFP utilizando microscopía de campo claro. **(B)** Visualización de los gráficos de granulosidad (SSC-A) en función del tamaño (FSC-A) de las células sin transfectar (izquierda) y transfectadas (derecha) con el plásmido control pHSV-IRES-EGFP.

En un segundo ensayo se transfectaron células THP-1 sin diferenciar y diferenciadas a macrófago, pero utilizando las condiciones recomendadas por el prooveedor de la lipofectamina LTX Plus Reagent para este tipo de células. Se ofreció el doble de plásmido que la vez anterior (2 ☑g de pHSV-IRES-EGFP), la mitad de Lipofectamina LTX (5 ☑L) y más del reactivo PLUS[™]Reagent (4 y 8 ☑L). Sin embargo, en estos ensayos tampoco se observaron células transfectadas, demostrando la dificultad de transfectar este tipo de célula inmune. Para demostrarlo, en paralelo se utilizó el mismo plásmido pHSV-IRES-EGFP en la transfección de las células humanas HeLa (realizada junto a la pasante de grado G. Morandi), lográndose entre un 28-40% de transfección (Figura 4.7.).



Figura 4.7. Ejemplo de los ensayos de transfección de células humanas HeLa con plásmido control pHSV-1-IRES-EGFP. (A) Visualización al microscopio de campo claro de las células sometidas a la transfección. (B) Visualización al microscopio de epifluorescencia de las células sometidas a la transfección, con el filtro que permite detectar la fluorescencia en verde. Las células fueron observadas utilizando el equipo BioRad, ZOE Fluorescent Cell Imager

Explorando la literatura, observamos que para la transfección de macrófagos se sugiere utilizar una mezcla comercial y un equipo específico de electroporación llamado Nucleofector™ vendido por la empresa LONZA. Este equipo es un electroporador más eficiente que permite llevarmoléculas de ADN directamente alnúcleo celular, que cuenta con una altísima eficiencia de transfección en eucariotas a la vez de baja toxicidad, sobre todo para células en suspensión, células no replicativas como los macrófagos y células difíciles de transfectar por métodos químicos, siendo sugerido como "la" alternativa a la transducción viral (4D-Nucleofector™ System Manual - BioNordika). El equipo está disponible en el Institut Pasteur de Montevideo, sin embargo durante la tesis no logramos tener respuestas de los representantes de LONZA en Uruguay para la compra de la mezcla comercial necesaria para el ensayo. Por lo tanto, debido a los problemas descritos previamente decidimos incluir otra estrategia experimental para introducir la actividad de la PtpA dentro de los monocitos humanos THP1. La misma es la estrategia descrita por Gilmore y colaboradores [Gilmore et al., 2001], basada en el método original de Okada y colaboradores [Okada et al., 1982], en el cual se introduce en las células eucariotas mediante pinocitosis la proteína recombinante de interés.

4.3. Introducción de las proteínas de interés en las células eucariotas mediante pinocitosis

Para este ensayo fue necesario obtener previamente de forma recombinante la fosfatasa salvaje PtpA-wt y el mutante inactivo PtpA-C11S. A su vez, necesitábamos un ensayo control que nos permitiera visualizar de forma rápida la entrada de la proteína a las células, por lo cual se decidió producir de forma recombinante la proteína EGFP cuya masa molecular es similar a PtpA. En el laboratorio contábamos con los plásmidos pET28a con el gen de la PtpA-wt y con el gen de la PtpA C11S (generados por nuestro grupo), y con el plásmido T7 con el gen de la EGFP (cedido por A. Correa, Institut Pasteur de Montevideo), lo que permitió realizar los ensayos de expresión en *E. coli* y posterior purificación de las proteínas.

4.3.1. Obtención de las proteínas recombinantes necesarias para los ensayos de pinocitosis

Para la expresión de la rPtpA en *E.coli* y su purificación se utilizó un protocolo previamente optimizado por el grupo para PtpA-wt [Margenat et al., 2015]. El mismo se aplicó con éxito al mutante inactivo rPtpA-C11S, el cual no había sido expresado previamente en el laboratorio. En el caso de la rEGFP se utilizó el protocolo descrito por Correa y colaboradores [Correa et al., 2014] agregando una etapa adicional de purificación por cromatografía de exclusión molecular para aumentar la pureza y evaluar el grado de oligomerización de la proteína obtenida. Los protocolos incluyen, la transformación de *E.coli BL21-DE3* con los plásmidos de interés, la expresión de los clones seleccionados en medio LB a baja temperatura (16°C-17°C), la purificación de las proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad, seguida de diálisis, una etapa de cromatografía de exclusión molecular y concentración por centrifugación (detallado en el punto 3.4.3.1 de la Metodología). En las Figuras 4.8 A y B se muestran los cromatogramas, donde se grafica la Abs_{280nm} en función del volumen (mL) de elución, obtenidos al realizar la purificación por cromatografía de exclusión molecular de las muestras de rPtpA-wtyrPtpA-C11S.

En esta cromatografía preparativa se pudo observar, para ambas proteínas, la presencia de un pico principal que corresponde a la forma nativa monomérica de la proteína. Considerando el volumen de elución se calculó una masa molecular de 21.5 kDa para rPtpA- wt y 16.4 kDa para rPtpA-C11S (Figura 4.8 A y B), en ambos casos la masa corresponde con la forma monomérica de la proteína de masa molecular teórica de 19.9 kDa. También se observaron picos más pequeños (de menor volumen de elución) correspondientes a contaminantes o agregados presentes en la muestra. De la misma manera en la Figura 4.9 A se muestra el cromatograma correspondiente a la purificación de la rEGFP, donde se observó un pico correspondiente a la EGFP monomérica con una masa molecular nativa de

34.1 kDa, similar a la masa teórica 27 kDa reportada.



Figura 4.8. Purificación por cromatografía de exclusión molecular preparativa de PtpA-wt y PtpA-C11S. (A) Perfil de elución a 280 nm de la PtpA-wt purificada por afinidad y diálisis, inyectada a la columna de exclusión molecular Superdex-200 16/60. El pico principal a 95 mL (21.5 kDa). (B) Perfil de elución a 280 nm para la purificación de la rPtpA-C11S. El pico mayor de elución se encuentra en el entorno de los 98 mL (16.4 kDa). El volumen total de la columna es de 120 mL. (C) SDS-PAGE para PtpA-wt, en el carril 1 se observa el perfil de la muestra inyectada a la columna y en carril 2 el perfil obtenido luego de la cromatografía de exclusión molecular. En el carril 3 se sembró el marcador de masa molecular (#26619 Thermo Fisher). (D) SDS-PAGE para rPtpA-C11S, mostrando en el carril 1 la PtpA-C11S antes de cromatografía de exclusión molecular y en el carril 2 la PtpA-C11S luego de cromatografía de exclusión molecular. Carril 3: marcador de masa molecular (#26619 Thermo Fisher).



Figura 4.9. Purificación por cromatografía de exclusión molecular de rEGFP. A) Perfil de elución a 280nm de la muestra rEGFP purificada por afinidad y diálisis e inyectada a la columna de exclusión molecular Superdex- 200 16/60. El pico mayor de elución se encuentra en el entorno de los 90 mL (34.1 kDa). En **(B)** se muestra la SDS-PAGE mostrando en el carril 1 el perfil de la muestra obtenido luego de la cromatografía de exclusión molecular. En el carril 2 se sembró el marcador de masa molecular (#26619 Thermo Fisher).

En las Figuras 4.8 Cy Dy 4.9 B se observa la SDS-PAGE con tinción con Coomasie de las muestras de rPtpA-wt, rPtpA-C11S y EGFP, respectivamente, antes y después de realizada la cromatografía de exclusión molecular. Los resultados sugieren que las proteínas obtenidas son claramente mayoritarias, ya que no se observan bandas que indiquen la presencia de proteínas contaminantes.

En suma, las proteínas obtenidas muestran un alto grado de pureza y están presentes en su forma nativa monomérica, fundamental para los ensayos con las células. De esta forma, se obtuvieron 1.5 mg, 3.5 mg y 2.0 mg de rPtpA-wt, rPtpA-C11S y rEGFP por gramo de células húmedas, respectivamente. Por otro lado, se verificó que la rPtpA-wt se encontrara activa luego de la purificación evaluando actividad fosfatasa con el sustrato artificial pNPP (Figura

4.10 A). Se realizó una curva de calibración con pNP, el producto de la reacción de desfosforilación de pNPP (Figura 4.10 B), para determinar el epsilón x el camino óptico b (el épsilon en μ M⁻¹cm⁻¹, y b en cm) para el compuesto a 405 nm, siendo el valor obtenido de 0.0132 μ M⁻¹. Este valor fue utilizado para la determinación de la actividad en μ M de pNP formados por minuto, por μ g de fosfatasa. Además, se obtuvo una actividad específica para rPtpA-wt de 4 U/mg, igual a la de otras producciones previas de nuestro grupo [Rodríguez,

L. 2012]. Como era de esperar rPtpA-C11S, el mutante en la cisteína catalítica de PtpA, no presentó actividad fosfatasa (Figura 4.10 A). Por otro lado se evaluó la actividad de rPtpA-wt diluida en los buffers en los que se realiza la pinocitosis (Hepes-Sacarosa y Hepes-Sacarosa- PEG). No se observó un efecto adverso de los mismos ya que no se detectaron diferencias significativas al comparar la actividad con la de la enzima diluida en el buffer control (GF) (Figura 4.10, B y C).



Figura 4.10. Evaluación de la actividad fosfatasa de las proteínas purificadas rPtpA-wt y rPtpA-C11S. (A) Gráfico representativo de Abs_{405nm} en función del tiempo obtenido al realizar el ensayo de actividad enzimática con rPtpA-wt y rPtpA-C11S utilizando el sustrato artificial pNPP-(B) Curva de calibración realizada midiendo la Abs_{405nm} en función de [pNP]. (C) μM de pNP por μg de PtpA-wt luego de los cambios de buffers necesarios para el ensayo de pinocitosis. En este caso, la reacción se realizó a punto final por 30 min a 37°C en el buffer de actividad fosfatasa conteniendo 20 mM del sustrato artificial pNPP. En dichas condiciones se evaluó la actividad de la rPtpA WT disuelta en el buffer de Gel filtración (GF), respecto a la PtpA-wt en los buffers necesarios para la pinocitosis (buffer Hepes 10 mM pH7.4 con sacarosa 0.5 M y buffer Hepes 10 mM pH7.4 con sacarosa 0.5 M, 10 % PEG 100). Se muestra el promedio 🛛 SD (n=4). No se observan diferencias significativas entre los grupos (p= 0.6147) al aplicar Kruskal-Wallistest, utilizando el programa GraphPadPrism 9.0.

4.3.2. Incorporación de la EGFP en las células eucariotas mediante pinocitosis

Se realizaron tres ensayos de pinocitosis utilizando la rEGFP, dos con monocitos THP-1 humanos en suspensión, y uno con macrófagos (Figuras 4.11, 4.12, 4.13). En la figura 4.11 se muestran imágenes representativas del resultado obtenido luego del primer experimento con las células THP-1. En la Figura 4.11A se observan las células THP-1 sin tratar, en la 4.11B las células sometidas a pinocitosis en ausencia de rEGFP y en la Figura 4.11C células sometidas a pinocitosis en presencia de rEGFP. La figura 4.11B muestra que las células tratadas por pinocitosis en ausencia de rEGFP presentan buen aspecto al compararlas con las células sin tratar (Figura 4.11A), lo que sugiere que las células resistieron bien al tratamiento realizado. Además la figura 4.11C muestra que las células donde se realizó la pinocitosis con rEGFP presentan un alto porcentaje de células fluorescentes, lo que indica el éxito del procedimiento de introducción de esta proteína exógena dentro de las células eucariotas.



Figura 4.11. Células THP-1 luego del ensayo de pinocitosis con rEGFP. (A) Imágenes de las células THP-1 sin tratamiento de pinocitosis. **(B)** Imágenes de las células THP-1 sometidas al tratamiento de pinocitosis en ausencia de rEGFP. **(C)** Imágenes de las células THP-1 sometidas al tratamiento de pinocitosis en presencia de rEGFP. Las células fueron observadas utilizando el equipo BioRad, ZOE Fluorescent Cell Imager, se muestran imágenes representativas de microscopía de campo claro (izquierda) y fluorescencia (derecha) (n=2) y se indica la escala bajo la imagen.

En la figura 4.12 y 4.13 se observan las imágenes representativas de los resultados obtenidos luego del segundo y tercer experimento correspondiente a células THP-1 y con las células diferenciadas a macrófagos, respectivamente. Las imágenes de las células tratadas por pinocitosis nuevamente muestran que las células tienen un buen aspecto general (Figura 4.12 A y 4.13 A) y que un alto número de células que contienen rEGFP en su interior (Figura 4.12 B y 4.13 B).

Se observó que un 95% ± 3 de células fluorescentes en el experimento con los monocitos THP-1 (Figura 4.12 B) y un 80% ± 1 en el experimento con los macrófagos (Figura 4.13 B), indicando que este método permite la incorporación de la proteína exógena a las células. A pesar de que en los macrófagos se observó una señal fluorescente, la misma fue más tenue en estas células adherentes que la observada al utilizar los monocitos THP-1 en suspensión. En estos ensayos, además de las células sometidas a la pinocitosis sin y con rEGFP, se agregó un control en el cual se incubaron las células con rEGFP pero no se les realizó el tratamiento de pinocitosis (Figura 4.12 C y 4.13 C). Esto se hizo para estar seguros que la rEGFP que entró a las células lo hizo por pinocitosis y no por otro mecanismo. La Figura 4-12C muestra que, en ausencia de pinocitosis, la rEGFP no se encuentra en el interior de las células. Por lo tanto podemos concluir que en las células tratadas por pinocitosis con rEGFP, el proceso de pinocitosis es lo que permite la entrada de la rEGFP a los monocitos. En el caso de los macrófagos incubados con rEGFP, en ausencia del tratamiento de pinocitosis, tampoco se observó ingreso de rEGFP (Figura 4-13 C).



100 µm

Figura 4.12. Células THP-1 luego del ensayo de pinocitosis con rEGFP. (A) Imágenes de las células sometidas al tratamiento de pinocitosis en ausencia de rEGFP. **(B)** Imágenes de las células sometidas al tratamiento de pinocitosis en presencia de rEGFP. **(C)** Imágenes de las células incubadas con rEGFP pero sin someterlas al tratamiento de pinocitosis. A la derecha se muestra una imagen amplificada donde se observa con con claridad la diferencia entre las imágenes B y C. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía de campo claro (izquierda) o epifluorescencia (derecha) utilizando el equipo BioRad, ZOE Fluorescent Cell Imager, se muestran imágenes representativas de n=2 experimentos y se indica la escala bajo la imagen. Se modificó de igual forma el contraste y brillo de ambas imágenes, para visualizar las células con claridad.



Figura 4.13. Macrófagos luego del ensayo de pinocitosis con rEGFP. (A) Imágenes de las células sometidas al tratamiento de pinocitosis en ausencia de rEGFP. (B) Imágenes de las células sometidas al tratamiento de pinocitosis en presencia de rEGFP. (C) Imágenes de las células incubadas con EGFP pero sin someterlas al tratamiento de pinocitosis. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía de campo claro (izquierda) o epifluorescencia (derecha) utilizando el equipo BioRad, ZOE Fluorescent Cell Imager, se muestran imágenes representativas de n=2 experimentos y se indica la escala bajo la imagen. Se modificó de igual forma el contraste y brillo de ambas imágenes, para visualizar las células con claridad.

En resumen, el procedimiento de pinocitosis permitió la introducción directa de proteína exógena a las células eucariotas. Esto nos motivó a realizar los experimentos con la fosfatasa rPtpA ya que esta estrategia resultó claramente más exitosa que los ensayos de transfección o transducción en los que se intentó introducir los genes de interés.

4.3.3. Incorporación de la proteína rPtpA-wt micobacteriana en los macrófagos mediante pinocitosis

En estos ensayos se utilizó la proteína rPtpA-wt, purificada como se describió anteriormente. Para poder detectar la rPtpA en los macrófagos se obtuvieron anticuerpos policionales contra rPtpA. Para ello se inmunizó un conejo con dicha proteína obteniéndose el antisuero contra rPtpA (colaboración con la Dra. Ana María Ferreira, Instituto de Higiene). Los anticuerpos policionales presentes en el antisuero se purificaron por afinidad utilizando una matriz comercial de sefarosa activada-NHS portadora de rPtpA unida covalentemente, siguiendo el protocolo descrito en 3.6. De esta manera se obtuvo un stock de anticuerpos policionales con una concentración de 0.3 mg/µL (2 mL). Mediante ensayos de *Dot Blot* se determinó que los anticuerpos obtenidos reconocen hasta 2.5 ng de rPtpA cuando son utilizados a una dilución 1/5000 y 1 ng de rPtpA cuando son utilizados a una dilución 1/2000 (Figura 4.14A). En humanos existe un gen homólogo a PtpA que da lugar a 4 isoformas de la proteína ACP (Uniprot P24666 1-4). Por lo cual se verificó que los anticuerpos obtenidos contra rPtpA no reconocieran alguna isoforma de la ACP humana u otra proteína de tamaño similar presente en el macrófago. La ausencia de esta posible reacción cruzada de los anticuerpos obtenidos se confirmó realizando un WB con las muestras de proteínas de macrófagos a los cuales se les agregó o no la rPtpA micobacteriana. Así en la Figura 4.14 B se observa una banda de tamaño similar al de rPtpA (21.5 kDa) únicamente cuando la rPtpA fue agregada al extracto proteico de macrófagos.



Figura 4.14. Inmunodetección de rPtpA. (A) Resultados del *Dot Blot* de diferentes cantidades de rPtpA, utilizando una dilución del anticuerpo anti-PtpA 1/5000. **(B)** WB detectando la rPtpA (5 ng) agregada a una muestra de extracto de proteínas de macrófago (carril 2); WB del mismo extracto de proteínas de macrófago pero en ausencia de agregado de rPtpA (carril 3). MPM: marcador de peso molecular (carril 1).

En los ensayos de pinocitosis realizados para introducir la rPtpA se utilizaron inicialmente 2x10⁵ células THP1 humanas diferenciadas a macrófagos durante 72 h con PMA. Posteriormente, se realizó el tratamiento de pinocitosis a 0 día post-diferenciación (dpd), luego de transcurrido 1 dpd y luego de transcurridos 2 dpd. Esto se realizó con el objetivo de determinar, en qué momento era adecuado realizar la pinocitosis sin que afectara la viabilidad de los macrófagos. En la figura 4.15 se puede observar que la rPtpA fue detectada en todos los extractos de proteínas de macrófagos tratados por pinocitosis con 46 µg de rPtpA, luego de 0, 1, o 2 día pos-diferenciación (dpd). Como era de esperar no se detectó rPtpA en aquellos macrófagos en los que no se agregó la proteína micobacteriana. Además se observó una mayor captación de rPtpA en los macrófagos tratados 2 dpd. Este resultado seguramente se debió a que luego de este tiempo prolongado post-diferenciación los macrófagos comienzan a tener afectada la membrana y disminuye la viabilidad, lo que explica que se comporten de manera diferente frente a la pinocitosis. Por lo cual, en experimentos posteriores se utilizaron sólo macrófagos con 0 dpd o 1 dpd.



(A) Dot-blot con anti-rPtpA sobre muestras de extractos proteicos obtenidas de macrófagos sometidos a pinocitosis

Figura 4.15. Introducción de rPtpA en los macrófagos. (A) *Dot blot* realizado sobre extractos proteicos obtenidos de macrófagos en los cuales se introdujo rPtpA mediante pinocitosis a 0, 1 y 2 dpd de los macrófagos, y el control de células tratadas de igual manera pero en ausencia de rPtpA. Se realizaron los ensayos por duplicado, se lavaron las células. A continuación se extrajeron y cuantificaron las proteínas totales de los macrófagos en 100 µl de buffer de lisis y se procedió a la detección de la rPtpA mediante *Dot blot* utilizando el anticuerpo anti PtpA previamente purificado. Se sembró en todos los casos 10 [®]L del extracto obtenido. En **(B)** se cuantificó la rPtpA detectada en los macrófagos, como el promedio del área en pixeles de la señal, determinada utilizando el programa ImageJ. Se muestra el promedio [®] SD (n=2).

A pesar de que la incorporación de rPtpA a los macrófagos fue exitosa, al cabo de 1 o 3 días postpinocitosis ya no se detectó la proteína dentro de las células, lo que sugiere que rPtpa es degradada rápidamente por los macrófagos (no se muestra). En ensayos posteriores evaluamos si la rPtpA permanecía, luego de tiempos más cortos, en los monocitos THP-1 sin diferenciar a macrófagos, ya que estas células, se encuentran menos especializadas en la destrucción de agentes exógenos que los macrófagos. Observamos que la rPtpA introducida se podía detectar en los monocitos luego de 3 h de realizado el tratamiento de pinocitosis. A su vez, se estimó la concentración de rPtpA-wt que se incorporó a las células, para ello se determinó por densitometría la señal obtenida de rPtpA-wt en las imágenes de los WB de las muestras tratadas por pinocitosis, y de la rPtpA-wt purificada a diferentes concentraciones (Figura 4.16). Se determinó así la presencia de 10 ng de PtpA cada 5 µg del extracto proteico total, correspondiente a 0.2% del total de proteínas del extracto obtenido a partir de 150 mil células. Esto indica que se incorporaron unos 0.07 picogramos de PtpA por célula, que corresponden a 0.004x10⁻³ picomoles (considerando una masa molar molecular 19.9 kDa). Si consideramos el volumen de una célula eucariota en 3.4×10^{-9} ml [Molecular Cell Biology. 4th edition], podemos calcular que por célula hay una concentración del orden 1[®]M PtpA- wt luego del tratamiento. Esta concentración es similar a la determinada para muchas enzimas del metabolismo [Zotter et al., 2017]. Sin embargo, debemos mencionar que las imágenes del control de pinocitosis con rEGFP muestran que las células presentan una fluorescencia variable (ver Figura 4.11), que indicaría que unas captan más proteína que otras.



Dot blot en banda con Ac-anti-PtpA

Figura 4.16. Inmunodetección de rPtpA en los extractos de monocitos humanos sometidos a pinocitosis. (A) Los extractos de monocitos THP1 se prepararon inmediatamente después de la pinocitosis (t=0) y luego de 3 h. Para el *Dot Blot* en banda se sembraron 5 µg de cada extracto y se utilizó el anticuerpo anti PtpA policional generado para detectar la rPtpA. Se agregaron como controles positivos 50 ng y 2 ng de la rPtpA. **(B)** Se analizaron las bandas con el programa ImageJ y teniendo en cuenta la intensidad de los controles positivos se pudo calcular los ng de rPtpA en cada muestra. Se muestra el promedio de los resultados ISD (n=2). Al analizar el número de células viables utilizando la tinción de exclusión con azul de tripano de las células sin tratar (s/p) y las tratadas por pinocitosis (c/p), se observó que luego del tratamiento se recupera en general un número similar de células por mL, y no se observan diferencias significativas entre los grupos (Figura 4.17 A). Sin embargo, en las muestras sin tratar por pinocitosis se observa una menor dispersión del número de células por mL, respecto a las tratadas por pinocitosis (c/p, c/p PtpA-wtPtpA-wt, c/p PtpA-C11S), seguramente debido al procedimiento aplicado que puede afectar en cierta medida a la células, afectando su recuperación en las etapas de centrifugación/suspensión propias del protocolo aplicado. Además, se observa una tendencia (pero no significativa) a un menor recuento de células viables en el caso de las células tratadas con PtpA-wt, lo que puede estar sugiriendo un efecto citotóxico de la actividad de esta fosfatasa. También se determinó la viabilidad midiendo la reducción de la resarzurina, observándose un perfil similar al obtenido mediante azul tripano, no observándose cambios significativos entre los grupos (Figura 4.17B).

(B)



(A)

Figura 4.17. Evaluación del impacto de la pinocitosis en la viabilidad celular. (A) Se muestra el número de células viables por mL en las distintas condiciones, determinadas por tinción de exclusión con azul tripano. Se muestra el el promedio de los resultados II SD (n=3). No se observan diferencias significativas entre los grupos (p=0,3161) al aplicar Kruskal-Wallis test, utilizando el programa GraphPad Prism 9.0. (B) Se muestra el recuento de células viables (%) en las distintas condiciones, determinadas con el kit de resarzurina para determinar la viabilidad. El resultado se expresó en %, considerando como 100 % el valor de fluorescencia de las células no tratadas (s/p), Se muestra el promedio de los resultados II SD (n=2). No se observan diferencias significativas entre los grupos (p=0.5852) al aplicar Kruskal-Wallistest, utilizando el programa GraphPadPrism 9.0.

71
Por otra parte, se evaluó si los potenciales sustratos de PtpA identificados por nuestro grupo (ECHA, ATPA y SQRD y PFK1) podían ser detectados en los extractos de macrófagos de células sin tratar utilizando anticuerpos comerciales. Para esto se obtuvieron, a partir de cultivos de macrófagos, fracciones subcelulares enriquecidas en mitocondria y citosol con las cuales se realizaron ensayos de WB. La Figura 4.18 muestra que se pudo observar una banda del tamaño esperado para cada proteína y en la fracción subcelular esperada. En el caso de la ECHA, ATPA y SQRD, las cuales son sintetizadas en el citosol y luego transportadas a la mitocondria, era esperable detectarlas en ambas fracciones. En cambio, la PFK1 que es sólo citoplasmática, fue detectada únicamente en la fracción citosólica. Haber logrado la detección de estas proteínas permitirá evaluar en un futuro los cambios en la localización y niveles de las misma en las células.



Figura 4.18. Inmunodetección de las proteínas candidatas a sustrato de PtpA. Se lisaron los macrófagos y se obtuvieron fracciones enriquecidas en mitocondrias y citosol utilizando un kit comercial *(Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells)*. Las diferentes fracciones se trataron con DTT 20 mM final por 30 min a 4°C y luego se separaron mediante SDS-PAGE y transfirieron a una membrana de PVDF. Se realizaron WB con anticuerpos anti-ECHA, anti-SQRD, anti-ATPA, anti-PFK1. C, corresponde a la fracción citosólica y M a la fracción mitocondrial (concentrada unas 20 veces respecto a la citosólica). Se indican en círculos rojos las bandas, del tamaño esperado, observadas para cada una de las proteínas analizadas.

En resumen se definió en el modelo de pinocitosis una ventana de tiempo en la cual la proteína se encuentra presente en las células, y podemos analizar si existen cambios a nivel del metabolismo energético en los macrófagos, que puedan ser mediados por la fosfatasa micobacteriana PtpA.

4.4. Evaluación del metabolismo energético

Como planteamos en la introducción la fosfatasa micobacteriana PtpA podría estar modulando el metabolismo energético del macrófago, actuando sobre proteínas vinculadas directa o indirectamente al metabolismo energético [Margenat et al., 2015]. Para explorar este punto llevamos a cabo, en el modelo obtenido, estudios para evaluar la existencia de cambios en el metabolismo energético asociados a la actividad de PtpA. En particular, se estudió el impacto de la actividad fosfatasa de PtpA sobre el consumo de oxígeno y acidificación extracelular de los monocitos THP-1, utilizando un analizador de flujo extracelular Seahorse XFe24 (Agilent). Se evaluó la velocidad de consumo de oxígeno en ausencia y presencia de diferentes inhibidores y/o desacoplantes de la cadena respiratoria. Se realizaron ensayos en las células a las que se le introdujo la rPtpA por pinocitosis (c/p rPtpA-wt) y los diferentes controles: células sin tratar por pinocitosis (s/p), células tratadas por pinocitosis en ausencia de proteína recombinante (c/p) y en presencia de la rEGFP (c/p rEGFP/) o del mutante inactivo rPtpA-C11S (c/p rPtpA-C11S).

4.4.1. Efecto de la pinocitosis y la incorporación de rPtpa sobre el consumo de oxígeno mitocondrial de los monocitos THP-1

En este ensayo, la comparación de las células sin tratar por pinocitosis respecto a las tratadas por pinocitosis permitió evaluar el impacto del tratamiento en el metabolismo energético celular. En la Figura 4.19A se observa la velocidad de consumo de oxígeno de las células sin tratar por pinocitosis (s/p) y las células tratadas con pinocitosis en ausencia de proteína recombinante (c/p sin prot.) y en presencia de la rEGFP (c/p rEGFP). En la figura 4.19B se observa la velocidad de consumo de oxígeno de las células tratadas por pinocitosis en presencia de rPtpA-wt y rPtpA-C11S (c/p rPtpA-wt, c/p rPtpA-C11S). En ambas figuras se observa que las células consumen oxígeno y responden al agregado de los diferentes inhibidores (oligomicina, antimicina A y rotenona) y el desacoplante (FCCP) utilizado. Se observa una respiración basal de 10-20 pmoles O₂/min/µg para todas las condiciones. Luego del agregado de oligomicina, inhibidor de la ATP sintasa, se observó una disminución en el consumo de oxígeno, como era esperable. El consumo residual corresponde al consumo independiente de la síntesis de ATP mitocondrial. A continuación, al agregar el desacoplante

del transporte de electrones y la síntesis de ATP (FCCP) se observó un aumento en el consumo de oxígeno correspondiente a la máxima respiración alcanzada por las células. Finalmente, como era de esperar, luego del agregado de antimicina A y rotenona, inhibidores de la cadena respiratoria, se observó una disminución del consumo de oxígeno. Al comparar los resultados obtenidos se observaron diferencias significativas, entre las células tratadas y sin tratar por pinocitosis, en la respiración máxima obtenida luego del agregado de FCCP (Figuras 4.19A y C). Se observó claramente que la pinocitosis afectó a las células, llevando a una disminución en la velocidad de consumo de oxígeno máxima, respecto a las células sin tratar. Este resultado podría deberse a que durante la pinocitosis se pierden metabolitos intracelulares, necesarios para la respiración celular. De cualquier forma pensamos que los mecanismos involucrados en la disminución de la respiración máxima (ya sea la pérdida de metabolitos luego de la pinocitosis u otros) no estarían afectando la viabilidad celular de forma drástica, ya que como se describió previamente no se observaron cambios en la viabilidad celular luego de la pinocitosis, e incluso luego de 3 h del tratamiento (Fig.4.17).

Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en el consumo de oxígeno entre las células en la que se introdujo rPtpA-wt y aquellas en las que se incorporó el mutante inactivo rPtpA-C11S (Figura4.19B)



Figura 4.19. Evaluación de la respiración mitocondrial en células sometidas a pinocitosis en presencia de rPtpa. Las células fueron sometidas a la pinocitosis en ausencia o presencia de las proteínas recombinantes o no fueron expuestas al tratamiento, las medidas se llevaron a cabo el mismo día del tratamiento en un periodo no mayor a 3 h. En **(A)** se muestra la velocidad de consumo de oxígeno determinada antes y después de la adición secuencial de oligomicina, el desacoplante FCCP (dos adiciones) y antimicina A más rotenona (AA/Rot), para las células control sin tratar por pinocitosis (s/p), las células tratadas por pinocitosis pero en ausencia de proteína recombinante (c/p sin prot.), y las células tratadas por pinocitosis con EGFP como control (c/p con EGFP). En **(B)** se muestra lo mismo pero para las células tratadas por pinocitosis con la rPtpA-wt o el mutante inactivo rPtpA-C11S. El gráfico (**C)** muestra la respiración máxima obtenida luego del agregado de FCCP. Los datos fueron obtenidos de las mediciones de la tasa de consumo de oxígeno que se muestran en (A) y (B). Se muestra el promedio 🛛 SD (n=5), en C se realizó un ANOVA de una vía ** p < 0.001.

4.4.2. Efecto de la pinocitosis y la incorporación de con rPtpA sobre la capacidad de acidificar el medio extracelular de las células THP-1

En los ensayos descritos arriba también se determinó en simultáneo la capacidad de las células THP-1 de acidificar el medio extracelular (Figura 4.20A y B). En este estudio no se observaron diferencias significativas en la acidificación extracelular entre las distintas

condiciones, pero las muestras presentaron una importante variabilidad (Figuras 4.19A y B) Únicamente se observó una leve disminución en la acidificación extracelular de las células tratadas con pinocitosis y rPtpA-wt, con respecto a las tratadas con pinocitosis y el mutante inactivo rPtpA-C11S (Figura 4.19C), pero la diferencia no fue significativa (p = 0.053). Es necesario evaluar en experimentos adicionales si esto se repite. Este resultado preliminar debe ser repetido pero podría estar reflejando una acción de PtpA-wt sobre alguna proteína del macrófago. Una posible hipótesis, es que la rPtpA esté actuando sobre la PFK1 una enzima reguladora de la glucólisis, que nuestro grupo ha identificado como candidato a sustrato de PtpA. [Evans et al., 1981; Schöneberg et al., 2013]. En este contexto, podríamos hipotetizar que la desfosforiación de la PFK1 por PtpA podría inhibir a la enzima, causando una disminución de la producción de piruvato y por ende del lactato, el cual es secretado al medio extracelular en co-transporte con un protón. Esto podría explicar la disminución de la capacidad de acidificar el medio extracelular observada en las células a las cuales se introdujo la PtpA-wt respecto a aquellas que contienen el mutante inactivo de dicha fosfatasa. Por otro lado, considerando los antecedentes y suponiendo que la PFK1 sea validada como sustrato, podríamos especular que *Mtb* durante la infección inyecta la PtpA dentro del macrófago como un efector bacteriano que le permite controlar la actividad de la vía glucolítica del macrófago, y por tanto la disponibilidad de glucosa. Nuestro grupo abordará estas hipótesis en investigaciones futuras.



Figura 4.20. Evaluación de la acidificación extracelular en células sometidas a pinocitosis en presencia de rPtpa. En **(A)** se muestra la velocidad de acidificación extracelular determinada en las mismas condiciones que en la Figura 4.19 (n = 5 pocillos por grupo), para las células control sin tratar por pinocitosis (s/p), las células tratadas por pinocitosis pero en ausencia de proteína recombinante (c/p sin prot.), y las células tratadas por pinocitosis con EGFP como control (c/p con EGFP). En **(B)** se muestra lo mismo pero para las células tratadas por pinocitosis con la rPtpA wt o el mutante inactivo rPtpA C11S. El gráfico (**C)** muestra la comparación de la acidificación extracelular basal obtenida para las células tratadas por pinocitosis con la rPtpA wt o el mutante inactivo rPtpA C11S. Se muestra el promedio SD (n=5), en Cse realizó un tes det (p=0.053).

Luego de familiarizarnos con los ensayos entendimos que la estrategia de incorporación de rPtpA por pinocitosis nos permitiría detectar únicamente cambios relativamente rápidos en el metabolismo energético potencialmente asociados a la actividad de PtpA. La ventana de tiempo en que la que sabemos que rPtpA permanece en la célula es muy corta (3 h), y no permitiría ver cambios a nivel mitocondrial, por ejemplo debidos a la acción de PtpA en la ECHA, SQRD o ATPA. Si bien estas proteínas son sintetizadas en el citosol, luego deben ser translocadas a la mitocondria, donde cumplen su función celular. Si rPtpA afecta la translocación de estas proteínas a la mitocondria, puede que esto no se vea reflejado en el metabolismo energético tan rápidamente, ya que las proteínas mitocondriales tienen una vida media muy alta (de días o semanas) [Mathieson et al., 2018]. Por ejemplo, en monocitos se ha reportado una vida media para ATPA de 198 h, para ECHA de 113 h y para SQRD es de 76 h [Mathieson et al., 2018].

Sin embargo, en el contexto de la infección de macrófagos con *Mtb*, han sido reportados cambios proteómicos en la mitocondria 24 h post-infección [Jamwal et al., 2013]. En este trabajo, luego del a infección de los macrófagas con la cepa virulenta H37Rv, seis proteínas dejan de ser detectadas en este organelo, entre ellas las tres candidatas a sustrato de PtpA identificados por nuestro grupo (ATPA, ECHA y SQRD) [Margenat et al., 2015]. Esto indica que en el contexto de la infección de los macrófagos, donde actúan numerosos factores de virulencia, la vida media de las proteínas mitocondriales puede disminuir. Esto nos ha motivado a generar mutantes de *Mtb* para PtpA, para poder evaluar el metabolismo energético de monocitos y otras células eucariotas en el contexto de la infección. A continuación se describen los avances realizados en este sentido.

4.5. Obtención de la cepa de *Mtb* mutante para el gen de PtpA, necesaria para la evaluación del rol de PtpA durante la infección

La realización de una pasantía en el Laboratorio de micobacterias dirigido por la Dra. Fabiana Bigi (INTA Castelar Argentina, posibilitó que se obtuviera una cepa de *Mtb* (cepa virulenta CDC) carente del gen funcional de PtpA. La cepa de *Mtb* CDC mutante para el gen de la PtpA fue obtenida siguiendo un protocolo basado en recombinación homóloga descrito para micobacterias [Murphy, KC et al., 2015]. El mismo consistió en una primera etapa en la cual se obtuvo una cepa con una frecuencia de recombinación elevada, lo que facilitó el intercambio alélico necesario para la interrupción del gen de interés. Para ello se transformó la micobacteria por electroporación con plásmidos inducibles que codifican para las recombinasas virales RecE y RecT y portan resistencia a kanamicina. Una vez alcanzada esta etapa se procedió a la obtención por PCR del casete de higromicina que se utilizó para interrumpir el gen de PtpA. Para ello se realizó una PCR utilizando como molde un vector que contenía los genes de resistencia a higromicina (pKp628) y cebadores complementarios a los extremos de dicho gen de resistencia y que incluían una secuencia adicional complementaria a las regiones (5') y (3') flanqueantes al gen de PtpA. Dicho casete se introdujo en la cepa obtenida previamente mediante una

79

segunda etapa de electroporación, seleccionando los clones transformados mediante doble selección con antibióticos (ampicilina e higromicina). Finalmente se verificó si los clones insertaron o no el casete de higromicina por recombinación homóloga. La figura 4.21A y B muestra los dos PCRs realizados con diferentes pares de cebadores para evaluar 2 de los 10 clones obtenidos (clon 8 y clon 3), demostrando que el clon 8 corresponde a la cepa mutante de *Mtb* para el gen de PtpA. En la parte A de la figura se muestra el producto de PCR utilizando un cebador complementario a las secuencia flanqueante en 5´ del gen de PtpA y otro complementario a una secuencia del gen de higromicina presente en el casete utilizado para la mutagénesis. Como resultado se observa que al utilizar como molde el clon 8 se obtiene un producto de amplificación < 1 kb (626 pb), que sugiere que se insertó el casete de resistencia a higromicina. Sin embargo, al utilizar como molde el clon 3, no se observó producto de PCR, lo que sugiere que no se insertó el casete de resistencia a higromicina. En la parte B de la figura se observan los productos de la PCR en la que se utilizaron los cebadores complementarios a las secuencias flanqueantes 5'y 3' del gen de PtpA para el clon 8 y 3. Se observa también el producto de PCR de dos controles, C1: PCR utilizando ADN genómico de la cepa salvaje de Mtb como molde, y C2: PCR utilizando como molde el casete de higromicina generado. Para ambos controles se observa fragmentos de tamaño esperado (C1 > 1 kb y C2 > 2 kb). Para el clon 8, se observa un fragmento del mismo tamaño que el observado en C2, lo que indica que el clon 8 insertó el casete de higromicina y es un clon mutante para el gen de PtpA. Finalmente para el clon 3 se observa un fragmento del tamaño del observado en C1, lo que indica que el clon 3 no es un clon mutante paraelgen de PtpA.



Figura 4.21. Obtención de un clon de *Mtb* **mutante para el gen de PtpA. (A)** Electroforesis en gel de agarosa 1% del producto de PCR utilizando un cebador complementario a las secuencia flanqueante en 5' del gen de PtpA y otro complementario a una secuencia del gen de higromicina presente en el casete utilizado para la mutagénesis. Se muestran los resultados del PCR utilizando C-: control negativo sin ADN. Clon 8: producto de PCR obtenido al utilizar como molde el ADN del clon 8. Clon 3: producto de PCR obtenido al utilizar como molde el ADN del clon 8. Clon 3: producto de PCR obtenido al utilizar como molde el agarosa 1% en el cual se sembró producto de la PCR en la que se utilizó los cebadores complementarios a las secuencias flanqueantes 5'y 3' del gen de PtpA. C-: control negativo sin ADN. Cl: PCR utilizando ADN genómico de la cepa salvaje de *Mtb* como molde y los cebadores indicados. C2: PCR utilizando como molde el casete de higromicina generado. Clon 8: producto de PCR obtenido al utilizar como molde el ADN del clon 8. Clon 3: producto de PCR obtenido al utilizar como molde el ADN del clon 8. Clon 8: producto de PCR obtenido al utilizar como molde el casete de higromicina generado. Clon 8: producto de PCR obtenido al utilizar como molde el ADN del clon 8. Clon 3: producto de PCR obtenido al utilizar como molde el ADN del clon 8. Clon 3: producto de PCR obtenido al utilizar como molde el ADN del clon 8. Clon 3: producto de PCR obtenido al utilizar como molde el ADN del clon 8. Clon 3: producto de PCR obtenido al utilizar como molde el ADN del clon 8. Clon 3: producto de PCR obtenido al utilizar como molde el ADN del clon 8. Clon 3:

Por lo tanto, en el marco de esta tesis se obtuvo la cepa de Mtb mutante para el gen de PtpA, lo que permitirá al grupo trabajar con el modelo de infección de macrófagos en un futuro.

4.6. Estudios *in silico* de interacción entre la fosfatasa micobacteriana PtpA y la TFP_{ECHA}

De los cuatro candidatos a sustrato de PtpA, identificados por nuestro grupo, la subunidad alfa de la TFP humana o ECHA es el que más hemos estudiado. Nuestro grupo ha demostrado la interacción y desfosforilación de ECHA por PtpA [Margenat, 2016, Margenat et al., 2015]. Por lo cual, para avanzar en la determinación de cuál es la tirosina de ECHA que estaría siendo desfosforilada por PtpA, realicé una pasantía orientada por el Dr. F. Herrera de la Universidad del Litoral-Santa Fe, Argentina. Allí participé en los ensayos *in silico* de acoplamiento molecular entre la PtpA y la ECHA (o TFP_{ECHA}).

4.6.1. Identificación de la Tyr-271 de TFP_{ECHA} como potencial blanco de PtpA

La estrategia utilizada permitió determinar en primer lugar cuáles eran las tirosinas de la TFP_{ECHA} expuestas al solvente que podrían ser blanco de PtpA, las cuales se consideraron para los experimentos de acoplamiento molecular. Los análisis de acoplamiento molecular permitieron obtener un número importante de soluciones para las cuales se compararon las energías de interacción electrostática. Así se logró determinar que el mejor resultado de acoplamiento molecular se da a través de la Tyr271 de TFP_{ECHA}, la cual interacciona con el sitio activo de la PtpA (Tabla 4.1). Las mejores soluciones correspondieron al clúster 1.1 y 2.1, que consideran al grupo tiol (SH) de la cisteína catalítica de PtpA como tiolato (S-), forma reactiva de la cisteína en la catálisis [Madhurantakam et al., 2008]. El clúster 1.1 fue el de menor energía e incluyó 128 estructuras de 184, siendo la estructura más representativa la 1.1. El clúster 2.1, también de menor energía, incluyó sólo 28 estructuras de 184, siendo la estructura del mejor complejo PtpA/TFP_{ECHA} obtenido por acoplamiento molecular.

Tabla 4.1 Energías de interacción electrostática para los complejos PtpA/TFP_{ECHA} que involucran a la Tyr271

TYR271 [1] ECHA_Y271_RX --> OUT_cluster1_1.pdb.apbs = -33.312 [1]ECHA_Y271_RX-->OUT_cluster1_2.pdb.apbs=-12.425 [1]ECHA_Y271_RX-->OUT_cluster1_3.pdb.apbs=-43.732 [1] ECHA_Y271_RX --> OUT_cluster1_4.pdb.apbs = 64.528 [1] ECHA_Y271_RX --> OUT_cluster2_1.pdb.apbs = -85.823 [1]ECHA_Y271_RX-->OUT_cluster2_2.pdb.apbs=19.229 [1]ECHA_Y271_RX-->OUT_cluster2_3.pdb.apbs=84.764 [1]ECHA_Y271_RX-->OUT_cluster2_4.pdb.apbs=46.824 [1]ECHA_Y271_RX-->OUT_cluster3_1.pdb.apbs=84.513 [1]ECHA_Y271_RX-->OUT_cluster3_2.pdb.apbs=63.003 [1]ECHA_Y271_RX-->OUT_cluster3_3.pdb.apbs=69.739 [1]ECHA_Y271_RX-->OUT_cluster3_4.pdb.apbs=43.028 [1]ECHA Y271 RX-->OUT cluster4 1.pdb.apbs=-15.042 [1]ECHA Y271 RX-->OUT cluster4 2.pdb.apbs=23.322 [1]ECHA_Y271_RX-->OUT_cluster4_3.pdb.apbs=36.057 [1] ECHA_Y271_RX --> OUT_cluster4_4.pdb.apbs = 0.457



Figura 4.22. Acomplamiento molecular de la PtpA con la ECHA. En (A) se muestra el modelo en diagrama de cintas de la interacción propuesta entre PtpA (rosa) y TFP_{EGA} (celeste), a través de la Tyr271 de ECHA y el sitio activo de PtpA. Se muestra ampliada la región de interacción detallando los residuos relevantes (Cys11 de PtpA y la Tyr271 de TFP_{EGA}) involucrados en dicha interacción. En (B) se indica la estructura de la TFP_{EGA} mitocondrial, indicando la hélice 10 de la TFP_{EGA} y el residuo de Tyr271 que sería desfosforilado, situado en la hélice-10 reportada como relevante para la interacción con la membrana mitocondrial [Xia et al., 2019].

Es interesante resaltar que la Tyr271 se encuentra en la hélice 10 de TFP_{ECHA}, que se describió como importante tanto para el anclado de la proteína a la membrana mitocondrial como para la formación de un canal entre los sitios activos de la enzima, y por tanto relevante para la actividad [Xia et al., 2019] (Figura 4.22B). Por otro lado un análisis de secuencias realizado por nuestro grupo mostró que dicha tirosina y hélice no se encuentran en los ortólogos micobacterianos del complejo TB, al cual pertenecen tanto Mtb como M. bovis. De hecho, se pudo observar que la tirosina y dicha hélice están ausentes en bacterias y están presentes únicamente en eucariotas complejos dentro de los cordados (artículo en revisión en Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, sección Bacteria and Host, 2022, del cual soy co-autora). Esto sugiere que PtpA podría actuar de forma específica sobre la TFP_{ECHA} eucariota y no sobre su homólogo bacteriano. A su vez podría estar reflejando un nivel de regulación propio de organismos más complejos como los mamíferos. Otro aspecto interesante es que, si bien nuestro grupo también ha demostrado que la TFP_{ECHA} presenta fosforilación en tirosina, no se sabe aún el rol de esta modificación postraduccional en la actividad o localización subcelular de la proteína. Todo esto nos motiva a seguir estudiando estos aspectos aún no resueltos. Estos ensayos fueron repetidos y refinados por F. Herrera, incluyendo resultados de dinámica Molecular y fueron incluidos en el manuscrito en revisión.



5. Conclusión y perspectivas

Con respecto al objetivo 1, podemos decir que se intentó introducir la fosfatasa bacteriana PtpA mediante en monocitos humanos o macrófagos humanos mediante: (i) transducción con un vector viral tipo amplicón portando varias copias del gen de la PtpA, (ii) transfección con el plásmido pHSV portando el gen de la PtpA y (iii) introducción directa de la PtpA recombinante (rPtpA) porpinocitosis.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos podemos concluir que de las 3 estrategias aplicadas, la más promisoria fue la pinocitosis. Además, se definió en el modelo de pinocitosis una ventana de tiempo de 3 h en la cual se pudo evaluar si existían cambios a nivel del metabolismo energético en los macrófagos, que pudieran ser mediados por la fosfatasa micobacteriana PtpA. Sin embargo, entendemos que la ventana de tiempo analizada en estos ensayos es muy corta y no sería la más conveniente para ver cambios a nivel mitocondrial. Además, en un futuro sería interesante repetir los experimentos para determinar inequívocamente si PtpA está o no involucrado en cambios en la acidificación del medio de cultivo de las células THP-1. Nuestro grupo cuenta con extractos proteicos de estos ensayos de pinocitosis, en los cuales se evaluará el nivel de fosforilación de los distintos candidatos a sustrato de PtpA, mediante 2D-PAGE asociado a WB con el anticuerpo anti P-Tyr y análisis por MS.

Por otra parte, sería interesante realizar los ensayos de consumo de oxígeno y acidificación

extracelular a tiempos más largos luego de la incorporación de Ptpa en la células. Para ello, sería importante desarrollar una estrategia experimental alternativa a la pinocitosis, como puede ser el uso de un vector viral diferente al utilizado. En este sentido puede ser interesante utilizar lentivirus o adenovirus, que permiten generar líneas estables e inducibles para el gen de interés [Rauschhuber et al., 2012]. También puede ser bueno utilizar un plásmido con una resistencia a algún antibiótico para células eucariotas, que nos permita seleccionar las células portadoras de Ptpa. Otra posibilidad sería poner a punto el modelo de infección con una cepa de *Mtb* portadora de Ptpa-wt y mutante en la cisteína catalítica.

Con respecto a los vectores virales generados en esta tesis, tanto el control cómo el portador del gen de la PtpA salvaje o inactiva, se reservarán para ensayos futuros que no necesiten un alto porcentaje de transducción. Podrán ser utlizados, por ejemplo, para evaluar mediante inmunocitoquímica la localización subcelular de alguno de los candidatos a sustrato o para detectar la PtpA dentro de las células eucariotas. Los esfuerzos del grupo para concentrar el vector el vector viral en pequeños volúmenes para poder utilizarlos en los ensayos en placa, alcanzando la MOI deseada, han continuado en el marco de la tesina de grado de Sebatián Vigo.

Con respecto al objetivo 2, que consitió en obtener el mutante Δ PtpA en la cepa virulenta *Mycobacterium tuberculosis*, para evaluar el rol de PtpA durante la infección. Podemos decir que fue exitoso ya que se obtuvo el mutante, pero resta obtener el complementante para futuros ensayos de infección que serán realizados en el laboratorio P3 del IBR en colaboración con la Dra. G. Gago. Además, en esta pasantía adquirí los conocimientos de mutagénesis de micobacterias que posibilitaron iniciar en Uruguay la obtención del mutante en PtpA en la cepa vacunal de *M.bovis* BCG. Esto es importante para el grupo porque trabajar con la cepa vacunal *M.bovis* BCG requiere un Nivel II de bioseguridad (disponible en FCIEN) y no Nivel III como se requiere para *Mtb* (ausente en Montevideo). Cabe señalar que la PtpA de dicha cepa de *M. bovis* es idéntica a la PtpA de *Mtb* y al igual que en *Mtb*, se ha demostrado que esta alcanza el citosol durante la infección, e incluso el núcleo [Wang et al, 2017].

Con respecto al objetivo 3 de caracterizar la interacción *in silico* de PtpA con alguno de los candidatos a sustrato, se logró determinar cuál podría ser la tirosina de la TFP_{ECHA} blanco de PtpA. Posteriormente F. Herrera realizó simulaciones de dinámica molecular del sistema ECHA-PtpA, utilizando la herramienta bioinformática AMBER, y considerando a la tirosina

85

271 en su estado fosforilado. Estos resultados sugieren que la interacción entre TFP_{ECHA} y la PtpA a través de la Tyr271 es posible y es estable, observándose incluso como la fluctuación de los residuos catalíticos de la PtpA como el Asp126 se estabilizan cuando interaccionan con dicha tirosina fosforilada de TFP_{ECHA}.

En resumen en éste trabajo se pusieron a punto varios métodos y herramientas que podrán ser utilizados por el grupo para el estudio del rol de la Ptpa en durante la infección del *Mtb* a células eucariotas, en particular monocitos y macrófagos. Además, se obtuvieron stocks del plásmido HSV-1-IRES-PtpA-C11S, las proteínas recombinantes rPtpa-wt, rPtpa-C11S y EGFP, el anticuerpo anti-PtpA, semillas de los cultivos de células utilizados (THP-1 y Hela), y extractos proteicos de los macrófagos en los cuales se realizó la pinocitosis. Con las pasantías realizadas se logró un buen intercambio de conocimientos y experiencias fortaleciendo el vínculo entre los distintos grupos de investigación.

Finalmente, los resultados obtenidos se difundieron en seminarios y congresos y se realizaron actividades de divulgación (ver Anexo Divulgación).

6. ANEXO DIVULGACIÓN

2 Se difundieron los resultados en congresos y seminarios nacionales

Se presentaron dos trabajos en formato poster en el II Congreso Nacional de Biociencias del 2019 y el resumen de estos se publicó online en el libro de resúmenes.

- Avances para el estudio del rol de la PtpA de Mycobacterium tuberculosis en el metabolismo energético de células eucariotas (Resumen#298). Vivian Irving, Ana Ferreira, Celia Quijano y Andrea Villarino.
- Infección de macrófagos humanos con Mycobacterium bovis BCG para la evaluación de cambios en el metabolismo celular (Resumen#183)<u>Tania García</u>, Vivian Irving, Andrea Villarino.

Se presentó un trabajo en formato poster en el III Congreso Nacional de Biociencias del 2022 y el resumen de estos se publicó online en el libro de resúmenes

Interacción y actividad de la fosfatasa PtpA de Mycobacterium tuberculosis con la proteína trifuncional humana, una enzima clave en la oxidación de los lípidos en la mitocondria. Herrera Fernando; <u>Margenat Mariana</u>; Irving Vivian; García Tania; Betancour Gabriela; Villarino Andrea

Se presentó un trabajo en formato poster en el EMBO Workshop on Tuberculosis 2022, Institut Pasteur de Paris.

- Understanding the eukaryotic pathways modulated by mycobacterial phosphatases: *Mtb*-PtpA interaction and activity on human TFPα, a key enzyme of host-lipid metabolism. F.E. Herrera1, V. Irving, M. Margenat, T. García-Cedrés, C. Quijano, <u>A. Villarino</u>
- Se realizaron dos seminarios por parte de la responsable del proyecto, uno en el IIBCE (30 de Octubre de 2019) y otro en el CENUR de Paysandú (20 DE Agosto 2019), titulado Vías de Señalización Eucariota moduladas por fosfatasas de patógenos intracelulares. A su vez presenté mis resultados en el ciclo de seminarios de la Sección de Bioquímica Diciembre 2019.

Desde el año 2019 se trabaja en colaboración con el grupo creador de "ComicBacterias, Microbiología para grandes y chicos"; generando material de difusión por medio de caricaturas, trípticos con información y juegos. A lo largo de la tesis pudieron conocer la primer historieta generada por el grupo, "El plan de la tuberculosis". Aquídejo otros materiales desarrollados con el mismo propósito.

GUIÓN E ILUSTRACIÓN: Alejandro Rodríguez Juele y Nicolás Peruzzo.

MATERIAL CIENTÍFICO/TÉCNICO: Andrea Villarino, Mariana Margenat, Vivian Irving, Tania García, Ana MaríaFerreira.

ADAPTACIÓN: Daniela Arredondo, Valentina Carrasco, María José González y Paola Scavone.







En Agosto 2018 en la Feria Latitud Ciencias, organizada por la Facultad de Ciencias en el Atrio de la IMM se realizó la difusión a la ciudadanía del problema nacional que existe con la enfermedad Tuberculosis. En la misma se presentó durante dos días un stand informativo e interactivo, sobre prevención y tratamiento de la Tuberculosis, así como la participación en una entrevista televisiva realizada durante dicho evento. Se adjunta del afiche generado y fotos del stand.



En la Facultad de Ciencias tratamos de entender cómo esta bacteria logra vivir dentro de nuestras células

ESTUDIANDO LA INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS DE LA BACTERIA CON PROTEÍNAS HUMANAS Y LOS EFECTOS QUE ESTO CAUSA EN NUESTRAS CÉLULA.



EVALUANDO EL DESARROLLO DE HERRAMIENTAS DE DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN ACTIVA POR MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS.



En Febrero 2019 con motivo del día de la mujer y la niña en la ciencia, se realizó en la Facultad de Ciencias una muestra de las actividades de investigación, en nuestro caso implicó la difusión a la ciudadanía del problema nacional que existe con la enfermedad Tuberculosis. En la misma se presentó durante dos días un stand informativo e interactivo, sobre prevención y tratamiento de la Tuberculosis. Se adjunta fotos del stand mostrando a los estudiantes vinculados al proyecto difundiendo la necesidad de prevenir la tuberculosis y el trabajo con el factor de





virulencia PtpA.



7. Bibliografía

- Ackermann, M., Kubitza, M., Hauska, G. and Piña, A. L. (2014). The vertebrate homologue of sulfide-quinone reductase in mammalian mitochondria. Cell and tissue research, 358(3),779-792.
- Bach, H., Papavinasasundaram, K. G., Wong, D., Hmama, Z. and Av-Gay, Y. (2008). Mycobacterium tuberculosis virulence is mediated by PtpA dephosphorylation of human vacuolar protein sorting 33B. Cell host and microbe, 3(5), 316-322.
- Bahal, R. K., Mathur, S., Chauhan, P. and Tyagi, A. K. (2018). An attenuated quadruple gene mutant of Mycobacterium tuberculosis imparts protection against tuberculosis in guinea pigs. Biology open, 7(1), bio029546.
- Balganesh, T. S., Alzari, P. M. and Cole, S. T. (2008). Rising standards for tuberculosis drug development. Trends in pharmacological sciences, 29(11), 576-581.
- Bambacioni, F., Casati, C., Serafini, M., Manganini, M., Golay, J. and Introna, M. (2001). Lentiviral vectors show dramatically increased efficiency of transduction of human leukemic cell lines. Haematologica, 86(10), 1095-1096.
- Barrera Ramírez, L., Serrano, D., Elisa, M., Pérez Ramos, J, Espuñes, S., del Rosario, T., and Mendoza Pérez, F. E. L. I. P. E. (2004). Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, 17(1), 42-55.
- Beke-Somfai, T., Lincoln, P., and Nordén, B. (2013). Rate of hydrolysis in ATP synthase is fine-tuned by α-subunit motif controlling active site conformation. Proceedings of the National Academy of Sciences, 110(6), 2117-2122.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of

microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 72(1-2), 248-254.

- Brand, M.D. and Nicholls, D.G. (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells.
 Biochemical Journal, 435(2), 297-312.
- Cai, G. Z., Callaci, T. P., Luther, M. A. and Lee, J. C. (1997). Regulation of rabbit muscle phosphofructokinase by phosphorylation. Biophysical chemistry, 64(1-3), 199-209.
- Cambier, C. J., Falkow, S. and Ramakrishnan, L. (2014). Host evasion and exploitation schemes of Mycobacterium tuberculosis. Cell, 159(7), 1497-1509.
- Chatterjee, A., Pandey, S., Singh, P. K., Pathak, N. P., Rai, N., Ramachandran, R. and Srivastava, K. K. (2015). Biochemical and functional characterizations of tyrosine phosphatases from pathogenic and nonpathogenic mycobacteria: indication of phenyl cyclopropyl methyl-/phenyl butenyl azoles as tyrosine phosphatase inhibitors. Applied microbiology and biotechnology, 99(18), 7539-7548.
- Chauhan, P., Reddy, P. V., Singh, R., Jaisinghani, N., Gandotra, S. and Tyagi, A. K. (2013).
 Secretory phosphatases deficient mutant of Mycobacterium tuberculosis imparts protection at the primary site of infection in guinea pigs. PloS one, 8(10), e77930.
- Chiaradia, L. D., Martins, P. G. A., Cordeiro, M. N. S., Guido, R. V. C., Ecco, G., Andricopulo, A. D., and Terenzi, H. (2012). Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of chalcone derivatives as potent inhibitors of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatases (PtpA and PtpB). Journal of medicinal chemistry, 55(1), 390-402.
- Coelho, W. S., Costa, K. C. and Sola-Penna, M. (2007). Serotonin stimulates mouse skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase through tyrosine-phosphorylation of the enzyme altering its intracellular localization. Molecular genetics and metabolism, 92(4), 364-370.
- Coelho, W. S. and Sola-Penna, M. (2013). Serotonin regulates 6-phosphofructo-1- kinase activity in a PLC–PKC–CaMK II-and Janus kinase-dependent signaling pathway. Molecular and cellular biochemistry, 372(1), 211-220.
- Cooper, C. E. and Brown, G. C. (2008). The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance. Journal of bioenergetics and biomembranes, 40(5),533-539.

- Correa, A., Ortega, C., Obal, G., Alzari, P., Vincentelli, R. and Oppezzo, P. (2014). Generation of a vector suite for protein solubility screening. Frontiers in microbiology, 5, 67.
- Cowley, S. C., Babakaiff, R. and Av-Gay, Y. (2002). Expression and localization of the Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase PtpA. Research in microbiology, 153(4), 233-241.
- Cumming, B. M., Addicott, K. W., Adamson J. H., and Steyn, A. J. (2018). Mycobacterium tuberculosis induces decelerated bioenergetic metabolism in human macrophages. Elife, 7,e39169.
- Czikora, I., Kim, K. M., Kása, A., Bécsi, B., Verin, A. D., Gergely, P. and Csortos, C. (2011). Characterization of the effect of TIMAP phosphorylation on its interaction with protein phosphatase 1. Biochimie, 93(7), 1139-1145.
- Daffé, M. and Draper, P. (1997). The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. Advances in microbial physiology, 39, 131-203.
- Daniel, J., Maamar, H., Deb, C., Sirakova, T. D. and Kolattukudy, P. E. (2011). Mycobacterium tuberculosis uses host triacylglycerol to accumulate lipid droplets and acquires a dormancy-like phenotype in lipid-loaded macrophages. PLoS pathogens, 7(6), e1002093.
- Denu, J. M., Stuckey, J. A., Saper, M. A., and Dixon, J. E. (1996). Form and function in protein dephosphorylation. Cell, 87(3), 361-364.
- Di Pancrazio, F., Bisetto, E., Alverdi, V., Mavelli, I., Esposito, G. and Lippe, G. (2006). Differential steady-state tyrosine phosphorylation of two oligomeric forms of mitochondrial F0F1ATPsynthase: A structural proteomic analysis. Proteomics, 6(3), 921-926.
- Diefenbach, Russell J, Cornel Fraefel, and Anthony LCunningham. (2014). The Interaction of HSV-1 Tegument Proteins PUL36 and PUL37: A Novel Target for Antivirals That Inhibit Viral Assembly. Future Virology, 9(9), 787–789.
- Weissenbacher M, Dr Salvatella R, and M. H. (s. f.). (2022). Sindicato Médico del Uruguay. http://www.smu.org.uy/publicaciones/rmu/1998v1/h-weiss.htm
- Eaton, S., Bursby, T., Middleton, B., Pourfarzam, M., Mills, K., Johnson, A. W. and Bartlecc, K. (2000). The mitochondrial trifunctional protein: centre of a β-oxidation metabolon?. Biochemical Society Transactions, 28(2), 177-182.

- Evans, P. R., Farrants, G. and Hudson, P. J. (1981). Phosphofructokinase: structure and control. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences, 293(1063), 53-62.
- Fatima, S., Kumari, A., Das, G. and Dwivedi, V. P. (2020). Tuberculosis vaccine: A journey from BCG to present. Life sciences, 252, 117594.
- Filipovic, M. R., Miljkovic, J., Allgäuer, A., Chaurio, R., Shubina, T., Herrmann, M. and Ivanovic-Burmazovic, I. (2012). Biochemical insight into physiological effects of H2S: reaction with peroxynitrite and formation of a new nitric oxide donor, sulfinyl nitrite. Biochemical Journal, 441(2),609-621.
- Gilmore, K. J., H. E. Quinn, and M. R. Wilson. (2001). Pinocytic Loading of Cytochrome c into Intact Cells Specifically Induces Caspase-Dependent Permeabilization of Mitochondria: Evidence for a Cytochrome c Feedback Loop. Cell Death and Differentiation 8(6), 631–639.
- Glaziou, P., Falzon, D., Floyd, K. and Raviglione, M. (2013). Global epidemiology of tuberculosis. In Seminars in respiratory and critical care medicine 34(1), 003-016, Thieme Medical Publishers.
- Gleeson, L. E., Sheedy, F. J., Palsson-McDermott, E. M., Triglia, D., O'Leary, S. M., O'Sullivan, M. P.and Keane, J. (2016). Cutting edge: Mycobacterium tuberculosis induces aerobic glycolysis in human alveolar macrophages that is required for control of intracellular bacillary replication. The Journal of Immunology, 196(6), 2444-2449.
- Goubern, M., Andriamihaja, M., Nübel, T., Blachier, F. and Bouillaud, F. (2007). Sulfide, the first inorganic substrate for human cells. The FASEB Journal, 21(8), 1699-1706.
- Harrahy, J. J., Malencik, D. A., Zhao, Z., Hisaw, F. L. and Anderson, S. R. (1997). Identification of a new phosphorylation site in cardiac muscle phosphofructokinase. Biochemical and biophysical research communications, 234(3), 582-587.
- Hobiger, K. and Friedrich, T. (2015). Voltage sensitive phosphatases: emerging kinship to protein tyrosine phosphatases from structure-function research. Frontiers in pharmacology, 6,20.
- Houben, D., Demangel, C., Van Ingen, J., Perez, J., Baldeón, L., Abdallah, A. M., and Peters, P. J. (2012). ESX-1-mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria. Cellular microbiology, 14(8), 1287-1298.
- Comisión Honoraria para la Lucha Antituberculosa y Enfermedades Prevalentes. Informe

Nacional de la Situación de la Tuberculosis en Uruguay (2021). https://chlaep.org.uy/programa-nacional-de-control-de-tuberculosis/estadisticas/

- Instituto Nacional de Seguridad y salud en el Trabajo (INSST), 2021. (s. f.). Fichas de agentes biológicos. https://www.insst.es/agentes-biologicosbasebio/bacterias/mycobacterium-tuberculosis
- Jamwal, S., Midha, M. K., Verma, H. N., Basu, A., Rao, K. V. and Manivel, V. (2013). Characterizing virulence-specific perturbations in the mitochondrial function of macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis. Scientific reports, 3(1), 1-10.
- Jonckheere, A. I., Smeitink, J. A. and Rodenburg, R. J. (2012). Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. Journal of inherited metabolic disease, 35(2), 211-225.
- Kane, L. A. and Van Eyk, J. E. (2009). Post-translational modifications of ATP synthase in the heart: biology and function. Journal of bioenergetics and biomembranes, 41(2), 145-150.
- Kieser, K. J. and Rubin, E. J. (2014). How sisters grow apart: mycobacterial growth and division. Nature Reviews Microbiology, 12(8), 550-562.
- Kloos, M., Brüser, A., Kirchberger, J., Schöneberg, T. and Sträter, N. (2015). Crystal structure of human platelet phosphofructokinase-1 locked in an activated conformation. Biochemical Journal, 469(3), 421-432.
- Koul, A., Choidas, A., Treder, M., Tyagi, A. K., Drlica, K., Singh, Y. and Ullrich, A. (2000). Cloning and characterization of secretory tyrosine phosphatases of Mycobacterium tuberculosis. Journal of bacteriology, 182(19), 5425-5432.
- Koul, A., Arnoult, E., Lounis, N., Guillemont, J., and Andries, K. (2011). The challenge of new drug discovery for tuberculosis. Nature, 469(7331), 483-490.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 227(5259): 680–685.
- Lagoutte, E., Mimoun, S., Andriamihaja, M., Chaumontet, C., Blachier, F. and Bouillaud, F. (2010). Oxidation of hydrogen sulfide remains a priority in mammalian cells and causes reverse electron transfer in colonocytes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 1797(8), 1500-1511.
- Laval, T., Chaumont, L. and Demangel, C. (2021). Not too fat to fight: The emerging role of macrophage fatty acid metabolism in immunity to Mycobacterium tuberculosis.

Immunological Reviews, 301(1), 84-97.

- Leite, T. C., Coelho, R. G., Da Silva, D., Coelho, W. S., Marinho-Carvalho, M. M. and Sola-Penna, M. (2011). Lactate downregulates the glycolytic enzymes hexokinase and phosphofructokinase in diverse tissues from mice. FEBS letters, 585(1), 92-98.
- Madhurantakam, C., Rajakumara, E., Mazumdar, P. A., Saha, B., Mitra, D., Wiker, H. G., and Das, A. K. (2005). Crystal structure of low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase from Mycobacterium tuberculosis at 1.9-A resolution. Journal of bacteriology, 187(6), 2175-2181.
- Madhurantakam, C., Chavali, V. R. M., and Das, A. K. (2008). Analyzing the catalytic mechanism of MPtpA: A low molecular weight protein tyrosine phosphatase from Mycobacterium tuberculosis through site-directed mutagenesis. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 71(2), 706-714.
- Mandel, M., & Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection.
 Journal of molecular biology, 53(1), 159-162.
- Margenat, M., Labandera, A. M., Gil, M., Carrion, F., Purificaçao, M., Razzera, G., and Villarino, A. (2015). New potential eukaryotic substrates of the mycobacterial protein tyrosine phosphatase PtpA: hints of a bacterial modulation of macrophage bioenergetics state. Scientific reports, 5(1), 1-11.
- Margenat, M. (2016). Fosfatasas en tirosina de Mycobacterium tuberculosis : avances en la identificación de sustratos y posible rol en la adaptación de la bacteria al macrófago. Tesis de doctorado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias.
- Mascarello, A., Chiaradia, L. D., Vernal, J., Villarino, A., Guido, R. V., Perizzolo, P. and Terenzi, H. (2010). Inhibition of Mycobacterium tuberculosis tyrosine phosphatase PtpA by synthetic chalcones: kinetics, molecular modeling, toxicity and effect on growth. Bioorganic and medicinal chemistry, 18(11), 3783-3789.
- Mathieson, T., Franken, H., Kosinski, J., Kurzawa, N., Zinn, N., Sweetman, G., and Savitski,
 M. M. (2018). Systematic analysis of protein turnover in primary cells. Nature communications, 9(1), 1-10.
- Murphy, K. C., Papavinasasundaram, K. and Sassetti, C. M. (2015). Mycobacterial recombineering. In Mycobacteria Protocols 177-199. Humana Press, New York, NY.
- Poirier, V., Bach, H. and Av-Gay, Y. (2014). Mycobacterium tuberculosis promotes antiapoptotic activity of the macrophage by PtpA protein-dependent dephosphorylation

of host GSK3α. Journal of Biological Chemistry, 289(42), 29376- 29385.

- Okada, C.Y. and Rechsteiner, M. (1982). Introduction of Macromolecules into Cultured Mammalian Cells by Osmotic Lysis of Pinocytic Vesicles. Cell 29(1): 33–41.
- Olson, Bradley J.S.C., and Markwell, J. (2007). Assays for Determination of ProteinConcentration. CurrentProtocols in Protein Science 48(1), 3.4.1-3.4.29.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Reporte Tuberculosis (2021) (www.who.int).
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Reporte Tuberculosis (2015). http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf?ua=1
- Protein Data Bank(<u>https://www.rcsb.org/</u>)
- Porath, J. (1992). Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography. Protein Expression and Purification 3(4), 263–281.
- Purificação, M. (2013). Identificação de Potenciais Substratos de PTPA, Tirosina-Fosfatase de Mycobacterium Tuberculosis._
 <u>http://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/103214</u>
- Rauschhuber, C., Noske, N. and Ehrhardt, A. (2012). New insights into stability of recombinant adenovirus vector genomes in mammalian cells. European journal of cell biology, 91(1),2-9
- Rodríguez, L. (2012). Estudio de potenciales inhibidores de la única fosfatasa en tirosina de Mycobacterium tuberculosis: PtpA y PtpB. Tesis de grado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias.
- Russell, D. G. (2001). Mycobacterium tuberculosis: here today, and here tomorrow. Nature reviews Molecular cell biology, 2(8), 569-578.
- Saeki, Y., C. Fraefel, T. Ichikawa, X. O. Breakefield, and E. A. Chiocca. (2001). Improved Helper Virus-Free Packaging System for HSV Amplicon Vectors Using an ICP27-Deleted, Oversized HSV-1 DNA in a Bacterial Artificial Chromosome. Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy 3(4), 591–601.
- Savalas, L. R. T., Furqon, B. R. N., Asnawati, D., Sedijani, P., Hadisaputra, S., Ningsih,
 B. N. S., and Syahri, J. (2020). Cis-2 and trans-2-eisocenoic fatty acids are novel inhibitors for Mycobacterium tuberculosis Protein tyrosine phosphatase A. Acta Biochimica Polonica, 67(2), 219-223.
- Schöneberg, T., Kloos, M., Brüser, A., Kirchberger, J. and Sträter, N. (2013). Structure and

allosteric regulation of eukaryotic 6-phosphofructokinases. Biological Chemistry, 394(8), 977-993.

- Sens, L., de Souza, A. C. A., Pacheco, L. A., Menegatti, A. C. O., Mori, M., Mascarello, A., and Terenzi, H. (2018). Synthetic thiosemicarbazones as a new class of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase A inhibitors. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 26(21), 5742-5750.
- Shi, R., Itagaki, N. and Sugawara, I. (2007). Overview of anti-tuberculosis (TB) drugs and their resistance mechanisms. Mini reviews in medicinal chemistry, 7(11), 1177- 1185.
- Shin, J. H., Yang, J. Y., Jeon, B. Y., Yoon, Y. J., Cho, S. N., Kang, Y. H., and Hwang, G. S. (2011). 1H NMR-based metabolomic profiling in mice infected with Mycobacterium tuberculosis. Journal of proteome research, 10(5), 2238-2247.
- Somashekar, B. S., Amin, A. G., Rithner, C. D., Troudt, J., Basaraba, R., Izzo, A., and Chatterjee, D. (2011). Metabolic profiling of lung granuloma in Mycobacterium tuberculosis infected guinea pigs: ex vivo 1H magic angle spinning NMR studies. Journal of proteome research, 10(9), 4186-4195.
- Somashekar, B. S., Amin, A. G., Tripathi, P., MacKinnon, N., Rithner, C. D., Shanley, C. A., and Chatterjee, D. (2012). Metabolomic signatures in guinea pigs infected with epidemicassociated W-Beijing strains of Mycobacterium tuberculosis. Journal of proteome research, 11(10),4873-4884.
- Stripecke, R., Cardoso, A. A., Pepper, K. A., Skelton, D. C., Yu, X. J., Mascarenhas, L., and Kohn, D. B. (2000). Lentiviral vectors for efficient delivery of CD80 and granulocyte-macrophage–colony-stimulating factor in human acute lymphoblastic leukemia and acute myeloid leukemia cells to induce antileukemic immune responses. Blood, , The Journal of the American Society of Hematology, 96(4), 1317-1326.
- Sullivan, J. T., Young, E. F., McCann, J. R. and Braunstein, M. (2012). The Mycobacterium tuberculosis SecA2 system subverts phagosome maturation to promote growth in macrophages. Infection and immunity, 80(3), 996-1006
- Kusumawati, A., Commes, T., Liautard, J. P. and Widada, J. S. (1999). Transfection of myelomonocytic cell lines: cellular response to a lipid-based reagent and electroporation. Analytical biochemistry, 269(1), 219-221.
- VanKessel, JuliaC., and Graham F. Hatfull. (2007). Recombineering in Mycobacterium Tuberculosis. Nature Methods 4(2), 147–152.

- Vigo, S. (2022). Estudio de la producción de vectores del virus herpes simple 1 tipo amplicón. Tesis de grado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias.
- Vogelnest, L. (2013). Tuberculosis: an emerging zoonosis. NSW Public Health Bull, 24(1), 32-3.
- Wang, S., Tabernero, L., Zhang, M., Harms, E., Van Etten, R. L. and Stauffacher, C. V. (2000). Crystal structures of a low-molecular weight protein tyrosine phosphatase from Saccharomyces cerevisiae and its complex with the substrate p-nitrophenyl phosphate. Biochemistry, 39(8),1903-1914.
- Wang, J., Li, B. X., Ge, P. P., Li, J., Wang, Q., Gao, G. F., and Liu, C. H. (2015). Mycobacterium tuberculosis suppresses innate immunity by coopting the host ubiquitin system. Nature immunology, 16(3), 237-245.
- Wang, J., Teng, J. L., Zhao, D., Ge, P., Li, B., Woo, P. C. and Liu, C. H. (2016). The ubiquitin ligase TRIM27 functions as a host restriction factor antagonized by Mycobacterium tuberculosis PtpA during mycobacterial infection. Scientific reports, 6(1), 1-13.
- Wang, J., Ge, P., Qiang, L., Tian, F., Zhao, D., Chai, Q., and Liu, C. H. (2017). The mycobacterial phosphatase PtpA regulates the expression of host genes and promotes cell proliferation. Nature communications, 8(1), 1-16.
- Wong, D., Bach, H., Sun, J., Hmama, Z. and Av-Gay, Y. (2011). Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H+–ATPase to inhibit phagosome acidification. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(48), 19371-19376.
- Wong, D., Chao, J. D. and Av-Gay, Y. (2013). Mycobacterium tuberculosis-secreted phosphatases: from pathogenesis to targets for TB drug development. Trends in microbiology, 21(2), 100-109.
- Xia, C., Fu, Z., Battaile, K. P. and Kim, J. J. P. (2019). Crystal structure of human mitochondrial trifunctional protein, a fatty acid β-oxidation metabolon. Proceedings of the National Academy of Sciences, 116(13), 6069-6074.
- Jo, J. I., and Tabata, Y. (2008). Non-viral gene transfection technologies for genetic engineering of stem cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 68*(1), 90-104.Yousefi-Avarvand, A., Tafaghodi, M., Soleimanpour, S. and Khademi, F. (2018). HspX protein as a candidate vaccine against Mycobacterium tuberculosis: an overview.

Frontiers in Biology, 13(4), 293-296.

- Zancan, P. and Sola-Penna, M. (2005). Regulation of human erythrocyte metabolism by insulin: cellular distribution of 6-phosphofructo-1-kinase and its implication for red blood cell function. Molecular genetics and metabolism, 86(3), 401-411.
- Zhang, M., Zhou, M., Van Etten, R. L. and Stauffacher, C. V. (1997). Crystal structure of bovine low molecular weight phosphotyrosyl phosphatase complexed with the transition state analog vanadate. Biochemistry, 36(1), 15-23.
- Zhang, M., Stauffacher, C. V., Lin, D. and Van Etten, R. L. (1998). Crystal structure of a human low molecular weight phosphotyrosyl phosphatase: implications for substrate specificity. Journal of Biological Chemistry, 273(34), 21714-21720.
- Zotter, A., Bäuerle, F., Dey, D., Kiss, V., and Schreiber, G. (2017). Quantifying enzyme activity in living cells. Journal of Biological Chemistry, 292(38), 15838-15848.