





TESIS DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Biología Molecular y Celular

PEDECIBA

Abordando el estudio de la interacción entre la fosfatasa OH1 del virus Orf y el factor de transcripción STAT1

Lic. Felipe Parietti

Tutora: Dra. Mabel Berois Co-tutora: Dra. Andrea Villarino

Abril 2024

Agradecimientos

A las Dras. Mabel Berois y Andrea Villarino, por aceptarme como estudiante de maestría y compartir connmigo toda su experiencia. Me gustaría darles las gracias por su apoyo y comprensión durante estos últimos cuatro años, especialmente durante los momentos de incertidumbre vividos en la pandemia.

A la Dra. Mariana Margenat, por su ayuda y buena disposición por enseñarme a realizar las producciones y darme consejos sobre numerosas técnicas de laboratorio.

A los integrantes del tribunal evaluador, por dedicar parte de su valioso tiempo en la corrección de esta tesis.

A todos mis compañeros de la Sección Virología y del 314 de la Sección Bioquímica por los momentos vividos y la buena onda.

A la Comisión Académica de Posgrado, por el apoyo económico otorgado.

A PEDECIBA por aceptarme al posgrado.

A CSIC por haber contado con el apoyo financiero a través de un proyecto I+D.

A mis amigos, especialmente a Nati, Fede, y Nacho, por todo el apoyo durante este período.

A toda mi familia, especialmente a mi mamá, que siempre me impulsó a continuar y no bajar los brazos. Especialmente durante la fase crítica de la pandemia.

Resumen

El virus Orf es el causante del ectima contagioso, una enfermedad global que afecta al ganado ovino y caprino. Este virus tiene un genoma de ADN de doble cadena y pertenece al género *Parapoxvirus* de la familia *Poxviridae*. Los virus de esta familia desarrollan diversas estrategias para infectar a los huéspedes y evadir sus defensas. Una de estas estrategias consiste en interferir con la vía de señalización JAK-STAT, desfosforilando el factor de transcripción STAT1 en la Tyr⁷⁰¹, bloqueando así la respuesta antiviral mediada por interferón. En estudios previos de nuestro grupo, se llevó a cabo la caracterización estructural y bioquímica de la fosfatasa de tirosina OH1 del virus Orf, y se demostró su interacción y actividad con STAT1. Asimismo, nuestro grupo propuso, basados en resultados experimentales *in silico*, la hipótesis de que en una primera etapa, la fosfatasa viral OH1 recluta a STAT1 a través de la Tyr¹⁵², para luego, en una segunda etapa, desfosforilar la Tyr⁷⁰¹ de STAT1, bloqueando así su dimerización e importación al núcleo.

En esta tesis, se buscó avanzar en entender el mecanismo de reclutamiento del sustrato STAT1 por parte de la fosfatasa viral OH1. Para ello, se produjo de forma recombinante la forma salvaje de OH1 (OH1^{WT}) y mutantes relevantes para la dimerización (OH1^{C1125}), la actividad (OH1^{C1125}) y para el reclutamiento de STAT1 (OH1^{Y151F} y OH1^{Y152F}). Se caracterizó la actividad fosfatasa de estas variantes de OH1 utilizando un sustrato artificial no proteico de fosfatasas. Así, se confirmó la actividad fosfatasa de la OH1^{WT} y la ausencia de esta para el mutante en la cisteína catalítica OH1^{C1125}. Además, se observó que OH1^{C155}, mutante en la cisteína responsable de estabilizar el dímero de OH1 mediante un puente disulfuro, presentó una disminución considerable en la actividad respecto a OH1^{WT}. Este resultado difiere de lo que se observó en un lote anterior producido en nuestro laboratorio, en el cual no se detectó pérdida de actividad. Esto seguramente se debió a problemas en la purificación de este nuevo lote, aspecto que se discute en la tesis. Los mutantes OH1^{Y151F} y OH1^{Y152F} también mostraron una importante reducción de la actividad comparada con OH1^{WT} (>75 %). Este resultado no fue el esperado, ya que la actividad se evaluó con un sustrato pequeño y no proteico, el cual interactúa directamente a través del sitio activo de las fosfatasas, y no es reclutado como lo sería STAT1 por un sitio diferente. Sin embargo, no se descarta que la pérdida en la actividad se deba al cambio de aminoácido o a la calidad de la proteína recombinante producida, por lo cual se deberán evaluar nuevos lotes.

Posteriormente, se realizaron ensayos celulares en el modelo HeLa, donde se evaluó el efecto de la expresión de la OH1 y sus variantes en la importación de STAT1 al núcleo. Ensayos previos del grupo mostraron que la expresión de OH1^{WT} y del mutante inactivo OH1^{C112S} afectan la importación de STAT1 al núcleo, esto respalda la hipótesis planteada de reclutamiento de STAT1 por un sitio diferente al sitio activo. En los ensayos celulares realizados en la presente tesis, se reprodujo el efecto observado para el mutante inactivo (OH1^{C112S}), detectándose una disminución de la importación nuclear de STAT1, pero para la OH1^{WT} la tendencia observada no fue significativa. Por otro lado, en este trabajo se evaluó por primera vez el efecto de la expresión de los mutantes OH1^{Y151F} y OH1^{Y152F}, observándose que estos no afectaron la importación nuclear de STAT1. Este último resultado apoya la hipótesis de interacción propuesta por el grupo. No obstante, debido a la discrepancia en los resultados obtenidos para la expresión de la OH1^{WT} y a la necesidad de un mayor número de réplicas, las conclusiones que se pueden sacar son limitadas.

Lista de Abreviaturas

APC	Antigen Presenting Cells (Células presentadoras de antígenos).
ARP	Ankyrin repeat (Motivos repetidos de anquirina).
ATB	Antibiótico.
BPSV	<i>Bovine Papular Stomatitis Virus</i> (Virus de la estomatitis papular bovina).
BSA	Bovine serum albumin (Sero albúmina bovina).
CBP	Chemokine Binding Protein (Proteína de union a quimioquinas).
DAPI	4'.6-diamino-2-fenilindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DO	
DSP	Dual-Snecificity Phosphatases (Fosfatasas de doble especificidad)
DTT	Ditiotreitol
dIITPasa	Desovyuridine 5'-trinhosnhatase (Desoviuridina 5'-trifosfato nucleotidohidrolasa)
FDTA	Etwinediaminetetracetic acid (árido etilendiaminetetracético)
FGFP	Enlytened Green Fluorescent Protein (Proteína fluorescente verde mejorada)
FΔ	Fosfatasa alcalina
GAG	Glucosaminoglucanos
CIF	GMCSE inhibitory factor (Factor inhibitor de GMCSE)
GM-CSF	Granulocyte-macronhage colony-stimulating factor (Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos)
CST CST	Clutatión S transforaça
UEDEC	Ácido 4 (2 hidroviatil)ninorazin 1 ilatanosulfánico
IILF LO UMM	Actuo 4 (2-intro Madel Madela coulta de Méxicov)
	Hitter Markov Model (Modelo oculto de Markov).
	Indirect Immunofluorescence (Inmunofluorescencia indirecta)
IFI	
	Interieron. Interieron.
IMAC	Internal Dikesoma Entry Cita (Citia interna de entrade el ribesome)
IKES IDE2	Internal Ribosome Entry Sile (Silio Interno de entrada al Hibosoma).
IKES	Interferon Regulator y Factor 5 (Factor Fegulador 5 del Interferon).
ISKE	Interjeron Stinduled Response Liements (Liementos de respuesta estimulada por interferon).
JAKS	Junus Kinuses (Quinasas de Janus).
	Lisogeny Broin (Caldo de lisogenia). Maleirla Ali munutaria e Esté Escuire Transform (Alia serviente méléirle maliante transforme de nécide de Escuire)
MAFFI	Multiple Augnment using Fast Fourier Transform (Allneamiento multiple mediante transformada rapida de Fourier).
MHC	Major Histocompatibility Complex (Complejo mayor de histocompatibilidad).
NMA	Normai Mode Analysis (Analisis de modo normal).
NF-KB	Nuclear Jactor Rappa-Ign-chain-chain-chainer of activated B cells (Factor nuclear potenciador de las cadenas ingeras kappa de los
ODEN	Inflocitos B activados).
OKEV	Orf Virus (virus Ori).
DVIENK	Orf virus interferon Resistance Protein (Proteina de resistencia al interferon ovina).
PBS POPU	Phosphate-buffered saune (Tampon Tostato-sauno).
PCPV	Pseudocowpox virus (Virus de la pseudoviruela bovina).
PDB	Protein Data Bank (Banco de datos de proteinas).
PIAS	Protein inhibitors of activated STATS (Inhibitiones proteicos de STATS activados).
PKR	Protein kinase R (Proteina quinasa R).
PTP	Protein tyrosine phosphatases (Fostatasas de tirosina).
PVDF	Polyvinylidene fluoride (Fluoruro de polivinilideno).
RE	Reticulo Endoplasmico.
SFB	Suero Fetal Bovino.
SH2	Src Homology 2 domain.
SOCS	Suppressor of cytokine signaling proteins (Supresores de la actividad de citoquinas).
STAT	Signal transducer and activator of transcription (Factores transductores de señales y activadores de la transcripción).
TA	Temperatura ambiente.
TAD	Transactivation domain (Dominio de transactivación).
TAE	<i>Tris-acetate-EDTA</i> (Tampón formado por Tris, acetato y EDTA).
TBS-T	<i>Tris-buffered saline and Tween 20</i> (Tampón Tris salino con Tween 20).
TEV	<i>Tobacco Etch Virus nuclear-inclusion-a endopeptidase</i> (Endopeptidasa del virus del grabado del tabaco).
TNFα	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> (Factor de necrosis tumoral alfa).
VACV	Vaccinia Virus (Virus vaccinia).
VEE	Viriones envueltos extracelulares.
VEGF	Viral Endotelial Growing Factor (Factor de crecimiento endotelial vascular).
vIL-10	<i>Viral Interleucine 10</i> (Interleuquina viral 10).
VMI	Viriones maduros intracelulares.
WPD	Bucle formado por los residuos triptófano, prolina y aspartato.

Índice

1	Intro	ducción	1
	1.1	Generalidades sobre el virus Orf y el Ectima Contagioso	1
	1.2	Estructura del ORFV	3
	1.3	Ciclo replicativo de los Poxvirus	5
	1.4	Mecanismos de evasión de la respuesta immune de los Poxvirus	8
	1.5	La fosfatasa OH1	11
	1.6	La vía de señalización celular JAK-STAT	14
	1.7	Modelo de interacción de OH1 con STAT1	17
2	Hipó	tesis de Trabajo	19
3	Obje	tivos	19
	3.1	Objetivo General	19
	3.2	Objetivos Específicos	19
4	Mate	riales y Métodos	20
	4.1	Técnicas de Biología Molecular	20
	4.1.1	Obtención de células <i>E. coli</i> XL-1 Blue quimiocompetentes	20
	4.1.2	Transformación de células <i>E. coli</i> electrocompetentes	20
	4.1.3	Transformación de células <i>E. coli</i> quimiocompetentes	21
	4.1.4	Análisis y cuantificación de ácidos nucleicos	21
	4.1.5	Generación de las variantes de OH1 en el vector plasmídico pET28a(+)	22
	4.1.6	Subclonado de variantes de OH1 en el vector plasmídico pHSV-IRES-EGFP	23
	4.2	Técnicas de Bioquímica de proteínas	25
	4.2.1	Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	25
	4.2.2	Electrotransferencia e inmunodetección por Western Blot (WB)	25
	4.2.3	Determinación de la concentración de proteínas	26
	4.2.4	Expresion en <i>E. coli</i> de las variantes de OH1 recombinantes	26
	4.2.5	Purificación de las variantes de OH1 recombinantes	27
	4.2.6	Evaluación de la actividad losiatasa de las variantes de OH1	28
	4.2.7	Fosiorilación de SiAl I y OHI con JAK	28
	4.3	Cultive de la línea celular Hella	29
	4.3.1	Transforción de las cólulas HoLa con los plósmidos pHSV IDES ECED de interío y estimulación con IEN y	29
	4.3.4	Industrección de las celulas nella con los plasmidos prisv-ikes-elor y de interes y estimulación con iriv-y	30
	4.3.3	Abordaios Rioinformáticos	30
	4. 4 ///1	Búsqueda de secuencias homólogas	J1 21
	4.4.2	Análisis <i>in silico</i> de los efectos de las mutaciones con cambio de sentido V151F e V152F en la estabilidad	J1
	flevik	ilidad de OH1	y 33
5	Resu	ltados v Discusión	34
•	5.1	Resultados asociados al primer obietivo	
	5.1.1	Obtención de los mutantes de OH1	34
	5.1.2	Producción de las variantes de OH1 como proteínas recombinantes	37
	5.1.3	Caracterización de la actividad fosfatasa de las variantes de OH1 obtenidas	44
	5.1.4	Ensayos de fosforilación <i>in vitro</i> de STAT1 y OH1	51
	5.2	Resultados asociados al segundo objetivo	53
	5.2.1	Introducción de las variantes de OH1 en el vector pHSV-IRES-EGFP	54
	5.2.2	Efecto de los mutantes OH1 ^{Y151F} y OH1 ^{Y152F} en la translocación de STAT1	55
6	Conc	lusión y Perspectivas	60
7	Bibli	ografía	62
8	Apén	dice	68
	8.1	Tabla de purificaciones de OH1 ^{WT} y mutantes	68
	8.2	Análisis de conservación de los residuos Tyr ¹⁵¹ y Tyr ¹⁵²	69
	8.3	Árbol filogenético generado por el programa ConSurf	70

I INTRODUCCIÓN

I.I Generalidades sobre el virus Orf y el Ectima Contagioso

Los poxvirus, pertenecientes a la familia *Poxviridae*, son virus de gran tamaño con genoma de ADN de doble cadena, que se replican exclusivamente en el citoplasma de sus células huésped. Se agrupan en dos subfamilias: *Chordopoxvirinae*, que infectan vertebrados (mamíferos, aves, reptiles y peces); y los *Entomopoxvirinae*, que infectan a los insectos. Hasta la fecha, se han reconocido 18 géneros dentro de la subfamilia *Chordopoxvirinae*, entre ellos los *Orthopoxvirus*, que incluye el virus de la viruela y su virus vacunal Vaccinia (VACV), y los *Parapoxvirus* (McInnes et al., 2023). Dentro de los *Parapoxvirus*, se destaca el virus Orf (ORFV), agente etiológico del Ectima Contagioso (EC); también conocido como dermatitis pustular contagiosa o «boquera de los corderos». El EC es una enfermedad zoonótica de distribución mundial que afecta principalmente al ganado ovino (*Ovis aries*) y caprino (*Capra hircus*), siendo más grave en esta última especie y causando pérdidas económicas importantes en la producción agropecuaria. También se han reportado infecciones en otros animales como camellos (*Camelus dromedarius*), renos (*Rangifer tarandus*), bueyes almizcleros (*Ovibos moschatus*) y seraues japoneses (*Capricornis crispus*) (Spyrou & Valiakos, 2015; Wang et al., 2019). Este virus también afecta a los trabajadores que mantienen un estrecho contacto con los animales infectados, en particular a matarifes, veterinarios y cuidadores de animales (Nougairede et al., 2013).

El ORFV es resistente a la desecación y puede mantenerse viable en la lana de animales infectados, facilitando así su dispersión a través de fómites (Spyrou & Valiakos, 2015). La transmisión del virus se realiza por contacto, entrando a través de la piel dañada y replicándose en las células epidérmicas. Esto suele ocurrir durante el pastoreo y a través de las abrasiones desarrolladas en los labios, las fosas nasales y la boca causada por alimentos secos (Nougairede et al., 2013). El EC es una enfermedad autolimitante que genera lesiones alrededor del hocico y las comisuras labiales del animal, a veces también afecta a las encías y la lengua, especialmente en corderos jóvenes. Los párpados, las patas y los pezones pueden verse afectados ocasionalmente. Las lesiones se presentan como ulceraciones con formación de costras que sangran con facilidad (figura 1.1 A). No hay evidencia de propagación sistémica del virus y las reinfecciones son frecuentes (Haig & Mercer, 2002).

Los animales jóvenes suelen sucumbir a causa de lesiones orales que dificultan la lactancia, infecciones bacterianas y fúngicas secundarias, o infestación por larvas de dípteros (Spyrou & Valiakos, 2015). En los rebaños donde la enfermedad aparece por primera vez, la morbilidad suele ser alta, pero la mortalidad es por lo general baja (<1 %) (Hosamani et al.,

Introducción

2009). En humanos, la infección suele manifestarse en la cara dorsal de las manos y los dedos en personas inmunocompetentes (figura 1.1 B). A veces, pueden aparecer síntomas como, fiebre, malestar e inflamación de los ganglios linfáticos. Es una enferedad que suele resolverse en 4 a 8 semanas (Diven, 2001).



Figura 1.1. Lesiones características del EC causadas por ORFV. A) Costras alrededor del hocico de una oveja adulta. Adaptado de da Costa et al., 2019. B) Lesión pustular en la mano. Adaptado de www.dermnetnz.org.

Existen vacunas contra el EC. Las mismas se producen sobre la base de virus propagados *in vivo* (a partir de material de costra) o en cultivos celulares. Aunque las vacunas pueden reducir la gravedad y duración de la enfermedad, su efecto inmunitario no es prolongado (4 a 6 meses), lo que permite que los animales vacunados se reinfecten con frecuencia (Haig & McInnes, 2002; Hosamani et al., 2009). En Uruguay, el laboratorio Virbac comercializa una vacuna liofilizada de fabricación nacional llamada Ectisan, elaborada utilizando aislamientos nacionales de virus vivo atenuado (Olivero, 2008). No existe una vacuna aplicable en humanos para prevenir el contagio del ORFV. Los individuos vacunados contra el virus de la viruela, perteneciente al género *Orthopoxivirus*, no están inmunizados contra el ORFV (Yirrel et al., 1994). En síntesis, aunque el EC suele ser una enfermedad autolimitada de la cual muchos animales pueden recuperarse sin consecuencias a largo plazo, las repercusiones inmediatas de un brote representan un desafío económico para los productores. La suma de estos costos en una región o país puede tener implicancias económicas significativas, especialmente en áreas donde la cría de ovejas y cabras es una industria importante.

I.2 Estructura del ORFV

Los virus que pertenecen al género *Parapoxviridae*, como el ORFV, comparten similitudes en cuanto a su morfología, organización genómica y mecanismo de virulencia. Al igual que otros poxvirus, poseen una cápside con morfología compleja, que no presenta simetría helicoidal ni icosaédrica (figura 1.2). Se diferencian de otros poxvirus por la forma ovoide de sus partículas virales, el patrón entrecruzado en forma de «ovillo de lana» en la superficie de la partícula y el tamaño relativamente pequeño de su cápside (260×160 nm para ORFV). También se caracterizan por el alto porcentaje de GC de su genoma, 64 %, notablemente mayor al 30–40 % de otros poxvirus (Nagington & Horne, 1962; Nagington et al., 1964; Spyrou & Valiakos, 2015; Wittek et al., 1979).



Figura 1.2. Estructura del ORFV. A la izquierda se muestra una micrografía electrónica de una partícula de ORFV, donde se aprecia la morfología compleja de la cápside, presentando una estructura ovoide con forma de «ovillo de lana». A la derecha se muestra un esquema con los diferentes componentes de la partícula viral. Imagenes adaptadas de Olivero, 2012 y Maclachlan & Dubovi, 2011.

El genoma de ORFV, uno de los más pequeños de la familia *Poxviridae*, tiene aproximadamente 140 kpb y cuenta con 132 marcos abiertos de lectura. La figura 1.3 muestra un esquema del genoma de un poxvirus. La región central contiene genes que son esenciales para la replicación del ADN y la producción de partículas virales en las células infectadas, mientras que los genes de las regiones terminales codifican factores de virulencia involucrados en la patogénesis viral y se encuentran flanqueados por repeticiones terminales invertidas (ITR) de 3 kpb (figura 1.3) (Wittek & Moss, 1980). Los genes de la región terminal tienden a ser específicos de género y codifican factores de virulencia y proteínas que interactúan con los componentes del sistema inmunitario del huésped (Haig & Mercer, 1998).



Figura 1.3. *Esquema del genoma de un poxvirus (cepa VACV WR).* Los ORFs se muestran como flechas coloreadas que indican la dirección de la transcripción. Las flechas azules indican la transcripción de los genes tempranos, las verdes la transcripción de los genes intermedios y las rojas la transcripción de los genes tardíos. En amarillo se representan los genes no expresados. Los números del 1 al 194711 indican las posiciones de nucleótidos en el genoma del VACV. La fosfatasa VH1, análoga a OH1 del ORFV, es codificada por el gen H1L ubicado entre los 87000 y 88000 pb del genoma de VACV WR. Adaptado de Yang et al., 2011.

1.3 Ciclo replicativo de los Poxvirus

Como se ha indicado anteriormente, los miembros de la familia Poxviridae, al que pertenece ORFV, replican enteramente en el citoplasma celular por una vía morfogenética compleja, pero ampliamente conservada. El virus más estudiado de esta familia es el virus vacunal de la viruela, del cual se ha descrito con detalle su ciclo replicativo (figura 1.4). Durante su ciclo replicativo, VACV produce dos tipos de partículas virales infecciosas morfológicamente distintas: los viriones maduros intracelulares (VMI) y los viriones envueltos extracelulares (VEE), ambos capaces de iniciar la infección. Tanto los VMI como los VEE difieren en sus glicoproteínas de superficie y en el número de membranas envolventes. Los VMI consisten en el núcleo viral que contiene el genoma de ADN doble cadena, dos cuerpos laterales proteicos y una bicapa lipídica con al menos 25 proteínas virales. Los VEE, por su parte, son partículas virales similares los VMI rodeadas por una segunda membrana viral derivada del aparato de Golgi, que incluye proteínas celulares y al menos 6 proteínas virales únicas. Se considera que los VMI son producidos más abundantemente y se cree que median la transmisión entre diferentes individuos, mientras que los VEE estarían implicados en la propagación del virus dentro de un huésped infectado (Schmidt et al., 2012; Smith et al., 2002). Aunque los VEE se diferencian de los VMI por poseer una membrana adicional, se piensa que la misma se rompe poco después de unirse a la superficie celular, por lo que la fase de entrada y de fusión son similares para ambos viriones. La unión del virión está determinada por varias proteínas virales y por los glucosaminoglucanos (GAG), como el condroitín sulfato y heparán sulfato presentes en la superficie de la célula diana o por componentes de la matriz extracelular (Bengali et al., 2009; Carter et al., 2005; Whitbeck et al., 2009). Se han identificado cuatro proteínas virales de VACV que intervienen en la unión de los VMI: los productos de los genes A27L y H3L que interaccionan con heparán sulfato, la proteína D8L que interacciona con condroitín sulfato y A26 con la laminina, un componente de la matriz extracelular (Chiu et al., 2007; Chung et al., 1998; Hsiao et al., 1998; 1999; Lin et al., 2000). Hasta la fecha, no se han descubierto receptores celulares específicos necesarios para la fusión y entrada de los viriones al citoplasma celular.

Dependiendo de la cepa de VACV y el tipo de partícula viral (VMI o VEE), la entrada a la célula puede ocurrir mediante fusión con la membrana plasmática o la inducción de la macropinocitosis como se muestra en la figura 1.4 (Armstrong et al., 1973; Carter et al., 2005). La siguiente etapa del ciclo replicativo consiste en un cambio morfológico del núcleo viral, pasando de ser bicóncavo a oval, en un proceso denominado «activación del núcleo viral», seguido por la liberación de los cuerpos laterales al citosol de la célula (Bidgood & Mercer, 2015). La replicación viral se caracteriza por tres oleadas de

Introducción

síntesis de ARNm y proteínas virales conocidas como: temprana, intermedia, y tardía; a las que sigue la morfogénesis de las partículas infecciosas. La transcripción de los genes tempranos se produce antes de que el genoma se desnude por completo y prepara el terreno para la replicación del ADN viral (Bidgood & Mercer, 2015). La síntesis del ADN se produce en lugares discretos del citoplasma llamados «factorías virales», una región de citosol electrondensa y desprovista de organelos celulares. La síntesis del ADN comienza con una muesca en una de las horguillas terminales para producir un extremo 3' que sirve de cebador. El proceso de replicación del ADN implica la formación y resolución de las horquillas para producir concatémeros cabeza-cabeza y cola-cola. El último paso del proceso es la ligación para formar una nueva molécula cerrada covalentemente. Los genomas replicados sirven de molde para la transcripción de genes intermedios y tardíos, codificando proteínas estructurales, factores de ensamblaje (proteínas andamio y chaperonas), enzimas y factores de transcripción necesarios para la infección de nuevas células (McFadden, 2005). El ensamblaje de las partículas virales inicia en las factorías virales con la aparición de estructuras morfológicamente distintas llamadas «crecientes semilunares» y «viriones inmaduros circulares». La incapacidad de discernir conexiones entre las membranas víricas y los organelos celulares condujo a la idea de que las membranas víricas se formaban «de novo» (Dales & Mosbach, 1968). Sin embargo, las conexiones podrían ser transitorias y se ha considerado un origen a partir de las membranas celulares que comprenden el compartimento intermedio entre el retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi, como se observa en la figura 1.4 (Chlanda et al., 2009; Sodeik & Krijnse-Locker, 2002; Weisberg et al. 2017). Los viriones se forman durante un proceso en el que los crecientes semilunares se cierran alrededor de un material electrondenso rico en proteínas (Wolffe et al., 1996). El genoma viral entra en las semilunas antes de que se cierren por completo (Morgan, 1976). Tras el cierre de la envoltura, el material capturado se reorganiza y coalesce para formar el núcleo y los cuerpos laterales, dando lugar a la forma ovoide del VMI (Sodeik et al., 1993). El VMI se transporta a través de microtúbulos y se envuelve con la membrana derivada de la cara trans del aparato de Golgi, constituyendo un VEE (Schmelz et al., 1994). Estos viriones envueltos pueden iniciar la polimerización de actina, que propulsa la partícula en una cola de actina hacia una célula adyacente, o salir de la célula por fusión con la membrana citoplasmática (Smith et al., 2002).



Figura 1.4. Esquema del ciclo replicativo de los Poxvirus. Imagen adaptada de https://viralzone.expasy.org/4399.

1.4 Mecanismos de evasión de la respuesta immune de los Poxvirus

Los poxvirus codifican diversas proteínas que interfieren con la respuesta inmunitaria, tanto innata como adaptativa. Muchas de estas proteínas, descritas inicialmente para VACV, se han encontrado también en otros miembros de esta familia viral. Como se describió previamente, los factores de virulencia se localizan principalmente en las regiones terminales del genoma viral. El número y el tipo de antagonistas inmunitarios varían considerablemente. Estos factores contribuyen significativamente al rango de hospedero y a la virulencia del virus. Cabe destacar que algunos de estos factores son proteínas similares a proteínas presentes en mamíferos. En la figura 1.5, se representa de forma esquemática la mayoría de estas proteínas inmunomoduladoras de los poxvirus, donde se encuentran representados varios de los factores de virulencia del ORFV.



Figura 1.5. *Factores de virulencia de los Poxvirus y sus blancos celulares*. Las proteínas representadas en rojo corresponden a los factores de virulencia de los poxvirus, mientras que sus blancos se indican con una flecha. Imagen adaptada de Harrison et al., 2004.

Introducción

En el caso de ORFV, se destacan varios factores de virulencia que se describen a continuación. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) viral, denominado (VEGF-E), fue el primer factor de virulencia descrito con un papel relevante en la patogénesis de ORFV (Lyttle et al., 1994). A través de su interacción exclusiva con el receptor 2 de VEGF, VEGF-E induce la proliferación de células epidérmicas y endoteliales, aumenta la permeabilidad vascular y la angiogénesis dérmica. Esto conduce a un aumento del crecimiento viral y la replicación en las células epidérmicas. VEGF-E sostiene esta respuesta regenerativa al fomentar la regeneración epidérmica, a la vez que suministra sustratos celulares necesarios para la replicación viral. VEGF-E también contribuye a la formación de costras ricas en partículas virales (Haig & McInnes, 2002; Meyer et al., 1999; Wise et al., 2012).

La proteína viral de resistencia al interferón ovino (OVIFNR) inhibe la respuesta antiviral mediada por interferón gamma (IFN-y). Este factor viral actúa inhibiendo la activación de la quinasa R (PKR) y de la 2'-5'-oligoadenilato sintetasa, evitando la inhibición de la traducción y degradación de los ARNm celulares y virales. Por lo tanto, OVIFNR permite que el virus Orf use la maquinaria de síntesis de proteínas de la célula huésped (Haig & McInnes, 2002).

Otra proteína inmunomoduladora codificada por ORFV es el factor inhibidor del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y de la IL-2, denominado GIF (Deane et al., 2000). Se expresa tardíamente en el ciclo replicativo del virus a diferencia del resto de las proteínas inmunomoduladoras. El GM-CSF estimula la diferenciación y activación de los macrófagos, lo que a su vez da lugar a la presentación de antígenos a los linfocitos T. También favorece el reclutamiento y la función de presentación de antígenos de las células dendríticas. GIF, al suprimir la función de la IL-2 y el GM-CSF, impide la activación de leucocitos y células dendríticas, lo que resulta en la inhibición de la respuesta inmune y favorece la supervivencia de ORFV (Fleming et al., 2015).

La interleuquina 10 del virus Orf (vIL-10) presenta una homología a nivel genético considerable con la IL-10 de ovino (80 %), de bovino (75 %), de humano (67 %) y de ratón (64 %) y es funcionalmente indistinguible de la IL-10 de los mamíferos. En un modelo murino, se ha demostrado que vIL-10 desempeña un papel importante en la inmunosupresión, al inhibir la síntesis de citoquinas de los macrófagos (Fleming et al., 1997). Además, inhibe la maduración y función de las células presentadoras de antígenos (APC). Esto, a su vez, resulta en la inhibición de la expresión de citoquinas por parte de las células Th1, a saber: IL-2, IL-3, IFN- γ y GM-CSF. Tanto la vIL-10 como la IL-10 inhiben la producción de IFN- γ a partir de linfocitos activados, así como la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y de la IL-8 de macrófagos y queratinocitos (Fleming et al., 2015).

Introducción

El ORFV también produce una proteína especializada conocida como proteína de unión a quimioquinas (CBP). Esta proteína actúa inhibiendo el mecanismo antiviral de las células inmunitarias (Seet et al., 2003). Dicha proteína muestra una similitud estructural y funcional con las proteínas CBP-II encontradas en otros poxvirus. ORFV secreta la CBP en el epitelio de la piel, lo que resulta en una inhibición competitiva de la interacción entre las quimioquinas y sus receptores afines. Esto conduce a una reducción en la quimiotaxis y el reclutamiento de leucocitos, previniendo así la inflamación al inhibir el movimiento de monocitos y células dendríticas (Lateef et al., 2010).

C6 es un inhibidor multifuncional del interferón, puede disminuir su producción e inhibir la señalización inducida por interferón y, en consecuencia, la expresión de genes estimulados por interferón. Primero, bloquea la inducción de IFN-β al unirse a las proteínas adaptadoras TBK1 en el citoplasma para inhibir la activación de IRF3. En segundo lugar, copurifica con STAT2 y actúa dentro del núcleo para bloquear la transcripción de genes que llevan una secuencia promotora llamada ISRE (elemento de respuesta estimulada por interferón) (Smith, 2018).

ORFV codifica varias proteínas que promueven la supervivencia del virus, incluidas las dUTPasas, factores moduladores de NF-κB, proteínas con repeticiones de anquirina (ANK) y el gen 125 de ORFV. La dUTPasa inhibe la incorporación de un exceso de dUTP en el ADN y, por lo tanto, reduce la frecuencia de mutación y preserva la estabilidad genética (Hosamani et al., 2009). Por otro lado, la familia de factores de transcripción NF-κB juega un papel clave en la modulación de las respuestas inmunitarias tempranas contra las infecciones virales. ORFV codifica tres genes (ORFV002, ORFV024 y ORFV121) que modulan la actividad de NF-κB dirigiéndose a partes únicas de la vía, tanto a nivel citoplasmático como nuclear (Diel et al., 2010, 2011). Las ANK son una gran familia de proteínas codificadas por casi todos los poxvirus. Estas proteínas, compuestas por múltiples copias del motivo repetido de anquirina (ANK), median la interacción proteínaproteína en células eucariotas (Mosavi et al., 2004). El gen 125 de ORFV codifica una proteína con actividad antiapoptótica por un mecanismo similar a la de Bcl-2. Este es un nuevo mecanismo de evasión inmune por parte de los parapoxvirus y no se han encontrado ortólogos en otros virus (Westphal et al., 2007).

Finalmente, el virus Orf codifica para una fosfatasa de tirosina, que nuestro grupo viene estudiando desde hace tiempo, y nombramos como OH1 (Segovia et al., 2017). Su ortólogo, VH1 de VACV, es un factor de virulencia que ha sido muy estudiado y que se caracteriza por estar localizado en la región central y conservada del genoma viral.

10

I.5 La fosfatasa OHI

Las fosfatasas de doble especificidad (DSP) comprenden una subclase de fosfatasas, dentro de la familia de las fosfatasas de tirosina (PTP), que desfosforilan tanto los residuos de fosfotirosina, como los de fosfoserina y fosfotreonina. Todas estas enzimas comparten un mecanismo catalítico similar, por el cual un residuo de cisteína conservado forma un intermediario covalente con el grupo fosfato a eliminar. El sitio activo de dichas enzimas contiene un bucle de unión a fosfato (bucle P), que contiene la cisteína catalítica; y un bucle que contiene al aspartato catalítico (bucle WPD), residuo que actua cómo un catalizador ácido-base durante la reacción (figura 1.6) (Zhang, 1998). Las DSP comparten una topología común con otras fosfatasas de tirosina clásicas, sin embargo, muestran diferencias estructurales marcadas en la arquitectura del sitio activo. Las DSP presentan una hendidura catalítica poco profunda de solo ~6 Å de profundidad, que les permite acomodar los residuos de fosfotirosina y fosfotreonina/serina. Por el contrario, el residuo catalítico de cisteína de las proteínas-tirosina fosfatasas clásicas se asienta en el fondo de un bolsillo de ~9 Å de profundidad, que reconoce selectivamente las fosfotirosinas (Yuvaniyama et al., 1996).



Figura 1.6. *Mecanismo catalítico de las PTP*. En **(a)** se muestra como el átomo de azufre de la cadena lateral de la cisteína nucleófila del bucle P, reacciona con el sustrato entrante fosforilado en tirosina, formando un intermediario cisteinil-fosfato, reacción asistida por un aspartato conservado del bucle WPD que actúa como ácido facilitando el ataque nucleofílico y la transferencia del grupo fosfato a la cisteína catalítica. En **(b)** se muestra la hidrólisis del intermediario cisteinil-fosfato, en el cual interviene una molécula de agua coordinada por una glutamina conservada del bucle Q y el aspartato conservado, esta vez actuando como base, aceptando un protón de la molécula de agua que se convierte en un ion hidróxido. Este ion hidróxido luego ataca el átomo de fósforo del intermediario cisteinil-fosfato, lo que lleva a la liberación de fosfato inorgánico y regenera el residuo de cisteína catalítica. Esta acción como base general es crucial para completar el ciclo catalítico y reiniciar la enzima para otra ronda de actividad. (Zhang, 1998). Imagen adaptada de Ahuja, 2018.

Introducción

La primera DSP identificada fue VH1 de VACV (Guan et al., 1991). El gen que codifica VH1 está conservado entre los virus de ADN de doble cadena de la familia *Poxviridae* y es esencial para la viabilidad del virus vaccinia en cultivos celulares (Liu et al., 1995). Se ha demostrado que VH1 es necesaria para evadir los mecanismos de defensa del huésped durante la infección al bloquear la señalización del IFN- γ . Esta función depende de la capacidad de VH1 para desfosforilar específicamente a STAT1 (transductor de señal y activador de la transcripción 1) (Guan et al., 1991; Koksal et al., 2009). Adicionalmente, se ha estimado por inmunoensayos que cada partícula viral lleva aproximadamente unas 200 moléculas de la fosfatasa VH1 empaquetadas en los cuerpos laterales del virión. Los cuerpos laterales son estructuras proteicas que transportan las proteínas efectoras virales al citosol de la célula durante la entrada del virión. En este lugar, se han detectado también otras dos proteínas virales: una fosfoproteína (F17R), y una glutarredoxina-2 viral (G4L). Se ha demostrado que la actividad del proteasoma es necesaria para facilitar la disgregación de los cuerpos laterales, lo cual ocasiona la liberación de las proteínas virales al citosol (Liu et al., 1995; Schmidt et al. 2013; Bidgood et al. 2022).

OH1 es una DSP homóloga a la fosfatasa VH1 de VACV, con la cual presenta un 42 % de identidad de secuencia, y es codificada por el gen ORFV057. Harvey et al. (2015) sugirieron que esta fosfatasa tiene un papel importante en la inhibición de la vía de señalización JAK-STAT del huésped, como descrito para VH1 (Koksal et al., 2009; Najarro et al., 2001). Nuestro grupo ha logrado caracterizar exitosamente la estructura cristalográfica de OH1 (Segovia et al., 2017). En contraste con VH1 de VACV donde el homodímero está estabilizado de forma no covalente (Koksal et al., 2009), el homodímero de OH1 está estabilizado mediante un enlace disulfuro que involucra a la Cys¹⁵ de ambos monómeros (figura 1.7). La estructura cuaternaria de OH1 es probablemente una estructura prototípica de las fosfatasas del género *Parapoxvirus* (Segovia et al., 2017). Mediante diferentes ensayos bioquímicos con OH1 salvaje y mutantes, nuestro equipo logró demostrar que la Cys¹⁵ es un residuo implicado en la dimerización, que OH1 es un dímero no solamente en el cristal, sino que también lo es en solución, y que deja de serlo únicamente en condiciones desnaturalizantes en presencia de un agente reductor (Segovia et al., 2017). Además, al igual que el grupo de Harvey y colaboradores, se demostró que la expresión de OH1 en células HeLa se corresponde con la desfosforilación del factor de transcripción STAT1 en la Tyr⁷⁰¹ (Harvey et al., 2015).



Figura 1.7. *Estructura de OH1 y esquema del sitio activo.* **A)** Representación cristalográfica de OH1 en diagrama de cintas mostrando los dos monómeros. Se muestra la distribución espacial de las cisteínas de OH1, entre ellas, la Cys¹⁵ involucrada en la formación del puente disulfuro entre monómeros, y el residuo Cys¹¹² correspondiente a la la cisteína catalítica de OH1 que fue mutada a serina con el objetivo de evitar su oxidación ya que esto afecta la formación de cristales homogéneos. Se muestra también el ion fosfato (PO₄) en naranja ubicado en el sitio activo. **B)** Detalle del sitio activo de OH1 mostrando los residuos implicados en la catálisis. La imagen de la izquierda fue realizada con PyMol (PDB 5NCR) y la de la derecha extraída de Segovia et al., 2017.

Adicionalmente, nuestro grupo demostró la interacción de OH1 con STAT1 y su desfosforilación a nivel celular (manuscrito a ser enviado, Porley et al., 2024). Mediante ensayos de captura de sustratos, empleando un mutante en la cisteína catalítica, OH1^{C112S}, se logró aislar e identificar a STAT1 por espectrometría de masas; siendo esta la primera evidencia de la interacción entre ambas proteínas (Porley, 2017; Segovia et al., 2017). A continuación, se describe la vía de señalización celular en la cual participa STAT1.

I.6 La vía de señalización celular JAK-STAT

La vía de señalización JAK-STAT (figura 1.8) es una vía de transducción de señales altamente conservada, involucrada en procesos como el desarrollo embrionario, la organogénesis, el crecimiento y la diferenciación celular, la inmunidad innata y adaptativa y la apoptosis. Esta vía comunica información de diferentes citoquinas fuera de la célula al núcleo, dando como resultado la activación de genes a través del proceso de transcripción (Aaronson & Horvath, 2002).

El IFN-y es una de las citoquinas que activa la vía JAK-STAT y juega un papel clave en la defensa del huésped (Young & Hardy, 1995). Regula la respuesta inmunitaria adaptativa, mejorando la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC I) en la mayoría de las células e induciendo la expresión de MHC de clase II en células presentadoras de antígenos y células endoteliales. El IFN- γ actúa sinérgicamente con TNF- α (actividad citotóxica/respuesta inflamatoria) e IFN α/β (actividad antiviral) (Müller et al., 1994). En la vía JAK-STAT el IFN ejerce su acción a través de su capacidad para unirse al receptor de IFN-y (IFN-yR), induciendo la dimerización de los pares de subunidades α y β del receptor para formar un heterotetrámero (etapa 1, Figura 1.8) (Fountoulakis et al., 1991, 1992). Estos receptores están asociados de manera estable con tirosina quinasas citoplasmáticas llamadas Janus quinasas (JAK) (Yamaoka et al., 2004), que fosforilan al receptor (etapa 2, Figura 1.8) en tirosinas específicas de las colas citoplásmicas del receptor, creando sitios de anclaje reconocidos por los dominios SH2 (del inglés Src Homology 2) de las STAT (etapa 3, Figura 1.8). Hay al menos siete tipos diferentes de STAT en mamíferos (STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b y 6). STAT1 se localiza predominantemente en el citoplasma antes de la estimulación por citoquinas y se denominan reguladores de transcripción latentes, porque migran al núcleo y regulan la transcripción de genes solo después de ser activados. Una vez reclutado STAT este es fosforilado en un residuo de tirosina en la posición 701 del dominio de transactivación en el caso de STAT1, produciendo STAT1 fosforilado (p-STAT1) (Darnell et al., 1994, Shuai et al., 1993). De esta manera se facilita la interacción recíproca entre los dominios de SH2 con la p-Tyr⁷⁰¹ de STAT1 monoméricas para formar dímeros activos de STAT que serán importados al núcleo (etapa 4 y 5, Figura 1.8).



Figura 1.8. *Esquema de la vía JAK-STAT*. La vía de señalización JAK-STAT está compuesta por tres elementos principales: receptores de citoquinas en la superficie celular, quinasas de Janus (JAK) y proteínas STAT. Cuando el ligando se une al receptor de citoquinas, se produce la dimerización del receptor que acerca a los JAK. Lo que lleva a la fosforilación tanto de los propios JAK como de las colas citoplasmáticas de los receptores, creando los sitios de acoplamiento necesarios para los monómeros de STAT. A continuación, dos proteínas STAT se unen a los fosfatos y las JAK fosforilan las STAT para formar un dímero. El dímero entra en el núcleo, se une al ADN y provoca la transcripción de los genes diana relacionados con la respuesta inmunitaria antiviral. Creado en BioRender.com

Los dominios SH2 están formados por una hoja β antiparalela con dos hélices α que forman un bolsillo conteniendo un residuo de arginina (Arg⁶⁰² en STAT1), que propicia la interacción con el grupo fosfato. La conformación dimérica de STAT fosforilados se denomina conformación paralela y se encuentra estabilizada por interacciones mutuas entre la p-Tyr⁷⁰¹ y el residuo Arg⁶⁰² del dominio SH2. Cuando STAT1 no está fosforilado, se encuentra en una forma dimérica antiparalela en el citosol formado por interacciones entre el dominio en espiral (CCD) de un protómero y el dominio de unión a ADN (ABD) de su pareja, y viceversa (figura 1.9). (Mao et al., 2005).



Figura 1.9. *Diagramas de las estructuras paralela y antiparalela de STAT1*. STAT1 fosforilada forma dímeros paralelos, representando su forma activa. Por otro lado, STAT1 no fosforilada forma dímeros antiparalelos, lo que refleja su estado inactivo. Los dominios de STAT1 son: el dominio N-terminal (NTD), dominio en espiral (CCD), dominio de unión a ADN (DBD), dominio de enlace (LD) y dominio SH2 (SH2D). El NTD está unido al CCD a través de una region flexible, y los residuos C-terminales incluyen la Tyr⁷⁰¹ que es fosforilada por JAK (punto rojo). La región C-terminal también es flexible, como lo indica la línea negra ondulada. Imagen adaptada de Asano et al., 2023.

El dímero STAT1 fosforilado es reconocido por la importina α 5. Esta, en combinación con la importina β , media la rápida translocación del dímero al núcleo celular. Una vez en el núcleo, el dímero STAT1, junto con otros reguladores de la transcripción, se une a una secuencia reguladora cis específica en varios genes y estimula su transcripción (ver figura 1.8) (Aaronson & Horvath, 2002; Tolomeo et al., 2022). Por otro lado, STAT1 está presente en dos isoformas en la mayoría de las células y tejidos: la isoforma completa STAT1 α (91 kDa) y la isoforma truncada STAT1 β (84 kDa). Esta última, truncada en su extremo C-terminal, es producto del splicing alternativo y carece del dominio de transactivación (TAD).

En el estudio de las proteínas STAT1, se ha observado que STAT1 α posee dos sitios de fosforilación: uno en la Tyr⁷⁰¹ y otro en el TAD, la Ser⁷²⁷. Se consideraba que la isoforma β de STAT1 era transcripcionalmente inactiva. Sin embargo, estudios en ratones genéticamente modificados demostraron que las isoformas β de STAT1, STAT3 y STAT4 son capaces de inducir una expresión génica distinta, tanto en cantidad como en calidad, a la de las respuestas transcripcionales provocadas por la respectiva isoforma α (Parrini et al., 2018).

1.7 Modelo de interacción de OHI con STATI

Existen antecedentes de un modelo de interacción entre la fosfatasa eucariota VHR y STAT5, basado en un estudio combinado de acoplamiento y dinámica molecular. Estos autores proponen que una región distinta al sitio activo de VHR interacciona con el dominio SH2 de STAT5, permitiendo el reclutamiento de este último para su posterior defosforilación (Jardin & Sticht, 2012). Como describimos en el párrafo anterior, el dominio SH2 es un dominio proteico estructuralmente conservado que se une a tirosinas fosforiladas específicas. En este modelo, los autores sugieren un mecanismo en dos pasos: un primer paso de reclutamiento de STAT5 hacia una región diferente al sitio activo de VHR, seguido de un segundo paso de desfosforilación de la tirosina de STAT5. El extremo C-terminal unido al dominio SH2 de STAT5, mediante una región flexible que permite acercar la fosfotirosina al sitio activo de VHR, es un prerrequisito para que ocurra la desfosforilación de STAT5. En este artículo, los autores extrapolan, sin realizar los ensayos *in silico*, el modelo propuesto para VHR y STAT5 a la interacción de STAT1 y VH1. Así se propone a la Tyr¹²⁴ de VH1 como la responsable de interaccionar con la Arg⁶⁰² del dominio SH2 de STAT1 (Jardin & Sticht, 2012).

En el contexto de la tesis de maestría de Darío Porley, mediante estudios *in silico*, se planteó un método en dos pasos de formación del complejo OH1-STAT1, parecido al sugerido para VH1 y STAT1 (figura 1.10). OH1 posee nueve tirosinas, de las cuales la Tyr¹⁵², según los resultados de acoplamiento y dinámica molecular, podría participar en el reclutamiento de STAT1 a través de la interacción con el dominio SH2. Nuestro grupo propone un modelo en el cual un residuo fosforilado de Tyr¹⁵² en OH1 compite con el residuo fosforilado de Tyr⁷⁰¹ de un monómero de STAT1 por la unión al SH2 del otro monómero de STAT1. En el refinamiento del modelo, se observó que la Arg⁶⁰² de STAT1 (que es capaz de reconocer la p-Tyr⁷⁰¹ de STAT1) se combina en un puente salino con la Tyr¹⁵² de uno de los monómeros de OH1, argumentando así a favor de una competencia entre la p-Tyr¹⁵² de OH1 y la p-Tyr⁷⁰¹ de STAT1. Además, en este complejo, la p-Tyr⁷⁰¹ de STAT1, al ser desplazada, quedaría orientada hacia el sitio catalítico de OH1, promoviendo su desfosforilación. Cabe destacar que, si bien los estudios *in silico* nos orientan hacia la Tyr¹⁵², el residuo contiguo es también una tirosina (Tyr¹⁵¹), por lo cual ambos residuos merecen atención a la hora de realizar los ensayos experimentales.

El modelo también proporciona una explicación molecular del papel de OH1 como dímero, ya que la segunda subunidad OH1 interactúa también con STAT1, magnificando la interfaz de contacto y estabilizando el complejo. Esto concuerda con nuestras evidencias experimentales, las cuales demuestran que OH1 forma un dímero estabilizado covalentemente mediante la Cys¹⁵ y que el mutante en la Cys¹⁵ continúa siendo un dímero en ausencia del puente disulfuro (Segovia et al., 2017). Esto también se alinea con la evidencia de que VH1 necesita ser un dímero para alcanzar el máximo nivel de actividad fosfatasa (Koksal & Cingolani, 2011). Por otro lado, el modelo de interacción se ve apoyado también por resultados experimentales. Se observó *in vitro* que no fue posible desplazar la interacción OH1-STAT1 incubando con altas concentraciones de ortovanadato de sodio (Na₃VO₄), un inhibidor competitivo de las fosfatasas. Además, en un modelo celular se observó que tanto la expresión de la fosfatasa OH1^{WT} como la del mutante inactivo en la cisteína catalítica, OH1^{C1125}, afectaron de igual manera la translocación de STAT1 al núcleo en células HeLa inducidas con IFN-γ. Ambos resultados apoyan el modelo propuesto de una interacción inicial entre OH1 y STAT1 mediada a través de un sitio diferente al sitio activo. (Porley, 2017; manuscrito Porley et al., 2023).

El mecanismo por el cual las proteínas compiten con el dominio SH2 de STAT1 también ha sido observado en otras proteínas virales. Así, la expresión de la proteína 018 del VACV afecta negativamente la localización nuclear de STAT1. Se sugiere que esta proteína interactúa con el dominio SH2 de STAT1, entrando en competencia con el receptor de IFN fosforilado. Esto impediría la unión de STAT1 al receptor y su subsiguiente fosforilación. No obstante, en este caso, la estructura cristalina del complejo entre la proteína 018 y STAT1 muestra un modo de unión al dominio SH2 distinto al sugerido para OH1, dado que no implicaría una p-Tyr de la proteína mencionada (Talbot-Cooper et al., 2022).



Figura 1.10. *Esquema del modelo de interacción de OH1 con STAT1.* . Con el objetivo de simplificar se muestra unicamente una de las p-Tyr⁷⁰¹ de STAT1. La p-Tyr¹⁵² de OH1 compite con la p-Tyr⁷⁰¹ de STAT1 por interaccionar con la Arg⁶⁰² del dominio SH2, posiblemente a través de interacciones electrostáticas, ya que el grupo fosfato está cargado negativamente a pH fisiológico, mientras que el grupo guanidinio de la arginina presenta carga positiva a dicho pH. De esta manera la p-Tyr⁷⁰¹ de STAT1 es despazada hacia el sitio activo del monómero de OH1 que está interaccionado con STAT1, para ser desfosforilada. Los círculos amarillos representan los sitios activos de OH1. Creado en BioRender.com

2 HIPÓTESIS DE TRABAJO

El mecanismo de reclutamiento de STAT1 por OH1 se produce por un sitio distinto al sitio activo de OH1. OH1 posee una p-Tyr que estaría implicada en el reclutamiento de STAT1 a través de su dominio SH2.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Entender el mecanismo de reclutamiento, interacción y actividad de la fosfatasa viral OH1 sobre el factor de transcripción STAT1.

3.2 Objetivos Específicos

- 1) Generar y caracterizar mutantes de OH1 en residuos relevantes para la actividad, dimerización y reclutamiento de STAT1.
- Estudiar en un modelo de células HeLa que expresan la OH1^{WT} y los diferentes mutantes, el efecto en la importación nuclear de STAT1.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Técnicas de Biología Molecular

4.1.1 Obtención de células de Escherichia coli XL-1 Blue quimiocompetentes

Inicialmente, se inocularon 3 mL de caldo de lisogenia estéril (LB) sin antibióticos (ATB), con única colonia fresca de *E. coli* XL-1 Blue. Este precultivo se empleó para inocular 250 mL de LB líquido en una relación 1:100. Las células se incubaron a 37 °C y 220 rpm hasta que la densidad óptica (D.O.) alcanzó 0,300, medida a 620 nm.

Posteriormente, se incubaron las células en hielo durante 30 min y luego se centrifugaron a 5000 rpm a 4 °C durante 10 min. Después de remover el sobrenadante, se lavó el pélet con aproximadamente 100 mL de CaCl₂ 0,1 M. Las células se resuspendieron en la misma cantidad de esta solución. Se repitió el proceso de centrifugación bajo las mismas condiciones, descartando el sobrenadante y resuspendiendo las células en 100 mL de CaCl₂ 0,1 M. Luego, las células se incubaron por 1 h a 4 °C en la solución de CaCl₂ 0,1 M. Se volvió a realizar otra centrifugación en las mismas condiciones anteriores, descartando nuevamente el sobrenadante. Se resuspendió el pélet en 3 mL de la solución de CaCl₂ 0,1 M con 20 % de glicerol. Se prepararon alícuotas de 50 μ L en tubos previamente enfriados a 4 °C y se almacenaron en el freezer a -80 °C.

Para evaluar la eficiencia de transformación de las células competentes *E. coli* XL-1 Blue, se calculó la eficiencia de la transformación, efectuando una transformación con una cantidad de plásmido conocida (12,5 ng de pHSV-IRES-EGFP), sembrando varias diluciones de la mezcla de transformación (1:10, 1:100 y 1:500) en placas de LB-agar más antibiótico. Las placas se incubaron en la estufa por 24 h a 37 °C para evaluar el crecimiento de los clones transformantes, expresándose la eficiencia en UFC/µg de ADN. Las células quimiocompetentes *E. coli* BL21(DE3)Star se encontraban disponibles en el laboratorio.

4.1.2 Transformación de células E. coli electrocompetentes

Para realizar la electrotransformación de las células, se siguió el protocolo descrito en el manual de protocolos de laboratorio (Sambrook & Green, 2012). Inicialmente, se colocaron en hielo un tubo de células electrocompetentes y la cubeta de electroporación de 0,2 cm durante 10 min. Utilizando el equipo GenePulser Xcell (BioRad), se programó la electroporación para bacterias con un pulso de 2,5 kV, una capacitancia de 25 μ F y una resistencia de 200 Ω . A continuación, se añadieron 0,7 μ L del plásmido deseado a 40 μ L de células electrocompetentes, incubándose esta mezcla en hielo por 1 min. Posteriormente, se trasladó el contenido del tubo a la cubeta de electroporación ya enfriada, se insertó en el electroporador y se aplicó el pulso. Tras remover la cubeta, se añadieron 500 μL de medio LB, suspendiendo suavemente las células, y se transfirió rápidamente la mezcla a un tubo conteniendo LB para su incubación en agitador a 37 °C durante 1 h a 225 rpm. Finalmente, se sembraron 250 μL de la suspensión celular en placas de LB con el antibiótico correspondiente (50–100 μg/mL), incubándolas a 37 °C durante toda la noche para evaluar el crecimiento de clones transformantes.

4.1.3 Transformación de células E. coli quimiocompetentes

Para realizar la transformación química de células *E. coli* XL-1 Blue, se utilizó el protocolo descrito en el manual de protocolos de laboratorio (Sambrook & Green, 2012). Una alícuota de 40 µL de células quimiocompetentes se descongeló en hielo durante 10 min. Después de este tiempo, se añadieron 5 µL del plásmido deseado, manteniendo la mezcla en hielo durante 30 min adicionales. A continuación, se realizó un choque térmico a 42 °C durante 30 s, seguido por un enfriamiento en hielo por 5 min. Posteriormente, se agregaron 945 µL de medio LB y la mezcla se incubó a 220 rpm y 37 °C durante 1 h. Finalmente, se sembraron 250 µL de esta suspensión en placas de LB con el antibiótico adecuado (50–100 µg/mL), incubándolas a 37 °C durante toda la noche.

4.1.4 Análisis y cuantificación de ácidos nucleicos

Los productos de PCR, plásmidos y productos de digestión se analizaron utilizando electroforesis de ADN en geles de agarosa al 1,5 % en tampón TAE (40 mM Tris-base pH 7,6; 20 mM ácido acético y 1 mM EDTA). Para la preparación de las muestras, estas se diluyeron en tampón de carga 6X (glicerol 50 %; azul de bromofenol 0,02 %; xilencianol 0,002 %). Dependiendo del tamaño de los fragmentos de ADN a analizar, se emplearon los marcadores de pares de bases (PM) GeneRuler 100 pb y 1 kb DNA Ladder de Thermo Scientific. La corrida electroforética se llevó a cabo a 100 V.

Para la visualización de los ácidos nucleicos bajo luz ultravioleta, se utilizó el reactivo SYBR Safe DNA Gel Stain de Invitrogen, siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen). En casos donde fue necesario purificar fragmentos de ADN del gel, se empleó el kit Zymoclean (Zymo Research #D4001), también siguiendo las indicaciones proporcionadas por el fabricante.

La cuantificación y evaluación de la pureza del ADN se realizaron mediante mediciones espectrofotométricas en el Nano Drop Lite (Thermo Scientific). Se determinó la absorbancia a 260 nm y se calcularon los cocientes de absorbancia 260/280 y 260/230 para evaluar la pureza. Paralelamente, la concentración del ADN se estimó mediante comparación visual con las bandas de intensidad conocida en el gel de agarosa, utilizando el marcador de pares de bases como referencia.

4.1.5 Generación de las variantes de OHI en el vector plasmídico pET28a(+)

Para la obtención de los mutantes OH1^{C155}, OH1^{Y151F} y OH1^{Y152F}, se utilizó la estrategia de mutagénesis sitio-dirigida. Este método permite realizar cambios específicos en la secuencia de ADN de un gen. El primer paso involucra el diseño de un par de cebadores mutagénicos complementarios entre sí, los cuales portan la mutación deseada (ver tabla 4.1). Utilizando estos cebadores, se amplifica el plásmido completo en una reacción de PCR. Esta reacción se efectúa con una ADN polimerasa de alta fidelidad, generando un ADN circular mellado que incorpora la mutación. Después de la amplificación, el ADN parental, usado como molde en la PCR, se elimina por digestión enzimática. Para este propósito, se utiliza la enzima DpnI, que tiene la capacidad de digerir específicamente el ADN metilado. Finalmente, el plásmido sintetizado, ahora portador de la mutación, se transforma en células competentes de *E. coli* XL-1 Blue. En estas células, la mella en el plásmido se repara y se producen múltiples copias del mismo. Los cebadores utilizados para esta metodología están detallados en la siguiente tabla:

Mutantes	Cebadores	Secuencia
0111(155	Forward	5'-CTCCTGCTGCGGAGCACGCGCGCGG-3'
OHICISS	Reverse	5'-CGCGTGCTCCGCAGCAGGAGCACCGCGCGCGG-3'
OTT V151F	Forward	5'-CGTGTACTTCCTCAAAACCTTCTACGAGATC-3'
UHI	Reverse	5'-GGTCCCGGATCTCGTAGAAGGTTTTGAGG-3'
OTTA V1525	Reverse	5'-CGTGTACTTCCTCAAAACCTACTTCGAGATC-3'
UHI	Forward	5'-GGTCCCGGATCTCGAAGTAGGTTTTGAGG-3'

Tabla 4.1. Cebadores mutagénicos.

Como molde se utilizó el plásmido pET28a(+)-OH1^{WT} disponible en el laboratorio. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL, conteniendo 10 µL de 5X Phusion HF Buffer, 1 µL de solución de dNTPs [10 mM] cada uno, 2,5 µL de cada cebador [10 µM], 1 µL de ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (2 U/µL, Thermo Scientific, #F-530S), un volumen de molde conteniendo 100 ng de ADN y c.s.p. de agua ultrapura. Se utilizó el siguiente programa de ciclado: desnaturalización inicial a 98 °C por 5 min, seguida de 30 ciclos de repetición de desnaturalización a 98 °C durante 20 s, hibridación de los cebadores a 55 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 7 min; finalmente se agregó una extensión a 72 °C durante 10 min.

Después de la PCR, el producto se digirió con 0.5 μ L de DpnI (Thermo Scientific, #ER1701) durante 120 min a 37 °C. Este paso es crucial para eliminar el molde original y preparar el ADN para la transformación en células *E. coli* XL-1 Blue, lo cual se realizó a continuación. Posteriormente, los clones transformantes se expandieron y los plásmidos se purificaron utilizando un kit comercial Zymoclean (Zymo Research #D4001). Para asegurar la calidad de los plásmidos para análisis posteriores, se evaluaron en términos de integridad, concentración y pureza, como se detalla en el punto 4.1.4. La secuencia de los clones se obtuvo mediante el servicio de Macrogen (Corea) y estas se analizaron utilizando el programa BioEdit, para la confirmación de la presencia de la mutación. Los clones bacterianos de *E. coli* XL-1 seleccionados se almacenaron a -80 °C. Posteriormente, estos clones se utilizaron para la extracción del ADN plasmídico. Luego, el ADN extraído se empleó en la transformación de *E. coli* BL21(DE3) Star, proceso necesario para la expresión recombinante de las variantes de OH1.

4.1.6 Subclonado de variantes de OHI en el vector plasmídico pHSV-IRES-EGFP

El vector pHSV-IRES-EGFP 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 (EGFP). Para llevar a cabo el clonado, se realizó otra PCR con un par de cebadores (ver tabla 4.2) que permite obtener un fragmento conteniendo el gen de OH1 y los sitios de restricción de HindIII flanqueando dicho gen.

La reacción de PCR se realizó con la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion de Thermo Scientific (F-530S), en un volumen final de 50 µL, conteniendo 10 µL de 5X Phusion HF Buffer, 1 µL de solución de dNTPs [10 mM] cada uno, 2,5 µL de cada cebador [10 µM], 1 µL de ADN polimerasa [2 U/µL] y 50 ng de ADN molde en este caso pET28a(+) generados en el punto 4.1.5. Se utilizó el siguiente programa de ciclado: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, seguida de 35 ciclos de repetición de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, hibridación de los cebadores a 50 °C durante 30 s, extensión a 72 °C durante 2 min, y finalmente una extensión a 72 °C durante 10 min.

Posteriormente, el producto de PCR se digirió con HindIII (Thermo Scientific #ER0501) por 120 min a 37 °C, seguido de una inactivación de la enzima a 80 °C durante 20 min. Este fragmento se separó en un gel de agarosa y se purificó utilizando el kit Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (#D4001).

De forma simultánea, el plásmido pHSV1-IRES-EGFP también fue tratado con HindIII durante 180 min a 37 °C, seguido por una inactivación similar. Para prevenir la religación del plásmido, se realizó una desfosforilación usando fosfatasa alcalina (Fast AP Thermo Scientific #EF0651) a [1 U/μL] durante 10 min a 37 °C. Ambos productos, el fragmento de ADN y el plásmido, fueron purificados usando el mismo kit Zymoclean.

La siguiente fase fue la ligación de los fragmentos de ADN. Este proceso se llevó a cabo utilizando 5 Weiss U de T4 DNA ligasa (Thermo Scientific #EL0011) en un volumen de reacción de 20 µL, que incluyó 60 ng del plásmido y 30 ng del inserto, incubados durante 1 h a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, la ligasa se inactivó durante 5 min a 70 °C. Con el producto de ligación, transformamos células *E. coli* XL-1 Blue.

Para verificar la inserción y orientación correctas del gen de interés, los plásmidos resultantes se sometieron a una doble digestión con las enzimas de restricción EcoRI y SalI. Los plásmidos que contaban con el inserto en la orientación correcta se expandieron y se purificaron utilizando el kit ZR Plasmid Miniprep (Zymo Research #D4015) siguiendo el protocolo del fabricante y analizados como se detalla en el punto 4.1.4.

Finalmente, se realizó la secuenciación de las construcciones clonadas. Para ello, se emplearon los cebadores HSV-1_IE4_5: 5'-TTTGCACGGGTAAGCACCTTGG-3' e IRES-rev: 5'-TATAAAACAGGCGTACAAGGGTA-3' en el servicio de secuenciación de Macrogen (Corea). La calidad de las secuencias se determinó observando los picos de los cromatogramas obtenidos. Posteriormente, se realizaron alineamientos con la secuencia codificante para la fosfatasa OH1^{WT}, usando el programa BioEdit. Tras confirmar la secuencia deseada, los clones seleccionados se almacenaron a −80 °C para su conservación.

Tabla 4.2. Cebadores para el sub-clonado de los vectores pHSV-IRES-EGFP. 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 HindIII. Estos cebadores fueron diseñados para poder utilizar RF-cloning o el clonado con ezimas de restricción, que fue lo que finalmente funcionó.

Cebadores	Secuencia
RFPTP for 2	5'- <mark>AGGAGGAACGTCCTCGTCGAT</mark> AAGCTT <mark>GCA</mark> ATGGGCGATAAGAGCGAGTGG-3'
RFPTP rev 2	5′-GGTACAACCCCAGAGCTGTTTTAAAAGCTTTTAGGACGGCGAGTCGCAGACG-3′

4.2 Técnicas de Bioquímica de proteínas

4.2.1 Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las proteínas producidas en forma recombinante se separaron según su peso molecular mediante SDS-PAGE utilizando cubas de electroforesis BioRad (MiniPROTEAN Tetra Cell 165-8000). Utilizando el protocolo sugerido por BioRad, se prepararon geles de 1 y 1,5 mm de espesor; se utilizó un gel concentrador al 6 % (p/v) y un gel separador de 8 o 12 % de acrilamida, dependiendo de la muestra. Las muestras se diluyeron a 1X con tampón de muestra 6X (Tris 0,35 M; SDS 10 %; glicerol 30 %; azul de bromofenol 0,02 %) y se les agregó ditiotreitol (DTT) a una concentración final de 50 mM para reducir los puentes disulfuro. Luego, se incubaron por 5 min a 95 °C y se dejaron enfriar antes de ser sembradas en los pocillos del gel de electroforesis.

4.2.2 Electrotransferencia e inmunodetección por Western Blot (WB)

Las muestras resueltas por SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) con el sistema de transferencia húmeda de BioRad, utilizando una solución tampón de transferencia previamente enfriada toda la noche a (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 al menos 1 h a TA. 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 (ver tabla 4.3) diluido en TBS-T conteniendo 5 % de BSA durante 90 min (o toda la noche dependiendo del 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 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 a los 10–30 min. Cuando se utilizó el anticuerpo conjugado a HRP, se reveló con el sustrato comercial Super Signal West Pico Chemiluminescent substrate (Thermo Scientific). 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.

Anticuerpos	Origen	Dilución	Fabricante	Nro. de catálogo
STAT1	Monoclonal en conejo	1:2000	Cell Signaling	D1K9Y
p-STAT1	Monoclonal en conejo	1:1000	Cell Signaling	58D6
Anti conejo-HRP	Policlonal en cabra	1:80000	Cell Signaling	A6545

Tabla 4.3. Anticuerpos primarios y secundarios.

4.2.3 Determinación de la concentración de proteínas

Para la cuantificación de proteínas, se utilizó el método de Bradford en una placa de 96 pocillos. Se realizó la reacción mezclando 150 μL de reactivo de Bradford con 5 μL de muestra, pura o en distintas diluciones, en un pocillo de la placa. Se dejó desarrollar el color durante 5 min 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 hecha con soluciones de concentración conocida de BSA diluida en H₂O milli-Q, en el rango de 0,1–1,0 mg/mL. Tanto las muestras como los puntos de la curva de calibración se analizaron por triplicado. Para determinar la concentración, se graficaron las medidas de absorbancia en función de la concentración de BSA y se procedió a hacer una regresión lineal de los datos obtenidos. Esta ecuación se utilizó para interpolar los valores de absorbancia y así poder estimar la concentración de las muestras.

4.2.4 Expresión en E. coli de las variantes de OHI recombinantes

Se transformaron células *E. coli* de la cepa BL21(DE3)Star quimiocompetentes con el plásmido pET28a(+). Este plásmido contiene una variante de interés del gen OH1 y una cola de histidinas (His-tag) en su extremo N-terminal. A partir de este stock, se realizó un precultivo de 3 mL en LB suplementado con kanamicina (50 µg/mL), y se incubó toda la noche a 37 °C en agitación a 200 rpm. Al día siguiente, se inoculó 500 mL del medio autoinductor ZY (N-Z amine Yeast extract) M5052, conteniendo el mismo antibiótico, con 5 mL de precultivo. Las células se dejaron crecer a 37 °C en agitación a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) a 600 nm de 0,6. Al llegar a este punto, se bajó la temperatura del cultivo a 16 °C, manteniendo la agitación a 200 rpm, hasta que la D.O. a 600 nm llegó a ser mayor o igual a 10, lo cual ocurrió aproximadamente a las 24 h.

4.2.5 Purificación de las variantes de OHI recombinantes

Una vez finalizada la expresión, se colectaron las células mediante centrifugación a 6000 rpm durante 15 min a 4 °C. A continuación, el sedimento celular fue resuspendido en tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0; NaCl 0,5 M; glicerol 10 %). A la suspensión cellular luego se le agregó un cóctel de inhibidores de proteasa a una concentración final 1X (Sigma S8830), lisozima (Sigma L2879-1G) a una concentración final de 0,1 µg/mL y se mantuvo a 4 °C. Después de esta preparación, 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). El siguiente paso fue la incubación del lisado con una concentración final de ADNasa I (Sigma D5025) a 5 µg/mL y MgCl₂ a 10 mM durante una hora a 4 °C. Posteriormente, se procedió a centrifugar el lisado a 13.000 rpm durante 1 hora a 4 °C, y luego se recogió el sobrenadante al cual se le verificó el pH, se filtró por 0,2 µm y se utilizó para la purificación mediante cromatografía de afinidad a metal (Cu²⁺) 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 hizo mediante el agregado sucesivo de 1 mL de tampón de lisis conteniendo imidazol 300 mM, siguiendo la proteína eluida mediante Bradford en microplaca. Tras esto, se agruparon las fracciones conteniendo a la proteína eluida. Para eliminar el His-tag y diminuir la concentración de imidazol, la fracción eluida se incubó con la proteasa TEV_{SH} recombinante, ON a 18 °C, mientras se realizaba la diálisis con el tampón de lisis conteniendo concentraciones decrecientes de imidazol (150, 75 y 20 mM). El último tampón de diálisis correspondió al tampón de lisis conteniendo 20 mM de imidazol, una menor cantidad de NaCl (50 mM) y 1 mM de DTT.

El producto obtenido se pasó tres veces a través de una columna IMAC para asegurar la remoción del His-tag digerido, la TEV_{SH} (que también contiene His-tag) y la proteína sin digerir, recuperándose el percolado con la variante de OH1 purificada por afinidad y sin His-tag. Luego, se concentró dicha fracción hasta un volumen de 4 mL mediante ultrafiltración (centricones de 10 kDa de corte). Como último paso de purificación, se procedió a realizar una cromatografía de exclusión molecular (SEC). Para ello, se inyectó la muestra en una columna preparativa HiLoad 16/60 Superdex 200 (GE Healthcare) conectada a un equipo AKTA Prime Plus (GE Healthcare), previamente equilibrada (Tris-HCl pH 8,0; NaCl 0,05 M; glicerol 10 %; DTT 1 mM; EDTA 5 mM) y calibrada por el grupo con un kit de proteínas de masa molecular nativa conocida. Se registró la absorbancia a 280 nm en las fracciones que eluyeron, obteniéndose un

cromatograma de la corrida. Se seleccionaron las fracciones correspondientes al volumen de elución en el cual, sabemos por experiencia previa, eluye la fosfatasa OH1 (V_e aprox. 80 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 al 12 % de acrilamida.

La ecuación $K_{av} = -0,3872 \log PM + 2,2662$, fue obtenida previamente por el grupo y se empleó para determinar la masa molecular nativa de las muestras analizadas por SEC (Segovia, 2017). Para ello, se calculó el valor de la constante $K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$, siendo V_t de 120 mL (volumen total de la columna), V_o de 48,07 mL (volumen muerto obtenido al utilizar azul dextrano ~2000 kDa como muestra) y V_e el volumen de elución del pico de interés.

4.2.6 Evaluación de la actividad fosfatasa de las variantes de OHI

La actividad fosfatasa de la enzima OH1 fue determinada utilizando el sustrato artificial para-nitrofenilfosfato (pNPP). La reacción de hidrólisis del grupo fosfato, generada por la actividad fosfatasa, se puede seguir en el tiempo detectando el aumento de la absorbancia a 405 nm debido a la liberación gradual del producto de la reacción, el para-nitrofenol (pNP), que en condiciones alcalinas es de color amarillo. La actividad fosfatasa se analizó a tres temperaturas diferentes: 20 °C, 30 °C y 37 °C, en tampón de actividad (Tris-HCl 20 mM pH 8,0; NaCl 0,05 M; DTT 1 mM; EDTA 3 mM; glicerol 5 % y Tween-20 0,005 %). El coeficiente de extinción molar por el camino óptico (ε₄₀₅) del pNP se determinó en las condiciones experimentales utilizadas y se expresó en M⁻¹. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 300 μL, conteniendo una concentración final de enzima de 0,009 mg/mL (0,4 μM) y un rango de concentraciones de pNPP entre 1 mM y 20 mM. La actividad fue expresada como μmoles de pNP·min⁻¹·mg⁻¹ de proteína recombinante. Las constantes cinéticas K_M y V_{máx} se calcularon utilizando el mejor ajuste de la ecuación de Michaelis-Menten en el programa GraphPad Prism. La k_{cat} (s⁻¹) fue calculada como el cociente entre la V_{máx} (μM pNP·s⁻¹) y la concentración de enzima (μM) en el ensayo.

4.2.7 Fosforilación de STATI y OHI con JAK

Para el ensayo de fosforilación se utilizó la enzima JAK comercial (PV4774, Thermo), la cual se encuentra a una concentración de 6 μM en tampón de almacenamiento (50 mM HEPES pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,02 % Tritón X-100; 2 mM DTT y 50 % Glicerol). Para los ensayos se preparó una dilución de trabajo 1:10 en el tampón de almacenamiento. Como sustrato se empleó STAT1 comercial (PH0011-Gibco) a una concentración de 10 μM en tampón de actividad (50 mM HEPES pH 7,5; 2,5 mM MnCl₂; 7,5 mM MgCl₂; 50 mM NaCl). Para OH1 se partió de una alícuota almacenada a –20 °C a una

concentración de 10.000 μM, y a partir de esta se preparó una dilución a una concentración final 10 μM en tampón de actividad.

El volumen de reacción del ensayo de fosforilación de ambos sustratos fue de 25 μL; siendo la concentración final del sustrato 1 μM y de la enzima JAK de 0,14 μM. Al volumen de reacción se le agregó 1 mM final de DTT y se incubó a 30 °C por 30 min. Para detener la reacción se agregó 5 μL de tampón de carga (5X), y se incubó por 6 min a 95 °C. Como control se realizó para cada sustrato un ensayo en paralelo sin JAK.

A continuación, las muestras se separaron por SDS-PAGE, luego se analizaron por WB como se detalla en el punto 4.2.2. Para revelar la presencia de STAT1 fosforilado en la Tyr⁷⁰¹ se realizó un WB utilizando el anticuerpo primario anti p-STAT1 descrito en la tabla 4.3. Una vez revelado el ensayo, se hizo un *stripping* suave de la membrana incubando dos veces con una solución de 1,5 % de glicina, 0,1 % de SDS, 1 % Tween 20 (ajustada a pH 2,2), en agitación por 10 min. Posteriormente, se hicieron dos lavados con PBS 1X de 10 min, y dos lavados con tampón TBST-T (20 mM Tris Base; 150 mM NaCl; 0,1 % Tween 20) de 5 min. Luego de efectuado el *stripping* se dejó bloqueando la membrana toda la noche a 4 °C, para luego lavarse e incubarse con un anticuerpo primario anti-STAT1 total (D1K9Y Cell Singaling) a una dilución de 1:2000. El revelado con estos dos anticuerpos y la cuantificación de la señal con ImageJ (Schneider et al., 2012) permitió determinar la proporción de pSTAT1/STAT1 total. Dado que no se contó con un anticuerpo anti p-OH1, para evaluar la fosforilación de OH1, se utilizó un anticuerpo anti p-Tyr tal como se detalla en la tabla 4.3.

4.3 Técnicas de Biología Celular

4.3.1 Cultivo de la línea celular HeLa

La línea celular HeLa (CCL-2[™]) es una línea celular inmortalizada humana derivada de una biopsia de cáncer cervical. Dicha línea celular, disponible en laboratorio, se cultivó a 37 °C bajo atmósfera húmeda con 5 % CO₂ en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Gibco), conteniendo Suero Fetal Bovino (SFB) descomplementado al 10 % (Gibco) y 1 % de antibiótico/antimicótico comercial (penicilina 100 Unidades/mL, estreptomicina 100 µg/mL, anfotericina B 0,25 µg/mL, ATB/AM Gibco #15240-062) y G418 sulfato (geneticina 500 µg/mL, Gibco). Las células HeLa crecen en monocapa, por lo cual, para mantener y/o expandir el cultivo, fue necesario disgregarlas mediante la incubación a 37 °C con una solución de Tripsina 0,25 % EDTA 0,02 %. Se realizó el conteo de células empleando la cámara Neubauer para mantener la línea y preparar de los tapices celulares para los diferentes ensayos de transfección.

4.3.2 Transfección de las células HeLa con los plásmidos pHSV-IRES-EGFP de interés y estimulación con IFN-γ

Se realizó una transfección de células HeLa con 5 plásmidos: control sin inserto (pHSV-IRES-EGFP), pHSV1-OH1^{WT}-IRES-EGFP, pHSV-OH1^{C1125}-IRES-EGFP, pHSV-OH1^{Y151F}-IRES-EGFP y pHSV-OH1^{Y152F}-IRES-EGFP. Para ello, se sembraron placas de 96 pocillos con densidades de 1–1,5×10⁴ células por pocillo en un volumen de 200 µL de DMEM al 10 % de SFB y se incubaron a 37 °C y 5 % CO₂. A las 24 h de haber sembrado las células, se prepararon dos tubos. El «tubo D» conteniendo 100 µL de Opti-MEM y 3 µL de reactivo PLUS (Thermo Scientific #A12621), 15 µL de Opti-MEM y 0,45 µL de reactivo PLUS por tubo. De este tubo «D» se tomaron alícuotas de 15 µL para 6 tubos rotulados de la siguiente forma: C, WT, C15S, C112S, Y151F e Y152F. Luego, a cada tubo se le agregaron 450 ng de su respectivo ADN plasmídico.

En paralelo, se preparó el «tubo L», en el cual se pipetearon 6 µL de Lipofectamina LTX (Thermo Scientific #A12621), (0,3 µL de Lipofectamina por pocillo para un total de 20 pocillos) y 100 µL de Opti-MEM. Luego, se pipetearon 15 µL del tubo L a cada uno de los 6 tubos D y se dejaron incubar en cámara de flujo por 30 min a TA. Mientras transcurría la incubación, se lavaron las células a transfectar con Opti-MEM y se dejaron con 100 µL de DMEM con SFB al 2 % sin ATB/AM. Posteriormente, se agregó por goteo a cada pocillo 10 µL de la mezcla ADN-Lipofectamina y se incubó la placa de 96 pocillos por 24 h a 37 °C y 5 % CO₂ para permitir la expresión de las proteínas de interés.

Luego, para activar la vía JAK-STAT1, se estimularon las células con IFN-γ (Gibco #PHC4031) diluido en PBS 1X y BSA al 1 % por 30 min a 37 °C en estufa, empleando 2 unidades de IFN-γ por 1×10⁶ de células.

4.3.3 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Para evaluar la localización subcelular de STAT1 en presencia o ausencia de la expresión de OH1 en células HeLa, se realizó una inmunofluorescencia indirecta. Luego de los distintos tratamientos, se retiró el medio de las células y se hicieron dos lavados suaves con PBS 1X.

Posteriormente, se fijaron las células con paraformaldehído al 4 % durante 20 min a TA. Se lavaron dos veces con PBS 1X y se permeabilizaron durante 10 min con metanol previamente enfriado a –20 °C. Se lavaron una vez con PBS 1X y se agregó el anticuerpo anti-STAT1 primario, en este caso a una dilución 1:400 en PBS 1X conteniendo 0,5 % SFB, 0,3 % BSA y 0,1 % Tritón X-100, y se incubaron 30 min a 37 °C. Posteriormente, se efectuaron tres lavados con 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

InmunoResearch Laboratories, #111-165-144) diluido 1:500 en igual solución que el anticuerpo primario. Se incubó por 1 h en cámara húmeda a 37 °C. Posteriormente, se realizaron tres lavados con solución de lavado, dos lavados con PBS 1X y un lavado con H₂O Milli-Q, y se dejaron secar los pocillos. Para marcar los núcleos, se agregó una solución de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) y se incubó por 15 min a TA. Se lavó con H₂O Milli-Q, se dejó secar y se adquirieron las imágenes en microscopio ZOE Fluorescent Cell Imager.

Para cada condición, se evaluó la distribución nuclear o difusa de STAT1 en aquellas células que expresaban EGFP. Se realizaron 3 réplicas biológicas independientes.

Se utilizó el programa GraphPad Prism versión 9.5.1 (GraphPad Software, Boston, Massachusetts, USA, www.graphpad.com) para analizar los datos de cada condición mediante la creación de tablas de contingencia, utilizando la prueba exacta de Fisher para evaluar la significancia estadística de las posibles diferencias observadas en la distribución de STAT1 en la célula, ya sea en el núcleo o difusa. Se consideraron como estadísticamente significativos los valores p < 0.05.

4.4 Abordajes Bioinformáticos

4.4.1 Búsqueda de secuencias homólogas

La búsqueda de secuencias homólogas se realizó utilizando el servidor ConSurf (https://consurf.tau.ac.il/) (Ashkenazy et al., 2016). ConSurf es una herramienta bioinformática que permite estimar la conservación evolutiva de las posiciones de aminoácidos en proteínas, ADN y moléculas de ARN. La posición de un aminoácido (o nucleótido) está altamente vinculada a su importancia estructural y funcional. ConSurf estima la tasa evolutiva al considerar la similitud entre aminoácidos y la relación evolutiva entre homólogos de la proteína de estudio (Pupko et al., 2002; Mayrose et al., 2004). Utilizando la secuencia de aminoácidos o nucleótidos, obtenida de la estructura cristalográfica tridimensional disponible en el PDB, ConSurf realiza una búsqueda de secuencias homólogas cercanas empleando uno de los siguientes programas: MMsec2, HMMER, CSI-BLAST, PSI-BLAST o BLAST (Altschul et al., 1990; Biegert & Söding, 2009; Finn et al., 2011).

El programa HMMER versión 3.4 (www.hmmer.org) que detecta homología comparando un perfil-HMM (un modelo oculto de Márkov construido explícitamente para una búsqueda concreta) con una única secuencia o con una base de datos de secuencias. Las secuencias que obtienen una puntuación significativamente mejor con el perfil-HMM en comparación con un modelo nulo se consideran homólogas a las secuencias que se utilizaron para construir el perfil-
HMM. HMMER está diseñado para detectar homólogos remotos con la mayor sensibilidad posible, basándose en la solidez de sus modelos probabilísticos subyacentes. Los parámetros iniciales para efectuar la búsqueda fueron de una iteración y un valor E de 0,0001. El valor esperado (valor E) es un parámetro que describe el número de aciertos que uno puede «esperar» ver por casualidad al buscar en una base de datos de un tamaño particular. Un buen valor E es mucho menor que 1; por ejemplo, un valor E de 0,01 significaría que, en promedio, se esperaría aproximadamente 1 falso positivo por cada 100 búsquedas con diferentes secuencias de consulta.

La búsqueda de homólogos se realizó contra la base de datos UniRef90 utilizando la secuencia aminoacídica de interés extraída del registro SEQRES del archivo PDB como consulta de entrada (PDB ID: 5ncr). Si el registro SEQRES no existe, ConSurf extrae la secuencia del registro ATOM. Posteriormente, se agrupan y las secuencias altamente similares se eliminan mediante el algoritmo CD-HIT (Li & Godzik, 2006) utilizando un % ID máximo entre secuencias de 95 y un % ID mínimo para homólogos de 35 que el límite superior de la «zona crepuscular» para las estructuras de proteínas (Rost, 1999). En total, se obtuvieron 29 secuencias que se utilizaron para realizar el alineamiento múltiple.

ConSurf realizó el alineamiento múltiple con el programa MAFFT utilizando el algoritmo L-INS-i (Katoh et al., 2002; Katoh & Toh, 2008). A continuación, el alineamiento múltiple de secuencias se utiliza para realizar un árbol filogenético utilizando el algoritmo de Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987), tal y como se implementó en el programa Rate4Site (Pupko et al., 2002).

Se utilizó el modelo Bayesiano, ya que ofrece una mejora en la precisión de las estimaciones de las puntuaciones de conservación con respecto al método de máxima verosimilitud (Mayrose et al., 2004).

4.4.2 Análisis *in silico* de los efectos de las mutaciones con cambio de sentido Y151F e Y152F en la estabilidad y flexibilidad de OH1.

El vínculo entre la estructura y la función de las proteínas puede entenderse al predecir el efecto de las mutaciones con cambio de sentido en la estabilidad y dinámica de la proteína. Una forma de medir el impacto de un cambio aminoácidico en la estabilidad de una proteína es mediante el cálculo teórico de una cantidad termodinámica llamada energía libre de plegamiento ($\Delta G_{plegamiento}$), es decir, la diferencia entre la energía libre de la proteína plegada y desplegada. El cambio de estabilidad de una proteína mutada a su forma salvaje se define como la diferencia entre las energías libres de plegamiento para el mutante menos la diferencia de energía libre de plegamiento para la forma salvaje:

$$\Delta \Delta G = \ \left(\Delta G_{plegamiento} \right)^{mutante} - \left(\Delta G_{plegamiento} \right)^{salvaje}$$

DynaMut2 (https://biosig.lab.uq.edu.au/dynamut2/) es un servidor web que combina métodos de Análisis de Modo Normal (NMA) para capturar el movimiento de las proteínas con el fin de investigar los efectos de mutaciones puntuales y múltiples en la estabilidad y dinámica de las proteínas (Rodrigues et al., 2020).

Para realizar el análisis se suministró el PDB ID de OH1 (5ncr) y las mutaciones deseadas, en este caso Y151F e Y152F.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Resultados asociados al primer objetivo

En esta etapa, se generaron y caracterizaron mutantes de OH1 en residuos relevantes para la actividad, dimerización y reclutamiento de STAT1. En este trabajo se produjeron los mutantes en las tirosinas 151 y 152 (OH1^{Y151F} y OH1^{Y152F}). Por otro lado, el mutante de OH1 en la cisteína catalítica C112S (inactivo), así como el mutante C15S, responsable de la dimerización, se obtuvieron durante el trabajo de maestría de Danilo Segovia. Posteriormente, se llevó a cabo la producción recombinante de todas las variantes de OH1 en *E. coli* BL21(DE3)Star y se realizó la purificación por IMAC y SEC. Luego se evaluó la actividad enzimática de las distintas variantes de OH1 utilizando el sustrato artificial pNPP.

5.1.1 Obtención de los mutantes de OHI

Los mutantes OH1^{Y151F} y OH1^{Y152F} se obtuvieron mediante mutagénesis sitio dirigida, utilizando como molde el gen de la fosfatasa clonado en el vector pET28a(+) (Segovia et al., 2017). Dicho plásmido se expandió mediante transformación de *E. coli* XL-1 y se purificó, obteniéndose dos preparaciones de buena calidad (Abs 260/280 > 1,8) y concentración (286–600 ng/µL). El análisis por electroforesis en gel de agarosa de ambas preparaciones (figura 5.1), muestra una banda principal de más de 10.000 pb, la cual se correspondería a la conformación circular del plásmido, ya que el tamaño del mismo más el inserto es de 6248 pb. No se observaron las conformaciones, tanto superenrollada como lineal, del plásmido purificado.



Figura 5.1. *Electroforesis en gel de agarosa mostrando el plásmido pET28a(+) OH1^{WT} purificado.* **Carril 1**: marcador de pb Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Thermo), **Carril 2**: preparación de plásmido purificado 1, **Carril 3**: preparación de plásmido purificado 2.

En la figura 5.2, se muestra el producto de PCR de la mutagénesis sitio-dirigida posteriormente al tratamiento con DpnI para la obtención del mutante OH1^{Y151F} (figura 5.2 A, carril 2) y para el mutante OH1^{Y152F} (figura 5.2B, carril 2). En ambos casos se observa un producto de PCR del tamaño esperado (6248 pb).



Figura 5.2. Electroforesis en gel de agarosa mostrando el producto de PCR de la mutagénesis sitio-dirigida para la obtención de los mutantes OH1^{Y151F} y OH1^{Y152F}. La figura **A** corresponde a la obtención del mutante OH1^{Y151F} y la **B** al mutante OH1^{Y152F}. **Carril** 1: marcador de pb Gene Ruler 1kb DNA Ladder Thermo. **Carril 2**: producto de PCR luego de la digestión con Dpnl.

Luego, con el producto de PCR obtenido y digerido con DpnI, se realizó la transformación por electroporación de las células *E. coli* XL-1 Blue electrocompetentes. A modo de ejemplo, en la obtención del mutante OH1^{Y151F} se observaron más de 50 colonias, a partir de las cuales se seleccionaron 10 clones. Estos clones posteriormente se expandieron y, a partir de ellos, se purificó el ADN plasmídico. Se cuantificó la concentración de estas preparaciones de ADN plasmídico, determinando que eran de buena calidad (Abs 260/280 > 1,8) y concentración (70–110 ng/µL). Se enviaron a secuenciar 5 de los ADN plasmídicos obtenidos (C1, C2, C3, C7 y C9), cuyo perfil electroforético se muestran en la figura 5.3, junto al resto de los clones seleccionados. En la figura 5.4 se presenta el alineamiento que incluye las secuencias C1, C2, C7 y C9, excepto la C3, debido a su mala calidad. De las analizadas, únicamente la correspondiente al clon 1 (C1) tenía la mutación deseada (Y151F), que corresponde al cambio de base adenina (A) por timina (T).



Figura 5.3. Electroforesis en gel de agarosa del ADN plasmídico purificado de los clones obtenidos luego de la transformación de E. coli con el producto de la mutagénesis sitio-dirigida, para la obtención del mutante OH1^{Y151F}. De C1 a C10 se indican los ADN correspondientes a los 10 clones procesados. Se enviaron a secuenciar los clones 1, 2, 3, 7, 9.

WT	436 146	TAC TCC CTC AAA ACC TAC TAC GAG ATC CGG GAC 46 Tyr-Phe-Leu-Lys-Thr-Tyr-Tyr-Glu-Ile-Arg-Asp 15	8 6
	C1	TAC TCC CTC AAA ACC TTC TAC GAG ATC CGG GAC Tyr-Phe-Leu-Lys-Thr- <mark>Phe</mark> -Tyr-Glu-Ile-Arg-Asp	
	C2	TAC TCC CTC AAA ACC TAC TAC GAG ATC CGG GAC Tyr-Phe-Leu-Lys-Thr-Tyr-Tyr-Glu-Ile-Arg-Asp	
	С3	TAC TCC CTC AAA ACC TAC TAC GAG ATC CGG GAC Tyr-Phe-Leu-Lys-Thr-Tyr-Tyr-Glu-Ile-Arg-Asp	
	C4	TAC TCC CTC AAA ACC TAC TAC GAG ATC CGG GAC Tyr-Phe-Leu-Lys-Thr-Tyr-Tyr-Glu-Ile-Arg-Asp	

Figura 5.4. Alineamiento nucleotídico de las secuencias de los clones C1, C2, C7 y C9 para la obtención del mutante OH1^{Y151F} respecto a la secuencia del gen de OH1^{WT}. Se muestra parte del alineamiento, indicando los aminoácidos correspondiente a cada codón, y en rojo la base T que da lugar al cambio de aminoácido Tyr a Phe.

El proceso para obtener el mutante OH1^{Y152F} fue similar al método previamente descrito. En esta ocasión, se utilizó el producto de PCR de la mutagénesis (figura 5.1) para transformar células *E. coli* XL-1 quimiocompetentes. De los 5 clones seleccionados y enviados a Macrogen para su secuenciación, solo uno presentó la mutación deseada Y152F (figura 5.5).

WT	436 146	TAC TCC CTC AAA ACC TAC TAC GAG ATC CGG GAC 46 Tyr-Phe-Leu-Lys-Thr-Tyr-Tyr-Glu-Ile-Arg-Asp 15	,8 ;6
	C1.1	TAC TCC CTC AAA ACC TAC TAC GAG ATC CGG GAC Tyr-Phe-Leu-Lys-Thr-Tyr-Tyr-Glu-Ile-Arg-Asp	
	C1.2	TAC TCC CTC AAA ACC TAC TTC GAG ATC CGG GAC Tyr-Phe-Leu-Lys-Thr-Tyr <mark>-Phe</mark> -Glu-Ile-Arg-Asp	
	C1.3	TAC TCC CTC AAA ACC TAC TAC GAG ATC CGG GAC Tyr-Phe-Leu-Lys-Thr-Tyr-Tyr-Glu-Ile-Arg-Asp	
	C1.4	TAC TCC CTC AAA ACC TAC TAC GAG ATC CGG GAC Tyr-Phe-Leu-Lys-Thr-Tyr-Tyr-Glu-Ile-Arg-Asp	
	C1.5	TAC TCC CTC AAA ACC TAC TAC GAG ATC CGG GAC Tyr-Phe-Leu-Lys-Thr-Tyr-Tyr-Glu-Ile-Arg-Asp	

Figura 5.5. Alineamiento nucleotidico de las secuencias de los clones C1.1, C1.2, C1.3, C1.4, C1.5 para la obtención del mutante OH1^{Y152F} respecto a la secuencia del gen de OH1^{WT}. Se muestra parte del alineamiento, indicando los aminoácidos correspondientes a cada codón, y en rojo la base T que da lugar al cambio de aminoácido Tyr a Phe.

Como fue descrito anteriormente, ya disponíamos de los plásmidos que contienen los genes codificantes para OH1^{WT}, así como para los mutantes OH1^{C15S} y OH1^{C112S}. Además de estos, se utilizaron los mutantes en tirosina generados en la tesis para la producción de las respectivas proteínas recombinantes: OH1^{WT}, OH1^{C15S}, OH1^{C112S}, OH1^{Y151F} y OH1^{Y152F}.

5.1.2 Producción de las variantes de OHI como proteínas recombinantes

Los plásmidos conteniendo las diferentes variantes de OH1 se utilizaron en la transformación de *E. coli* BL21(DE3)Star, como se describió en el punto 4.2.4. Se purificaron las proteínas de interés usando inicialmenteme una primera IMAC (IMAC1), la cual fue seguida de una diálisis, eliminación del His-tag mediante la proteasa TEV_{SH} y una segunda IMAC (IMAC-2). Finalmente, se realizó una etapa adicional de purificación por SEC.

En la figura 5.6 A, se incluye un análisis por SDS-PAGE de las muestras provenientes de la purificación de OH1^{WT}. En el primer gel, correspondiente al análisis de las muestras luego de la IMAC-1, se observa el perfil del *pool* de la elución con imidazol (carril E) donde se detecta una banda principal que se corresponde con el monómero de OH1^{WT} con His-tag (25 kDa), indicada con la flecha violeta. Por otro lado, en el carril D, se aprecia el perfil de la digestión de la muestra anterior con la proteasa TEV_{SH} (flecha verde). En este se puede notar una nueva banda que concuerda con OH1^{WT} sin His-tag (flecha negra) y restos de OH1^{WT} sin digerir. El tiempo de digestión con la proteasa se extendió de manera de aumentar la cantidad de fosfatasa digerida con TEV_{SH}. En el segundo gel, se muestra el perfil de las muestras correspondientes a la IMAC-2, cuyo objetivo es remover la OH1^{WT} que aún cuenta con el His-tag (no digerida), el His-tag liberado de la OH1^{WT}

digerida y la proteasa TEV_{SH} que cuenta con un His-tag. En el primer y segundo carril se observa el perfil del percolado (FT) y un lavado representativo (L), observándose una banda del tamaño esperado, correspondiente a OH1^{WT} sin His-tag. A su vez, en el carril E se muestra el perfil proteico de la elución de la segunda IMAC, que retuvo la proteasa TEV_{SH} (flecha verde), los restos de OH1^{WT} con His-tag y el His-tag removido por la TEV_{SH} (flecha naranja). Además, en este eluído se aprecian restos de OH1^{WT} sin His-tag (flecha negra), lo que podría indicar que el lavado de la matriz no fue suficiente. Alternativamente, podrían existir otras histidinas expuestas en OH1 que permitan explicar la retención parcial de la proteína en la matriz de la IMAC-2, incluso tras la eliminación del His-tag.



Figura 5.6. *Purificación de OH1^{WT}*. **A)** Se muestra la imagen del SDS-PAGE al 12 % donde se migraron las muestras correspondientes a los diferentes pasos de purificación de la fosfatasa OH1^{WT}. En el primer gel se sembró el *pool* de eluciones obtenido luego de la primer IMAC y la digestión con la proteasa TEV_{SH} (D). En el segundo gel se sembraron las muestras correspondientes a la segunda IMAC: el percolado (FT), un lavado (L) representativo de los 10 lavados realizados, y la elución (E). En todos los casos se sembró en cada carril 15 µL de muestra diluida en tampón de carga (7,5 µL de muestra sin diluir + 7,5 µL de tampón de carga 2X) y 5 µL del PM. Las flechas indican en verde la proteasa TEV_{SH}, en violeta el monómero de OH1^{WT} con Histag, en negro el monómero de OH1^{WT} sin His-tag y en naranja el His-tag. **B)** Cromatograma de exclusión molecular mostrando la absorbancia (mAu) a 280 nm en función del volumen de elución (mL). Se indican con flechas el pico de elución conteniendo OH1^{WT} (90,8 mL) y el pico correspondiente a al imidazol remanente en la muestra. En el inserto se incluye un gel SDS-PAGE mostrando el perfil proteico del pico conteniendo a OH1^{WT} (principalmente el monómero).

Los residuos de histidina muestran una fuerte afinidad hacia las matrices de iones metálicos, debido a la presencia de un anillo de imidazol que actúa como un grupo donante de electrones, facilitando así la formación de enlaces coordinados con los iones metálicos (Bonner, 2019). De hecho, al analizar la secuencia primaria de OH1, se observa que esta contiene cuatro histidinas por monómero (His³⁴, His⁷⁶, His¹¹¹, e His¹²⁹). Además, al emplear el programa PyMOL para analizar las estructuras terciaria y cuaternaria de OH1, se pudo constatar que tres de estas histidinas (His³⁴, His⁷⁶, e His¹²⁹) están expuestas hacia la superficie en cada monómero (figura 5.7). En un futuro, sería necesario agregar etapas adicionales de lavado después de la IMAC2, y/o incluir una baja concentración de imidazol que compita por la unión inespecífica de OH1 con la matriz.



Figura 5.7. *Histidinas presentes en el dímero de OH1.* Se muestra la estructura del dímero de OH1 en diagrama de cintas y en superficie. Los monómeros de OH1 se colorearon cada uno en celeste y amarillo, indicándose las histidinas en barras, coloreando en rojo la superficie que estas ocupan (His³⁴, His⁷⁶, His1²⁹ e His¹¹¹). La imagen fue generada con el programa The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.4.5, Schrödinger, LLC.

La figura 5.6 B muestra el último paso de purificación por SEC, que permitió verificar la masa nativa de OH1^{WT}. En este cromatograma se observó un pico de elución que contiene a OH1^{WT} a 91 mL, equivalente a una masa nativa de aproximadamente 40 kDa. Estos resultados concuerdan con los reportes previos de nuestro grupo, donde la OH1^{WT} forma un dímero en solución. Al final del cromatograma se observa un segundo pico, correspondiente a restos de imidazol que no fueron completamente eliminados durante la diálisis posterior a la IMAC-1. Se muestra también el perfil proteico de la OH1^{WT} purificada luego de un SDS-PAGE, mostrando una banda principal correspondiente al monómero de OH1^{WT} (flecha negra) y la presencia de dímero de OH1^{WT} (flecha roja) que, a pesar de haber preparado la muestra en condiciones reductoras, igualmente se formó. Esto ya ha sido observado por el grupo, y la única manera de prevenir la aparición del dímero ha sido mediante la alquilación previa de las cisteínas de OH1 con iodiacetamina, de manera de evitar la formación de puentes disulfuro (Segovia et al., 2017).

Luego de todos los pasos de purificación se obtuvieron 6 mg de OH1^{WT}, lo que corresponde a 0,4 mg/g de peso húmedo de células (ver tabla en Apéndice 8.1). Este valor es aproximadamente 8 veces menor al obtenido anteriormente por el grupo. Esta diferencia podría explicarse por la alta precipitación inesperada observada durante esta purificación, específicamente durante la diálisis y la digestión con TEV, que correspondió al 69 % de la proteína obtenida luego de la IMAC-1.

Para la purificación del mutante OH1^{C15S}, se procedió de la misma forma que para OH1^{WT}. Como ya se describió en los antecedentes, en OH1^{WT}, la Cys¹⁵ contribuye a la estabilización del dímero en solución mediante la formación de un puente disulfuro entre los monómeros de la proteína (Segovia et al., 2017). La figura 5.8 A, muestra un primer gel correspondiente a la IMAC-1 obtenido durante la purificación de OH1C15S. En el carril E, se observa el perfil del pool de elución de la IMAC-1, destacándose una banda intensa correspondiente al monómero de OH1^{c155} con His-tag (25 kDa), señalado con una flecha violeta. Además, mediante una flecha roja, se señala una banda menos intensa que se corresponde con un dímero de OH1. La presencia de este dímero no era esperable debido a la ausencia de la Cys¹⁵ y la utilización de condiciones reductoras durante la preparación de la muestra. No obstante, la experiencia del grupo indica que estas estructuras dimerizadas pueden generarse durante la preparación de la muestra para la SDS-PAGE. En estas condiciones desnaturalizantes, se exponen otras cisteínas de los monómeros de OH1. Estas pueden reaccionar entre sí, formando puentes disulfuro y dando lugar a dímeros artefactuales. OH1 cuenta con cuatro cisteínas (Cys¹⁵, Cys⁵⁷, Cys¹¹², y Cys¹⁷⁷). En el carril D, donde se sembró la digestión con TEV de lo eluído en la IMAC-1, se observa una banda principal correspondiente a OH1^{C15S} sin His-tag y restos de OH1^{C15S} sin digerir. El segundo gel SDS-PAGE de la figura muestra el resultado de la IMAC-2, observándose en el FT y en el lavado una banda principal correspondiente al monómero de OH1^{C15S} sin His-tag, como se esperaba. En el FT, también se notan restos de OH1^{C15S} sin digerir, lo que indica que la cantidad de matriz IMAC-2 utilizada en este caso no fue suficiente para eliminar completamente la proteína con el His-tag. Para experimentos futuros, se podría mejorar la calidad de esta muestra realizando una tercera IMAC. El perfil proteico de la elución de la matriz IMAC-2 (E) muestra que se logró remover la TEV_{SH}, el His-tag y parte de la OH1 sin digerir.

Al igual que con OH1^{WT}, el último paso de purificación por SEC permitió verificar la masa nativa de OH1^{C15S} (figura 5.8 B). En este cromatograma, se observó un pico de elución que contiene a OH1^{C15S} a 92 mL, equivalente a una masa nativa de aproximadamente 40 kDa. Además, hacia el final del cromatograma, se detectó un segundo pico correspondiente a restos de imidazol que no fueron completamente eliminados durante la diálisis posterior a la IMAC-1. También se muestra el perfil proteico de la OH1^{C15S} purificada luego de un SDS-PAGE, evidenciando tres bandas: una conteniendo al monómero de OH1^{C15S} sin His-tag (flecha negra), otra conteniendo los restos de OH1^{C15S} con His-tag (flecha violeta) y, una tercera banda, de mayor peso molecular, correspondiente a dímeros artefactuales de OH1^{C15S} (flecha roja). Luego de todos los pasos de purificación, se obtuvo un rendimiento de 0,1 mg/g de peso húmedo de células (ver tabla en Apéndice 8.1).

Basándonos en los resultados de la SEC, el mutante OH1^{C15S} es un dímero en solución, no un monómero como habríamos esperado. Esto es inesperado, ya que al no estar presente la Cys¹⁵, que forma el puente disulfuro, cabría esperar que el dímero se disociara. Esto va en consonancia con la estructura cristalográfica resuelta por nuestro grupo del doble mutante OH1^{C112S/C15S}, dónde se observa que en ausencia de la Cys¹⁵ el dímero se estabiliza mediante la misma interfase que en OH1^{C112S}, pero en este caso mediante interacciones no covalentes, principalmente hidrofóbicas (resultados no publicados y Segovia et al., 2017).



Figura 5.8. *Purificación de OH1^{C15S}.* **A)** Se muestra la imagen del SDS-PAGE al 12 %, donde se migraron muestras correspondientes a los diferentes pasos de purificación de la fosfatasa OH1C15S. En el primer gel se sembró el *pool* de eluciones obtenido luego de la primera IMAC y la digestión con la proteasa TEV_{SH} (D). En el segundo gel se sembraron las muestras correspondientes a la segunda IMAC: el percolado (FT), un lavado (L) representativo de los 10 lavados realizados, y la elución (E). En todos los casos se sembró en cada carril 15 µL de muestra diluida en tampón de carga (7,5 µL de muestra sin diluir + 7,5 µL de tampón de carga 2X) y 5 µL del marcador de masa molecular. Las flechas indican en rojo el dímero de OH1^{C15S}, en violeta el monómero de OH1^{WT} con His-tag, en negro el monómero de OH1^{C15S} sin His-tag, en naranja el His-tag y en verde la proteasa TEV_{SH}. **B)** Cromatograma de la SEC mostrando la absorbancia (mAu) a 280 nm en función del volumen de elución (mL). Se indican con flechas el pico de elución conteniendo OH1^{C15S} (92 mL) y el pico correspondiente a al imidazol remanente en la muestra. En el inserto se incluye un gel SDS-PAGE mostrando el perfil proteico del pico conteniendo a OH1^{C15S} (principalmente el monómero).

En la figura 5.9 A, se muestran los geles SDS-PAGE al 12 % correspondientes a la IMAC-1 e IMAC-2 de la purificación de la fosfatasa mutante en la cisteína catalítica OH1^{C1125}. En este caso, y a modo de resumen, se logró obtener OH1^{C1125} sin Histag. Además, de manera similar a lo ocurrido durante la purificación de OH1^{WT}, luego de la IMAC-2 se observaron restos de OH1 sin His-tag que quedaron retenidos a la matriz. Como se discutió anteriormente, esto podría deberse a la presencia de algunas histidinas en la superficie de la proteína. La figura 5.9 B muestra el último paso de purificación por SEC que permitió verificar la masa nativa de OH1^{C1125}. En este cromatograma se observó un pico de elución que contiene a OH1^{C1125} a 92 mL, equivalente a una masa nativa del dímero ~40 kDa. En este caso, la eliminación del imidazol en la diálisis fue más eficiente, ya que el segundo pico correspondiente al imidazol casi no se observa. También se muestra el perfil proteico de la OH1^{C1125} purificada luego de un SDS-PAGE, mostrando dos bandas. Una banda principal correspondiente al monómero de OH1^{C1125} sin His-tag (flecha negra) y una última banda de mayor peso molecular que se corresponde con dímeros artefactuales de OH1^{C1126} (flecha roja). Luego de todos los pasos de purificación se obtuvo un rendimiento de 0,3 mg/g de peso húmedo de células (ver tabla en Apéndice 8.1).



Figura 5.9. *Purificación de OH1^{C112S}*. **A)** Se muestra la imagen del SDS-PAGE al 12 %, donde se migraron muestras correspondientes a los diferentes pasos de purificación del mutante OH1^{C112S}. En el primer gel se sembró el pool de eluciones obtenido luego de la primera IMAC y la digestión con la proteasa TEV_{SH} (D). En el segundo gel se sembraron las muestras correspondientes a la segunda IMAC: el percolado (FT), un lavado (L) representativo de los 10 lavados realizados, y la elución (E). En todos los casos se sembró en cada carril 15 µL de muestra diluida en tampón de carga (7,5 µL de muestra sin diluir + 7,5 µL de tampón de carga 2X) y 5 µL del marcador de masa molecular. Las flechas indican en rojo el dímero de OH1^{C15S}, en verde la proteasa TEV_{SH}, en violeta el monómero de OH1^{WT} con His-tag, en negro el monómero de OH1^{C15S} sin His-tag y en naranja el His-tag. **B)** Se muestra el cromatograma de exclusión molecular mostrando la absorbancia (mAu) a 280 nm en función del volumen de elución (mL). Se indican con flechas el pico del volumen de elución para OH1^{C112S} (92,3 mL) y el pico correspondiente a restos de imidazol. En el inserto se incluye un gel SDS-PAGE mostrando el perfil proteico del pico conteniendo a OH1^{C15S} (principalmente el monómero).

En la figura 5.10 y 5.11 se muestran los resultados de la purificación los mutantes OH1^{Y151F} y OH1^{Y152F}, respectivamente, utilizando los mismos códigos descritos en las figuras previas. En ambos casos, la SEC muestra que estos mutantes son dímeros en solución, al igual que OH1^{WT}. Asimismo, como ocurrió en la purificación para OH1^{C15S}, el perfil de SDS-PAGE indica que la muestra obtenida no es homogénea y contiene aún restos de la fosfatasa mutante con His-tag. A futuro, a las muestras que presentaron contaminación con OH1 con His-tag se les deberá realizar una tercera IMAC.

Además, en la purificación de OH1^{Y151F} y OH1^{Y152F} se obtuvo un bajo rendimiento, siendo este de 0,05 y 0,08 mg proteína/g de peso húmedo de células, respectivamente (ver tabla en Apéndice 8.1). Este resultado se atribuye a un alto grado de precipitación observado durante la diálisis, efectuada para disminuir la concentración de imidazol y la digestión con la TEV. Para prevenir largas incubaciones en presencia de imidazol, que favorecen la precipitación, se propone evaluar la remoción del imidazol mediante una SEC (matriz G-25, columna PD-10) inmediatamente después de la elución de la IMAC-1, antes de proceder a la digestión con TEV.



Figura 5.10. *Purificación de OH1*^{Y151F}. **A)** Se muestra la imagen del SDS-PAGE al 12 %, donde se migraron muestras correspondientes a los diferentes pasos de purificación del mutante OH1^{Y151F}. En el primer gel se sembró el pool de eluciones obtenido luego de la primera IMAC y la digestión con la proteasa TEV_{SH} (D). En el segundo gel se sembraron las muestras correspondientes a la segunda IMAC: el percolado (FT), un lavado (L) representativo de los 10 lavados realizados, y la elución (E). En todos los casos se sembró en cada carril 15 µL de muestra diluida en tampón de carga (7,5 µL de muestra sin diluir + 7,5 µL de tampón de carga 2X) y 5 µL del marcador de masa molecular. Las flechas indican en rojo el dímero de OH1^{Y151F}, en verde la proteasa TEV_{SH}, en violeta el monómero de OH1^{Y151F} con His-tag, en negro el monómero de OH1^{Y151F} sin His-tag y en naranja el His-tag. **B)** Se muestra el cromatograma de exclusión molecular mostrando la absorbancia (mAu) a 280 nm en función del volumen de elución (mL). Se indican con flechas el pico del volumen de elución para OH1^{Y151F} (91,6 mL) y el pico correspondiente a restos de imidazol. En el inserto se incluye un gel SDS-PAGE mostrando el perfil proteico del pico conteniendo a OH1^{Y151F} (principalmente el monómero).



Figura 5.11. *Purificación de OH1*^{Y152F}. **A)** Se muestra la imagen del SDS-PAGE al 12 %, donde se migraron muestras correspondientes a los diferentes pasos de purificación del mutante OH1^{Y152F}. En el primer gel se sembró el pool de eluciones obtenido luego de la primera IMAC y la digestión con la proteasa TEV_{SH} (D). En el segundo gel se sembraron las muestras correspondientes a la segunda IMAC: el percolado (FT), un lavado (L) representativo de los 10 lavados realizados, y la elución (E). En todos los casos se sembró en cada carril 15 μL de muestra diluida en buffer de carga (7,5 μL de muestra sin diluir + 7,5 μL de buffer de carga 2X) y 5 μL del marcador de masa molecular. Las flechas indican en rojo el dímero de OH1^{Y152F}, en verde la proteasa TEV_{SH}, en violeta el monómero de OH1^{Y151F} con His-tag, en negro el monómero de OH1^{Y152F} sin His-tag y en naranja el His-tag. **B)** Se muestra el cromatograma de exclusión molecular mostrando la absorbancia (mAu) a 280 nm en función del volumen de elución (mL). Se indican con flechas el pico del volumen de elución para OH1^{Y151F} (91,6 mL) y el pico correspondiente a restos de imidazol. En el inserto se incluye un gel SDS-PAGE mostrando el perfil proteico del pico conteniendo a OH1^{Y152F} (principalmente el monómero).

5.1.3 Caracterización de la actividad fosfatasa de las variantes de OHI obtenidas

Para estudiar la actividad fosfatasa de OH1, se efectuaron análisis cinéticos con el sustrato artificial pNPP, el cual es hidrolizado enzimáticamente liberando fosfato inorgánico (P_i) y para-nitrofenol (pNP). Este último, de color amarillo, fue detectado midiendo su absorbancia a 405 nm. Para determinar la concentración de pNP producido, se aplicó la ley de Lambert-Beer: $A = \varepsilon cl$. Con este fin, en primer lugar, se determinó el coeficiente de extinción molar (ε_{405}) del pNP por el camino óptico (*l*). Para ello, se efectuó un ensayo en el cual se determinó la absorbancia a 405 nm de diferentes concentraciones de pNP y se hizo un ajuste lineal de los resultados. La pendiente de la recta obtenida fue de 11.660 M⁻¹ (figura 5.12 A). Esto permitió expresar la actividad fosfatasa en términos de la concentración de pNP formado por unidad de tiempo. A modo de ejemplo, la figura 5.12 B muestra un gráfico representando la concentración de pNP en función del tiempo, utilizando 20 mM del sustrato pNPP, tanto en presencia como en ausencia de la fosfatasa OH1^{WT}. A partir de gráficos como este, se obtuvieron las velocidades iniciales (V_o) para un rango de concentraciones de sustratos de 1 a 20 mM. Tal como lo había evidenciado anteriormente el grupo, la fosfatasa OH1^{WT} presenta una cinética de Michaelis-Menten (Segovia et al., 2017). En este caso, el lote generado de OH1^{WT} presentó una K_M de 16,7 mM, una V_{máx} de 1,0 μ mol pNP·min⁻¹ y una k_{cat} de 0,04 s⁻¹ (figura 5.12 C). Al comparar los valores de K_M y de k_{cat} con los obtenidos previamente para otro lote de OH1^{WT} purificada por el grupo (Segovia et al., 2017), se observó que el lote actual tiene una K_M seis veces mayor y una k_{cat} que es la mitad de la previamente reportada (K_M de 2,6 mM, k_{cat} de 0,08 s⁻¹). Según Michaelis-Menten, en condiciones donde la concentración de sustrato es menor a la K_M, la K_M indica la afinidad de la enzima por el sustrato (Voet & Voet, 2011). Así, una K_M baja sugiere una alta afinidad de la enzima por el sustrato, mientras que una K_M alta sugiere una menor afinidad de la enzima por el sustrato. De este modo, el aumento de la K_M del nuevo lote de OH1^{WT} respecto al anterior producido en el laboratorio indicaría que en este caso disminuyó la afinidad de la enzima por el sustrato. Por otro lado, la k_{cat} representa el número de moles de sustrato transformados por segundo por sitio activo de la enzima en las condiciones de la reacción. Por lo cual, una disminución de la *k*_{cat} indica que la OH^{WT} producida no es tan eficiente como el lote anterior. De hecho, la actividad específica de la OH1^{WT} (0,11 UE/mg) fue la mitad de la obtenida para el lote anterior (0,23 UE/mg) (Segovia et al., 2017). Esta diferencia se podría explicar por una alteración estructural del sitio activo de la enzima, afectando a los residuos que participan en el reconocimiento del sustrato artificial, como a los que participan en la catálisis.

Una posibilidad es que la enzima producida en esta tesis pudo haberse alterado durante el proceso de purificación, especialmente durante los eventos de precipitación. Debido a que no se eliminó rápidamente el imidazol durante el proceso de diálisis, quedaron restos de este hasta la etapa final de la SEC, donde fue totalmente eliminado (pico 2 de la SEC, figura 5.10 C). Se ha reportado que el imidazol puede afectar a las proteínas debido a su naturaleza anfótera, es decir, que puede actuar como base o como ácido. Esta característica le permite interaccionar con los dipolos transitorios o permanentes presentes en las proteínas, pudiendo alterar la conformación de residuos relevantes (Staś et al., 2023).



Figura 5.12. Actividad fosfatasa de $OH1^{WT}$ con el sustrato artificial pNPP. **A**) Se muestra un gráfico de la absorbancia a 405 nm en función de la concentración de pNP. Se incluye la pendiente del gráfico, la cual representa el coeficiente de extinción molar (ε) del pNP determinado a 405 nm por el camino óptico (definido por el volumen de reacción de 300 µL colocado en la placa de 96 pocillos). **B**) Se muestra el gráfico de concentración de pNP en función del tiempo para OH1^{WT} y el ensayo control sin enzima, representativo de los ensayos de actividad realizados a 37 °C para el cálculo de las velocidades iniciales. En ese caso, en el ensayo se utilizó una concentración final (E_0) de 0,4 µM (9 µg/mL) y 20 mM del sustrato pNPP. En el gráfico se incluye la pendiente correspondiente a la actividad (V₀) utilizando 20 mM de pNPP. Se excluyeron los primeros 7 min del ensayo (puntos en rojo) debido a la presencia de una demora en la estabilización de la temperatura de la reacción (37 °C). **C**) Se presenta el gráfico de Michaelis-Menten para OH1^{WT} utilizando concentraciones de 1 a 20 mM de pNPP. Se incluye el ajuste a una hipérbola rectangular que permitió el cálculo de los parámetros cinéticos V_{máx} y K_M utilizando el programa GraphPad Prism versión 9.5.0. La k_{cat} se determinó mediante el cociente entre V_{máx} sobre E₀.

Para estudiar la actividad fosfatasa de OH1 de los diferentes mutantes generados se realizó un estudio cinético similar al realizado para $OH1^{WT}$. En la figura 5.13, se observa la velocidad (V_{0}) de las diferentes variantes de OH1 obtenidas al utilizar 20 mM del sustrato artificial pNPP. Como se esperaba, a diferencia de OH1^{WT}, el mutante inactivo OH1^{C112S} no fue capaz de catalizar la hidrólisis del pNPP. En este mutante, la Cys¹¹² catalítica, responsable del ataque nucleofílico al fosfosustrato, se sustituyó por una serina, la cual es incapaz de efectuar este ataque nucleofílico debido a que posee un grupo hidroxilo (-OH) en lugar de un grupo tiol (-SH). En el caso del mutante OH1^{C155}, que contiene la mutación de la cisteína responsable de la unión de los monómeros de OH1 a través de un puente disulfuro, se observó que la actividad disminuyó considerablemente (8,5 veces) en comparación con OH1^{WT} (figura 5.13). Esto resultó sorprendente, ya que con un lote previo de OH1^{C15S} no se había observado pérdida de actividad respecto a OH1^{WT}. Además, la estructura de OH1^{C15S}, resuelta por el grupo y aún no publicada, muestra que no presenta alteraciones en la estructura terciaria que puedan explicar esta pérdida de actividad. Por ende, es necesario realizar una nueva purificación optimizando las etapas en las cuales hubo dificultades para poder avanzar en el estudio de este mutante. En el caso de los mutantes OH1^{Y151F} y OH1^{Y152F}, donde se mutaron las tirosinas 151 y 152, residuos que suponemos son importantes para el reclutamiento de STAT1, también se observó una disminución en la actividad fosfatasa, siendo 4 veces menor a la observada respecto a OH1^{WT} (figura 5.13). En este caso no teníamos antecedentes, y supusimos que, si estas tirosinas participan en el reclutamiento de un sustrato proteico como STAT1 (previo a su desfosforilación), su ausencia no afectaría la actividad del mutante. Sin embargo, vimos una reducción de la actividad, evaluada con un sustrato no proteico que se une directamente en el sitio activo.



Figura 5.13. Actividad fosfatasa utilizando los diferentes mutantes obtenidos de OH1. El gráfico muestra la (V_o) obtenida para las diferentes variantes de OH1 (OH1^{WT}, mutantes OH1^{C112S}, OH1^{C15S}, OH1^{Y151F} y OH1^{Y152F}), utilizando 20 mM de pNPP, en las condiciones definidas para el ensayo de actividad fosfatasa, materiales y métodos sección 4.5.

Es necesario realizar nuevas purificaciones para estar seguros de este resultado, ya que durante las purificaciones realizadas observamos un alto grado de precipitación, lo que pudo haber afectado la calidad final de cada una de las proteínas purificadas. Además, como se describió anteriormente, a diferencia de OH1^{WT}, en el caso de los mutantes OH1^{Y151F}, OH1^{Y152F} y OH1^{C15S}, se detectó la presencia de restos de fosfatasa con His-tag en la muestra final de la purificación. En futuros ensayos, sería necesario evaluar el efecto del His-tag en la actividad de las diferentes variantes de OH1.

Otra posibilidad es que estas tirosinas sean relevantes para la catálisis o para mantener regiones de la estructura en su conformación correcta. Por tanto, su eliminación podría causar una disminución de la actividad fosfatasa detectada al usar el sustrato artificial pNPP. Sin embargo, utilizando el programa PyMOL, analicé la posición de las tirosinas 151 y 152 respecto al sitio activo de OH1, observando que ambas se encuentran en una hélice α distante a la Cys¹¹² catalítica a una distancia de 13,6 Å y 19,8 Å, respectivamente.

Por último, si bien el cambio realizado de tirosina a fenilalanina se hizo buscando no alterar la estructura de OH1, no se descarta que hayan ocurrido ciertas alteraciones en la estructura secundaria, y que estas hayan afectado la actividad fosfatasa. De hecho, en la figura 5.14, al analizar la estructura, vemos que la Tyr¹⁵² está en la hélice α 5 que se ubica en la interfase del dímero. Su cadena lateral interacciona formando un puente de hidrógeno con la Arg¹⁴, situada en la hélice α 1 del otro monómero de OH1 (figura 5.14 B), próxima a la Cys¹⁵ que estabiliza el dímero de OH1.

En la figura 5.14 A, se muestra la representación de la estructura coloreada según el factor B. Este factor describe el desplazamiento de las posiciones atómicas a partir de un valor medio (desplazamiento cuadrático medio) y se ha utilizado como herramienta para identificar regiones flexibles en las proteínas. Los factores B altos (en rojo) indican regiones más flexibles que la media, mientras que los factores B bajos (en azul) indican posiciones rígidas. A mayor flexibilidad, mayores desplazamientos y, en última instancia, menor densidad electrónica. Esto se debe a que los átomos de una cadena lateral flexible (u otras partes de la estructura) se distribuirán en un mayor volumen en el espacio, lo que conduce a una menor densidad por unidad de volumen. Como se puede apreciar en la figura, la hélice α 1 de la cadena A presenta un factor B bastante alto en comparación al resto de la estructura. Esta alta flexibilidad puede sugerir que la interacción entre la Tyr¹⁵² de la hélice α 5 de la cadena B y la Arg¹⁴ de la hélice α 1 de la cadena A es posible, a pesar de que la distancia entre estos residuos es de unos 4,5 Å (figura 5.14 B). En ausencia del grupo OH de la tirosina (al cambiar por fenilalanina) este puente de hidrógeno no se podrá realizar, por lo cual no podemos descartar que en el mutante OH1^{Y152F}

esta no se encuentra en la interfase del dímero como la Tyr¹⁵², y se encuentra estabilizada intramolecularmente formando un puente de hidrógeno con la Arg¹⁵⁵ (figura 5.14 C). La ausencia de dicha interacción en el mutante OH1^{Y151F} podría tener consecuencias en la estructura, que se traduzcan en un efecto en la actividad de la fosfatasa.

Las mutaciones con cambio de sentido pueden dar lugar a cambios en la estabilidad de la proteína. La energía libre de plegamiento ($\Delta G_{plegamiento}$) comúnmente se mide en kcal/mol, y el signo indica si una mutación es desestabilizante (signo negativo) o aumenta la estabilidad de la proteína (signo positivo). Utilizando el programa DynaMut2 (Rodrigues et al., 2020), se pudo predecir un valor para $\Delta\Delta G_{Y151F}$ de –1,61 kcal/mol, lo cual indica que el cambio de una tirosina a una fenilalanina en esa posición genera una desestabilización de la hélice α 5 de la cadena A, ya que la misma es estabilizada mediante un puente de hidrógeno con la Arg¹⁵⁵. En cuanto al mutante OH1^{Y152F}, se obtuvo un valor para $\Delta\Delta G_{Y152F}$ de –0,99 kcal/mol, lo cual indica que esta mutación es desestabilizante al igual que la mutación Y151F.

En un futuro sería interesante complementar el estudio de estos mutantes en tirosina de OH1, evaluando por cristalografía potenciales cambios estructurales en OH1 y los porcentajes de estructura secundaria por dicroísmo circular.

Resultados y Discusión



Figura 5.14. Regiones flexibles y residuos que podrían estar implicados en la estabilización de los monómeros de OH1. **A**) Se muestra la representación de la estructura, con una coloración según el factor B. El color rojo indica regiones más flexibles que la media, mientras que el color azul representa regiones rígidas de la proteína. **B**) Se presenta el detalle de los puentes de hidrógeno de 4,5 Å de distancia entre los residuos Tyr¹⁵² de la hélice α 5 de la cadena B y la Arg¹⁴ de la hélice α 1 de la cadena A. **C**) Se observa la proximidad de los residuos Tyr¹⁵¹ y Arg¹⁵⁵ de la hélice α 5 de la cadena A.

5.1.4 Ensayos de fosforilación in vitro de STATI y OHI

Según los antecedentes descritos en la introducción, un potencial sustrato fisiológico de la fosfatasa viral OH1 es el factor de transcripción STAT1, fosforilado en la Tyr⁷⁰¹. Para poder evaluar in vitro la actividad de OH1 sobre STAT1, es importante contar con dicho sustrato. Se optó por obtener a STAT1 de forma comercial, ya que durante la tesis no fue posible obtenerla a partir de los grupos que han trabajado con ella. Sin embargo, la STAT1 obtenida no se encontraba fosforilada, por lo cual se realizaron ensayos de fosforilación utilizando la quinasa comercial JAK1. JAK1 es la quinasa responsable de su fosforilación a nivel celular durante la activación de la vía JAK-STAT (Hu et al., 2021). Esta estrategia es más adecuada que hacerlo mediante un extracto celular de HeLa, como fue reportado previamente (Cengel et al., 1999), ya que al utilizar JAK1 recombinante, nos aseguramos una fosforilación dirigida y específica hacia el residuo de interés: la Tyr⁷⁰¹ de STAT1. Además, dado que la JAK1 comercial viene fusionada a un tag de glutatión S-transferasa (GST), es fácilmente removible de la reacción utilizando una matriz de afinidad (glutatión sefarosa). En la figura 5.15 se muestra el resultado de un ensayo in vitro de fosforilación de STAT1 revelado utilizando un anticuerpo contra la forma fosforilada de STAT1 (anti-STAT1 p-Tyr⁷⁰¹) y contra STAT1 total (anti-STAT1 total). Se observa la clara fosforilación de STAT1 por JAK1 en las condiciones del ensayo, logrando fosforilar la Tyr⁷⁰¹ en un 80 % del STAT1 presente en la reacción. En dicha figura se observan las dos isoformas esperadas de STAT1, ambas fosforiladas. En la mayoría de las células y tejidos, STAT1 ha sido detectada en dos isoformas, producto del splicing alternativo: STAT1α (91 kDa) y STAT1β (84 kDa). STAT1α, que representa la forma mayoritaria de STAT1, posee dos sitios de fosforilación (Tyr⁷⁰¹ y Ser⁷²⁷). En cambio, la isoforma STAT1β, truncada en el extremo C-terminal, no posee parte del dominio de transactivación (TAD), y, por lo tanto, contiene solamente a Tyr⁷⁰¹ (Semper et al., 2014). La isoforma β ha sido reportada como transcripcionalmente inactiva, pero trabajos más recientes en ratones genéticamente modificados han demostrado que la isoforma β de STAT1 es capaz de inducir la expresión de ciertos genes, aunque de una forma menos eficiente que la isoforma α más abundante (Parrini et al., 2018).



Figura 5.15. *Fosforilación in vitro de STAT1 con JAK1.* **A)** Membranas de WB utilizando el anticuerpo contra la forma fosforilada de STAT1, en la Tyr⁷⁰¹. Se muestra STAT1 incubada en presencia de JAK1 (+JAK1) y en ausencia de JAK1 (-JAK1). La reacción se llevó a cabo utilizando una la relación E:S de 1:7 en un volumen final de 25 µL, a 30 °C durante 30 min. Para detener la reacción se agregaron 5 µL de tampón de carga 5X y se incubó por 6 min a 96 °C, luego se separaron las proteínas por SDS-PAGE y se procedió a realizar el WB. **B)** WB utilizando las misma membrana que en (A) pero reveladas con el anticuerpo anti-STAT1 total. Las imágenes se analizaron con ImageJ (Schneider et al., 2012) determinándose el porcentaje de STAT1 fosforilada respecto a STAT1 total.

Según nuestra hipótesis, en una fase inicial, OH1 recluta al dímero paralelo de STAT1 mediante una tirosina fosforilada que interactúa con el dominio SH2 de uno de los monómeros de STAT1. Los resultados de simulaciones de interacción molecular indican que las posibles tirosinas fosforiladas de OH1 son la Tyr¹⁵¹ o la Tyr¹⁵², lo cual requeriría la fosforilación de OH1 mediante una quinasa. Sin embargo, aún desconocemos qué quinasa específica está llevando a cabo esta fosforilación en OH1. En el contexto de los poxvirus, como el VACV, existe una quinasa viral denominada F10. Esta quinasa es conocida por fosforilar residuos de tirosina, esta incorporada en el núcleo de la partícula viral y es esencial en la morfogénesis viral (Derrien et al., 1999; Wang & Shuman, 1995). Aunque se ha identificado un sustrato viral de esta quinasa (la proteína A17 de VACV), no podemos descartar la posibilidad de que también afecte a la homóloga de OH1 en VACV (VH1). Para verificar esto se requerirán estudios adicionales, como experimentos de captura de sustrato con OH1 y extractos virales para determinar si la homóloga de F10 en ORFV puede interactuar con OH1. Será interesante evaluar si esta quinasa puede fosforilar OH1 en presencia de ATP, observando la fosforilación mediante WB, e identificando el sitio específico mediante espectrometría de masas. Incluso si los resultados son alentadores, se podría producir de manera recombinante la quinasa homóloga de F10 en ORFV y llevar a cabo pruebas de interacción y fosforilación con OH1^{WT} y los mutantes en las tirosinas de interés. Otra posibilidad es que sea fosforilada por una quinasa eucariota, por lo cual nos pareció pertinente evaluar si la quinasa JAK1 era capaz de fosforilar a OH1. En la figura 5.16 A se observa que efectivamente, en las condiciones *in vitro* utilizadas, JAK1 es capaz de fosforilar a OH1^{WT}. Sin embargo, no podemos afirmar que se esté fosforilando en las tirosinas deseadas, ya que OH1 cuenta con 9 tirosinas. Futuros ensayos de espectrometría de masas esperamos permitan identificar los sitio de fosforilación de OH1. Para evaluar si la fosforilación era específica de la Tyr¹⁵¹ o Tyr¹⁵², también evaluamos la fosforilación por JAK1 de los mutantes puntuales de OH1 en la Tyr¹⁵¹ o la Tyr¹⁵² (figura 5.16 B). El resultado del WB muestra que estas variantes de OH1 también fueron fosforiladas indicando que, en las condiciones ensayadas, JAK1 es capaz de fosforilar numerosas tirosinas, incluyendo otras distintas a la Tyr¹⁵¹ y Tyr¹⁵². Esto puede deberse a que se utilizó una relación enzima:sustrato de 1:7, lo que pudo favorecer la fosforilación inespecífica de numerosas tirosinas. En un futuro, sería interesante realizar ensayos de fosforilación en tiempos cortos utilizando relaciones enzima:sustrato 1:100 o mayores. Esto ayudaría a evitar la fosforilación inespecífica



Figura 5.16. *Fosforilación in vitro de la fosfatasa viral OH1 con JAK1.* **A)** SDS-PAGE y WB de OH1^{WT} utilizando el anticuerpo anti p-Tyr, incubada en ausencia (OH1) y presencia de JAK1 (OH1+JAK1). La reacción se llevó a cabo utilizando una la relación E:S de 1:7 en un volumen final de 25 µL, a 30 °C durante 30 min. Para detener la reacción se agregaron 5 µL de tampón de carga 5X y se incubó por 6 min a 96 °C, luego se separaron las proteínas por SDS-PAGE y en paralelo se procedió a realizar el WB. **B**) WB mostrando la fosforilación de los mutantes de OH1^{Y151F} y OH1^{Y152F}. En este caso se muestra la cinética de fosforilación en iguales condiciones de reacción que las utilizadas en el ensayo con OH1^{WT}. En la membrana de WB se observa además de OH1 fosforilada en tirosina, la fosforilación en tirosina de la quinasa JAK1 necesaria para que esta enzima sea activa. Las flechas verdes indican el monómero de OH1, y las flechas en negro la JAK1 y las flechas rojas podría corresponder al dímero de OH1 o algún contaminante remanente que se fosforiló.

5.2 Resultados asociados al segundo objetivo

En esta etapa, se examinó la importación nuclear de STAT1 en células HeLa expresando variantes de OH1. Para este propósito, se generaron previamente mutantes del gen OH1 en las tirosinas 151 y 152 (OH1^{Y151F} y OH1^{Y152F}) los cuales se clonaron en el plásmido pHSV-IRES-EGFP. Además, se incorporaron los plásmidos que contenían el gen de la fosfatasa OH1^{WT} y el mutante inactivo en la cisteína catalítica (OH1^{C112S}), obtenidos durante la tesis de maestría de Darío Porley.

5.2.1 Introducción de las variantes de OHI en el vector pHSV-IRES-EGFP

Para la obtención de los vectores plasmídicos necesarios para la expresión en células HeLa, se realizó el subclonaje de los genes OH1^{Y151F} y OH1^{Y152F} en el plásmido pHSV-IRES-EGFP, siguiendo el protocolo descrito en 4.1.6. A partir del gen de OH1^{Y151F} y OH1^{Y152F} clonado en pET28a, se realizó una PCR con cebadores que insertaron el sitio de restricción de la enzima HindIII. En la figura 5.17 A se muestran los productos de amplificación obtenidos para ambos genes, de aproximadamente 550 pb. Estos productos y el pHSV-IRES-EGFP fueron digeridos, ligados y expandidos en *E. coli*. Se seleccionaron 5 colonias al azar correspondientes a cada mutante, realizando los minicultivos correspondientes y obteniéndose los plásmidos pHSV-IRES-EGFP recombinantes con un alto grado de pureza (Abs 260 nm/280 nm > 1,8) y concentración (92–123 ng/µL). Para evaluar la presencia de clones positivos y su correcta inserción, se realizó una digestión con las enzimas SalI y EcoRI. La figura 5.17 muestra el perfil electroforético correspondiente a la digestión con dichas enzimas de restricción, obteniéndose 3 construcciones correctas tanto para pHSV-IRES-EGFP-OH1^{Y151F} como para pHSV-IRES-EGFP-OH1^{Y151F} (panel B y C, respectivamente).



Figura 5.17. *Subclonado del gen OH1*^{Y151F} *y OH1*^{Y152F} *en el plásmido pHSV-IRES-EGFP.* **A)** Electroforesis en geles de agarosa de los amplicones de OH1^{Y151} *y* OH1^{Y152} digeridos con HindIII. PM: GeneRuler 1 kb ladder. Carril 1: amplicon correspondientes a OH1^{Y152F} Carril 2: amplicón correspondientes a OH1^{Y151F}. Carril 3: pHSV-IRES-EGFP digerido y desfosforilado. **B)** Patrón de digestión del ADN de cinco clones OH1^{Y151F} tratados con las enzimas de restricción Sall y EcoRI resuelto en una electroforesis en gel de agarosa al 1 %. En rojo se destacan los clones con el inserto en la orientación correcta. PM: GeneRuler 1 kb ladder. Carriles 1–5: Patrón de digestión con Sall y EcoRI del plásmido pHSV-OH1^{Y151F}-IRES-EGFP. Carril 6: Control de plásmido pHSV-IRES-EGFP sin digerir. **C)** Patrón de digestión del ADN de cinco clones OH1^{Y152F} tratados con las enzimas de restricción Sall y EcoRI resuelto en una electroforesis en una electroforesis en gel de agarosa al 1 %. En rojo se destacan los clones con enzima EcoRI. Carril 8: Control de plásmido pHSV-IRES-EGFP sin digerir. **C)** Patrón de digestión del ADN de cinco clones OH1^{Y152F} tratados con las enzimas de restricción Sall y EcoRI resuelto en una electroforesis en gel de agarosa al 1 %. En rojo se destacan los clones con el inserto en la orientación correcta. PM: GeneRuler 1 kb ladder. Carril 7: Control digestión con enzima EcoRI. Carril 8: Control de plásmido pHSV-IRES-EGFP sin digerir. **C)** Patrón de digestión del ADN de cinco clones OH1^{Y152F} tratados con las enzimas de restricción Sall y EcoRI resuelto en una electroforesis en gel de agarosa al 1 %. En rojo se destacan los clones con el inserto en la orientación correcta. PM: GeneRuler 1 kb ladder. Carriles 1–5: Patrón de digestión con Sall y EcoRI del plásmido pHSV-OH1^{Y152F}-IRES-EGFP. Carril 6: Control de plásmido pHSV-IRES-EGFP digerido con enzima Sall. Carril 7: Control digestión con enzima EcoRI. Carril 8: Control de plásmido pHSV-IRES-EGFP sin digerir.

Primero, se verificó la secuencia de OH1 en los plásmidos mediante un perfil de restricción para confirmar la correcta inserción. Posteriormente, estas muestras fueron enviadas a Macrogen Corea para su secuenciación. Una vez obtenidas las secuencias, se realizó un alineamiento con la secuencia del gen OH1^{WT}. A partir del mismo, se seleccionó un clon específico de cada mutante. En la figura 5.18 se muestra parte de la secuencia de los dos clones seleccionados y alineados con respecto a la secuencia de OH1^{WT}, indicándose la mutación puntual A452T y A455T correspondiente a Y151F y Y152F respectivamente. De esta forma, se obtuvieron plásmidos pHSV conteniendo los genes de OH1^{Y151F}. JRES-EGFP y pHSV-OH1^{Y152F}-IRES-EGFP, respectivamente.

Los plásmidos pHSV-IRES-EGFP, pHSV-OH1^{WT}-IRES-EGFP y pHSV-OH1^{C112S}-IRES-EGFP fueron expandidos y purificados a partir de las semillas bacterianas disponibles en el grupo.

WT 4	436 146	TAC Tyr-	TCC -Phe-	CTC -Leu-	AAA Lys-	ACC Thr-	TAC Tyr-	TAC Tyr-	GAG Glu-	ATC Ile-	CGG Arg-	GAC Asp	468 156
pHSV-OH1 ^{Y151F} -IRES-EG	FP	TAC Tyr-	TCC Phe-	CTC -Leu-	AAA Lys-	ACC Thr-	TTC Phe-	TAC Tyr-	GAG Glu-	ATC Ile-	CGG Arg-	GAC Asp	
pHSV-OH1 ^{Y152F} -IRES-EG	FP	TAC Tyr-	TCC -Phe-	CTC -Leu-	AAA ·Lys-	ACC Thr-	TAC Tyr-	TTC Phe-	GAG •Glu-	ATC -Ile-	CGG Arg-	GAC Asp	

Figura 5.18 Alineamiento nucleotídico parcial de las secuencias de los clones de los mutantes OH1^{Y151F} y OH1^{Y152F}. Se muestra parte del alineamiento de secuencias nucleotídicas de los clones secuenciados para la obtención de los mutantes pHSV-OH1^{Y151}- IRES-EGFP y pHSV-OH1^{Y152F}-IRES-EGFP respecto a la secuencia del gen de OH1^{WT} UY11/07 (KY651216.1). Se indica también el aminoácido correspondiente a cada codón, y en rojo la base T que da lugar al cambio de aminoácido Tyr a Phe.

5.2.2 Efecto de los mutantes OHI^{YI51F} y OHI^{YI52F} en la translocación de STATI

Una vez obtenidos los vectores plasmídicos necesarios, se procedió a evaluar el efecto de la expresión transitoria de la fosfatasa OH1 en la importación nuclear de STAT1 en células HeLa estimuladas con IFN-γ. Como se expuso previamente en la introducción, STAT1 es un factor de transcripción involucrado en la activación de la respuesta inmunitaria mediada por IFN-γ. Al estimular las células HeLa con IFN-γ, se desencadena una cascada de fosforilación que da como resultado la fosforilación de la Tyr⁷⁰¹ de STAT1 y su dimerización. STAT1 fosforilado se importa al núcleo donde activa la expresión de genes relacionados con la respuesta celular antiviral.

La figura 5.19 representa un ejemplo de las imágenes analizadas. En el panel 1 se observa una célula HeLa donde la ubicación subcelular de STAT1 es predominantemente nuclear y en el panel 2 se muestra una célula donde la localización subcelular de STAT1 es difusa. Se considera localización subcelular difusa cuando no es posible determinar si la

localización subcelular es predominantemente nuclear. Se realizaron dos experimentos independientes para evaluar la localización de STAT1 en células HeLa transfectadas con distintos plásmidos: pHSV-IRES-EGFP, pHSV-OH1^{WT}-IRES-EGFP, pHSV-OH1^{C112S}-IRES-EGFP, pHSV-OH1^{Y151F}-IRES-EGFP y pHSV-OH1^{Y152F}-IRES-EGFP. Estos vectores plasmídicos permiten la expresión de EGFP en tándem con la proteína de interés, y se utilizó la fluorescencia verde para seleccionar las células a analizar.



Figura 5.19. *Evaluación de la localización de STAT1 en células HeLa transfectadas y estimuladas con IFN-y*. A modo de ejemplo se muestra la inmunofluorescencia indirecta en las células transfectadas con los plásmidos pHSV-IRES-EGFP (panel 1), o pHSV-OH1^{C112S}-IRES-EGFP (panel 2). La fluoresencia verde es producto de la expresión del gen reportero EGFP que se encuentra corriente abajo respecto al gen de OH1. 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 (azul). En el panel 1 se aprecia una localización predominantemente nuclear y en el panel 2 una distribución difusa de STAT1. La imagen mostrada es representativa de los diferentes campos observados y diferentes ensayos realizados. Las imágenes fueron obtenidas en el microscopio ZOE Fluorescent Cell Imager.

En el primer experimento, se detectaron entre 15 y 28 células fluorescentes para las distintas condiciones de expresión de OH1, excepto para OH1^{Y151F}, donde se contabilizaron 85 eventos. En contraste, el segundo experimento mostró entre 7 y 14 células fluorescentes para las mismas condiciones, sin eventos observados para OH1^{C112S}. Estos resultados difieren de los obtenidos anteriormente por el grupo, que reportaron alrededor de 200 eventos por condición (Porley, 2017). Esta discrepancia sugiere que los ensayos actuales no reprodujeron los anteriores, probablemente debido a dificultades técnicas. Factores como la confluencia subóptima de las monocapas, la falta de evaluación de la viabilidad celular y el porcentaje de transfección, aspectos previamente analizados en nuestro grupo, podrían haber influido en los resultados (Morandi, 2022; Porley, 2017). Los ensayos previos mostraron un 80 % de viabilidad luego de la expresión del plásmido control o de las variantes de OH1 (WT o mutante inactivo) y porcentajes de transfección del orden del 20 %.

A pesar de estos desafíos, se procedió a analizar el primer ensayo, que mostró el mayor número de células transfectadas. Sin embargo, la baja cantidad de eventos fluorescentes limita la capacidad de obtener conclusiones definitivas, resaltando la necesidad de realizar más réplicas biológicas.

En el análisis de la localización de STAT1 (figura 5.20), se encontró que en las células transfectadas con el plásmido control, un 72 % mostraba localización nuclear de STAT1. En cambio, cuando se expresan OH1^{WT} y OH1^{C112S} se observa una disminución en el número de células que presentan una localización nuclear de STAT1 del 18 % y 57 %, respectivamente, siendo solo significativa en el caso de OH1^{C112S}. Ensayos previos del grupo analizando tres replicas biológicas con un número de eventos 10 veces superior a los obtenidos en la presente tesis, mostraron que tanto la expresión de OH1^{WT} y OH1^{C112S} causan una disminución significativa del orden del 20 % respecto al control (Porley, 2017). En su globalidad estos resultados van en consonancia con la hipótesis planteada de recultamiento de STAT1 por un sitio diferente al sitio activo de OH1, lo que explicaría que tanto la OH1^{WT} como OH1^{C112S} afecten la translocación de STAT1 al núcleo. Por otro lado, cuando se expresa el mutante OH1^{Y151F} la disminución en el número de células que presentan una localización nuclear de STAT1 fue de solo 7 %, sin significancia estadística respecto al control. Para el caso del mutante OH1^{Y152F} no se observó disminución respecto al control, por el contrario se observó un mayor porcentaje en el número de células que presentaron una localización nuclear de STAT1 (93 %). El resultado observado para OH1^{Y151F} y OH1^{Y152F} fue significativo al compararlo con el valor obtenido para OH1^{C1125}. Este resultado no lo podemos comparar con resultados previos porque fue la primera vez que se realizó el estudio con los mutantes en las tirosinas. Sin embargo, sugieren que la expresión de los mutantes en estas tirosinas no estaría afectando la importación nuclear de STAT1, como lo hace la expresión de OH1^{C1128}. Esto apoya la hipótesis de interacción de OH1 con STAT1 propuesta por el grupo, aunque nuestro modelo se centraba en la Tyr¹⁵² de OH1.



Figura 5.20. *Localización subcelular de STAT1 en las células transfectadas.* En el gráfico se muestran el porcentaje de células con una localización de STAT1 nuclear o difusa (citosólica y nuclear) para las diferentes condiciones ensayadas, correspondiente al primer ensayo experimental. Se indican las diferencias que fueron significativas respecto al control, obtenida mediante tablas de contingencia y aplicando el Test exacto de Fisher.

Sin embargo, no podemos descartar un efecto de la Tyr¹⁵¹ dada la proximidad a la Tyr¹⁵². Una posible explicación es que la ausencia de la Tyr¹⁵¹ afecte la interacción de la Tyr¹⁵² fosforilada con el dominio SH2 de STAT1. Un análisis de la conservación evolutiva de cada residuo de OH1 (figura 5.21) muestra un elevado grado de conservación en la Tyr¹⁵¹ respecto a la Tyr¹⁵², extendiéndose esta conservación a otros géneros, además del *Parapoxvirus*. Este resultado está respaldado por estudios filogenéticos de nuestro grupo (Segovia, 2016). El grado de conservación evolutiva de un aminoácido depende en gran medida de su importancia estructural y funcional. El análisis de la conservación de posiciones dentro de la misma familia de proteínas puede revelar el papel que una posición desempeña en la estructura o función de esa proteína. Como se describió en los resultados del objetivo 1, el análisis de la estructura de OH1 muestra que la Tyr¹⁵², es probable que la mutación Y151F afecte el entorno de la Tyr¹⁵² y, en consecuencia, el reclutamiento de STAT1. En el futuro, sería interesante generar el doble mutante en dichas tirosinas para evaluar o determinar si existe un efecto sinérgico en la inhibición de la translocación de STAT1 al núcleo.

En conclusión, aunque los experimentos no lograron replicar completamente los estudios previos, proporcionan evidencia que apoya la hipótesis de interacción de OH1 con STAT1. Los resultados destacan la importancia de considerar factores técnicos y experimentales en estudios futuros, así como la necesidad de realizar más réplicas para validar estos hallazgos preliminares.



Figura 5.21. *Estimación de la conservación evolutiva de las posiciones de los residuos aminoacídicos en OH1^{WT}*. El programa ConSurf permite estimar las tasas de evolución de los aminoácidos y las mapea en la secuencia de la macromolécula de consulta. Para este análisis se encontraron 123 secuencias aminoacídicas de proteínas homólogas, de las cuales 29 secuencias resultaron ser únicas. Los grados de conservación evolutiva de los aminoácidos se presentan con la barra de color en la parte inferior. La Tyr¹⁵¹ fue asignada con un alto grado de conservación, al igual que la Arg¹⁵⁵ (8). Mientras que la Tyr¹⁵² muestra un puntaje de 6 que entra en el rango de residuos ambiguos. Código de letras: (b) indica un residuo inaccesible según el algoritmo NACSES; (e) indica un residuo expuesto según el mismo algoritmo; (f) indica un residuo predicho como funcional (expuesto y altamente conservado) y (s) indica un residuo predicho como estructural (inaccesible y altamente conservado). Los sitios resaltados en amarillo indican residuos para los cuales la estimación de la conservación se realizó en menos del 10 % de las secuencias analizadas.

6 CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

En relación al primer objetivo de la tesis, podemos concluir que se generaron diferentes variantes de OH1 en residuos relevantes para la actividad (OH1^{WT}, OH1^{C112S}), para la dimerización (OH1^{C15S}) y para el reclutamiento de STAT1 (OH1^{Y151F} y OH1^{Y152F}), caracterizando su actividad mediante el uso del sustrato artificial pNPP. Aunque el protocolo general utilizado para la producción de las variantes de OH1 como proteínas recombinantes había sido utilizado con éxito en el laboratorio (purificación de OH1^{WT}, OH1^{C112S} y OH1^{C15S}), su aplicación durante este trabajo presentó dificultades, dando lugar a resultados heterogéneos. Se obtuvieron rendimientos menores a los reportados por el grupo, observándose precipitaciones en algunas de las etapas de la purificación y la presencia de contaminantes no deseados en el producto final. Estas incidencias se explican, en algunos casos, por demoras en la eliminación del imidazol o la necesidad de agregar etapas suplementarias de purificación, tal como se detalla en los resultados.

A pesar de estos contratiempos, se tomó la decisión de seguir adelante y proceder a evaluar la actividad fosfatasa de las preparaciones obtenidas, utilizando el sustrato artificial pNPP. En cuanto a la caracterización cinética, tanto OH1^{WT} como OH1^{C13S} mostraron una menor actividad en comparación con las preparaciones previamente obtenidas por el grupo. Este resultado refleja una calidad menor de las muestras actuales. El mutante inactivo OH1^{C112S} se comportó como los lotes previamente producidos, sin que se observara actividad fosfatasa. Por otro lado, los mutantes OH1^{Y151F} y OH1^{Y152F} también presentaron una menor actividad que OH1^{WT}. Sin embargo, este resultado no sabemos si es el esperado, ya que suponíamos que no deberían presentar una actividad menor que OH1^{WT}, al ser el pNPP una molécula pequeña y no proteica que se une directamente al sitio activo. Una posible explicación podría ser la baja calidad de las proteínas obtenidas. Otra opción es que la mutación de tirosina a fenilalanina haya generado cambios en la estructura secundaria que podrían afectar la actividad. Esto deberá ser evaluado en nuevos lotes de proteína, utilizando, por ejemplo, dicroísmo circular u otras estrategias. Cabe destacar que la estructura cuaternaria de estos mutantes evaluada por SEC no fue diferente a la de OH1^{WT}.

Por último, para los futuros experimentos de evaluación de la actividad de OH1 sobre STAT1 *in vitro*, era necesario contar con STAT1 en cantidad y pureza adecuada para los ensayos. Se utilizó STAT1 comercial pura, la cual se logró fosforilar en la Tyr⁷⁰¹ con éxito, utilizando la enzima JAK comercial. También se logró fosforilar a OH1 con dicha quinasa. No obstante, resta optimizar el ensayo y evaluar por espectrometría de masas las tirosinas que fueron fosforiladas en las diversas variantes. Cabe destacar que, en las condiciones utilizadas, se detectó fosforilación en tirosina incluso en los mutantes de interés, OH1^{Y151F} y OH1^{Y152F}. A pesar de las dificultades, este proceso me permitió familiarizarme con la obtención de mutantes puntuales, la expresión y purificación de proteínas recombinantes, así como la caracterización cinética de la actividad fosfatasa y la fosforilación de proteínas con JAK.

A pesar de haber avanzado en los procesos para adquirir ciertos recursos materiales, aún es necesario llevar a cabo los ensayos de actividad entre las variantes de OH1 y STAT1. En línea con esto, el grupo obtuvo recientemente un plásmido sintético que contiene el gen de STAT1, lo que permitirá su producción recombinante en *E. coli*, y así obtener las cantidades necesarias para los ensayos. Esto es primordial porque la proteína STAT1 comercial fue discontinuada.

En relación con el segundo objetivo, podemos concluir que en esta tesis se logró completar el clonado de todas las variantes de OH1 en el plásmido pHSV-IRES-EGFP y analizar la importación nuclear de STAT1 en células que expresaban las variantes OH1^{WT}, OH1^{C112S}, OH1^{Y151F} y OH1^{Y152F}. Sin embargo, al igual que ocurrió con el primer objetivo, solo se pudo contar con resultados de un único ensayo. Estos resultados preliminares, obtenidos a partir de una única réplica biológica, parecen respaldar la hipótesis de interacción entre OH1 y STAT1 propuesta por nuestro grupo. Esto sugiere la participación de una tirosina de OH1 en dicho proceso. Para alcanzar el segundo objetivo, será crucial incrementar el número de ensayos y mejorar los porcentajes de transfección. Esto permitirá evaluar un mayor número de células transfectadas. Además, se considera la posibilidad de emplear un vector de expresión alternativo.

7 **BIBLIOGRAFÍA**

Aaronson, D. S., & Horvath, C. M. (2002). A road map for those who don't know JAK-STAT. Science, 296(5573), 1653-1655. doi: 10.1126/science.1071545

Ahuja, L. G. (2018). Protein Tyrosine Phosphatases: Structure, Signaling and Drug Discovery, Berlin, Boston: De Gruyter. doi: 10.1515/9783110421774

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, 215(3), 403–410. https://doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80360-2

Armstrong, J. A., Metz, D. H., & Young, M. R. (1973). The mode of entry of vaccinia virus into L cells. The Journal of general virology, 21(3), 533–537. https://doi.org/10.1099/0022-1317-21-3-533

Asano, T., Noma, K., Mizoguchi, Y., Karakawa, S., & Okada, S. (2023). Human STAT1 gain of function with chronic mucocutaneous candidiasis: A comprehensive review for strengthening the connection between bedside observations and laboratory research. Immunological Reviews. https://doi.org/10.1111/imr.13300

Bengali, Z., Townsley, A. C., & Moss, B. (2009). Vaccinia virus strain differences in cell attachment and entry. Virology, 389(1-2), 132-140. doi: 10.1016/j.virol.2009.04.012

Bidgood, S. R., & Mercer, J. (2015). Cloak and Dagger: Alternative Immune Evasion and Modulation Strategies of Poxviruses. *Viruses*, 7(8), 4800–4825.

Bidgood, S. R., Samolej, J., Novy, K., Collopy, A., Albrecht, D., Krause, M., Burden, J. J., Wollscheid, B., & Mercer, J. (2022). Poxviruses package viral redox proteins in lateral bodies and modulate the host oxidative response. PLoS Pathogens, 18(7), e1010614.

Biegert, A., & Söding, J. (2009). Sequence context-specific profiles for homology searching. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106(10), 3770–3775. https://doi.org/10.1073/pnas.0810767106

Bonner, P. (2019). Protein purification (2.^a ed.). CRC Press Taylor y Francis. ISBN 13: 978-0815344889.

Carter, G. C., Law, M., Hollinshead, M., & Smith, G. L. (2005). Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans. The Journal of General Virology, 86(Pt 5), 1279-1290. doi: 10.1099/vir.0.80831-0

Cengel, K. A., & Freund, G. G. (1999). JAK1-dependent phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) is inhibited by IRS-1 serine phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(39), 27969–27974. doi: 10.1074/jbc.274.39.27969.

Chiu, W. L., Lin, C. L., Yang, M. H., Tzou, D. L., & Chang, W. (2007). Vaccinia virus 4c (A26L) protein on intracellular mature virus binds to the extracellular cellular matrix laminin. Journal of virology, 81(5), 2149–2157. https://doi.org/10.1128/JVI.02302-06

Chlanda, P., Carbajal, M. A., Cyrklaff, M., Griffiths, G., & Krijnse-Locker, J. (2009). Membrane rupture generates single open membrane sheets during vaccinia virus assembly. *Cell Host & Microbe*, 6(1), 81–90.

Chung, C. S., Hsiao, J. C., Chang, Y. S., & Chang, W. (1998). A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate. Journal of Virology, 72(2), 1577-1585. doi: 10.1128/JVI.72.2.1577-1585.1998

da Costa, R. A., Cargnelutti, J. F., Schild, C. O., Flores, E. F., Riet-Correa, F., & Giannitti, F. (2019). Outbreak of contagious ecthyma caused by Orf virus (*Parapoxvirus ovis*) in a vaccinated sheep flock in Uruguay. Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology], 50(2), 565-569. doi: 10.1007/s42770-019-00057-7

Dales, S., & Mosbach, E. H. (1968). Vaccinia as a model for membrane biogenesis. Virology, 35(4), 564-583. doi: 10.1016/0042-6822(68)90286-9

Darnell, J., Kerr, I. M., & Stark, G. S. (1994). JAK-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. Science, 264(5164), 1415–1421. https://doi.org/10.1126/science.8197455

Deane, D., McInnes, C. J., Percival, A., Wood, A., Thomson, J., Lear, A., Gilray, J., Fleming, S., Mercer, A., & Haig, D. (2000). Orf virus encodes a novel secreted protein inhibitor of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2. Journal of virology, 74(3), 1313–1320. https://doi.org/10.1128/jvi.74.3.1313-1320.2000

Derrien, M., Punjabi, A., Khanna, M., Grubisha, O., & Traktman, P. (1999). Tyrosine phosphorylation of A17 during vaccinia virus infection: involvement of the H1 phosphatase and the F10 kinase. *Journal of Virology*, *73*(9), 7287–7296.

Diel, D. G., Delhon, G., Luo, S., Flores, E. F., & Rock, D. L. (2010). A novel inhibitor of the NF-κB signaling pathway encoded by the parapoxvirus orf virus. Journal of Virology, 84(8), 3962-3973. doi: 10.1128/JVI.02291-09

Diel, D. G., Luo, S., Delhon, G., Peng, Y., Flores, E. F., & Rock, D. L. (2011). A nuclear inhibitor of NF-κB encoded by a poxvirus. Journal of Virology, 85(1), 264-275. doi: 10.1128/JVI.01149-10

Diven, D. G. (2001). An overview of poxviruses. Journal of the American Academy of Dermatology, 44(1), 1–16.

Finn, R. D., Clements, J., & Eddy, S. R. (2011). HMMER web server: interactive sequence similarity searching. Nucleic acids research, 39(Web Server issue), W29–W37. https://doi.org/10.1093/nar/gkr367

Fleming, S. B., McCaughan, C. A., Andrews, A. E., Nash, A. D., & Mercer, A. A. (1997). A homolog of interleukin-10 is encoded by the poxvirus orf virus. Journal of Virology, 71(6), 4857–4861.

Fleming, S. B., Wise, L. M., & Mercer, A. A. (2015). Molecular genetic analysis of orf virus: a poxvirus that has adapted to skin. Viruses, 7(3), 1505-1539. doi: 10.3390/v7031505

Fountoulakis, M., Lahm, H. W., Maris, A., Friedlein, A., Manneberg, M., Stueber, D., & Garotta, G. (1991). A 25-kDa stretch of the extracellular domain of the human interferon gamma receptor is required for full ligand binding capacity. The Journal of Biological Chemistry, 266(23), 14970-14977. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1831199

Fountoulakis, M., Zulauf, M., Lustig, A., & Garotta, G. (1992). Stoichiometry of interaction between interferon gamma and its receptor. European Journal of Biochemistry / FEBS, 208(3), 781-787. doi: 10.1111/j.1432-1033.1992.tb17248.x

Guan, K. L., Broyles, S. S., & Dixon, J. E. (1991). A Tyr/Ser protein phosphatase encoded by vaccinia virus. Nature, 350(6316), 359-362. doi: 10.1038/350359a0

Haig, D. M., & Mercer, A. A. (1998). Ovine diseases. Orf. Veterinary Research, 29(3-4), 311-326. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9689744

Haig, D. M., & McInnes, C. J. (2002). Immunity and counter-immunity during infection with the parapoxvirus orf virus. Virus Research, 88(1-2), 3-16. doi: 10.1016/s0168-1702(02)00117-x

Harrison, S. C., Alberts, B., Ehrenfeld, E., Enquist, L., Fineberg, H., McKnight, S. L., Moss, B., O'Donnell, M., Ploegh, H., Schmid, S. L., Walter, K. P., & Theriot, J. (2004). Discovery of antivirals against smallpox. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101(31), 11178-11192. doi: 10.1073/pnas.0403600101

Harvey, R., McCaughan, C., Wise, L. M., Mercer, A. A., & Fleming, S. B. (2015). Orf virus inhibits interferon stimulated gene expression and modulates the JAK/STAT signalling pathway. Virus Research, 208, 180-188. doi: 10.1016/j.virusres.2015.06.014

Hosamani, M., Scagliarini, A., Bhanuprakash, V., McInnes, C. J., y Singh, R. K. (2009). Orf: an update on current research and future perspectives. Expert Review of Anti-Infective Therapy, 7(7), 879-893. doi: 10.1586/eri.09.64

Hsiao, J. C., Chung, C. S., & Chang, W. (1998). Cell surface proteoglycans are necessary for A27L protein-mediated cell fusion: identification of the N-terminal region of A27L protein as the glycosaminoglycan-binding domain. Journal of Virology, 72(10), 8374-8379. doi: 10.1128/JVI.72.10.8374-8379.1998

Hsiao, J. C., Chung, C. S., & Chang, W. (1999). Vaccinia virus envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates the adsorption of intracellular mature virions to cells. Journal of Virology, 73(10), 8750-8761. doi: 10.1128/JVI.73.10.8750-8761.1999

Hu, X., Li, J., Fu, M., Zhao, X., & Wang, W. (2021). The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 402. doi: 10.1038/s41392-021-00791-1

Jardin, C., & Sticht, H. (2012). Identification of the structural features that mediate binding specificity in the recognition of STAT proteins by dual-specificity phosphatases. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, *29*(4), 777–792.

Katoh, K. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. Nucleic Acids Research, 30(14), 3059–3066. https://doi.org/10.1093/nar/gkf436

Katoh, K., & Toh, H. (2008). Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. Briefings in Bioinformatics, 9(4), 286–298. https://doi.org/10.1093/bib/bbn013

Koksal, A. C., Nardozzi, J. D., & Cingolani, G. (2009). Dimeric quaternary structure of the prototypical dual specificity phosphatase VH1. The Journal of Biological Chemistry, 284(15), 10129-10137. doi: 10.1074/jbc.M808362200

Lateef, Z., Baird, M. A., Wise, L. M., Young, S., Mercer, A. A., & Fleming, S. B. (2010). The chemokine-binding protein encoded by the poxvirus orf virus inhibits recruitment of dendritic cells to sites of skin inflammation and migration to peripheral lymph nodes. Cellular Microbiology, 12(5), 665-676. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01425.x

Li, W., & Godzik, A. (2006). Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. Bioinformatics (Oxford, England), 22(13), 1658–1659. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl158

Lin, C. L., Chung, C. S., Heine, H. G., & Chang, W. (2000). Vaccinia virus envelope H3L protein binds to cell surface heparan sulfate and is important for intracellular mature virion morphogenesis and virus infection *in vitro* and *in vivo*. Journal of Virology, 74(7), 3353-3365. doi: 10.1128/jvi.74.7.3353-3365.2000

Liu, K., Lemon, B., & Traktman, P. (1995). The dual-specificity phosphatase encoded by vaccinia virus, VH1, is essential for viral transcription *in vivo* and *in vitro*. Journal of Virology, 69(12), 7823-7834. doi: 10.1128/JVI.69.12.7823-7834.1995

Lyttle, D. J., Fraser, K. M., Fleming, S. B., Mercer, A. A., & Robinson, A. J. (1994). Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. Journal of Virology, 68(1), 84–92.

Maclachlan, J. & Dubovi, E. (Eds.). (2011). Poxviridae. In Fenner's Veterinary Virology (4th ed., pp. 151–165) Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375158-4.00007-9.

Mao, X., Ren, Z., Parker, G. N., Sondermann, H., Pastorello, M. A., Wang, W., McMurray, J. S., Demeler, B., Darnell, J., & Chen, X. (2005). Structural bases of unphosphorylated STAT1 association and receptor binding. Molecular Cell, 17(6), 761–771. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.02.021

Mayrose, I., Graur, D., Ben-Tal, N., & Pupko, T. (2004). Comparison of site-specific rate-inference methods for protein sequences: empirical Bayesian methods are superior. Molecular biology and evolution, 21(9), 1781–1791. https://doi.org/10.1093/molbev/msh194

McFadden, G. (2005). Poxvirus tropism. Nature Reviews. Microbiology, 3(3), 201–213. doi: 10.1038/nrmicro1099

McInnes, C. J., Damon, I. K., Smith, G. L., McFadden, G., Isaacs, S. N., Roper, R. L., Evans, D. H., Damaso, C. R., Carulei, O., Wise, L. M., & Lefkowitz, E. J. (2023). ICTV Virus Taxonomy Profile: Poxviridae 2023. *The Journal of General Virology*, *104*(5). https://doi.org/10.1099/jgv.0.001849

Meyer, M., Clauss, M., Lepple-Wienhues, A., Waltenberger, J., Augustin, H. G., Ziche, M., Lanz, C., Büttner, M., Rziha, H. J., & Dehio, C. (1999). A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. The EMBO Journal, 18(2), 363–374. https://doi.org/10.1093/emboj/18.2.363

Morgan, C. (1976). The insertion of DNA into vaccinia virus. Science, 193(4253), 591–592.

Müller, U., Steinhoff, U., Reis, L. F., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R. M., & Aguet, M. (1994). Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. Science, 264(5167), 1918-1921. doi: 10.1126/science.8009221

Nagington, J. & Horne, R. (1962). Morphological studies of orf and vaccinia viruses. Virology, 16(3), 248–260. https://doi.org/10.1016/0042-6822(62)90245-3

Nagington, J., Newton, A. A. & Horne, R. (1964). The structure of orf virus. Virology, 23(4), 461–472. https://doi.org/10.1016/0042-6822(64)90230-2

Najarro, P., Traktman, P., & Lewis, J. A. (2001). Vaccinia virus blocks gamma interferon signal transduction: viral VH1 phosphatase reverses Stat1 activation. Journal of Virology, 75(7), 3185-3196. doi: 10.1128/JVI.75.7.3185-3196.2001

Nougairede, A., Fossati, C., Salez, N., Cohen-Bacrie, S., Ninove, L., Michel, F., Aboukais, S., Buttner, M., Zandotti, C., de Lamballerie, X., & Charrel, R. N. (2013). Sheep-to-human transmission of Orf virus during Eid al-Adha religious practices, France. Emerging Infectious Diseases, 19(1), 102-105. doi: 10.3201/eid1901.120421

Olivero, N. (2008). Caracterización a nivel molecular de cepas uruguayas del virus causante del ectima contagioso en ovinos. Tesis de Grado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias.

Olivero, N. (2012). Estudio de los Mecanismos Genéticos Implicados en la Variabilidad del Virus Causante del Ectima Contagioso en Ovinos. Tesis de Maestría. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias.

Parrini, M., Meissl, K., Ola, M. J., Lederer, T., Puga, A., Wienerroither, S., Kovarik, P., Decker, T., Müller, M., & Strobl, B. (2018). The C-Terminal Transactivation Domain of STAT1 Has a Gene-Specific Role in Transactivation and Cofactor Recruitment. *Frontiers in Immunology*, *9*, 2879. doi: 10.3389/fimmu.2018.02879

Porley, D. (2017). Expresión en células HeLa de la única fosfatasa de fosfo-tirosina del virus Orf: hacia la validación de interactores. Tesis de Maestría. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias.

Pupko, T., Bell, R. E., Mayrose, I., Glaser, F., & Ben-Tal, N. (2002). Rate4Site: an algorithmic tool for the identification of functional regions in proteins by surface mapping of evolutionary determinants within their homologues. Bioinformatics (Oxford, England), 18 Suppl 1, S71–S77. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/18.suppl_1.s71

Rodrigues, C. H. M., Pires, D. E. V., & Ascher, D. B. (2020). DynaMut2: Assessing changes in stability and flexibility upon single and multiple point missense mutations. Protein Science, 30(1), 60–69. https://doi.org/10.1002/pro.3942

Rost, B. (1999). Twilight zone of protein sequence alignments. Protein engineering, 12(2), 85–94. https://doi.org/10.1093/protein/12.2.85

Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular biology and evolution, 4(4), 406–425. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454

Sambrook, J., & Green, M. (2012). Molecular cloning: A Laboratory Manual (4ed). Publisher: Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 13: 9781936113415

Schmelz, M., Sodeik, B., Ericsson, M., Wolffe, E. J., Shida, H., Hiller, G., & Griffiths, G. (1994). Assembly of vaccinia virus: the second wrapping cisterna is derived from the trans Golgi network. *Journal of Virology*, 68(1), 130–147.

Schmidt, F. I., Bleck, C. K. E., & Mercer, J. (2012). Poxvirus host cell entry. Current Opinion in Virology, 2(1), 20-27. doi: 10.1016/j.coviro.2011.11.007

Schmidt, F. I., Bleck, C. K. E., Reh, L., Novy, K., Wollscheid, B., Helenius, A., Stahlberg, H., & Mercer, J. (2013). Vaccinia virus entry is followed by core activation and proteasome-mediated release of the immunomodulatory effector VH1 from lateral bodies. *Cell Reports*, 4(3), 464–476.

Schneider, C. A., Rasband, W., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nature Methods, 9(7), 671–675. https://doi.org/10.1038/nmeth.2089

Seet, B. T., McCaughan, C. A., Handel, T. M., Mercer, A., Brunetti, C., McFadden, G., & Fleming, S. B. (2003). Analysis of an Orf virus chemokine-binding protein: Shifting ligand specificities among a family of poxvirus viroceptors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100(25), 15137–15142.

Segovia, D., Haouz, A., Porley, D., Olivero, N., Martínez, M., Mariadassou, M., Berois, M., André-Leroux, G., & Villarino, A. (2017). OH1 from Orf Virus: A New Tyrosine Phosphatase that Displays Distinct Structural Features and Triple Substrate Specificity. Journal of Molecular Biology, 429(18), 2816-2824. doi: 10.1016/j.jmb.2017.07.017

Semper, C., Leitner, N. R., Lassnig, C., Parrini, M., Mahlakoiv, T., Rammerstorfer, M., Lorenz, K., Rigler, D., Müller, S., Kolbe, T., Vogl, C., Rülicke, T., Staeheli, P., Decker, T., Müller, M., & Strobl, B. (2014). STAT1β is not dominant

negative and is capable of contributing to gamma interferon-dependent innate immunity. *Molecular and Cellular Biology*, 34(12), 2235–2248. doi: 10.1128/MCB.00295-14.

Shuai, K., Stark, G. R., Kerr, I. M., & Darnell, J. (1993). A single phosphotyrosine residue of STAT91 required for gene activation by interferon-Γ. Science, 261(5129), 1744–1746. https://doi.org/10.1126/science.7690989

Smith, G. L., Vanderplasschen, A., & Law, M. (2002). The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *The Journal of General Virology*, 83(Pt 12), 2915–2931.

Smith, G. L. (2018). Vaccinia Virus Protein C6: A Multifunctional Interferon Antagonist. Advances in Experimental Medicine and Biology, 1052, 1-7. doi: 10.1007/978-981-10-7572-8_1

Sodeik, B., Doms, R. W., Ericsson, M., Hiller, G., Machamer, C. E., Van't Hof, W., van Meer, G., Moss, B., & Griffiths, G. (1993). Assembly of vaccinia virus: role of the intermediate compartment between the endoplasmic reticulum and the Golgi stacks. *The Journal of Cell Biology*, *121*(3), 521–541.

Sodeik, B., & Krijnse-Locker, J. (2002). Assembly of vaccinia virus revisited: de novo membrane synthesis or acquisition from the host? Trends in Microbiology, 10(1), 15-24. doi: 10.1016/s0966-842x(01)02256-9

Spyrou, V., & Valiakos, G. (2015). Orf virus infection in sheep or goats. Veterinary Microbiology, 181(1-2), 178-182. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.08.010

Staś, M., Najgebauer, P., & Siodłak, D. (2023). Imidazole-amino acids. Conformational switch under tautomer and pH change. *Amino Acids*, 55(1), 33–49. doi: 10.1007/s00726-022-03201-0

Talbot-Cooper, C., Pantelejevs, T., Shannon, J. P., Cherry, C. R., Au, M. T., Hyvönen, M., Hickman, H. D., & Smith, G. L. (2022). Poxviruses and paramyxoviruses use a conserved mechanism of STAT1 antagonism to inhibit interferon signaling. Cell Host & Microbe, 30(3), 357-372.e11. doi: 10.1016/j.chom.2022.01.014

Tolomeo, M., Cavalli, A., & Cascio, A. (2022). STAT1 and Its Crucial Role in the Control of Viral Infections. International Journal of Molecular Sciences, 23(8). doi: 10.3390/ijms23084095

Voet, D., & Voet, J. G. (2011). Biochemistry. Wiley. ISBN: 9780470570951

Wang, S., & Shuman, S. (1995). Vaccinia virus morphogenesis is blocked by temperature-sensitive mutations in the F10 gene, which encodes protein kinase 2. *Journal of Virology*, *69*(10), 6376–6388.

Wang, R., Wang, Y., Liu, F., & Luo, S. (2019). Orf virus: A promising new therapeutic agent. Reviews in Medical Virology, 29(1), e2013. doi: 10.1002/rmv.2013

Weisberg, A. S., Maruri-Avidal, L., Bisht, H., Hansen, B. T., Schwartz, C. L., Fischer, E. R., Meng, X., Xiang, Y., & Moss, B. (2017). Enigmatic origin of the poxvirus membrane from the endoplasmic reticulum shown by 3D imaging of vaccinia virus assembly mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(51), E11001–E11009.

Westphal, D., Ledgerwood, E. C., Hibma, M., Fleming, S. B., Whelan, E. M., & Mercer, A. A. (2007). A novel BCL-2-Like inhibitor of apoptosis is encoded by the Parapoxvirus ORF virus. Journal of Virology, 81(13), 7178–7188. https://doi.org/10.1128/jvi.00404-07

Whitbeck, J. C., Foo, C.-H., Ponce de León, M., Eisenberg, R. J. & Cohen, G. H. (2009). Vaccinia virus exhibits cell-typedependent entry characteristics. Virology, 385(2), 383-391. doi: 10.1016/j.virol.2008.12.029

Wise, L. M., Inder, M. K., Real, N. C., Stuart, G. S., Fleming, S. B., & Mercer, A. A. (2012). The vascular endothelial growth factor (VEGF)-E encoded by orf virus regulates keratinocyte proliferation and migration and promotes epidermal regeneration. En Cellular Microbiology (Vol. 14, Número 9, pp. 1376-1390). doi: 10.1111/j.1462-5822.2012.01802.x

Wittek, R., Kuenzle, C. C., & Wyler, R. (1979). High CG Content in Parapoxvirus DNA. In *Journal of General Virology* (Vol. 43, Issue 1, pp. 231–234). doi: 10.1099/0022-1317-43-1-231

Wittek, R., & Moss, B. (1980). Tandem repeats within the inverted terminal repetition of vaccinia virus DNA. *Cell*, 21(1), 277–284.

Wolffe, E. J., Moore, D. M., Peters, P. J. & Moss, B. (1996). Vaccinia virus A17L open reading frame encodes an essential component of nascent viral membranes that is required to initiate morphogenesis. Journal of Virology, 70(5), 2797–2808.

Yang, Z., Reynolds, S. L., Martens, C., Bruno, D., Porcella, S. F., & Moss, B. (2011). Expression profiling of the intermediate and late stages of Poxvirus replication. Journal of Virology, 85(19), 9899–9908. https://doi.org/10.1128/jvi.05446-11

Yamaoka, K., Saharinen, P., Pesu, M., Holt, V. E., III, Silvennoinen, O. & O'Shea, J. J. (2004). The Janus kinases (Jaks). *Genome biology*, 5(12), 253. doi: 10.1186/gb-2004-5-12-253

Yirrell, D. L., Vestey, J. P. & Norval, M. (1994). Immune responses of patients to Orf virus infection. *The British Journal of Dermatology*, 130(4), 438–443.

Young, H. A. & Hardy, K. J. (1995). Role of interferon-γ in immune cell regulation. En Journal of Leukocyte Biology (Vol. 58, Número 4, pp. 373-381). doi: 10.1002/jlb.58.4.373

Yuvaniyama, J., Denu, J. M., Dixon, J. E. & Saper, M. A. (1996). Crystal structure of the dual specificity protein phosphatase VHR. Science, 272(5266), 1328-1331. doi: 10.1126/science.272.5266.1328

Zhang, Z. Y. (1998). Protein-tyrosine phosphatases: biological function, structural characteristics, and mechanism of catalysis. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *33*(1), 1–52. doi: 10.1080/10409239891204161

Zhao, K., Song, D., He, W., Lu, H., Zhang, B., Li, C., Chen, K. & Gao, F. (2010). Identification and phylogenetic analysis of an Orf virus isolated from an outbreak in sheep in the Jilin province of China. *Veterinary Microbiology*, *142*(3-4), 408–415. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.10.006
8 APÉNDICE

8.1 Tabla de purificaciones de OHI^{WT} y mutantes

	Fracción	Peso húmedo del pélet (g)	Proteína total (mg)	Rendimiento (mg de OH1/gr de pélet)
WT	IMAC	16	99	6,2
	Diálisis	-	30,6	1,9
	Digestión con TEV	-	13,5	0,8
	Concentración	-	6,6	0,4
	Gel Filtración	-	6,4	0,4
C15S	IMAC	8,9	21,5	2,4
	Diálisis	-	21,5	2,4
	Digestión con TEV	-	7,1	0,8
	Concentración	-	3,9	0,4
	Gel Filtración	-	1,3	0,1
C112S	IMAC	14,5	55,8	3,8
	Diálisis	-	27	1,9
	Digestión con TEV	-	27	1,9
	Concentración	-	14,4	0,9
	Gel Filtración	-	4,5	0,3
Y151F	IMAC	40	60,3	1,5
	Diálisis	-	-	-
	Digestión con TEV	-	23,3	0,6
	Concentración	-	2	0,05
	Gel Filtración	-	2	0,05
¥152F	IMAC	40	24,9	0,6
	Diálisis	-	-	-
	Digestión con TEV	-	7	0,2
	Concentración	-	3	0,08
	Gel Filtración	-	3	0,08

8.2 Análisis de conservación de los residuos Tyr¹⁵¹ y Tyr¹⁵²

1 Territ and SEOPER 1	FUYET KEVYET BOT DCAPT FNANED VOT TKNEVCDCD	C
2 un D2IGK411 19112 20 100 Decude compar un mus	FVIFIKITIEIRDERGAFERNANFRIGEIRMFVCDSF	0
2 ur[D0302K4]1_101[2.5e-109]Pseudocowpox_virus	EVIELKIIIEIKDLKGAFLENANFKMQLIKMFVCD55	2
3 ur AUAUA/MA86/1_1/6/9./e-89/Parapoxvirus_red_deer/HL953	FVYFLKTYFELRDLKGAFLENQNFRLQLIKLFV	-
4 ur[Q6TVD1]3_177]1.1e-86[Bovine_papular_stomatitis_virus	FVFFLKTYYELRDSRGAFLENNNFRYQLIKMFVT	-
5 ur A0A1Z3GCU7 1_179 2.1e-86 Seal_parapoxvirus	FVFFLKTYYMLRDLRGAFLENQNFRYQLIKMFVVES-	-
6 ur A0A220T6D8 2_170 6.7e-41 Poxviridae	FIYFLYIYHSMREQRGAFVENPSFRKQIIEKYILE	-
7 ur Q9WH06 2_169 3.2e-39 Capripoxvirus	FIYFLYIYHSMREKRGAFIENPSFRKQLIDKYII	-
8 ur Q85297 2_169 5.7e-39 Leporipoxvirus	FMYFLYIYHSIREQRGAFLENPSFRRQIIEKYII	-
9 ur A0A7G5AX83 2_167 9.5e-39 Molluscum_contagiosum_virus	VIYFLYVYHGIKDIRGAFLENASFKRQLVDH	-
10 ur U3UBD0 5_169 2.6e-38 Squirrelpox_virus	FVYFLYVYHGLREQRGAFVENPSFRRQLIEHYV	-
11 ur A0A650AJK5 2_167 5.4e-38 Equine_molluscum_contagiosum-like_virus	VIYFLHVYHGLKDLRGAFLENASFKKQLVDH	-
12 ur Q6TUU3 2_168 5.8e-38 Yaba_monkey_tumor_virus_strain_VR587	FVYFLHVYHSMREQRGAFLENPSFRKQVIEKYV	-
13 ur Q08FS1 2 169 1e-37 Cervidpoxvirus	FIYFLYIYHSMREQRGAFLENPSFRKQIIEKYII	-
14 ur A0A223FMS7 2 168 2.5e-37 Centapoxvirus	V L Y F L Y V Y H T L R D L R G A F V E N S S F R R Q I I E K Y I T	-
15 ur G3EIF7 2_168 1e-36 Yokapox_virus	MVYFLYVYHTLRDLRGAFVENSSFRRQIIERYII	-
16 ur A0A6B9R233 2 170 1.5e-36 Cetacean poxvirus 1	FIYFLHMYYEIKELRGAFLENPSFRKQIIRKYVL	-
17 ur A0A2R8F5P0 2_170 5.5e-36 Orthopoxvirus	MLYFLYVYHSMRDLRGAFVENPSFKRQIIEKYVIDK-	-
18 ur A0A2U9QHP0 2_168 6.4e-36 Sea_otter_poxvirus	FVYFLYIIHGLREKRGAFVENDSFKKQLIRYYI	-
19 ur A0A7D0Q8M1 2_169 1.7e-35 Brazilian_porcupinepox_virus_1	FMYFLYIYHSMRERRGAFIEN <mark>S</mark> SFRKQIINKYVI	-
20 ur Q9DHP1 2 169 2.1e-35 Tanapox virus	FMFFLYVYHSMREQRGAFLENPSFRKQIIEKYVI	-
21 ur AOA1B1MRK0 2 169 3.6e-35 Pteropox virus	FVYFLYVYHSLKEKRSAFLENASFKKQVIKYYVTD	-
22 ur H6TA62 2_170 1.1e-34 Oryzopoxvirus	FMYFLYIYHAMREKRGAFVENVSFRKQIINKYIVD	-
23 ur A0A881SY51 2_170 6e-34 Swinepox_virus	FIYFLYIYHLMREKRGAFIENPSFRKQIIDKYIIN	-
24 ur A0A2C9DT47 2 164 1.1e-29 Macropopoxvirus	LVYFLYVYHELKRIRGAFLEN <mark>R</mark> SFKDQLLDH	-
25 ur A0A1V0S7Z5 21 165 2.2e-29 Poxviridae	LIYFLYVYHELKSIRGAFLENKSFLNQIVDRY	-
26 ur A0A8S4B646 6 117 1.1e-13 Menidia menidia		-
27 ur A0A671YBZ4 3_111 2.4e-13 Sparidae		-
28 ur UPI0020D1246D 6_117 2.8e-12 Epinephelus	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	-
29 ur UPI001FB8427A 7 116 5e-12 Mugil cephalus		-

Figura 8.1 Alineamiento múltiple de distintas fosfatasas homólogas de OH1 demostrando el grado de conservación de los residuos

de Tyr indicados con flechas negras.

8.3 Árbol filogenético generado por el programa ConSurf



Figura 8.2 Árbol filogenético generado por el método de Neighbor-Joining (NJ), obtenido a partir del alineamiento en la figura 8.1.