



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

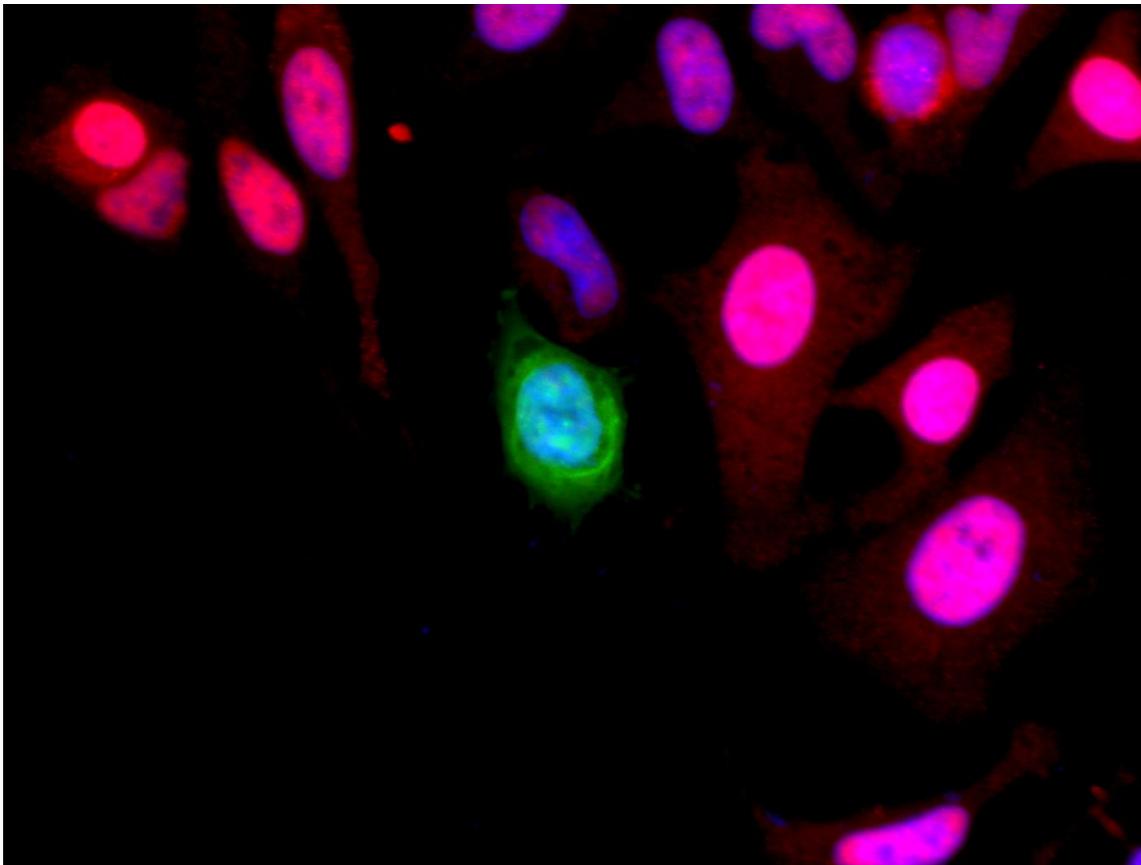
Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

PEDECIBA

Sub-área: Biología Celular y Molecular



***Expresión en células HeLa de la única fosfatasa  
de fosfo-tirosina del virus Orf: hacia la  
validación de interactores***



**Lic. Darío Porley**

Orientadora: Dra. Mabel Berois

Co-Orientadora: Dra. Andrea Villarino

Sección Virología - Sección Bioquímica  
Facultad de Ciencias, Universidad de la República  
Montevideo, 2017

## Agradecimientos

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación, PEDECIBA y a ECOS-Sud, por el apoyo económico otorgado.

A las Dras. Mabel Berois y Andrea Villarino, por aceptarme como estudiante de maestría y enseñarme sobre esta profesión más de lo que puedo agradecer en este apartado.

A la Dra. Gwenaëlle André-Leroux, por recibirme en París en mi primera experiencia en Europa, por su gran contribución a este trabajo y por no desesperar con los eventos de “Lucky Guy”.

A los integrantes del tribunal evaluador, el Dr. Otto Pritsch y las Dras. Ana Ramón y Pilar Moreno por dedicar parte de su valioso tiempo en la corrección de esta tesis.

Al Dream Team de sistemas del MaIAGE, sin los cuales la realización de los experimentos *in-silico* tampoco hubiera sido imposible.

A la Dra. Mariana Margenat, por su ayuda y buena disposición para realizar los experimentos de substrate trapping.

Al MSc. Danilo Segovia por su ayuda con la producción recombinante de la OH1-C112S.

A la Dra. Fernanda Domínguez por su buena onda y tremenda ayuda con los experimentos de citometría.

A la M.Sc. Marcela Díaz y Tabaré de los Campos, por su gran aporte con la adquisición y procesamiento de imágenes de microscopía de epifluorescencia.

A la Dra. Madelón Portela, por ayuda con el procesado de datos de MALDI-TOF-TOF MS/MS.

Al gran grupo humano que componen la Sección Virología y la 314 de la Sección Bioquímica, cuyos integrantes hicieron del día a día un gusto ir a trabajar.

A la gentuza de la facultad, a Santiago, Vivi y en especial a Aldana, por permitirme el placer de sacarle canas verdes todos los días.

A los amigos que están siempre. En particular a las Águilas, Tuca y Chochay. Amigos desde que conozco el significado de la palabra.

A mi familia, sin los cuales nada de esto sería posible. A ustedes va dedicada esta tesis.

## Resumen

El virus Orf (género *Parapoxvirus*, familia *Poxviridae*) es el responsable del Ectima Contagioso, una enfermedad zoonótica de gran importancia económica que afecta principalmente ovinos. Las reinfecciones con dicho virus son frecuentes donde la expresión de factores de virulencia que permiten evadir el sistema inmune tiene un rol esencial. Entre estos factores se encuentra la fosfatasa en tirosina del Virus Orf (OH1), la cual ha sido sugerida como la enzima responsable de desfosforilar el factor de transcripción STAT1 de la vía JAK/STAT, importante en la respuesta inmunitaria mediada por interferón. En la presente tesis se buscó profundizar en el estudio de OH1, buscando mayores evidencias que apoyen que STAT1 es uno de sus sustratos eucariotas. Para ello evaluamos *in vitro* y a nivel celular, si OH1 interacciona con STAT1, si la actividad de OH1 altera el nivel de fosforilación de STAT1 y su translocación al núcleo. Para ello, se utilizó las formas recombinantes de OH1 salvaje y el mutante inactivo OH1-C112S. Este último constituye también una herramienta para aislar potenciales nuevos sustratos. Utilizando el mismo se logró aislar a STAT1, siendo esta la primera evidencia de la formación de un complejo entre ambas proteínas. Cuando se introdujo la actividad OH1 en células HeLa, mediante una estrategia clásica y otra que consiste en el uso de un vector herpético de tipo amplicón, demostramos en este contexto celular que OH1 salvaje como mutante afecta la translocación de STAT1, lo que apoya la formación de un complejo entre ambas proteínas. Además corroboramos que todo esto correlaciona, con un efecto de OH1 en la disminución de la fosforilación en la Tyr701 de STAT1. Todos los resultados permiten proponer a OH1 como sustrato eucariota de STAT1, apoyando la hipótesis de que OH1 es un factor de virulencia importante para el OrfV. Por último, englobando estos resultados y los obtenidos mediante ensayos *in silico* de acoplamiento molecular se propuso un mecanismo de formación del complejo OH1/STAT1, en el cual OH1 por medio de una Tyr fosforilada reclutaría a STAT1 a través del dominio SH2. De esta manera se estabilizaría la conformación antiparalela de STAT1, posicionando a OH1 de tal forma que es capaz de desfosforilar la Tyr 701. Teniendo en cuenta la conservación de los residuos implicados, este mecanismo podría representar al utilizado por los miembros de la sub-familia viral a la que pertenece el OrfV, e incluso por otras fosfatasas de especificidad dual. Por último, en base a los experimentos *in vitro* de aislamiento de interactores identificamos a actinas, tubulinas y la proteína GAPDH como potenciales nuevos interactores de OH1, todas ellas fosforiladas en diferentes tirosinas. La GAPDH es un candidato interesante ya que además de vincularse con el metabolismo energético, participa también en el tráfico vesicular, la dinámica del citoesqueleto y la respuesta inmune mediada por interferón. Por lo cual podría ser un blanco interesante del OrfV, teniendo en cuenta el complejo ciclo replicativo de los poxvirus.

# Índice

<b>Agradecimientos</b> .....	<b>2</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>3</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1. Biología del virus Orf y el Ectima contagioso</b> .....	<b>7</b>
<b>1.2. El virus Orf y sus factores de virulencia</b> .....	<b>9</b>
<b>1.3. La fosfatasa OH1 del virus Orf y su rol en la respuesta inmunitaria</b> .....	<b>16</b>
<b>1.4. STAT1 como sustrato de fosfatasas de tirosina</b> .....	<b>21</b>
<b>2. Hipótesis planteada</b> .....	<b>26</b>
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1 Objetivo General</b> .....	<b>26</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>26</b>
<b>4. Materiales y Métodos</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1. Técnicas Generales</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1.1 Técnicas generales de biología molecular</b> .....	<b>27</b>
4.1.1.1 Obtención de células <i>E. coli</i> DH5- $\alpha$ electrocompetentes.....	27
4.1.1.2 Transformación de células <i>E. coli</i> DH5- $\alpha$ electrocompetentes .....	27
4.1.1.3 Transformación de células <i>E.coli</i> quimiocompetentes comerciales .....	28
4.1.1.4 Purificación de plásmidos.....	28
4.1.1.5 Electroforesis en geles de agarosa y purificación de fragmentos de interés.....	29
4.1.1.6 Cuantificación de ácidos nucleicos .....	29
<b>4.1.2 Técnicas generales de biología celular</b> .....	<b>29</b>
4.1.2.1 Cultivo de la línea celular Vero 2.2 .....	29
4.1.2.2 Cultivo de la línea celular HeLa.....	30
4.1.2.3 Inmunofluorescencia indirecta (IFI) .....	30
4.1.2.4 Obtención de extractos proteicos de células HeLa enriquecidos en fosfoproteínas .....	31
4.1.2.5 Evaluación de la viabilidad celular.....	31
<b>4.1.3 Técnicas generales de bioquímica de proteínas</b> .....	<b>32</b>

4.1.3.1 Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	32
4.1.3.2 Electrotransferencia e inmunodetección (western blot) .....	32
4.1.3.3 Producción recombinante de la fosfatasa OH1-C112S .....	34
4.1.3.4 Determinación de la concentración de proteínas .....	35
<b>4.2. Búsqueda de interactores eucariotas de OH1 mediante la técnica de Substrate Trapping (ST).....</b>	<b>36</b>
<b>4.3. Evaluación del efecto de OH1 en STAT1 en un modelo celular eucariota .</b>	<b>37</b>
<b>4.3.1 Expresión de OH1 en células HeLa .....</b>	<b>38</b>
4.3.1.1 Sistema de transducción con vectores basados en el virus Herpes Simple tipo 1 .....	38
4.3.1.1.1. Producción de vectores HSV1 portando los genes de interés .....	42
4.3.1.1.2. Transducción de células HeLa con los vectores HSV1 .....	43
4.3.1.2 Transfección de células HeLa con los plásmidos pHSV1 .....	44
<b>4.3.2 Evaluación del efecto de OH1 sobre la localización sub-celular de STAT1.....</b>	<b>45</b>
<b>4.3.3 Evaluación del efecto de OH1 sobre el nivel de fosforilación de STAT1 .....</b>	<b>45</b>
<b>4.4. Estudio <i>in-silico</i> de la interacción de OH1 con STAT1.....</b>	<b>46</b>
<b>4.4.1 Preparación de las estructuras utilizadas.....</b>	<b>46</b>
<b>4.4.2 Acoplamiento molecular .....</b>	<b>47</b>
<b>5. Resultados.....</b>	<b>50</b>
<b>5.1. Identificación de interactores eucariotas de OH1, entre ellos STAT1 .....</b>	<b>50</b>
<b>5.1.1 Purificación de OH1-C112S y obtención de extractos proteicos de células HeLa</b>	<b>50</b>
<b>5.1.2 Ensayo de ST e identificación de potenciales interactores de OH1 .....</b>	<b>52</b>
<b>5.2. OH1 afecta la localización sub-celular de STAT1.....</b>	<b>58</b>
<b>5.2.1. Introducción del gen de la fosfatasa viral OH1 en las células HeLa .....</b>	<b>59</b>
<b>5.2.2. Efecto de OH1 en la translocación de STAT1 al núcleo .....</b>	<b>63</b>
<b>5.3. OH1 afecta la fosforilación de STAT1 en la tirosina 701.....</b>	<b>66</b>
<b>5.4. Modelos de interacción <i>in silico</i> entre OH1 y STAT1.....</b>	<b>68</b>
<b>6. Discusión y conclusión .....</b>	<b>75</b>
<b>6.1 STAT1 como sustrato de OH1 .....</b>	<b>75</b>
<b>6.2 Otros interactores de OH1.....</b>	<b>81</b>
<b>7. Perspectivas .....</b>	<b>86</b>

<b>8. Bibliografía .....</b>	<b>87</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>96</b>
a) Abreviaciones. ....	96
b) Análisis por espectrometría de masas. ....	99
c) Resultados adicionales de los experimentos de acoplamiento molecular para el complejo OH1/STAT1. ....	102
d) Análisis de conservación de residuos de tirosina en la sub-familia <i>Chordopoxvirinae</i> y el género <i>Parapoxvirus</i> .....	104
f) Patrón de digestión con enzimas de restricción del plásmido pHSV1-IRES-EGFP .....	105

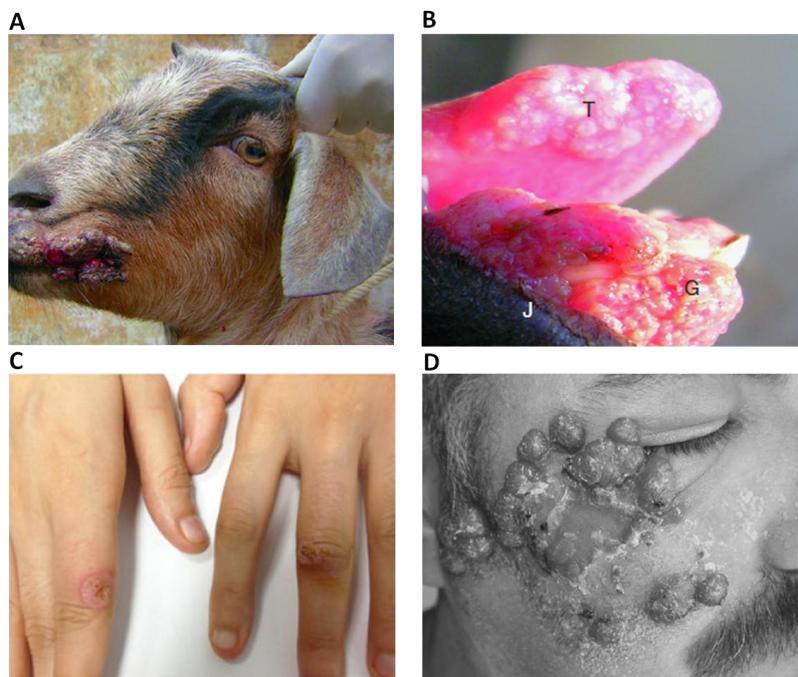
# 1. Introducción

## 1.1. Biología del virus Orf y el Ectima contagioso

El virus Orf (OrfV) es el agente etiológico del Ectima contagioso (EC), también conocido como dermatitis pustular contagiosa o simplemente Orf. El origen de este nombre no está claro, podría derivar del nórdico antiguo “hrüfa” que significa costra (describiendo el aspecto de las heridas causadas por el virus). Por otro lado, se plantea que puede proceder del inglés antiguo “orcwealm” que significa enfermedad del ganado, o “hwyorf” que indica a las especies bovinas [1], [2]. El EC se caracteriza por infectar principalmente a ovinos y caprinos siendo más susceptibles los individuos jóvenes. El EC es una infección proliferativa de la piel y mucosas, normalmente auto-limitante, que se resuelve en 6 a 8 semanas. Más específicamente, se suele desarrollar en la piel de los labios, la mucosa oral y alrededor de la fosa nasal de los individuos afectados. En animales lactantes se pueden observar este tipo de lesiones, así como en las ubres de sus madres. Las lesiones proliferativas suelen adoptar una forma de coliflor, comenzando en los labios, el hocico, las uniones muco-cutáneas, la fosa nasal, las encías y esparciéndose hacia los órganos internos como la lengua, incluso en la ausencia de dispersión sistémica (Figura 1-A, B). La pérdida de la integridad epitelial es el mayor factor de predisposición para la infección con OrfV y la erupción de los incisivos en animales jóvenes es suficiente para predisponerlo a contraer dicha enfermedad [3], [4]. El OrfV se replica principalmente en los queratinocitos epidérmicos en regeneración, las lesiones suelen comenzar como un eritema, que evoluciona a vesícula, luego pústula y por último en costra. Esta costra es rica en partículas virales y luego puede ser perdida por el animal y actuar como inoculante del ambiente donde se encuentra el individuo infectado [5]. Si bien la histopatología varía de acuerdo al estado clínico de la enfermedad, las características histopatológicas incluyen una degeneración y redondeo de los queratinocitos, incremento de la vascularización dérmica, vacuolización del núcleo y citoplasma así como también una variada infiltración inflamatoria constituida por linfocitos, histiocitos, neutrófilos y eosinófilos.

La enfermedad EC presenta una alta morbilidad y una baja tasa de mortalidad. Normalmente, la infección se propaga por contacto, de forma rápida, a través del rebaño y puede tener una prevalencia de hasta el 90% [4]. Una mayor tasa de mortalidad se debe a complicaciones asociadas a la enfermedad, como la incapacidad de los animales de alimentarse debido a lesiones orales e infecciones secundarias que acaban causando anorexia. Las infecciones secundarias pueden ser de origen bacteriano, fúngico o de gusanos y son secuelas normales del EC que aportan a la mortalidad [5]. La distribución geográfica exacta del OrfV es desconocida pero se

estima que está presente a nivel mundial [6], habiéndose detectado su presencia en rebaños a nivel regional [7], [8] y en el Uruguay por nuestro grupo de trabajo [9]. Además de afectar a ovinos y caprinos, el EC ha sido reportado en un amplio rango de especies, como camellos, gacelas, renos, el buey almizclero, el serau japonés e incluso gatos y perros [4], [10], [11]. De hecho, esta enfermedad es considerada una zoonosis, pudiendo infectar al ser humano [12]. Las poblaciones de riesgo en este caso son pastores, carniceros, trabajadores de mataderos, veterinarios y básicamente cualquier profesión donde exista la posibilidad de entrar en contacto directo con animales o fómites. Esto se debe a que el OrfV es extremadamente resistente en el ambiente, resiste al secado y congelado y permanece viable en el suelo durante meses o años. De esta manera los mismos edificios de la granja, el equipamiento contaminado, la lana, las cercas, los comederos, cuchillos y etiquetas auriculares entre otras cosas pueden funcionar como agentes transmisores de la enfermedad. Por ejemplo, en el Reino Unido, alrededor del 30% de los individuos que trabajan con ovejas han reportado infecciones con OrfV y anualmente se reporta al menos un brote en países donde existen poblaciones musulmanas, debido al incremento de sacrificio ritual de animales [5]. Si bien no existen reportes de la proporción de casos de EC que requieren hospitalización, suele ser benigno y en individuos inmuno-competentes se resuelve de forma espontánea luego de 3 a 6 semanas (Figura 1-C). Sin embargo, ha habido reportes de formas proliferativas atípicas llamadas Orf gigantes tanto en individuos inmuno-suprimidos como en inmuno-competentes (Figura 1-D) [4], [13].



**Figura 1- Lesiones causadas por el virus Orf.**

A-Imagen clínica de una lesión en la comisura oral de cabra adulta. B-Lesiones en la lengua (T) y en las encías (G) y mandíbula (J) que cubren totalmente los incisivos inferiores de una cabra de 1 semana de edad. C-Múltiples pápulas inflamadas con el centro necrótico de un paciente de 33 años. D-Forma atípica de Orf gigante en paciente de 41 años y sin inmuno-supresión aparente. Imagen adaptada de [4], [5], [14].

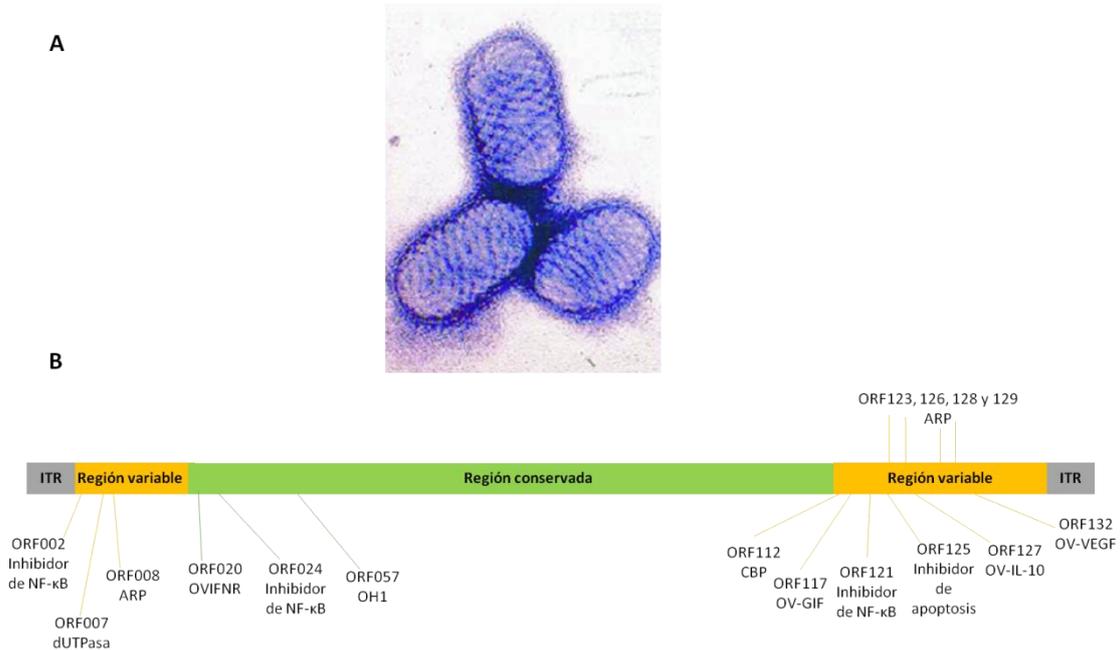
Existen vacunas contra el OrfV, pero estas son producidas en base a virus vivo atenuado por medio de múltiples pasajes en cultivo celular o *in-vivo*. Sin embargo, si bien estas vacunas limitan la severidad de la infección, no son capaces de generar una inmunidad a largo plazo y las reinfecciones por OrfV son comunes incluso en animales vacunados [5]. De hecho, se han reportado brotes de EC a partir de cepas vacunales [15].

Todas estas características hacen que su presencia en rebaños suponga pérdidas económicas importantes principalmente en la población rural que se dedica exclusivamente a la producción de pequeños rumiantes. De hecho, se encuentra dentro de las primeras 20 enfermedades de mayor impacto en países en desarrollo [12], [16].

## 1.2. El virus Orf y sus factores de virulencia

El OrfV pertenece al género *Parapoxvirus* de la sub-familia *Chordopoxvirinae*, dentro de la familia *Poxviridae* [17]. Esta familia ha sido la responsable de importantes pandemias, como fue el caso del virus de la Viruela (integrante del género *Orthopoxvirus*) en humanos [18]. Otros miembros del mismo género incluyen al virus de la estomatitis papilar bovina (BPSV), el virus pseudocowpox (PCPV) y el parapoxvirus del ciervo rojo en Nueva Zelanda. Los viriones de los parapoxvirus miden aproximadamente 260 nm de largo y 160 nm de ancho, tienen una forma ovoide característica y su superficie está cubierta por estructuras largas y tubulares cuya apariencia se asemeja a un ovillo de lana (Figura 2-A). Este es un virus envuelto cuya estructura interna consta de un “core” bicóncavo donde se empaqueta el genoma de ADN viral, este core está flanqueado a su vez por dos estructuras de composición proteica llamadas cuerpos laterales. Su genoma viral es de los más pequeños dentro de la familia *Poxviridae*, está compuesto de 140 kpb de ADN lineal de doble hebra, sus extremos se encuentran cerrados covalentemente y contienen repetidos invertidos terminales (ITRs) [10]. A diferencia de otros virus de su misma familia, los parapoxvirus tienen un genoma rico en G+C, llegando al 63-64% en OrfV, conteniendo 132 marcos de lectura abiertos. Figura 2-B muestra un esquema de la organización genómica de OrfV, característica de todos los poxvirus. En esta se destaca una región central altamente conservada donde se encuentran genes esenciales para la replicación y morfogénesis viral y en los extremos una región variable donde se hallan genes menos conservados relacionados con la virulencia y los ITRs. Mediante mapeo genómico se ha revelado que el núcleo central del OrfV consta de 88 kpb, conservado en otros chordopoxvirus y con alto grado de similitud con el virus *Vaccinia*, la especie tipo del género *Orthopoxvirus*. En los extremos, lugar donde existe mayor divergencia, se observan inserciones, deleciones y translocaciones de ADN. Este fenómeno explica la

existencia de variaciones entre distintos géneros y entre integrantes del mismo género [4], [5], [10], [19].

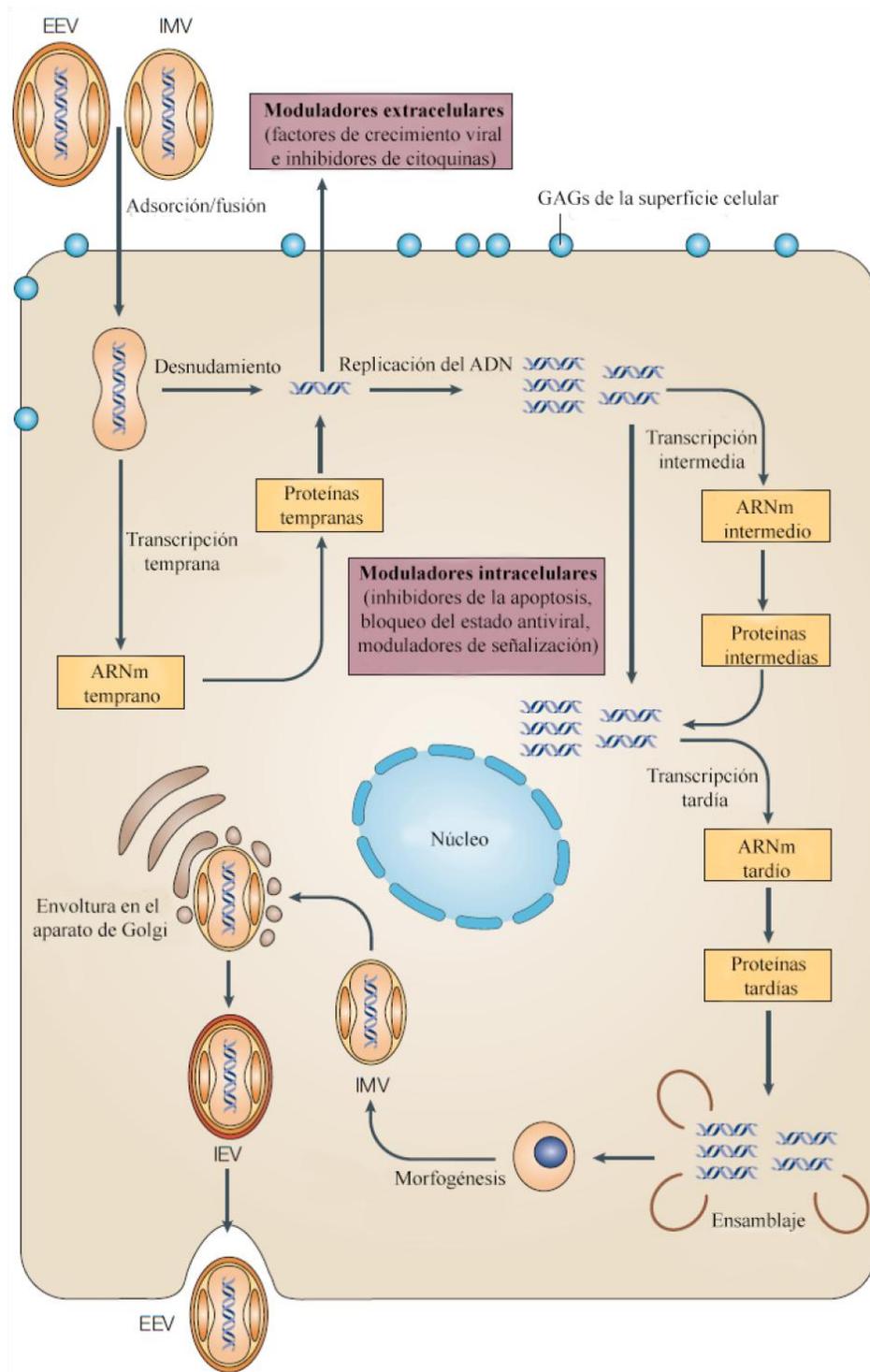


**Figura 2- Estructura de la partícula viral y organización genómica del Orfv.**

A- Micrografía electrónica de partículas de Orfv, se aprecia la estructura ovoide con forma de ovillo de estambre. Imagen adaptada de [20] B- Esquema mostrando la organización genómica del Orfv, indicando la región central conservada (verde), la región variable de genes no esenciales que suelen ser especie/genero específicos (amarillo) y los ITRs (gris). Se señalan algunos factores de virulencia y modulares de procesos celulares presentes en las distintas regiones. Estos factores son inhibidores de NF-κB, una dUTPasa, proteínas repetidas de ankirina (ARP), la proteína de resistencia al interferón ovino (OVIFNR), la fosfatasa de tirosina de especificidad dual (OH1), la proteína de unión a quimioquinas (CBP), el factor OV-GIF de inhibición del factor estimulador de granulocitos y macrófagos, un factor inhibidor de la apoptosis, la interleuquina-10 viral (OV-IL-10) y el factor de crecimiento endotelial vascular viral (OV-VEGF). Los genes están numerados de acuerdo a la nomenclatura disponible en [19].

El ciclo de Orfv ocurre en el citosol de la célula que infecta, de hecho en comparación con otros virus, presenta una gran autonomía con respecto a la célula, codificando su propia maquinaria de transcripción y replicación de ADN [10]. Si bien la replicación intracelular ha sido estudiada en profundidad solo para el virus *Vaccinia* (cepa vacunal utilizada para erradicar la viruela), las características principales de este proceso estarían conservadas dentro de la familia *Poxviridae*. Como se puede observar en la Figura 3, existen dos tipos de partículas infectivas que pueden iniciar el ciclo replicativo, el virión intracelular maduro (IMV, por intracellular mature virion) y el virión extracelular envuelto (EEV, por extracellular enveloped virion). La IMV y EEV difieren en sus glico-proteínas de membrana y en el número de membranas que envuelven al virión, dado que los EEV poseen una envoltura de membrana más que los IMV. Estos virus tienen dos formas de entrar a la célula: a un pH fisiológico son capaces de fusionar sus membranas directamente con las membranas de la célula del hospedero, mientras que en un entorno de pH ácido se facilita la entrada por la vía endosomal. La diferencia en estos dos procesos que presentan ambas formas

infectivas aún no son comprendidos en su totalidad [21]. Sin embargo, se ha propuesto que la principal vía de entrada a la célula por parte de estos virus es a través de la vía endosomal. En este caso, la diferencia entre los IMV y los EEV, es que estos últimos deben perder la envoltura membranosa extra que poseen, liberando una particular con las características de una IMV que es capaz de realizar la fusión de las membranas [22]. Hasta el momento, varias proteínas del virión han sido reportadas como cruciales para la unión del virión a la superficie celular, entre ellas A26, A27, H3, and D8, sugiriéndose interaccionan con receptores celulares del tipo glicosaminoglicanos (GAGs). También estarían implicadas las proteínas A28 y L5, encontradas en la superficie viral [23], [24]. Estas proteínas contienen múltiples puentes disulfuro en su estructura que son claves para el mantenimiento de su función. De hecho, los poxvirus codifican para proteínas de una vía esencial de formación de puentes disulfuros, compuesta por las proteínas E10R, G4L y A2.5L [25]. Una vez que el virión y la membrana del hospedero se han fusionado y el *core* viral es liberado al citoplasma celular junto a factores de transcripción y ARN polimerasas, se conforma el transcriptosoma viral, el cual comienza la primera cascada de expresión de genes virales tempranos. Posteriormente, ocurre el desnudamiento del virus, donde el ADN genómico viral es liberado del *core* y actúa como molde para la replicación del ADN en el citoplasma y para las próximas rondas de transcripción de genes intermedios y tardíos. A diferencia de los genes tempranos, se cree que estas rondas de transcripción requieren de la cooperación de factores de transcripción de la célula eucariota [26]. Concomitantemente con el aumento de los genes de expresión tardía, ocurre la morfogénesis de las nuevas partículas virales. El proceso replicativo del virus se lleva a cabo en estructuras citoplásmicas conocidas como “factorías virales”. En estas estructuras se ensamblan las partículas IMVs mediante un proceso complejo que involucra la generación de estructuras membranosas conocidas como “medialunas” derivadas del retículo endoplásmico (RE). Luego, las IMVs que obtienen sus membranas del RE, utilizan el sistema de tráfico micro-tubular celular para migrar y adquirir las dos capas de membrana derivadas del aparato de Golgi, formando así viriones envueltos intracelulares (IEV de intracellular enveloped virions). A su vez, los IEV se fusionan con la membrana plasmática perdiendo una de las membranas externas, generando los viriones envueltos con una sola membrana asociados a la célula (CEV de cell-associated enveloped virion). Los CEV pueden ser dirigidos hacia otras células mediante la polimerización de una cola de actina que se genera debajo del virión, o ser liberados directamente al medio como partículas EEV libres. Se cree que los CEV y EEV juegan un papel importante en la transmisión rápida de célula a célula *in vivo*, mientras que los IMV contribuyen a la diseminación del virus en la fase tardía de muerte celular y ruptura de la membrana [21], [26].

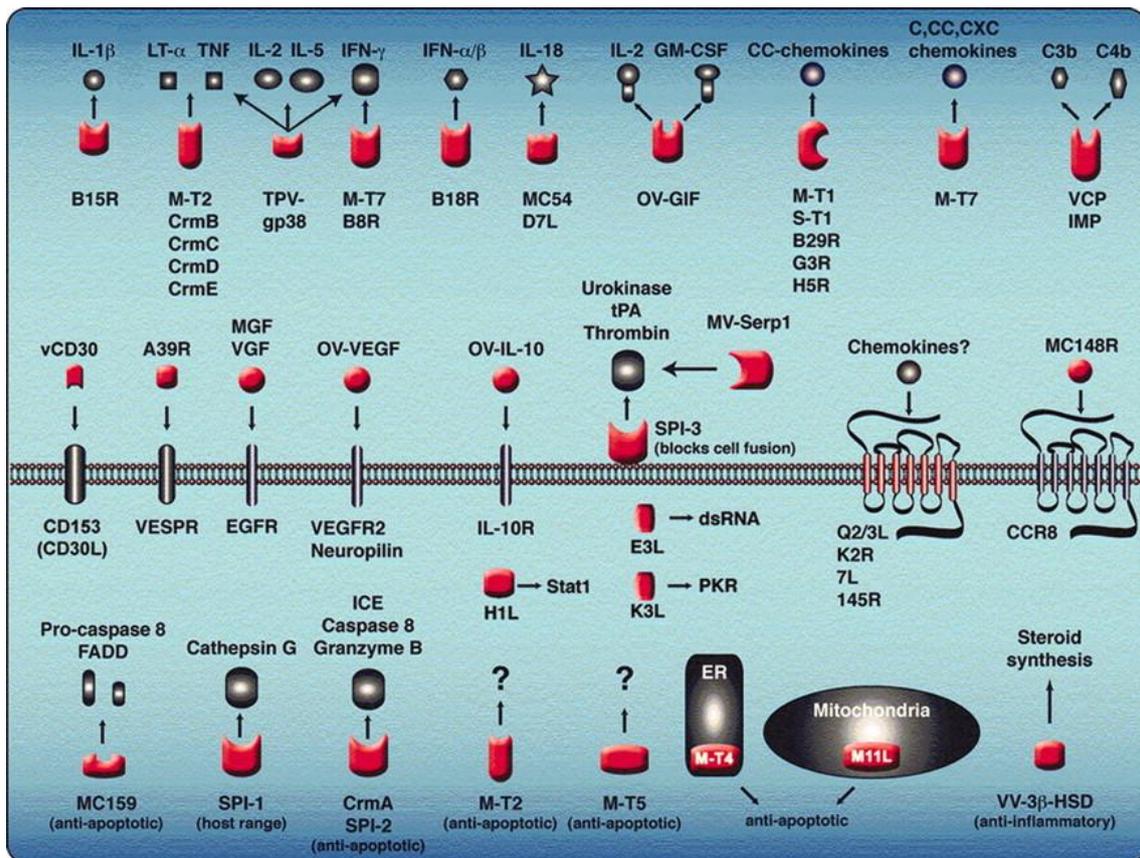


**Figura 3- Ciclo replicativo de los Poxvirus.**

La infección puede ser iniciada por dos partículas virales distintas, el virus intracelular maduro (IMV) o el virus extracelular envuelto (EEV). Se indican los glicosaminoglicanos celulares (GAGs) celulares, las tres rondas de transcripción viral (temprana, intermedia y tardía) y síntesis proteica viral, los virus envueltos intra-celulares (IEV) y la gran variedad de factores de regulación, virulencia e inmuno-moduladores de la respuesta inmune del hospedero que aportan al éxito de la replicación. Imagen adaptada de [26].

Durante el ciclo descrito los poxvirus expresan una amplia gama de proteínas modificadoras que modifican el ambiente extra e intracelular de la célula infectada. Estas proteínas virales modulan una gran cantidad de respuestas antivirales que son

activadas por la infección viral y algunas de ellas con una función anti-inflamatoria. En la Figura 4 se representa en forma esquemática la gran mayoría de estas proteínas inmunomoduladoras de los poxvirus y donde se encuentran representados varios de los factores de virulencia del virus Orf, algunos de los cuales se han identificado solo en este virus. Entre ellos están el factor de crecimiento endotelial vascular viral (OV-VEGF), la interleuquina-10 de Orfv (OV-IL-10), la proteína de resistencia al interferón ovina (OVIFNR, E3L en la figura), la proteína de unión a quimioquinas (CBP, M-T7 en la figura), el factor de inhibición del factor estimulador de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y de la IL-2 (OV-GIF), la fosfatasa de fosotirosina OH1 (H1L en la figura).



**Figura 4- Representación esquemática de los factores de virulencia de los poxvirus.**

Las proteínas representadas en rojo pertenecen a los poxvirus, mientras que los factores celulares se muestran en negro y gris. En la parte superior se encuentran los factores virales secretados que funcionan como señuelos solubles o en la superficie celular, uniéndose a citoquinas y quimioquinas del exterior celular. Otros factores virales son secretados al medio extracelular para funcionar como ligandos agonistas o antagonistas de receptores celulares del hospedero y se representan en la parte media de la imagen. Por último, algunos factores actúan en el interior celular y regulan aspectos como la apoptosis, el procesamiento de citoquinas y el rango de huésped. En particular, para el virus Orf se representan la interleuquina-10 de Orfv (OV-IL-10), El factor de crecimiento endotelial vascular viral (OV-VEGF), el factor OV-GIF de inhibición del factor estimulador de granulocitos y macrófagos, la proteína de resistencia al interferón ovina (E3L) y la fosfatasa de tirosina OH1 (H1L). Imagen adaptada de [27].

El OV-VEGF fue el primer factor de virulencia en ser descrito como esencial para la patogénesis del Orfv. Este factor tiene homología con el VEGF de mamíferos y se transcribe temprano en la infección. A través de su interacción con el receptor celular de VEGF induce la proliferación epitelial y epidérmica, además de aumentar la

permeabilidad vascular y la angiogénesis. De esta manera se potencia la replicación viral en las células en división, además contribuye a la generación de las costras ricas en partículas virales y vitales para la propagación del virus [20], [28].

La interleuquina OV-IL-10 ha sido encontrada solo en virus pertenecientes al género *Parapoxvirus*, presenta a nivel genómico una gran homología con la IL-10 de ovinos (80%), bovinos (75%), humanos (67%) y ratones (64%). En un modelo murino, se constató que la OV-IL-10 juega un rol importante en la supresión de la respuesta inmune mediante la inhibición de la síntesis de citoquinas por parte de los macrófagos. Actúa sobre las células presentadoras de antígenos inhibiendo su maduración y función, y de esta manera inhibe la expresión de citoquinas por parte de linfocitos Th1 (IL-2, IL-3, Interferón- $\gamma$  y GM-CSF). La OV-IL-10 también inhibe la producción de Interferón- $\gamma$  (INF $\gamma$ ) en linfocitos activados, así como también del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y la IL-8 de queratinocitos y macrófagos [5], [29].

El factor OVIFNR, que se expresa tempranamente durante el ciclo viral detiene la producción de INF de tipo I por parte de la célula huésped. Como mecanismo de defensa antiviral, el INF promueve la síntesis de la quinasa R (PKR) y de la 2-5 adenilato sintetasa, enzimas que se activan por la presencia de ARN viral doble hebra, desencadenando una inhibición de la traducción y la degradación de los ARNm, respectivamente. Cuando se produce OVIFNR, esta proteína se une al ARN doble hebra viral, evitando de esta manera la activación de la quinasa PKR y la 2-5 adenilato sintetasa. Mediante este mecanismo el OrfV es capaz de inhibir la respuesta inmune y a su vez utilizar la maquinaria de síntesis proteica celular para su replicación [30].

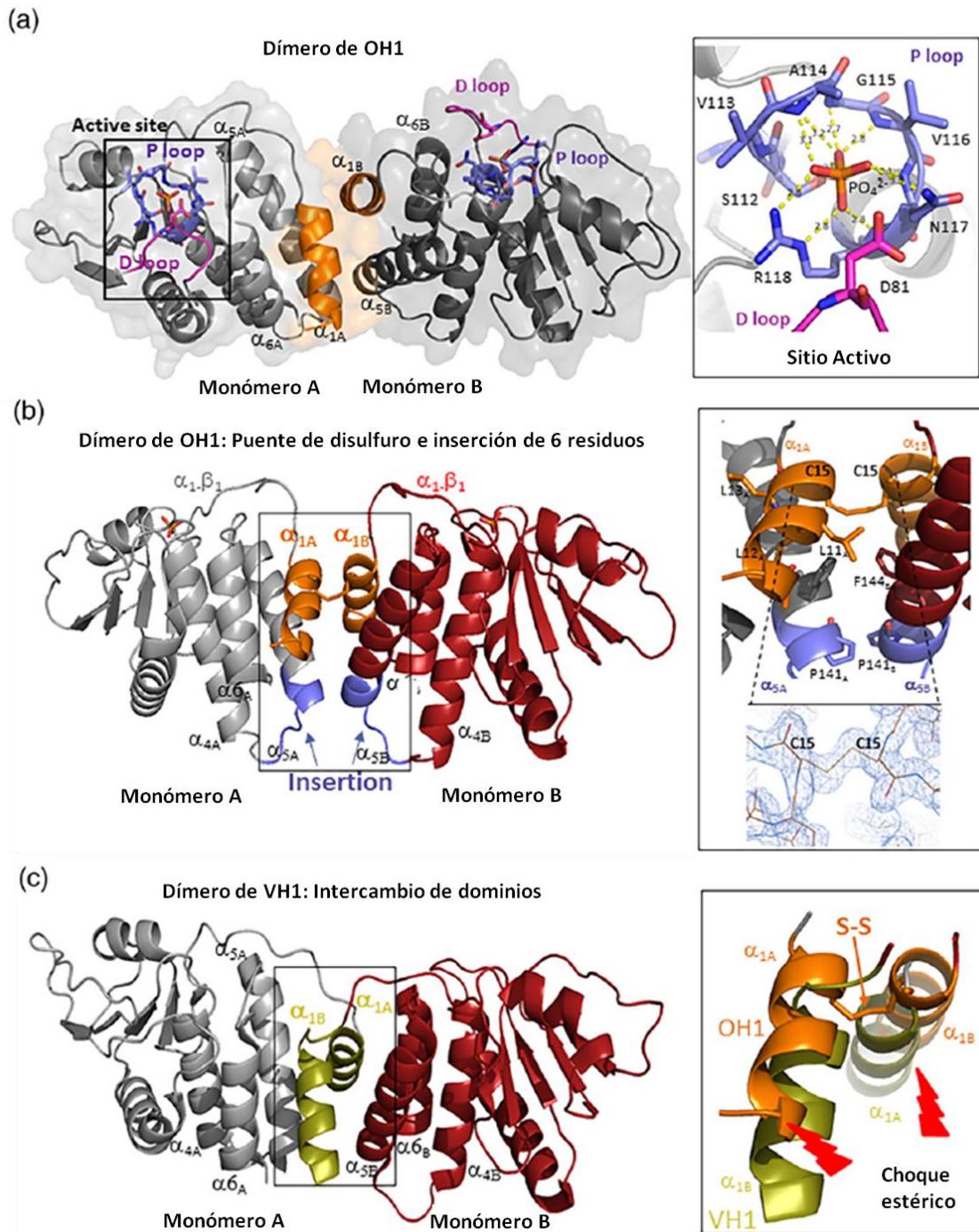
El factor CBP, es una proteína que se une con gran afinidad a muchas quimioquinas, incluyendo a la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), la proteína inflamatoria de macrófagos 1a (MIP-1a), y la quimioquina de regulación por activación expresada y secretada por los linfocitos T (RANTES), las cuales regulan el reclutamiento de monocitos, macrófagos y linfocitos T al sitio de infección. Al ser secretada en el epitelio donde se sitúa la infección, la CBP impide la interacción de las quimioquinas con sus respectivos receptores de forma competitiva, inhibiendo la quimiotaxis y reclutamiento de linfocitos [5].

Un factor de expresión tardía es la proteína OV-GIF, la cual inhibe la función de GM-CSF y de la IL-2 actuando como un dímero que se une a GM-CSF con mayor afinidad que la IL-2. El GM-CSF celular estimula la diferenciación y activación de macrófagos, lo que a su vez resulta en la presentación de antígeno a las células T y estimula el reclutamiento y la función presentadora de antígeno de las células dendríticas. De esta forma, la inhibición de la función de GM-CSF y la IL-2 por medio de OV-GIF previene la activación de leucocitos y células dendríticas, promoviendo la supervivencia viral. Cabe destacar, que este factor presenta puentes disulfuro y un motivo aminoacídico WDPWV, ambos vitales para su actividad [5], [29].

A su vez, el OrfV codifica otros factores de importancia para la sobrevivencia viral, como dUTPasas, factores de modulación de NF- $\kappa$ B, proteínas repetidas de ankirina (ARP) y el producto del gen 125 de OrfV. La dUTPasa es una enzima que mantiene la estabilidad genética del genoma viral reduciendo la frecuencia de mutación generada por la incorporación excesiva de dUTP en el ADN [31]. Por otro lado, la familia de factores de transcripción NF- $\kappa$ B juega un papel preponderante en la modulación de la respuesta inmune temprana contra las infecciones virales. Por lo cual no es sorprendente que OrfV codifique para tres genes (ORFV002, 024 y 121) capaces de interferir con esta vía en distintos puntos, tanto a nivel citoplasmático como nuclear [29]. En cuanto a las proteínas repetidas de ankirina, poco se sabe del rol de esta familia de proteínas durante el ciclo viral. No se encuentra normalmente en virus, pero en eucariotas, cumplen un rol en variadas funciones biológicas como la señalización célula-célula, la integridad del citoesqueleto, el transporte de proteínas y la respuesta inflamatoria. En OrfV encontramos 5 genes de este tipo de proteínas (ORF008, 123, 126, 128 y 129), cuyos productos parecen relacionarse con la degradación vía el proteosoma celular mediada por ubiquitinilación, modulando de esta forma distintas vías celulares [32]. Por otro lado, el producto del gen 125 del OrfV, factor específico del género *Parapoxvirus*, presenta capacidad de inhibir la apoptosis celular por medio de la interferencia de la vía de bcl-2 [31]. Por último, nuestro grupo demostró recientemente que OH1, codificada por el gen 057 de OrfV que se encuentra en la región conservada del genoma [19], es una fosfatasa de fosfo-tirosina [33], [34], homóloga a la caracterizada para el virus *Vaccinia* (VH1) [35]–[37]. Simultáneamente, otro grupo reportó que la expresión de OH1 en células HeLa se correspondió con la desfosforilación del factor transcripcional STAT1 en la Tyr 701, componente esencial en la activación de la respuesta inmune generada por el INF $\gamma$  [38].

### 1.3. La fosfatasa OH1 del virus Orf y su rol en la respuesta inmunitaria

OH1 fue clonada y producida en forma recombinante por nuestro grupo en su forma salvaje (OH1wt) y como mutante inactivo (OH1-C112S). Se logró resolver la estructura cristalográfica, confirmándose mediante análisis estructurales y enzimáticos que pertenece a la familia de fosfatasas de especificidad dual, capaz de defosforilar tanto residuos de fosfo-tirosina (p-Tyr) como de fosfo-treonina o serina (p-Thr/p-Ser). El sitio activo de OH1 presenta los motivos conservados que caracterizan a los miembros de la familia de fosfo-tirosin fosfatasas (del inglés PTPs) observándose los bucles de unión a fosfato (P-loop) que contiene la Cys112 catalítica y el bucle conteniendo al aspartato catalítico (D-loop) (Figura 5-A). Los estudios realizados para evaluar la estructura cuaternaria de OH1 revelaron que OH1 es un dímero covalente, estabilizado por un puente disulfuro que involucra la Cys15 presente en la hélice alfa 1 de cada monómero (Figura 5-B). Esto difiere de la estabilización del dímero no covalente (por intercambio de dominios) reportada para el dímero de la fosfatasa viral VH1 del virus de *Vaccinia*, la cual carece de la Cys15 y presenta una Ser en esta posición (Figura 5-C). Para OH1, nuestro grupo se encuentra evaluando la hipótesis de que ambos dímeros, covalente y no covalente, podrían coexistir dependiendo del ambiente reductor. De hecho, demostramos que la presencia de la Cys15 no es esencial para la formación de dímeros de OH1 en solución, por lo que se propuso que OH1 pueda alternar entre dimerización covalente (puente disulfuro) y no covalente (intercambio de dominios). Por último, OH1 presenta una inserción TMTQPA entre las hélices  $\alpha 4$  y 5, característica del género *Parapoxvirus*. Esta inserción contribuye a la interface dimérica y estabiliza la posición de la hélice  $\alpha 1$ , favoreciendo la presencia del puente disulfuro en detrimento del intercambio de dominios que se observa en VH1 [34] (Figura 5-B).



**Figura 5- Estructura de OH1 determinada por cristalografía de rayos X.**

A- Representación gráfica del dímero de OH1 de OrfV con sus monómeros A y B, las hélices  $\alpha 1$  de ambos monómeros están indicadas en naranja. Para cada monómero se indica el sitio activo con los bucles P y D (P y D loop) en azul y magenta respectivamente. Se indica un ion fosfato ( $PO_4$ ) en naranja y los residuos que interactúan con este están rotulados (detalles en el recuadro). B- Representación gráfica del dímero de OH1 estabilizado por un puente disulfuro entre las Cys15 de las hélices  $\alpha 1$  de ambos monómeros (en naranja) y una inserción de 6 residuos (azul). En el recuadro se muestran los detalles de la densidad electrónica del puente disulfuro y los residuos que estabilizan esta interacción. C- Representación gráfica del dímero de VH1 del virus *Vaccinia* con las hélices involucradas en el intercambio de dominios indicadas en amarillo. En el recuadro se detalla la incompatibilidad de la posición de las hélices  $\alpha 1$  A de OH1 (naranja) y  $\alpha 1$  B de VH1 (amarillo), se indican los choques estéricos con flechas rojas. Imagen adaptada de [34].

La estructura de OH1 descrita pensamos representa a las fosfatasas de todo el género *Parapoxvirus*. La Cys15 está conservada en todos los miembros pertenecientes a dicho género viral y está ausente en el género *Orthopoxvirus*, al cual pertenece la fosfatasa VH1 del virus de la viruela y el de *Vaccinia*, así como en muchos otros géneros virales de la familia *Poxviridae*. Por otro lado, se encuentran residuos de Cys en las hélices  $\alpha$  de miembros de los géneros *Yokapoxvirus*, *Avipoxvirus* y *Yatapoxvirus* [34]. Con el objetivo de explorar que diferencias en la secuencia de este gen se asociaban evolutivamente con la sustitución de Ser15 a Cys15 nuestro grupo realizó un análisis filogenético encontrando algunos cambios en aminoácidos con posibles consecuencias funcionales y/o estructurales. Por un lado, la Ala40 de OH1 la cual cambia a Tyr en el resto de la familia viral, se encuentra en la cercanía del sitio activo, donde la ausencia de la cadena lateral de la Tyr parece generar un sitio alternativo de unión del grupo fosfato, detectado a través de ensayos de acoplamiento molecular. La Tyr152 de OH1, la cual cambia a His en el resto de la familia viral podría cumplir un rol en la estabilización de la hélice  $\alpha$ 1 de OH1. Otros residuos donde se detectaron cambios que correlacionan con el cambio de Ser 15 a Cys15 fueron la inserción del motivo Gly-Asp (GD) en la posición 49-50, y las sustituciones de Cys57, Leu101, Val127 y Phe175 por Tyr, Cys, Leu y Tyr respectivamente. Sin embargo, estos cambios aún no hemos logrado correlacionarlos a posibles cambios estructurales o funcionales [34].

En cuanto a la actividad de OH1, se constató que utilizando un sustrato artificial de fosfatasas, el para-nitrofenol-fosfato, la enzima presenta una cinética de Michaelis-Menten. Como era de esperar el mutante en la cisteína catalítica (OH1-C112S) no presentó actividad, sin embargo, el mutante C15S (dímero no covalente en solución) presentó parámetros similares a la proteína salvaje (dímero covalente en solución) [33]. Esto es consistente con lo reportado para VH1, donde la conformación dimérica ha sido sugerida como esencial para el mantenimiento de mayores niveles de actividad, evaluado tanto con un sustrato artificial como con el sustrato fisiológico STAT1. Además, la dimerización de la fosfatasa viral sería importante también para el reconocimiento y unión de STAT1 [39], [40].

Por último, OH1 fue capaz no solo de desfosforilar proteínas conteniendo residuos de pTyr y pThr, sino que también fue capaz de desfosforilar fosfatidilinositol 3,5 bifosfato (PtdIns-(3,5)P<sub>2</sub>). La habilidad de OH1 de desfosforilar PtdIns *in vitro* es de particular interés ya que la señalización desencadenada por estas moléculas lipídicas ha sido relacionada con el ciclo viral de los poxvirus, mediado por las fosfatidilinositol 3 quinasas (PI3K) humanas, enzimas que co-localizan con los centros virales de replicación [41], [42]. A su vez, en experimentos donde se utilizaron a nivel celular inhibidores de PI3K, se observó una marcada disminución en la eficiencia de la maduración y morfogénesis viral. Esto es consistente con que los poxvirus son virus envueltos que contienen membranas derivadas del aparato de Golgi, un organelo

particularmente enriquecido en fosfatidilinositol 4 fosfato, y que los virus maduros también se encuentran enriquecidos en PtdIns [43].

En VH1 aún no se ha evaluado si presenta o no actividad fosfoinostil fosfatasa, sin embargo, como ya lo hemos mencionado existen claras evidencias de su rol en la inhibición de la respuesta mediada por interferón gama, mediante la desfosforilación del factor de transcripción STAT1. VH1 desfosforila a STAT1 en la Tyr701, impidiendo su dimerización y translocación desde el citoplasma al núcleo, bloqueando la vía de señalización por INF $\gamma$ , así como también de interferones tipo 1, eludiendo de esta manera los mecanismos de defensa del hospedero durante la infección viral [36], [37], [44]. Se ha reportado también que VH1 desfosforilaría proteínas virales como la proteína F18, uno de los principales componentes de los cuerpos laterales [44], y las proteínas de membrana A14 y A17, relacionadas a la morfogénesis temprana de las IMV [45]. VH1 se expresa en la fase tardía de la infección viral, se estima que unas 200 moléculas de dicha fosfatasa son empaquetadas dentro de las nuevas partículas virales en los cuerpos laterales [35], [44]. VH1 es esencial para la generación de progenie viral infecciosa [35], [44]. De hecho, un estudio empleando un virus *Vaccinia* modificado, en el cual el gen de VH1 era expresado bajo el sistema de regulación del operón Lac, demostró que la represión de la expresión de VH1 causaba una disminución en la producción de partículas virales infectivas [35]. La interacción directa de VH1 con su sustrato fisiológico STAT1 fue demostrada, utilizando una estrategia de captura de complejos enzima-sustrato llamada “*substrate trapping*” (ST) descrita para fosfatasas de tirosina [36], [46] y recientemente optimizada por nuestro grupo [47]. La estrategia de ST se basa en el uso de mutantes puntuales del sitio catalítico de la fosfatasa, que presentan una constante catalítica ( $K_{cat}$ ) nula o menor que la fosfatasa salvaje y una constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) similar a esta última (evaluada con un sustrato artificial), características que aumentan la posibilidad de atrapar los potenciales interactores y/o sustratos.

En cuanto a OH1, estudios publicados durante el desarrollo de este trabajo por el grupo de Harvey y colaboradores [38] observaron que la infección con partículas virales de OrfV en células HeLa estimuladas con INF $\gamma$  o  $\alpha$ , reprimía la respuesta transcripcional generada por estas citoquinas. Además, concluyeron que esta respuesta era dependiente de un componente estructural del virión, dado que esta no se vio afectada por el tratamiento con un inhibidor específico de la síntesis proteica de los poxvirus. Como siguiente paso, se demostró que la infección con OrfV de células HeLa disminuía el nivel de fosforilación de STAT1 en la Tyr701 ante la estimulación con INF $\gamma$  o  $\alpha$ . Esta reducción no se observaba al tratar a las células con un inhibidor reversible de fosfatasas (el ortovanadato de sodio) por lo que se propuso que una fosfatasa de tirosina sería la responsable de la reducción en fosforilación de STAT1. Como última aproximación se constató que la expresión transitoria de OH1 en células eucariotas, correlacionó con una disminución del nivel de fosforilación de STAT1 en Tyr701 [38],

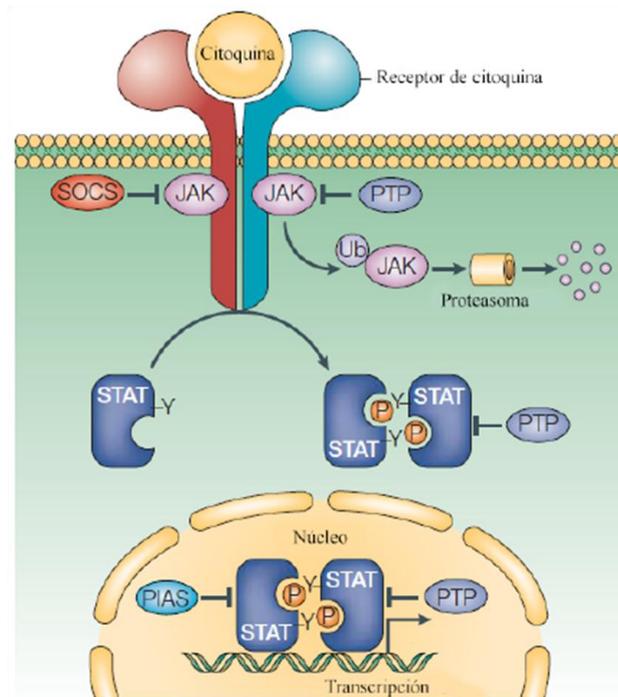
sugiriendo que OH1 sería la fosfatasa implicada, cumpliendo la misma función en OrfV que VH1 en *Vaccinia*. Esto último era un objetivo inicial de la presente tesis, sin embargo, los resultados reportados hasta ahora sugieren pero no demuestran la interacción directa entre OH1 y STAT1, ni demuestran el efecto de la actividad de OH1 sobre la translocación de STAT1, objetivo que buscaremos abordar en esta tesis. Por otro lado, al igual que VH1 y otras fosfatasas, es posible pensar que OH1 actúe sobre otros sustratos celulares o virales importantes, lo que motiva expandir la búsqueda de nuevos interactores, en principio solo eucariotas, dado que aún carecemos en el laboratorio del modelo celular de infección con OrfV.

## 1.4. STAT1 como sustrato de fosfatasa de tirosina

La vía de señalización JAK-STAT (Figura 6) permite transmitir la información recibida a partir de polipéptidos extracelulares específicos (como ser una citoquina o un factor de crecimiento) los cuales se unen a receptores transmembrana, desencadenando así la activación de la transcripción de genes nucleares particulares. La unión del mensajero extracelular, activa la dimerización del receptor de membrana y la subsecuente activación de las quinasas en tirosina Janus (JAK), las que se encuentran constitutivamente asociadas a dicho receptor. Residuos de tirosina específicos del receptor son entonces fosforilados por las JAKs activadas y sirven como sitios de anclaje para las proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción (STAT). Seguidamente, los STATs son fosforilados por las JAKs, forman dímeros particulares que subsecuentemente dejan el receptor para ser translocados al núcleo celular, donde activan la transcripción de genes específicos. Esto lleva a una rápida reprogramación de la expresión de genes en la célula [48]. Existen cuatro tipos diferentes de proteínas JAK y siete tipos de STATs, los cuales a su vez pueden formar homodímeros y heterodímeros, lo que permite a la célula responder en forma diferente a diversos estímulos. En las células, la vía JAK-STAT se encuentra finamente regulada a múltiples niveles. Algunos ejemplos son fosfatasas que remueven el fosfato del STAT fosforilado, proteínas supresoras de la señalización por citoquinas (SOCs) que se unen a JAKs e inhiben su actividad, proteínas que median la degradación de JAKs por la vía de ubiquitinación y proteínas Inhibidoras de STATs (PIAS) que actúan en el núcleo y median la inhibición de la activación de la transcripción por parte de STAT, entre otros [49].

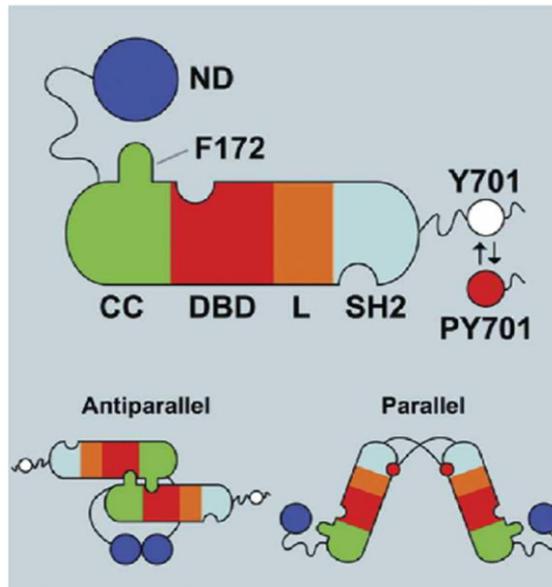
No se ha reportado que exista degradación de STAT1 como mecanismo de reciclaje luego de la activación generada por el INF $\gamma$ . Por el contrario, STAT1 es reciclado al citoplasma mediante la desfosforilación por parte de fosfatasas celulares como TC45 [50]. STAT1 posee múltiples dominios, estos son el dominio N-terminal (ND), el dominio de hélice superenrollada (CC), un dominio de unión al ADN (DBD), un dominio de unión o *linker* (L) y un dominio de homología a Src 2 (SH2) conteniendo un extremo adicional flexible donde se encuentra la Tyr701. Se ha postulado que STAT1, en condiciones fisiológicas, se encuentra en un equilibrio entre dos conformaciones diméricas llamadas paralela y anti-paralela, en base a la disposición de sus dominios SH2 [50], [51] (Figura 7). La transición entre estas conformaciones estaría determinada por la interacción preponderante entre sus distintos dominios. Se ha propuesto que en ausencia de estimulación por INF $\gamma$ , STAT1 se encuentra en el citoplasma en su forma anti-paralela inactiva estabilizada por interacciones reciprocas entre los dominios ND y los dominios CC y DBD de ambos monómeros. Cuando se estimulan las células eucariotas con INF $\gamma$ , el STAT1 anti-paralelo citoplásmico es fosforilado en la Tyr701 (p-Tyr701), lo que resulta en un cambio hacia la forma paralela favorecida por la

interacción recíproca entre la p-Tyr701 de un monómero de STAT1 con la Arg602 del dominio SH2 del otro monómero (dominio especializado en reconocer p-Tyr). Esta estructura paralela que enfrenta ambos dominios SH2 sería la responsable de interaccionar con el ADN en el núcleo y funcionar como factor activador de la transcripción [50], [51] (Figura 7).



**Figura 6- Esquema de vía de señalización JAK-STAT.**

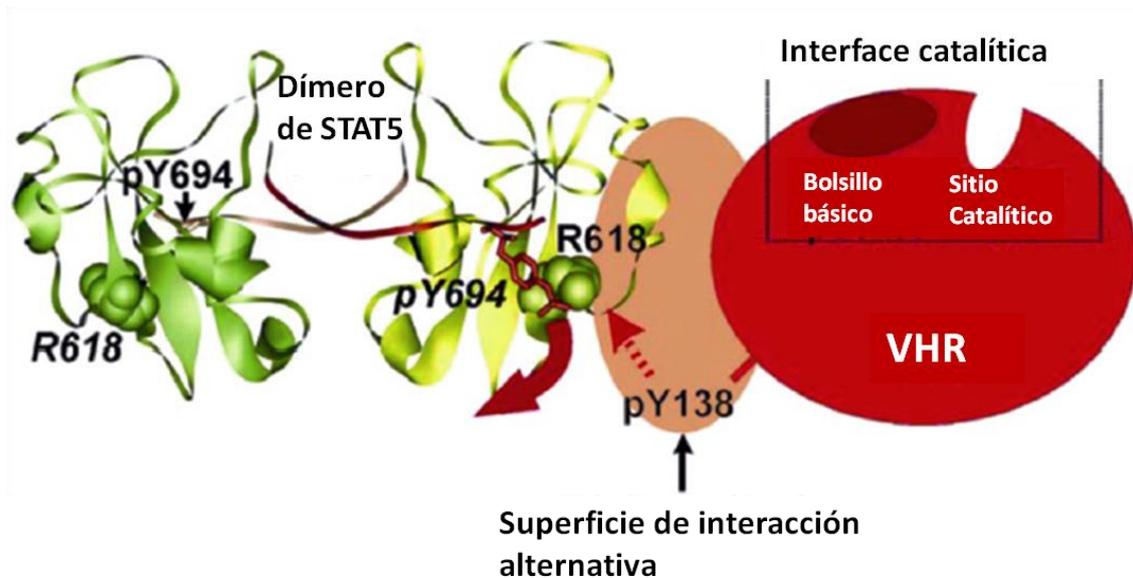
En esta vía de transducción de señales, la unión de un ligando al receptor (por ejemplo, una citoquina), desencadena el reclutamiento de la proteína STAT al receptor, la cual es entonces fosforilada por la quinasa JAK. Una vez fosforilada, la proteína STAT forma un dímero particular capaz de translocarse al núcleo celular y activar la transcripción de genes. Esta vía es regulada de forma negativa en todos los niveles, como se esquematiza en el diagrama. Se representan supresores de señalización por citoquinas (SOCS), tirosín-fosfatasa citoplásmica y nucleares (PTP), degradación de JAK mediada por ubiquitinación (Ub) y proteínas inhibitoras de STAT activado (PIAS). Imagen adaptada de [49].



**Figura 7- Esquema de dominios y estructuras cuaternarias de STAT1.**

Se diagraman los dominios N-terminal (ND), de hélice superenrollada (CC), de unión al ADN (DBD), de unión (L) y de homología a Src 2 (SH2). En el extremo C-terminal de STAT1 se indica la ubicación de la tirosina 701 (Tyr701) en su estado desfosforilado (blanco) o fosforilado (rojo). En la parte inferior de la imagen se diagrama la forma antiparalela y paralela de STAT1. Imagen adaptada de [50].

Si bien no existe un modelo de interacción establecido entre STAT1 y la fosfatasa viral VH1, Jardin y colaboradores, utilizando experimentos de acoplamiento y dinámica molecular [52], propusieron un mecanismo basado en el estudio de la interacción de la fosfatasa humana VHR con su sustrato STAT5 [52]. Como se observa en la Figura 8, la tirosina fosforilada 138 (p-Tyr138) de VHR sería capaz de reclutar a STAT5 a través de la Arg618 del dominio SH2. La formación de este complejo desplazaría el extremo C-terminal del segundo monómero de STAT5 y permitiría, en un segundo paso, la desfosforilación de la p-Tyr694 ubicada en esta región. En este estudio, se extrapoló dicho modelo de interacción a STAT1 con VH1, teniendo en cuenta la conservación de la Tyr138 de VHR en VH1 (Tyr 124), lográndose reproducir la superficie de unión del complejo. Como se observa en la Figura 9-A, esta interacción depende de numerosos contactos polares para la estabilidad del complejo. Se evaluaron los residuos importantes para la interacción de este complejo mediante experimentos de dinámica molecular y se reportaron los residuos Arg29, Lys51, Lys128, Lys130 y Glu131 de VH1 como relevantes, mientras que en STAT1 fueron Arg586, Arg602, Glu605 y Glu632.



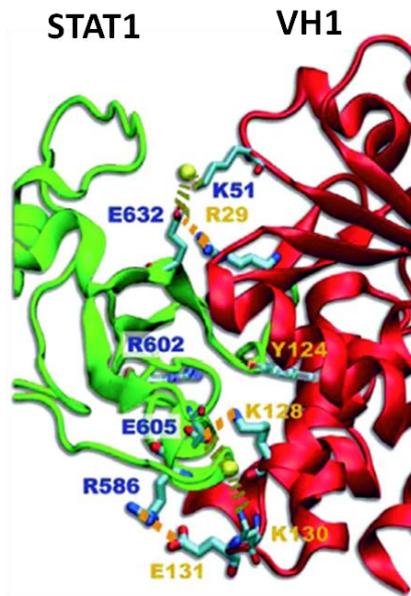
**Figura 8- Representación esquemática de la interacción en dos pasos del complejo VHR/STAT5.**

Se representa un dímero activado de STAT5 donde las tirosinas 694 están fosforiladas (p-Tyr694) formando interacciones inter-moleculares entre las subunidades. En este modelo, la tirosina 138 fosforilada (p-Tyr138) de VHR interacciona con el dominio SH2 de una de las subunidades de STAT5, compitiendo y desplazando la fosfo-tirosina del extremo C-terminal de la otra subunidad de STAT5. Esto permite que la desfosforilación de esta p-Tyr694 ocurra en un segundo paso. Los dominios SH2 del dímero de STAT5 están representados en diagrama de cintas en dos tonos de verde, mientras que VHR está representada como un círculo rojo. Se indican la interfaz catalítica de VHR y la superficie de interacción alternativa con STAT5. Imagen adaptada de [52].

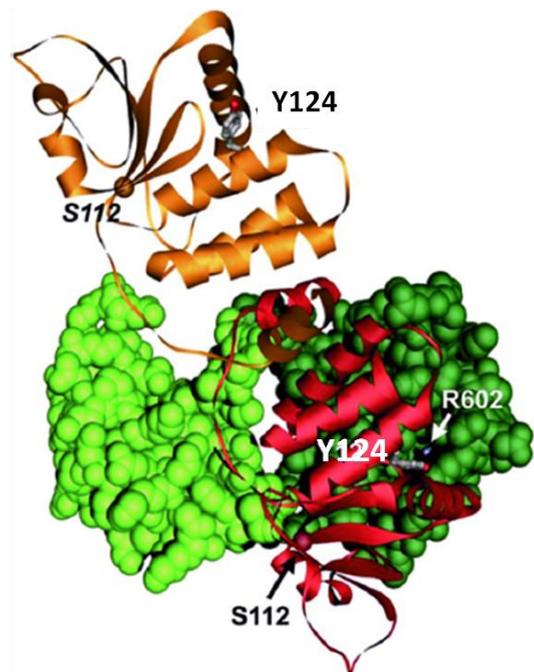
A diferencia de la fosfatasa humana VHR, VH1 es un dímero en solución, y como describimos en la sección anterior se ha demostrado que la dimerización es importante para la actividad e interacción con STAT1. Sin embargo, cada sitio activo de VH1 actúa de manera independiente, siendo necesario sólo uno de ellos en la desfosforilación de STAT1 [39]. El modelo de interacción STA1-VH1 propuesto por Jardin y cols [52] sería compatible con la presencia del dímero de VH1, ya que el segundo monómero de VH1 no presenta choques estéricos con STAT1. Además, la separación entre los dos sitios activos de VH1 es consistente con lo reportado sobre la necesidad de un solo de estos sitios para la actividad de VH1 [39] (Figura 9-B). Cabe destacar que si bien hay evidencia experimental de que la Tyr138 de VHR está fosforilada, no se ha reportado la fosforilación de la correspondiente Tyr en VH1. Además, estudios previos han demostrado que la fosforilación de esta Tyr no es necesaria para la unión de VH1 a STAT1 [40], por lo cual no es seguro que el modelo propuesto sea válido.

En este contexto, como último objetivo nos planteamos evaluar si este modelo de interacción propuesto para VH1 y STAT1 puede extrapolarse a OH1 y STAT1 y si existen modelos alternativos al mismo.

A



B



**Figura 9- Representación gráfica de la interacción propuesta en el modelo del complejo VH1/STAT1.**

A- Interface de interacción en el complejo entre VH1 (rojo) con STAT1 (verde) mostrando los residuos relevantes en la estabilización del mismo. B- Representación del complejo propuesto de interacción entre el dímero de VH1 (en diagrama de cintas) con el dímero de STAT1 (en diagrama de esferas verde claro y oscuro). En la subunidad de VH1 se indican los residuos Tyr124 y en STAT1 la Arg602 observándose la proximidad espacial de ambos residuos. A su vez se indica la Ser112 ubicada en el sitio activo de VH1. La subunidad de VH1 que no interacciona con STAT1 (naranja) está orientada en la otra dirección de los dominios SH2 de STAT1 y su sitio catalítico se ubica en el lado opuesto de SH2. Imágenes adaptadas de [52].

## **2. Hipótesis planteada**

OH1 interacciona con el factor transcripcional STAT1, lo desfosforila e impide su translocación al núcleo, interfiriendo con la activación de la respuesta antiviral mediada por interferón gama. OH1 cuenta con otros interactores eucariotas además de STAT1.

## **3. Objetivos**

### **3.1 Objetivo General**

Aportar al conocimiento sobre la fosfatasa OH1 del OrfV y profundizar sobre cuáles son sus interactores y/o sustratos eucariotas y las vías de señalización que modula.

### **3.2 Objetivos Específicos**

- 1- Identificar interactores eucariotas de OH1, aplicando la técnica de “Substrate Trapping”.
- 2- Validar en un modelo celular eucariota a STAT1 como sustrato de OH1.
- 3- Proponer un mecanismo de interacción molecular entre OH1 y STAT1.

## 4. Materiales y Métodos

### 4.1. Técnicas Generales

#### 4.1.1 Técnicas generales de biología molecular

##### 4.1.1.1 Obtención de células *E. coli* DH5- $\alpha$ electrocompetentes

Se utilizó un protocolo adaptado en base al descrito por el proveedor del equipo de electroporación (GenePulser XCell Electroporation System, Biorad), el cual se describe a continuación. Se inocularon 3 mL de caldo de lisogenia (LB, por sus siglas en inglés) sin antibióticos (ATB) con una única colonia fresca de *E.coli* DH5 $\alpha$ . Se utilizó este pre-cultivo para inocular 500 mL de LB líquido en una relación 1/500 y se incubó las células a 37 °C y 225 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de entre 0.5 y 0.8, medida a 600 nm. Posteriormente se incubaron las células en hielo 30 min, se centrifugaron a 4.000 rpm durante 15 min a 4 °C y se removió el sobrenadante. Todos los materiales y las soluciones utilizados debieron ser previamente enfriados en hielo. Se resuspendieron las células en 1 L de H<sub>2</sub>O miliQ. Se repitió la centrifugación en las condiciones anteriores, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 0.5 L de H<sub>2</sub>O miliQ. Se repitió el paso de centrifugación y descarte del sobrenadante, resuspendiendo las células en 20 mL de glicerol 10% en H<sub>2</sub>O miliQ estéril. Finalmente se repitió el paso de centrifugación, se descartó el sobrenadante con pipeta y se resuspendieron las células en 2.5 mL de glicerol 10% en H<sub>2</sub>O miliQ estéril. Se alicuotó la suspensión rápidamente de a 50  $\mu$ L en hielo y se guardaron las alícuotas a -80°C. Para las células competentes preparadas se calculó la eficiencia de la transformación, realizando para ello una transformación con un plásmido de concentración conocida y sembrando varias diluciones de la mezcla de transformación en LB-agar.

##### 4.1.1.2 Transformación de células *E. coli* DH5- $\alpha$ electrocompetentes

Para realizar la electroporación de las células obtenidas se siguió el protocolo propuesto por el manual del equipo utilizado (GenePulser XCell Electroporation System, Biorad). Se descongeló una alícuota de células *E.coli* DH5- $\alpha$  electrocompetentes en hielo durante 10 min. Se alicuotó 40  $\mu$ L en un tubo eppendorf de 1.5 mL previamente enfriado en hielo y a esta suspensión se le agregó 140 ng de ADN en un volumen de 1  $\mu$ L. Se mezcló gentilmente y se incubó 1 min en hielo. Se transfirió la suspensión a una celda de electroporación de 0.2 cm previamente enfriada en hielo y se aseguró que la mezcla permaneciera en el fondo de la celda. A continuación, se colocó la celda en el electroporador, se seleccionó el protocolo pre-establecido para bacterias y se sometió a un pulso de 5 ms, voltaje de 2.5 kV, capacitancia de 25  $\mu$ F y resistencia de 200  $\Omega$ . Se quitó la celda del electroporador y se le agregó rápidamente 1 mL de medio LB. Se mezcló por inversión, se puso la mezcla en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se incubó a 37 °C por 1.5 hs con una agitación de 225 rpm. Se sembró 200  $\mu$ L de la suspensión en placas de LB-agar conteniendo

cloranfenicol (12.5 µg/mL) y se incubó a 37 °C por 16 hs para evaluar su crecimiento. Al día siguiente, las colonias aisladas se sembraron en nuevas placas para obtener y expandir los clones puros.

#### **4.1.1.3 Transformación de células *E.coli* quimiocompetentes comerciales**

Para expandir los plásmidos de interés generados se transformaron células *E.coli* quimio-competentes comerciales de alta eficiencia derivadas de DH5α, NEB® 5-alpha (New England Biolabs). Se realizó la transformación por choque térmico con un protocolo adaptado basado en las instrucciones del fabricante. Brevemente, se descongeló una alícuota de 25 µL de suspensión de células quimio-competentes en hielo por 10 min. Se agregó 2.5 µL de ADN plasmídico conteniendo entre 1 pg-100 ng de material genético y se agitó suavemente cinco veces. Se incubó la mezcla en hielo por 30 min y se realizó el choque térmico en baño de agua a 42 °C por 45 segundos (s). Se incubaron las células inmediatamente por 10 min en hielo y se les agregó 475 µL de caldo de crecimiento súper óptimo conteniendo glucosa (SOC, por sus siglas en inglés). Se incubó 1 h a 37 °C bajo agitación a 225 rpm. Se sembraron 100-200 µL de la mezcla de transformación en placas de LB-agar conteniendo 50 µg/mL de ampicilina (LB-ampicilina) y se incubaron a 37 °C por 16 hs para la evaluación del crecimiento de colonias transformantes.

#### **4.1.1.4 Purificación de plásmidos**

Para extraer y purificar los plásmidos se utilizó el método de lisis alcalina [53], el cual se detalla brevemente a continuación. Se realizó un pre-cultivo de 3 mL de medio LB-ampicilina con una colonia fresca o a partir de un stock en glicerol conservado a -80 °C. Se incubó el mismo a 37 °C bajo agitación a 225 rpm por 16 hs, se centrifugó 1 min a 12.000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el sedimento en 200 µL de Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM y se agregó 5 µL de ARNasa a 10 mg/mL. Posteriormente se agregó 200 µL de una solución recién preparada de NaOH 200 mM, SDS 1% y se mezcló por inversión suavemente, incubando 5 min a temperatura ambiente (TA). Luego se agregaron 200 µL de una solución de acetato de potasio 3 M pH 4.8 previamente enfriada en hielo, observándose la aparición de turbidez blanca debida a la precipitación de proteínas y del ADN cromosómico. Se mezcló por inversión, se incubó 5 min en hielo y se centrifugó a 12.000 rpm por 20 min recuperándose en el sobrenadante el ADN plasmídico. Al sobrenadante se le agregó 0.6 volúmenes de isopropanol para precipitar el ADN plasmídico, se incubó 15 min en hielo y se centrifugó a 12.000 rpm a 4 °C durante 20 min. Posteriormente, se descartó el sobrenadante, se lavó el sedimento con 750 µL de etanol 70% frío, se centrifugó a 12.000 rpm 5 min a TA, se descartó nuevamente el sobrenadante y se secó el sedimento para finalmente resuspenderlo en 50 µL de H<sub>2</sub>O miliQ. El ADN plasmídico obtenido se cuantificó como se describe más adelante y se conservó a -20 °C. En los casos que se envió el ADN a secuenciar se purificó el ADN plasmídico utilizando el kit comercial Zymo Research (#D4036), siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **4.1.1.5 Electroforesis en geles de agarosa y purificación de fragmentos de interés**

Se preparó geles de agarosa al 1 y 0.5% utilizando buffer Tris-Acetato-EDTA 1X (TAE) (40 mM Tris-base pH 7.6, 20 mM ácido acético y 1 mM EDTA). Para visualizar los ácidos nucleicos con luz ultravioleta se utilizó el reactivo SYBR Safe (Invitrogen) Se utilizaron los marcadores de pares de bases (PM) GeneRuler 100pb y 1kb DNA Ladder (Fermentas). Las muestras se diluyeron a 1x con tampón de carga 6x (glicerol 50%, azul de bromofenol 0.02%, xilencianol 0.002%). Se realizó la corrida electroforética en TAE 1X , por 25 min a 120 V de los geles 1% agarosa mientras que los geles 0.5% agarosa se corrieron por 10 horas (hs) a 25 V. Cuando fue necesario purificar fragmentos de ADN a partir del gel se utilizó el kit Zymoclean® (Zymo Research #D4001) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **4.1.1.6 Cuantificación de ácidos nucleicos**

La cuantificación del ADN se realizó mediante medida espectrofotométrica en Nano Drop Lite (Thermo Scientific) a 260 nm, mientras que el grado de pureza se evaluó utilizando las relaciones entre las longitudes de onda 260/280 y 260/230. En paralelo se estimó la concentración mediante electroforesis en gel de agarosa, comparando la intensidad de la banda de interés con la intensidad correspondiente a las bandas del estándar de concentración conocida presentes en los marcadores de pares de bases.

### **4.1.2 Técnicas generales de biología celular**

#### **4.1.2.1 Cultivo de la línea celular Vero 2.2**

La línea celular Vero 2-2 (cedida por el Dr. Cornel Fraefel del Instituto de Virología de la Universidad de Zurich, Suiza) es una línea celular derivada de la línea Vero de epitelio de riñón de mono verde africano. A esta línea se le incorporó en el genoma el promotor y el gen ICP27 de HSV1 necesarios para la producción de los vectores virales HSV1. Dicha línea celular se cultivó a 37 °C bajo atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub> en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Gibco), conteniendo Suero Fetal Bovino al 10% (SBF, Gibco), antibiótico-antimicótico 1% (penicilina 100 Unidades/mL, streptomicina 100 µg/mL, anfotericina B 0.25 µg/mL, ATB/AM Gibco #15240-062) y G418 sulfato (geneticina 500 µg/mL, Gibco). Las células Vero se adhieren a la superficie y crecen en monocapa, por lo cual para mantener y/o expandir el cultivo fue necesario disgregarlas mediante la incubación con una solución de Tripsina 0.25%-EDTA 0.02%. Para mantener la línea celular se realizaron 2 pasajes semanales realizando una dilución 1:5 de la suspensión celular con medio fresco.

Para el conteo de células, se despegó la monocapa tripsinización como se describió anteriormente para el pasaje de las células. En el último paso de la tripsinización, se agregaron 10 mL de medio de cultivo. Se realizó una dilución 1/2 de las células en una solución de azul de tripán 0.4% y se cargó una cámara *Neubauer* una gota de células. Se realizó el conteo de células viables y no viables (de color azul) en los 4 cuadrantes laterales de la grilla de la cámara *Neubauer*, utilizando el microscopio invertido. Luego,

se realizó un promedio de las células contadas en cada cuadrante. Como el volumen de un cuadrante es de 1  $\mu\text{L}$ , se multiplicó por 1000 el número de células contadas para obtener el número de células por mililitro en la dilución 1/2. Para calcular el número correspondiente a la suspensión original, bastó con multiplicar por el factor de dilución (2 en este caso). El porcentaje de células viables se calculó multiplicando por 100 la división del número de células viables por el total de células contadas.

#### **4.1.2.2 Cultivo de la línea celular HeLa**

La línea celular HeLa deriva originalmente de células epiteliales de cuello uterino humano (*Homo sapiens*) con adenocarcinoma disponible en el laboratorio. La misma se utilizó para los ensayos de localización sub-celular de STAT1 y búsqueda de sustratos de OH1 y se mantuvo a 37 °C bajo una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub> en medio DMEM, conteniendo 10% de SFB descomplementado y 1% de ATB/AM. Al igual que las células Vero, esta línea es adherente por lo cual para contar, mantener y/o expandir el cultivo se procedió como se describió en el punto **4.1.2.1**.

#### **4.1.2.3 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

Para evaluar la localización sub-celular de STAT1 en presencia o ausencia de la OH1 se realizó una inmunofluorescencia indirecta sobre cultivos de células HeLa en placas de 96 y 24 pocillos. Luego de los distintos tratamientos se retiró el medio de las células y se realizaron dos lavados suaves con buffer de fosfato salino (PBS 1X). Posteriormente, se fijó las células con paraformaldehído al 4% durante 20 min a TA. Se lavó dos veces con PBS 1X y se permeabilizó con metanol 100% frío durante 10 min a -20 °C. Se lavó una vez con PBS 1X y se agregó el anticuerpo anti-STAT1 primario (Cell Signaling, #14994) a una dilución 1/400 en PBS 1X conteniendo 0.5% SFB, 0.3% BSA, 0.1% Tritón X-100. Se incubó durante 1.5 hs en cámara húmeda a 37 °C y alternativamente se incubó a 4 °C ON. Posteriormente se realizó tres lavados (PBS 1X conteniendo 0.1% Tritón X-100 y 0.5% SFB) y se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a cianina 3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, #111-165-144) diluido 1/500 en igual solución que el anticuerpo primario. Se incubó 1 hora en cámara húmeda a 37 °C. Posteriormente se realizaron tres lavados con solución de lavado, dos lavados con PBS 1X y un lavado con H<sub>2</sub>O MiliQ y se dejó secar los pocillos. Se agregó 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) y se incubó 15 min a TA, este compuesto se une fuertemente al ADN se utiliza normalmente como marcador nuclear. Se lavó con H<sub>2</sub>O MiliQ, se dejó secar y se adquirieron las imágenes en microscopio de epifluorescencia Olympus IX81 utilizando el software Micro manager. Las mismas se analizaron como se describe en la sección **4.3.2**.

#### **4.1.2.4 Obtención de extractos proteicos de células HeLa enriquecidos en fosfoproteínas**

En estudios previos llevados a cabo por la Dra. Mariana Margenat [54] se optimizó un protocolo para enriquecer los extractos de proteínas eucariotas en fosfoproteínas. Este protocolo se utilizó en la preparación de extractos de células HeLa y se describe a continuación. Partiendo de los cultivos celulares de interés, se quitó el medio y se cubrió las células con DMEM conteniendo ortovanadato de sodio (inhibidor competitivo de las fosfatasas endógenas) a una concentración final de 100  $\mu$ M, se incubó 40 min a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>, se quitó el medio conteniendo ortovanadato de sodio y se lavó los pocillos dos veces con PBS 1X. Posteriormente se agregó tampón de lisis a 4 °C (HEPES 25 mM pH 7.4; EDTA 1 mM; NaCl 150 mM; Tritón X-100 1%; glicerol 5%; cóctel de inhibidores de proteasas 1X Sigma #S8830) y se lisaron las células por disgregación mecánica utilizando una punta de micropipeta o un homogeneizador *Dounce*. A continuación se agregó iodoacetamida (IAA, Applichem) a una concentración final de 5 mM y se incubó 30 min en hielo. Esta etapa permite inhibir irreversiblemente las fosfatasas en tirosina endógenas mediante la alquilación de las Cys catalíticas de estas. Luego se realizaron dos ciclos de congelado (-20 °C) y descongelado (37 °C) y se agregó DTT a una concentración final de 10 mM durante 15 min en hielo para inactivar el exceso de IAA. El lisado se centrifugó a 14.000 rpm y 4 °C durante 25 min, se recuperó el sobrenadante enriquecido en fosfoproteínas, se filtró por una membrana de 0.22  $\mu$ m y las alícuotas se conservaron a -20 °C.

#### **4.1.2.5 Evaluación de la viabilidad celular**

Se realizaron experimentos de citometría de flujo para evaluar la viabilidad celular luego de introducir la expresión de OH1 en las células HeLa. Para ello las células fueron tratadas con el marcador de viabilidad fluorescente yoduro de propidio (IP), el cual entra a las células cuya membrana se encuentra dañada, intercalándose en el ADN de estas [55]. Se realizaron transducciones con los distintos vectores virales (HSV1-OH1wt-EGFP, HSV1-OH1C112S-EGFP y HSV1-EGFP) a una MOI de 1, de cultivos de células HeLa ( $1 \times 10^4$  células por pocillo) en placas de 96 pocillos de acuerdo a lo detallado en **4.3.1.1.2**. Además, se mantuvieron múltiples pocillos de células sin transfectar como control. A las 24 horas se despegaron las células agregando una solución de tripsina 0.25%-EDTA 0.02%, se centrifugaron a 1200 rpm por 5 min a TA y se resuspendieron en DMEM conteniendo EDTA 2 mM. Se realizó el conteo de un pocillo de células control como se describe en el punto **4.1.2.1**, y se utilizó este número como referencia para incubar el resto de las muestras con 2  $\mu$ g de IP por millón de células previo a ser analizadas en el citómetro de flujo. A continuación 3 réplicas analíticas del experimento se analizaron en un citómetro BD Accuri C6, contando entre 500 y 2000 eventos por experimento. En primer lugar, se definió la población celular presente en las muestras en base al gráfico FSC vs SSC de muestras control sin

transfectar y se subordinaron los análisis a esta población. Para la medición de la fluorescencia basal de GFP e IP se ajustó la fluorescencia en el canal FL-1 y FL-3 respectivamente con respecto a las células control sin transfectar. A su vez, se utilizó células transfectadas con el plásmido HSV1-EGFP para definir el umbral de señal positiva para fluorescencia de GFP en el canal FL-1 tomando como referencia el control negativo. Para la medición de IP se calibró el canal FL-3 con respecto a células control sin transfectar que fueron previamente incubadas 10 min a 65 °C para generar muerte celular. Se construyó un histograma con los datos de fluorescencia de las células control. En función de estos umbrales se calculó el % de células transducidas y el total que resultaron positivas para IP bajo las distintas condiciones evaluadas. Los datos se analizaron utilizando el software aportado por el proveedor.

### **4.1.3 Técnicas generales de bioquímica de proteínas**

#### **4.1.3.1 Electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Las proteínas obtenidas de distintos experimentos se separaron según su peso molecular mediante SDS-PAGE utilizando cubas de electroforesis BioRad (Mini-PROTEAN Tetra Cell 165-8000). Se prepararon geles de 1 y 1.5 mm de espesor, se utilizó gel concentrador al 6% (p/v) y un gel separador de 8 o 12% de acrilamida dependiendo de la muestra, utilizando el protocolo sugerido por BioRad. Las muestras se diluyeron a 1X con buffer de muestra 6X (BM) (Tris 0.35 M, SDS 10%, glicerol 30%, azul de bromofenol 0.02%), se les agregó DTT a una concentración final 50-100 mM, se calentaron 5 min a 95 °C, y se dejaron enfriar previo a ser sembradas en los pocillos del gel de electroforesis. Junto con las muestras, se sembró un marcador de peso molecular (PM) (Thermo, #26610 o New England Biolabs, #P7708s). La corrida electroforética se realizó a 60 V durante la entrada de la muestra al gel concentrador, y a 200 V durante el pasaje por el gel separador. Se utilizó como tampón de corrida Tris-glicina-SDS (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0.1%). Dependiendo del experimento, el gel se tiñó con azul de Coomassie coloidal G-250 (Azul Brillante de Coomassie G-250 0.2%, sulfato de aluminio-(14-18 hidrato) 5%, etanol 10%, ácido ortofosfórico 2%) o se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. Para la tinción con la solución de Coomassie coloidal se lavaron los geles tres veces en H<sub>2</sub>O miliQ durante 10 min con agitación, de esta forma se eliminaron restos de SDS que puedan interferir con la unión del colorante a las proteínas. Luego se incubó estos geles en la solución de Coomassie coloidal ON con agitación, se quitó el exceso de colorante con H<sub>2</sub>O miliQ y se lavó con H<sub>2</sub>O miliQ durante 10-60 min con agitación [56].

#### **4.1.3.2 Electrotransferencia e inmunodetección (western blot)**

Las muestras resueltas por SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Biorad) con el sistema de transferencia húmeda de BioRad, utilizando una solución tampón Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0.1%, etanol 20%. Las proteínas se

transfirieron durante 1 h a 100 V. Una vez finalizada la transferencia la membrana se bloqueó con una solución de seroalbúmina bovina (BSA) comercial (Invitrogen, #00-0105), durante toda la noche a 4 °C o durante 1 h a TA, según el anticuerpo utilizado. Se enjuagó la membrana brevemente con TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM) conteniendo Tween-20 al 0.1% (TBS-T) y se incubó con el anticuerpo primario diluido en TBS-T conteniendo 5% de BSA durante 90 min o toda la noche según el anticuerpo utilizado. Luego de tres lavados de 5 min cada uno se incubó la membrana durante 1 h con el anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina (FA) o a peroxidasa (HRP) según el experimento. Posteriormente, luego de tres lavados con TBS-T y un lavado con TBS de 5 min cada uno, se procedió al revelado. En los ensayos en que se utilizó el anticuerpo secundario conjugado a FA, se agregó el sustrato comercial BCIP/NBT (*blue liquid substrate system* Sigma #B3804) hasta la aparición de las bandas, normalmente 10-30 min. Cuando se utilizó el anticuerpo conjugado a HRP se reveló con el sustrato comercial *Super Signal West Pico Chemiluminescent substrate* (Thermo). En este caso se incubó la membrana 5 min con el sustrato, y luego se expuso en el equipo de quimioluminiscencia GBOX Chemi System (SynGene), haciendo exposiciones en general de entre 15-75 s dependiendo del anticuerpo utilizado. Se utilizaron los siguientes anticuerpos comerciales:

#### Anticuerpos primarios

Anticuerpo	Origen		Procedencia	Dilución
Anti fosfotirosina(pTyr)	Monoclonal	en	Invitrogen #136600	1/500
Anti STAT1	Monoclonal	en	Cell Signaling #14994	1/800 o 1/1600
Anti FosfoSTAT1	Monoclonal	en	Cell Signaling #9167	1/800

#### Anticuerpos secundarios

Anticuerpo	Origen		Procedencia	Dilución
Anti ratón-AP	Policlonal	en	Sigma #A3562	1/30000
Anti conejo-AP	Policlonal	en	Abcam #AB98487	1/5000
Anti conejo-HRP	Policlonal	en	Sigma #A0545	1/80000

Cuando fue necesario evaluar más de un anticuerpo sobre una misma membrana, se procedió a remover los anticuerpos y el agente bloqueante previos mediante incubación con hidrocloreuro de guanidina (GndCl). Para esto se incubó la membrana durante 30 min con agitación en una solución de GndCl 6,5 M y se lavó dos veces por 5 min con TBS.

#### 4.1.3.3 Producción recombinante de la fosfatasa OH1-C112S

Se realizó la expresión como proteína recombinante de la fosfatasa catalíticamente inactiva (mutante OH1-C112S) en *E.coli*. Para ello se utilizó un protocolo optimizado por el MSc. Danilo Segovia [33], [34]. Se utilizaron células transformadas de *E.coli* BL21(DE3)Star conteniendo el plásmido pET28a (+) que porta el gen de OH1-C112S más una cola de histidinas (His-Tag) en su N-terminal. A partir de este stock se realizó un pre-cultivo de 3 mL en LB con kanamicina (50 µg/ml) incubándolo toda la noche a 37 °C bajo agitación a 200 rpm. Al día siguiente, se inoculó medio auto inductor ZY(N-Z *amine Yeast extract*)M 5052 [57] con 1 mL de pre-cultivo cada 100 mL de medio fresco conteniendo el mismo antibiótico (500 mL totales). Se dejó crecer las células a 37 °C con agitación a 200 rpm hasta alcanzar una DO a 600 nm de 0.6. Una vez alcanzado este punto, se continuó el cultivo a 16 °C bajo agitación de 200 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600nm</sub> mayor o igual a 10 (aproximadamente a las 24 hs). Una vez finalizada la expresión, se colectaron las células mediante centrifugación a 6000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, y luego el sedimento celular fue resuspendido en buffer de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 0.5 M, glicerol 10%). A la suspensión celular se le agregó un cóctel de inhibidores de proteasa (Sigma S8830), lisozima a una concentración final de 0.1 µg/mL y se mantuvo a 4 °C. Se lisaron las células mediante sonicación (Sonic Ruptor 250, 20 ciclos de 1 min, Power output 50, Pulser 40%, intervalos de 30 s de descanso). Posteriormente el lisado se incubó con una concentración final de ADNasa I a 5 µg/mL y MgCl<sub>2</sub> a 10 mM, durante una hora a 4 °C. Luego, se procedió a centrifugar el lisado a 13000 rpm durante 1 hora a 4 °C, se recogió el sobrenadante a cual se le verificó el pH, se filtró por 0.2 µm y se utilizó para la purificación mediante cromatografía de afinidad a metal (Cu<sup>2+</sup>) inmovilizado (IMAC). Para la cromatografía, se utilizaron 3 mL de matriz IMAC-Cu por cada 40 mL de sobrenadante procesado, la cual se incubó con esta fracción durante 40 min, a TA y en *batch*. Se recogió el percolado (que contiene las proteínas que no se unieron a la matriz) y se realizaron seis lavados con 5 mL de tampón de lisis suplementado con imidazol 20 mM. La elución se realizó con tampón de lisis conteniendo imidazol 300 mM. Para eliminar el His-Tag la fracción eluída se incubó con la proteasa TEV<sub>SH</sub> recombinante [58] ON a 18 °C, al mismo tiempo que se realizó la diálisis para remover el imidazol hasta una concentración de 20 mM. El producto obtenido se aplicó de forma secuencial a tres columnas IMAC para asegurar la remoción del His.tag digerido, la TEV<sub>SH</sub> (que también contiene His-tag) y la proteína sin digerir, recuperándose el percolado con la OH1-C112S purificada por afinidad. Posteriormente, se concentró dicha fracción hasta un volumen de 4 mL mediante ultrafiltración (centricones de 10 kDa de corte). Como último paso de purificación, esta fracción se realizó una cromatografía de exclusión molecular. Para ello se inyectó la muestra en una columna preparativa *Hi Load 16/60 Superdex 200* (GE) conectada a un equipo *AKTA prime plus* (GE Healthcare). Se registró la Abs 280 nm en las fracciones que eluyeron obteniéndose un cromatograma de la corrida. Se seleccionaron las fracciones correspondientes al pico del cromatograma que indica la

presencia de la proteína de interés ( $V_e = 84$  mL). Finalmente, se concentró la misma y se alicuotó y almacenó a  $-20$  °C. Las fracciones de los diferentes pasos de purificación se analizaron por SDS-PAGE en un gel separador de 12% como se detalla en la parte **4.1.3.1.**

#### **4.1.3.4 Determinación de la concentración de proteínas**

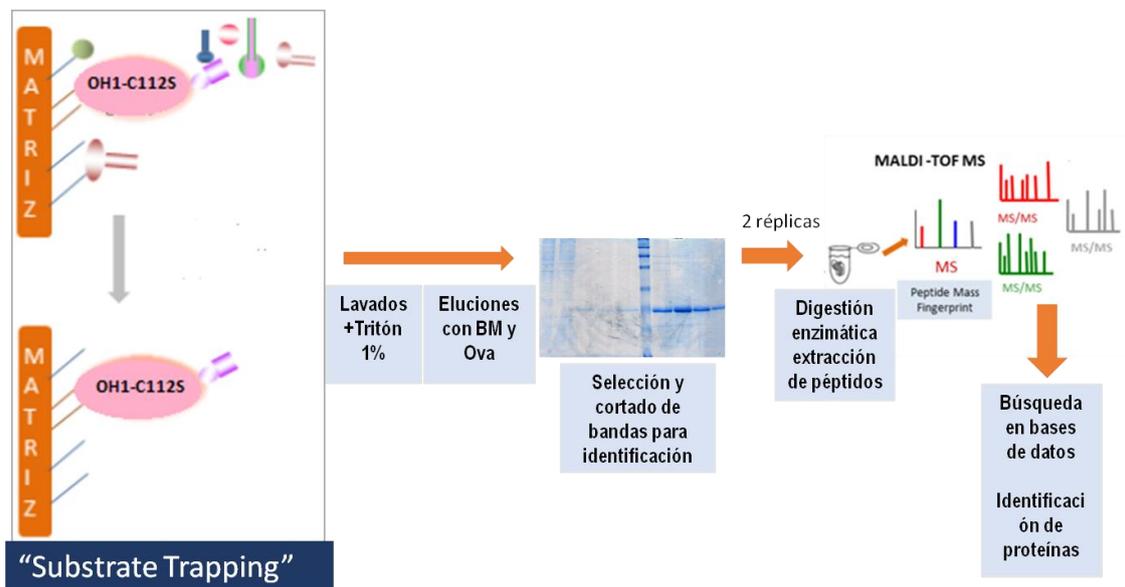
Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método de Bradford en placa de 96 pocillos. El método se basa en la interacción del azul de Coomassie G-250 con residuos de Arg, Trp, His y Phe, presentes en las proteínas. Esta interacción provoca un corrimiento en el espectro de absorción del azul de Coomassie desde el marrón hacia el color azul, detectable midiendo la absorbancia a 595 nm. Para realizar la reacción, se mezclaron 150  $\mu$ L de reactivo de Bradford con 5  $\mu$ L de muestra pura o en distintas diluciones, en un pocillo de la placa. Se dejó desarrollar el color durante 5 minutos y se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro con lector de placas. Para determinar la concentración se obtuvo en primer lugar una curva de calibración realizada con soluciones de concentración conocida de BSA diluida en H<sub>2</sub>O miliQ, en el rango de 0.1 mg/mL a 1 mg/mL [59]. Se ajustaron los valores obtenidos a una recta y la ecuación de la misma se utilizó para determinar la concentración de las muestras de interés. Los puntos de la curva de calibración y las muestras se analizaron por triplicado, utilizándose en los análisis el promedio de los valores de Abs, considerando el desvío estándar de los mismos.

## 4.2. Búsqueda de interactores eucariotas de OH1 mediante la técnica de *Substrate Trapping* (ST)

Con el fin de abordar el Objetivo específico 1 se realizaron ensayos *in vitro* de captura de proteínas buscando identificar interactores proteicos de OH1. Para ello se utilizó la estrategia denominada *Substrate Trapping* (ST), optimizada y aplicada con éxito por nuestro grupo, en la identificación de potenciales sustratos de una fosfatasa en tirosina de *Mycobacterium tuberculosis* [47]. La misma consiste en incubar el mutante catalítico de la fosfatasa en tirosina (en nuestro caso OH1-C112S) previamente inmovilizado covalentemente a una matriz de sefarosa, con un extracto proteico enriquecido en proteínas fosforiladas en tirosina [46]. Por lo tanto, se necesitó contar con la OH1-C112S recombinante inmovilizada, y los extractos proteicos de células HeLa enriquecidos en P-Tyr proteínas. En este caso, las células HeLa se expandieron como se detalla previamente en **4.1.2.2** hasta una confluencia de 80% para luego estimularlas con INF $\gamma$  (Gibco #PHC4031, 2 U/millón de células) por 30 min a 37 °C y 5% de CO $_2$ . Finalmente, se realizó la extracción proteica según lo detallado en **4.1.2.4**. La proteína recombinante OH1-C112S obtenida como se describe en **4.1.3.3**, se inmovilizó a través de los grupos  $\epsilon$ -amino a una matriz de NHS-Sefarosa activada (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se lavó la matriz (100  $\mu$ L) con HCl 1 mM frío, se agregaron inmediatamente 300  $\mu$ g de OH1-C112S diluida en buffer de inmovilización (NaHCO $_3$  0.2 M, NaCl 0.5 M pH 8.3) y se incubó durante 16 hs a 4 °C. A continuación, se bloqueó los grupos libres de la matriz con etanolamina 0.5 M pH 8.3, NaCl 0.5 M, ON a 4 °C. A continuación esta se lavó con 200  $\mu$ L de tampón Tris-HCl 0.1 M pH 8.0, 200  $\mu$ L de buffer acetato 0.1 M pH 4.5, NaCl 0.5 M, repitiéndose este ciclo de lavados tres veces. Finalmente, se equilibró la matriz con buffer de trabajo SPR (HEPES 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, Tween 20 0.005% conteniendo cóctel inhibidor de proteasas 1X). Para determinar el rendimiento de la inmovilización se cuantificó la concentración de proteínas en el sobrenadante de inmovilización y se comparó con la cantidad de OH1-C112S ofrecida a la matriz. Simultáneamente, se utilizó una matriz control, tratada de la misma manera pero sin incubar con OH1-C112S. Esta matriz se utilizó para evaluar las uniones inespecíficas de proteínas a la matriz de sefarosa bloqueada.

Se realizaron 2 ensayos de este experimento, utilizando diferentes lotes de producción de OH1-C112S y del extracto proteico de HeLa. En la Figura 10 se muestra el esquema del procedimiento de ST realizado. Se incubaron 100  $\mu$ L de OH1-C112S inmovilizada con 1.95 mg totales de extracto de proteínas de células HeLa, diluido a una concentración final de 0.078 mg/mL en buffer SPR, durante 1 h a 4 °C con agitación suave en un rotor orbital. La matriz se colectó por centrifugación suave (10 min a 900 x

g) guardándose una alícuota del percolado para posterior análisis por SDS-PAGE. Posteriormente, se realizaron seis lavados de la matriz, tres veces con 200  $\mu$ L de tampón SPR y tres veces con 100  $\mu$ L de mismo buffer conteniendo Tritón X-100 al 1%. Como estrategia de elución se utilizó incubar la matriz con 100  $\mu$ L del inhibidor competitivo ortovanadato de sodio 25 mM (Sigma) en HEPES 25 mM pH 7.4 y se recuperó el sobrenadante. Como segunda condición de elución se utilizó incubar con BM de SDS-PAGE. Para ello se agregó 50  $\mu$ L de BM 2X a la matriz, se calentó a 95  $^{\circ}$ C por 5 min, se centrifugó (1 min a 1000 x g) y se recuperó el sobrenadante. Luego, se hizo tres eluciones más agregando 50  $\mu$ L de BM 1X, repitiendo el procedimiento. Los lavados y eluatos de las primeras 2 réplicas fueron analizados por SDS-PAGE al 12% seguido de tinción con Coomassie coloidal. Las bandas de proteínas eluidas se cortaron en secciones de 2 mm de gel, y cada una se analizó por MALDI-TOF-TOF MS/MS.



**Figura 10-** Esquema de trabajo de metodología *Substrate Trapping* para la identificación de interactores de OH1. Se indica la fosfatasa mutante del sitio catalítico OH1-C1125 en rosado, proteínas extraídas de células HeLa como bastones de distintos colores y los pasos a seguir luego de la interacción de la fosfatasa con el extracto proteico.

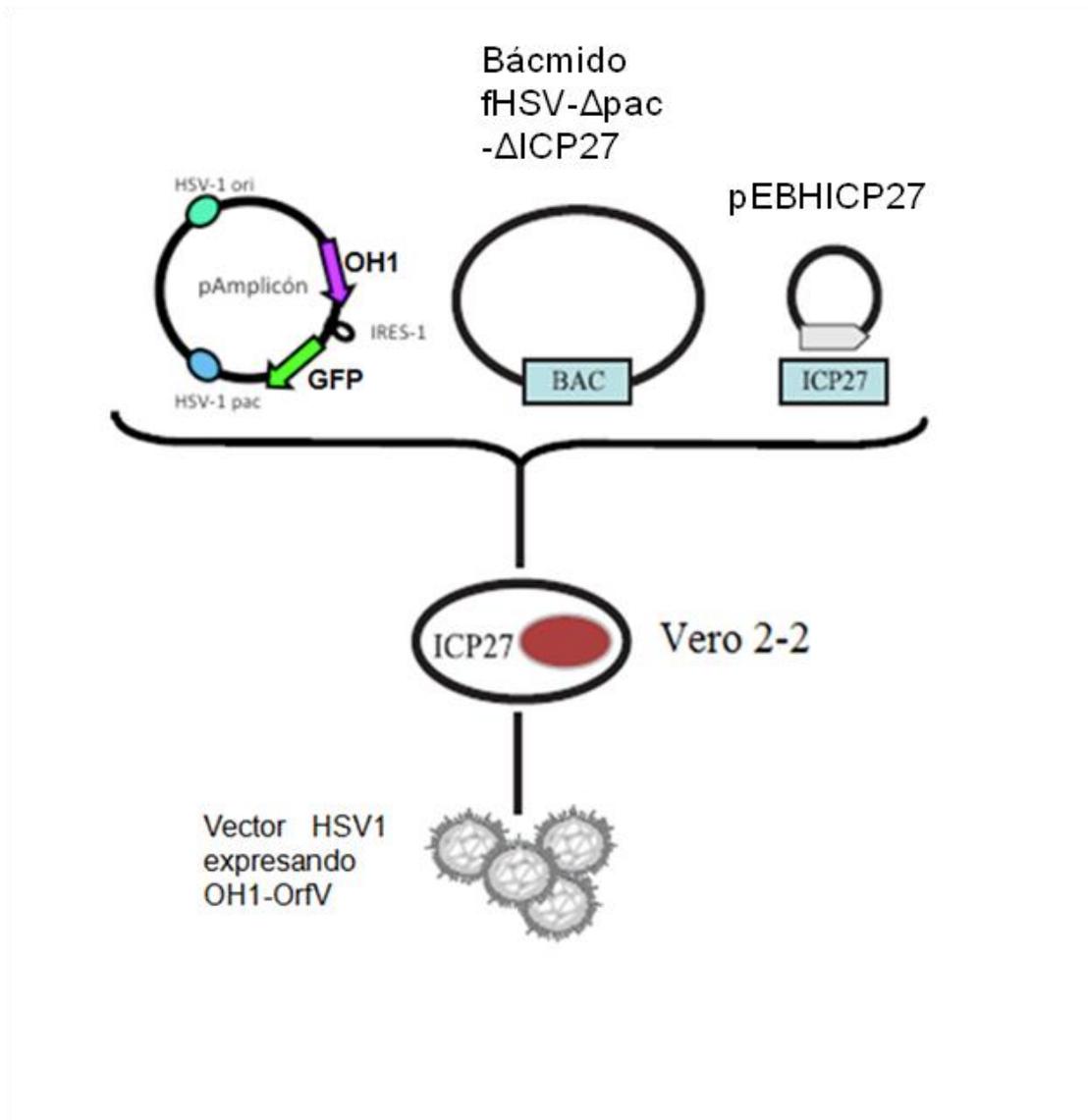
### 4.3. Evaluación del efecto de OH1 en STAT1 en un modelo celular eucariota

Con el fin de abordar el Objetivo específico 2 fue necesario poner a punto dos sistemas de expresión del gen de OH1 en la línea celular HeLa, lo que permitió evaluar el efecto de OH1 sobre la localización sub-celular y la fosforilación de STAT1.

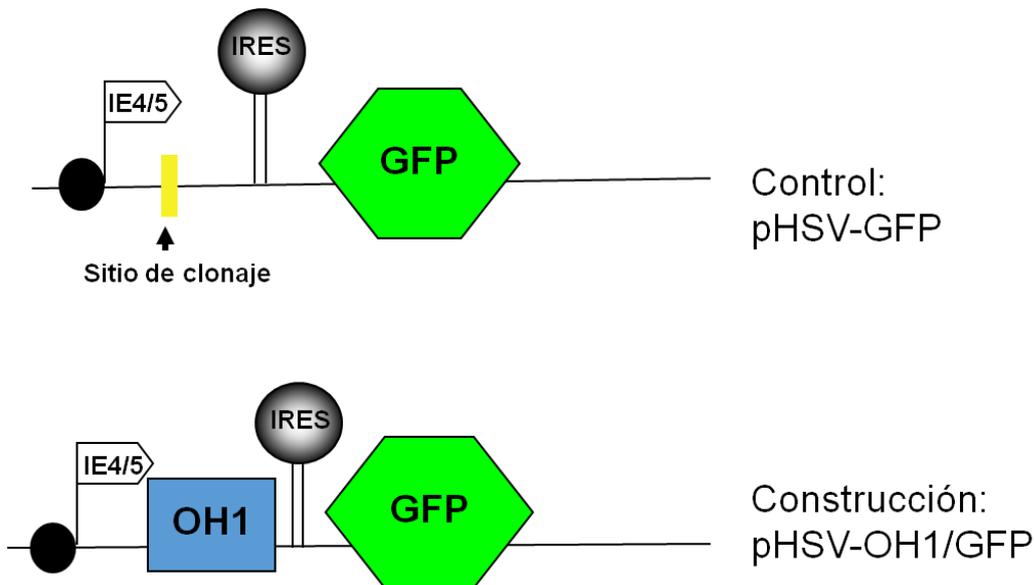
### **4.3.1 Expresión de OH1 en células HeLa**

#### **4.3.1.1 Sistema de transducción con vectores basados en el virus Herpes Simple tipo 1**

Los vectores virales basados en el virus Herpes Simple tipo 1 (HSV1), tipo amplicón, 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. La naturaleza de su diseño hace del mismo una partícula inocua a nivel de toxicidad celular conservando la capacidad de ingresar a muchos tipos celulares [60]. Para la producción de este vector HSV1 se debe realizar la co-transfección de la línea celular Vero 2-2 con: (i) un plásmido amplicón conteniendo el gen de interés (pHSV-IRES-EGFP), (ii) un plásmido codificando un gen esencial (pEBHICP27) para la replicación del virus herpes, y (iii) un bácmido auxiliar que proporciona el genoma viral necesarios para la síntesis de las partículas virales (fHSV- $\Delta$ pac- $\Delta$ ICP27) (Figura 11). Este sistema se encontraba disponible en nuestro grupo y fue cedido por el Dr. Fraefel del Instituto de Virología de la Universidad de Zürich, Suiza. A continuación se describe la obtención de los componentes de este sistema:



**Figura 11- Esquema de producción de vectores HSV1 de tipo amplicón, expresando OH1 como gen heterólogo.** Se indican el plásmido amplicón (pAmplicón) con origen de replicación y señal de empaquetamiento de Herpes virus (HSV-1 ori y HSV-1 pac respectivamente), el bácmido conteniendo el genoma de HSV1 sin señal de empaquetamiento ni el gen esencial ICP7 (Bácmido fHSV-Δpac-ΔICP27), el plásmido de expresión del gen ICP27 (pEBHICP27) y las células empaquetadoras Vero 2-2 codificando ICP27. Imagen adaptada de [60].



**Figura 12- Esquema de casete de expresión de plásmido pHSV-IRES-EGFP y construcciones expresando OH1.**  
 Se indican las ubicaciones de las secuencias correspondientes a la fosfatasa OH1, el gen reportero de la proteína verde fluorescente (GFP), el sitio de entrada interno de ribosomas (IRES), el promotor inmediatamente temprano del virus Herpes (IE4/5) y el sitio de clonaje múltiple.

(i) El plásmido amplicón pHSV-IRES-EGFP [61] contiene un casete de expresión con el promotor temprano IE4/5 de HSV1, seguido del sitio de clonado múltiple, un sitio interno de entrada del ribosoma (IRES) y el gen de la proteína verde fluorescente (GFP)(Figura 12). Este plásmido contiene además un origen de replicación del virus Herpes y una señal de empaquetamiento en la cápside viral del HSV1 (Figura 11).

Como primera aproximación a la obtención del plásmido amplicón conteniendo el gen de OH1wt (pHSV1-OH1wt-IRES-EGFP) y el mutante inactivo OH1-C112S (pHSV1-OH1-C112S-IRES-GFP) se utilizó la estrategia de clonaje por PCR, libre de enzimas de restricción [62]. Esta técnica se basa en la obtención de mega-cebadores en una primer PCR, utilizando cebadores con homología con el gen que se busca amplificar y un agregado homólogo al vector donde se desea insertar. Los cebadores diseñados y obtenidos comercialmente (Macrogen) fueron:

**RFPTP for 2**

5'-AGGAGGAACGTCCTCGTATAGCTTGCAATGGGCGATAAGAGCGAGTGG-3'

**RFPTP rev 2**

5'-GGTACAACCCAGAGCTGTTTTAAAGCTTTTAGGACGGCGAGTCGCAGACG-3'

\*En negro se indica la secuencia complementaria a OH1, en rojo se indica la secuencia complementaria a pHSV1-IRES-EGFP y en verde se indica la secuencia correspondiente al sitio de corte de Hind III.

Estos cebadores se utilizaron para amplificar la secuencia de OH1wt a partir de una extracción de ADN genómico de la cepa de campo 11 de OrfV preparadas por la MSc. Natalia Olivero [63]. Para amplificar el mutante inactivo OH1-C112S se utilizó el plásmido pEt28a (+) conteniendo el gen de dicho mutante descrito previamente [33]. Se utilizó la enzima Taq DNA polimerasa (Fermentas) siguiendo las instrucciones del fabricante. En un volumen final de 50  $\mu$ L, conteniendo 5  $\mu$ L de buffer 10X *Taq*, 1  $\mu$ L de solución de dNTPs (10 mM cada uno), 1.5  $\mu$ L de cada cebador (10  $\mu$ M), 0.2  $\mu$ L de ADN polimerasa (5 U/  $\mu$ L), 4  $\mu$ L de  $MgCl_2$  (25 mM), llevando a volumen con  $H_2O$ . El ciclado consistió de 3 min a 95  $^{\circ}C$ , seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95  $^{\circ}C$  por 30 s, hibridación a 55  $^{\circ}C$  por 30 s y polimerización a 72  $^{\circ}C$  por 2 min, finalizando con una etapa de 72  $^{\circ}C$  por 10 min. El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa 1% y se purificó de acuerdo a lo detallado en el punto **4.1.1.5**. Una vez obtenidos los megacebadores purificados, se realizó la segunda ronda de PCR utilizando el plásmido pHSV1-IRES-EGFP como molde utilizando la enzima DNA polimerasa Phusion (Thermo Scientific). En un volumen final de 50  $\mu$ L, conteniendo 10  $\mu$ L de buffer 5x *Phusion HF*, 1  $\mu$ L de solución de dNTPs [10 mM] cada uno, 200 ng de megacebador, 0.8  $\mu$ L de ADN polimerasa [2 U/ $\mu$ L] y 400 ng de plásmido. El ciclado consistió de 1 min a 98  $^{\circ}C$ , seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 98  $^{\circ}C$  por 30 s, hibridación a 68  $^{\circ}C$  por 30 s y polimerización a 72  $^{\circ}C$  por 5 s, finalizando con una incubación a 72  $^{\circ}C$  por 7 min. Luego de la amplificación se digirió el ADN parental metilado con la enzima Dpn I y se transformaron células quimio-competentes NEB<sup>®</sup>5-alpha como se detalla en la parte **4.1.1.3**. Si bien se probaron varias condiciones del protocolo no se lograron obtener resultados positivos. Por lo tanto, como segunda aproximación se realizó un clonado clásico con enzimas de restricción, utilizando las secuencias de Hind III presentes a ambos lados de los megacebadores generados y en la secuencia de pHSV1-IRES-EGFP. Los mega-cebadores obtenidos fueron digeridos con Hind III por 2 hs a 37  $^{\circ}C$  y se inactivó la enzima por 20 min a 80  $^{\circ}C$ . El producto de digestión se migró en un gel de agarosa y se purificó como se detalla en el punto **4.1.1.5**. El plásmido pHSV1-IRES-EGFP también se digirió con la Hind III, durante 3 hs a 37  $^{\circ}C$  y se inactivo por 20 min a 80  $^{\circ}C$ . Luego de la digestión, se desfosforiló el plásmido para evitar religación del mismo, utilizando fosfatasa alcalina (Fast AP Thermo #EF0651) durante 10 min a 37  $^{\circ}C$ . A continuación, se purificó el plásmido desfosforilado mediante el kit MNnucleospin (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos se ligaron con 2 Weiss U de T4 DNA ligasa (Thermo) en un volumen de 20  $\mu$ L, durante 1 h a TA, conteniendo 60 ng del plásmido y 30 ng del inserto. Posteriormente se inactivó la enzima durante 5 min a 70  $^{\circ}C$ . Con el producto de ligación se transformaron células NEB<sup>®</sup>5-alpha como se detalla en el apartado **4.1.1.3**. Con algunas de las colonias transformantes obtenidas se realizaron purificaciones del ADN plasmídico por lisis alcalina. Utilizando estos como molde se realizó una doble digestión con Eco RI y Sal I para confirmar la correcta inserción y orientación del gen de interés. Los plásmidos seleccionados por esta técnica fueron confirmados mediante secuenciación, utilizando un nuevo stock del plásmido purificado con un kit comercial.

(ii) El plásmido pEBHICP27 conteniendo el gen ICP27, esencial para el sistema basado en Herpes virus, fue producido y purificado como se detalla en **4.1.1.3** y **4.1.1.4**.

(iii) El bácmido fHSV- $\Delta$ pac- $\Delta$ ICP27 es un cromosoma bacteriano artificial de unos 150 kpb, porta un gen de resistencia al cloranfenicol y el genoma viral que es esencial para la producción de los vectores HSV1 tipo amplicón [64]. Este genoma es defectivo (incapaz de producir progenie viral) ya que carece del gen esencial ICP27 y además de la señal de empaquetamiento, lo que minimiza que se produzcan partículas virales con este genoma auxiliar. Con el fin de expandir y purificar este bácmido se prepararon y transformaron células de *E.coli* DH5- $\alpha$  electro-competentes de acuerdo a lo detallado en **4.1.1.1** y **4.1.1.2**. Se sembraron las células transformadas en una placa de LB-agar conteniendo cloranfenicol (12.5  $\mu$ g/mL), se incubó por 20 hs a 37 °C y se aisló una colonia fresca. Se realizó un pre-cultivo de 3 mL de LB-cloranfenicol y se incubó 8 hs a 37 °C con agitación a 280 rpm. Un volumen de 500  $\mu$ L de este pre-cultivo se utilizó para inocular 500 mL de LB- cloranfenicol, el cual se incubó a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una densidad celular de 3–4 x 10<sup>9</sup> unidades formadoras de colonias por mL (ufc/mL). Para determinar las fases de crecimiento y el número de ufc/mL se realizó previamente una curva de crecimiento. Se cosecharon las células mediante centrifugación a 6000 x *g* durante 15 min a 4 °C. El plásmido expandido se purificó utilizando un kit adaptado para construcciones de gran tamaño (QIAGEN, #12462), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración del bácmido fHSV- $\Delta$ pac- $\Delta$ ICP27 purificado se cuantificó mediante espectrofotometría UV y análisis cuantitativo en gel de agarosa. Además, se verificó la identidad del mismo mediante el análisis del patrón de restricción en geles de agarosa utilizando Hind III y Kpn I, contando para ello con un control positivo correspondiente al bácmido original.

#### **4.3.1.1.1. Producción de vectores HSV1 portando los genes de interés**

Con la finalidad de producir los vectores virales se realizó una transfección múltiple, en células Vero 2-2, con los tres componentes obtenidos en el punto anterior. La producción se optimizó utilizando el plásmido amplicón pHSV1-IRES-EGFP sin el gen de la fosfatasa (plásmido control). Este paso es importante para corroborar la integridad y el correcto funcionamiento del bácmido auxiliar utilizado. Para ello se sembró 3.3 x 10<sup>6</sup> células Vero 2-2 (en 10 mL de DMEM suplementado con SFB 10%, ATB/AM 1%) en placas de cultivo de 10 cm (p100) y se incubó ON a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Por cada placa se preparó dos soluciones, una conteniendo 690  $\mu$ L de Optimem más 46.4  $\mu$ L de Lipofectamina LTX<sup>®</sup> (Thermo) y la otra conteniendo el mismo volumen de Optimem más el ADN (5.5  $\mu$ g de bácmido fHSV- $\Delta$ pac- $\Delta$ ICP27, 0.5  $\mu$ g del plásmido pEBHICP27, 1.1  $\mu$ g de plásmido amplicón). Se agitó levemente cada tubo y se agregó cuidadosamente 27.6  $\mu$ L de reactivo PLUS (Thermo) al tubo conteniendo el ADN. Se incubó este tubo por 5 min, se mezcló gentilmente y se incubó 5 min más. De no haber un precipitado visible se agregó el contenido del tubo con lipofectamina al tubo con ADN, se mezcló suavemente y se incubó por 30 min. Se agregó 2.5 mL de Optimem y se mezcló por

inversión. Un volumen de 3.6 mL de esta mezcla se agregó a las placas de células Vero 2-2, previamente lavadas con Optimem. Se incubaron las mismas por 4 hs a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5% cuidando de mover la placa cada hora. Luego, se lavaron las placas tres veces con Optimem y se agregó 9.6 mL de DMEM conteniendo SFB 6%. Se incubó por 4 días a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5%. A los 4 días se desprendieron las células por disgregación mecánica, se colectaron, se mantuvieron en hielo y posteriormente se centrifugaron a 1400 x *g* y 4 °C por 10 min, para finalmente recuperar los vectores obtenidos en el sobrenadante. Para liberar los vectores contenidos dentro de las células presentes en el sedimento, este se resuspendió en 250 µL de medio y se realizaron tres ciclos de congelado y descongelado en N<sub>2</sub> líquido y H<sub>2</sub>O a 37° C, respectivamente. Se repitió la centrifugación y se recuperó un nuevo sobrenadante conteniendo vectores, el cual se juntó con el obtenido en primera instancia. El mismo se alicuotó y guardó a -80 °C para su posterior titulación y concentración por ultra-centrifugación en colchón de sacarosa 25 % por 3 horas a 4 °C y 100.000 x *g*. Los stocks concentrados de vectores virales se resuspendieron en PBS 1X, se alicuotaron y almacenaron a -80 °C. La titulación se realizó mediante cuantificación por conteo de focos fluorescentes (FF) en las células Vero 2-2, ya que los vectores HSV1 expresan la proteína verde fluorescente (GFP) como gen reportero. Se sembraron 1x10<sup>5</sup> células Vero 2-2 en cada pocillo de una placa de 24 como se detalla en **4.1.2.2**. Al siguiente día se reemplazó el medio por 250 µL por pocillo de DMEM conteniendo SFB 2%, ATB/AM 1%, se inocularon por duplicado diluciones seriadas de los vectores producidos. Luego de 48 hs de incubación se contaron FF en un microscopio de epifluorescencia Olympus IX81, utilizando el software Micro manager para el análisis de las imágenes. Se contaron los pocillos con 15-40 FF y con el valor obtenido para la dilución donde se realizó el conteo se calculó el título de cada stock en unidades transducentes por mL (UT/mL). A su vez, como se detalla en **4.1.2.5**, se realizaron experimentos de viabilidad celular mediante citometría de flujo en cultivos tratados con los stocks virales generados.

#### **4.3.1.1.2. Transducción de células HeLa con los vectores HSV1**

Utilizando los vectores producidos y descritos en el punto anterior, se realizó la puesta a punto de la transducción en placas de cultivo celular de 96 pocillos, sembrando 5x10<sup>3</sup> células HeLa por pocillo en el medio y condiciones detalladas en **4.1.2.2**. Al día siguiente se incubó las células durante 1 h con el vector viral contenido en un volumen de 50 µL por pocillo, con el objetivo de promover el contacto de los vectores con las células. Se probó 0.5, 1 y 2 como multiplicidades de infección (MOI), siendo 1 la MOI seleccionada. Luego, se completó el pocillo con medio de cultivo a un volumen final de 100 µL y se incubó 24 hs para permitir la expresión de los transgenes. A continuación se realizó la estimulación de las células con distintas concentraciones de INFγ (0.5, 1 y 2 Unidades/millón de células), con la finalidad de que se active la respuesta mediada por interferón y de esta manera se promueva la activación de la vía JAK/STAT. Se incluyeron controles de células sin estimular con INFγ, sin transducir con el vector viral y sin ambos tratamientos. En última instancia se seleccionó la concentración de 2

U/mil como la más apropiada. Luego de la estimulación se realizó la IFI como se detalló en **4.1.2.3**, para evaluar el efecto de la expresión de OH1 en la localización del factor de transcripción STAT1.

#### **4.3.1.2 Transfección de células HeLa con los plásmidos pHSV1**

Como sistema de expresión alternativo, se realizó una transfección de células HeLa con los mismos 3 plásmidos (pHSV1-OH1wt-IRES-EGFP, pHSV1-OH1-C112S-IRES-EGFP, pHSV1-IRES-EGFP) utilizados para producir los vectores virales. Se realizó la transfección en placas de cultivo de 24 y 96 pocillos con  $5 \times 10^4$  y  $1 \times 10^4$  células respectivamente. Para las placas de 24 pocillos, a las 24 hs de sembradas las células se colocó en un tubo 1  $\mu\text{g}$  de ADN plasmídico en 50  $\mu\text{L}$  de Optimem y en paralelo en otro tubo 3  $\mu\text{L}$  de Lipofectamina LTX<sup>®</sup> con 50  $\mu\text{L}$  de Optimem. A continuación al tubo conteniendo el ADN plasmídico se le agregó 1  $\mu\text{L}$  de reactivo PLUS por cada  $\mu\text{g}$  de ADN y se incubó 5 min. Luego, se agregó la dilución de lipofectamina a dicho tubo y se incubó durante 30 min. Mientras tanto se lavó las células a transfectar con DMEM y luego se incubaron con DMEM SFB 2% descomplementado sin ATB/AM. Posteriormente se agregó gradualmente a cada pocillo 50  $\mu\text{L}$  de la mezcla ADN-lipofectamina. Se incubó 24 horas a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> para permitir la expresión de las proteínas de interés.

Para las placas de 96 pocillos, a las 24 hs de sembradas las células se colocó en un tubo 2.25  $\mu\text{g}$  de ADN plasmídico en 75  $\mu\text{L}$  de Optimem y en paralelo en otro tubo 1.5  $\mu\text{L}$  de Lipofectamina LTX<sup>®</sup> en 25  $\mu\text{L}$  de Optimem. Se agregó al tubo conteniendo el ADN 1  $\mu\text{L}$  de reactivo PLUS por cada  $\mu\text{g}$  de ADN y se incubó 5 min. Luego se agregó 25  $\mu\text{L}$  de dicha mezcla a los 25  $\mu\text{L}$  de dilución de lipofectamina y se incubó durante 30 min. Mientras tanto se lavó las células a transfectar con DMEM y se incubaron con DMEM SFB 2% descomplementado sin ATB/AM. Posteriormente se agregó gradualmente 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla ADN-lipofectamina a cada pocillo conteniendo las células. Se incubaron las células 24 hs a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>.

En ambos casos, luego de la expresión de las proteínas recombinantes, se estimuló las células con 2 U de INF $\gamma$ /millón de células diluido en PBS 1X y BSA 1% y se incubó 30 min a 37 °C. Posteriormente se quitó el INF $\gamma$  y se procedió a realizar la IFI como se detalla en **4.1.2.3**.

#### **4.3.2 Evaluación del efecto de OH1 sobre la localización sub-celular de STAT1**

Este estudio se realizó utilizando las condiciones seleccionadas en los ensayos de transducción y transfección en placas de 96 y 24 pocillos respectivamente de células HeLa, descritos en **4.3.1.1.2** y **4.3.1.2**. De esta forma se evaluaron tres condiciones, células expresando OH1wt, OH1-C112S o células control expresando solo GFP. Dado que ambos vectores (virales y plasmídicos) utilizados codifican para la expresión de GFP en tándem con la proteína de interés, la emisión de fluorescencia verde se utilizó para seleccionar las células a analizar en las imágenes adquiridas. Se contaron alrededor de 20 células o focos fluorescentes (FF) por cada imagen analizada. Se utilizó el marcador nuclear DAPI para identificar la ubicación del núcleo celular en cada FF y se evaluó la ubicación sub-celular de STAT1 con respecto a éste. Para cada condición evaluada, se relevó la cantidad de FF que presentaron una distribución nuclear de STAT1 o una localización citoplásmica. En total, se contaron entre 150 y 200 FF por cada condición en cada experimento realizado. Para ambos sistemas utilizados, se realizó 3 réplicas biológicas independientes, por lo que se relevaron aproximadamente 600 datos de cada condición. Los datos de cada condición se sumaron y analizaron realizando tablas de contingencia, utilizando el test exacto de Fisher para evaluar la significancia estadística de posibles diferencias observadas en la distribución de STAT1 en la célula (nuclear o citoplásmico).

#### **4.3.3 Evaluación del efecto de OH1 sobre el nivel de fosforilación de STAT1**

En este caso, se realizó la transfección y estimulación de células HeLa en placas de 96 pocillos de acuerdo a lo detallado previamente en **4.3.1.2**. Se realizó una extracción de proteínas enriquecidas en fosfo-residuos de estas muestras de acuerdo a lo detallado en **4.1.2.4** y se separaron por SDS-PAGE en geles al 8%. Luego de la electrotransferencia, se evaluó mediante inmunodetección la presencia de STAT1 total y de su forma fosforilada en cada condición, como se detalló en **4.1.3.2**. La adquisición de imágenes se realizó con el equipo GBOX ChemiSystem (SynGene). Se procesó las imágenes utilizando el software ImageJ [65] para calcular la intensidad de cada banda inmuno reactiva. De esta forma, para cada carril (o condición) se cuantificó el porcentaje de STAT1 fosforilado en función de STAT1 total, de forma de normalizar los resultados. Se realizaron tres réplicas biológicas de este experimento y se evaluó si las diferencias observadas en el porcentaje de STAT1 fosforilado entre las distintas condiciones fueron estadísticamente significativas mediante el test de t con datos pareados (N=3).

#### **4.4. Estudio *in-silico* de la interacción de OH1 con STAT1**

Luego de definir los posibles interactores de OH1, se abordó como último objetivo de esta tesis, la falta de un modelo molecular para esta interacción. Dichos experimentos se realizaron a lo largo de dos estancias de un mes en la Unidad de Matemática e Informática Aplicadas al Genoma y al Ambiente del INRA de Jouy en Josas, en el marco de un proyecto Ecos-sud de intercambio, a cargo de la Dra. Gwenaëlle André-LeRoux y la Dra. Andrea Villarino.

Si bien no hay información sobre OH1, se intentó modelar la interacción de esta fosfatasa con STAT1 de tres maneras distintas. En primer lugar, se realizó un acoplamiento molecular directamente a través del sitio catalítico de OH1 y la Tyr701 fosforilada de STAT1. Además, existe un modelo de interacción en dos pasos que ha sido propuesto para su fosfatasa homóloga VH1 [52]. Esta unión alternativa está fuertemente ligada a varios residuos en VH1, principalmente Arg29, Lys51, Tyr124, Lys128, Lys130 y Glu131. Se analizó si alguno de estos residuos se encuentra conservado con respecto a OH1, para esto se generó un alineamiento con información estructural utilizando ClustalW y ESPript (<http://esript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>) a partir de las secuencias de OH1, VH1 y VHR obtenidas de la base de datos PDB con los códigos 5NCR, 3CM3 y 1VHR respectivamente. Una vez determinados los residuos conservados en OH1, se modeló la posible interacción de OH1 con STAT1 a través del dominio SH2 y los residuos de este sitio alternativo de unión en OH1. Por último, se realizó un acoplamiento utilizando la Tyr36 de OH1 y Arg602 del dominio SH2 como restricción para la interacción, dado que este residuo de Tyr se encuentra conservado entre OH1, VH1 y VHR y se ha reportado como fosforilado en VHR [66].

##### **4.4.1 Preparación de las estructuras utilizadas**

Se tomó la estructura dimérica de OH1 de la base de datos PDB con el código 5NCR, se cargó la estructura en PyMOL [67], se removieron las moléculas de agua, sulfato y fosfato y se guardó como un archivo pdb único. Dado que la estructura de OH1 disponible en la base de datos es de un mutante OH1-C112S, para los acoplamientos moleculares que involucraron el sitio catalítico de OH1 se mutó la Ser112 a un residuo de Cys para simular la enzima wt.

Con respecto a STAT1, cabe destacar que la estructura de 1BF5 presente en [52] utilizado como referencia para el acoplamiento alternativo de OH1 contiene un dominio C-terminal donde no se es posible resolver la totalidad del bucle móvil (aminoácidos 682-711). Dado que este bucle contiene la Tyr701 fosforilada, este debió ser modelado y constituye una diferencia con el procedimiento original. El modelo fue realizado previamente por el grupo de trabajo, brevemente, se tomó las secuencias hasta de los dominios SH2 de STAT1 humano (1YVL), de *Dictyostelium discoideum* (1UUR) y de STAT3 y STAT5a de ratón (1BG1 y 1Y1U respectivamente) de la base de

datos PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/>). Estas secuencias se alinearon con la secuencia completa del dominio SH2 de STAT1 de humano como referencia, utilizando ClustalW y ESPript para agregar la información referente a las estructuras secundarias de los archivos pdb utilizados. Luego, se modeló por homología la estructura del dominio SH2 de humano completo con su Tyr701 fosforilada computando el alineamiento y todas las estructuras de rayos X resueltas previamente citadas como molde 3D. Se generaron 100 estructuras usando el software de modelización Modeller (mod9v13), para satisfacer las limitaciones espaciales generadas por el alineamiento con las proteínas de interés [68]. Los modelos con el mejor valor de score y la mejor estequiometría chequeada por Molprobity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>) [69] fueron analizados visualmente utilizando PyMOL. Se mantuvieron los mejores cuatro modelos y se tomaron para reconstruir la estructura completa del dímero de STAT1 en sus formas paralela unida a ADN y anti-paralela, mediante la superposición con las estructuras de 1BF5 y 1YVL como molde respectivamente. Por último, vale la pena mencionar que tanto el modelo generado, como la estructura en 1BF5 utilizada por Jardin y colaboradores [52], carecen a su vez del dominio ND (aminoácidos 1-136). Este dominio es importante para el tipo de dimerización adquirido por STAT1, pero es extremadamente móvil y puede acomodar grandes variaciones estructurales. Por esta razón no se incluyó en los modelos analizados.

3CM3 y 5CNR contienen estructuras desfosforiladas de VH1 y OH1 respectivamente, sin embargo, ha sido propuesto que la Tyr126 se encuentra fosforilada en VH1. Luego de realizar los ensayos de acoplamiento molecular para OH1 se procedió a agregar un grupo fosfato a esta Tyr para evaluar si su presencia es disruptiva para la interacción. Para esto se utilizó la herramienta de PyTMs disponible como complemento del programa de visualización molecular PyMOL [67].

#### **4.4.2 Acoplamiento molecular**

En primer lugar, se modeló la interacción entre OH1 y STAT1 utilizando el servidor de *docking* de proteína/proteína, GRAMMX (<http://vakser.bioinformatics.ku.edu/resources/gramm/grammx>) [70], [71]. Este recurso utiliza una metodología basada en la transformada rápida de Fourier e incluye el suavizado de potenciales, una etapa de refinamiento y el agregado de un sistema de puntuación basado en conocimiento previo. Debido a esto, es posible determinar que residuos del par receptor/ligando deberían estar presentes en la interacción generada.

Las estructuras que se le proporcionaron al servidor fueron siempre el dímero de OH1-C112S y el dominio SH2 modelado de STAT1. Se utilizó siempre el dímero de OH1 por que este presenta un puente disulfuro estabilizando su estructura dimérica, una característica única para este tipo de fosfatasa recientemente reportada por el grupo de trabajo [34]. A su vez, mediante análisis bioquímicos y estructurales se corroboró que esta fosfatasa existe como un dímero en solución. Incluso, nuestro grupo reportó

recientemente que se mantiene como dímero luego de eliminar el puente disulfuro [34]. Mientras que se seleccionó utilizar solo el dominio SH2 de STAT1 para mantener la mayor similitud con lo realizado por Jardin y colaboradores [52]. En base a esto, se subieron las estructuras al servidor y se utilizaron los parámetros estándar de acoplamiento proporcionados por este. El servidor genera hasta 10 complejos por cada acoplamiento realizado y los organiza del 1 al 10 en base a un *score* interno. Se realizó un acoplamiento estableciendo restricciones en base dos pares de residuos importantes reportados previamente en la literatura [52] y determinados como se detallo en la parte 4.4. Además, es posible seleccionar la cantidad de estos residuos pre-seleccionados que necesariamente deben interactuar entre sí en los complejos generados. Debido a esto, se realizaron dos acoplamientos entre estos mismos pares de residuos, seleccionando uno o los dos pares, como interactores. De esta forma se obtendrán por lo menos 20 complejos. Simultáneamente, se utilizó las mismas estructuras para realizar un acoplamiento sin restricciones, obteniéndose hasta 10 estructuras más.

Luego de obtener los complejos, se superpuso las estructuras del dominio SH2 de los resultados obtenidos sobre el monómero de tamaño completo de STAT1 utilizando la función *align* de PyMOL. Se evaluó si las estructuras de interacción obtenidas presentaban una incompatibilidad estérica con el monómero de tamaño completo de STAT1. Luego, se utilizó el mismo procedimiento para superponer el segundo monómero de STAT1 sobre las estructuras obtenidas y se generaron las formas paralela y anti-paralela de STAT1. Esto permitió analizar visualmente las estructuras restantes en un contexto estructural de STAT1 variado. Se buscó un posicionamiento común entre los modelos con y sin restricciones (agrupamiento, o *clustering*) y se identificaron los residuos más importantes involucrados en la interacción entre OH1 y STAT1 en el modelo propuesto. Una vez obtenido el modelo de interacción cumpliendo los criterios utilizados, se calculó la superficie de contacto y las características estructurales y químicas presentes en esta superficie (cantidad de residuos involucrados en la interacción, puentes de hidrógeno, puentes salinos). Para esto se utilizó el servidor PISA (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe/pisa/>) [72].

Alternativamente, se intentó modelar la interacción de OH1 a través de su sitio catalítico con la Tyr701 fosforilada del monómero de tamaño completo de STAT1 modelado. Para esto se utilizaron diversos recursos electrónicos como el servidor Patchdock[73], [74], Rosetta [75]o Haddock [76], [77]. Patchdock es una herramienta similar a GRAMMX dado que depende principalmente de la complementariedad estérica de las superficies moleculares para la generación de los complejos de interés. Por el otro lado, Rosseta y Haddock difieren con GRAMMX en que tienen una mayor capacidad de incorporar datos biológicos a los acoplamientos. En este caso se definieron los residuos involucrados en la interacción como Asp81, Cys112 y Arg118

para OH1 y p-Tyr701 para STAT1. Se analizaron los resultados mediante la misma metodología descrita previamente para GRAMMX.

## 5. Resultados

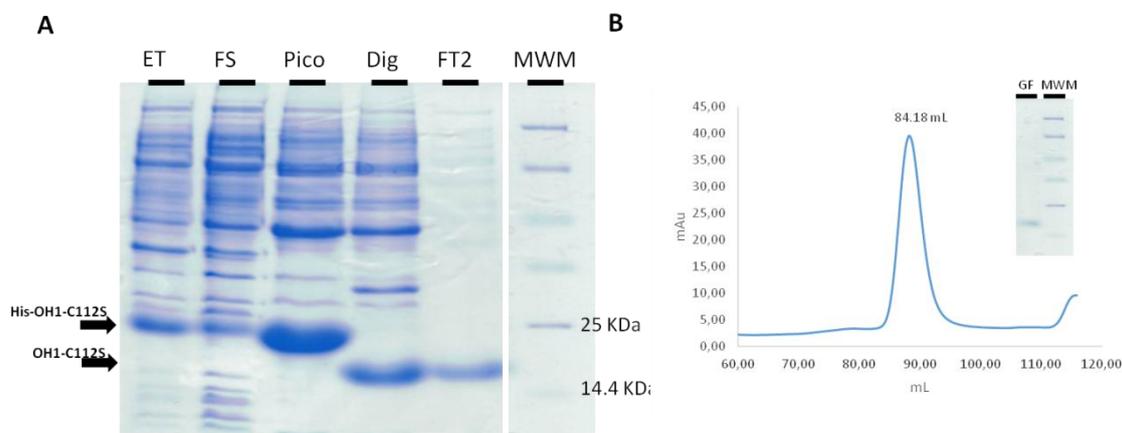
### 5.1. Identificación de interactores eucariotas de OH1, entre ellos STAT1

Para proceder al aislamiento e identificación de proteínas eucariotas que interaccionen con OH1 se utilizó la metodología de ST, basada en el uso de mutantes de actividad, en este caso del mutante inactivo en la cisteína catalítica de OH1 (OH1-C112S). Dicho mutante ha sido caracterizado estructuralmente por nuestro grupo [34] demostrando la ausencia de alteraciones a nivel del sitio activo, validándolo como herramienta para el aislamiento de potenciales interactores. La primera etapa fue obtener la proteína recombinante OH1-C112S y extractos proteicos de células HeLa enriquecidos en p-Tyr. Una vez culminadas estas etapas se procedió a inmovilizar covalentemente la OH1-C112S a una matriz de NHS-sefarosa comercial. Luego de ello se incubó la matriz conteniendo la fosfatasa mutante inmovilizada con el extracto proteico eucariota y luego de ser lavada se procedió a la elución de las proteínas retenidas e identificación por espectrometría de masa y análisis por western blot. A continuación se describen los resultados de estas etapas.

#### 5.1.1 Purificación de OH1-C112S y obtención de extractos proteicos de células HeLa

La proteína OH1-C112S se produjo en forma recombinante en *E. coli* BL21(DE3)Star en un medio auto-inductor como descrito en 4.1.3.3. Se purificó mediante cromatografía de afinidad por metal (IMAC-Cu), se eliminó el His-tag por digestión con la proteasa TEV y finalmente se realizó una etapa adicional de purificación por exclusión molecular. En la Figura 13-A se muestra un gel SDS-PAGE donde se visualiza la separación de las muestras obtenidas en los distintos pasos de la purificación. En el carril ET de la Figura, se observa que la proteína fue expresada, y de acuerdo a su presencia en el carril FS, mayoritariamente en forma soluble. Como se observa en el carril Pico, la proteína se vio enriquecida por IMAC, y se confirmó la eliminación del His-Tag mediante digestión con TEV debido a la observación de una banda de peso molecular apropiado (~ 20 kDa) en el carril Dig. A su vez, se eliminó la TEV y se aumentó la pureza de la proteína mediante una segunda IMAC (carril FT2). En la Figura 13-B se muestra el cromatograma obtenido durante la cromatografía de exclusión molecular en una columna previamente calibrada con proteínas de masa molecular nativa conocida. En dicho gráfico se observa un pico principal a un volumen de elución de 84.18 mL, consistente con un dímero de OH1 (~ 40 kDa). Dicha muestra en un gel SDS-PAGE reductor se observa como una banda correspondiente al monómero de OH1 (~ 20 kDa) (Figura 13-B, inserto). La presencia del dímero de OH1 en solución fue verificada por nuestro grupo mediante estudios bioquímicos que incluyeron

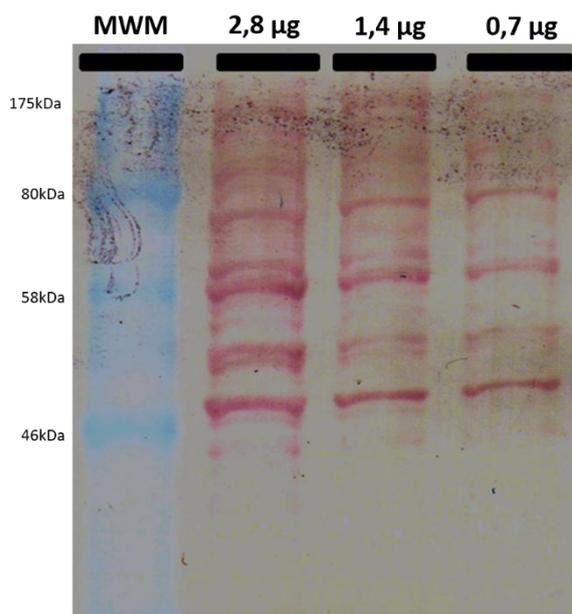
centrifugación analítica y estudios estructurales adicionales con un mutante puntual de la Cys 15 involucrada en la estabilización del dímero formando un puente disulfuro [34]. La muestra obtenida luego de la exclusión molecular se recogió y concentró por centrifugación entre 1- 3 mg/mL dependiendo del lote de producción.



**Figura 13- Purificación de OH1-C112S recombinante.**

A- Gel SDS-PAGE al 12% teñido con coomassie mostrando las muestras correspondientes a los distintos pasos de purificación. De izquierda a derecha se sembraron 3  $\mu$ L extracto total (ET), 6  $\mu$ L fracción soluble (FS), 6  $\mu$ L del pico de elución de la IMAC-Cu (Pico), 6  $\mu$ L de la digestión con TEV (Dig), 6  $\mu$ L del percolado de la segunda IMAC-Cu (FT2). Se indican con flechas las posiciones de OH1-C112S con y sin His-tag. B- Cromatograma de la exclusión molecular mostrando la absorbancia a 280 nm (mAu) en función del volumen de elución (mL). Se indica el pico principal que contiene a la fosfatasa OH1-C112S. El pico minoritario que aparece a la derecha corresponde a restos de imidazol. Se utilizó una columna de Superdex 16/60, se inyectó 4 mL de stock de fosfatasa a 5 mg/mL y la corrida se realizó a un flujo de 1 mL/min. La columna fue previamente calibrada siendo la ecuación de calibración  $K_{av} = -0.3872(\log MW) + 2.2662$ . Para calcular los pesos moleculares, se calcula el valor de  $K_{av}$  ( $V_e - V_o / V_t - V_o$ ) a partir del volumen total de la columna (120 mL, el volumen muerto obtenido utilizando azul dextrano (48.07 mL) y el volumen de elución. Se muestra en el inserto un gel SDS-PAGE conteniendo 1  $\mu$ L del concentrado de la cromatografía de exclusión molecular (GF) y 6  $\mu$ L de un marcador de peso molecular Thermo #26610 (MWM).

Para generar los extractos eucariotas ricos en fosfo-proteínas se procedió de acuerdo a lo detallado previamente en la sección 4.2. La estrategia utilizada fue optimizada durante la tesis de la Dra. M. Margenat [54] e implica la utilización de inhibidores de las fosfatasas endógenas de las células eucariotas, paso necesario para lograr observar un enriquecimiento en fosfoproteínas. Se obtuvieron varias producciones de unos 2-10 mg de proteína total con concentraciones que variaron de 0.6-2.4 mg/mL. En estas muestras se realizó un western blot, con un anticuerpo anti p-Tyr previamente validado en nuestro laboratorio, para verificar la presencia de proteínas fosforiladas en tirosina (Figura 14). Como se observa en dicha figura, se detectó proteína fosforilada en tirosina en el rango evaluado (0.7-2.8  $\mu$ g totales de extracto proteico).



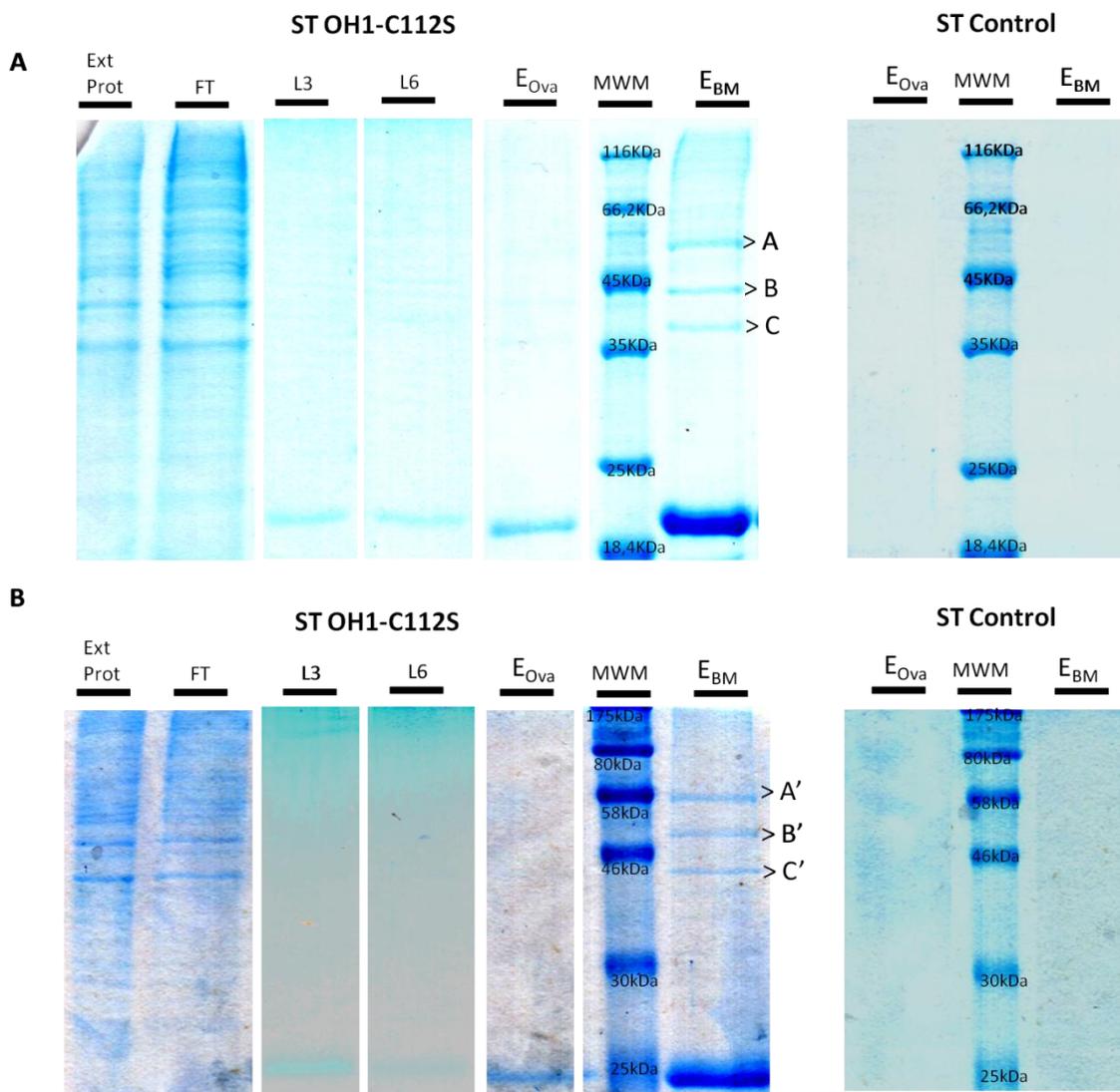
**Figura 14- Detección de proteínas fosforiladas en tirosina en extractos proteicos de HeLa por western blot.**

Las muestras se resolvieron por SDS-PAGE al 12% y posteriormente transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Se realizó la inmunodetección con un anticuerpo primario anti-fosfotirosina (Invitrogen) y un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a AP (Sigma). En el gel se agregó un marcador de peso molecular pre-teñido (MWM, New England Biolabs), la cantidad de extracto proteico sembrado por pocillo se indica en la figura.

### 5.1.2 Ensayo de ST e identificación de potenciales interactores de OH1

Para proceder con esta etapa se inmovilizó covalentemente la fosfatasa OH1-C112S a la matriz NHS-sefarosa tal como se describió en 4.2. En los diferentes experimentos independientes se obtuvieron rendimientos de inmovilización entre 50-70%. Cabe destacar la inmovilización de OH1 se realiza a través de los grupos  $\epsilon$ -amino de las Lys (7 en OH1) y el N-terminal, por lo cual la inmovilización del dímero de OH1 a la matriz se espera sea multipuntual. Como matriz control, se utilizó una matriz de NHS-sefarosa a la que se trató de la misma manera pero en la cual no se inmovilizó la fosfatasa OH1-C112S. Con ambas matrices, la matriz-OH1-C112S y la matriz-control, se realizaron dos ensayos de ST independientes, utilizando dos lotes diferentes de fosfatasa y extracto proteico de células HeLa. En la Figura 15 se muestra la separación por SDS-PAGE de las muestras obtenidas en ambos ensayos de ST realizados con la matriz-OH1-C112S (Figura 15-A y B izquierda) y la matriz-control (Figura 15-A y B derecha). Se puede observar que la cantidad de proteína que se desprende de la matriz-OH1-C112S luego de los lavados L3 y L6 ya es muy baja (carril L3 y L6). Sin embargo se observa una banda intensa de 20 kDa, identificada por MALDI-TOF como OH1. Esto es esperable ya que, si bien la inmovilización covalente es multipuntual, al ser un dímero, es probable que no siempre se encuentre ambas subunidades inmovilizadas, lo que explica que en el tratamiento de la muestra podamos recuperar esta proteína. Sin embargo, la cuantificación de esta pérdida durante todo el ensayo representa un 6,5% de la proteína inmovilizada a la matriz. Luego de los lavados, observamos que la estrategia de elución con el inhibidor competitivo ortovanadato de sodio (carril E<sub>Ova</sub>) no fue

efectiva ya que no permite observar nuevas bandas en el gel, en ninguna de las dos réplicas independientes del ensayo. Sin embargo en ambos ensayos al realizar la elución con buffer de muestra se detecta claramente, en el entorno de 30-66 kDa, tres nuevas bandas, indicadas en la figura como A, B, C y A', B' y C' (carril E<sub>BM</sub>). Cabe destacar que el perfil de estas eluciones es distinto del perfil observado para los extractos de células HeLa utilizados (carril Ext Prot), lo que sugiere un enriquecimiento de ciertas proteínas. Además, la aparición de estas bandas correlaciona con la presencia de OH1-C112S en la matriz, ya que estas no se detectaron en las eluciones realizadas al utilizar la matriz-control. Las bandas de interés fueron cortadas y enviadas al servicio de espectrometría de masa del Institut Pasteur Montevideo (IPMon) para el análisis por MALDI-TOF MS/MS.



**Figura 15- Análisis de los ensayos de ST realizados por SDS-PAGE.**

En A y B se muestran los resultados obtenidos para cada una de las réplicas independientes del ensayo. En ambos casos se sembró 16.7  $\mu$ L de cada muestra, se resolvieron en geles SDS-PAGE al 12% y se tificaron con Coomassie coloidal. Se observa el perfil de 1.3  $\mu$ g de extracto proteico de células HeLa (Ext Prot), del sobrenadante obtenido luego de la interacción con la matriz (FT), de los lavados (L3 y L6), de las eluciones con el inhibidor ortovanadato de sodio 25 mM (E<sub>Ova</sub>) y con tampón muestra para SDS-PAGE 2X (E<sub>BM</sub>). En los geles se incluyó un marcador de peso

molecular (MWM). El lavado L3 corresponde al tercer lavado realizado con tampón HEPES 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, Tween 20 0.005%, cóctel inhibidor de proteasas 1X. El lavado L6, corresponde al último lavado realizado con el mismo tampón conteniendo 1% Tritón X-100. En la figura se indica con A, B, C y A', B', C', los fragmentos recortados que se analizaron por MALDI-TOF MS/MS.

La Tabla 1 resume los resultados de identificación por espectrometría de masa. En esta tabla, se observa que en ambos ensayos independientes de ST con OH1-C112S se identifican tres proteínas: actinas, tubulinas y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (resaltadas en la Tabla 1). Si bien los resultados indican que estas tres proteínas se pueden haber enriquecido debido a una interacción con OH1 (directa o indirecta), debemos decir también que se trata de proteínas abundantes en la célula, generalmente consideradas como interactores no específicos [78], [79]. Teniendo esto en cuenta, debemos profundizar en este resultado antes de sugerir a estas proteínas como interactores potenciales de OH1. Un análisis de la presencia de modificación post-traduccionales utilizando la herramienta Phosphosite (<https://www.phosphosite.org/homeAction.action>) muestra que estas tres proteínas presentan tirosinas fosforiladas, algunas de ellas incluso identificadas en nuestros ensayos de espectrometría de masa (Tabla 2). En particular, como será retomado en la discusión, para GAPDH existen evidencias que este tipo de fosforilación cumple un rol importante en la función de la misma [80], [81].

Tabla 1- Proteínas identificadas por espectrometría de masa en los ensayos de ST.

Banda <sup>a</sup>	Proteína identificada	Código de proteína	Masa (kDa)	Mascot Score	Número de secuencias coincidentes	Cobertura de secuencia (%)	Secuencias peptídicas confirmadas por MS/MS
A/A <sup>1</sup>	<i>Keratin, type II cytoskeletal 1</i> <sup>b,*</sup>	K2C1_HUMAN	66	183	19	36	R.SGGGFSSGSAGIINYQR.R
	<i>Tubulin beta-4B</i> <sup>c</sup>	TBB4B_HUMAN	50	113	9	22	R.YLTVAAVFR.G R.AVLVDLEPGTMDSVR.S +Oxidation(M) K.GHYTEGAELVDSVLDVVR.K
	<i>Tubulin alpha-1B</i> <sup>d</sup>	TBA1B_HUMAN	50	83	7	22	R.SIQFVDWCPTGFK.V R.AVFVDLEPTVIDEVR.T R.IHFPLATYAPVISAEEK.A
	<i>Tubulin beta-6 chain</i> <sup>*</sup>	TBB6_HUMAN	50	70	5	13	R.FPGQLNADLR.K K.NSSYFVEWIPNNVK.V
B/B <sup>1</sup>	<i>Actin, cytoplasmic 1</i> <sup>f</sup>	ACTB_HUMAN	41	190	8	29	K.IWHHTFYNELR.V SYELPDGQVITIGNER.F R.VAPEEHPVLLTEAPLNPK.A
C/C <sup>1</sup>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	G3P_HUMAN	36	155	9	31	K.LVINGNPITIFQER.D + Deamidated (NQ) K.LISWYDNEFGYSNR.V
	<i>Keratin, type I cytoskeletal 9</i> <sup>e,*</sup>	K1C9_HUMAN	62	78	24	53	K.NYSPYYNTIDDLKQIVDLTVGNNK.T

a- Para cada proteína, el valor del score y número de secuencias coincidentes indicados corresponde al mayor valor obtenido a partir de los dos experimentos independientes de ST.

b- las queratinas K1C9\_HUMAN, K1C10\_HUMAN y K1C16\_HUMAN fueron identificadas con menor score en el mismo ensayo

c- Las proteínas TBB3\_HUMAN, TBB2A\_HUMAN y TBB2B\_HUMAN fueron identificados con los mismos péptidos fragmentados.

d- Las proteínas TBA1C\_HUMAN, TBA4A\_HUMAN y TBA1A\_HUMAN fueron identificados con los mismos péptidos fragmentados.

f- Las proteínas ACTA\_HUMAN, ACTG\_HUMAN, ACTBM\_HUMAN, ACTC\_HUMAN, ACTS\_HUMAN, ACTH\_HUMAN, POTEH\_HUMAN, POTEF\_HUMAN y POTEI\_HUMAN fueron identificadas con los mismos péptidos fragmentados.

e- las queratinas K1C10\_HUMAN y K2C1\_HUMAN fueron identificadas con menor score en el mismo ensayo

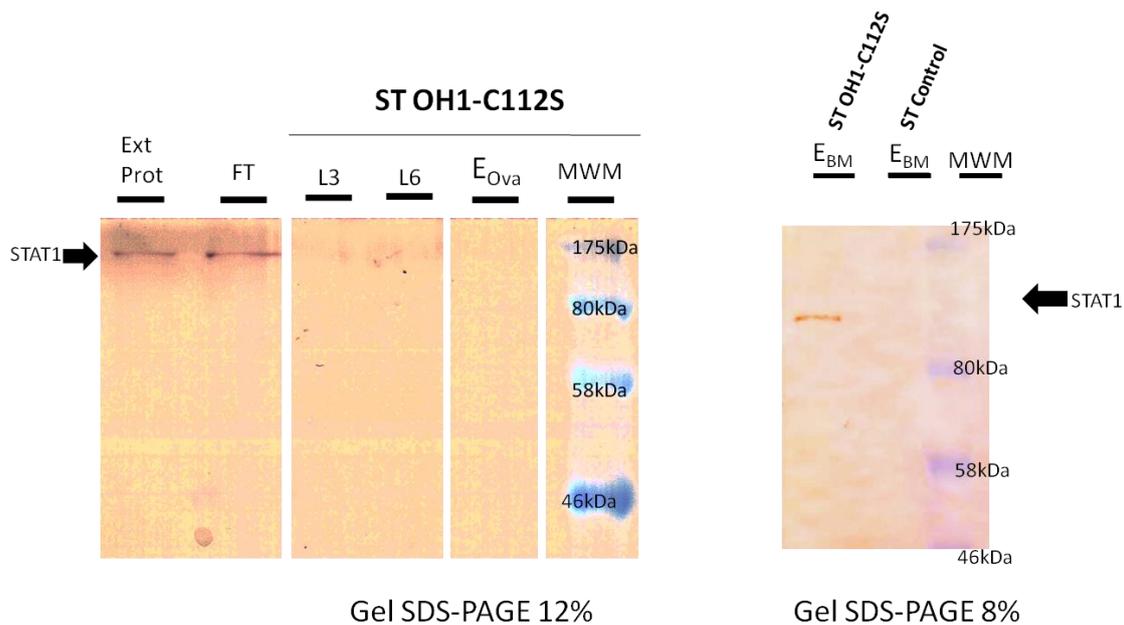
\*- Estas proteínas solo se identificaron en una de las dos réplicas realizadas, son proteínas abundantes y/o contaminantes de este tipo de experimento [78], [79].

**Tabla 2- Residuos de fosfo-tirosina presentes en las proteínas de interés identificadas.**

Nombre de la proteína	Código de proteína	Tirosinas (Y) en la secuencia completa <sup>a</sup>	Fosfo-péptidos identificados por MALDI-TOF-TOF
<i>Tubulin beta-4B</i> <sup>c</sup>	TBB4B_HUMAN	<b>Y36, Y50, Y51, Y59, Y106, Y159, Y183, Y200, Y208, Y222, Y281, Y310, Y340, Y398, Y422, Y425</b>	R.INVYYNEATGGK.Y + Phospho (Y) R.INVYYNEATGGK.Y + 2 Phospho (Y) R.INVYYNEATGGKYVPR.A + Phospho (Y) R.INVYYNEATGGKYVPR.A + 3 Phospho (Y) K.YVPRAVLVDPGTMDSVR.S + Phospho (Y); Oxidation (M) R.LHFFMPGFAPLTSRGSQQYR.A + Phospho (Y)
<i>Tubulin alpha-1B</i> <sup>d</sup>	TBA1B_HUMAN	<b>Y24, Y83, Y103, Y108, Y161, Y172, Y185, Y210, Y224, Y262, Y272, Y282, Y312, Y319, Y357, Y399, Y408, Y432, Y451</b>	K.YMACCLLYR.G + 2 Carbamidomethyl (C); Phospho (Y) K.YMACCLLYR.G + 2 Carbamidomethyl (C); 2 Phospho (Y); Oxidation (M) R.LDHKFDLMYAK.R + Phospho (Y); Oxidation (M) R.HGKYMCCCLLYR.G + 2 Phospho (Y) R.HGKYMCCCLLYR.G + 2 Carbamidomethyl (C); Phospho (Y) R.NLDIERPTYTNLNR.L + Phospho (Y) K.YMACCLLYRGDVVVK.D + Phospho (Y); Oxidation (M) R.GHYTIGKEIDLVLDR.I + Phospho (Y) K.YMACCLLYRGDVVVK.D + 2 Carbamidomethyl (C); Phospho (Y) K.RAFVHWYVGEEMEEGFSEAR.E + Phospho (Y)
<i>Tubulin beta-6 chain</i> <sup>*</sup>	TBB6_HUMAN	<b>Y36, Y50, Y51, Y59, Y106, Y183, Y200, Y208, Y222, Y281, Y310, Y340, Y422, Y425</b>	K.GHYTEGAELVDAVLVVVK.E + Phospho (Y)
<i>Actin, cytoplasmic 1</i> <sup>f</sup>	ACTB_HUMAN	<b>Y53, Y69, Y91, Y133, Y143, Y166, Y169, Y188, Y198, Y218, Y240, Y294, Y306, Y337, Y362</b>	K.DSYVGDEAQS.K.R + Phospho (Y) K.DSYVGDEAQS.K.R + Phospho (Y) R.GYSFTTTAEREIVR.D + Phospho (Y) K.YPIEHGIVTNWDDMEK.I + Phospho (Y) K.EKLCYVALDFEQEMATAASSSSLEK.S + Carbamidomethyl (C); Oxidation (M); Phospho (Y) R.DLTDYLMK.I + Phospho (Y) K.MTQIMFETFPAMYVAIQAVLSLYASGR.T + Oxidation (M); Phospho (Y)
<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	G3P_HUMAN	<b>Y42, Y45, Y49, Y94, Y140, Y255, Y276, Y314, Y320</b>	K.YDDIKK.V + Phospho (Y) K.LISWYDNEFGYSNR.V + 2 Phospho (Y) K.PAKYDDIK.K + Phospho (Y) K.WGDAGAEYVVESTGVFTTMEKAGAHLQGGAK.R + Deamidated (NQ); Oxidation (M); Phospho (Y)

a- Las p-Tyr detectadas por espectrometría de masa en esta tesis se indican en rojo. Las p-Tyr detectadas en esta tesis que no han sido reportadas previamente se indican subrayadas. Las p-Tyr reportadas en el sitio web Phosphosite se resaltan en negrita (en ambos colores).

Por otro lado, en la banda del gel correspondiente a la región en la que se esperaba visualizar a STAT1 no se logró identificar dicha proteína por MALDI-TOF-TOF MS/MS, posiblemente enmascarada por las proteínas abundantes identificadas. Por lo cual procedimos a buscar a STAT1 mediante western blot utilizando un anticuerpo específico para STAT1. En estos ensayos se logró su detección en las eluciones realizadas con buffer de muestra ( $E_{BM}$ ), de ambos ensayos de ST con OH1-C112S. La Figura 16 muestra a modo de ejemplo los resultados obtenidos en uno de los ensayos. En dicha figura se muestra también, que STAT1 está presente en el extracto proteico de células HeLa (carril Ext Prot) y en el percolado (FT), pero no en los lavados (carril L3 y L6) ni en la elución con ortovandato de sodio ( $E_{Ova}$ ) del ST con OH1-C112S, ni en las muestras analizadas del ST control.



**Figura 16- Detección de STAT1 ensayos de ST realizados por western blot.**

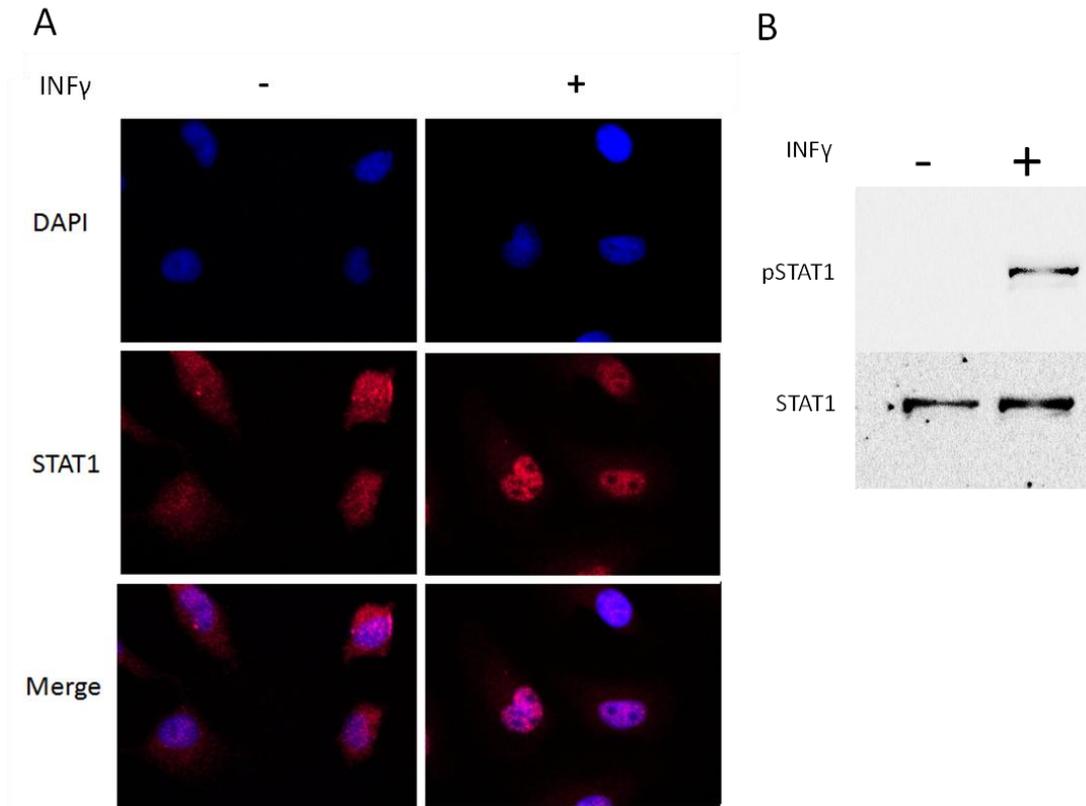
Se sembró 15  $\mu$ L de cada muestra las que se separaron en un gel SDS-PAGE y en el caso del extracto de proteínas se sembraron 1.3  $\mu$ g. El western blot se reveló con un Ac primario anti STAT1 (Cell Signaling) como se describe en la metodología. Se observa la presencia de STAT1 en el extracto proteico de células HeLa (Ext Prot), en el sobrenadante obtenido luego de la interacción con la matriz (FT) y su ausencia en los lavados (L3 y L6), y las eluciones con el inhibidor ortovanadato de sodio 25 mM (E<sub>Ova</sub>). STAT1 también está presente en la muestra correspondiente a la elución con buffer de muestra SDS-PAGE (E<sub>BM</sub>) del experimento de ST con la fosfatasa viral (ST OH1-C112S), pero no en la correspondiente elución del experimento de ST realizado con la matriz sin la fosfatasa (ST Control). En los geles se incluyó un marcador de peso molecular (MWM). El lavado L3 corresponde al tercer lavado realizado con tampón HEPES 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, Tween 20 0.005%, cóctel inhibidor de proteasas 1X. El lavado L6, corresponde al último lavado realizado con el mismo tampón conteniendo 1% Tritón X-100.

***En conclusión, utilizando el mutante OH1-C112S se identificó por MALDI-TOF MS/MS a GAPDH y a distintas formas de actina y tubulina como potenciales interactores directos o indirectos de OH1. A su vez, por western blot STAT1 también fue identificado como un interactor de OH1.***

## 5.2. OH1 afecta la localización sub-celular de STAT1

Tal como se describió en la introducción STAT1 es un factor de transcripción involucrado en la activación de la respuesta inmune mediada por interferón gamma. Las células estimuladas con interferón desencadenan una cascada de fosforilación que resulta en la fosforilación de la Tyr 701 del factor de transcripción STAT-1 ubicado en el citoplasma [36]. Luego, STAT-1 fosforilado es translocado al núcleo dónde activa la expresión de múltiples genes relacionados a la respuesta antiviral celular. Como ya se resaltó en la introducción, esta proteína ha sido reportada como sustrato de VH1 del virus de *Vaccinia*, y sugerida como sustrato de OH1 [34]–[38]. Sin embargo para ninguna de ellas existen evidencias de que su actividad afecte la localización sub-celular de STAT1. Para avanzar en este sentido, se buscó en primer lugar poner a punto un sistema de expresión que permitiera introducir la actividad fosfatasa de OH1 en células HeLa, en el cual fuera posible evaluar la localización sub-celular de STAT1. A continuación se describen los resultados obtenidos en esta primera etapa.

En primer lugar, se evaluó la capacidad de la línea celular HeLa a responder a la estimulación con INF $\gamma$ , lo cual estaba reportado en la literatura [38]. Para ello se ensayaron diferentes concentraciones de INF $\gamma$  y se evaluó la translocación de STAT1 al núcleo. Se seleccionó una concentración de 2U de INF $\gamma$  por millón de células, concordante con la reportada en la literatura [38]. Como se observa en la Figura 17-A, esta condición permitió observar una clara translocación de STAT1 al núcleo en las células estimuladas con INF $\gamma$  y no en aquellas no estimuladas. Además se corroboró (Figura 17-B) que STAT1 total se mantuvo relativamente constantes mientras que STAT1 fosforilado en la Tyr 701 se detectó solo en los extractos proteicos obtenidos a partir de células estimuladas con INF $\gamma$  (detallado en 4.1.2.4 y 4.1.3.2).



**Figura 17- Evaluación de la translocación y fosforilación de STAT1 en células HeLa.**

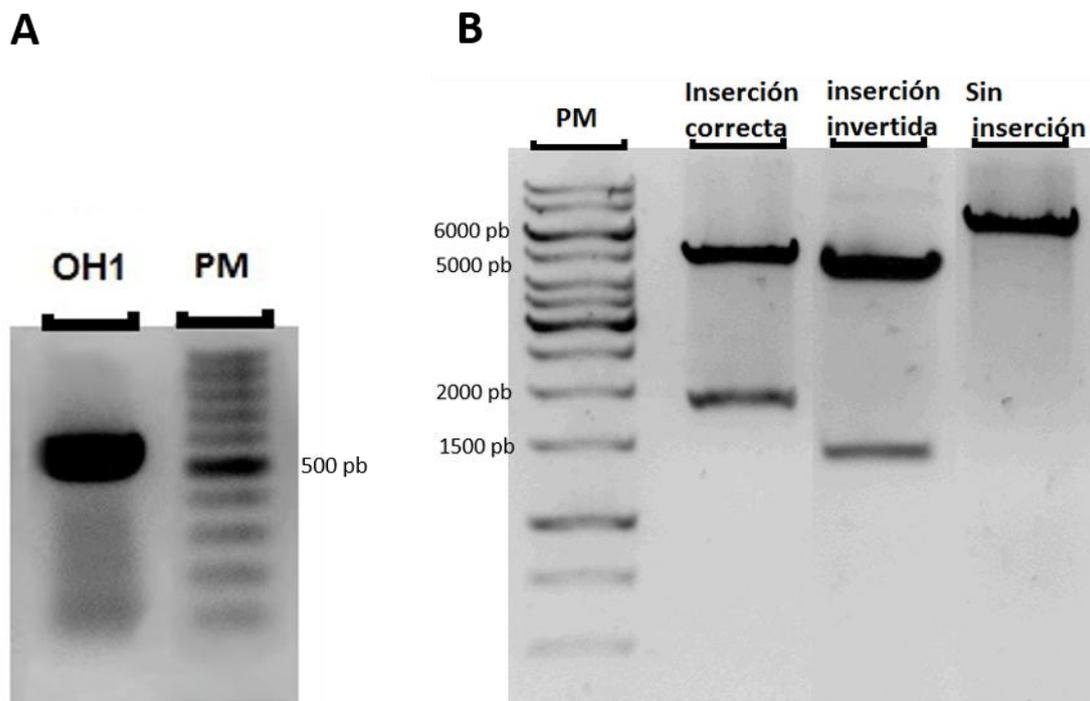
A- Se observan las células no estimuladas y estimuladas con 2 Unidad de INF $\gamma$  por millón de células durante 30 minutos a 37°C. Se realizó una inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo anti STAT1 total (Cell Signaling), utilizando para revelar un anticuerpo secundario fusionado a cianina 3 (emisión en el rojo) (Jackson ImmunoResearch Laboratories) y se utilizó DAPI como marcador nuclear. Las capturas se obtuvieron en microscopio de epifluorescencia a un aumento de 40X. La imagen mostrada es representativa de los diferentes campos observados y diferentes ensayos realizados. B- Se evaluó el nivel de fosforilación de STAT1 en este sistema en ausencia o presencia de 2 U de INF $\gamma$ . Se migraron las muestras en un gel de poliacrilamida al 8%, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, se inmunodetectó STAT1 fosforilado (pSTAT1), seguido de un stripping de la membrana y un segunda inmunodetección de STAT1 total utilizando los anticuerpos primarios apropiados (Cell Signaling).

### 5.2.1. Introducción del gen de la fosfatasa viral OH1 en las células HeLa

Como primera estrategia se generaron los vectores HSV1 tipo amplicón conteniendo el gen de la fosfatasa salvaje (HSV1-OH1wt/EGFP), el gen de la fosfatasa inactiva (HSV1-OH1-C112S/EGFP) y un vector control sin el gen de la fosfatasa (HSV1-EGFP). La producción de los vectores HSV1 requiere de dos plásmidos particulares, el plásmido pEBHICP27 conteniendo el gen ICP27 del virus Herpes y el plásmido de expresión pHSV1-IRES-EGFP conteniendo el gen de interés. Además requiere de un tercer elemento, el báculo fHSV- $\Delta$ pac- $\Delta$ ICP27.

El plásmido pEBHICP27 disponible en el laboratorio, se expandió y purificó exitosamente de acuerdo a lo estipulado en 4.3.1.1. La siguiente etapa fue clonar por PCR el gen del OH1 en el plásmido pHSV1-IRES-EGFP siguiendo el protocolo descrito en el mismo apartado metodológico, empleando como molde ADN genómico o el

plásmido pet28a conteniendo el gen de OH1 salvaje o el mutante inactivo OH1-C112S, respectivamente. A modo de ejemplo, la Figura 18-A muestra la amplificación del gen correspondiente a OH1wt por PCR, obteniéndose el producto de amplificación deseado (550 pb). Inicialmente dicho producto se utilizó para intentar el clonado por RF-cloning. Sin embargo no se logró obtener plásmidos recombinantes, por lo que se procedió a su clonado utilizando la enzima de restricción Hind III (sitio de corte introducido en el diseño de los cebadores y presente en el vector de destino). Para evaluar la presencia de clones positivos y su correcta inserción se realizó una digestión con las enzimas Sal I y Eco RI. A modo representativo la Figura 18-B muestra lo observado para tres clones analizados. La secuencia de OH1 en los plásmidos cuyo perfil de restricción evidenciaron una correcta inserción, fue verificada por secuenciación. De esta forma se obtuvieron plásmidos pHSV1 conteniendo los genes de OH1wt y OH1-C112S que denominamos pHSV1-OH1wt-IRES-EGFP y pHSV1-OH1-C112S-IRES-EGFP, respectivamente.

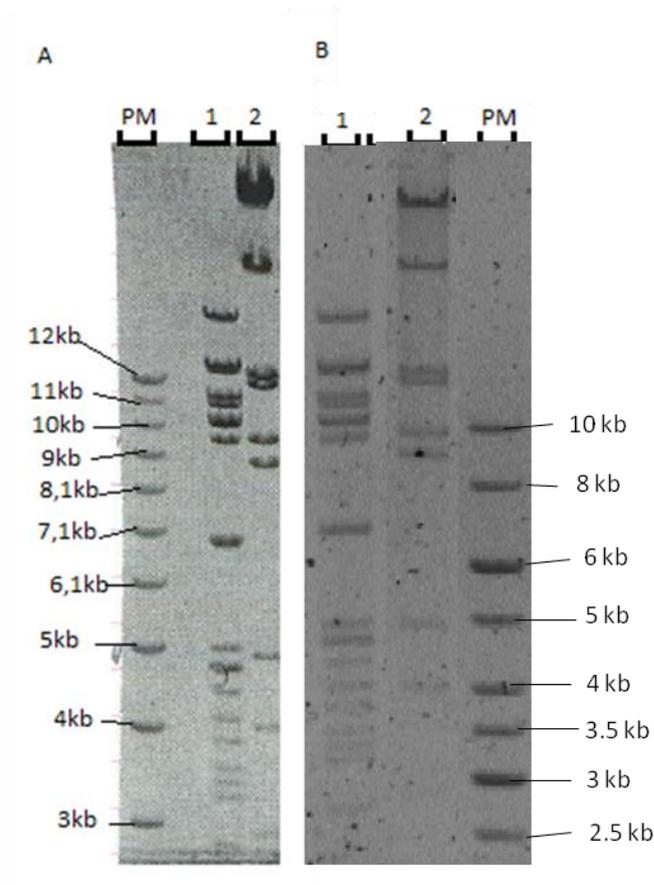


**Figura 18- Amplificación y clonado de OH1 en un plásmido de expresión eucariota.**

A- Amplificación del gen de OH1wt por PCR utilizando de molde el ADN genómico de la cepa de campo UY11, resuelto en una electroforesis en gel de agarosa al 1 % e incluyendo el marcador de 100 pb (PM). B- Patrón de digestión del ADN de tres clones tratados con las enzimas de restricción Sal I y Eco RI. Las muestras se resolvieron en un gel de agarosa al 1%, incluyendo un marcador de 1 kb pb (PM). Se indican los resultados obtenidos para el perfil correspondiente a un plásmido con inserción correcta de OH1, inserción invertida y sin inserción.

Posteriormente, se expandió el bécrido fHSV- $\Delta$ pac- $\Delta$ ICP27 y se caracterizó analizando su patrón de restricción con las enzimas Kpn I y Hind III. El perfil de referencia (Figura 19-A) proporcionado por los que generaron dicho bécrido (Dra. Laimbacher y el Dr.

Fraefel del Instituto de Virología de la Universidad de Zürich, Suiza) se comparó con el perfil obtenido (Figura 19-B), corroborándose la identidad de nuestra preparación.



**Figura 19- Caracterización del b́acmido fHSV-Δpac-ΔICP27.**

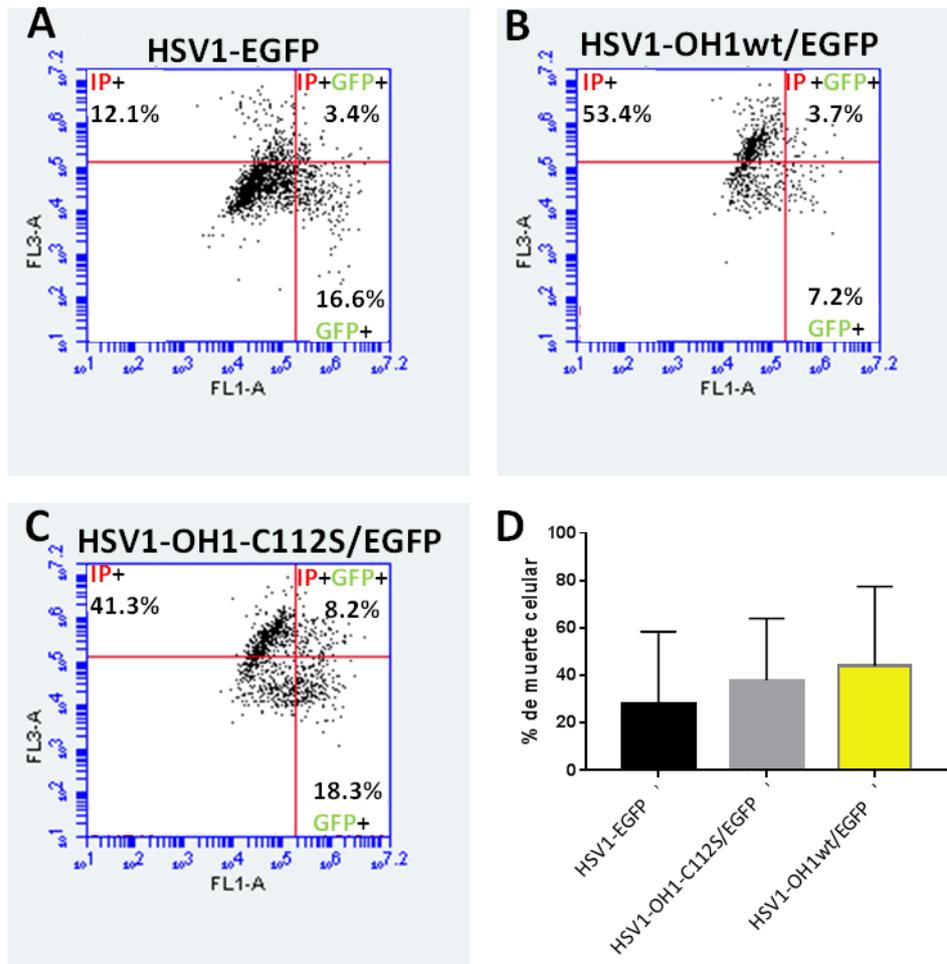
A-Patrón de digestión de referencia del b́acmido fHSV-Δpac-ΔICP27 con KpnI (carril 1) y Hind III (carril 2) (imagen cedida por la Dra. Laimbacher y el Dr. Fraefel). B- Patrón de digestión del b́acmido fHSV-Δpac-ΔICP27 obtenido en esta tesis con las mismas enzimas de restricci3n y representativo de los ensayos realizados. Las muestras se resolvieron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.5% y se migraron por 12 horas a 25 V, incluyéndose un marcador de 1kb pb (PM).

Una vez obtenidos los tres componentes del sistema, con estos se procedió a la producci3n en células Vero 2-2 de los vectores HSV1 mediante una transfecci3n múltiple utilizando Lipofectamina. Para el vector control HSV1-EGFP se obtuvieron títulos del orden de  $0.8-2 \times 10^4$  antes de concentrar la preparaci3n y  $1-3 \times 10^5$  UT/mL luego de concentrarla. Para los vectores HSV1-OH1wt/EGFP y HSV1-OH1-C112S/EGFP se obtuvieron del orden de  $0.04-1 \times 10^5$  y  $0.6-1 \times 10^5$  UT/mL post-concentraci3n, respectivamente. Debemos resaltar, que sistemáticamente los títulos obtenidos para los vectores portando el gen del OH1-wt fueron menores que aquellos obtenidos para los vectores portando el gen inactivo OH1-C112S. Por otro lado durante el proceso de concentraci3n se perdi3 ~50% de la producci3n del vector, lo que indica que será necesaria a futuro la optimizaci3n de este protocolo.

Utilizando los vectores HSV1-EGFP obtenidos se puso a punto la transducción de células HeLa, observándose expresión de GFP a las 24 y 48 horas. La relación MOI seleccionada fue de 1 ya que esto permitió detectar una buena cantidad de focos fluorescentes, siendo la eficiencia de transducción de un 28%. Como control se verificó previamente que el vector no fuera capaz de activar las células HeLa no estimuladas con INF $\gamma$ , promoviendo la translocación de STAT-1 al núcleo. De esta manera se corroboró que el modelo de transducción era adecuado para probar los vectores que expresan la forma salvaje e inactiva de OH1 y evaluar así el efecto en la translocación de STAT1. Durante los ensayos preliminares con los vectores virales generados, se constató un muy bajo número de células transducidas con el vector HSV1-OH1wt/EGFP y un estado general de deterioro de las células, observado por análisis de epifluorescencia. Con el objetivo de evaluar una posible citotoxicidad de este vector, se evaluó la viabilidad celular por citometría de flujo en las células transducidas con los tres vectores (HSV1-EGFP, HSV1-OH1wt/EGFP y HSV1-OH1-C112S/EGFP). La Figura 20, muestra el resultado de dicho análisis correspondiente a una de las réplicas del ensayo (Figura 20-A, B y C), el cual muestra que el % de células transducidas (detectadas por fluorescencia de la GFP) al usar el vector control y el que contiene el gen de la fosfatasa inactiva es del orden de 20-27%. No obstante el % de células transducidas al usar el vector conteniendo la OH1wt fue de un 10%. Además se observó una tendencia hacia un aumento del % de células muertas en la población tratada con los vectores HSV1-OH1wt/EGFP y HSV1-OH1-C112S/EGFP, respecto a las células transducidas con el vector control (HSV1-EGFP) (Figura 20-D). Estos resultados sugieren que la presencia de OH1 (salvaje o inactiva) afecta la viabilidad de las células, y sumado a esto la eficiencia de la transducción disminuyó al emplear el vector que lleva la OH1 salvaje.

Como estrategia alternativa para la introducción de la actividad de OH1wt en las células HeLa se transfectaron las mismas utilizando directamente los plásmidos de expresión eucariota (pHSV1-IRES-EGFP, pHSV1-OH1wt-IRES-EGFP y pHSV1-OH1-C112S-IRES-EGFP) empleados en la producción de los vectores HSV1 tipo amplicón. A las 24 hs del ensayo se obtuvo una eficiencia de transfección del 20%, similar al utilizar los vectores virales, pero se mejoró considerablemente el número total de células fluorescentes disponible para los ensayos planificados.

Puestos en marcha ambos sistemas de expresión de OH1 en células HeLa, se procedió a evaluar su efecto sobre la localización sub-celular de STAT1.



**Figura 20- Evaluación del nivel de citotoxicidad de vectores HSV1 en células HeLa.**

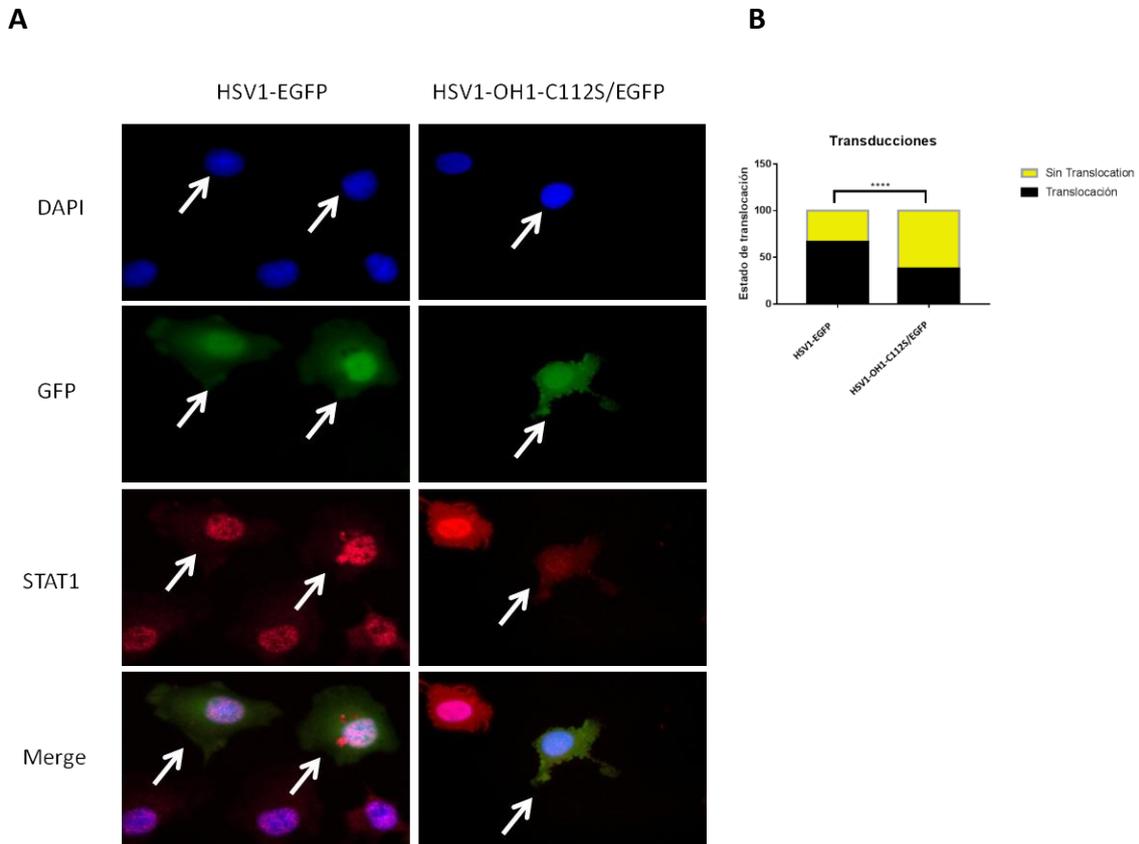
(A), (B) y (C) representan a modo de ejemplo los diagramas de un ensayo obtenido al marcar con yoduro de propidio (IP) y tratar con el vector control HSV1-EGFP, HSV1-OH1wt/EGFP y HSV1-OH1-C112S/EGFP, respectivamente. En el canal FL-3 se calibró la fluorescencia del IP mientras que en FL-1 se hizo lo propia para la fluorescencia en GFP. Se indican los cuadrantes correspondientes a las poblaciones IP y GFP positivas (IP+ y GFP+ respectivamente) D- Representación gráfica de los porcentajes de muerte celular total, calculado para tres réplicas biológicas.

### 5.2.2. Efecto de OH1 en la translocación de STAT1 al núcleo

Se procedió a evaluar el efecto de la expresión transitoria de esta fosfatasa en la ubicación sub-celular de STAT1 en células HeLa estimuladas con INF $\gamma$  como se detalla en 4.3.2.

Utilizando los vectores virales se evaluó solamente el efecto del vector control y del vector conteniendo la fosfatasa inactiva, debido a que, tal como se describió arriba al usar el vector que porta la OH1 salvaje no se obtuvieron células suficientes para dar soporte estadístico a estos ensayos. Como era de esperar, en las células transducidas con el vector control y estimuladas con INF $\gamma$  se observó la localización nuclear de STAT1. De esta manera, se confirmó que el vector en sí mismo no inhibe la

translocación de STAT1 (Figura 21-A, panel izquierdo). Sin embargo, al utilizar el vector que porta la fosfatasa inactiva se observó un efecto inhibitorio en la translocación de STAT1 al núcleo (Figura 21-A, panel derecho), estadísticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) (Figura 21-B).



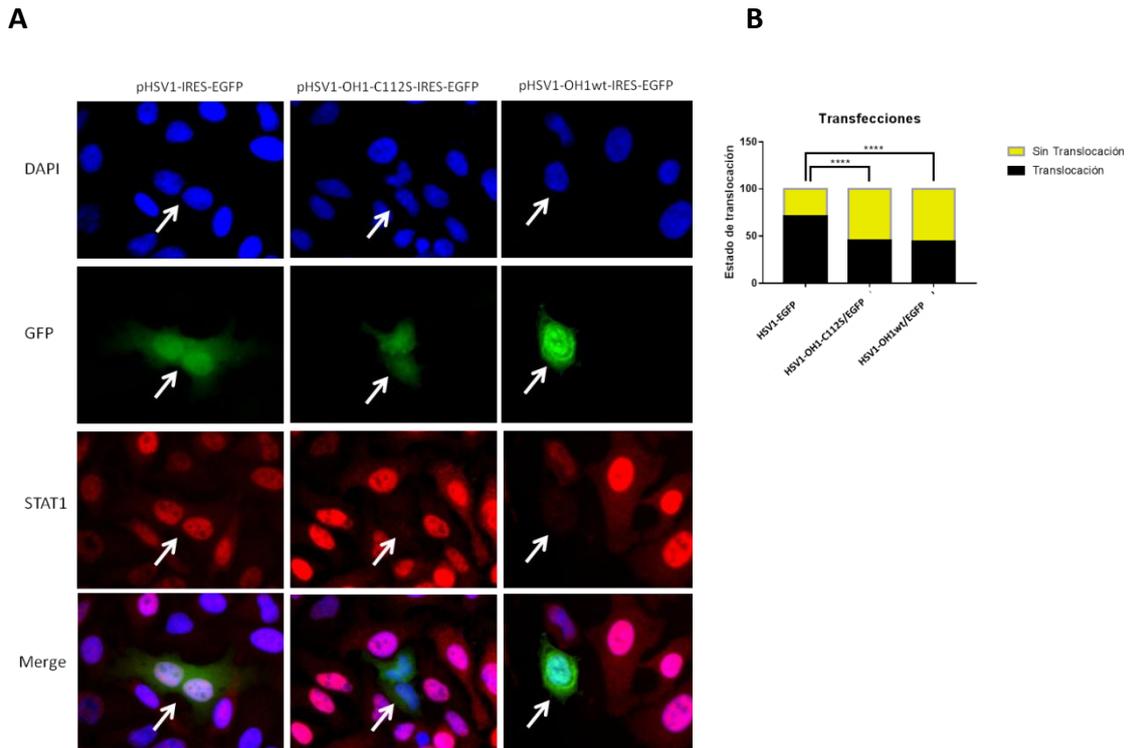
**Figura 21- Evaluación por inmunofluorescencia indirecta de la translocación de STAT1 en células HeLa transducidas y estimuladas con interferón.**

A- Inmunofluorescencia indirecta en células HeLa transducidas con los vectores virales: control HSV1-EGFP (panel izquierdo) y con el vector HSV1-OH1-C112S/EGFP (panel derecho). Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio de epifluorescencia Olympus utilizando el software Micro manager con un aumento de 40X. Para detectar STAT1 se utilizó un anticuerpo primario anti STAT1 (Cell Signaling) y un anticuerpo secundario anti conejo conjugado a cianina 3 (emisión en rojo) (Jackson InmunoResearch Laboratories). Para marcar los núcleos celulares se utilizó DAPI. Se indica con una flecha blanca las células transducidas.

B- Representación gráfica del % de translocación obtenido en 3 réplicas biológicas. Se contaron entre 150 y 200 focos por cada condición en cada réplica. La diferencia entre ambas condiciones fue estadísticamente significativa  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*) obtenida mediante tablas de contingencia y aplicando el test exacto de Fisher.

Utilizando los plásmidos directamente y no los vectores virales se logró transfectar las células HeLa con los plásmidos pHSV1-IRES-EGFP, pHSV1-OH1wt-IRES-EGFP y pHSV1-OH1-C112S-IRES-EGFP (Figura 22-A). Un análisis de tres experimentos independientes nos permitió determinar si las diferencias observadas eran estadísticamente significativas (Figura 22-B). En esta figura se observa una disminución significativa del % de translocación de STAT1 al núcleo tanto en las células transfectadas con el plásmido portando la OH1 inactiva como salvaje, respecto a las células transfectadas con el plásmido control. Además, cabe destacar que no se observó una diferencia

significativa en la translocación de STAT1 a núcleo en las células transfectadas con el plásmido portando la forma de OH1 salvaje o inactiva. Esto podría explicarse debido a que el mutante inactivo es de esperar retenga la capacidad de unir al sustrato, pero no la capacidad de desfosforilarlo. De esta manera el mutante podría estar reclutando a STAT1 en citosol, siendo esto una evidencia más que sugiere una interacción directa de OH1 con STAT1. En su conjunto, estos resultados confirman por primera vez el efecto de la OH1 sobre la localización sub-celular de STAT1.



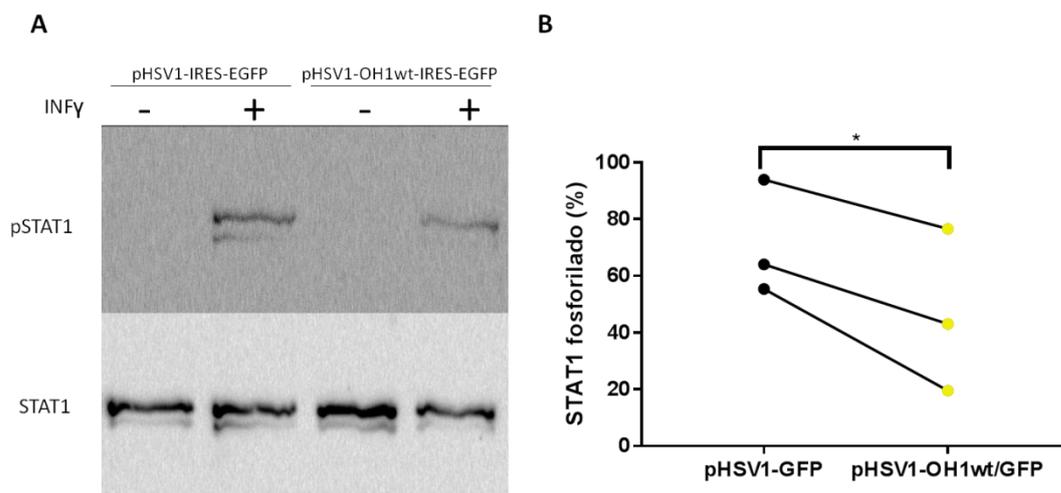
**Figura 22- Evaluación por inmunofluorescencia indirecta de la translocación de STAT1 en células HeLa transfectadas y estimuladas con interferón.**

A- Inmunofluorescencia indirecta en células HeLa transfectadas con los vectores virales: control con pHSV1-IRES-EGFP (panel izquierdo), con pHSV1-OH1-C112S-IRES-EGFP (panel central), y con pHSV1-OH1wt-IRES-EGFP (panel derecho). Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio de epifluorescencia Olympus utilizando el software Micro manager con un aumento de 40X. Para detectar STAT1 se utilizó un anticuerpo primario anti STAT1 (Cell Signaling) y un anticuerpo secundario anti conejo conjugado a cianina 3 (emisión en rojo) (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Para marcar los núcleos celulares se utilizó DAPI. Se indica con una flecha blanca las células transfectadas.

B- Representación gráfica del % de translocación obtenido en 3 réplicas biológicas. Se contaron entre 150 y 200 focos por cada condición en cada réplica. La diferencia entre ambas condiciones fue estadísticamente significativa  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*) obtenida mediante tablas de contingencia y aplicando el test exacto de Fisher.

### 5.3. OH1 afecta la fosforilación de STAT1 en la tirosina 701

En esta etapa se buscó evaluar si la presencia de OH1 en las células HeLa correlaciona con la desfosforilación de STAT1 en la tirosina 701. Durante el desarrollo de esta tesis esto fue demostrado por Harvey et al [38], sin embargo era pertinente analizar esto en el contexto de nuestros experimentos. Para ello, se evaluó el estado de fosforilación de STAT1 evaluado mediante western blot utilizando un anticuerpo contra la forma fosforilada en Tyr701 (pSTAT1) y un anticuerpo contra STAT1 total, tal como se detalla en el apartado 4.1.3.2. Esto se realizó en extractos de proteínas obtenidas de células Hela donde se introdujo la actividad fosfatasa de OH1wt (eficiencia de transfección del orden de 29%). A modo de ejemplo, la Figura 23-A, muestra los resultados de uno de los experimentos independientes. En esta se puede observar que el nivel de STAT1 total se mantiene relativamente constante en las células estimuladas o no con INF $\gamma$ . Sin embargo el nivel de pSTAT1 disminuyó en el extracto obtenido a partir de las células estimuladas y transfectadas con el plásmido portando el gen de OH1wt (pHSV1-OH1wt-IRES-EGFP), respecto al nivel observado en el extracto obtenido a partir de las células estimuladas y transfectadas con el plásmido control (pHSV1-IRES-EGFP). Además, esta figura muestra que en las células no estimuladas con interferón, la transfección con estos plásmidos por sí misma no activa la fosforilación de STAT1. Con el fin de comparar la cantidad de pSTAT1 en cada condición, se midió la intensidad de la banda de pSTAT1 en relación a la banda de STAT1 total correspondiente. De esta forma, se comparó el nivel de pSTAT1 entre las distintas condiciones y se demostró que la disminución en el nivel del pSTAT1 descrito es estadísticamente significativa ( $p$ -valor= 0.048) (Figura 23-B).



**Figura 23-** Evaluación por western blot del efecto de la expresión de OH1 en los niveles de fosforilación de STAT1 en células HeLa.

A-Western blot anti pSTAT1 y STAT1, obtenido utilizando los extracto proteicos provenientes de células transfectadas con el plásmido control (pHSV1-IRES-EGFP) y el plásmido portando la OH1 salvaje (pHSV1-OH1wt-IRES-EGFP). Se reveló por quimioluminiscencia con anticuerpo secundario anti conejo conjugado a HRP (Sigma).

B- Representación gráfica del % de pSTAT1 en función de STAT1 total de tres experimentos independientes, utilizando el software de procesamiento de imágenes ImageJ. Se señala la diferencia estadísticamente significativa,

calculada utilizando test de t con muestras pareadas ( $p= 0.0485$ ). Las muestras que fueron pareadas se indican unidas por una línea.

***Resumiendo, tanto la OH1 salvaje como el mutante inactivo fueron capaces de inhibir la translocación de STAT1 al núcleo, sugiriendo que OH1 interacciona directamente con STAT1. A su vez, se demostró que la expresión de OH1 en un entorno celular correlaciona con la desfosforilación de STAT1 en la Tyr701. Todo esto sostiene que STAT1 es sustrato fisiológico de OH1.***

#### 5.4. Modelos de interacción *in silico* entre OH1 y STAT1

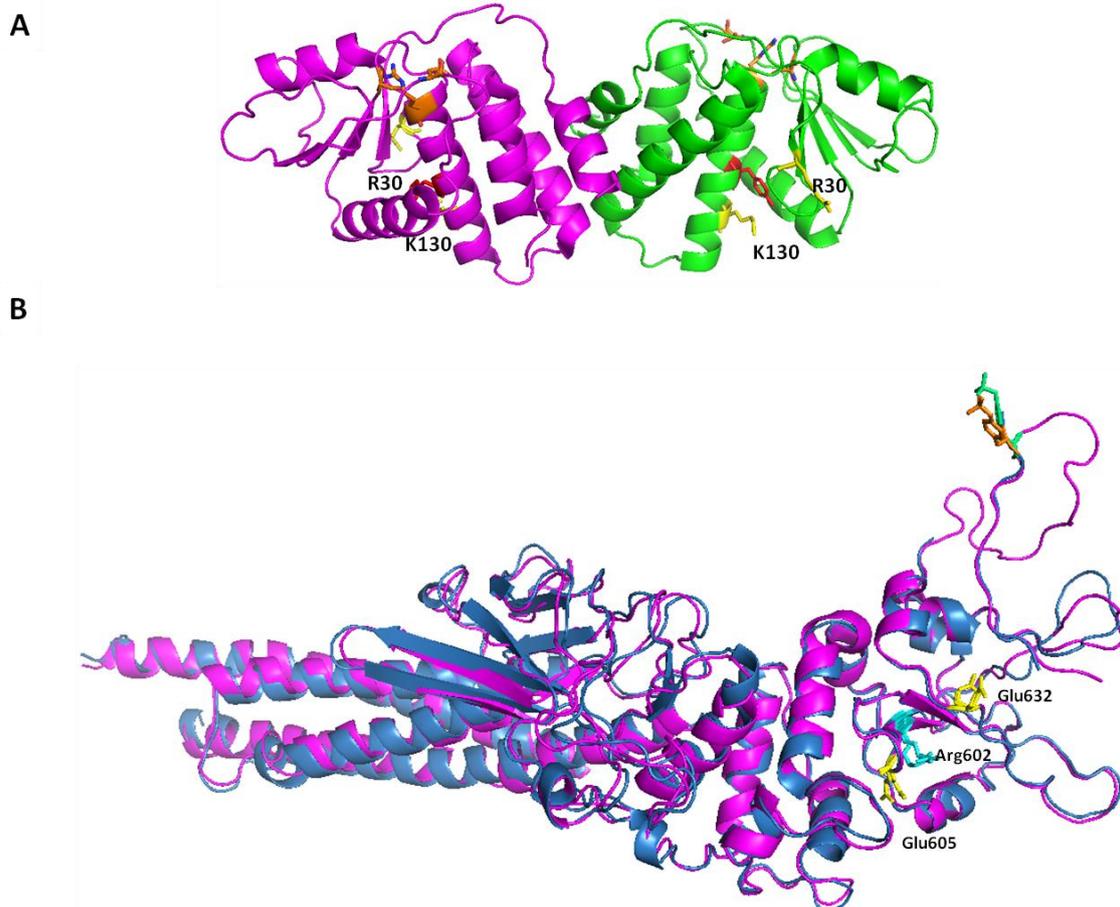
Los resultados hasta ahora descritos apuntan a que STAT1 es sustrato fisiológico de OH1, ya que confirman que OH1 interacciona con STAT1, afecta su estado de fosforilación así como su localización sub-celular. En este contexto, se abordó un último objetivo, la búsqueda de un modelo molecular de interacción entre OH1 y STAT1. Para OH1 utilizamos la PDB 5NCR, estructura cristalográfica resuelta por nuestro grupo [34] (Figura 24-A dímero OH1). Para STAT1 humano se utilizó el monómero de STAT1 (aminoácidos 136 a 712) modelado previamente por nuestro grupo, dado que las estructuras disponibles en las bases de datos no incluyen la resolución del extremo C-terminal completo, que contiene la p-Tyr701. Este modelo de STAT1 se superpuso con la estructura cristalográfica más completa de STAT1 (1BF5) y se analizó visualmente en PyMOL (Figura 24-B). Como primera observación, la estructura general de la proteína modelada se ve conservada y el extremo C-terminal modelado como un bucle móvil no presenta choques estéricos con el monómero correspondiente a 1BF5, lo que valida la utilización del modelo de STAT1 generado, en los siguientes ensayos de acoplamiento molecular con OH1.

Con la estructura de OH1 y STAT1, se procedió como primera aproximación a modelar la interacción a través del sitio catalítico de OH1 (compuesto por la tríada catalítica Asp81, Cys112 y Arg118) y la Tyr701 fosforilada de STAT1 monomérica. Sin embargo, en ninguno de los resultados evaluados se logró obtener una estructura que cumpliera con los requisitos mínimos esperados para una interacción proteína/proteína relevante. Por ejemplo, en los casos donde se observó una posición favorable de la Tyr701 con respecto al sitio catalítico de OH1, se encontraron superficies de interacción poco importantes (menores a 300 Å) estabilizadas por muy pocas o ninguna interacción no covalente como puentes de hidrógeno y/o puentes salinos. En su conjunto, estos resultados sugerían un mecanismo alternativo de reconocimiento de STAT1 por parte de la fosfatasa OH1.

Como segunda aproximación, utilizamos la información de la estrategia reportada de modelado de la fosfatasa de tirosina humana monomérica VHR con STAT5, publicada por Jardin y colaboradores [52]. Los autores sugieren que el modelo propuesto puede explicar también cómo el homólogo viral de OH1, la fosfatasa VH1, interacciona con STAT1. En este modelo VH1 reclutaría a STAT1 a través de una p-Tyr específica (presente en un sitio diferente al sitio activo). Esto sería posible gracias al reconocimiento de esta por el dominio SH2 ubicado en la región C-terminal de STAT1 [52]. Para evaluar este posible mecanismo de interacción se analizó primero la conservación en OH1 de esta Tyr y de otros residuos descritos en VH1 que participan en estabilizar la interacción con STAT1. Para ello, se realizó un alineamiento con información estructural de VH1 con OH1 y la fosfatasa humana VHR (Figura 25). En esta figura y con la información del trabajo de Jardin y colaboradores [52] se pudo constatar que los residuos Arg29, Lys128, Tyr124 de VH1 se encuentran conservados

en OH1 (Arg30, Lys130 y Tyr126, respectivamente), mientras que otros residuos no presentaron conservación.

Una diferencia que cabe destacar, es que en OH1 los residuos Lys128, Lys130 y Glu131 de VH1 se encuentran en la hélice  $\alpha_4$ , la cual en OH1 es más extensa que en VH1, e incluye la inserción TMTQPA (Figura C1 disponible en anexos), específica de la fosfatasa del género *Parapoxvirus* (género al que no pertenece VH1). Cabe destacar, que en OH1, al igual que en VH1, no existen evidencias que la Tyr126 se encuentre fosforilada durante la infección. Interesantemente, el alineamiento permite observar que además de la Tyr126, la Tyr36 de OH1 también se encuentra conservada en estas tres fosfatasas.



**Figura 24- Estructuras utilizadas para acoplamiento molecular de OH1 y STAT1.**

A- Dímero de OH1. En verde y magenta se representan los monómeros A y B respectivamente. En amarillo se indican los residuos Arg30 y Lys130 y en rojo la Tyr126 de OH1, potencialmente relevantes en el reclutamiento de STAT1. En naranja se resalta el sitio catalítico de OH1 compuesto por la triada Asp81, Cys112 (en este caso Ser) y la Arg118.

B- Superposición de STAT1 con extremo C-terminal modelado (magenta) con la estructura cristalográfica de STAT1 (1BF5) utilizada por Jardin y colaboradores (Azul) [52]. Se indican los residuos Tyr701 fosforilados (en verde y naranja) y los residuos Glu605 y Glu632 potencialmente relevantes en la interacción con los residuos de OH1 conservados y e indicados en la parte A. En cian se indica el residuo Arg602 del dominio SH2 importante para la interacción con péptidos conteniendo fosfo-tirosina.



reportada su fosforilación, se buscó que en los complejos obtenidos se mantuviese a una distancia que permitiera, pero no requiriera estrictamente, la incorporación de una p-Tyr (una distancia menor a 8.5 Å).

En paralelo, se realizó un acoplamiento entre las mismas estructuras sin restricciones, de manera de evaluar la existencia de otros posibles complejos.

Para los experimentos donde se utilizaron restricciones en el acoplamiento molecular se obtuvieron 20 estructuras de complejos OH1-SH2 STAT1 y en aquellos sin restricción se obtuvieron 10 estructuras de OH1-SH2 STAT1. Posteriormente se descartaron los resultados donde OH1 en el complejo analizado presentaba choques estéricos con la estructura completa de STAT1, ya que el modelado se realizó solo con el dominio SH2 de STAT1. A continuación se agruparon las estructuras de interacción similar, logrando 6 estructuras distintas de complejos: dos provenientes de los ensayos donde se aplicaron restricciones y cuatro provenientes de los ensayos sin restricciones (Tabla C3 disponible en anexos). Sin embargo, debemos resaltar que ninguno de los complejos obtenidos fue similar al propuesto para VH1-STAT1 [52]. Esto no es sorprendente considerando las diferencias estructurales observadas entre OH1 y VH1 en la región de interacción, resaltadas arriba. De hecho, debido a la extensión de la hélice donde se encuentra la Tyr126 de OH1, esta es menos accesible que su homóloga en VH1. Por consiguiente, para que la Tyr126 se vea involucrada en una interacción directa con SH2, la hélice que la contiene debería des-estructurarse. Este mecanismo, por ejemplo, ya ha sido reportado para el factor de elongación Tu [82].

En los dos modelos obtenidos hasta el momento, no se encontró un complejo donde la Tyr de interés presentara la capacidad de asociarse con el sitio de unión pre-establecido en la otra estructura del complejo. A su vez, cuando las Tyr sí se ubicaron a una distancia apropiada y sin impedimentos estéricos de otros residuos para la interacción, la extensión y características físico-químicas de las superficies de interacción fueron despreciables ( $\Delta G$ , Nº de puentes de hidrogeno y Nº de puentes salinos). Por estas razones, reparamos en la existencia de otra Tyr conservada en OH1 como posible candidato para realizar otro acoplamiento. Como describimos anteriormente, en el alineamiento estructural mostrado arriba, la Tyr36 se encuentra conservada en OH1, VH1 y VHR (Figura 25). Un análisis de un mayor número de secuencias en un alineamiento previamente realizado y reportado por nuestro grupo (material suplementario de [34]) permitió observar que esta Tyr36 (al igual que la 126) se encuentra conservada en todos los miembros del género y la sub-familia viral a la que pertenece OH1 (alineamiento disponible en Figura D1 de anexos). Debido a que esta también se encuentra conservada con respecto a VHR un mecanismo de acción que las involucre tiene el potencial de ser atribuido a las fosfatasa de especificidad dual como grupo. Dado que la Tyr36 ha sido reportada como fosforilada en VHR [66], se realizó un acoplamiento molecular entre OH1 y el dominio SH2 de STAT1 utilizando

la Tyr36 de OH1 y la Arg602 del dominio SH2 de STAT1 como única restricción. De esta forma se obtuvieron 10 soluciones, de las cuales se mantuvieron 5 luego de agrupar las estructuras redundantes y descartar las soluciones que presentaron colisiones con el monómero completo de STAT1 (Tabla 3).

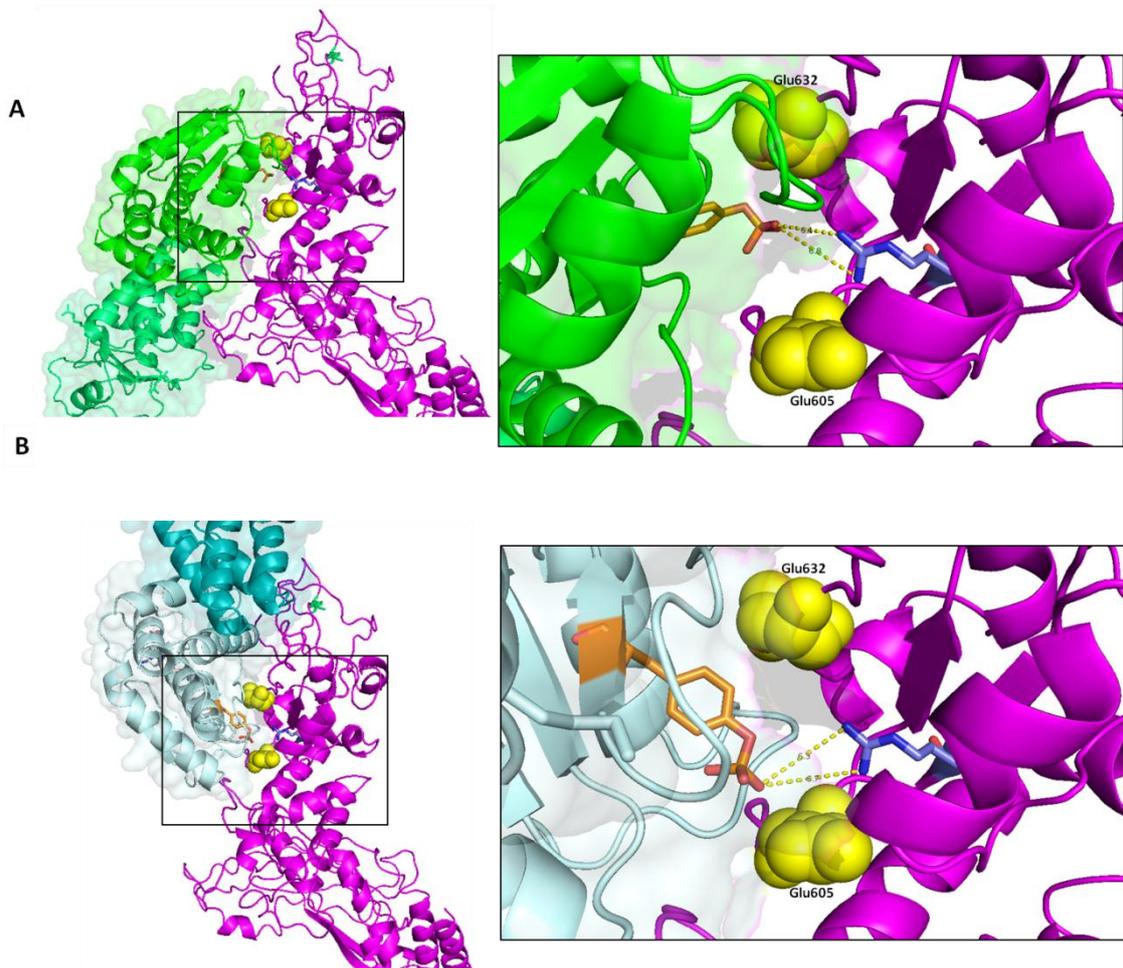
**Tabla 3- Parámetros de interacción de los complejos obtenidos en los experimentos de acoplamiento molecular centrados en la región que contiene la Tyr36.** Se evaluaron las superficies de interacción utilizando el servidor PISA. La numeración de la estructura se corresponde con su posición dentro de las 10 estructuras generadas por GRAMMX de acuerdo a su score.

Complejo	superficie de interacción total con STAT1 (Å <sup>2</sup> )	Contribución a la superficie de interacción con STAT1 (Å <sup>2</sup> ) de MonomeroA/MonomeroB	ΔG (kcal/mol) de la interacción con STAT1 aportado por MonomeroA/MonomeroB	Nº de puentes de hidrógeno con STAT1 aportados por MonomeroA/MonomeroB	Nº de puentes Salinos con STAT1 aportados por MonomeroA/MonomeroB
R2	1805	1208/597	0,1/-4,5	18/1	3/0
R5	1216	1160/55	4,0/-1,0	15/0	2/0
R6	1021	1021/0	-0,9/0,0	8/0	2/0
R8	828	828/0	2,1/0,0	8/0	2/0
R9	1241	1213/28	1,7/0,4	17/0	6/0

A diferencia de las soluciones obtenidas mediante los acoplamientos anteriores, se obtuvieron dos complejos (soluciones R2 y R5 de la Tabla 3) donde la Tyr36 de OH1 se ubicó de forma promisorio para la interacción con la Arg602 de STAT1, por lo que se simuló una fosforilación de este residuo y se constató que su presencia no afecta la superficie de interacción. Además, la distancia entre un átomo de oxígeno del grupo funcional fosfato de Tyr36 de OH1 y un átomo Nη de la Arg602 de STAT1 fue menor a 8.5 Å, distancia que permitiría posicionar a la Tyr36 fosforilada correctamente para interactuar con la Arg602 del dominio SH2 de STAT1 (Figura 26). A su vez, estas dos soluciones presentaron dos de las mayores superficies de interacción (siendo superada únicamente R5, por R9, como se indica en la Tabla C3 disponible en anexos) y entre 18 y 15 puentes de hidrógeno. A su vez, la superficie de interacción en el complejo R2, tiene un importante aporte de ambas subunidades de OH1. Esto es relevante teniendo en cuenta la naturaleza dimérica de OH1 y el hecho de que se ha reportado que esta estructura cuaternaria en VH1 es vital para el reconocimiento de STAT1 [39].

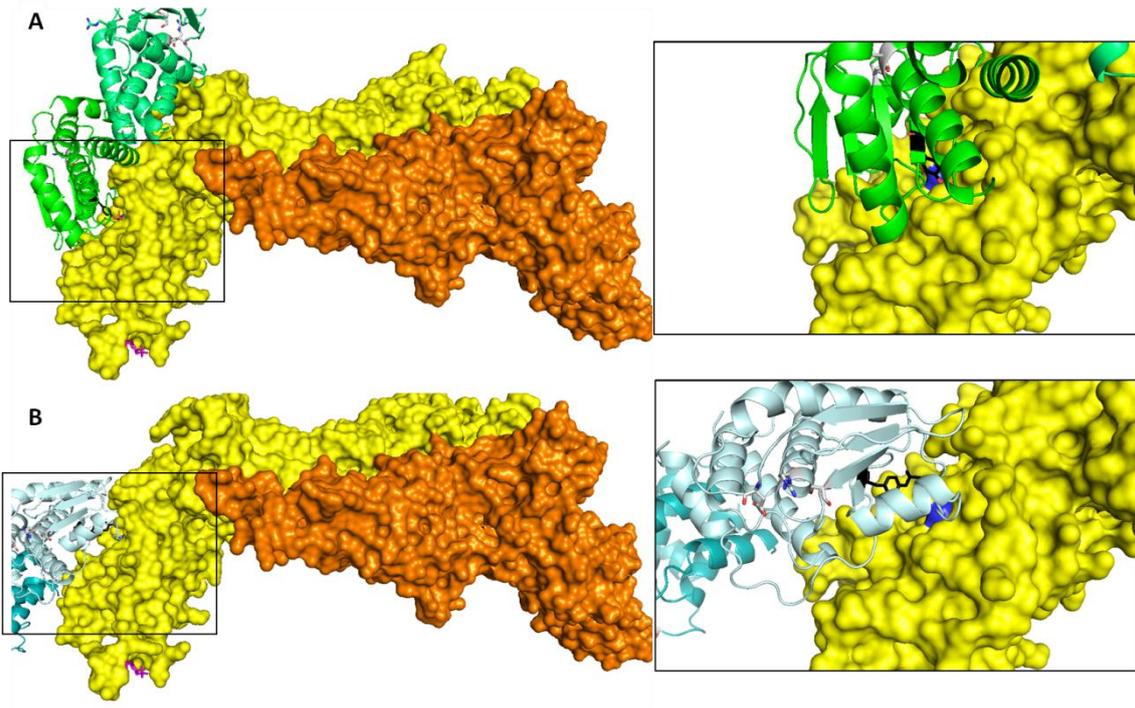
Por último, se evaluó el posicionamiento de estas soluciones con respecto a las formas diméricas de STAT1 y se constató que estas estructuras presentan compatibilidad con la forma dimérica anti-paralela de STAT1 (al igual que todas las soluciones evaluadas) (Figura 27), pero son incompatibles con la forma paralela de esta molécula. Esto se debe a la presencia de choques estéricos entre OH1 y el bucle móvil (portando la p-Tyr701) del monómero opuesto de STAT1 (recuadro en Figura C2 disponible en anexos). En el posicionamiento con la forma dimérica anti-paralela, los sitios catalíticos

de OH1 no se encuentran directamente enfrentados a un residuo de p-Tyr701 de STAT1. Sin embargo, la naturaleza flexible del extremo C-terminal hace que la distancia entre la Arg683 y la Tyr701 puede llegar a ser de 45 Å en su máxima extensión [51], lo cual permite un amplio rango de movimiento y abre la posibilidad a que igualmente sea desfosforilada por OH1 en uno de estos complejos. Este tipo de interacción, que no se pudo reproducir para la Tyr126, se asemeja a la reportada previamente por Jardin y colaboradores [52] y se ajusta a la teoría de un mecanismo de acción en dos pasos, uno de reclutamiento de STAT1 seguido de uno de desfosforilación de la Tyr 701 de STAT1.



**Figura 26- Soluciones de complejos OH1-STAT1 obtenidos por acoplamiento molecular.**

Representación gráfica de soluciones R2 (A) y R5 (B). El dímero de OH1 se representa en A (verde y verde claro) y B (celeste claro y cian) indicándose la fosfo-Tyr36 en naranja y los sitios catalíticos de cada subunidad en Blanco. En ambos casos STAT1 se representa en magenta y se indican los residuos Glu605 y Glu632 en amarillo, Arg602 en cian y la Tyr701 en verde claro. En el recuadro se muestra un aumento de la superficie de interacción observada en cada estructura y se indican las medidas de distancia entre la fosfo-Tyr36 de OH1 y Arg602 de STAT1. Las imágenes se obtuvieron utilizando el programa PyMOL.



**Figura 27- Compatibilidad de soluciones R2 y R5 con el dímero anti-paralelo de STAT1.**

Representación gráfica de la localización de OH1 en las soluciones R2 (A) y R5 (B) en referencia a un dímero anti-paralelo de STAT1 (en amarillo y naranja), de OH1 se indica la fosfo-Y36 en negro y los sitios catalíticos de cada subunidad en blanco mientras que en STAT1 se indica el residuo Arg602 en azul y la Tyr701 en magenta. En el recuadro se muestra un aumento de la superficie de interacción observada en cada estructura, el dímero de OH1 se representa en verde y verde claro en (R2) y en celeste claro y cian (R5). Imágenes generadas en PyMOL.

## 6. Discusión y conclusión

Este trabajo buscó avanzar en el conocimiento de la funcionalidad de la fosfatasa en tirosina codificada por el virus Orf (OH1). En línea con este objetivo se realizaron experimentos que validan a STAT1 como su sustrato eucariota de OH1. Esto se logró a partir de la determinación, por primera vez: (i) de la interacción entre OH1 y STAT1 en experimentos *in vitro* de ST, (ii) de la demostración del efecto inhibitorio de OH1 en la translocación de STAT1 al núcleo. Sumado a la confirmación de que OH1 desfosforila la Tyr701 de STAT1, todo esto a partir de un sistema celular puesto en marcha en esta tesis. Por otro lado, se exploró la forma de interacción entre OH1 y STAT1 mediante experimentos *in silico* de acoplamiento molecular, lográndose proponer dos modelos, que deben ser validados experimentalmente. Por último, se identificaron tres potenciales interactores previamente no descritos para OH1 en base a los experimentos *in vitro* de ST. Esto abre la puerta a nuevas posibilidades de investigación en particular apuntando a entender como estas proteínas eucariotas se relacionan con el ciclo viral del OrfV. A continuación se discuten los distintos resultados obtenidos en la realización de este trabajo y su impacto en el estado de conocimiento de este tema.

### 6.1 STAT1 como sustrato de OH1

Tal como describimos en la introducción resultados descritos por el grupo de Harvey y colaboradores [38] sugieren a STAT1 como sustrato de OH1, cumpliendo la misma función en OrfV que VH1 en *Vaccinia*. Sin embargo, estos resultados publicados no apuntaban a demostrar la interacción entre OH1 y STAT1, ni demostraban el efecto de OH1 sobre la translocación de STAT1, objetivo que logramos abordar en esta tesis.

En primer lugar, se corroboró que la expresión de OH1 salvaje en células eucariotas estimuladas con INF $\gamma$  se corresponde con un descenso en el nivel de fosforilación de STAT1, de forma estadísticamente significativa. Si bien esto fue descrito por el grupo de Harvey mientras se realizaba esta tesis [38], resultó pertinente replicar la experiencia bajo nuestras condiciones experimentales. De hecho la disminución en el nivel de pSTAT1 observado fue estadísticamente significativo a pesar de que los valores de p-valor fueron próximos a 0.05 en ambos estudios (la presente tesis y [38]). Por otro lado, debemos resaltar que en nuestro caso, logramos observar un efecto de OH1 sobre los niveles de pSTAT1 aun teniendo menor eficiencia de transfección en nuestros ensayos (29%) respecto a los reportados por Harvey y colaboradores (84.3%) [38]. De este dato se desprende la necesidad de mejorar la eficiencia de transfección en nuestros ensayos.

Además, se confirmó mediante experimentos de ST que STAT1 interacciona con OH1. STAT1, presente en un extracto complejo de proteínas fue aislado específicamente al usar una matriz donde se inmovilizó OH1 (OH1-C112S). Sin embargo, fue necesario recurrir a experimentos de western blot para su identificación utilizando un anticuerpo específico contra STAT1 ya que no se detectaron péptidos de STAT1 mediante espectrometría de masa. Esto puede ser un indicativo de la necesidad de optimizar las condiciones de lavado y elución de dichas matrices, tratando de minimizar las proteínas abundantes que puedan enmascarar a STAT1, un procedimiento ya aplicado por nuestro grupo para el estudio de una fosfatasa bacteriana [47], [54]. Para ello se utilizó la Resonancia Plasmónica de Superficie (SPR) con el objetivo de definir condiciones de lavado y elución más exigentes. Para OH1 se intentó caracterizar la interacción de OH1 con el extracto proteico utilizando un equipo de SPR (Biacore 3000, GE Healthcare instrument) del servicio de la Unidad de Biofísica de Proteínas (UBP) del Institut Pasteur Montevideo, bajo la supervisión de Federico Carrión. Por ahora contamos con resultados de un único ensayo, que debido a diferentes impedimentos técnicos no hemos logrado contar con una réplica del mismo. Cabe destacar que a pesar de no contar con una réplica de este, pudimos observar una interacción entre OH1 y componentes del extracto de células HeLa y que altas concentraciones de NaCl y del detergente zwitteriónico CHAPS no parecen afectar esta interacción. Esto motivó a realizar un nuevo ensayo de ST, en el cuál se agregaron etapas de lavado con CHAPS (0.3%) y altas concentraciones de NaCl (0.5 M). Bajo estas condiciones, se logró identificar por espectrometría de masas a STAT1 en los eluidos de ST. Sin embargo estos ensayos no se incluyeron en la tesis dado que tuvimos problemas de contaminación en el control negativo del mismo.

Por otro lado, se encontró que la expresión de OH1, en el sistema celular puesto en marcha en esta tesis, inhibió de forma estadísticamente significativa la translocación de STAT1 al núcleo. Siendo la primera vez que se observa este efecto para esta fosfatasa viral, y a partir de estos datos de localización sub-celular en conjunto con los anteriormente descritos, se puede inferir una función de OH1 en la inhibición de la vía de señalización JAK/STAT inducida por INF $\gamma$  similar a la reportada para VH1 [36], [37]. Uno de los métodos utilizados en esta tesis para la expresión transitoria de OH1 fue la producción de vectores virales de tipo amplicón basados en HSV1. Curiosamente, los vectores expresando OH1 salvaje fueron titulados transduciendo células Vero 2-2 y realizando sin dificultad el conteo de numerosas células fluorescentes. Sin embargo cuando se utilizaron células HeLa se obtuvieron muy bajos niveles de transducción y por lo tanto de células fluorescentes. Por citometría de flujo se observó una tendencia de este vector, portando la OH1 salvaje, de resultar más citotóxico que los otros vectores (OH1-C112S y control). Este efecto de toxicidad podría deberse a la presencia de la OH1 en su forma activa y en grandes cantidades (ya que el vector introduce del orden de 21 copias del gen), lo que podría distorsionar las vías de señalización de la célula en la cual la estamos expresando. Las diferencias observadas al usar células

HeLa respecto al utilizar células Vero 2-2 podrían deberse a una sensibilidad diferente a dicha actividad. Esto nos llevó a utilizar directamente los plásmidos de este sistema, para introducir menos copias del gen de OH1, evitando potenciar un efecto citotóxico. Esto fue efectivo y nos permitió avanzar en las preguntas planteadas.

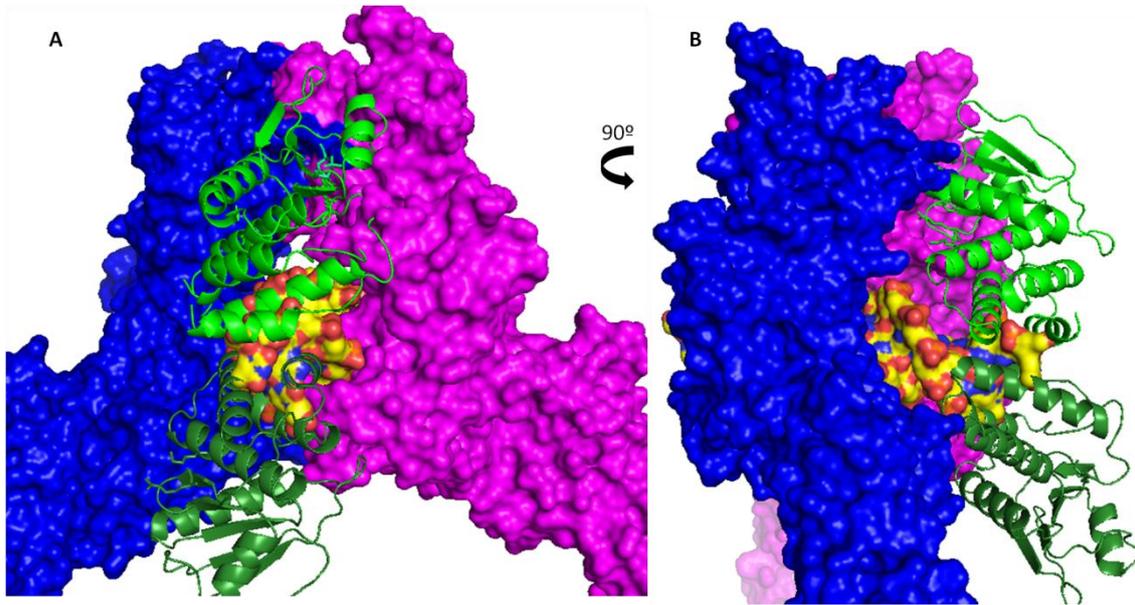
Como describimos en los resultados en los experimentos de localización sub-celular de STAT1, se constató que el mutante inactivo OH1-C112S también inhibió la translocación al núcleo de STAT1. Teniendo en cuenta que este mutante no posee actividad fosfatasa [33], [34] pero que es de esperar mantenga la afinidad por su sustrato, era esperable que afectara la translocación. Sin embargo, no esperábamos que la afectara de manera similar a la OH1 salvaje, para esta última esperábamos ver un mayor efecto ya que al estar activa el número de recambio de moléculas de STAT1 en el sitio activo sería mayor. Este resultado similar entre la forma activa e inactiva de OH1, podría estar indicando que STAT1 está siendo reclutado por un sitio diferente al sitio activo. Ambos podrían estar secuestrando las moléculas de STAT1 en el citoplasma celular e impidiendo su consecuente translocación al núcleo. Incluso existen ejemplos de patógenos que se basan en esta estrategia para interferir con esta importante vía de señalización celular. Por ejemplo, se ha reportado que la proteína V codificada por el virus Nipah (familia *Paramixoviridae*), inhibe la respuesta transcripcional y la translocación al núcleo de STAT1 mediante el secuestro de este factor en complejos de alto peso molecular que se mantienen en el citoplasma incluso luego de la estimulación con INF $\gamma$  y  $\alpha$  [83]. De la misma forma, la proteína P del virus de la rabia (familia *Rhabdoviridae*) también es capaz de inhibir la translocación de STAT1 al núcleo como estrategia de bloqueo de la respuesta por INF. Además, se ha reportado que esta proteína también es capaz de interferir en la unión al ADN de STAT1 activado [84].

No podemos descartar como hipótesis que la fosfatasa OH1, al interactuar con STAT1, facilite que este último adopte una conformación favorable a la desfosforilación por otra fosfatasa celular. De hecho se ha propuesto que STAT1 existe en la célula en un equilibrio entre una conformación dimérica paralela y una anti-paralela, teniendo esta última predisposición por ser desfosforilada [50], [51], [85]. De ser este el caso, OH1 podría actuar desplazando el equilibrio existente en el dímero de STAT1 hacia la conformación anti-paralela, dejando así más accesible los residuos de tirosina fosforilados. En el caso del mutante inactivo de OH1, la desfosforilación podría estar siendo llevada a cabo por una fosfatasa celular y en el caso de la OH1 salvaje por ella misma. Los resultados de los experimentos de acoplamiento molecular realizados en esta tesis concuerdan con esta hipótesis. Por un lado, la forma anti-paralela de STAT1 resultó siempre compatible con los complejos generados con OH1. Por otro lado, se constató que la unión canónica a través del sitio catalítico de OH1 con la p-Tyr701 de STAT1 es poco probable bajo las condiciones definidas en nuestro acoplamiento. Esto sugiere una interacción alternativa de reconocimiento de STAT1

independiente del sitio catalítico de OH1, pero que permitiría la posterior desfosforilación de STAT1. A su vez, es también concordante con el hecho que durante los experimentos de ST, la elución con ortovanadato de sodio, un inhibidor competitivo de fosfatasas que interacciona con el sitio catalítico de la enzima, no fue efectiva.

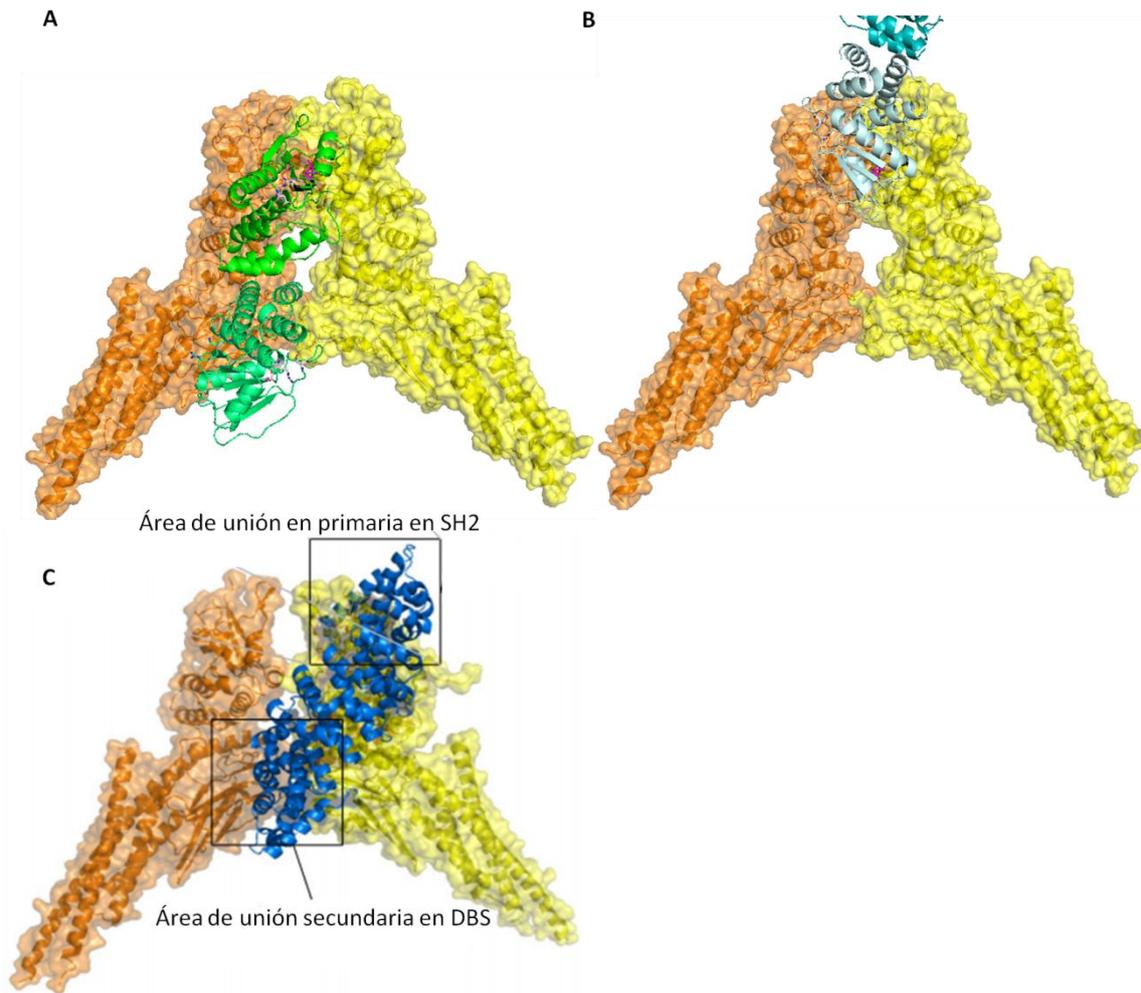
En esta misma línea, un mecanismo de interacción en dos pasos, fue explorado por Jardin y colaboradores para la interacción de VHR con STAT5 y fue extrapolado para el complejo formado por VH1 y STAT1 [52]. Si bien se corroboró que múltiples residuos reportados en ese trabajo se encontraban conservados en OH1, entre ellos la Tyr126 responsable de la interacción con STAT1 a través de su dominio SH2, no fuimos capaces de reproducir la superficie de interacción reportadas por Jardin y colaboradores para el complejo OH1/STAT1. Es importante destacar que estos autores no modelaron el extremo C-terminal con la Tyr701 de STAT1 como se realizó en esta tesis, ni evaluaron distintas conformaciones del dímero de esta proteína, lo que representa un nuevo grado de profundización sobre esta interacción aportada por nuestro trabajo. Teniendo esto en consideración, identificamos otra Tyr en la posición 36, conservada en todos los miembros de la sub-familia a la que pertenece OH1 (disponible en Figura D1 de anexos). En base a esta Tyr se describieron dos complejos alternativos que podrían interaccionar con el dominio SH2 de STAT1. En estos complejos la Tyr36 interaccionó con la Arg602 del dominio SH2. Al ocupar este dominio SH2, estos complejos dificultarían la unión a este sitio de la Tyr701 del otro monómero de STAT1 y por ende, desestabilizarían la formación del dímero paralelo de STAT1 que depende fuertemente de esta interacción. Además, en el complejo R2 en particular, OH1 se superpone con la localización de la doble hebra de ADN en la conformación paralela de STAT1 (Figura 28). Esto es concordante con lo reportado para VH1 que es capaz de desfosforilar en la Tyr701 a STAT1 *in vitro*, pero su actividad se ve inhibida por la adición de moléculas de ADN reconocidas por STAT1 [40]. En la misma línea, se observó que la importina  $\alpha 5$ , responsable del transporte de los dímeros paralelos de STAT1 activados al núcleo, también protegió a STAT1 de ser desfosforilado por VH1 [40]. Incluso, es sabido que la importina  $\alpha 5$  reconoce a STAT1 en un sitio que no incluye a la Tyr701[40]. En concordancia con nuestros resultados, el modelo para el complejo STAT1/importina  $\alpha 5$  propone una superficie de interacción que se superpone con el complejo R2 (Figura 29) [86]. En base a esto postulamos, que en un ensayo *in vitro*, la desfosforilación de STAT1 por parte de OH1 también se vería inhibida por estas dos moléculas (ADN e importina). Toda esta información, hace de la Tyr36 un objetivo interesante a la hora de generar mutantes puntuales de OH1, para profundizar en el estudio de la interacción STAT1-OH1 y rol en la vía JAK-STAT1. Con estos mutantes, se podría evaluar la importancia de este sitio sobre la actividad de OH1 y el efecto sobre la translocación, y fosforilación de STAT1, en los ensayos celulares puestos a punto en esta tesis. Normalmente, se mutan los residuos de tirosina a fenilalanina para inhibir la fosforilación en este sitio, mientras que para

mimetizar la fosforilación se genera una mutación a ácido glutámico [87]. Debido al grado de conservación de la Tyr36, podría tratarse de un mecanismo de interacción con STAT1 que estaría conservado por lo menos para los chordopoxvirus y dada su conservación en la fosfatasa humana VHR, posiblemente para otras fosfatasas de especificidad dual.



**Figura 28- Representación gráfica del impedimento estérico presente en el complejo R2 entre OH1 y la hebra de ADN unida al dímero paralelo de STAT1.**

Se representan ambos monómeros del dímero paralelo de STAT1 (azul oscuro y magenta) unido a una doble hebra de ADN (amarillo, rojo y azul) y un dímero de OH1 (verde y verde oscuro) en una vista frontal en referencia a OH1 (A) y con una rotación de 90° (B). Las imágenes se generaron con el software PyMOL.



**Figura 29- Comparación del dímero de OH1 con molécula de importina  $\alpha 5$  sobre dímero paralelo de STAT1.** Se muestran los complejos R2 (A) y R5 (B) generados en esta tesis de interacción del dímero de OH1 con la conformación paralela del dímero de STAT1. Los dímeros de OH1 se encuentran representados en verde y verde claro (R2) y celeste claro y cian (R5). C- Modelo de interacción entre conformación paralela del dímero de STAT1 y molécula de importina  $\alpha 5$  (azul). Se indican las áreas de unión de la importina  $\alpha 5$  al dominio SH2 y al dominio de unión al ADN (DBS) reportadas. En todos los casos se representan los monómeros de STAT1 en naranja y amarillo. Imagen adaptada de [86].

Si bien se ha reportado que la Tyr36 está fosforilada en VHR [66] y resultó estar conservada en los alineamientos realizados, una limitación de nuestros resultados es el hecho de que hasta el momento no hemos confirmado que OH1 se encuentre fosforilada en el entorno celular, experimentos en curso de planificación. Sin embargo, la información obtenida en los experimentos discutidos hasta ahora define el camino a seguir en cuanto al estudio del mecanismo de interacción de este factor de virulencia de OrfV.

## 6.2 Otros interactores de OH1

Es común que las fosfatasa tengan más de un sustrato fisiológico [35], [36], [88], [89]. De hecho, en los experimentos de ST utilizados para identificar a STAT1 como sustrato fisiológico de la fosfatasa VH1, se vieron otras proteínas fosforiladas que no han sido exploradas [36]. Esto es de esperar, también considerando que los poxvirus tienen un ciclo replicativo extremadamente complejo y el cual aún no se conoce en su totalidad.

Con respecto a OH1, además de confirmar a STAT1 como sustrato eucariota, se encontraron nuevos posibles interactores basándose en los experimentos de ST realizados. Tres proteínas fueron específicamente concentradas al utilizar las matrices con la OH1-C112S inmovilizada: GAPDH y distintas formas de actina y tubulina. Tal como se describió en los resultados, estas tres proteínas presentan sitios de fosforilación en tirosina, aunque en el caso de las actinas y tubulinas, el rol de estas fosforilaciones no ha sido estudiado aún. Cabe remarcar, que estas proteínas nunca fueron observadas en las matrices utilizadas como control en los diferentes ensayos independientes de ST, lo que es un hecho importante dado que se trata de proteínas abundantes y reportadas como contaminantes usuales de este tipo de experimento [78], [79]. Teniendo esto en consideración, estas proteínas continúan siendo relevantes para nuestro grupo y la realización de futuras investigaciones.

En el caso de GAPDH, es una enzima clave de la vía glucolítica ampliamente estudiada. Normalmente se encuentra en el citoplasma celular formando homo-tetrámeros y su función canónica consiste en la fosforilación oxidativa del gliceraldehído 3 fosfato en presencia de  $\text{NAD}^+$  y fosfato inorgánico. Sin embargo, se ha reportado implicada en otras múltiples funciones, lo que la hace relevante para un patógeno oportunista. Entre estas funciones, se encuentran la reparación del ADN, la exportación de ARN de transferencia, el transporte y la fusión de membranas, la dinámica del citoesqueleto y la muerte celular [90]. Resulta interesante señalar que GAPDH fue la primer enzima glucolítica conocida capaz de interactuar con moléculas de tubulina y actina, fomentando su aglomeración y polimerización respectivamente [90]. Esto es digno de remarcar dado que es concordante con la identificación de estas tres proteínas en los ST realizados en esta tesis. Además, es sabido que los poxvirus se valen del citoesqueleto para su transporte intracelular durante su ciclo replicativo, resaltando la utilidad para el patógeno de poseer un mecanismo de regulación de esta función. Por ejemplo, para el virus *Vaccinia* luego de la entrada a la célula, la partícula viral es transportada desde la periferia celular utilizando el sistema microtubular celular. Las proteínas responsables de esta interacción no han sido determinadas, pero se estima que A10L y L4R podrían estar involucrados [91]. Además, se constató que los ARN mensajeros tempranos de este virus también interactúan con los microtúbulos para ser transportados a estructuras granulares discretas donde se asocian con factores de

traducción celulares y poliribosomas [91]. Otra forma en la que este virus utiliza los microtúbulos es durante el transporte de los IMV desde las factorías virales donde fueron generados hacia la periferia celular [91]. Además, los poxvirus son capaces de utilizar un mecanismo de dispersión basado en proyecciones de actina polimerizada debajo de la superficie celular para propulsarse desde la célula infectada [92]. Sin embargo, este mecanismo de transmisión no ha sido observado en el OrfV y puede deberse al hecho de que éste no codifica un homólogo de la proteína A36R, responsable de reclutar la actina hacia la superficie celular donde se encuentran los viriones [29].

En cuanto al tráfico y fusión de membranas, se ha reportado que GAPDH interacciona con múltiples proteínas para regular el transporte de vesículas entre el retículo RE y el aparato de Golgi. En particular, se reportó que GAPDH es fosforilado (p-GAPDH) por la protein-quinasa atípica C1 (aPKC) y esta fosforilación incrementa el reclutamiento de p-GAPDH a los complejos de transporte (VTCs por *vesicular tubular clusters*). Los VTCs funcionan como un intermediario en la vía de transporte entre el aparato de Golgi y el RE. A su vez, la fosforilación de GAPDH es necesaria para la interacción de las vesículas con los microtúbulos. Además, esta fosforilación es asistida por Rab2, una GTPasa que se localiza en VTCs y regula el transporte retrógrado de vesículas entre el Golgi y el RE [90], [93]. De hecho, se reportó que la fosforilación en la Tyr42 de GAPDH es esencial para el funcionamiento del sistema de transporte, aunque no impedía su unión a Rab2 y reclutamiento al VTC [80]. Coincidentemente, se ha reportado que Rab2 co-localiza predominantemente con las membranas encontradas en las factorías virales durante la infección con virus *Vaccinia* [94]. Recientemente, GAPDH ha sido propuesto como un gran integrador de señales en el tráfico vesicular, dado que también participa en el tráfico anterógrado mediante la interacción con Rab1 [95].

La quinasa aPKC responsable de fosforilar a GAPDH en esta vía, es capaz de ser activada por Pltdns. Los Pltdns son componentes de la membrana celular que actúan como “códigos postales celulares” determinando la identidad y destino de diferentes organelos membranosos [96], que a su vez juegan un papel importante en la morfogénesis viral del virus *Vaccinia* [42]. Coincidentemente, nuestro grupo reportó recientemente que OH1 es capaz de desfosforilar Pltdns *in vitro* [34]. Este hecho es relevante, dado que los poxvirus llevan a cabo su ciclo replicativo en factorías virales, dominios citoplásmicos donde se da la replicación del ADN viral y el ensamblado de las partículas. Estos dominios parecerían ser derivados de estructuras celulares y se rodean de cisternas del RE [21]. Incluso, cuando los IMV se transportan a la periferia celular, adquieren más envolturas de membrana derivadas del Golgi o endosomas tempranos. En su conjunto, esta información sugiere un posible rol de OH1 sobre el tráfico de membranas en la morfogénesis del OrfV mediante la regulación de GAPDH involucrando también fosfatidilinositoles. Esto se basa en las variadas funciones reguladoras que cumple GAPDH en la célula, y el hecho de que las modificaciones post-

traduccionales como la fosforilación jueguen un rol directo en estas funciones. Mediante la modulación de GAPDH, OH1 podría regular el tráfico de membranas necesario para la morfogénesis de las partículas virales. Sin embargo, dado que se necesitan múltiples co-factores para este tipo de procesos, es probable que OH1 actúe en concierto con otras proteínas virales para alcanzar este objetivo. De hecho, no sería la primera vez que se reporta que un poxvirus modula a GAPDH. Por ejemplo, en situaciones de estrés celular, la expresión de GAPDH aumenta y este se transloca del citoplasma al núcleo donde es capaz de activar la apoptosis celular. Se ha reportado que la infección con el virus *Vaccinia* en monocitos adherentes afecta la expresión e inhibe translocación de GAPDH al núcleo y se propone que podría tratarse de un mecanismo viral para inhibir la apoptosis [97]. Con respecto a la translocación de GAPDH al núcleo, un estudio identificó distintos sitios de fosforilación en esta proteína y evaluó su importancia ante una respuesta provocada por el daño del genoma (estrés genotóxico). Se reportó que un mutante puntual de GAPDH en Tyr94 (que carecía de ese residuo en su forma fosforilada), alteró marcadamente la dinámica de la interacción de este mutante de GAPDH con las proteínas nucleares, aunque no perdió la capacidad de translocarse al núcleo ante el estrés genotóxico. Esto sugiere que esta P-Tyr94 no es necesaria para la translocación al núcleo pero es importante para la interacción de GAPDH con las proteínas involucradas en esta vía, las cuales no han sido descritas [81]. Cabe destacar que en esta tesis identificamos la Tyr94 de GAPDH como fosforilada en los experimentos de ST (Tabla 2). Otro ejemplo de un virus apropiándose de la funcionalidad de GAPDH, lo constituye el estudio con el virus Parainfluenza humano (familia *Paramixoviridae*), el cual empaqueta en su virión formas fosforiladas de GAPDH que se encuentran normalmente en concentraciones minoritarias en el entorno celular. A su vez, se constató que estas formas fosforiladas de GAPDH inhiben la transcripción viral y podrían funcionar como un regulador de dicha función en el ciclo viral de este virus [98].

Por último, GAPDH junto a la glutamil-prolil tNA sintetasa (EPRS), la proteína asociada a NS1 1 (NSAP1) y la proteína ribosomal L13a forman parte del complejo de inhibición de la traducción activado por INF $\gamma$  (GAIT, por interferon-gamma-activated/inhibitor of translation). El complejo GAIT está presente en células mieloides humanas y se activa ante la estimulación de la célula con INF $\gamma$ . Luego de la activación este complejo se une al extremo 3' de regiones no traducidas de ARN mensajeros con función inflamatoria e inhibe su traducción. De esta forma funciona como un regulador negativo de la respuesta inflamatoria, con el fin de limitar la gravedad de la respuesta inmune [99]. En este contexto, GAPDH funciona como una chaperona, protegiendo a la proteína ribosomal L13a de la degradación proteosomal, permitiendo que esta participe en la formación del complejo GAIT [100], aunque no se ha reportado una incidencia de la fosforilación en GAPDH en este proceso. Si bien este mecanismo se encuentra en células mieloides y el OrfV replica principalmente en queratinocitos y células

epiteliales, es una vía interesante que este patógeno podría modular para limitar la respuesta antiviral generada por la célula.

En conclusión, en su conjunto los resultados de esta tesis apoyan a OH1 como un factor de virulencia del OrfV. OH1 interacciona con STAT1, es capaz de desfosforilarlo, e inhibe su translocación al núcleo en un modelo celular. De esta forma, cumple funciones previamente reportadas para factores homólogos en virus emparentados. Sin embargo, presenta características propias, algunas de las cuales podrían estar directamente relacionadas con la morfogénesis viral, implicando nuevos interactores descritos en este trabajo. De esta forma, los resultados de esta tesis ahondaron en el conocimiento de la fosfatasa OH1 del OrfV y abren nuevas puertas para la investigación del papel de esta enzima en el ciclo de este complejo patógeno viral.

### **Conclusiones generales**

- Utilizando el mutante OH1-C112S se identificó a GAPDH, a distintas formas de actina y tubulina, y a STAT1 como potenciales interactores de OH1 (directos o indirectos).
- En las células HeLa, la expresión de OH1 correlaciona con una disminución en la translocación de STAT1 al núcleo y en la desfosforilación de STAT1 en la Tyr701. Todo esto indicaría que STAT1 es sustrato fisiológico de OH1.
- OH1 podría estar reclutando a STAT1 mediante un sitio diferente al sitio activo de OH1. Los estudios in silico nos permitieron identificar dos posibles modelos de interacción entre OH1 y STAT1 que involucran la Tyr 36 de OH1

## 7. Perspectivas

Para continuar con la caracterización de este factor de virulencia y comenzar con la validación del modelo de interacción propuesto, es vital evaluar el estado de fosforilación de OH1 en células eucariotas, identificando si existen Tyr fosforiladas. Además, es necesario evaluar si existen cambios en el nivel de fosforilación de STAT1 en la Tyr701 cuando se expresa la fosfatasa OH1-C112S en las células HeLa. De ser posible, sería interesante realizar también experimentos de dinámica molecular para determinar la relevancia de interacciones reportadas en este trabajo, en lo que respecta a los complejos OH1/STAT1. Por otro lado, sería relevante contar con STAT1 recombinante y fosforilado. Esto permitiría determinar parámetros cinéticos de OH1 salvaje y mutantes específicos con su sustrato STAT1, caracterizar la interacción mediante SPR y abordar la co-cristalización del complejo STAT1/OH1. En la misma línea, sería interesante evaluar si existe un efecto en la desfosforilación de STAT1 mediada por OH1, en presencia de la importina  $\alpha 5$  y de ADN. A su vez, es importante investigar los distintos niveles de acción de este factor de virulencia, por lo que resulta de interés evaluar el efecto de la expresión OH1 sobre los genes normalmente activados por STAT1.

Es necesario validar los tres potenciales nuevos interactores de OH1, apuntando a la utilización del sistema celular puesto en marcha en esta tesis, para relevar la localización celular y estado de fosforilación de GAPDH, actina y tubulina en presencia de OH1. En particular, sería interesante realizar experimentos de acoplamiento molecular entre OH1 y estos potenciales interactores, en particular GAPDH. Además, la capacidad de OH1 de desfosforilar PtdIns, abre muchas posibilidades para estudiar las implicancias en la biología viral del OrfV en conjunto con los interactores descritos en esta tesis. Sin embargo, todavía es necesario dilucidar que especificidad tiene esta fosfatasa viral por los distintos PtdIns para ahondar en las vías que este modula. Estos experimentos están en curso en nuestro laboratorio.

Por último, visto el grado de complejidad del ciclo replicativo del OrfV, las proteínas a estudio también deben ser evaluadas en un contexto menos aislado, permitiendo la interacción con otros factores virales. Esto es evidente para OH1, y para cualquier factor de virulencia que se quiera caracterizar a posteriori. Debido a eso, la adaptación del OrfV al crecimiento en cultivo de células sigue siendo una perspectiva de gran importancia para esta línea de investigación.

## 8. Bibliografía

- [1] M. M. Al-Qattan, "Orf infection of the hand.," *J. Hand Surg. Am.*, vol. 36, no. 11, pp. 1855–8, Nov. 2011.
- [2] A. Nougairede, C. Fossati, N. Salez, S. Cohen-Bacrie, L. Ninove, F. Michel, S. Aboukais, M. Buttner, C. Zandotti, X. de Lamballerie, and R. N. Charrel, "Sheep-to-human transmission of Orf virus during Eid al-Adha religious practices, France.," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 19, no. 1, pp. 102–5, Jan. 2013.
- [3] M. C. McElroy and H. F. Bassett, "The development of oral lesions in lambs naturally infected with orf virus," *Vet. J.*, vol. 174, no. 3, pp. 663–664, 2007.
- [4] M. Hosamani, A. Scagliarini, V. Bhanuprakash, C. J. McInnes, and R. K. Singh, "Orf: an update on current research and future perspectives.," *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, vol. 7, no. 7, pp. 879–893, 2009.
- [5] C. Bergqvist, M. Kurban, and O. Abbas, "Orf virus infection," *Rev. Med. Virol.*, vol. 27, no. 4, p. e1932, Jul. 2017.
- [6] A. De la Concha-Bermejillo, "Health Hazards in veterinary practice," in *Poxviral diseases.*, 3rd ed., Schaumburg: American Veterinary Medical Association, 1995, pp. 55–56.
- [7] A. Peralta, C. Robles, A. Martínez, L. Alvarez, A. Valera, G. Calamante, and G. A. König, "Identification and molecular characterization of Orf virus in Argentina," *Virus Genes*, vol. 50, no. 3, pp. 381–388, 2015.
- [8] J. S. Abrahão, I. A. Borges, C. Mazur, Z. I. P. Lobato, P. C. P. Ferreira, C. A. Bonjardim, G. S. Trindade, and E. G. Kroon, "Looking back: a genetic retrospective study of Brazilian Orf virus isolates," *Vet. Rec.*, vol. 171, no. 19, pp. 476–476, Nov. 2012.
- [9] N. Olivero, "Caracterización a nivel Molecular de Cepas Uruguayas del Virus causante del Ectima Contagioso en Ovinos," Universidad de la República, 2008.
- [10] S. Nandi, U. K. De, and S. Chowdhury, "Current status of contagious ecthyma or orf disease in goat and sheep-A global perspective," *Small Rumin. Res.*, vol. 96, no. 2–3, pp. 73–82, 2011.
- [11] R. A. Fairley, E. M. Whelan, P. A. Pesavento, and A. A. Mercer, "Recurrent localised cutaneous parapoxvirus infection in three cats," *N. Z. Vet. J.*, vol. 56, no. 4, pp. 196–201, 2008.
- [12] S. Essbauer, M. Pfeffer, and H. Meyer, "Zoonotic poxviruses," *Vet. Microbiol.*, vol. 140, no. 3–4, pp. 229–236, 2010.
- [13] S. S. Kilic, A. Puel, and J. L. Casanova, "Orf Infection in a Patient with Stat1 Gain-of-Function," *J. Clin. Immunol.*, vol. 35, no. 1, pp. 80–83, 2015.

- [14] S. J. Key, J. Catania, S. F. Mustafa, R. Logan, M. Kalavala, S. C. Hodder, and D. W. Patton, "Unusual presentation of human giant orf (ecthyma contagiosum).," *J. Craniofac. Surg.*, vol. 18, no. 5, pp. 1076–8, 2007.
- [15] J. A. Gilray, P. F. Nettleton, I. Pow, C. J. Lewis, S. A. Stephens, J. D. Madeley, and H. W. Reid, "Restriction endonuclease profiles of orf virus isolates from the British Isles," *Vet. Rec.*, vol. 143, no. 9, pp. 237–240, 1998.
- [16] J. J. M. B.D. Perry, T.F. Randolph and K. R. S. and P. K. Thornton, *Investing in animal health research to alleviate poverty*. 2002.
- [17] C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L. A. Ball, *Virus taxonomy: VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005.
- [18] K. A. Bratke, A. McLysaght, and S. Rothenburg, "A survey of host range genes in poxvirus genomes," *Infect. Genet. Evol.*, vol. 14, no. 3, pp. 406–425, Mar. 2013.
- [19] A. A. Mercer, N. Ueda, S. M. Friederichs, K. Hofmann, K. M. Fraser, T. Bateman, and S. B. Fleming, "Comparative analysis of genome sequences of three isolates of Orf virus reveals unexpected sequence variation," *Virus Res.*, vol. 116, no. 1–2, pp. 146–158, 2006.
- [20] D. M. Haig and C. J. McInnes, "Immunity and counter-immunity during infection with the parapoxvirus orf virus," *Virus Res.*, vol. 88, no. 1–2, pp. 3–16, 2002.
- [21] L. Liu, T. Cooper, P. M. Howley, and J. D. Hayball, "From crescent to mature virion: Vaccinia virus assembly and maturation," *Viruses*, vol. 6, no. 10, pp. 3787–3808, 2014.
- [22] F. I. Schmidt, C. K. E. Bleck, and J. Mercer, "Poxvirus host cell entry," *Curr. Opin. Virol.*, vol. 2, no. 1, pp. 20–27, 2012.
- [23] A. C. Townsley, T. G. Senkevich, and B. Moss, "The product of the vaccinia virus L5R gene is a fourth membrane protein encoded by all poxviruses that is required for cell entry and cell-cell fusion.," *J. Virol.*, vol. 79, no. 17, pp. 10988–10998, 2005.
- [24] T. G. Senkevich, B. M. Ward, and B. Moss, "Vaccinia virus A28L gene encodes an essential protein component of the virion membrane with intramolecular disulfide bonds formed by the viral cytoplasmic redox pathway.," *J. Virol.*, vol. 78, no. 5, pp. 2348–56, 2004.
- [25] T. G. Senkevich, C. L. White, E. V. Koonin, and B. Moss, "Complete pathway for protein disulfide bond formation encoded by poxviruses.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 10, pp. 6667–6672, 2002.
- [26] G. McFadden, "Poxvirus tropism," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 3, no. 3, pp. 201–213, Mar. 2005.
- [27] S. C. Harrison, B. Alberts, E. Ehrenfeld, L. Enquist, H. Fineberg, S. L. McKnight, B.

- Moss, M. O'Donnell, H. Ploegh, S. L. Schmid, K. P. Walter, and J. Theriot, "Discovery of antivirals against smallpox.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 31, pp. 11178–11192, 2004.
- [28] L. M. Wise, M. K. Inder, N. C. Real, G. S. Stuart, S. B. Fleming, and A. A. Mercer, "The vascular endothelial growth factor (VEGF)-E encoded by orf virus regulates keratinocyte proliferation and migration and promotes epidermal regeneration," *Cell. Microbiol.*, vol. 14, no. 9, pp. 1376–1390, 2012.
- [29] S. B. Fleming, L. M. Wise, and A. A. Mercer, "Molecular genetic analysis of orf virus: A poxvirus that has adapted to skin," *Viruses*, vol. 7, no. 3, 2015.
- [30] D. M. Haig, "Orf virus infection and host immunity.," *Curr. Opin. Infect. Dis.*, vol. 19, no. 2, pp. 127–131, 2006.
- [31] D. M. Haig, "Subversion and piracy: DNA viruses and immune evasion," *Res. Vet. Sci.*, vol. 70, no. 3, pp. 205–219, 2001.
- [32] A. A. Mercer, S. B. Fleming, and N. Ueda, "F-box-like domains are present in most poxvirus ankyrin repeat proteins," *Virus Genes*, vol. 31, no. 2, pp. 127–133, 2005.
- [33] D. Segovia, "Caracterización estructural y funcional de la única fosfatasa del virus Orf," Universidad de la República, 2016.
- [34] D. Segovia, A. Haouz, D. Porley, N. Olivero, M. Martínez, M. Mariadassou, M. Berois, G. André-Leroux, and A. Villarino, "OH1 from Orf Virus: A New Tyrosine Phosphatase that Displays Distinct Structural Features and Triple Substrate Specificity," *J. Mol. Biol.*, vol. 429, no. 18, pp. 2816–2824, Sep. 2017.
- [35] K. Liu, B. Lemon, and P. Traktman, "The dual-specificity phosphatase encoded by vaccinia virus, VH1, is essential for viral transcription in vivo and in vitro.," *J. Virol.*, vol. 69, no. 12, pp. 7823–34, 1995.
- [36] P. Najarro, P. Traktman, and J. A. Lewis, "Vaccinia Virus Blocks Gamma Interferon Signal Transduction: Viral VH1 Phosphatase Reverses Stat1 Activation," *J. Virol.*, vol. 75, no. 7, pp. 3185–3196, 2001.
- [37] B. A. Mann, J. H. Huang, P. Li, H.-C. Chang, R. B. Slee, A. O'Sullivan, M. Anita, N. Yeh, M. J. Klemsz, R. R. Brutkiewicz, J. S. Blum, and M. H. Kaplan, "Vaccinia Virus Blocks Stat1-Dependent and Stat1-Independent Gene Expression Induced by Type I and Type II Interferons," *J. Interf. Cytokine Res.*, vol. 28, no. 6, pp. 367–380, 2008.
- [38] R. Harvey, C. McCaughan, L. M. Wise, A. A. Mercer, and S. B. Fleming, "Orf virus inhibits interferon stimulated gene expression and modulates the JAK/STAT signalling pathway," *Virus Res.*, vol. 208, pp. 180–188, 2015.
- [39] A. C. Koksai and G. Cingolani, "Dimerization of Vaccinia virus VH1 is essential for dephosphorylation of STAT1 at tyrosine 701," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 16, pp. 14373–14382, 2011.

- [40] A. C. Koksai, J. D. Nadozzi, and G. Cingolani, "Dimeric quaternary structure of the prototypical dual specificity phosphatase VH1," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 15, pp. 10129–10137, 2009.
- [41] S. Kolli, X. Meng, X. Wu, D. Shengjuler, C. E. Cameron, Y. Xiang, and J. Deng, "Structure-function analysis of vaccinia virus H7 protein reveals a novel phosphoinositide binding fold essential for poxvirus replication.," *J. Virol.*, vol. 89, no. 4, pp. 2209–19, 2015.
- [42] S. McNulty, W. Bornmann, J. Schriewer, C. Werner, S. K. Smith, V. A. Olson, I. K. Damon, R. M. Buller, J. Heuser, and D. Kalman, "Multiple phosphatidylinositol 3-kinases regulate vaccinia virus morphogenesis," *PLoS One*, vol. 5, no. 5, 2010.
- [43] J. Krijnse Locker, P. Chlanda, T. Sachsenheimer, and B. Brügger, "Poxvirus membrane biogenesis: Rupture not disruption," *Cell. Microbiol.*, vol. 15, no. 2, pp. 190–199, 2013.
- [44] F. I. Schmidt, C. K. E. Bleck, L. Reh, K. Novy, B. Wollscheid, A. Helenius, H. Stahlberg, and J. Mercer, "Vaccinia virus entry is followed by core activation and proteasome-mediated release of the immunomodulatory effector VH1 from lateral bodies," *Cell Rep.*, vol. 4, no. 3, pp. 464–476, 2013.
- [45] M. Derrien, a Punjabi, M. Khanna, O. Grubisha, and P. Traktman, "Tyrosine Phosphorylation of A17 during Vaccinia Virus Infection: Involvement of the H1 Phosphatase and the F10 Kinase," *J Virol*, vol. 73, no. 9, pp. 7287–7296, 1999.
- [46] a J. Flint, T. Tiganis, D. Barford, and N. K. Tonks, "Development of 'substrate-trapping' mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, no. 5, pp. 1680–1685, 1997.
- [47] M. Margenat, A.-M. Labandera, M. Gil, F. Carrion, M. Purificação, G. Razzera, M. M. Portela, G. Obal, H. Terenzi, O. Pritsch, R. Durán, A. M. Ferreira, and A. Villarino, "New potential eukaryotic substrates of the mycobacterial protein tyrosine phosphatase PtpA: hints of a bacterial modulation of macrophage bioenergetics state.," *Sci. Rep.*, vol. 5, no. 1, p. 8819, Mar. 2015.
- [48] D. S. Aaronson, "A Road Map for Those Who Don't Know JAK-STAT," *Science (80- .)*, vol. 296, no. 5573, pp. 1653–1655, 2002.
- [49] K. Shuai and B. Liu, "Regulation of JAK–STAT signalling in the immune system," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 3, no. 11, pp. 900–911, 2003.
- [50] C. Mertens, M. Zhong, R. Krishnaraj, W. Zou, X. Chen, and J. E. Darnell, "Dephosphorylation of phosphotyrosine on STAT1 dimers requires extensive spatial reorientation of the monomers facilitated by the N-terminal domain," *Genes Dev.*, vol. 20, no. 24, pp. 3372–3381, 2006.
- [51] X. Mao, Z. Ren, G. N. Parker, H. Sondermann, M. A. Pastorello, W. Wang, J. S. McMurray, B. Demeler, J. E. Darnell, and X. Chen, "Structural bases of unphosphorylated STAT1 association and receptor binding.," *Mol. Cell*, vol. 17,

no. 6, pp. 761–71, Mar. 2005.

- [52] C. Jardin and H. Sticht, “Identification of the Structural Features that Mediate Binding Specificity in the Recognition of STAT Proteins by Dual-Specificity Phosphatases,” *J. Biomol. Struct. Dyn.*, vol. 29, no. 4, pp. 777–792, 2012.
- [53] J. Sambrook and D. W. and Russell, *Molecular Cloning, a laboratory manual*, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2011.
- [54] M. Margenat, “Fosfatasas en tirosina de Mycobacterium tuberculosis: avances en la identificación de sustratos y posible rol en la adaptación de la bacteria al macrófago,” Universidad de la República, 2016.
- [55] C. Riccardi and I. Nicoletti, “Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry,” *Nat. Protoc.*, vol. 1, no. 3, pp. 1458–1461, 2006.
- [56] N. Dyballa and S. Metzger, “Fast and sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels,” *J. Vis. Exp.*, no. 30, pp. 6–10, Aug. 2009.
- [57] F. W. Studier, “Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 41, no. 1, pp. 207–234, May 2005.
- [58] S. van den Berg, P.-A. Löfdahl, T. Härd, and H. Berglund, “Improved solubility of TEV protease by directed evolution,” *J. Biotechnol.*, vol. 121, no. 3, pp. 291–8, Feb. 2006.
- [59] J. B. Hammond and N. J. Kruger, “The bradford method for protein quantitation,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 3, no. 1, pp. 25–32, 1988.
- [60] A. L. Epstein, “HSV-1-derived amplicon vectors: recent technological improvements and remaining difficulties--a review,” *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 104, no. 3, pp. 399–410, May 2009.
- [61] A. S. Laimbacher, L. E. Esteban, A. A. Castello, J. C. Abdusetir Cerfoglio, M. H. Argüelles, G. Glikmann, A. D’Antuono, N. Mattion, M. Berois, J. Arbiza, M. Hilbe, E. M. Schraner, M. Seyffert, C. Dresch, A. L. Epstein, M. Ackermann, and C. Fraefel, “HSV-1 Amplicon Vectors Launch the Production of Heterologous Rotavirus-like Particles and Induce Rotavirus-specific Immune Responses in Mice,” *Mol. Ther.*, vol. 20, no. 9, pp. 1810–1820, 2012.
- [62] T. Unger, Y. Jacobovitch, A. Dantes, R. Bernheim, and Y. Peleg, “Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression,” *J. Struct. Biol.*, vol. 172, no. 1, pp. 34–44, Oct. 2010.
- [63] N. Olivero, “Estudio de los Mecanismos Genéticos Implicados en la Variabilidad del Virus Causante del Ectima Contagioso en Ovinos,” Universidad de la República, 2012.
- [64] Y. Saeki, C. Fraefel, T. Ichikawa, X. O. Breakefield, and E. A. Chiocca, “Improved helper virus-free packaging system for HSV amplicon vectors using an ICP27-deleted, oversized HSV-1 DNA in a bacterial artificial chromosome,” *Mol. Ther.*,

vol. 3, no. 4, pp. 591–601, Apr. 2001.

- [65] C. a Schneider, W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri, “NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis,” *Nat. Methods*, vol. 9, no. 7, pp. 671–5, Jul. 2012.
- [66] A. Alonso, S. Rahmouni, S. Williams, M. van Stipdonk, L. Jaroszewski, A. Godzik, R. T. Abraham, S. P. Schoenberger, and T. Mustelin, “Tyrosine phosphorylation of VHR phosphatase by ZAP-70.,” *Nat. Immunol.*, vol. 4, no. 1, pp. 44–8, Jan. 2003.
- [67] L. Schrödinger, “The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8,” 2015.
- [68] N. Eswar, B. Webb, M. A. Marti-Renom, M. S. Madhusudhan, D. Eramian, M. Shen, U. Pieper, and A. Sali, “Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller,” in *Current Protocols in Bioinformatics*, vol. Chapter 5, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2006, p. 5.6.1-5.6.30.
- [69] V. B. Chen, W. B. Arendall, J. J. Headd, D. A. Keedy, R. M. Immormino, G. J. Kapral, L. W. Murray, J. S. Richardson, and D. C. Richardson, “MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography.,” *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, vol. 66, no. Pt 1, pp. 12–21, Jan. 2010.
- [70] A. Tovchigrechko and I. A. Vakser, “GRAMM-X public web server for protein-protein docking.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 34, no. Web Server issue, pp. W310-4, Jul. 2006.
- [71] A. Tovchigrechko and I. A. Vakser, “Development and testing of an automated approach to protein docking,” *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, vol. 60, no. 2, pp. 296–301, Jun. 2005.
- [72] E. Krissinel and K. Henrick, “Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State,” *J. Mol. Biol.*, vol. 372, no. 3, pp. 774–797, Sep. 2007.
- [73] D. Schneidman-Duhovny, Y. Inbar, R. Nussinov, and H. J. Wolfson, “PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 33, no. Web Server issue, pp. W363-7, Jul. 2005.
- [74] D. Duhovny, R. Nussinov, and H. J. Wolfson, “Efficient Unbound Docking of Rigid Molecules,” in *Algorithms in Bioinformatics*, 2002, pp. 185–200.
- [75] S. Lyskov, F.-C. Chou, S. Ó. Conchúir, B. S. Der, K. Drew, D. Kuroda, J. Xu, B. D. Weitzner, P. D. Renfrew, P. Sripakdeevong, B. Borgo, J. J. Havranek, B. Kuhlman, T. Kortemme, R. Bonneau, J. J. Gray, and R. Das, “Serverification of molecular modeling applications: the Rosetta Online Server that Includes Everyone (ROSIE).,” *PLoS One*, vol. 8, no. 5, p. e63906, 2013.
- [76] C. Dominguez, R. Boelens, and A. M. J. J. Bonvin, “HADDOCK: A Protein–Protein Docking Approach Based on Biochemical or Biophysical Information,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 7, pp. 1731–1737, Feb. 2003.
- [77] G. C. P. van Zundert, J. P. G. L. M. Rodrigues, M. Trellet, C. Schmitz, P. L. Kastiris,

- E. Karaca, A. S. J. Melquiond, M. van Dijk, S. J. de Vries, and A. M. J. J. Bonvin, "The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes," *J. Mol. Biol.*, vol. 428, no. 4, pp. 720–725, Feb. 2016.
- [78] L. Trinkle-Mulcahy, S. Boulon, Y. W. Lam, R. Urcia, F.-M. Boisvert, F. Vandermoere, N. A. Morrice, S. Swift, U. Rothbauer, H. Leonhardt, and A. Lamond, "Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes.," *J. Cell Biol.*, vol. 183, no. 2, pp. 223–39, Oct. 2008.
- [79] D. Mellacheruvu, Z. Wright, A. L. Couzens, J. Lambert, N. A. St-Denis, T. Li, Y. V Miteva, S. Hauri, M. E. Sardi, T. Y. Low, V. A. Halim, R. D. Bagshaw, N. C. Hubner, A. Al-Hakim, A. Bouchard, D. Faubert, D. Fermin, W. H. Dunham, M. Goudreault, Z.-Y. Lin, B. G. Badillo, T. Pawson, D. Durocher, B. Coulombe, R. Aebersold, G. Superti-Furga, J. Colinge, A. J. R. Heck, H. Choi, M. Gstaiger, S. Mohammed, I. M. Cristea, K. L. Bennett, M. P. Washburn, B. Raught, R. M. Ewing, A.-C. Gingras, and A. I. Nesvizhskii, "The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification–mass spectrometry data," *Nat. Methods*, vol. 10, no. 8, pp. 730–736, Jul. 2013.
- [80] E. J. Tisdale and C. R. Artalejo, "A GAPDH mutant defective in Src-dependent tyrosine phosphorylation impedes Rab2-mediated events," *Traffic*, vol. 8, no. 6, pp. 733–741, 2007.
- [81] M. Phadke, N. Krynetskaia, A. Mishra, C. Barrero, S. Merali, S. A. Gothe, and E. Krynetskiy, "Disruption of NAD(+) binding site in glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase affects its intranuclear interactions.," *World J. Biol. Chem.*, vol. 6, no. 4, pp. 366–78, 2015.
- [82] G. Polekhina, S. Thirup, M. Kjeldgaard, P. Nissen, C. Lippmann, and J. Nyborg, "Helix unwinding in the effector region of elongation factor EF-Tu-GDP," *Structure*, vol. 4, no. 10, pp. 1141–1151, 1996.
- [83] J. J. Rodriguez, J. Parisien, and C. M. Horvath, "Nipah Virus Evasion of STAT 1,2 Transcription Factors," *J. Virol.*, vol. 76, no. 22, pp. 11476–83, 2002.
- [84] A. Vidy, J. El Bougrini, M. K. Chelbi-Alix, and D. Blondel, "The Nucleocytoplasmic Rabies Virus P Protein Counteracts Interferon Signaling by Inhibiting both Nuclear Accumulation and DNA Binding of STAT1," *J. Virol.*, vol. 81, no. 8, pp. 4255–4263, 2007.
- [85] N. Wenta, H. Strauss, S. Meyer, and U. Vinkemeier, "Tyrosine phosphorylation regulates the partitioning of STAT1 between different dimer conformations.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, pp. 9238–9243, 2008.
- [86] J. Nardozi, N. Wenta, N. Yasuhara, U. Vinkemeier, and G. Cingolani, "Molecular Basis for the Recognition of Phosphorylated STAT1 by Importin  $\beta$ 5," *J. Mol. Biol.*, vol. 402, no. 1, pp. 83–100, 2010.
- [87] N. Dephoure, K. L. Gould, S. P. Gygi, and D. R. Kellogg, "Mapping and analysis of

- phosphorylation sites: a quick guide for cell biologists," *Mol. Biol. Cell*, vol. 24, no. 5, pp. 535–542, 2013.
- [88] K.-L. Guan and J. E. Dixon, "Bacterial and viral protein tyrosine phosphatases," *Cell Biology*, vol. 4, pp. 389–396, 1993.
- [89] N. K. Tonks, "Protein tyrosine phosphatases - From housekeeping enzymes to master regulators of signal transduction," *FEBS J.*, vol. 280, no. 2, pp. 346–378, 2013.
- [90] C. Tristan, N. Shahani, T. W. Sedlak, and A. Sawa, "The diverse functions of GAPDH: Views from different subcellular compartments," *Cell. Signal.*, vol. 23, no. 2, pp. 317–323, Feb. 2011.
- [91] G. L. Smith, B. J. Murphy, and M. Law, "Vaccinia Virus Motility," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 57, no. 1, pp. 323–342, 2003.
- [92] R. C. Condit, N. Moussatche, and P. Traktman, "In A Nutshell: Structure and Assembly of the Vaccinia Virion," *Adv. Virus Res.*, vol. 65, no. 6, pp. 31–124, 2006.
- [93] E. J. Tisdale, "Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is phosphorylated by protein kinase C and plays a role in microtubule dynamics in the early secretory pathway," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 5, pp. 3334–3341, 2002.
- [94] B. Sodeik, R. W. Doms, M. Ericsson, G. Hiller, C. E. Machamer, W. Van't Hof, G. Van Meer, B. Moss, and G. Griffiths, "Assembly of vaccinia virus: Role of the intermediate compartment between the endoplasmic reticulum and the Golgi stacks," *J. Cell Biol.*, vol. 121, no. 3, pp. 521–542, 1993.
- [95] E. J. Tisdale, N. K. Talati, C. R. Artalejo, and A. Shisheva, "GAPDH binds Akt to facilitate cargo transport in the early secretory pathway," *Exp. Cell Res.*, vol. 349, no. 2, pp. 310–319, 2016.
- [96] G. Di Paolo and P. De Camilli, "Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics," *Nature*, vol. 443, no. 7112, pp. 651–657, 2006.
- [97] K. W. Nahlik, A. K. Mleczko, M. K. Gawlik, and H. B. Rokita, "Modulation of GAPDH expression and cellular localization after vaccinia virus infection of human adherent monocytes," *Acta Biochim. Pol.*, vol. 50, no. 3, pp. 667–676, 2003.
- [98] S. Choudhary, B. P. De, and a K. Banerjee, "Specific phosphorylated forms of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase associate with human parainfluenza virus type 3 and inhibit viral transcription in vitro.," *J. Virol.*, vol. 74, no. 8, pp. 3634–41, 2000.
- [99] R. Mukhopadhyay, J. Jia, A. Arif, P. S. Ray, and P. L. Fox, "The GAIT system: a gatekeeper of inflammatory gene expression," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 34, no. 7, pp. 324–331, Jul. 2009.

- [100] J. Jia, A. Arif, B. Willard, J. D. Smith, D. J. Stuehr, S. L. Hazen, and P. L. Fox, "Protection of Extraribosomal RPL13a by GAPDH and Dysregulation by S-Nitrosylation," *Mol. Cell*, vol. 47, no. 4, pp. 656–663, 2012.

# Anexos

## a) Abreviaciones.

Ácido desoxirribonucleico: ADN

Ácido ribonucleico: ARN

Antibióticos: ATB

Buffer Tris-Acetato-EDTA: TAE

Caldo de lisogenia: LB

Caldo de crecimiento súper óptimo conteniendo glucosa: SOC

Centímetros: cm

Densidad óptica: DO

Dominio de homología a Src 2: SH2

Durante la noche: ON

Ectima contagioso: EC

El virus pseudocowpox: PCPV

Factor de crecimiento endotelial vascular viral: VEGF

Factor de crecimiento endotelial vascular viral: OV-VEGF

Factor de inhibición del GM-CSF: OV-GIF

Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ : TNF- $\alpha$

Factor estimulador de granulocitos y macrófagos: GM-CSF

Fosfatasa en tirosina del virus Orf: OH1

Fosfatidilinositol 3 quinasa: PI3K

Fosfatidilinositol 3,5 bifosfato: PtdIns-(3,5)P<sub>2</sub>

Fosfo-tirosin fosfatasas: PTPs

Fosfo-tirosina: p-Tyr

Fosfo-treonina: p-Thr

Glicosaminoglicanos: GAGs

Guanina + citosina: G+C

Grados Celsius: ° C

Horas: hs

Interferón- $\gamma$ : INF $\gamma$

Interleuquina: IL

Interleuquina-10 de OrfV: OV-IL-10

Kilo pares de bases: kpb

Kilovoltios: kV

Litros: L

Marcadores de pares de bases: PM

Marcadores de peso molecular: MWM

Micrómetros:  $\mu\text{m}$

Microlitros:  $\mu\text{L}$

Miligramos: mg

Mililitros: mL

Milímetros: mm

Milimolar: mM

Minutos: min

Molar: M

Nanogramos: ng

Nanómetros: nm

Pares de bases: pb

Picogramos: pg

Proteína de resistencia al interferón ovina: OVIFNR

Proteína de unión a quimioquinas: CBP

Proteína inflamatoria de macrófagos 1a: MIP-1<sup>a</sup>

Proteínas Inhibidoras de STATs: PIAS

Proteína quimiotáctica de monocitos 1: MCP-1

Proteínas repetidas de ankirina: ARP

Proteínas supresoras de la señalización por citoquinas: SOCs

Proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción: STAT

Quimioquina de regulación por activación expresada y secretada por los linfocitos T: RANTES

Quinasas en tirosina Janus: JAK

Quinasa R: PKR

Retículo endoplásmico: RE

Repetidos invertidos terminales: ITR

Revoluciones por minuto: rpm

Segundos: s

Substrate trapping: ST

Temperatura ambiente: TA

Virus de la estomatitis papular bovina: BPSV

Virión extracelular envuelto: EEV

Virión intracelular maduro: IMV

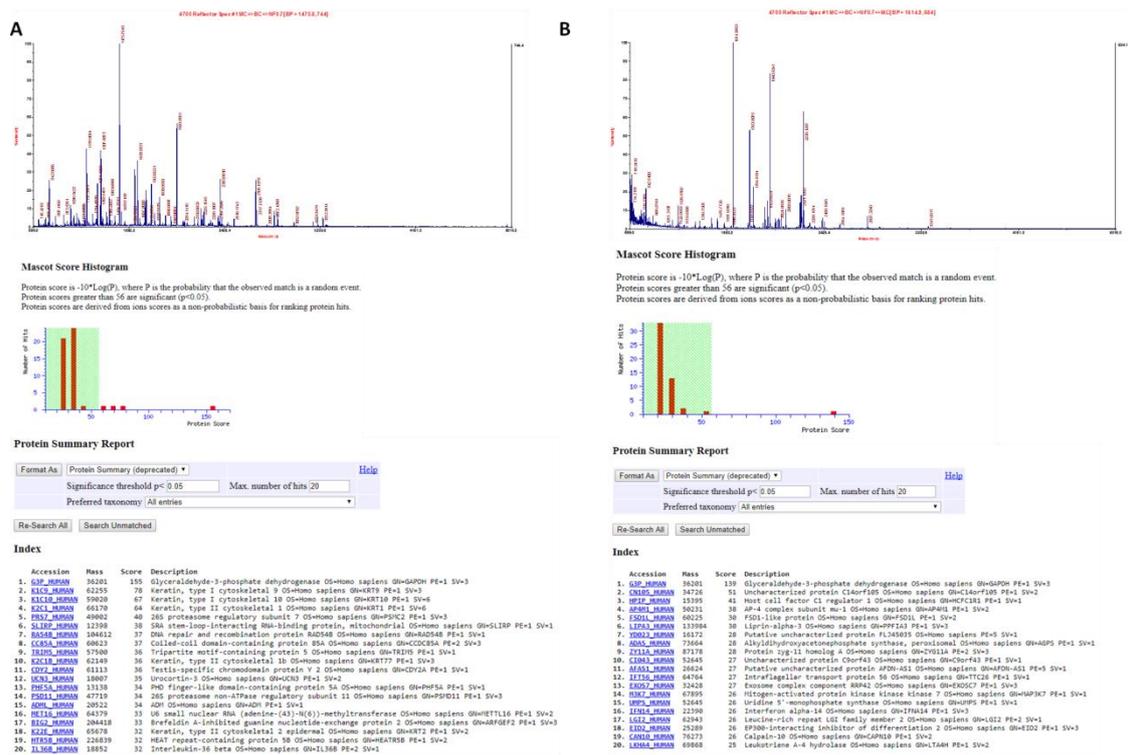
Virión envuelto intracelular: IEV

Virión envuelto asociado a la célula: CEV

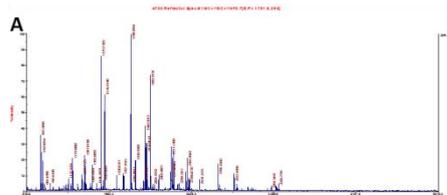
Virus Orf: OrfV

## b) Análisis por espectrometría de masas.

Las bandas de SDS-PAGE obtenidas de las eluciones de los experimentos de *substrate trapping* conteniendo los potenciales interactores de OH1 fueron enviadas analizar por espectrometría de masas, para realizar una identificación de estas proteínas.

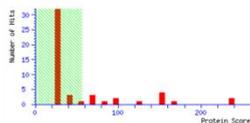


**B1-** Se presenta el espectro de masas obtenido en modo reflector positivo luego de la digestión trípica de la proteína contenida en la banda C (A) y C' (B) correspondiente a la elución con buffer muestra de las dos réplicas de *substrate trapping*. En el panel inferior se muestra el resultado del análisis utilizando el motor de búsqueda Mascot en la base de datos pública (Swissprot), en el cual se identifica a esta proteína como la Glicerilaldehído 3 fosfato deshidrogenasa ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)).



Mascot Score Histogram

Protein score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where  $P$  is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 56 are significant ( $p < 0.05$ ). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Protein Summary Report

Format As: Protein Summary (deprecated) [Help](#)

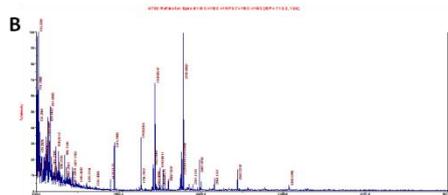
Significance threshold  $p < 0.05$  Max. number of hits: 20

Preferred taxonomy: All entries

[Re-Search All](#) [Search Unmatched](#)

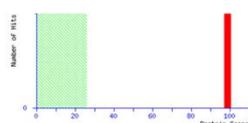
Index

Accession	Mass	Score	Description
1. ACTB_HUMAN	42092	237	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1
2. ACTA_HUMAN	42108	237	Actin, cytoplasmic 2 OS=Homo sapiens GN=ACTG1 PE=1 SV=1
3. POTEF_HUMAN	123020	166	POTE ankyrin domain family member F OS=Homo sapiens GN=POTEF PE=1 SV=2
4. ACTB_HUMAN	42331	156	Putative beta-actin-like protein 3 OS=Homo sapiens GN=POTEP PE=5 SV=1
5. ACTC_HUMAN	42334	151	Actin, alpha cardiac muscle 1 OS=Homo sapiens GN=ACTC1 PE=1 SV=1
6. ACTG_HUMAN	42366	151	Actin, alpha skeletal muscle OS=Homo sapiens GN=ACTAL PE=1 SV=1
7. POTEL_HUMAN	122882	150	POTE ankyrin domain family member F OS=Homo sapiens GN=POTEF PE=2 SV=3
8. ACTB_HUMAN	42318	128	Beta-actin-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=ACTB2 PE=1 SV=2
9. ACTA_HUMAN	42249	99	Actin, gamma-enteric smooth muscle OS=Homo sapiens GN=ACTG2 PE=1 SV=1
10. ACTA_HUMAN	42381	99	Actin, aortic smooth muscle OS=Homo sapiens GN=ACTA2 PE=1 SV=1
11. KIF1A_HUMAN	59020	90	Keratin, type I cytoskeletal 1B OS=Homo sapiens GN=KIF1A PE=1 SV=6
12. KIF1A_HUMAN	62255	72	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3
13. KIF1A_HUMAN	66170	66	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6
14. POTEL_HUMAN	122858	65	POTE ankyrin domain family member 1 OS=Homo sapiens GN=POTEF PE=3 SV=1
15. POTEL_HUMAN	118740	62	POTE ankyrin domain family member 2 OS=Homo sapiens GN=POTEF PE=3 SV=1
16. TRAK1_HUMAN	189943	40	Trafficking kinesin-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=TRAK1 PE=1 SV=1
17. RAB36_HUMAN	36813	36	Ras-related protein Rab-36 OS=Homo sapiens GN=RAB36 PE=2 SV=2
18. SORD3_HUMAN	11687	35	Small ubiquitin-related modifier 3 OS=Homo sapiens GN=SORD3 PE=1 SV=2
19. ZNF214_HUMAN	62376	34	Zinc finger and SCAN domain-containing protein 25 OS=Homo sapiens GN=ZNF214 PE=1 SV=2
20. ZNF80_HUMAN	68658	33	Zinc finger protein 800 OS=Homo sapiens GN=ZNF80 PE=2 SV=2



Mascot Score Histogram

Ions score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where  $P$  is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores  $> 26$  indicate identity or extensive homology ( $p < 0.05$ ). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Protein Summary Report

Format As: Protein Summary (deprecated) [Help](#)

Significance threshold  $p < 0.05$  Max. number of hits: 20

Preferred taxonomy: All entries

[Re-Search All](#) [Search Unmatched](#)

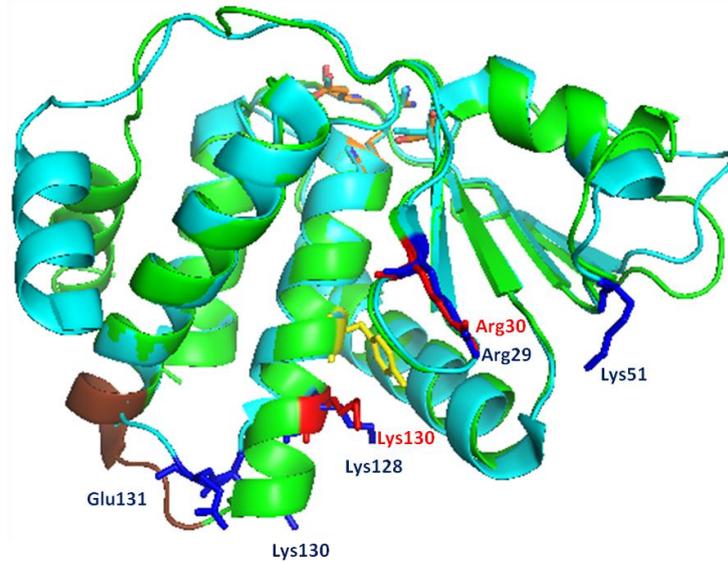
Index

Accession	Mass	Score	Description
1. ACTB_HUMAN	42331	145	Putative beta-actin-like protein 3 OS=Homo sapiens GN=POTEP PE=5 SV=1
2. ACTC_HUMAN	42334	138	Actin, alpha cardiac muscle 1 OS=Homo sapiens GN=ACTC1 PE=1 SV=1
3. ACTA_HUMAN	42366	138	Actin, alpha skeletal muscle OS=Homo sapiens GN=ACTAL PE=1 SV=1
4. ACTB_HUMAN	42052	138	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1
5. ACTA_HUMAN	42108	138	Actin, cytoplasmic 2 OS=Homo sapiens GN=ACTG1 PE=1 SV=1
6. POTEF_HUMAN	122882	130	POTE ankyrin domain family member F OS=Homo sapiens GN=POTEF PE=2 SV=3
7. POTEL_HUMAN	123020	130	POTE ankyrin domain family member F OS=Homo sapiens GN=POTEF PE=1 SV=2
8. ACTB_HUMAN	42318	84	Beta-actin-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=ACTB2 PE=1 SV=2
9. ACTA_HUMAN	42249	84	Actin, gamma-enteric smooth muscle OS=Homo sapiens GN=ACTG2 PE=1 SV=1
10. ACTA_HUMAN	42381	80	Actin, aortic smooth muscle OS=Homo sapiens GN=ACTA2 PE=1 SV=1
11. POTEL_HUMAN	122858	48	POTE ankyrin domain family member 1 OS=Homo sapiens GN=POTEF PE=3 SV=1
12. POTEL_HUMAN	118740	48	POTE ankyrin domain family member 2 OS=Homo sapiens GN=POTEF PE=3 SV=1
13. FICD_HUMAN	33395	21	Ficolin-3 OS=Homo sapiens GN=FICD PE=1 SV=2
14. HSNL1_HUMAN	25624	21	Putative uncharacterized protein HSNL1 OS=Homo sapiens GN=HSNL1 PE=5 SV=1
15. IFTB1_HUMAN	69310	20	Intraflagellar transport protein 74 homolog OS=Homo sapiens GN=IFTB1 PE=1 SV=1
16. ZIK1_HUMAN	56461	18	Zinc finger protein interacting with ribonucleoprotein K OS=Homo sapiens GN=ZIK1 PE=2 SV=1
17. ODF1_HUMAN	18874	18	Ola saturation factor beta OS=Homo sapiens GN=ODF1 PE=1 SV=2
18. ZFP2_HUMAN	54360	18	Zinc finger protein 2 homolog OS=Homo sapiens GN=ZFP2 PE=1 SV=1
19. HSNL1_HUMAN	69113	17	Probable ATP-dependent RNA helicase ODA OS=Homo sapiens GN=ODH4 PE=1 SV=2
20. STPG1_HUMAN	37219	17	O(6)-methylguanine-induced apoptosis 2 OS=Homo sapiens GN=STPG1 PE=1 SV=1

**B2-** Se presenta el espectro de masas obtenido en modo reflector positivo luego de la digestión trípica de la proteína contenida en la banda B (A) y B' (B) correspondiente a la elución con buffer muestra de las dos réplicas de substrate trapping. En el panel inferior se muestra el resultado del análisis utilizando el motor de búsqueda Mascot en la base de datos pública (Swissprot), en el cual se identifican estas proteínas como distintas formas de actina (www.matrixscience.com).



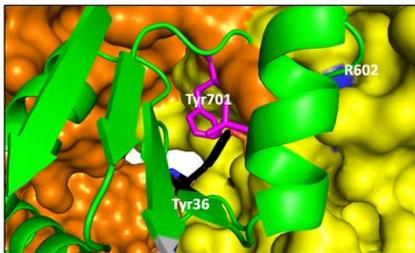
**c) Resultados adicionales de los experimentos de acoplamiento molecular para el complejo OH1/STAT1.**



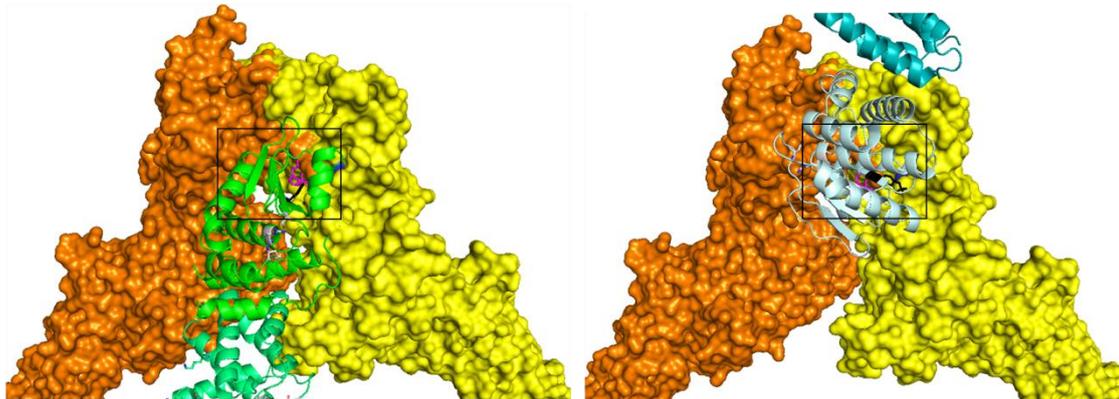
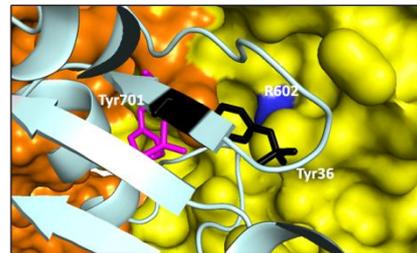
**C1- Comparación de la estructura de OH1 y VH1 y de los residuos relevantes en la interacción con STAT1.**

Superposición de monómeros de OH1 en verde con VH1 en cian (códigos 5NCRy 3CM3 de la PDB respectivamente), se indican en azul los residuos de VH1 reportados por Jardin y colaboradores [52] como relevantes en la interacción con STAT1. En rojo se muestran los residuos Arg30 y Lys130 conservados en OH1 respecto a VH1, en amarillo las Tyr126 y 124 de OH1 y VH1 respectivamente, en naranja el sitio catalítico de OH1 compuesto por la triada Asp81, Cys112 (en este caso Ser) y Arg118 y en marrón la inserción TMTQPA de OH1.

**A**



**B**



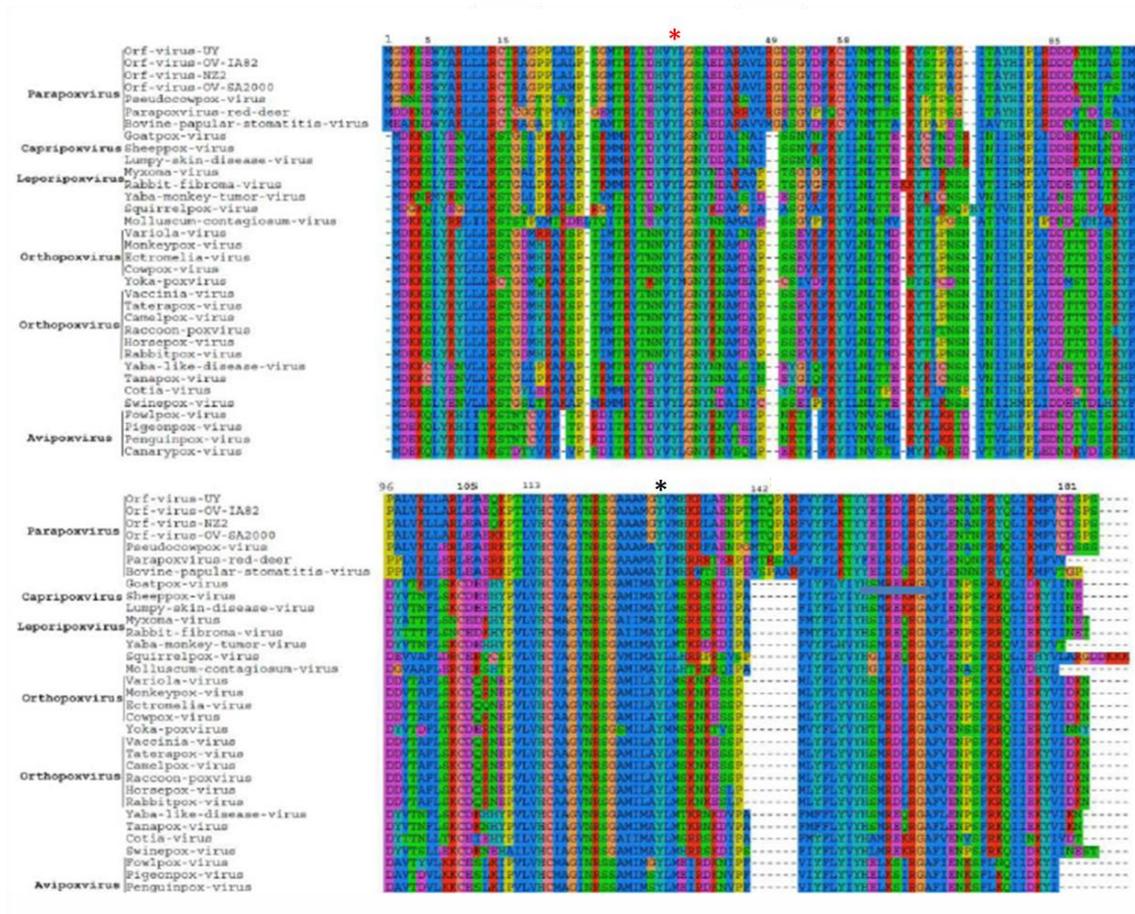
**C2- Compatibilidad de soluciones R2 y R5 con el dímero paralelo de STAT1.**

Representación gráfica de la localización de OH1 en las soluciones R2 (A) y R5 (B) en referencia a un dímero paralelo de STAT1 (en amarillo y naranja), de OH1 se indica la fosfo-Y36 en negro y los sitios catalíticos de cada subunidad en blanco mientras que en STAT1 se indica el residuo Arg602 en azul y la Tyr701 en magenta. En el recuadro se muestra un aumento de la superficie de interacción observada en cada estructura, el dímero de OH1 se representa en verde y verde claro en (R2) y en celeste claro y cian (R5). Imágenes generadas en PyMOL.

**C3- Tabla de parámetros de interacción de los complejos obtenidos en los experimentos de acoplamiento molecular con restricción (R) y sin restricción (SR).** Las superficies de interacción se calcularon utilizando el servidor PISA. La numeración de la estructura se corresponde con su posición dentro de las 10 estructuras generadas por GRAMMX de acuerdo a su score.

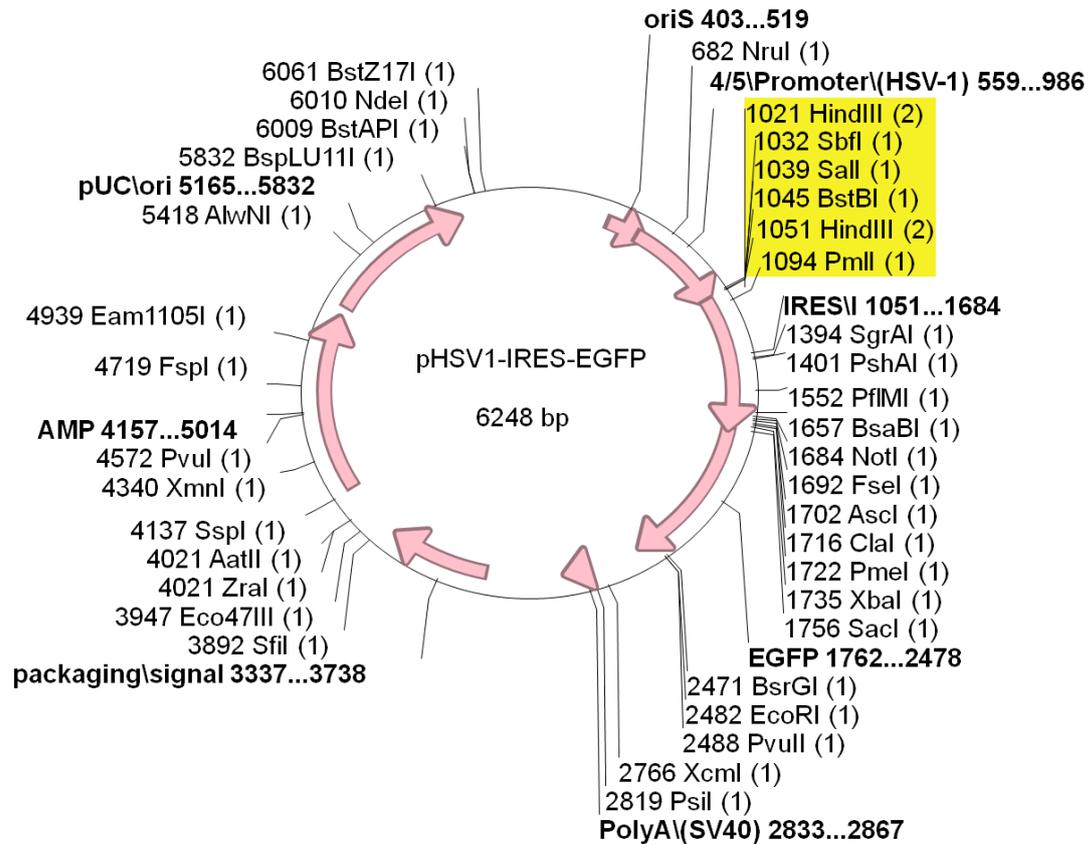
Complejo	superficie de interacción total con STAT1 (Å <sup>2</sup> )	Contribución a la superficie de interacción con STAT1 (Å <sup>2</sup> ) de MonomeroA/MonomeroB	ΔG (kcal/mol) de la interacción con STAT1 aportado por MonomeroA/MonomeroB	Nº de puentes de hidrógeno con STAT1 aportados por MonomeroA/Monomero B	Nº de puentes Salinos con STAT1 aportados por MonomeroA/MonomeroB
R1	1913	1060/853	-2,3/-5,1	14/9	6/3
R5	1321	1236/85	2,8/-0,7	10/0	9/0
SR3	1343	810/533	-8,4/-3,6	3/2	0/0
SR6	1098	0/1098	0/-13,0	0/4	0/0
SR8	1158	603/555	-3,8/-4,2	6/6	1/0
SR10	1184	457/727	-1,7/-9,3	5/3	2/0

d) Análisis de conservación de residuos de tirosina en la sub-familia *Chordopoxvirinae* y el género *Parapoxvirus*



D1- Alineamiento filogenético de distintos géneros de la sub-familia *Chordopoxvirinae* de la familia *Poxviridae*. Se observa la conservación de residuos de Tyr. Se indican con un asterisco la Tyr36 (rojo) y la Tyr126 (negro) conservada entre los distintos géneros. Imagen adaptada de material suplementario de [34].

f) Patrón de digestión con enzimas de restricción del plásmido pHSV1-IRES-EGFP



F1- Mapa de digestión con enzimas de restricción del plásmido pHSV1-IRES-EGFP.

Se indica la ubicación del sitio de clonaje múltiple en amarillo junto con la enzima de corte doble Hind III utilizada en esta tesis.