



TESIS DE LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA

Evaluación del rol de mutantes de la fosfatasa OH1 del virus Orf en la translocación al núcleo del factor de transcripción STAT1



Vanina Astrada

Tutor: Dra. Mabel Berois

Sección Virología - Facultad de Ciencias, UdelaR

Setiembre 2024

Agradecimientos

A mi tutora, Dra. Mabel Berois por su orientación, por aceptarme como estudiante para realizar la tesis de grado y confiar en mí para la realización de este trabajo.

A todos los miembros de la sección virología por integrarme al grupo y ponerse a disposición desde el primer momento.

A los integrantes del tribunal evaluador, por dedicar su tiempo a la lectura y corrección de esta tesis.

A mis compañeros de trabajo por apoyarme durante toda la carrera y permitirme adaptar mi horario laboral para poder estudiar y asistir a clases.

A toda mi familia por el apoyo durante todos estos años. A mi madre, a mi padre y a Kari por el apoyo emocional y por confiar en mí siempre. A Leo, porque hacemos el mejor equipo, gracias por la paciencia y la comprensión.

Índice

RESUMEN	3
1 - INTRODUCCIÓN	4
1.1 - Virus Orf	4
1.1.1 - Virus Orf: morfología y genoma	4
1.1.2 - Virus Orf: ciclo de replicación	6
1.2 - Ectima Contagioso	8
1.2.1 - Ectima contagioso: generalidades de la enfermedad	8
1.2.2 - Ectima contagioso: detección, tratamiento y vacunas disponibles	10
1.3 - Estrategias del ORFV para modular la respuesta inmune	11
1.3.1 - Respuesta inmune contra ORFV	11
1.3.2 - Proteínas moduladoras del virus Orf - Factores de virulencia	11
1.4 - Fosfatasa de Tyr del ORFV: OH1	14
1.4.1 - Vía de señalización JAK-STAT	14
1.4.2 - OH1: generalidades y análogo en Virus Vaccinia	16
1.4.3 - OH1: estructura	18
1.4.4 - Interacción entre OH1 y STAT1	19
2 - OBJETIVOS	22
2.1 - Objetivo general	22
2.2 - Objetivos específicos	22
3 - MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1 - Obtención de los plásmidos de interés	23
3.1.1 - Vectores plasmídicos utilizados	23
3.1.2 - Amplificación y purificación de los plásmidos de interés	25
3.1.3 - Verificación de los plásmidos obtenidos	26
3.2 - Transfección de células HeLa con los plásmidos pHSV1	28
3.2.1 - Pasaje y mantenimiento de la línea celular	28
3.2.2 - Transfección de células HeLa	29
3.3 - Ensayo de inmunofluorescencia indirecta	30
3.4 - Análisis de datos	31
4 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.1 - Verificación de los plásmidos obtenidos	32
4.2 - Puesta a punto del ensayo de translocación nuclear de STAT1	36
4.3 - Evaluación de la translocación nuclear de STAT1 en presencia de diferentes	
mutantes de OH1	41
4.4 - Análisis de los resultados obtenidos	46
5 - CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	49
6 - REFERENCIAS	51
APENDICE 1 - Abreviaciones	55
APENDICE 2 - Complemento Resultados	57

RESUMEN

El virus Orf (ORFV) es una especie de virus perteneciente al género *Parapoxvirus* dentro de la familia *Poxviridae* y es el agente causante de la enfermedad zoonótica denominada Ectima Contagioso. Esta enfermedad se da en ovinos y caprinos a una edad temprana y puede ser transmitida a seres humanos que estén en contacto con animales infectados.

Los ORFV se caracterizan por ser capaces de codificar una gran cantidad de proteínas moduladoras de la respuesta inmune de la célula hospedera. Uno de estos factores de virulencia es OH1, una fosfatasa de tirosina de doble especificidad. En estudios previos del grupo de investigación, se determinó la estructura cristalográfica de OH1 y se identificó a STAT1 como su sustrato fisiológico. Además, se observó una disminución en los niveles de STAT1 fosforilado en células transfectadas con el gen de OH1, lo que indicó que la expresión de esta fosfatasa afecta la vía de señalización JAK-STAT y bloquea la translocación de STAT1 al núcleo. A partir de estos resultados, junto con estudios *in silico*, se propuso un mecanismo de interacción en dos pasos entre OH1 y STAT1, que involucra a la Tyr152 de la fosfatasa viral.

Este trabajo busca contribuir al estudio de este mecanismo de interacción mediante la evaluación de la localización subcelular de STAT1 en células HeLa transfectadas con diferentes mutantes de OH1. Para cumplir con este objetivo se produjeron los vectores plasmídicos portadores del gen de OH1 salvaje y los diferentes mutantes. Estos plásmidos fueron producidos y verificados mediante electroforesis en gel de agarosa y secuenciación. Posteriormente se optimizó el ensayo de transfección en células HeLa inducidas con IFN-y, para luego realizar los ensayos empleando los diferentes mutantes de OH1 y evaluar la localización subcelular de STAT1 mediante detección por inmunofluorescencia. Se observó una disminución en la localización nuclear de STAT1 en las células transfectadas con el plásmido que expresa la fosfatasa salvaje (OH1wT) y su variante inactiva (OH1_{C112S}), en comparación con las células transfectadas con el plásmido control que no porta el gen de la fosfatasa. Estos resultados confirman lo previamente observado por el grupo respecto a OH1_{wT} y OH1_{C112S}, indicando que ambas variantes inhiben la translocación de STAT1 al núcleo. Por otro lado, los ensayos realizados con el mutante de OH1 en la Tyr152 (OH1_{Y152F}) en el cual la translocación de STAT1 al núcleo no se ve afectada, refuerzan nuestra hipótesis de que la interacción entre OH1 y STAT1 se inicia en un sitio diferente al sitio activo de la fosfatasa involucrando el residuo Tyr152.

1 - INTRODUCCIÓN

1.1 - Virus Orf

1.1.1 - Virus Orf: morfología y genoma

El virus Orf (ORFV) es una especie de virus perteneciente a la familia *Poxviridae*. Esta familia consta de dos subfamilias *Entomopoxvirinae* y *Chordopoxvirinae* que entre ambas contienen 22 géneros. Uno de estos géneros perteneciente a la subfamilia *Chordopoxvirinae* es *Parapoxvirus* dentro del cual se encuentra a los ORFV [1]. Los miembros de esta familia comparten similitudes en su morfología y tamaño. Como la mayor parte de los Poxvirus, los ORFV son virus envueltos y tienen una forma ovoide. ORFV y algunos otros virus pertenecientes al mismo género se diferencian de otros por tener su superficie cubierta por estructuras tubulares en forma de espiral (Figura 1) [2]. Tienen un tamaño aproximado de entre 220 y 300 nm de largo y entre 140 y 200 nm de ancho [3]. Los ORFV se caracterizan por ser muy resistentes a diferentes condiciones ambientales y bajo las condiciones adecuadas son capaces de sobrevivir durante varios meses [4].



Figura 1. Estructura de virus pertenecientes a la familia Poxviridae. Microscopía electrónica de diferentes miembros de la familia Poxviridae. (A) Vaccinia Virus (B) Molluscipoxvirus, imágenes adaptadas de [1]. (C) Orf Virus, imagen extraída de [5].

El Virus Vaccinia (VACV) es un virus perteneciente al género *Orthopoxvirus* de la familia *Poxviridae*. Es el virus más estudiado dentro de esta familia siendo considerado un prototipo de esta y ha sido utilizado en la fabricación de vacunas contra la viruela. Al igual que sucede en VACV, se demostró que los ORFV tienen dos tipos de partículas infecciosas dependiendo de su envoltura: IMV y EEV (Figura 2). La primera hace referencia el virión maduro intracelular (IMV) mientras que la segunda refiere el virión envuelto extracelular (EEV). Ambas formas se tratan de virus envueltos que tienen la capacidad de infectar, pero en el caso de IMV puede hacerlo si la célula infectada sufre una lisis que provoque la liberación de esta partícula infecciosa. De lo contrario, IMV continúa dentro de la célula donde adquiere una membrana adicional y pasa a denominarse EEV una vez que abandona la célula hospedera [1].



Figura 2. EEV IMV. e Representación de la estructura del virión envuelto extracelular (EEV) del virión maduro intracelular (IMV) del género Orthopoxvirus dentro del cual se encuentra, por ejemplo, el virus Vaccinia. Imagen adaptada de [6].

El genoma de los ORFV está compuesto por ADN lineal doble hebra de aproximadamente 140 Kb [3]. Una característica diferencial del genoma de los *Parapoxvirus* es el alto contenido de GC que poseen respecto a los demás Poxvirus, siendo de aproximadamente 63% [7]. Este genoma codifica para 132 genes [2] de los cuales 88 están altamente conservados dentro de la subfamilia *Chordopoxvirinae* y se encuentran dentro de la región central. Se trata de genes implicados en la replicación, transcripción y ensamblaje de las nuevas partículas virales. El resto de los genes se encuentran hacia los extremos del genoma y varían dentro de los diferentes miembros de esta familia (Figura 3). Estos genes no son esenciales para la replicación del virus sino que cumplen funciones más específicas y propias de cada virus como por ejemplo codificar para proteínas que son factores de virulencia [8]. Finalmente en los extremos del genoma se encuentran las regiones que constan de repeticiones terminales invertidas, ITRs (del inglés *Inverted Terminal Repeat Sequences*). Se ha observado que el genoma de los ORFV es colineal respecto a otros géneros dentro de la familia *Poxviridae*. Un ejemplo de esto es el VACV perteneciente al género *Orthopoxvirus* [7].



Figura 3. Representación esquemática del genoma de ORFV. (A) Se señalan los ITRs, la región conservada y las regiones no conservadas. Imagen adaptada de [7]. (B) Mapa del genoma de ORFV. Los marcos abiertos de lectura, ORFs (del inglés Open Reading Frame) se muestran con flechas en diferente sentido dependiendo de la dirección en que se da la transcripción de estos genes. Los números representan la posición dentro del genoma. Imagen extraída de [9].

1.1.2 - Virus Orf: ciclo de replicación

El ciclo replicativo ha sido estudiado en el virus Vaccinia (Figura 4) y se piensa que el mecanismo general se encuentra conservado en los diferentes géneros pertenecientes a la familia *Poxviridae*. Existen dos formas de ingreso del virus a la célula hospedera dependiendo del tipo de partícula viral. En el caso de IMV el ingreso a las células se da por vía endosomal mediante la fusión de la membrana del virus con la membrana plasmática. Por otro lado, el ingreso de los EEV se da mediante macropinocitosis [10]. La unión del virus a la célula depende de los glucosaminoglucanos (GAGs) presentes en la membrana celular y de proteínas virales [1]. La replicación de los ORFV sucede por completo en el citoplasma de los queratinocitos, las células predominantes en la epidermis. Esto es posible debido a que los Poxvirus se caracterizan por tener en su genoma todos los genes necesarios para su propia replicación y traducción, por lo que no es necesario el ingreso al núcleo de la célula infectada [11].



Figura 4. Ciclo de replicación de los Poxvirus. EEV: Virión envuelto extracelular. IMV: Virión maduro intracelular. IEV: Virión envuelto intracelular. Imagen adaptada de [1].

Una vez en el interior de la célula, el cuerpo central del virión denominado "core", que está compuesto por el ácido nucleico y proteínas, sufre un cambio conformacional que desencadena en la liberación de los cuerpos laterales y en el transporte del "core" a través de microtúbulos hacia la región donde se forma el transcriptoma viral. Dentro del genoma de los ORFV existen 3 tipos de genes dependiendo del momento en que se transcriben: genes tempranos, genes intermedios y genes tardíos [7]. Inicialmente se da la transcripción de los genes tempranos que se transcriben dentro del "core" por acción de la ARN polimerasa ADN dependiente viral. Los ARNm generados son liberados al citoplasma de la célula donde se traducen [10]. Luego de la expresión de los genes tempranos, el núcleo del virus es liberado en el citoplasma mediante un evento denominado desnudamiento. Para todos los Poxvirus se ha observado que luego del ingreso a la célula se da la formación de fábricas virales dentro del citoplasma, donde sucede la síntesis del ADN viral. Este mecanismo evita que el ADN del virus tenga que ingresar al núcleo para su replicación permitiendo que todo el ciclo suceda en el citoplasma de las células infectadas [12]. Como se mencionó anteriormente, la transcripción de los genes tempranos se da por la acción de la ARN polimerasa viral y de factores de transcripción propios del virus, sin embargo, para el caso de los genes intermedios y tardíos, es necesaria la participación de factores de transcripción de la célula hospedera [1]. Luego de la liberación del "core" en el citoplasma se da la transcripción de genes intermedios y finalmente la transcripción de los genes tardíos. Estos últimos codifican proteínas implicadas en el ensamblaje de las nuevas partículas virales [11]. Inicialmente se da el ensamblaje formando partículas virales inmaduras que luego pasan a formar IMV y en caso de producirse la lisis de la célula infectada, puede ser liberada e infectar otras células. Si no se produce la lisis celular, IMV migra hacia el Golgi donde adquiere una nueva membrana y se transforma en IEV, un virión envuelto intracelular. Finalmente, IEV sale de la célula mediante fusión con la membrana plasmática y pasa a denominarse EEV [10].

1.2 - Ectima Contagioso

1.2.1 - Ectima contagioso: generalidades de la enfermedad

El Ectima contagioso (EC) es una enfermedad zoonótica causada por ORFV. Esta enfermedad afecta a ovinos y caprinos, principalmente a una edad temprana, desde su nacimiento hasta aproximadamente los cuatro meses de vida, pero también puede ser transmitida a seres humanos que estén en contacto directo con animales infectados [9]. La entrada del virus al organismo se produce debido a lesiones orales que facilitan la

infección durante la alimentación [13]. Estas heridas pueden deberse a la erupción de los dientes de leche y es por este motivo que la infección por ORFV se ve principalmente en animales de corta edad.

En los animales infectados por EC se observan lesiones cutáneas proliferativas como la formación de pústulas (Figura 5). Estas lesiones se dan principalmente en la zona de la nariz y la boca y generalmente desaparecen entre tres y ocho semanas posteriores a la infección. Las lesiones en los humanos son similares a las de ovejas y cabras pero se dan principalmente en las manos ya que es la zona de contacto con los animales infectados [14] (Figura 5).





Figura 5. Lesiones provocadas por ORFV. (A) Lesiones provocadas por ORFV en caprinos. Arriba se observa la evolución de las lesiones macroscópicas y abajo un análisis histológico de la evolución de las lesiones a nivel microscópico. Imagen adaptada de [13]. (B) Lesiones provocadas en humanos. Imagen adaptada de [7].

La morbilidad puede llegar a ser del 100% mientras que la mortalidad es muy baja, generalmente por debajo del 5% [13].

A nivel mundial el EC causa importantes pérdidas económicas en el sector ganadero principalmente debido a infecciones bacterianas secundarias. Además, también se generan pérdidas económicas por retraso en el crecimiento y pérdida de peso de los animales infectados debido a la dificultad para alimentarse por las lesiones generadas [15].



Figura 6. Zonas donde se han detectado infecciones por ORFV. Se indican con estrellas las zonas en que se han detectado brotes de ectima contagioso hasta el año 2018. Imagen extraída de [9].

1.2.2 - Ectima contagioso: detección, tratamiento y vacunas disponibles

El primer brote de EC se dio en el año 1920 en el suroeste de África pero rápidamente se extendió por el resto del mundo [9] (Figura 6). A lo largo de los años se han desarrollado diferentes métodos de diagnóstico de esta enfermedad. El método inicial para detectar ORFV en lesiones sospechosas de EC consistió en el análisis mediante microscopía electrónica de transmisión. En esta observación se buscan las características típicas de los viriones de este virus en cuanto a su morfología, como su forma ovoide y la presencia en la superficie de estructuras tubulares que lo asemejan a un ovillo de lana [7]. Otro método utilizado se basa en la histopatología. En este caso se buscan a nivel microscópico cambios en la piel que estén relacionados con la infección por ORFV como por ejemplo la inflamación de los queratinocitos [13]. Un método de detección que se ha utilizado en los últimos años es la PCR, donde se busca amplificar el gen B2L que codifica para la proteína p42K presente en la envoltura viral [16].

El tratamiento del EC se basa en tratar las lesiones causadas por la enfermedad mediante el uso de distintos antisépticos o de antibióticos aplicados directamente sobre

la piel en presentación de gel, cremas o vía oral. El tratamiento con antibióticos se utiliza con el objetivo de evitar una infección secundaria de las lesiones ya existentes causada por bacterias, pero no es un tratamiento efectivo contra el ORFV [14]. Debido a esta falta de tratamiento efectivo la mejor opción contra esta enfermedad sería la vacunación.

Actualmente se han registrado dos tipos de vacunas contra el EC. Por un lado, vacunas con el virus vivo no atenuado y por otro lado vacunas con el virus vivo atenuado. La vacunación con virus no atenuados puede llevar a que se produzcan brotes en poblaciones de animales previamente sanos obteniendo el efecto contrario al deseado [9]. Por otro lado, la vacunación con virus vivos atenuados no genera una inmunidad completa y existe el riesgo de reversión de la virulencia [4]. Sin embargo, estas últimas suelen ser las vacunas elegidas por ser más seguras.

Dadas las desventajas que existen en ambos tipos de vacunas se está trabajando en el diseño de vacunas más modernas, vacunas de ADN y basadas en subunidades [14].

1.3 - Estrategias del ORFV para modular la respuesta inmune

1.3.1 - Respuesta inmune contra ORFV

ORFV tiene la capacidad de reinfectar aunque se haya generado una respuesta inmunitaria previa, generalmente presentando lesiones más leves y por un período de tiempo menor [17]. Ante la infección por ORFV la inmunidad mediada por células tiene un papel fundamental y se ha demostrado que los anticuerpos tienen poco poder protector. Las células que son reclutadas al sitio de infección son neutrófilos, linfocitos T CD8, CD4, linfocitos B y células dendríticas. La respuesta inmune que se genera es de tipo Th1 y por lo tanto se da un aumento en la producción de citoquinas como IL-2, IL-12 e IFNγ [18].

1.3.2 - Proteínas moduladoras del virus Orf - Factores de virulencia

Los ORFV se caracterizan por codificar un gran número de proteínas capaces de interferir con la respuesta inmune de las células infectadas, modificando tanto el ambiente intracelular como extracelular [13]. Esta clase de proteínas son conocidas como factores de virulencia (Figura 7). Los genes relacionados con la virulencia no son esenciales para la replicación viral pero si lo son para la infección. Dentro del genoma viral estos genes generalmente se ubican sobre los extremos. Estas son regiones no conservadas dentro del genoma lo cual conduce a una rápida evolución y adaptación del ORFV para facilitar la infección [9].

A continuación, se presentan algunos de los factores de virulencia identificados en ORFV.

Proteína de unión a quimioquinas virales (CBP):

Esta proteína es codificada por el gen correspondiente al marco de lectura abierto ORF112 y se une competitivamente a quimioquinas de tipo CC con alta afinidad a pesar de no tener similitudes con la secuencia de los receptores celulares para quimioquinas [19]. Esta unión impide la quimiotaxis inducida por las quimioquinas y evita de esta forma el reclutamiento de células dendríticas y monocitos al sitio de la infección. Interfiere en la respuesta tipo Th1 [20].

• Factor de crecimiento endotelial vascular viral (vVEGF):

vVEGF es una proteína codificada por el ORF132 y es homóloga a la proteína VEGF de mamíferos. Al igual que en los mamíferos, esta proteína cumple un rol importante en la estimulación de la proliferación de células endoteliales vasculares. Este aumento en la proliferación celular sumado a la inhibición de la apoptosis, genera que existan más receptores para el virus favoreciendo su replicación [20].

• <u>IL-10 viral (vIL-10):</u>

La IL-10 es codificada por el ORF127 y cumple la misma función inmunosupresora y antiinflamatoria que su homólogo en mamíferos. Impide la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-8, IFN γ y TNF α inhibiendo la inflamación. Tanto la inmunidad innata como la adaptativa se ven afectadas por la acción de esta citoquina [9].

• Factor de resistencia al interferón (VIR):

Se trata de un ortólogo del gen E3L en VACV y es codificado por el ORF020. Este factor se une al ARN doble hebra (ARNdh) evitando que ocurra la inhibición de la síntesis de proteínas virales y la degradación del ARNdh propias del estado antiviral inducido por interferón. Mediante este mecanismo de evasión de la respuesta inmune se da la síntesis de proteínas virales y la replicación viral [7].

Factor inhibidor de la proteína GM-CSF (GIF):

La proteína GIF es codificada por el ORF117 y su función es inhibir al factor de proliferación GM-CSF (del inglés *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*) y a la IL-2. GM-CSF es una hematopoyetina y su función durante la respuesta inmune es estimular la producción de neutrófilos, monocitos, macrófagos y eosinófilos. Además, también participa en el reclutamiento y activación de estas células. Por otro lado, la IL-2 se encarga de estimular la proliferación de células T y células NK [7].

• Fosfatasa de Tyr (OH1):

OH1 es una fosfatasa de tirosina homóloga a VH1 en VACV. Se demostró que VH1 modula la respuesta inmune de la célula inhibiendo la vía de señalización JAK-STAT de respuesta al IFNγ [21]. En el siguiente apartado, profundizaremos en las características de este factor de virulencia, que ha sido objeto de estudio por nuestro grupo de investigación y constituye el eje central de esta tesina.



Figura 7. Representación esquemática de algunos factores de virulencia del ORFV. En la imagen se representa con puntos negros a las partículas virales presentes dentro de las células epiteliales. Se indican con diferentes colores los distintos factores de virulencia y sus blancos celulares por medio de flechas. Rojo: Factor de crecimiento endotelial viral (vVEGF) - células endoteliales. Verde: Proteína de unión a quimioquinas virales (CBP). Azul: IL-10 viral (vIL-10) - Macrófagos, células dendríticas y células T. Naranja: Factor inhibidor de la proteína GM-CSF. Violeta: Factor de resistencia al interferón (VIR). Imagen adaptada de [18].

1.4 - Fosfatasa de Tyr del ORFV: OH1

1.4.1 - Vía de señalización JAK-STAT

La vía JAK-STAT (Figura 8) es una vía de señalización mediada por proteínas quinasas. Los componentes principales de esta vía son JAK (JAK1, JAK2, JAK3), STAT (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B, STAT6) y receptores transmembrana de citoquinas presentes en las células infectadas. Por medio de esta señalización se transmite información desde el exterior celular luego de la unión de citoquinas y factores de crecimiento a receptores transmembrana y conduce a que en el núcleo de esta célula se active la transcripción de determinados genes [22]. Los interferones son citoquinas que cumplen un rol fundamental en la inhibición de la replicación viral. En el caso de infección por virus IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ y IFN- ω e IFN γ son esenciales en la respuesta inmune. Estas proteínas se liberan ante la infección y llevan a la activación de la vía de señalización JAK-STAT [23].

En el caso de IFNy el paso inicial es la unión de esta citoquina liberada ante la infección viral a los receptores transmembrana que forman parte de la membrana plasmática de la célula infectada. Esta unión produce que el receptor de IFNy sufra un cambio conformacional que conduce a su dimerización y a la posterior activación de las quinasas de Tyr JAK que se encuentran asociadas a los dominios intracelulares de cada uno de los monómeros del receptor (JAK1 y JAK2). La activación de JAK se da por transfosforilación en residuos de Tyr específicos [24]. Una vez que JAK está activada, es capaz de fosforilar al receptor en residuos de Tyr que van a servir como sitios de anclaje para el dominio de unión a fosfotirosina de STAT1 (SH2) [25]. STAT1 es reclutado y posteriormente es fosforilado en el residuo de Tyr701 por acción de JAK. Esta fosforilación facilita la formación de dímeros de STAT1 de forma paralela mediante la interacción de la Tyr701 fosforilada de un monómero con el SH2 del otro monómero. Finalmente estos homodímeros de STAT1 son translocados al núcleo donde se unen a una secuencia consenso denominada GAS en los promotores de los genes estimulados por IFNy. Entre los genes activados por STAT1 se encuentran genes involucrados en la respuesta inmune antiviral y genes supresores de tumores [24].



Figura 8. Representación de la vía de señalización JAK-STAT. (A) Unión de citoquinas y factores de crecimiento extracelulares al receptor transmembrana. **(B)** Esta unión lleva a un cambio conformacional en el receptor y a la fosforilación de la proteína JAK que se encuentra asociada al dominio intracelular del receptor. JAK fosforila a la proteína STAT que dimeriza y se transloca al núcleo donde regula la expresión de determinados genes. Imagen adaptada de [22].

Existen varios virus que han desarrollado mecanismos para la inhibición de la vía de señalización JAK-STAT. Un ejemplo de esto es el virus de la Hepatitis C que inhibe la fosforilación de STAT1 [21]. El virus Herpes simple tipo 1 también logra inhibir la vía JAK-STAT inhibiendo la fosforilación de STAT1 y la expresión del receptor de IFNγ [26].

En el caso del virus Vaccinia se demostró que la fosfatasa de Tyr VH1 es capaz de inhibir la activación de la vía JAK-STAT en células estimuladas con IFNγ desfosforilando STAT e impidiendo su translocación al núcleo [23]. A partir de estudios previos se propuso un mecanismo en dos pasos para la formación del complejo de STAT5 con la fosfatasa de Tyr homóloga en humanos VHR (Figura 9). El primer paso de este mecanismo consiste en la interacción de la tirosina fosforilada de VHR con el dominio SH2 de STAT5. El segundo corresponde a la desfosforilación de la Tyr de STAT5. Este proceso es facilitado por el primer paso del mecanismo que logra que se dé el acercamiento de la fosfotirosina al sitio activo de VHR [27]. En este estudio además se

menciona que la interacción entre VH1 y STAT1 sería similar al mecanismo planteado anteriormente.



Figura 9. Representación esquemática del mecanismo en dos pasos planteado para la interacción entre VHR y STAT5. En la figura se muestran los dominios de unión a fosfotirosina de STAT5 (SH2). La tirosina fosforilada de VHR (pY138) interactúa con el dominio SH2 de STAT5 reclutandolo. Esta interacción genera un desplazamiento de la tirosina fosforilada de STAT5 (pY694) que facilitará su desfosforilación al acercarla al sitio activo de VHR. Imagen adaptada de [27].

Con respecto a ORFV se vio una relación lineal entre la desfosforilación del residuo de Tyr701 de STAT1 y la dosis de MOI (multiplicidad de infección) de ORFV utilizada para la infección. En células que fueron transfectadas con OH1 se observó una disminución de STAT1 fosforilado. A partir de estas observaciones se demostró que OH1 inhibe la vía JAK-STAT mediante el mismo mecanismo que VH1 [21].

1.4.2 - OH1: generalidades y análogo en Virus Vaccinia

Las fosfatasas de tirosina de doble especificidad (DSP) se caracterizan por ser capaces de desfosforilar residuos de fosfotirosina pero además desfosforilan residuos de fosfoserina y de fosfotreonina. VH1 es una DSP codificada por el gen H1 del virus Vaccinia y fue la primera fosfatasa de este tipo en ser caracterizada. A partir de esto, se han logrado caracterizar otras DSP similares a VH1 y que tienen en común su mecanismo catalítico (Figura 10). Las DSP comparten el mecanismo catalítico con las fosfatasas de tirosina clásicas, pero se diferencian morfológicamente de estas debido a la profundidad de su sitio activo, siendo menos profundo para el caso de las DSP [28].



Figura 10. Mecanismo catalítico de las fosfatasas de Tirosina. (A) Complejo enzima-sustrato (**B**) Intermediario fosfo-enzima. La reacción entre la fosfatasa de tirosina y el sustrato se da en dos pasos. Primero el ataque nucleofílico de la cisteína al grupo fosfato de la tirosina, generando la formación del intermediario cisteinil fosfato y la acción del aspartato actuando como ácido. El segundo paso de esta reacción corresponde a la hidrólisis del intermedio donde interviene una molécula de agua, un residuo de glutamina y el aspartato actuando como base para lograr liberar el fosfato. Imagen extraída de [29].

Nuestro grupo de investigación ha trabajado desde el año 2006 con ORFV obteniendo una gran cantidad de información sobre distintos aspectos del mismo. Se logró confirmar que OH1 es una DSP que además de desfosforilar fosfotirosina, es capaz de desfosforilar in vitro moléculas de fosfatidil inositol fosfato [30]. En un estudio previo realizado en células HeLa infectadas con ORFV, se observó una inhibición en los genes de respuesta al IFNy y una reducción en los niveles de fosforilación de STAT1 en la Tyr701. Para verificar si estos cambios se debían a la acción de una fosfatasa, se trató a las células con un inhibidor de fosfatasas de tirosina. Se observó que en presencia de este inhibidor, los niveles de fosforilación de STAT1 no disminuían y por lo tanto se concluyó que estos cambios se debían a una fosfatasa de tirosina de ORFV [21]. Por último, resultados obtenidos por nuestro grupo, lograron confirmar que en células HeLa que expresaban OH1 ocurría la desfosforilación de STAT1 en la Tyr701 y que esto afectaba la translocación de STAT1 al núcleo [31]. Si bien esto último se logró observar, hacen falta ensayos adicionales para su confirmación realizando más controles y utilizando diferentes mutantes de OH1 para evaluar su efecto en la translocación de STAT1.

1.4.3 - OH1: estructura

A partir de estudios previos del grupo se logró resolver la estructura cristalográfica de la fosfatasa de Tyr OH1 de ORFV (Figura 11). Esta caracterización fue importante para estudios posteriores relacionados con el rol de OH1 en la modulación de la respuesta inmune y para realizar modelos de interacción de OH1 con otras proteínas. La estructura resuelta es similar a la estructura de VH1 en cuanto a la presencia de las hélices α , diferenciándose principalmente por la orientación de la hélice α 1 y por la forma de estabilización del dímero. Se demostró que OH1 es un dímero tanto en el cristal como en solución y que este dímero está estabilizado por un puente disulfuro intermolecular que involucra a la Cys15 ubicada en la hélice α 1 (Figura 11C). Debido al posicionamiento de todas las hélices α que forman parte de la estructura de OH1, también podría contribuir con la estabilización del dímero una posible interacción hidrofóbica entre las hélices α 1 y α 5 [32].

En la Figura 11 A se muestra en color violeta la inserción de seis aminoácidos característica de la fosfatasa de los *Parapoxvirus*. Debido a su cercanía a la hélice α 1, es posible que el residuo de glutamina presente en esta inserción sea capaz de interaccionar con la misma. Por otro lado, en la figura 11 B se muestra un acercamiento al sitio catalítico del mutante de OH1 inactivo donde se ven los tres residuos que forman parte del este: Asp81 (D81), Arg118 (R118) y Ser112 (S112) sustituyendo a la Cys112 presente en el sitio activo de OH1 salvaje.



Figura 11. Estructura de OH1. (A) Estructura general del dímero de la fosfatasa OH1. Se observa la hélice α 1 en naranja, una inserción de 6 aminoácidos en violeta, otra inserción de dos aminoácidos (RG) en magenta, el bucle P en verde, el bucle WPD en amarillo y por último el bucle α 1- β 1 en rojo. Imagen extraída de [30]. **(B)** Acercamiento al sitio catalítico. El ion fosfato está representado como sticks de color naranja. Se muestran y se etiquetan los residuos que interactúan con este ión. **(C)** Acercamiento al puente disulfuro. Se logra observar el puente disulfuro presente entre las Cys15 de cada monómero responsable de estabilizar al dímero. Imágenes extraídas de [32] y [30].

1.4.4 - Interacción entre OH1 y STAT1

A partir de ensayos previos realizados por el grupo se logró demostrar que existe una interacción entre OH1 y STAT1. Mediante ensayos de *substrate trapping* se logró aislar a STAT1 empleando un mutante inactivo de OH1 (OH1_{C112S}), evidenciando así una interacción directa.



Figura 12. Representación del modelo de interacción entre OH1 y STAT1. En la figura de la izquierda se muestra el dímero de STAT1 interaccionando con el dímero de OH1. En la figura de la derecha se muestra un acercamiento al sitio donde ocurre esta interacción. En naranja se representa la hélice a5 de OH1 dentro de la cual se encuentra el residuo Tyr152 fosforilado (pTyr152). En gris se muestra el residuo de Tyr701 fosforilado (pTyr701) de uno de los monómeros de STAT1. En violeta se muestra el dominio de unión a fosfotirosina (SH2) del otro monómero de STAT1 y en celeste el residuo de Arg602 que forma parte de SH2. Imagen cedida por M. Berois, manuscrito en evaluación (Porley D., Olivero-Deibe N., Segovia D., Margenat M., Villarino A., André G., Berois M. "STAT1 is a physiological substrate of the Orf virus OH1 phosphatase").

En cuanto al mecanismo de interacción entre OH1 y STAT1, nuestro grupo propuso un modelo de dos pasos basado en resultados experimentales propios y en estudios previos sobre VHR y STAT5 [27]. Dos hallazgos experimentales sustentan el modelo propuesto: primero, los ensayos de *substrate trapping* donde la interacción OH1-STAT1 no se ve afectada por un inhibidor competitivo de fosfatasas, el ortovanadato de sodio. Segundo, tanto la expresión de la fosfatasa $OH1_{WT}$ como la del mutante inactivo $OH1_{C112S}$, afectaron de igual manera la translocación de STAT1 al núcleo en células HeLa inducidas con IFN- γ . Ambos apoyan la idea de que la interacción entre OH1 y STAT1 se da en un sitio diferente al sitio activo de OH1 [31].

Mediante un análisis de acoplamiento y dinámica molecular de la interacción entre OH1 y STAT1 se llegó a un modelo de interacción donde estaría implicada la Tyr152 en la hélice α5. En este modelo se propone que el residuo de Tyr152 fosforilado de OH1, compite con el residuo de Tyr701 fosforilado de STAT1 por la interacción con el residuo

de Arg602 presente en el dominio SH2 de otro monómero de STAT1 (Figura 12). Debido a esta interacción la Tyr701 fosforilada presente en STAT1 se ve desplazada y queda orientada de tal forma tal que la misma se acerca al sitio catalítico de OH1 facilitando su desfosforilación. Se trata de un modelo que además de explicar la interacción entre ambas proteínas, logra explicar la razón de que OH1 forme dímeros: un monómero sería el encargado de desfosforilar el residuo de Tyr701 mientras que el otro monómero sería el responsable de estabilizar el bucle que contiene a esta tirosina.

Basándonos en la hipótesis de que la interacción entre OH1 y STAT1 sigue un mecanismo en dos pasos, donde el primer paso involucra a la Tyr152 de OH1, este trabajo busca aportar nueva evidencia para evaluar esta propuesta.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo general

 Contribuir al estudio del mecanismo de interacción entre OH1 y STAT1 mediante la evaluación de la translocación nuclear de STAT1 en un modelo de células HeLa que expresan OH1 salvaje o sus variantes.

2.2 - Objetivos específicos

- Producir los vectores plasmídicos que portan el gen de OH1 salvaje y sus variantes.
- Optimizar en células HeLa el ensayo de transfección con los vectores plasmídicos correspondientes y posterior inducción con IFN-γ.
- Evaluar la localización subcelular de STAT1 en células HeLa transfectadas mediante detección por inmunofluorescencia indirecta.

3 - MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 - Obtención de los plásmidos de interés

3.1.1 - Vectores plasmídicos utilizados

Para la posterior realización de los ensayos de transfección se utilizaron seis vectores plasmídicos pHSV diferentes como se detalla en la Tabla 1. El plásmido pHSV cuenta de 6248 pares de bases (pb) y contiene un bloque de expresión que permite la inserción del gen de interés. En la Figura 13 se representa de forma esquemática el casete de expresión del plásmido pHSV-IRES-EGFP el cual va a ser utilizado como plásmido control en los ensayos de transfección.



Figura 13. Esquema del casete de expresión contenido en el plásmido pHSV-IRES-EGFP (Control). Se indican el promotor temprano del virus Herpes 1 (IE4/5), el sitio de clonaje donde se inserta el gen de OH1, el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) y el gen de la proteína verde fluorescente (EGFP) como reportero.

El plásmido pHSV-IRES-EGFP posee un sitio de clonaje que se encuentra a continuación del promotor temprano de Virus Herpes Simple tipo 1 (IE4/5). Además, también cuenta con un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) seguido del gen que codifica para la proteína verde fluorescente (EGFP) como reportero con el objetivo de poder visualizar las células que incorporen el plásmido. En estos vectores plasmídicos, el casete de expresión bicistrónico permite la producción de un ARNm que codifica tanto para EGFP como para la proteína de interés en tándem. De esta manera, la expresión de EGFP indica que la proteína clonada antes del IRES también está siendo expresada. Durante este ensayo, además del plásmido control se utilizaron cinco plásmidos más conteniendo como inserto la secuencia de OH1 salvaje y de cuatros mutantes de OH1 (Tabla 1). Todos los plásmidos utilizados fueron clonados anteriormente durante las tesis de Maestría de D. Porley [31] y de F. Parietti [33] y se encontraban almacenados en bacterias *E. coli* XL1 Blue recombinantes.

Tabla 1. Vectores plasmídicos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Inserto	Característica
pHSV-IRES-EGFP	-	Control negativo que no expresa la fosfatasa viral
pHSV-OH1-WT-IRES-EGFP	OH1	Expresa la fosfatasa salvaje
pHSV-OH1-C15S-IRES-EGFP	OH1 con mutación en la cisteína 15 sustituída por serina	Expresa un mutante de la fosfatasa en un residuo implicado en la dimerización de la fosfatasa.
pHSV-OH1-C112S-IRES-EGFP	OH1 inactiva sustituyendo a la cisteína catalítica por una serina	Expresa el mutante inactivo de la fosfatasa, incapaz de desfosforilar STAT1.
pHSV-OH1-Y151F-IRES-EGFP	OH1 con mutación en tirosina 151 sustituida por fenilalanina	Expresa una variante mutante de la fosfatasa en un residuo adyacente al que se postula como implicado en la interacción con STAT1.
pHSV-OH1-Y152F-IRES-EGFP	OH1 con mutación en tirosina 152 sustituida por fenilalanina	Expresa una variante mutante de la fosfatasa en el residuo que se postula como implicado en la interacción con STAT1.

Aunque el modelo de interacción de STAT1 y OH1 sugiere que la tirosina en la posición 152 (Tyr152) está implicada en este proceso, no se puede descartar la importancia de la tirosina adyacente en la posición 151 (Tyr151) ya que ambas están posicionadas en la hélice α 5. Por lo tanto, es posible que Tyr151 también esté participando en el reclutamiento de STAT1. Debido a esto, ambos mutantes OH1_{Y151F} y OH1_{Y152F} serán considerados en esta tesina.

3.1.2 - Amplificación y purificación de los plásmidos de interés

Inicialmente se amplificaron los plásmidos a utilizar que se encontraban almacenados en bacterias *E. coli* XL1 Blue recombinantes, mediante precultivos en medio LB conteniendo ampicilina 50 µg/mL (LB/ampicilina). Se dejó incubar toda la noche a 37 °C con agitación. Posteriormente, se inoculó 50 mL de LB/ampicilina con 250 µL de los precultivos generados anteriormente. Se incubó nuevamente toda la noche a 37 °C con agitación. Finalmente se realizó la cosecha de las células por medio de centrifugación a 4000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se descartó y se conservó el *pellet* a -20 °C hasta su posterior procesamiento.

La purificación de los plásmidos fue realizada mediante el kit comercial *PLED35 GenElute Endotoxin-free Plasmid Midiprep Kit* (Sigma-Aldrich, Figura 14). Este kit es útil para purificar plásmidos que posteriormente van a ser utilizados en ensayos de transfección debido a que se logra un alto grado de purificación y libre de endotoxinas, lo que permite aumentar la eficiencia de la transfección. Brevemente, se resuspendió el *pellet* de células obtenidas para luego proceder a la lisis alcalina con posterior neutralización. Después de la neutralización, se procedió a separar fases mediante centrifugación a 10.000 x g durante 30 minutos a 5 °C y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente, se agregó al lisado una solución para remover las endotoxinas y una vez obtenido el ADN libre de endotoxinas, se procedió a purificarlo aún más mediante adsorción a una columna. Luego de reiterados pasos de lavado y centrifugación, se realizaron alícuotas y se conservaron a -20 °C. Este procedimiento de purificación se realizó dos veces para cada plásmido a fin obtener la cantidad de ADN suficiente para los ensayos.



Figura 14. Representación esquemática del protocolo del kit utilizado. PLED35 GenElute Endotoxin-free Plasmid Midiprep Kit. Imagen extraída del manual de usuario de Sigma-Aldrich.

3.1.3 - Verificación de los plásmidos obtenidos

Los plásmidos purificados fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa con el objetivo de confirmar la presencia de ADN. Para realizar esta electroforesis se utilizó gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA 1X) y un buffer de carga 6X (glicerol 50%, azul de bromofenol 0,02%, xilencianol 0,002%). Se agregó *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen) como agente intercalante para su posterior visualización con luz ultravioleta. La electroforesis se realizó a 100 V durante 45 minutos.

Posteriormente se cuantificó el ADN purificado midiendo la absorbancia a 260 nm utilizando un espectrofotómetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific). Las concentraciones de ADN obtenidas se compararon con el resultado cualitativo obtenido de la electroforesis realizada anteriormente. Además, se evaluó la pureza del ADN mediante la relación entre las absorbancias a 260 nm y a 280 nm (A260/A280).

Finalmente, los plásmidos purificados se enviaron a secuenciar (Macrogen, Corea) para verificar si se trataba de los plásmidos esperados. Los cebadores utilizados para este análisis fueron IRES-REV y HSV-1-IE4-5 [31]. Las secuencias obtenidas se analizaron mediante alineamiento y comparación con la secuencia de OH1 salvaje la cual se obtuvo de GaneBank (KY651216.1) utilizando el Software BioEdit.

3.2 - Transfección de células HeLa con los plásmidos pHSV1

La línea celular HeLa deriva de una muestra de cáncer cérvico-uterino humano. Esta línea celular, se utilizó para la transfección con los plásmidos obtenidos y para evaluar la localización de STAT1 luego de realizar un ensayo de inmunofluorescencia indirecta.

3.2.1 - Pasaje y mantenimiento de la línea celular

La línea celular se mantuvo en botellas F25 a una temperatura de 37 °C en estufa con CO_2 al 5%. Como medio de cultivo se utilizó DMEM conteniendo 10% de suero fetal bovino (SFB), antibiótico/antimicótico comercial (penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL, anfotericina B 0,25 µg/mL, ATB/AM Gibco #15240-062) y 2 mM de L-Glutamina. El cultivo celular se observó a diario utilizando un microscopio invertido para controlar el crecimiento celular, la morfología de las células y su adherencia a la superficie. Cuando se consideró necesario se realizaron cambios de medio o pasajes celulares si se contaba con una densidad celular de aproximadamente 80%.

Para realizar los pasajes celulares, inicialmente se atemperaron a 37 °C el medio de cultivo y la solución de Tripsina 0,25 % EDTA 0,02 %. Esta proteasa digiere las proteínas de la membrana celular, disgregando el tapiz celular ya sea para mantenimiento o preparación de biosustratos para ensayos. Se descartó el medio y se agregó 1 mL de DMEM para realizar un lavado de las células. Luego se descartó y se agregó 1 mL de Tripsina. Se incubó 3-4 minutos a 37 °C para desprender las células de la superficie. Para verificar si las células se habían separado por completo se observó al microscopio invertido. Luego se agregó 4 mL de medio DMEM SFB 10% fresco y homogeneizamos la suspensión celular. Dependiendo de la concentración estimada de células iniciales, los pasajes se realizaron a una dilución 1:5 o 1:6. La cantidad deseada de la suspensión celular se pasó a una botella F25 nueva y se completó con medio DMEM SFB 10% fresco. El nuevo pasaje se incubó a 37 °C en las condiciones antes mencionadas.

3.2.2 - Transfección de células HeLa

Se realizaron los ensayos de transfección en placas de 24 pocillos. Se sembraron 12 pocillos con 5x10⁴ células HeLa en cada uno y los 12 pocillos restantes con 7X10⁴ células por pocillo aproximadamente. La placa se incubó toda la noche a 37 °C. Pasadas las 24 horas de incubación se realizó la transfección utilizando los seis plásmidos purificados. Todos los ensayos de transfección se realizaron por el método de lipofección. Este método utiliza Lipofectamina, un reactivo que está basado en liposomas cargados positivamente. Esta condición permite que los liposomas puedan formar complejos con los ácidos nucleicos debido a su carga negativa facilitando de esta forma la entrada de estos a la célula mediante fusión con la membrana plasmática [34].

Inicialmente se prepararon tubos y en cada uno se colocó 1 µg del ADN plasmídico correspondiente (0,5 µg por cada pocillo). Se agregó Optimem (Gibco #51985-034, stock 1x) en cada tubo para obtener un volumen final de 50 µL. Luego se agregó 1 µL de reactivo PLUS (Thermo Fisher, #15338100) por cada µg de ADN y se dejó incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Por otro lado, en otro tubo se colocó 24 µL de Lipofectamina LTX® (Thermo Fisher,#15338100, 1,5 µL por cada pocillo) y 400 µL de Optimem. Pasados los 10 minutos de incubación de los tubos con ADN plasmídico, en cada uno se agregó 50 µL del tubo conteniendo Lipofectamina y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Mientras, se lavaron los pocillos con 500 µL de Optimem y se colocó 400 µL de DMEM 2% SFB en cada pocillo. Finalmente, en los pocillos correspondientes se agregó por goteo 50 µL de la mezcla ADN - Lipofectamina y se incubó a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ durante toda la noche. Luego de ese tiempo en el cual se espera la expresión de OH1, las células fueron inducidas con IFNy para simular la respuesta inmune de la célula ante una infección por virus. Se agregaron 0,4 U de IFNy por cada pocillo diluído con Optimem 1% SFB. La dilución de IFNy se agregó directamente sobre el medio utilizado para la transfección y se dejó incubar 30 minutos a 37 °C y 5% de CO₂.

En base a los resultados observados, se decidió continuar con los siguientes ensayos de transfección utilizando placa de 96 pocillos siguiendo el protocolo realizado en la tesis de Maestría de D. Porley [31].

Se sembraron 36 pocillos con tres concentraciones diferentes de células HeLa en cada uno. La placa se incubó toda la noche a 37 °C y CO_2 5%. Al día siguiente se observó la densidad celular en las tres condiciones sembradas y se decidió realizar la transfección por duplicado en las dos condiciones que presentan la mejor densidad celular recomendada para estos ensayos (alrededor de 80%). Para comenzar con la

29

transfección, se prepararon tubos y en cada uno se colocó 0,8 µg del ADN plasmídico correspondiente (0,2 µg por cada pocillo). Se agregó Optimem en cada uno de los tubos hasta obtener un volumen final de 20 µL. Luego se agregó 1 µL de reactivo PLUS y se dejó incubar 10 minutos a temperatura ambiente. Por otro lado, en otro tubo se colocó 4,8 µL de Lipofectamina LTX® (0,2 por cada pocillo µL) junto con 120 µL de Optimem. Pasados los 10 minutos de incubación de los tubos con ADN plasmídico, en cada uno se agregó 20µL del tubo conteniendo Lipofectamina y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, en los pocillos correspondientes se agregó por goteo 10 µL de Ia mezcla ADN - Lipofectamina y se incubó a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ durante toda la noche. Pasadas las 24 horas de incubación, las células fueron estimuladas agregando sobre el medio 0,2 U de IFNγ por cada pocillo diluído con Optimem 1% SFB. Se dejó incubar 30 minutos a 37° C y atmósfera con 5% CO_2 .

3.3 - Ensayo de inmunofluorescencia indirecta

Al finalizar cada ensayo de transfección, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta para evaluar la localización subcelular del factor de transcripción STAT1. Se utilizó el protocolo puesto a punto por D. Porley en el marco de su tesis de Maestría [31].

Se utilizó un anticuerpo primario anti-STAT1 (Cell Signaling, #14994) y un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a cianina 3 (Thermo Scientific, A10520). Inicialmente, se retiró el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con PBS. Luego se fijaron las células utilizando paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se realizaron dos lavados más con PBS y luego se procedió a permeabilizar utilizando metanol enfriado a -20 °C durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se lavó una vez más con PBS y luego se realizó un paso de bloqueo con PBS - 2% BSA - 0,3% Tritón X-100 y se dejó incubar 1 hora a temperatura ambiente. Una vez finalizado el bloqueo, se retiró la solución de los pocillos, se agregó el anticuerpo primario diluido 1:400 o 1:500 en PBS - 0,3% BSA - 0,1% Tritón X-100 y se incubó toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se realizaron tres lavados con PBS - 0,1% Tritón X-100 y luego se agregó el anticuerpo secundario diluido 1:1000 en PBS - 0,3% BSA - 0,1% Tritón X-100. Se incubó 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda y protegido de la luz. Luego se realizaron tres lavados con PBS - 0,1% Tritón X-100, dos lavados con PBS y un lavado con agua MiliQ. Una vez que los pocillos estaban secos, en algunos de los ensayos realizados se agregó DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente se lavaron los pocillos con agua MiliQ y se dejaron secar. La placa se conservó a 4 °C y oscuridad y los días posteriores se observaron los resultados. Para visualizar las placas se utilizó un microscopio de epifluorescencia BioRad, ZOE Fluorescent Cell Imager. Los vectores plasmídicos utilizados expresan EGFP, lo que permite seleccionar las células que emiten fluorescencia verde para evaluar en ellas la localización de STAT1. En los casos en los que se utilizó DAPI, se pueden observar los núcleos en color azul y evaluar la localización de STAT1 respecto al núcleo. En los ensayos en los que no se utilizó DAPI, la localización de STAT1 se pudo evaluar observando la morfología de los focos fluorescentes rojos: nucleares o difusos. Para facilitar la visualización de los resultados, se tomaron imágenes en los tres canales de fluorescencia y luego se solaparon para poder compararlas. En cada uno de los ensayos y para cada uno de los plásmidos utilizados, se realizó un conteo de los focos fluorescentes observados y se discriminó a los mismos según la localización de STAT1.

3.4 - Análisis de datos

Finalmente se realizó una tabla conteniendo los resultados obtenidos y posteriormente se procedió a analizar los mismos mediante gráficos realizados utilizando el software GraphPad Prism 9 y análisis estadísticos (tablas de contingencia y test exacto de Fisher).

4 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 - Verificación de los plásmidos obtenidos

Se realizaron dos rondas de purificación de los seis plásmidos de interés a partir de las respectivas *E. coli* XL1 Blue recombinantes, como se describe en la sección 3.1.2. Para verificar los plásmidos obtenidos y evaluar su calidad se realizó una electroforesis en gel de agarosa (Figura 15) y se cuantificaron midiendo su absorbancia a 260 nm (Tabla 2).

	Purif	icación 1	Purif	icación 2
	Volumen (µL)	Concentración (ng/µL)	Volumen (µL)	Concentración (ng/µL)
pHSV-IRES-EGFP (Control)	850	20,7	800	53,2
pHSV-OH1-WT-IRES-E GFP	850	41,5	800	29,9
pHSV-OH1-C15S-IRES -EGFP	*	8,9	600	107,8
pHSV-OH1-C112S-IRE S-EGFP	850	22,7	800	44,3
pHSV-OH1-Y151F-IRE S-EGFP	550	16,2	500	33,8
pHSV-OH1-Y152F-IRE S-EGFP	650	157,9	**	**

Tabla 2. Concentración y volumen obtenido de los plásmidos purificados en cada ensayo.

*Ocurrió un error en el proceso de purificación y no eluyó todo el volumen en la columna. El volumen obtenido fue mínimo. **No fue necesario volver a purificar el plásmido pHSV-OH1-Y152F-IRES-EGFP, se utilizó el purificado inicialmente.

Como se muestra en la Tabla 2, se observó que durante la primera purificación las concentraciones obtenidas fueron muy bajas para todos los plásmidos excepto para el pHSV-OH1-Y152F-IRES-EGFP lo cual coincidió con lo observado en el gel. Además, para el caso del plásmido pHSV-OH1-C15S-IRES-EGFP no se obtuvo un volumen suficiente para realizar los ensayos de transfección posteriores. Por este motivo se decidió volver a realizar el procedimiento de amplificación y purificación de todos los plásmidos con excepción del pHSV-OH1-Y152F-IRES-EGFP.

En general, se puede observar un aumento en las concentraciones de los plásmidos purificados como se muestra en la Tabla 2. Para el caso de los plásmidos

pHSV-OH1-WT-IRES-EGFP y pHSV-OH1-C112S-IRES-EGFP, mediante la medida de la absorbancia a 260 nm logramos observar que la concentración del plásmido pHSV-OH1-WT-IRES-EGFP fue mayor en la primera purificación mientras que la del plásmido pHSV-OH1-C112S-IRES-EGFP lo fue en la segunda.

En la figura 15 se observa el resultado de la electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos del segundo ensayo de purificación y el plásmido pHSV-OH1-Y152F-IRES-EGFP obtenido en la primera purificación.



Figura 15. Electroforesis gel de agarosa 1%. Los plásmidos analizados fueron en pHSV-OH1-Y151F-IRES-EGFP pHSV-OH1-Y152F-IRES-EGFP (OH1-Y151F), (OH1-Y152F), pHSV-OH1-C15S-IRES-EGFP (OH1-C15S), pHSV-OH1-C112S-IRES-EGFP(OH1-C112S), pHSV-IRES-EGFP(CONTROL) y pHSV-OH1-WT-IRES-EGFP (OH1-WT). Como marcador de pb se utilizó GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). Las imágenes fueron obtenidas visualizando el gel bajo luz ultravioleta.

La banda principal de los plásmidos migró a lo que correspondería a su conformación lineal (aproximadamente 6 kb), excepto en el carril del plásmido control (pHSV-IRES-EGFP), cuyo tamaño es mayor a 10 kb y se correspondería con la conformación circular. No se observó fragmentación en los plásmidos, lo cual indica que las preparaciones fueron de buena calidad. Además, fue evaluada la pureza de los plásmidos mediante la relación de la absorbancia a 260 nm y a 280 nm (A260/280). Los valores de A260/280 fueron mayores a 1,8 para los plásmidos pHSV-IRES-EGFP, pHSV-OH1-WT-IRES-EGFP, pHSV-OH1-C112S-IRES-EGFP y pHSV-OH1-Y152F-IRES-EGFP, lo cual indica una pureza óptima. Por otro lado, para los plásmidos pHSV-OH1-C15S-IRES-EGFP y pHSV-OH1-Y151F-IRES-EGFP los valores de A260/280 obtenidos fueron levemente menores al óptimo (1,74 y 1,77

respectivamente) indicando un posible grado de contaminación con trazas de proteínas u otros compuestos aromáticos.

Cómo último paso para la verificación de los plásmidos obtenidos los mismos se enviaron a secuenciar (Macrogen, Corea) para confirmar que tengan el inserto esperado. En base a la observación de los resultados se decidió secuenciar los plásmidos pHSV-OH1-Y152F-IRES-EGFP y pHSV-OH1-WT-IRES-EGFP de la primera purificación y los plásmidos pHSV-IRES-EGFP, pHSV-OH1-C15S-IRES-EGFP, pHSV-OH1-C112S-IRES-EGFP y pHSV-OH1-Y151F-IRES-EGFP obtenidos en la segunda purificación. En la Figura 16 se observa el alineamiento de las secuencias obtenidas con la secuencia codificante de la fosfatasa salvaje extraída de GenBank (KY651216.1). Para el procesamiento de las secuencias se utilizó el Software BioEdit. Como se observa en las Figuras 16 y 17 los insertos de cada plásmidos coinciden con lo esperado. Para la secuencia de OH1_{WT}, esta coincide exactamente con la secuencia de referencia KY651216.1 del gen OH1 de la cepa UY11/07, clonada por Danilo Segovia [30]. En el mutante OH1_{C15S} se observa una mutación en la posición 43 que cambia el codón TGC por AGC, lo que sustituye el residuo 15 de cisteína por serina. Para el mutante OH1_{C112S} la mutación ocurre en el residuo 112, donde el codón TGC se modifica a TCC, reemplazando también la cisteína por serina. En los mutantes OH1_{Y151E} y OH1_{Y152F}, las posiciones 452 y 455 muestran mutaciones que cambian el codón TAC por TTC, resultando en la sustitución de tirosina por fenilalanina en los residuos 151 y 152 respectivamente. Los plásmidos enviados a secuenciar fueron los utilizados para realizar los ensayos posteriores.

		1					
KY651216.1 Orf	AGGGGGA	10 AAGAG GAG	20		40 5	0 60	GGGGCC
VAwt IRES-rev		AAGAG <mark>C</mark> GAG	GG A G		GCTG A G G		
VA12 IRES-rev		AAGAG GAG	GG A G		GGTGCAGCG	GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
VA151 IRES-rev VA152_IRES-rev	A GGG GAT	AAGAGOGAG			GGTG A G G		GC
KY651216.1 Orf		80 GGGCANGACG	90 GGC A	100 GGACCA GTGTA		CAGGAC GCG	30 CCCCCCC
VAwt IRES-rev VA15 IRES-rev		GGG <mark>CA</mark> GACG GGGCAGGACG	GG Z A	GGA A G G G A GGA A G G G A	GGG AG G	GAGGA G G GAGGA G G	G G G G T G G G G G T
VA112 IRES-rev VA151 IRES-rev		GGCA GA G		GGACA GTGTA		GAGGA G G	G G G G
VA152 IRES-rev	CIECCORC	GGG <mark>A GA</mark> G	GGCA	GGA A G G A	GGG AG G	GAGGAGG	GGGGG
	140	150	160	170	180	190	200
KY651216.1 Orf	G G GGGG	GGACEGG	GGA		TAACATGACCA	GTOCAAGTAC	GACGCC
VAwt IRES-rev VA15 IRES-rev		GGACTCC GG	G GAC	CAAG GCC GG			GACGCC
VA112 IRES-rev VA151 IRES-rev	G G G G G G G G G G G G G G G G G G G	GGACICOGG GGACICOGG	G GA GI GA		PTAACATGACCA PTAACATGACCA	IGICOAAGIA IGICOAAGIA	GACGCC GACGCC
VA152_IRES-rev	GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	GGACCGG	GGAC	CAAG GCC GG	AACA GACCA	GCCAAGAC	GACGCC
	210	220	230	240	250	260	270
KY651216.1 Orf	G GGGGA	LAA GG GTA LAA GG GTA		GAGAGA G	ACGACAAGACGZ ACGACAAGACGZ		AT ATG
VA15 IRES-rev	G GGGGA		CCACATT	GOTGAGAGA G			
VA112 IRES-rev VA151 IRES-rev	G GGGGA	AA GG G A	COACATT	G GAGAGA G		ACATEGETTE	ALATC
VAISZ IRES-IEV	00000A	AA 00 0 A	UCAURTT.	O ADADA O	A OA AAOA OF		A A O
	280	290	30	0 310	320	330	340
KY651216.1 Orf VAwt IRES-rev		290 IGAAGOIGO IGAAGOIGO	GG G G GG G G	0 310 GAGG GAG	320 AGAAGCCACG AGAAGCCACG	330 CLOGIGCACIG	340 GIGG G
KY651216.1 Orf VAwt IRES-rev VA15 IRES-rev VA112 IRES-rev		290 GAAG TG GAAG TG GAAG TG GAAG TG	GG G G GG G G GG G G GG G G	0 310 GAGG GAG GAGG GAG GAGG GAG GAGG GAG GAGG GAG	320 AGAAG A G AGAAG A G AGAAG A G AGAAG A G	330 CTCC COACTC CTCC COACTC CTCC COACTC CTCC COACTC CTCC COACTC	340 G GG G G GG G G GG G G GG G G GG G
KY651216.1 Orf VAwt IRES-rev VA15 IRES-rev VA112 IRES-rev VA151 IRES-rev VA152 IRES-rev		290 GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G	30 GG G G GG G G GG G G GG G G GG G G GG G G	0 310 GAGG GAG GAGG GAG GAGG GAG GAGG GAG GAGG GAG GAGG GAG	320 AGAAG A G AGAAG A G AGAAG A G AGAAG A G AGAAG A G AGAAG A G	330 CTCG G AC G CTCG G AC G	340 G GG G G G GG G G G GG G G G GG G G G GG G
KY651216.1 Orf VAwt IRES-rev VA15 IRES-rev VA112 IRES-rev VA151 IRES-rev VA152 IRES-rev		290 GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G	30 GC C C GC C C GC C C GC C C GC C C	0 310 GAGG GAG GAGG GAG GAGG GAG GAGG GAG GAGG GAG GAGG GAG	320 AGAAG A G AGAAG A G AGAAG A G AGAAG A G AGAAG A G AGAAG A G	330 CT G G A G A G G A G A G G A G A CT G G A G A CT G G A G CT G G A G CT G G A G CT G G A G	340 G GG G G G GG G G G GG G G G GG G G G GG G
KY651216.1 Orf VAwt IRES-rev VA15 IRES-rev VA12 IRES-rev VA151 IRES-rev VA152_IRES-rev KY651216.1 Orf	280 C G G T G C G G G T G C G T G G T G G T G C G G T G G T G G T G G T G C G G T G G G T G G T G G T G G G T G G G T G G G T G G G G T G	290 GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G GAG G G AG G G G G G		0 310 CAGG GAG GAGG GAG CAGG GAG GAGG GAG CAGG GAG GAGG GAG 370 380 A GGG A G G	320 AGAAG A G AGAAG A G 390 A G A AAG GG	330 330 30 30 30 30 30 30 30 30	
KY651216.1 Orf VAwt IRES-rev VA15 IRES-rev VA112 IRES-rev VA151 IRES-rev VA152_IRES-rev KY651216.1 Orf VAwt IRES-rev VA15 IRES-rev	280 G G T G G G T G 350 G G AA G G AA	290 GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G G AG GG G G AG GG G		0 310 CAGG GAG GAGG GAG CAGG GAG CAGG GAG CAGG GAG CAGG GAG A GGG A GAG A GGG A GAG	320 AGAAG A G AGAAG A G AGA AAG G A G A AAG GG	330 G G G A G G G G G A G 400 G G G A G 400 G G G A GA G G G G A GA G G G A GA G G G G A GA G G G G A GA G G G G G G GA G G G G G G GA G G G G G GA G G G G GA G G G G GA G G G G G GA G G G G G GA G G G G G GA G G G G GA G G G G G GA G G G G GA G G G G GA G G G G GA G G G G GA G G G G G G G GA G G G G G G G GA G G G G G G G G G G GA G G G G G G G G G G G G G G G G G G G	
KY651216.1 Orf VAwt IRES-rev VA15 IRES-rev VA151 IRES-rev VA152_IRES-rev VA152_IRES-rev VA152_IRES-rev VA15 IRES-rev VA15 IRES-rev VA151 IRES-rev	280 G G G T G G G T G G G T G G G T G G G T G 350 G T AA G G AA G G AA G G AA G G AA	290 GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G GAG G G AG G G AG G G AG G G AG G G AG G G G G G AG G G G G G AG G G G G		00 310 CT GAGG GAG CT GAGG GAG CT GAGG GAG CT GAGG GAG CT GAGG GAG CT GAGG GAG CT GAGG GAG A GGGGTA GTG A GGGGTA GTG A GGGGTA GTG A GGGGTA GTG A GGGGTA GTG	320 AGAAG A G AGAAG A G AG A AAG G A G A AAG G A G A AAG G A G A AAG G	330 330 330 340 340 340 340 340	
KY651216.1 Orf VAwt IRES-rev VA15 IRES-rev VA151 IRES-rev VA152_IRES-rev VA152_IRES-rev VA151 IRES-rev VA151 IRES-rev VA151 IRES-rev VA151 IRES-rev VA151 IRES-rev	280 G G T G G G T G 350 G G AA G G AA G G AA G G AA G G AA G G AA	290 GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G G AG G		0 310 CAGG GAG CAGG GAG CAGG GAG CAGG GAG CAGG GAG CAGG GAG CAGGG A GAG A GGGG A GAG	320 AGAAG A G AGAAG A G AGA AAG G A G A AAG G	330 330 330 330 340 340 340 34000 3400 3400 3400 3400 3400 3400 3400 3400 3400 3400	
KY651216.1 Orf VAwt IRES-rev VA15 IRES-rev VA151 IRES-rev VA152 IRES-rev VA152 IRES-rev VA152 IRES-rev VA15 IRES-rev VA15 IRES-rev VA151 IRES-rev VA151 IRES-rev VA152 IRES-rev	280 G G G T G G G G T G G G G T G G G G T G G G G T G 350 G G AA G G AA G G AA G G AA G G AA G G AA G G AA	290 GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G GAG GG G AG GG G G AG G G G		0 310 CI GAGG GAG CI GAGG GAG CI GAGG GAG CI GAGG GAG CI GAGG GAG CI GAGG GAG CI GAGG A GIG A GGGG A GIG	320 AGAAG A G AGAAG A G AG A AAG G A G A AAG A AAG G A AAG A AAG G A AAG A A AAG A AAG A AAG A A AAG A AAG A AAG A AAG A A AAG A A	330 330 330 330 330 330 330 330	
KY651216.1 Orf VAwt IRES-rev VA15 IRES-rev VA151 IRES-rev VA152 IRES-rev VA152_IRES-rev VA152_IRES-rev VA155 IRES-rev VA155 IRES-rev VA152_IRES-rev VA152_IRES-rev VA152_IRES-rev VA152_IRES-rev VA152_IRES-rev	280 G G G T G G G T A S G A G G C C C C G G C C C C G C C C C G G C C C C G C C C C C C C C C C C C C C C C C C	290 GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G G AG GG G		00 310 01 GAGG GAG 02 GAGG GAG 03 GGGG GG 04 GGGG A 05 A GGG 04 GGGG A 05 A GGG 05 A GGG 06 GGGG A 07 0 380 08 08 08 08 08 08 08 08 08 08 08 08 08 08 08 08 08 08 08 08	320 AGAAG A G AGAAG A G AG A AAG GG A G A AAG GG	330 330 330 330 330 330 330 330	
KY651216.1 Orf VAwt IRES-rev VA15 IRES-rev VA151 IRES-rev VA152_IRES-rev VA152_IRES-rev VA151 IRES-rev VA151 IRES-rev VA151 IRES-rev VA152_IRES-rev VA152_IRES-rev VA152_IRES-rev VA151_IRES-rev VA15_IRES-rev VA15_IRES-rev VA15_IRES-rev	280 G G G T G G G T A 350 G T A G G A G A	290 GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G G AG G G G G G G AG G G G G G		00 310 01 GAGG GAG 01 GGGG A 02 GGGG A 03 GGGG A 04 GGGG A 04 GGGG A 040 4 440 040 4 A 040 C AAAA	320 AGAAG A G AGAAG A G AG A AAG G A G A AAG G A A AG G A A AG G A	330 330 330 330 330 330 330 330	
KY651216.1 Orf VAwt IRES-rev VA15 IRES-rev VA151 IRES-rev VA152_IRES-rev VA152_IRES-rev VA152_IRES-rev VA151 IRES-rev VA151 IRES-rev VA151 IRES-rev KY651216.1 Orf VAwt IRES-rev VA152 IRES-rev VA151 IRES-rev VA151 IRES-rev VA151 IRES-rev	280 G G G T G G G G T G G G G T G G G G T G G G G T G 350 G T AA G G AA 42 A GA G AG A G A G AG A GA G AG	290 GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G GAG G G AG G G AG G G AG G G AG G G AG G G G G G G G G G G G G G G G G		0 310 CI GAGG GAG CI GAGG GAG CI GAGG GAG CI GAGG GAG CI GAGG GAG CI GAGG GAG CI GAGG A GIG A GGGG A GIG A GGG A GIG A GIG A GGG A GIG A GIG A GGG A GIG A GIG A GIG A GIG A GIG A GIG A GIG A G	320 AGAAG A G AGAAG G AGA AAG AGA AAG G AGA AAG AGA AAG G AGA AAG AAG	330 330 330 330 330 330 330 330	
KY651216.1 Orf VAwt IRES-rev VA15 IRES-rev VA151 IRES-rev VA152 IRES-rev VA152_IRES-rev VA152_IRES-rev VA155 IRES-rev VA151 IRES-rev VA151 IRES-rev VA152_IRES-rev VA152_IRES-rev VA151_IRES-rev VA151_IRES-rev VA151_IRES-rev VA152_IRES-rev VA152_IRES-rev VA152_IRES-rev	280 G G G T G G G G T G G G G T G G G G T AA G G A AA G G G A AA G G G A AA G G G AA G A G AA G AA G A G AA G	$\begin{array}{c} 290\\ \text{GAAG} & \text{G}\\ \text{GAG} & \text{G}\\ \text{GG} & \text{GG} & \text{GG} & \text{GG} & \text{G}\\ \text{GG} & \text{GG} & \text{GG} & \text{GG} & \text{GG}\\ \text{GG} & \text{GG} & \text{GG} & \text{GG} & \text{GG}\\ \text{GG} & \text{GG} & \text{GG} & \text{GG} & \text{GG} & \text{GG}\\ \text{GG} & \text{GG} & \text{GG} & \text{GG} & \text{GG} & \text{GG}\\ \text{GG} & \text{GG} & \text{GG} & \text{GG} & \text{GG} & \text{GG}\\ \text{GG} & \text{GG} & \text{GG} & \text{GG} & \text{GG} & \text{GG}\\ \text{GG} & \text{GG} & \text{GG} & \text{GG} & \text{GG} & \text{GG} & \text{GG} \\ \text{GG} & $		00 310 11 GAGG GAG 12 GAGG GAG 1370 380 GA 14 GGGG GG 14 GGGG GG 14 GGGG GG 14 GGGG A 140 4	320 AGAAG A G AGAAG A G AGA AAG G A G A AAG A AAG G A G A AAG A A AAG A A AAG A A AAG A	330 330 30 30 30 30 30 30 30 30 30 30 30	340 GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
KY651216.1 Orf VAwt IRES-rev VA15 IRES-rev VA151 IRES-rev VA152_IRES-rev VA152_IRES-rev VA151 IRES-rev VA151 IRES-rev VA151 IRES-rev VA152_IRES-rev VA152_IRES-rev VA151 IRES-rev VA151 IRES-rev VA151 IRES-rev VA151 IRES-rev VA152_IRES-rev	280 G G G T G G G T G G G T G G G T G G G T A 350 G T AA G G A G T AA G G A G A A A G A G G A G A G A G A A G A G A G A G A G A A G A G A G A G A G A G A A G A G A G A G A G A G A G A G A G A G	290 GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G G AG G		00 310 01 GAGG GAG 02 GAGG GAG 03 800 A 04 GGGG A 04 A GGGG 04 A GGGG 04 A GGGG 04 A GAGG 04 A GAGG 04 A GAGGG 04 <td< td=""><td>320 AGAAG A G AGAAG A G A G</td><td>330 330 330 330 330 330 330 330</td><td></td></td<>	320 AGAAG A G AGAAG A G A G	330 330 330 330 330 330 330 330	
KY651216.1 Orf VAwt IRES-rev VA15 IRES-rev VA151 IRES-rev VA152_IRES-rev VA152_IRES-rev VA152_IRES-rev VA151 IRES-rev VA151 IRES-rev VA152 IRES-rev VA152 IRES-rev VA152 IRES-rev VA151 IRES-rev VA151 IRES-rev VA151 IRES-rev VA152_IRES-rev VA152_IRES-rev VA152_IRES-rev VA152_IRES-rev	280 G G G T G G G G A A G G G A G G A A G	290 GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G G AG GG G G AG G G G		0 310 CI GAGG GAG CI GAGG GAG CI GAGG GAG CI GAGG GAG CI GAGG GAG CI GAGG GAG CI GAGG A CI GAGA CI GAGG A CI GAGA CI GAG	320 AGAAG A G AGAAG A G AGA AAG G G AGA G AGA AAG G G AGA AAG G G AGA AAG G G AGA AAG G G AGA G AAG AAG	330 330 330 330 330 330 330 330	
KY651216.1 Orf VAwt IRES-rev VA15 IRES-rev VA151 IRES-rev VA152 IRES-rev VA152_IRES-rev VA152_IRES-rev VA155 IRES-rev VA155 IRES-rev VA151 IRES-rev VA152_IRES-rev VA152_IRES-rev VA151_IRES-rev VA151_IRES-rev VA152_IRES-rev VA152_IRES-rev VA152_IRES-rev VA152_IRES-rev VA152_IRES-rev VA152_IRES-rev VA152_IRES-rev VA152_IRES-rev VA151_IRES-rev VA151_IRES-rev VA151_IRES-rev VA151_IRES-rev VA151_IRES-rev VA151_IRES-rev VA151_IRES-rev VA151_IRES-rev	280 G G G T G G G G T AA G G G AA G AA G G G AA G	290 GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G GAAG G G AG GG G G G G G		00 310 01 GAGG GAG 02 GAGG GAG 03 GGGG GGG 04 GGGG A 05 A GGGG 04 GGGG A 05 A GGGG 04 GGGG A 05 A GGGG 04 GAG AAAA 04 A AAAA 05 A AAAA 04 A A 05 A AAAA 04 A A 05 A A 04 A A 05 A </td <td>320 AGAAG A G AGAAG A G AGA AAG G AGA G AAG G AGA AAG AAG</td> <td>330 330 330 330 330 330 330 330</td> <td></td>	320 AGAAG A G AGAAG A G AGA AAG G AGA G AAG G AGA AAG AAG	330 330 330 330 330 330 330 330	

Figura 16. Alineamiento de secuencias. Alineamiento de la secuencia codificante de la fosfatasa OH1 (GenBank - KY651216.1) y de los insertos de los plásmidos pHSV-OH1-WT-IRES-EGFP (VAwt IRES-rev), pHSV-OH1-C15S-IRES-EGFP (VA15 IRES-rev), pHSV-OH1-C112S-IRES-EGFP (VA112 IRES-rev), pHSV-OH1-Y151F-IRES-EGFP (VA151 IRES-rev) y pHSV-OH1-Y152F-IRES-EGFP (VA152 IRES-rev) respectivamente. En blanco se ven las posiciones en las que existen mutaciones en la secuencia. Datos procesados utilizando el Software BioEdit.



Figura 17. Alineamiento de aminoácidos. Alineamiento de los aminoácidos de la fosfatasa OH1 (GeneBank - KY651216.1) y de los insertos de los plásmidos pHSV-OH1-WT-IRES-EGFP (VAwt IRES-rev), pHSV-OH1-C15S-IRES-EGFP (VA15 IRES-rev), pHSV-OH1-C112S-IRES-EGFP (VA112 IRES-rev), pHSV-OH1-Y151F-IRES-EGFP (VA151 IRES-rev) y pHSV-OH1-Y152F-IRES-EGFP (VA152 IRES-rev) respectivamente. Datos procesados utilizando el Software BioEdit.

4.2 - Puesta a punto del ensayo de translocación nuclear de STAT1

Previo a comenzar con los ensayos de transfección utilizando todos los plásmidos purificados, se realizó una puesta a punto del protocolo en placa de 96 pocillos con el plásmido control (pHSV-IRES-EGFP) para lo que se adaptó el protocolo utilizado durante la tesis de Maestría de D. Porley [31]. En esta puesta a punto se buscó optimizar el protocolo tanto para la transfección de células HeLa como para el ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI). En cuanto a la transfección se evaluó la cantidad de ADN y de lipofectamina utilizados, así como la densidad celular al momento del ensayo. Para el caso de la inmunofluorescencia indirecta se buscó evaluar la dilución de los anticuerpos utilizados. También fue útil para realizar determinados controles que confirmaran si la estimulación de las células con IFNy se realizaba correctamente.

El ensayo de transfección se realizó utilizando una placa de 96 pocillos y sembrando tres diferentes concentraciones iniciales de células según el diseño de placa presentado en la Figura 18.



Figura 18. Diseño de placa para la puesta a punto del ensayo de transfección en células HeLa. Se muestran los pocillos en diferentes colores dependiendo de la cantidad de células sembradas inicialmente. Los pocillos en blanco no fueron utilizados. Los números en los pocillos refieren a las tres condiciones utilizadas durante el ensayo: (1): transfección con el plásmido Control e inducción con IFNy (2): transfección con el plásmido Control e inducción con IFNy.

La placa se incubó toda la noche a 37 °C en estufa con CO_2 al 5%. Al día siguiente, luego de observar las células utilizando un microscopio invertido se decidió continuar con el ensayo de transfección en los pocillos con menor concentración inicial de células. Basándonos en el protocolo detallado en la sección 3.2.2, se decidió utilizar para la transfección 0,3 µL de Lipofectamina y 0,15 µg de plásmido por cada pocillo. Para evaluar el medio a utilizar se colocó en la placa diferentes cantidades de Optimem (100 µL en columnas 2 y 5 o 150 µL en columnas 1 y 4) o DMEM SFB 2% (100 µL en columnas 3 y 6) para seleccionar la mejor opción. Luego de realizada la transfección se incubó a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO_2 durante toda la noche. Al día siguiente la placa fue observada utilizando un microscopio de epifluorescencia con el objetivo de verificar si la transfección se había dado de forma correcta.



Figura 19. Imágenes de células HeLa a las 24 horas posteriores a la transfección. Imágenes obtenidas para células transfectadas con pHSV-IRES-EGFP **(A)** Visualización de las células transfectadas con el plásmido Control (EGFP - canal verde). **(B)** Visualización de todas las células HeLa (campo claro - Canal blanco). **(C)** Combinación de las imágenes A y B (Merge). Imágenes obtenidas utilizando el microscopio de epifluorescencia (BioRad, ZOE Fluorescent Cell Imager).

Tras 24 horas de realizado el ensayo, se observó, como se muestra en la figura 19, un gran número de focos fluorescentes verdes, lo que corresponde a la expresión de EGFP y, por tanto, a una transfección exitosa.

Pasado esa etapa, las células se estimularon con IFNγ y luego de 30 minutos se procedió al ensayo de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo primario anti-STAT1 y un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a cianina 3, como se detalla en la sección 3.3. Luego de la permeabilización la placa se conservó a 4 °C para continuar el día siguiente con el protocolo. La placa se conservó a 4 °C y oscuridad y los días posteriores se analizaron los resultados utilizando el microscopio de epifluorescencia.

En esta puesta a punto se evaluó el efecto del IFNy sobre la localización subcelular de STAT1 realizando un control con células HeLa sin estimular. Como se detalla en la sección 1.4.1, ante una infección viral el IFNy, entre otras citoquinas, cumple un rol fundamental en la respuesta inmune al ser capaz de activar la vía de señalización JAK-STAT. Esta vía consiste en una cascada de señalización mediada por proteínas quinasas cuyo último paso es la formación de dímeros de STAT que son translocados al núcleo donde regulan la transcripción de genes específicos involucrados en la respuesta antiviral. Por lo tanto, en las células que fueron estimuladas con IFNy se espera ver una localización nuclear de STAT1 mientras que en las no estimuladas STAT1 se encontraría en el citoplasma.



Figura 20. Comparación entre las células HeLa estimuladas con IFNγ y las no estimuladas. Imágenes obtenidas para los pocillos A4 (izquierda) y B4 (derecha). En ambos casos se realizó la transfección con el plásmido Control con la diferencia de la inducción o no con IFNγ (A4 y B4 respectivamente).

En la Figura 20 se comparan las células estimuladas con IFNγ (izquierda) y las no estimuladas (derecha). En las células estimuladas con IFNγ se logra ver una localización de STAT1 mayormente nuclear que se evidencia por mayor fluorescencia en esta zona y por la forma redondeada de los focos fluorescentes. Por otro lado, en las células que no fueron estimuladas con IFNγ la localización de STAT1 es difusa o citoplasmática. Estos resultados coinciden con los esperados para este ensayo. Sin embargo, para lograr una mayor estimulación decidimos aumentar a 0,2 U la dosis de IFNγ por pocillo (en este ensayo fue 0,14 U) en los ensayos posteriores.

Tras el ensayo de inmunofluorescencia, se observó una disminución de los focos fluorescentes verdes en comparación con los mismos pocillos antes del ensayo. Durante este ensayo se realizan una serie de lavados como fue detallado anteriormente que podrían haber afectado la cantidad de focos fluorescentes al desprender células que no se encontraran bien adheridas a la superficie de la placa. Por este motivo se decidió realizar los lavados suavemente y por goteo para evitar el desprendimiento celular. Además, también observamos más focos fluorescentes en los pocillos en que la transfección se realizó utilizando como medio de cultivo DMEM SFB 2%.

La figura 21 muestra detalladamente la localización subcelular de STAT1 en una célula transfectada con el plásmido Control, estimulada o no con IFNy. En general se observó que en las células transfectadas con el plásmido pHSV-IRES-EGFP y luego estimuladas con IFNy, la localización subcelular de STAT1 fue predominantemente nuclear. En cambio, en las células no estimuladas con IFNy, STAT1 presentó una localización difusa. Estos resultados demuestran que el plásmido pHSV-IRES-EGFP no es capaz de inhibir por sí mismo la translocación de STAT1 al núcleo, corroborando lo observado anteriormente en el grupo [31].



Figura 21. Células HeLa transfectadas y estimuladas o no con IFNγ. En ambos casos se realizó la transfección con el plásmido Control con la diferencia de la inducción o no con IFNγ. **(A)** Visualización de las células transfectadas con el plásmido Control (EGFP - canal verde). **(B)** Visualización de la localización subcelular de STAT1 (anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a cianina 3 (Thermo Scientific, A10520). - Canal rojo). **(C)** Combinación de las imágenes A y B (Merge).

Concluyendo con la puesta a punto, se consideró que la cantidad de células iniciales fue correcta para la realización del ensayo. Por lo tanto, en los posteriores ensayos de transfección, se sembraron estas tres dosis de células para evaluar el tapiz celular al día siguiente y elegir el más adecuado para continuar con la transfección. Se decidió utilizar las mismas cantidades de ADN y de lipofectamina que el protocolo utilizado durante la tesis de Maestría de D. Porley [31] para la transfección de células HeLa en placa de 24 pocillos y de 96 pocillos. Como medio de cultivo post- transfección se decidió utilizar DMEM SFB 2%. En cuanto a la estimulación con IFNγ se aumentó la dosis utilizada por pocillo para obtener mejores resultados. El ensayo de inmunofluorescencia indirecta funcionó correctamente, pero se decidió modificar el protocolo agregando un paso de bloqueo como se indica en la sección 3.3. Además se dejó de utilizar DAPI ya que la localización subcelular de STAT1 pudo observarse sin la necesidad de este marcador.

4.3 - Evaluación de la translocación nuclear de STAT1 en presencia de diferentes mutantes de OH1

El primer ensayo de transfección e inducción con IFN_Y fue realizado en placa de 24 pocillos siguiendo el protocolo planteado en la sección 3.2.2. Fueron utilizados los seis plásmidos purificados previamente y en todos los casos se realizó el ensayo por duplicado. Además, también se realizaron tres controles diferentes: transfección con el plásmido control sin inducir con IFN_Y, células solo con lipofectamina e inducidas con IFN_Y y células solamente inducidas con IFN_Y. El ensayo de inmunofluorescencia fue realizado tal cual se describe en la sección 3.3 pero sin el agregado de DAPI.

Inicialmente se evaluaron los controles para luego analizar la localización subcelular de STAT1 en las células que fueron transfectadas con los diferentes plásmidos. A partir de la observación de los controles y de los resultados obtenidos para los ensayos realizados con los seis plásmidos, se decidió realizar algunas modificaciones al protocolo para continuar con los demás ensayos de transfección. El primer ensayo se realizó utilizando 0,5 µg de ADN y 1,5 µL de lipofectamina por cada pocillo. Con el objetivo de obtener una mayor cantidad de focos fluorescentes se decidió para los siguientes dos ensayos, aumentar la cantidad de ADN colocando 0,75 µg en cada pocillo. Además, para disminuir el efecto citotóxico de la lipofectamina se decidió disminuir a 1,2 µL por pocillo. En los controles de inducción con IFNy, se observó una clara diferencia en la localización subcelular de STAT1 entre las células HeLa estimuladas y las no estimuladas. En las células estimuladas, la localización de STAT1 se identificó por la fluorescencia roja de forma redondeada en la zona del núcleo. Por otro lado, en las células no estimuladas la localización de STAT1 fue mayoritariamente difusa en todo el soma de la célula. Dado estos resultados se decidió continuar realizando la estimulación con IFNy de acuerdo a lo detallado en la sección 3.2.2. A pesar que para el ensayo 3 se utilizaron las mismas condiciones que para el ensayo 2, los resultados no fueron los mismos (ver tabla 5 en Apéndice 2). Se obtuvieron muy pocos focos fluorescentes que dificultó el conteo de estos. Esto puede deberse a que la baja densidad celular en el tapiz hizo que las cantidades de lipofectamina y ADN utilizadas afectaran más a las células, volviéndolas más propensas a desprenderse de la superficie de la placa. Por este motivo los resultados del ensayo 3 no fueron tomados en cuenta para el conteo y análisis estadístico de los datos obtenidos.

Por otro lado, los pocos resultados obtenidos en los primeros tres ensayos para los plásmidos pHSV-OH1-C15S-IRES-EGFP y pHSV-OH1-Y151F-IRES-EGFP (ver tabla 6 en Apéndice 2) podrían asociarse a la menor calidad de estos plásmidos. La presencia

de posibles contaminantes en las purificaciones podría haber llevado a una lectura incorrecta de la concentración de ADN, lo que habría afectado la cantidad de ADN utilizada en los ensayos de transfección. Esto podría explicar por qué los resultados con estos plásmidos fueron insuficientes, motivo por el cual se decidió excluirlos de los ensayos posteriores.

A partir de este punto, se iniciaron los ensayos de transfección en placas de 96 pocillos siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.2.2. Considerando lo mencionado anteriormente, se decidió utilizar los cuatro plásmidos más relevantes para cumplir con los objetivos de este estudio: pHSV-IRES-EGFP, pHSV-OH1-WT-IRES-EGFP, pHSV-OH1-C112S-IRES-EGFP y pHSV-OH1-Y152F-IRES-EGFP.

En todos los casos se realizaron dos controles diferentes por duplicado para verificar que la inducción con IFNy se haya dado de forma correcta y además en los ensayos 4 y 5, se realizó un control de transfección extra utilizando el plásmido pCDNA 3.1-EGFP. Luego de finalizada la transfección se realizó la estimulación con IFNy y el ensayo de inmunofluorescencia indirecta. Fueron realizados seis ensayos en placa de 96 pocillos. En todos los casos se utilizaron 0,2 µg de ADN y 0,2 µL de lipofectamina en cada pocillo siguiendo el protocolo planteado en la sección 3.2.2. Además, en uno de los ensayos se probó un método diferente para la realización de la transfección. En este método se utilizó *GeneJuice Transfection Reagent* (Novagen) con el objetivo de comparar el efecto en las células causado por la acción de la lipofectamina. Sin embargo, al comparar los resultados se obtuvo una mayor cantidad de focos fluorescentes en la transfección realizada con lipofectamina y por lo tanto se decidió continuar con este método en los ensayos de transfección posteriores. Se evaluaron los controles realizados y luego en cada caso se observó la localización subcelular de STAT1 en las células que fueron transfectadas con los diferentes plásmidos.

En la tabla 3 se presentan de forma resumida las condiciones utilizadas para todos los ensayos realizados las cuales se fueron optimizando de acuerdo con la observación de los resultados. En la Figura 22 se muestra a modo de ejemplo, los controles realizados en el ensayo N° 8 los cuales dieron según lo esperado.

Tabla 3.	Condiciones	utilizadas	en los	ensayos (de transfección.
----------	-------------	------------	--------	-----------	------------------

Ensayo	Placa	Plásmidos	Lipofectamina por pocillo (µL)	ADN por pocillo (µg)
1	p24	 pHSV-IRES-EGFP pHSV-OH1-WT-IRES-EGFP pHSV-OH1-C15S-IRES-EGFP pHSV-OH1-C112S-IRES-EGFP pHSV-OH1-Y151F-IRES-EGFP pHSV-OH1-Y152F-IRES-EGFP 	1,5	0,5
2	p24	 pHSV-IRES-EGFP pHSV-OH1-WT-IRES-EGFP pHSV-OH1-C15S-IRES-EGFP pHSV-OH1-C112S-IRES-EGFP pHSV-OH1-Y151F-IRES-EGFP pHSV-OH1-Y152F-IRES-EGFP 	1,2	0,75
3	p24	 pHSV-IRES-EGFP pHSV-OH1-WT-IRES-EGFP pHSV-OH1-C15S-IRES-EGFP pHSV-OH1-C112S-IRES-EGFP pHSV-OH1-Y151F-IRES-EGFP pHSV-OH1-Y152F-IRES-EGFP 	1,2	0,75
4	p96	 pHSV-IRES-EGFP pHSV-OH1-WT-IRES-EGFP pHSV-OH1-C112S-IRES-EGFP pHSV-OH1-Y152F-IRES-EGFP pCDNA 3.1 	0,2	0,2
5	p96	 pHSV-IRES-EGFP pHSV-OH1-WT-IRES-EGFP pHSV-OH1-C112S-IRES-EGFP pHSV-OH1-Y152F-IRES-EGFP pCDNA 3.1 	0,2	0,2
6	p96	 pHSV-IRES-EGFP pHSV-OH1-WT-IRES-EGFP pHSV-OH1-C112S-IRES-EGFP pHSV-OH1-Y152F-IRES-EGFP 	0,2	0,2
7	p96	 pHSV-IRES-EGFP pHSV-OH1-WT-IRES-EGFP pHSV-OH1-C112S-IRES-EGFP pHSV-OH1-Y152F-IRES-EGFP 	0,2	0,2
8	p96	 pHSV-IRES-EGFP pHSV-OH1-WT-IRES-EGFP pHSV-OH1-C112S-IRES-EGFP pHSV-OH1-Y152F-IRES-EGFP 	0,2	0,2
9	p96	 pHSV-IRES-EGFP pHSV-OH1-WT-IRES-EGFP pHSV-OH1-C112S-IRES-EGFP pHSV-OH1-Y152F-IRES-EGFP 	0,2	0,2



Figura 22. Controles realizados en el ensayo de transfección N° 8. (A) Células HeLa inducidas con IFNy. **(B)** Células HeLa no inducidas con IFNy.

En la Figura 23 se muestran algunas de las imágenes obtenidas en el ensayo N° 8 para cada uno de los plásmidos utilizados que es representativa de los resultados obtenidos para los demás ensayos realizados. Se logra observar una clara diferencia en la intensidad de fluorescencia y en la cantidad de focos fluorescentes verdes entre el plásmido control y los demás plásmidos obtenidos, siendo mayor en las células transfectadas con el plásmido control. Esta diferencia entre el plásmido control y los plásmidos que tienen el inserto puede deberse a que en el transcripto generado la proteína EGFP se encuentra luego del IRES generando que la expresión de esta proteína se vea afectada por tener antes el otro gen a ser traducido directamente desde la señal promotora. En particular en el caso del plásmido pHSV-OH1-WT-IRES-EGFP se obtuvieron pocos focos fluorescentes y las células visualizadas se vieron muy afectadas lo que causó dificultades al momento del conteo de eventos. Ambas observaciones coinciden con lo ya observado en el grupo [31],[33]. También se observó en general, que la cantidad de focos fluorescentes y la intensidad de esta fluorescencia fue directamente proporcional a la calidad del plásmido utilizado para la realización de la transfección. Como se observa en la Figura 23 A, en las células que fueron transfectadas con el plásmido control (pHSV-IRES-EGFP) y luego estimuladas con IFNy la localización subcelular de STAT1 fue mayormente nuclear.



Figura 23. Resultados obtenidos en el ensayo N° 8. (A) Transfección con el plásmido pHSV-IRES-EGFP (Control) (B) Transfección con el plásmido pHSV-OH1-WT-IRES-EGFP (C) Transfección con el plásmido pHSV-OH1-C112S-IRES-EGFP (D) Transfección con el plásmido pHSV-OH1-Y152F-IRES-EGFP. Se muestran las imágenes obtenidas para el canal verde (EGFP), rojo (STAT1) y la unificación de ambas imágenes (MERGE).

Tanto en las células transfectadas con el plásmido pHSV-OH1-WT-IRES-EGFP como en las transfectadas con el plásmido pHSV-OH1-C112S-IRES-EGFP (OH1 inactiva) se puede observar la inhibición de la translocación de STAT1 siendo su localización difusa (Figura 23 B y C). Por último, en la Figura 23 D se muestra una de las imágenes obtenidas para las células transfectadas con el plásmido pHSV-OH1-Y152F-IRES-EGFP. Como se observa en este caso, la localización subcelular de STAT1 fue mayoritariamente nuclear. Este resultado indica que al estar mutada la Tyr152, no se vio afectada la translocación de STAT1 al núcleo con respecto al control y esto apoya la hipótesis de que la Tyr152 estaría implicada en la interacción entre OH1 y STAT1.

4.4 - Análisis de los resultados obtenidos

Se realizaron un total de nueve ensayos, generando 5140 eventos en total. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, los resultados obtenidos con los plásmidos pHSV-OH1-C15S-IRES-EGFP y pHSV-OH1-Y151F-IRES-EGFP, así como la totalidad del tercer ensayo, fueron excluidos del análisis estadístico. Para el análisis de resultados se consideraron 5048 eventos que se presentan en la Tabla 4 y en el gráfico de la Figura 24.

Ensayo	pHSV-IRES	S-EGFP	pHSV-OH1 -EG	-WT-IRES FP	pHSV-OH1-C EGF	112S-IRES- P	pHSV-OH1-Y EGF	152F-IRES- P
	Nuclear	Difuso	Nuclear	Difuso	Nuclear	Difuso	Nuclear	Difuso
1	240 (88,6%)*	31	2 (28,6%)*	5	17 (48,6%)*	18	30 (81,1%)*	7
2	253 (60,5%)*	165	11 (34,4%)*	21	19 (38,8%)*	30	10 (100%)*	0
4	169 (74,4%)*	58	10 (38,5%)*	16	31 (48,4%)*	33	25 (83,3%)*	5
5	211 (64,7%)*	115	15 (44,1%)*	19	22 (40,7%)*	32	45 (78,9%)*	12
6	95 (67,9%)*	45	12 (46,2%)*	14	71 (43,8%)*	91	64 (75,3%)*	21
7	367 (59,7%)*	248	86 (45,5%)*	103	202 (43,4%)*	263	185 (76,8%)*	56
8	237 (73,8%)*	84	67 (50,0%)*	67	187 (49,9%)*	188	86 (86,0%)*	14
9	234 (65,9%)*	121	6 (37,5%)*	10	33 (28,9%)*	81	23 (69,7%)*	10

 Tabla 4. Conteo de la localización subcelular de STAT1.

*Valores correspondientes a los porcentajes de células con localización nuclear de STAT1.

La realización de tablas de contingencia y test exacto de Fisher permitió determinar si las diferencias observadas en el gráfico respecto a la localización subcelular de STAT1 eran o no estadísticamente significativas. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando los valores de p fueron menores a 0,05.



Figura 24. Localización subcelular de STAT1. En el gráfico se muestran los porcentajes de células con localización de STAT1 nuclear o difusa para las diferentes condiciones ensayadas, obtenidos a partir de ocho ensayos experimentales independientes, con un total de 5048 contabilizados. Se muestran las diferencias significativas y no significativas (ns) obtenidas mediante la realización de tablas de contingencia y aplicando test exacto de Fisher. Se consideran significativos los valores de p menores a 0,05. Tanto el análisis estadístico como el gráfico fueron realizados utilizando el Software GraphPad Prism 9.

Como se muestra en el gráfico de la figura 24, considerando los 5048 eventos contabilizados, el porcentaje de células en las cuales STAT1 se localizó en el núcleo fue del 67,6% para el plásmido control. Sin embargo, este porcentaje disminuyó por debajo del 50% tanto en las células transfectadas con el plásmido pHSV-OH1-WT-IRES-EGFP

(45,0%) como en las transfectadas con el plásmido portando OH1 inactiva pHSV-OH1-C112S-IRES-EGFP (44,2%) siendo esta diferencia significativa con respecto al control. Estos resultados están en concordancia con los ensayos realizados durante la tesis de Maestría de D. Porley [31], confirmando que tanto OH1_{WT} como su mutante inactivo OH1_{C112S} afectan la translocación de STAT1 al núcleo. Por otro lado, este hecho estaría apoyando la hipótesis de que la interacción entre OH1 y STAT1 se da en un sitio diferente al sitio activo de OH1. Con respecto a las células que fueron transfectadas con el plásmido pHSV-OH1-Y152F-IRES-EGFP, se observó que la localización nuclear de STAT1 fue de un 78,9%, siendo esta diferencia no significativa respecto al control, pero sí con respecto a los ensayos realizados con pHSV-OH1-C112S-IRES-EGFP y pHSV-OH1-WT-IRES-EGFP. Recientemente durante la tesis de Maestría de F. Parietti [33] fue realizado un ensayo utilizando este mutante. Aunque la cantidad de focos fluorescentes en ese caso no fue suficiente para sacar una conclusión, los resultados de este trabajo de tesina son consistentes con los resultados preliminares, ahora respaldados con mayor número de ensayos y análisis estadísticos. Los resultados de esta tesina confirman lo planteado en la sección 1.4.4, demostrando que la interacción entre OH1 y STAT1 involucraría al residuo Tyr152 de OH1, al no ocurrir dicha interacción, OH1_{Y152F} no impediría la translocación de STAT1 al núcleo.

5 - CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se logró cumplir el objetivo principal de este trabajo: evaluar la localización subcelular de STAT1 en células HeLa transfectadas con diferentes variantes del gen de OH1 y estimuladas con IFNγ.

Se logró purificar con éxito los plásmidos necesarios para los ensayos de transfección. Si bien se realizaron dos purificaciones para obtener una mayor cantidad de ADN y los ensayos se llevaron a cabo correctamente, la baja concentración de ADN afectó los resultados, obteniendo menos focos fluorescentes de lo esperado. A pesar de usar un kit adecuado que garantiza alta pureza, ausencia de endonucleasas y de endotoxinas, la cantidad de plásmidos recuperados no fue la esperada. Para mejorar este aspecto se podría considerar utilizar un método de purificación diferente o un kit comercial alternativo. Aun así, se logró optimizar el protocolo para la transfección de células HeLa, ajustando el método de referencia en función de los resultados observados.

Se observó una disminución en la cantidad y la intensidad de los focos fluorescentes en los plásmidos con inserto con respecto al plásmido control, que ya había sido reportado en ensayos anteriores del grupo de investigación. La disminución en la fluorescencia se debe al diseño del casete de expresión en los plásmidos utilizados, lo que afecta la expresión de EGFP cuando se incorpora un gen foráneo. Para obtener mejores resultados, se podría considerar modificar los plásmidos pHSV o utilizar un plásmido alternativo que no implique un casete bicistrónico.

Debido a los pocos datos obtenidos para los plásmidos pHSV-OH1-C15S-IRES-EGFP y pHSV-OH1-Y151F-IRES-EGFP no podemos realizar conclusiones sobre su efecto en la localización subcelular de STAT1. Queda pendiente evaluar el rol de la Cys15 y la dimerización de OH1 en la interacción con STAT1. En cuanto al plásmido pHSV-OH1-Y151F-IRES-EGFP, un ensayo preliminar realizado por el grupo mostró que no afecta la translocación de STAT1 al núcleo lo que es consistente con los limitados resultados obtenidos en este trabajo. No obstante, se requieren más ensayos para obtener datos suficientes que permitan un análisis estadístico confiable.

Se pudo confirmar que el porcentaje de células en las cuales STAT1 se localizó en el núcleo, fue significativamente menor en las células transfectadas con los plásmidos pHSV-OH1-WT-IRES-EGFP y pHSV-OH1-C112S-IRES-EGFP con respecto al control. Estos resultados demuestran que OH1 inhibe efectivamente la translocación de STAT1

al núcleo y respaldan la hipótesis de que lo hace al interactuar con un sitio distinto al sitio activo de OH1.

Por otro lado, se demostró que la translocación de STAT1 al núcleo no se ve afectada en las células transfectadas con el plásmido pHSV-OH1-Y152F-IRES-EGFP. Estos resultados apoyan la hipótesis planteada por el grupo que involucra a la Tyr152 en la interacción entre OH1 y STAT1. Es fundamental continuar con la caracterización del mutante OH1Y152F, incluyendo estudios de actividad enzimática y análisis estructural.

6 - REFERENCIAS

[1] McFadden G. (2005). "Poxvirus Tropism", Nature Reviews Microbiology, Vol. 3, N° 3. doi: 10.1038/nrmicro1099

[2] Abu Ghazaleh R., Al-Sawalhe M., Abu Odeh I., El Ibrahim J., Al-Turman B. and Makhamreh J. (2023). "Host range, severity and transboundary transmission of Orf virus (ORFV)", Infection, Genetics and Evolution Vol. 112. doi: 10.1016/j.meegid.2023.105448

[3] Pagallies F., Labisch J. J., Wronska M., Pflanz K. and Amann R. (2024). "Efficient and scalable clarification of Orf virus from HEK suspension for vaccine development", Vaccine: X, Vol. 18. doi: 10.1016/j.jvacx.2024.100474

[4] Li S., Jing T., Zhu F., Chen Y., Yao X., Tang X., Zuo C., Liu M., Xie Y., Jiang Y., Wang Y., Li D., Li L., Gao S., Chen D., Zhao H. and Ma W. (2023). "Genetic Analysis of Orf Virus (ORFV) Strains Isolated from Goats in China: Insights into Epidemiological Characteristics and Evolutionary Patterns", Virus Research Vol. 334. doi: 10.1016/j.virusres.2023.199160

[5] Olivero N. (2012). "Estudio de los Mecanismos Genéticos Implicados en la Variabilidad del Virus Causante del Ectima Contagioso en Ovinos"

[6] Srinivasan Rajsri K. and Rao M. (2022). "Poxvirus-driven human diseases and emerging therapeutics". doi: 10.1177/20499361221136751

[7] Haig D. M., McInnes C. J. (2002). "Immunity and counter-immunity during infection with the parapoxvirus orf virus", Virus Research Vol. 88. doi: 10.1016/s0168-1702(02)00117-x

[8] Peralta A., Flores-Olivares C., Verna A., González-Altamiranda E., Odriozola E., Madariaga C., Odeón A., König G. A. and Cantón G. (2023). "Identification and molecular characterization of Orf virus infection in occupationally exposed women in South America", Revista Argentina de Microbiología Vol. 55. doi: 10.1016/j.ram.2022.07.002

[9] Bala J. A., Balakrishnan K. N., Abdullah A. A., Mohamed R., Haron A. W., Abdullah Jesse F. F., Noordin M. M., Mohd-Azmi M. L. (2018). "The re-emerging of orf virus infection: A call for surveillance, vaccination and effective control measures", Microbial Pathogenesis Vol. 120. doi: 10.1016/j.micpath.2018.04.057

51

[10] Perdiguero B., Pérez P., Marcos-Villar L., Albericio G., Astorgano D., Álvarez E., Sin L., Gómez C. E., García-Arriaza J. and Esteban M. (2023). "Highly attenuated Poxvirus-Based vaccines against emerging viral diseases", Journal of Molecular Biology Vol. 435, N° 15. doi: 10.1016/j.jmb.2023.168173

[11] Joshi L. R., Mansano do Nascimento G. and Diel D. G. (2023). "The transcriptome of the parapoxvirus Orf virus reveals novel promoters for heterologous gene expression by poxvirus vectors", Virology Vol. 587. doi: 10.1016/j.virol.2023.109864

[12] Yu Y., Lian Z. and Cui Y. (2022). "The O–H system: A panorama view of the PPV-host interaction", Infection, Genetics and Evolution Vol. 98. doi: 10.1016/j.meegid.2022.105220

[13] Lacasta D., Cuadra M., Gómez A., Ortín A., Ruiz de Arcaute M., Ramos J. J., Villanueva-Saz S., Tejedor M. T., Ruiz H., Verde M., Reina R., Navarro T., Quilez P., Rodríguez-Largo A. and Windsor P. A. (2024). "Comparative study of three different routes of experimental inoculation of the orf virus", Small Ruminant Research Vol. 233. doi: 10.1016/j.small rum res.2024.107248

[14] Gómez A., Lacasta D., Tejedor M. T., Ruiz de Arcaute M., Ramos J. J., Ruiz H., Ortín A., Villanueva-Saz S., Reina R., Quílez P., Navarro T., Verde M., Borobia M. and Windsor P. A. (2024). "Use of a local anaesthetic and antiseptic wound formulation for the treatment of lambs naturally infected with Orf virus", Veterinary Microbiology Vol. 292. doi: 10.1016/j.vetmic.2024.110037

[15] Almeida da Costa R., Felipetto Cargnelutti J., Schild C. O., Furtado Flores E., Riet-Correa F. and Giannitti F. (2019) "Outbreak of contagious ecthyma caused by Orf virus (Parapoxvirus ovis) in a vaccinated sheep flock in Uruguay", Brazilian Journal of Microbiology Vol. 50. doi: 10.1007/s42770-019-00057-7

[16] Hosamani M., Bhanuprakash V., Scagliarini A. and Singh R.K. (2006). "Comparative sequence analysis of major envelope protein gene (B2L) of Indian Orf viruses isolated from sheep and goats", Veterinary Microbiology Vol. 116. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.04.028

[17] Onyango J., Mata F., McCormick W. and Chapman S. (2014). "Prevalence, risk factors and vaccination efficacy of contagious ovine ecthyma (orf) in England", Vet Rec. doi: 10.1136/vr.102353

[18] Bergqvist C., Kurban M. and Abbas O. (2017). "Orf virus infection", Medical Virology Vol. 27. doi: 10.1002/rmv.1932

[19] Heidarieh H., Hernáez B. and Alcamí A. (2015). "Immune modulation by virus-encoded secreted chemokine binding proteins", Virus Research Vol. 209. doi: 10.1016/j.virusres.2015.02.028

[20] Yamada Y., Chuang S., Tseng C., Liao G., Liu S., Tseng Y., Lin F. and Hsu W. (2023). "Deletion of gene OV132 attenuates Orf virus more effectively than gene OV112", Applied Microbiology and Biotechnology Vol. 107. doi: 10.1007/s00253-022-12323-0

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

[22] Miot H. A., Criado P. R., Silva de Castro C. C., Ianhez M., Talhari C. and Müller P. Ramos (2023). "JAK-STAT pathway inhibitors in dermatology", Anais Brasileiros de Dermatologia Vol. 98. doi: 10.1016/j.abd.2023.03.001

[23] Najarro P., Traktman P. and Lewis J. A. (2001). "Vaccinia Virus Blocks Gamma Interferon Signal Transduction: Viral VH1 Phosphatase Reverses Stat1 Activation", Journal of Virology Vol. 75. doi: 10.1128/JVI.75.7.3185–3196.2001

[24] Zamora-Salas S. X., Robles-Villarruel M. L., Macías-Silva M., Álvarez-Sánchez M. E. y Tecalco-Cruz A. C. (2023). "Interferón-gamma: vías de señalización y sus implicaciones en el cáncer", TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas Vol. 26. doi: 10.22201/fesz.23958723e.2023.533

[25] Gough D. J., Levy D. E., Johnstone R. W. and Clarke C. J. (2008). "IFNg signaling—Does it mean JAK–STAT?", Cytokine & Growth Factor Reviews Vol. 19. doi: 10.1016/j.cytogfr.2008.08.004

[26] Fleming S. B. (2016). "Viral Inhibition of the IFN-Induced JAK/STAT Signalling Pathway: Development of Live Attenuated Vaccines by Mutation of Viral-Encoded IFN-Antagonists", Vaccines Vol. 4. doi: 10.3390/vaccines4030023

[27] Jardin C. and Sticht H. (2012). "Identification of the Structural Features that Mediate Binding Specificity in the Recognition of STAT Proteins by Dual-Specificity Phosphatases", J Biomol Struct Dyn Vol. 29. doi: 10.1080/07391102.2012.10507413

[28] Koksal A. C., Nardozzi J. D. and Cingolani G. (2009). "Dimeric Quaternary Structure of the Prototypical Dual Specificity Phosphatase VH1", The Journal of Biological Chemistry Vol. 284. doi: 10.1074/jbc.M808362200

[29] Denu J. M., Stuckey J. A., Saper M. A. and Dixon J. E. (1996). "Form and Function in Protein Dephosphorylation" Cell Vol. 87. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81356-2

[30] Segovia D. (2016). "Caracterización estructural y funcional de la única fosfatasa del virus Orf", Tesis de Maestría, Universidad de la República (Uruguay), Facultad de Ciencias.

[31] 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.

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

[33] Parietti F. (2024). "Abordando el estudio de la interacción entre la fosfatasa OH1 del virus Orf y el factor de transcripción STAT1". Tesis de Maestría, Universidad de la República (Uruguay), Facultad de Ciencias.

[34] Dalby B., Cates S., Harris A., Ohki E. C., Tilkins M. L., Price P. J. and Ciccarone V. C. (2004). "Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications", Methods Vol. 33. doi: 10.1016/j.ymeth.2003.11.023

APÉNDICE 1 - Abreviaciones

ARNdh: ARN doble hebra

BSA: Albúmina de suero bovino (Bovine Serum Albumin)

CBP: Proteína de unión a quimioquinas (Chemokine Binding Protein)

Células NK: Células Natural Killer

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DSP: Fosfatasa de doble especificidad (Dual-Specificity Phosphatases)

EC: Ectima Contagioso

EDTA: Ácido Etilen Diamino Tetraacético (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid)

EEV: Virión Envuelto Extracelular (Extracellular Enveloped Virion)

EGFP: Proteína fluorescente verde mejorada (Enhanced Green Fluorescent Protein)

GAGs: Glucosaminoglucanos

GIF: Factor inhibidor de la proteína GM-CSF (GM-CSF-Inhibitory Factor)

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor)

IEV: Virión Envuelto Intracelular (Intracellular Enveloped Virion)

IFI: Inmunofluorescencia Indirecta

IFN: Interferón

IL-2: Interleuquina 2

IL-10: Interleuquina 10

IL-12: Interleuquina 12

IMV: Virión Maduro Intracelular (Intracellular Mature Virion)

IRES: Sitio interno de entrada al ribosoma (Internal Ribosome Entry Site)

ITRs: Repeticiones Terminales Invertidas (Inverted Terminal Repeat Sequences)

JAK: Quinasa de Janus (Janus Kinases)

LB: Caldo de Lisogenia (Lisogeny Broth)

ORFs: Marcos abiertos de lectura (Open Reading Frame)

ORFV: Virus Orf (Orf Virus)

PBS: Tampón fosfato-salino (Phosphate-Buffered Saline)

SFB: Suero Fetal Bovino

SH2: Dominio de unión a fosfotirosina (Src Homology 2)

STAT: Factor transductor de señales y activador de la transcripción (Signal Transducer and Activator of Transcription)

TAE: Tris-Acetato-EDTA

TNFα: Factor de necrosis tumoral alfa (Tumor Necrosis Factor alpha)

VACV: Virus Vaccinia (Vaccinia Virus)

VIR: Factor de resistencia al interferón

vVEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular viral (Viral Vascular Endotelial Growing Factor)

APÉNDICE 2 - Complemento Resultados

En las tablas 5 y 6 se presentan los resultados que no fueron tenidos en cuenta para la realización del gráfico de la figura 24 y para los análisis estadísticos posteriores.

Ensayo	pHSV-IRE	S-EGFP	pHSV-OH1 -EG	pHSV-OH1-WT-IRES -EGFP		pHSV-OH1-C112S-IRES -EGFP		1-Y152F- EGFP
	Nuclear	Difuso	Nuclear	Difuso	Nuclear	Difuso	Nuclear	Difuso
3	31	7	0	1	0	0	0	0

Tabla 5. Conteo de la localización subcelular de STAT1 para el ensayo 3.

Se presentan los resultados obtenidos para los plásmidos pHSV-IRES-EGFP, pHSV-OH1-WT-IRES -EGFP, pHSV-OH1-C112S-IRES-EGFP y pHSV-OH1-Y152F- IRES-EGFP para el ensayo de transfección número 3.

Tabla 6. Conteo de la localización subcelular de STAT1.

Ensayo	pHSV-OH1-C15	S-IRES -EGFP	pHSV-OH1-Y151	F- IRES-EGFP
	Nuclear	Difuso	Nuclear	Difuso
1	0	0	0	0
2	11	19	16	7
3	0	0	0	0

Se presentan los resultados obtenidos para los plásmidos pHSV-OH1-C15S-IRES -EGFP y pHSV-OH1-Y151F-IRES-EGFP para los ensayos de transfección 1 al 3.