

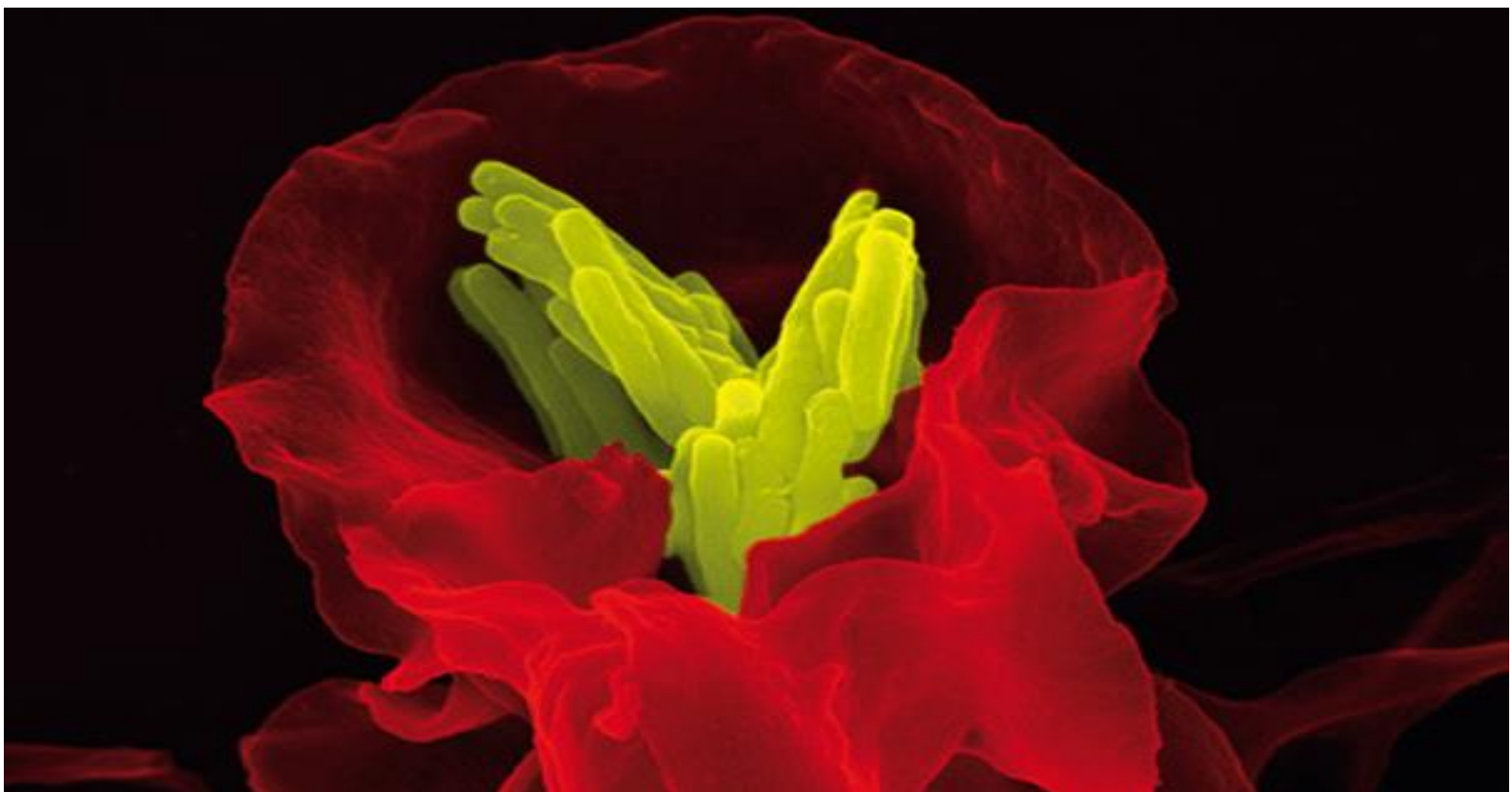
## Tesina de grado Licenciatura en Bioquímica

---

**Avances en la utilización de la estrategia de doble híbrido para la validación de la interacción entre la fosfatasa de tirosina PtpA de *Mycobacterium tuberculosis* y sus potenciales sustratos identificados.**

**Bach. Vivian Irving**

**Orientadoras: Dra. Andrea Villarino y Dra. Ana Ramón  
Sección Bioquímica y Biología Molecular  
Septiembre 2016**



A mi querida abuela Perla, mi "Nanny", por todo el amor y la alegría con que me cuidó, por ser la persona más linda que conocí y mi ejemplo a seguir.

## Resumen

*Mycobacterium tuberculosis (Mtb)*, agente causal de la tuberculosis, representa un importante problema de salud pública, siendo dicha enfermedad una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. *Mtb* es un patógeno intracelular el cual debe sortear diferentes barreras durante el proceso de infección. Existen estudios que demuestran que este tipo de patógenos introducen dentro de la célula infectada factores de virulencia, los cuales modulan vías de señalización del hospedero alterando sus respuestas celulares. En *Mtb* un ejemplo es la fosfatasa en tirosina, PtpA, para la cual existen evidencia de que se localiza en el citosol de macrófagos infectados. Si bien la importancia de esta fosfatasa ha sido reconocida, al día de hoy falta profundizar en los mecanismos moleculares subyacentes a su acción y en la interacción con sus posibles sustratos. Recientemente el grupo en el cual se enmarca el proyecto aisló e identificó, mediante una estrategia *in vitro*, cuatro proteínas eucariotas como potenciales sustratos o interactores de PtpA: la subunidad alfa de la proteína trifuncional mitocondrial, la sulfuro quinona oxidoreductasa mitocondrial, la subunidad alfa de la ATP sintasa mitocondrial y la 6-fosfofructoquinasa. En el presente trabajo avanzamos en la puesta a punto de la estrategia de doble híbrido en levadura con el objetivo de poder utilizar esta herramienta para validar la interacción, en un contexto celular, entre la PtpA y uno de los candidatos identificados, la proteína humana ECHA.

## Agradecimientos

En primera instancia quiero agradecer a la Dra. Andrea Villarino y a la Dra. Ana Ramón por haberme aceptado para realizar este trabajo, por todo el conocimiento transmitido y los momentos compartidos.

Quiero agradecer a mi familia, a mis padres y a mi hermano por todas las enseñanzas de vida, el amor, el cariño, y el apoyo incondicional en todas mis metas y sueños.

A Matias Maidana y Bibiana Nieves por haberme incluido en el proyecto PAIE con el cual inicié mi experiencia en el laboratorio.

A Mariana Margenat por la colaboración durante el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros de la 314, Susana Castro, Lorena Herrera, César García y Mauricio Castellano por su compañerismo y especialmente gracias a Danilo Segovia y Juan Marizcurrena por la ayuda y las tardes de reflexión cuando los resultados no eran los esperados.

Gracias a mi novio Ramiro Tambasco por ser mi gran compañero y apoyarme en todo momento alentándome a seguir adelante con su mirada positiva.

Por último quiero agradecer a todos mis amigos por estar siempre presente a lo largo de los años con alegría y entusiasmo.

# Abreviaturas

A o Ala: Alanina

ADN: ácido desoxirribonucleico

AM: ácidos micólicos

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ATP: Adenosín trifosfato

ATPA: subunidad alfa de la ATPsintasa

BCG: Bacille Calmette-Guérine

BrEt: bromuro de etidio

C o Cys: cisteína

cdc25H: cepa de *Saccharomyces cerevisiae* mutante. Esta cepa contiene una mutación puntual en el aminoácido 1328 del gen cdc25

Col I: fragmento de proteína colagenasa tipo IV de ratón (aminoácidos 148-375)

Csp: cantidad suficiente para

D o Asp: aspartato

dNTP: desoxinucleotidos trifosfato

DO: densidad óptica

DTT: ditioneitol

*E. coli*: *Escherichia coli*

ECHA (HADHA): subunidad  $\alpha$  de la proteína trifuncional humana

ECHB: subunidad  $\beta$  de la proteína trifuncional humana

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

GAL1: promotor inducible por galactosa

GDP: Guanosín difosfato

GSK3 $\alpha$ : Glycogen Synthase Kinase 3, subunit alpha

GTP: Guanosín trifosfato

hSos: proteína Sos humana, factor de intercambio de nucleótido de guanina

K6PP o PFK: 6-fosfofructoquinasa

k<sub>cat</sub>: constante catalítica

kDa: kilodalton

L o LEU: leucina

Lamin C: fragmento de la proteína Lamin C humana (aminoácidos 67-230)

LB: Lysogeny broth

LEU2: gen que codifica uno de los genes necesarios para la síntesis de leucina

LMW-PTP: Proteínas fosfatasa de tirosina de bajo PM

MafB: factor de transcripción humano MAFB

MDR-TB: cepa multi-resistentes de TB

min: minutos

*Mtb: Mycobacterium tuberculosis*

P-ADH1: promotor de expresión constitutiva

Pb: pares de base

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PM: peso molecular

pMyr: plásmido Myr

pSos: plásmido Sos

PTP: proteína fosfatasa en tirosina

PtpA: Proteína fosfatasa en tirosina A de *Mycobacterium Tuberculosis*

PtpB: Proteína fosfatasa en tirosina B de *Mycobacterium Tuberculosis*

P-Tyr: Tirosina fosforilada

R o Arg: Arginina

S o Ser: serina

*S. cerevisiae: Saccharomyces cerevisiae*

SB: Sos binding protein, proteína de unión a Sos

SD/Galactosa (-UL): Medio Mínimo con galactosa-agar sin uracilo y leucina

SD/Glucosa (-UL): Medio Mínimo con glucosa-agar sin uracilo y leucina

seg: segundo

SQRD: sulfuro quinona oxidoreductasa

T o Thr: treonina

TB: tuberculosis

TCA: ácidos tricarbónicos

TE/LiAc/PEG: Tampón Tris-EDTA con Acetato de litio y polietilenglicol

TFP: proteína trifuncional humana

TRIS: tris (hidroximetil) aminometano

U o URA: uracilo

*URA3*: gen que codifica uno de los genes para la síntesis de uracilo

UV: Ultra Violeta

V-ATPase

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

VPS33B: Vacuolar Protein sorting 33B

WHO: Organización Mundial de la Salud

wt: wild type, tipo salvaje

Y o Tyr: Tirosina

YPAD: Yeast Extract-Peptone-Adenine-Dextrose medium

## Índice

<b>1. Introducción</b> .....	<b>9</b>
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>18</b>
2.1. Objetivo General:.....	18
2.2. Objetivos específicos: .....	18
<b>3. Metodología</b> .....	<b>19</b>
3.1. Principio del sistema doble híbrido en levaduras utilizado .....	19
3.2. Reactivos .....	23
3.3. Medios y soluciones utilizados en el doble híbrido .....	23
3.4. Cuantificación de ácidos nucleicos .....	25
3.5. Electroforesis en geles de agarosa.....	25
3.6. Obtención de células de <i>E. coli</i> quimio-competentes.....	26
3.7. Preparación del stock de la cepa de levadura <i>S. cerevisiae</i> cdc25H.....	26
3.8. Propagación y purificación de los plásmidos .....	27
3.9. Diseño de cebadores para la amplificación de los genes de interés. ....	27
3.10. Amplificación de la secuencia de los genes de interés .....	28
3.10.1. Amplificación del gen de la fosfatasa PtpA de <i>M. tuberculosis</i> .....	28
3.10.2. Obtención del ADNc de los genes humanos de interés.....	29
3.10.2.1. Extracción de ARN de células THP-1 en cultivo.....	29
3.10.2.2. Purificación de ARN <sub>mensajero</sub> y síntesis del ADN copia (ADNc) .....	30
3.10.2.3. Amplificación de los genes de los potenciales sustratos de PtpA .....	30
3.11. Clonado del gen de la PtpA D126A y del candidato a sustrato ECHA en los plásmidos correspondientes. ....	31
3.11.1. Clonado del gen de PtpA D126A en el plásmido pSos .....	31
3.11.2. Clonado del gen de la ECHA en el plásmido pMyr .....	31
3.12. Purificación de los plásmidos conteniendo el gen de interés.....	32
3.13. Verificación inserto .....	32
3.13.1 Verificación inserto del gen de PtpA D126A en pSos.....	32
3.13.2. Verificación inserto del gen ECHA en pMyr .....	33
3.14. Co-transformaciones con los plásmidos del ensayo de doble híbrido .....	34
3.14.1. Preparación de células de levadura competentes.....	34
3.14.2. Transformación .....	35
<b>4. Resultados y Discusión</b> .....	<b>38</b>
4.1. Amplificación de la secuencia de los genes de interés .....	38



4.1.1. Amplificación del gen de la fosfatasa PtpA D126A de <i>Mtb</i> .....	38
4.1.2. Obtención del ADNc de los candidatos a sustrato de PtpA .....	38
4.2. Clonado de las secuencias de interés en los plásmidos pSos y pMyr .....	40
4.2.1. Confirmación de la presencia del gen de PtpA D126A en el plásmido pSos .....	41
4.2.2. Confirmación de la presencia del gen de ECHA en pMyr.....	46
4.3. Resultados del ensayo de Doble Híbrido .....	49
<b>5. Conclusiones y Perspectivas .....</b>	<b>55</b>
<b>6. Bibliografía .....</b>	<b>58</b>



## 1. Introducción

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), capaz de colonizar el pulmón y otros órganos como el bazo y el tejido adiposo [1]. Es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. En 2014, 9.6 millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1.5 millones murieron por esta enfermedad. De los que contrajeron la enfermedad se estima que un millón fueron niños (140.000 murieron) y cerca de medio millón desarrolló una tuberculosis multirresistente a las drogas utilizadas en la quimioterapia actual. Cabe destacar que esta enfermedad es una de las cinco causas principales de muerte en las mujeres de entre 15 y 44 años de edad y es la causa principal de muerte en las personas co-infectadas por el VIH [2].

*Mtb* es una bacteria considerada Gram positiva aunque su pared celular presenta características particulares en lo que respecta a su composición, compartiendo algunas características con bacterias Gram negativas, por ejemplo no retiene la tinción de Gram [3] y tiene un pseudoperiplasma [4]. Por otra parte, la alta densidad de lípidos de superficie vuelve a *Mtb* resistente a la tinción ácido-alcohol (tinción Ziehl-Neelsen) [4]. Partiendo del interior hacia el exterior se observa una membrana citoplasmática cubierta por una capa extensa de peptidoglicanos unidos a polisacáridos, los cuales se encuentran esterificados con los ácidos micólicos (AM) (60% del peso de la pared celular). En las micobacterias, esta capa de AM funciona de forma análoga a la membrana externa de las bacterias Gram negativas ya que se genera un espacio entre la membrana interna y la capa de AM equivalente al periplasma [4]. Son bacterias con un tamaño de 0.2-0.7 x 1-10 micras ( $\mu\text{m}$ ), ligeramente curvadas, inmóviles, no formadoras de esporas ni cápsulas, aerobias estrictas y de crecimiento lento. Este bacilo es capaz de sobrevivir durante meses si es mantenido en un lugar fresco y oscuro, y durante semanas en materiales como alfombras, cadáveres, abonos, papel o ropa, o bien formando parte del polvo. Es muy sensible al calor, a la luz solar y a la luz ultravioleta, pero es resistente al frío, a la congelación y a la desecación [5].

*Mtb* se transmite de persona a persona a través del aire. Cuando un enfermo de TB pulmonar tose, estornuda o expectora, expulsa bacilos tuberculosos al aire. Basta con que una persona inhale unos pocos bacilos para infectarse [6]. Se calcula que una tercera parte de la población mundial se encuentra infectada pero aún no han desarrollado la enfermedad. Las personas infectadas con esta forma latente tienen a lo largo de la vida un riesgo del 10% de enfermar de tuberculosis. Sin embargo, este riesgo aumenta en las personas cuyo sistema inmunitario se encuentra comprometido, como ocurre en casos de co-infección por el VIH, malnutrición o diabetes, o en quienes consumen tabaco [7]. Cuando la forma activa de la enfermedad se presenta, los síntomas (como tos, fiebre, sudores nocturnos, pérdida de peso) pueden ser leves durante muchos meses. Como resultado los pacientes tardan en buscar atención médica y transmiten la bacteria a otras personas. A lo largo de un año, un enfermo que está manifestando la enfermedad puede infectar a unas 10 a 15 personas por contacto estrecho. Si no reciben el tratamiento adecuado, dos terceras partes de los enfermos mueren.

Desde el año 2000, se han salvado más de 43 millones de vidas gracias al diagnóstico y quimioterapia efectiva que se basa en el uso de una combinación de cuatro antibióticos (isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida). Estos se administran durante seis meses, sumado a la facilitación de información, supervisión y apoyo al paciente por un trabajador sanitario o un voluntario capacitado. La gran mayoría de los enfermos pueden curarse a condición de que los medicamentos se suministren y se tomen correctamente [7]. Sin embargo, la larga duración del tratamiento hace que muchos lo abandonen cuando se percibe una mejoría y además no todos los gobiernos del mundo pueden asegurar las exigencias para su supervisión y costo. Esto ha favorecido la aparición de cepas resistentes a uno o todos los antibióticos utilizados actualmente (“Multidrog resistant TB” MDR-TB) [8,9]. Además de la quimioterapia, existe una única vacuna disponible contra la TB, la Bacillus Calmette-Guérine (BCG). Sin embargo la misma no es muy efectiva, especialmente en adultos [10].

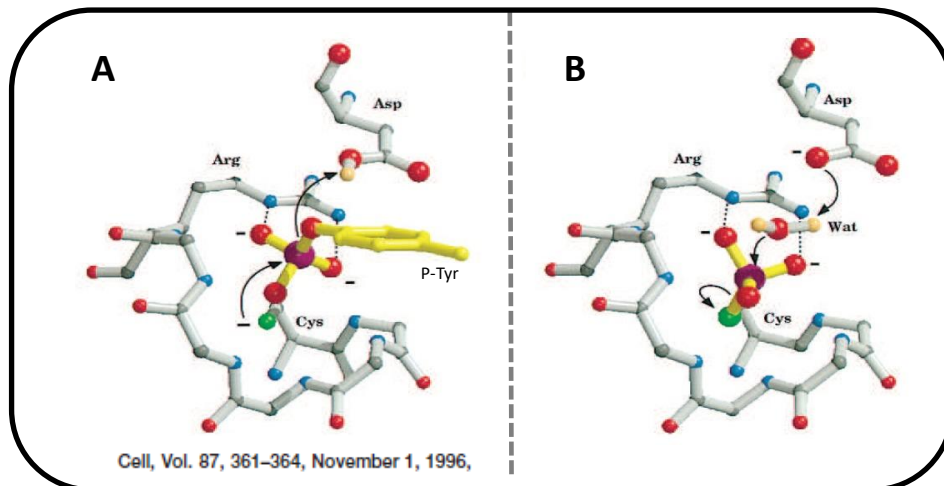
Luego que *Mtb* es inhalada esta bacteria es fagocitada por células del sistema inmune, principalmente por macrófagos presentes en los alvéolos pulmonares. Como respuesta inflamatoria a la infección son reclutadas desde la sangre otras células del sistema inmune las cuales entonces son nuevo blanco de infección. Una vez fagocitada, la bacteria

dentro del fagosoma es capaz de activar mecanismos que evitan la acidificación de este compartimento, afectando la fusión del fagosoma al lisosoma, evitando su destrucción [11]. Luego de un tiempo los macrófagos infectados junto con otras células del sistema inmune forman en el pulmón lo que se conoce como “granuloma”, el cual se rodea de células necróticas para evitar que se siga expandiendo la bacteria. Allí muchas de las bacterias mueren pero algunas logran sobrevivir en un estado no replicativo llamado estado de latencia. De esta forma se controla la enfermedad salvo en los casos que el sistema inmune decaiga, como es el caso de personas mayores o inmunodeprimidas (por ejemplo personas que presentan VIH) [10, 12-14].

Los patógenos intracelulares deben sortear diferentes barreras durante el proceso de infección. Una estrategia utilizada es introducir dentro de las células infectadas efectores bacterianos que modulen las vías de señalización del hospedero, alternando así las respuestas celulares, en beneficio de la persistencia y proliferación bacteriana [15,16]. Por ejemplo *Yersinia pseudotuberculosis*, libera la fosfatasa YopH una vez que entra a la célula, la cual inhibe la fagocitosis [17], suprime la respuesta oxidativa que genera especies reactivas de oxígeno [18] y desmonta proteínas de adhesión [19]. En *Mtb*, un ejemplo son las dos únicas fosfatasas en tirosina, PtpA y PtpB, las cuales se considera que son secretadas dentro del hospedero durante la infección, existiendo para PtpA evidencias de su localización en el citosol de los macrófagos infectados [20]. Ambas actúan como factores de virulencia, ya que cepas de *Mtb* carentes del gen de estas fosfatasas son menos exitosas en la infección y persistencia en macrófagos y modelos animales [20-22]. Existen también estudios con inhibidores específicos de PtpA y PtpB que reproducen dicho efecto de reducción de la supervivencia de la bacteria en macrófagos humanos [23, 24].



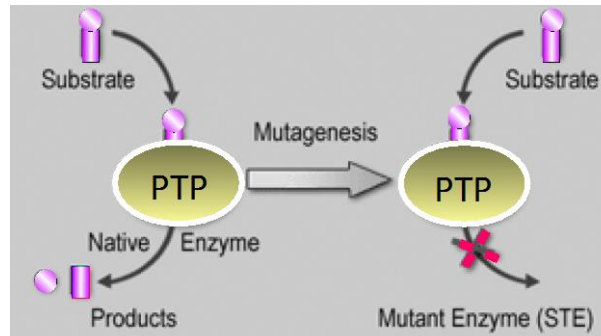
El mecanismo de reacción de este tipo de fosfatasa (Figura 1.2) consiste en dos etapas: (i) en la primera la cisteína catalítica cuyo grupo tiol (-SH) se encuentra estabilizado como tiolato (-S<sup>-</sup>) realiza un ataque nucleofílico al grupo fosfato unido a la tirosina del sustrato, formándose un intermediario cisteinil-fosfato. El grupo tirosil saliente es protonado por el residuo de Asp conservado (Asp126 en PtpA) el cual actúa como ácido; (ii) en la segunda etapa ocurre la hidrólisis del intermediario cisteinil-fosfato mediada por un residuo de arginina o glutamina el cual coordina una molécula de agua, permitiendo que el Asp conservado esta vez actúe como base, liberando el grupo fosfato y regenerando el sitio activo de la fosfatasa [27].



**Figura 1.2. Esquema de mecanismo catalítico de la PtpA de *Mtb*.** (A) Ataque nucleofílico del grupo tiol de la Cys11 al P-Tyr sustrato y formación de intermediario cisteinil-fosfato; (B) Regeneración del sitio activo asistido por el Asp 126. En dicho esquema se observa el fosfo-tirosin-sustrato representado en barras amarillas, con los oxígenos indicados en esferas rojas y el fosfato como una esfera violeta. El sitio activo de la PtpA se observa representado en barras grises, indicándose la Cys catalítica como una esfera verde, los oxígenos como esferas rojas, los nitrógenos como esferas azules y los carbonos como esferas grises. Para la molécula de agua se representan los hidrógenos como esferas amarillas y el oxígeno como una esfera roja.

Existen ya varias proteínas eucariotas reportadas como sustratos o potenciales sustratos de la PtpA de *Mtb*. El primer sustrato de PtpA reportado es la proteína VPS33B (vacuolar protein sorting 33B), proteína que forma parte del complejo proteico de clase C requerido para el tráfico y fusión de vesículas endocíticas. PtpA desfosforila a VPS33B e interacciona con la subunidad H de la V-ATPase, lo que evita se active el proceso normal de acidificación del fagosoma así como su fusión al lisosoma [20,28]. El segundo sustrato reportado de PtpA es la GSK3 $\alpha$  (Glycogen synthase kinase-3 alpha) proteína cuya fosforilación en tirosina (Tyr279) es crítica para su activación como quinasa e inducción de vías apoptóticas [29]. Por lo tanto, la desfosforilación de la GSK3 $\alpha$  por PtpA bloquearía la apoptosis durante la infección temprana, favoreciendo así la sobrevivencia de la bacteria dentro del macrófago. Por otra parte, recientemente se reportó que PtpA es capaz de interactuar de forma no-covalente con la ubiquitina del hospedero, a través de un motivo nunca antes descrito (en inglés *ubiquitin-interacting motif-like*) en la fosfatasa [30]. Esta interacción incrementa la actividad de PtpA hacia sustratos reportados, como VPS33B, y hacia dos nuevos sustratos, las quinasas eucariotas Jnk y p38. Los autores demuestran también que la desfosforilación de Jnk y p38 por PtpA desencadena una reducción de la inducción de ciertas citoquinas proinflamatorias como TNF, IL-1 $\beta$  e IL-12, y un aumento en la sobrevivencia de la bacteria en células y pulmón de ratones infectados. Debemos hacer notar, que el grupo que identificó la desfosforilación de GSK3 $\alpha$ , no detectó que PtpA afectara los niveles de fosforilación de Jnk y p38 (en P-Tyr específicas) [29]. Esto refleja que el uso de aproximaciones experimentales válidas, pero muy diferentes, no siempre vuelca el mismo resultado, sin embargo enriquecen en la posibilidad de identificar nuevos sustratos o interactores.

Recientemente el grupo en el que se enmarca el proyecto, dirigido por la Dra. Andrea Villarino, identificó cuatro nuevos potenciales sustratos de PtpA de *Mtb* aislados de células humanas THP-1 premonocíticas (proyecto FCE-ANII y tesis de doctorado de M. Margenat) [31]. Para aislarlos utilizaron una estrategia *in vitro* optimizada, basada en la



clásica estrategia de “Mutant Substat Trapping” descrita por Flint y colaboradores para la búsqueda de sustratos de fosfatasas en tirosina (PTPs) [32]. Tal como muestra el siguiente esquema, la misma se basa en la utilización de mutantes puntuales en residuos conservados del sitio activo. Se busca que el mutante no pierda la habilidad de ligarse a su sustrato, pero sí cause una disminución drástica en la constante catalítica ( $k_{cat}$ ), haciendo más factible la aislación de los complejos enzima-sustrato [33, 34]. En el caso de PtpA se utilizó el mutante puntual PtpA D126A. Este mutante tiene una Ala en el lugar del Asp catalítico ya mencionado, lo que se espera haga más lenta la segunda etapa de la reacción enzimática (Figura 1.2) permitiendo “pescar” los posibles sustratos.

Lo interesante es que los cuatro sustratos eucariotas identificados por nuestro grupo están relacionadas directa o indirectamente con la producción de energía [31]. Tres de los candidatos a sustrato de PtpA, la subunidad alfa (ECHA) de la proteína trifuncional (TFP), la subunidad alfa (ATPA) de la ATP sintasa, la sulfuro quinona oxido-reductasa (SQRD) son proteínas sintetizadas en el citoplasma y luego dirigidas a la mitocondria gracias a la presencia de un péptido señal en la región amino terminal. La ECHA, subunidad de la enzima clave de la vía catabólica llamada beta-oxidación de ácidos grasos, es responsable de dos de las cuatro etapas de esta vía [35]. En esta vía se genera poder reductor ( $NADH$  y  $FADH_2$ ) que provee de electrones a la cadena respiratoria para la síntesis de ATP. Otro producto de la vía es el acetil-CoA, el cual si existe necesidad de energía entrará al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) para su oxidación, favoreciendo así la generación de más poder reductor ( $NADH$  y  $FADH_2$ ), alimentando la cadena respiratoria. La ATPA es una de las



subunidades que forma el dominio catalítico de la ATP sintasa, enzima clave en la producción de ATP mitocondrial [36,37]. La SQRD, responsable de la oxidación del sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S), compuesto cuyas concentraciones deben ser mantenidas bajas pues si se acumula es tóxico siendo capaz de inhibir la cadena respiratoria a nivel de la citocromo oxidasa [38, 39]. La cuarta proteína identificada como candidato a sustrato de PtpA, la 6-fosfofructoquinasa (K6PP o PFK), es citosólica y cataliza una de las etapas irreversibles considerada el punto central de regulación de la glucólisis, el pasaje de fructosa-6-fosfato a fructosa 1,6-difosfato [40].

Los cuatro candidatos a sustrato de PtpA descritos poseen residuos de Tyr a lo largo de sus secuencias, algunos ya reportados como fosforilados en la base de datos Phosphosite [41]. La hipótesis planteada es que PtpA podría estar desfosforilando alguna de estas proteínas en el citosol de las células que infecta, modificando así su localización celular y/o actividad fisiológica. En acuerdo con esta hipótesis se ha observado recientemente que en macrófagos infectados con la cepa virulenta *Mtb* H37Rv, y no con la cepa avirulenta *Mtb* H37Ra, las proteínas SQRD, ATPA y ECHA dejan de ser detectadas en la mitocondria [42]. Por lo tanto, nuestro grupo supone que PtpA podría ser el factor bacteriano responsable de este efecto. Actualmente nuestro grupo se encuentra validando dichos candidatos como potenciales sustratos *in vitro*. Los resultados hasta ahora obtenidos, han confirmado que la PtpA interacciona *in vitro* con la TFP (ECHA/ECHB) a través de su sitio activo, y que es capaz de desfosforilarla, lo que la convierte en un potencial sustrato fisiológico a ser estudiado con prioridad [31].

Para avanzar en la caracterización de la TFP como sustrato de la PtpA, es necesario validar la interacción de estas proteínas en un contexto celular eucariota, lo que complementarían los ensayos *in vitro* hasta ahora realizados. Para ello en esta tesis buscamos poner en funcionamiento el sistema de doble híbrido en levadura (Yeast Two-hybrid) [43]. Dicho sistema desarrollado en *Saccharomyces cerevisiae* ha sido ampliamente utilizado para validar y descubrir nuevas interacciones entre proteínas. Esta levadura constituye un sistema eficaz para el estudio de procesos celulares debido a su fácil manipulación genética, crecimiento, bajo costo y por constituir un microorganismo seguro en términos de bioseguridad [44]. El sistema de doble híbrido suele servirse de una cepa de levadura

modificada genéticamente para que sea defectuosa en alguna vía celular. Cuando estas cepas se cultivan en condiciones específicas que requieren el funcionamiento de dicha vía, no son capaces de sobrevivir. Los plásmidos con los que se co-transforma la levadura son diseñados para producir uno de los productos proteico de interés fusionado a una proteína que denominaremos “carnada” (en inglés “bait”), mientras que otro plásmido es diseñado para producir un segundo producto proteico fusionado a una proteína que llamaremos “presa” (en inglés “target”). Si las proteínas carnada y presa interaccionan, se hace posible la restauración de la vía celular defectuosa lo que permite el crecimiento de la levadura [45]. Una vez puesto a punto el sistema de doble híbrido utilizando los plásmidos control que provee el sistema, se buscará evaluar la interacción entre la PtpA de *Mtb* y al menos uno de los candidatos a sustrato identificados.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo General:

Avanzar en la validación de los potenciales sustratos identificados de la fosfatasa en tirosina PtpA de *M. tuberculosis*.

### 2.2. Objetivos específicos:

- 1- Poner en marcha la técnica de doble híbrido en levadura utilizando diferentes plásmidos control.
- 2- Insertar en los plásmidos del sistema de doble híbrido los genes de interés (el de la fosfatasa PtpA) y el de uno de los posibles sustratos (la proteína humana ECHA).
- 3- Evaluar si existe interacción en un contexto celular entre la PtpA de *M. tuberculosis* y la ECHA humana.



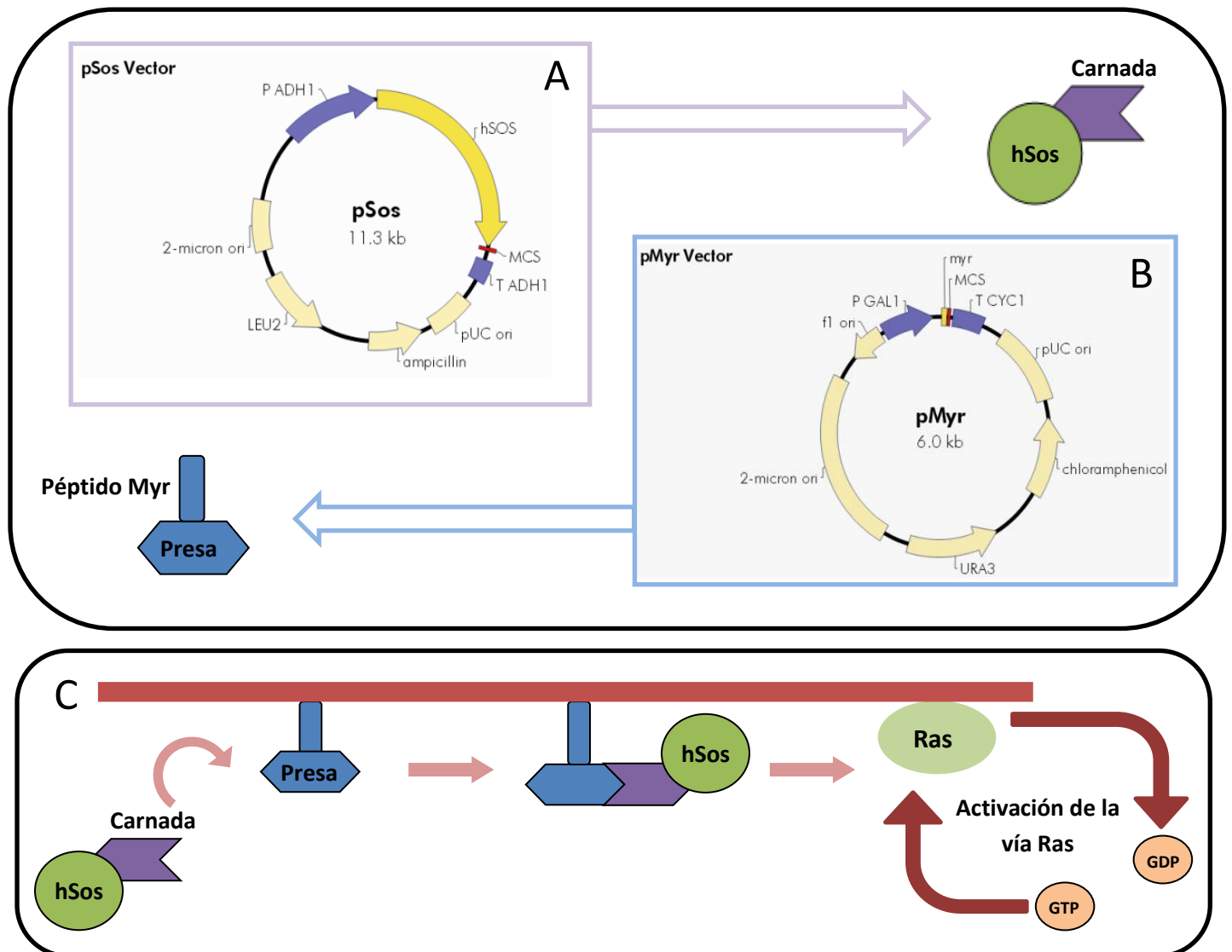
### 3. Metodología

#### 3.1. Principio del sistema doble híbrido en levaduras utilizado

Se utilizó el sistema comercial de doble híbrido en levadura CytoTrap Vector (Stratagen, #217438). El mismo se basa en la co-expresión de dos plásmidos, pSos y pMyr, que expresan respectivamente las proteínas “carnada” (en inglés “bait”) y “presa” (en inglés “target”). Si las dos proteínas interactúan dentro de la célula, se pone de manifiesto mediante la activación de una vía que permite el crecimiento de la levadura a 37°C. En nuestro caso la proteína “carnada” es la fosfatasa en tirosina PtpA D126A de *Mtb*, cuyo gen fue introducido en el sitio de policlonado de pSos fusionado al gen de la proteína hSos (figura 3.1 A). La expresión del gen de la PtpA D126A junto al de hSos, dará lugar a una proteína de fusión hSos-PtpA. Por otro lado el ADN que codifica la “presa”, en nuestro caso el gen de la ECHA humana, fue introducido en el sitio de policlonado de pMyr fusionado a una pequeña secuencia blanco de miristilación (figura 3.1 B). En la levadura, esta secuencia sufre una modificación postraduccional que agrega un lípido (miristilato) el cual permitirá el anclaje de la proteína de fusión a la membrana plasmática.

Los genes de interés se introdujeron mediante métodos clásicos con enzimas de restricción y la correcta inserción y ausencia de mutaciones fue verificada mediante secuenciación (Macrogen). Las construcciones generadas se utilizaron para transformar una cepa de *S. cerevisiae* mutante, *cdc25H*. Esta cepa contiene una mutación puntual en el aminoácido 1328 del gen *cdc25* que no afecta su crecimiento a 25°C pero le impide crecer a 37°C. Este gen es homólogo al gen Sos humano (hSos) que codifica para un factor de intercambio de nucleótido de guanina que une y activa la GTPasa Ras, favoreciendo la unión de GTP. Ras es una proteína que actúa a nivel de la membrana plasmática como interruptor-regulador molecular muy importante en una gran variedad de rutas de transmisión de señales celulares que permiten el crecimiento a 37°C. Este sistema de doble híbrido se basa entonces en la habilidad que tiene la proteína hSos, codificada por pSos, de complementar el defecto de la cepa de levadura *cdc25* y activar la vía de señalización Ras. De esta forma, si existe interacción entre la fosfatasa PtpA D126A y la proteína humana ECHA, la proteína

hSos será localizada en la membrana haciendo posible la activación de la vía de señalización mediada por Ras, permitiendo que la cepa de *S. cerevisiae* cdc25H crezca a 37°C (figura 3.1 C).



**Figura 3.1.** Figura A: plásmido pSos y su producto proteico (proteína de fusión con rol de carnada en el sistema doble híbrido). Figura B: plásmido pMyr y su producto proteico (proteína se fusión con rol de presa en el sistema de doble híbrido). Figura C: esquema de activación de la vía Ras mediante la interacción entre las proteínas carnada y presa del sistema de doble híbrido.

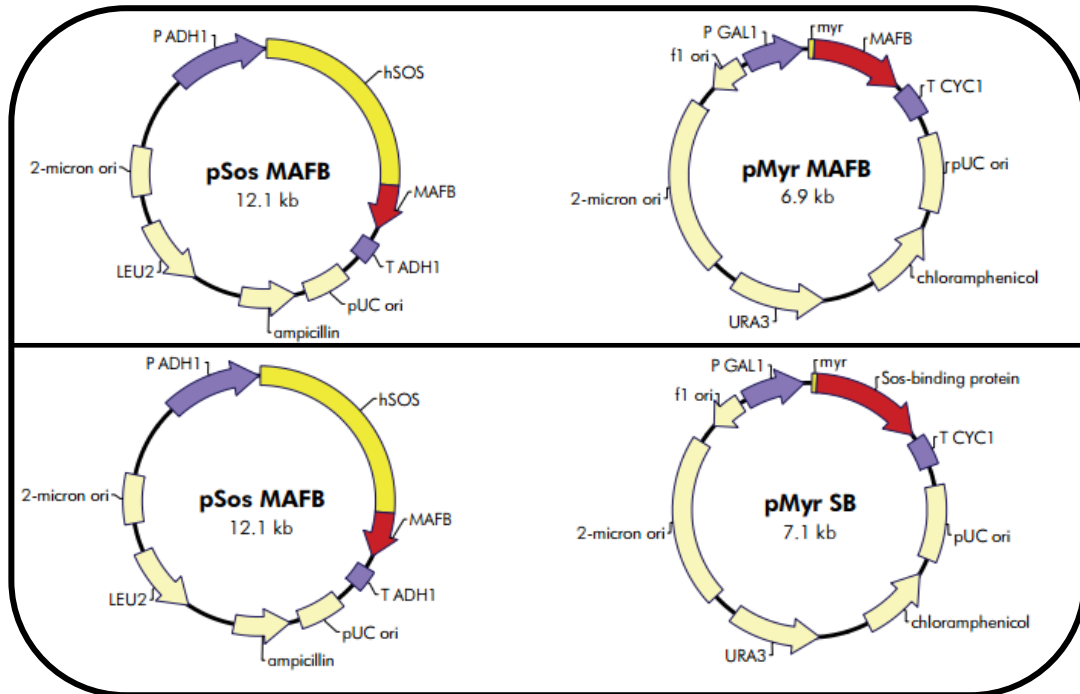
El sistema comercial CytoTrap Vector cuenta también con 5 plásmidos utilizados en los controles negativos y positivos del sistema de doble híbrido (pSos Col I, pMyr Lamin C, pSos MAFB, pMyr MAFB, pMyr SB (Figuras 3.2 y 3.3). El plásmido pSos Col I (pSos Collagenasa) expresa la proteína hSos fusionada a un fragmento de una collagenasa tipo IV de ratón (aminoácidos 148-375). El plásmido control pMyr Lamin C expresa la señal de miristilación

fusionada a un fragmento de la proteína Lamin C humana (aminoácidos 67-230). El plásmido control pSos MAFB expresa la proteína Sos fusionada al factor de transcripción humano MAFB (MAFB\_HUMAN). El plásmido control pMyr MAFB expresa la señal de miristilación fusionada a la misma proteína MAFB descrita anteriormente. El plásmido control pMyr SB expresa la señal de miristilación fusionada a una proteína de unión a Sos denominada SB. Los controles se utilizan co-transformando de a pares tal como indica el kit, de forma tal que sean capaces o no de rescatar la sensibilidad a la temperatura de la cepa *cdc25H* de levadura. A continuación se detallan dichos controles.

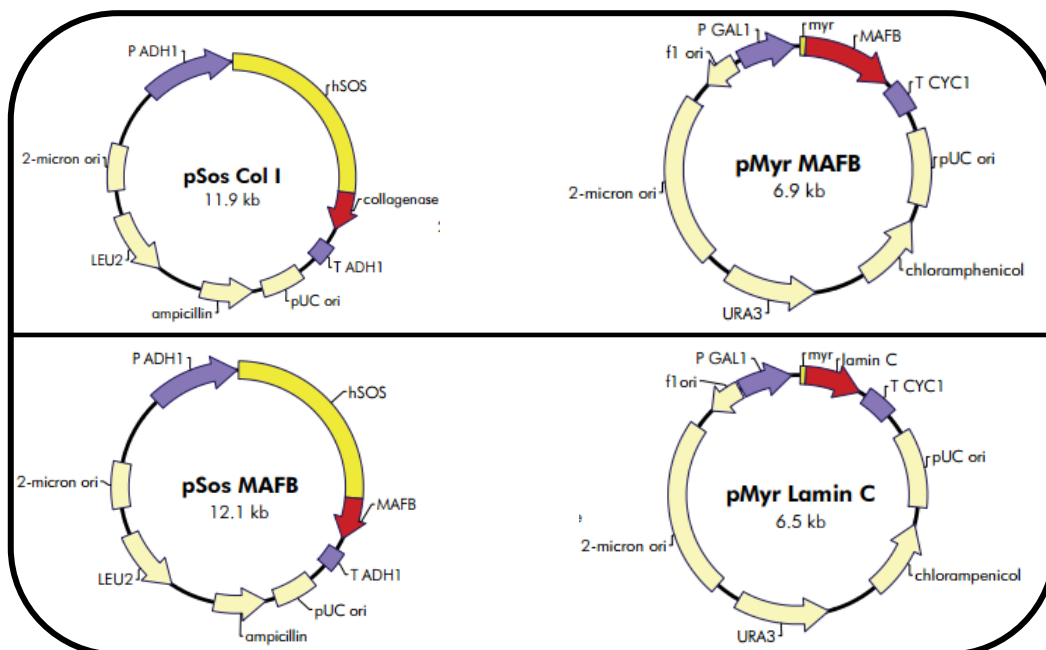
Los productos proteicos MAFB expresados por la co-transformación de pSos MAFB y pMyr MAFB, capaces de formar homodimeros dentro de un contexto celular *in vivo*, funcionan como control positivo del sistema doble híbrido. Además, los productos proteicos hSos y SB expresados por la co-transformación de pSos MAFB y pMyr SB interaccionan entre sí dentro de un contexto celular, funcionando como control positivo de la correcta localización celular de hSos en el citoplasma y SB en la membrana plasmática. Este último control con el plásmido pMyr SB se realiza también co-transformando con pSos-carnada, con el objetivo de verificar la correcta localización en el citoplasma de la proteína hSos, aún en presencia de la proteína carnada fusionada. Por otro lado, la co-transformación de pSos MAFB y pMyr Lamin C, o pSos Col I y pMyr MAFB se utilizan como control negativo ya que sus productos proteicos no interaccionan entre ellos en un contexto celular. Al contrario que para los controles positivos, los co-transformantes de *S. cerevisiae cdc25H* que contengan estos pares de plásmidos no serán capaces de activar la vía Ras por lo cual es de esperar no crezcan a 37°C.

Como se puede observar también en las figuras 3.2 y 3.3, tanto los plásmidos pSos y pMyr como los plásmidos control tienen genes de selección útiles durante las transformaciones de la cepa de *S. cerevisiae cdc25H*. Los plásmidos pSos, pSos Col I y pSos MAFB portan como marcador de selección el gen *LEU2* (que codifica uno de los genes necesarios para la síntesis de leucina) lo que permite seleccionar a los transformantes en medios carentes de leucina. Los plásmidos pMyr, pMyr Lamin C, pMyr MAFB y pMyr SB portan como marcador de selección el gen *URA3* (que codifica uno de los genes para la síntesis de uracilo) lo que permite seleccionar a los transformantes en medios carentes de uracilo. También contienen genes de resistencia a antibióticos que permiten la selección de los transformantes en *E. coli*

durante la expresión de estos plásmidos. Los plásmidos pSos, pSos col I y pSos MAFB tienen gen de resistencia a ampicilina; y los plásmidos pMyr, pMyr Lamin C, pMyr MAFB y pMyr SB tienen gen de resistencia a cloranfenicol.



**Figura 3.2.** Se muestran los pares de plásmidos provistos por el Kit utilizados como control positivo del doble híbrido en la co-transformación de levadura *S. cerevisiae* cdc25H. Cada plásmido cuenta con un promotor para la expresión del gen codificante para la proteína fusionada, secuencias necesarias para la replicación del plásmido, un gen como marcador de selección y un gen que le confiere resistencia a un antibiótico.



**Figura 3.3.** Se muestran los pares de plásmidos provistos por el Kit utilizados como control negativo del doble híbrido en la co-transformación de levadura *S. cerevisiae* cdc25H. Cada plásmido cuenta con un promotor para la expresión del gen codificante para la proteína fusionada, secuencias necesarias para la replicación del plásmido, un gen como marcador de selección y un gen que le

### 3.2. Reactivos

Todos los productos que se utilizaron se obtuvieron de Sigma o de AppliChem, o según se detalla. Tris (hidroximetil) aminometano (TRIS); Ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA). Ditiotreitól (DTT). Solventes orgánicos: etanol, glicerol. Reactivos utilizados en la preparación de medios de cultivo de bacterias: peptona, extracto de levadura, lysogeny broth (LB), dextrosa, rafinosa y agar. Antibióticos: ampicilina, cloranfenicol. Reactivos de electroforesis y tinción de geles: agarosa, bromuro de etidio, Good View (SBS Genetech), marcadores de PM para ADN de 100 pb DNA (Ladder Bioron 304005) y 1 Kb (Fermentas SM0311). Reactivos de biología molecular: Phusion High Fidelity polimerasa (Thermo Scientific), Taq polimerasa (Thermo Scientific), FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo scientific), T4 DNA ligase (Thermo scientific), SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen), desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) (Thermo scientific), Oligonucleótidos dT<sub>12-18</sub> (Invitrogen), agua sin RNAasa (DEPC treated Water) (Thermo scientific).

### 3.3. Medios y soluciones utilizados en el doble híbrido

**Medio YPAD:** medio utilizado para el crecimiento de la levadura en medio líquido. Su composición es: extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2% y sulfato de adenina 0.4%. El mismo se esteriliza autoclavando 20 min a 121°C.

**Medio YPAD-agar:** medio utilizado para el crecimiento de la levadura en placa. Su composición es igual al medio YPAD pero se le adiciona agar 2%.

**Medio LB (Lisogenic broth):** medio utilizado para crecer *Escherichia coli* DH5- $\alpha$ , bacterias utilizadas para expandir los plásmidos pSos, pMyr, pSos-carnada, pMyr-presa y plásmidos control suministrados por el sistema comercial de doble híbrido. En cada cultivo se colocó el antibiótico correspondiente a la resistencia que lleva cada uno de los plásmidos utilizados, siendo ampicilina 100  $\mu$ g/ml para los plásmidos pSos y cloranfenicol 100  $\mu$ g/ml para los plásmidos pMyr.

**Medio Mínimo con glucosa-agar [SD/Glucosa (-UL)]:** medio utilizado para seleccionar los co-transformantes en el ensayo de doble híbrido. El medio contiene base nitrogenada sin aminoácidos 0.17%, sulfato de amonio 0.5%, glucosa 2% y agar 1.7%. El volumen se debe ajustar a 900 mL y autoclavar a 121°C por 15 min (respetar el tiempo para evitar que el



medio cambie a una consistencia blanda, tal como describe en manual *Growth and Maintenance of Yeast* [46]. Luego agregarle 100 mL de 10x solución de aminoácidos sin uracilo (URA) y leucina (LEU) previamente prepara y filtrada como se describe a continuación.

**Solución de aminoácidos sin/con leucina y uracilo:** se preparó la solución 10x como se indica en la tabla 1 y se filtró por 0.2 µm. Esta solución luego de filtrada se agrega luego de autoclavar el medio porque algunos de sus componentes son termolábiles. A su vez dependiendo del plásmido con el cual se trasforme se agregará LEU y/o URA. La omisión de LEU o URA en la solución selecciona para el plásmido pSos o pMyr, respectivamente. La omisión de ambos selecciona ambos plásmidos pSos y pMyr.

**Tabla 1**

Componentes	Solución 10X de aminoácidos (mg/Litro de solución 10x)
L-Isoleucina	300
L-Valina	1500
L-Adenina	200
L-Arginina	500
L-Histidina	200
L-Leucina*	1000
L-Licina	500
L-Metionina	200
L-Fenilalanina	500
L-Treonina	2000
L-Triptófano	500
L-Tirosina	500
L-Uracilo*	200
L-Ácido Glutámico	1000
L-Ácido Aspártico	1000
L-Serina	400

\*Dependiendo de el o los plásmidos utilizados se agrega o no leucina o uracilo

**Medio mínimo con Galactosa-agar [SD/Galactosa (-UL)]:** medio utilizado para evaluar el éxito del doble híbrido. El mismo está compuesto de base nitrogenada sin aminoácidos 0,17%, sulfato de amonio 0.5%, galactosa 2%, rafinosa 1% y agar 1.7%. Cuando se prepara 1

litro de medio se debe ajustar a un volumen de 900 mL, se autoclava por 15 min 121°C (respetar el tiempo). Una vez que se enfríe, se agregan 100 mL de 10x solución de aminoácidos sin URA ni LEU, previamente preparada como se describe arriba. Al igual que en el medio SD/Glucosa (-UL), este medio también carece de LEU y URA, y en él crecerán solo aquellas levaduras que hayan sido co-transformadas con ambos plásmidos. La diferencia de este medio es que contiene galactosa en vez de glucosa lo que permite la expresión de la proteína de fusión a la señal de miristilación presente en el plásmido pMyr, la cual se encuentra bajo control del promotor GAL1 inducible por galactosa. El plásmido pSos contiene el promotor P-ADH1 el cual permite la expresión constitutiva de pSos y por ende permitirá la expresión de la hSos fusionada a la fosfatasa PtpA. Es de esperar que si las proteínas fusionadas se expresan e interaccionan, las colonias transformadas serán capaces de crecer en este medio a 37°C.

**Tampón Tris-EDTA/Acetato de litio:** se preparó una solución de Tris-EDTA 10x definida como TE (40 mL Tris-HCl 1 M pH 7.5, 8 mL EDTA 0.5 M, csp 400 mL de H<sub>2</sub>O MiliQ) y una solución de acetato de litio 1M (PM: 102 g/mol). Se autoclavó por 20 min a 121°C. Posteriormente se mezclaron 10% acetato de litio 1 M, 10% TE y 80% de agua MRho y se filtró por 0.22 µm. Esta solución se puede guardar por unas semanas.

**Tampón TE/LiAc/PEG40%:** 2 g de polietilenglicol (PM: 3350 g/mol) se disolvieron en un volumen final de 5 mL de tampón TE/LiAc. Para favorecer la disolución se puede calentar a 37°C dejándolo enfriar antes de usar. Finalmente se filtró por 0.22 µm. Esta solución debe ser preparada en el día.

### **3.4 Cuantificación de ácidos nucleicos**

La cuantificación se realizó mediante medida espectrofotométrica a 254 nm en Nano Drop Lite (Thermo Scientific).

### **3.5. Electroforesis en geles de agarosa**

Se prepararon geles de agarosa 1% en tampón 0.5x TBE (Tris borato 20 mM, EDTA 2 mM, pH 8) y se le agregó 2 µL del reactivo Good View por cada 50 mL de gel para detectar la presencia de ácidos nucleicos por exposición al UV. En algunos casos luego de la corrida se

utilizó bromuro de etidio (BrEt) como agente intercalante, incubando 15 min. A las muestras se les agregó tampón de carga 6x (glicerol 50%, azul de bromofenol 0.02%, xilencianol 0.002%) hasta alcanzar una concentración final 1x y se sembraron junto con un marcador de ácidos nucleicos. Se realizó la electroforesis en tampón TBE 0.5x a 80V por aproximadamente 20 min. Las imágenes se adquirieron y registraron con la cámara fotográfica Gel Logic 112 y el programa Carestream MI.

### **3.6. Obtención de células de *E. coli* quimio-competentes**

El protocolo utilizado para la producción de células quimio-competentes se basó en el método que utiliza  $\text{CaCl}_2$  [47]. Se inoculó un tubo de 3 mL de medio *LB* con una colonia fresca de la cepa de células *E.coli* DH5 $\alpha$ . Se dejó crecer toda la noche a 37°C bajo una agitación de 200 rpm. Al día siguiente se inocularon 250 mL de *LB* en un matraz de 1 L, con 2.5 mL (1/100) del pre-cultivo. Se creció a 37°C hasta que la densidad óptica (DO) a 620 nm alcanzara 0.3 unidades. Se centrifugó a 3500 rpm, durante 10 min a 4°C. A partir de ese momento las células y reactivos se mantuvieron en frío. Se descartó el sobrenadante, se lavó el pellet con 100 mL de  $\text{CaCl}_2$  0.1 M estéril, agregando de a poco hasta resuspender el pellet. Posteriormente se centrifugó a 3500 rpm, durante 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 100 mL de  $\text{CaCl}_2$  0.1 M. Se incubó 1 h a 4°C en la solución de  $\text{CaCl}_2$  0.1 M. Se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min a 4°C y se resuspendió el pellet en 3 mL de  $\text{CaCl}_2$  con 20% glicerol estéril. Finalmente, la suspensión de células se alicuotó de a 50-100  $\mu\text{L}$  en eppendorf pre-enfriados en hielo, y se almacenó rápidamente a -80°C.

### **3.7. Preparación del stock de la cepa de levadura *S. cerevisiae* cdc25H**

Una placa de medio YPAD-agar conteniendo colonias de *S. cerevisiae* cdc25H provista por J. Badano (Institut Pasteur Montevideo). Para preparar el stock se procedió como recomienda el kit comercial de doble híbrido CytoTrap Vector (Stratagen, #217438). Se inoculó 10 mL medio YPAD con una colonia de la cepa cdc25H y se incubó a 25°C a 200 rpm hasta una DO= 0.8-1.0. Posteriormente se le agregó 4.5 mL de una solución estéril de glicerol 50% preparada en YPAD, se alicuotó en eppendorf de 1 mL y se almacenó a -80 °C.

### **3.8. Propagación y purificación de los plásmidos**

Con el fin de disponer de un stock mayor de los plásmidos pSos, pMyr y los 5 plásmidos control (pSos MAFB, pSosColl, pMyr MAFB, pMyrLaminC y pMyrSB) se realizó la propagación y purificación de los mismos. Los plásmidos se transformaron en células quimio-competentes *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  preparadas como ya se describió previamente en 3.6. Para las diferentes transformaciones 100  $\mu$ L de células DH5 $\alpha$  se dejaron descongelar unos minutos en hielo. A cada tubo, se le agregó 1  $\mu$ L de plásmido correspondiente y se incubó en hielo por 30 min adicionales. Posteriormente se realizó un shock térmico de 90 seg a 42°C y se dejó en hielo 2 min más. Luego se le agregó a cada tubo 500  $\mu$ L de medio líquido LB estéril y se incubó una hora a 37°C, bajo agitación suave. Finalmente se sembraron las células en LB agar con los antibióticos correspondientes para cada plásmido y se las incubó durante la noche (“overnight”, ON) a 37°C. La purificación de los plásmidos a partir de colonias transformantes se realizó utilizando un kit de extracción comercial (Plasmid Miniprep-Classic, ZymoResearch). La purificación se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa 1% y las preparaciones obtenidas se cuantificaron en un nanodrop (Nanodrop Lite, ThermoScientific).

### **3.9. Diseño de cebadores para la amplificación de los genes de interés.**

Los cebadores fueron diseñados de forma tal que contengan un fragmento de la secuencia complementaria a cada uno de los genes de interés a amplificar y en sus extremos los sitios de corte de las enzimas de restricción utilizadas para el sub-clonado en los plásmidos del sistema de doble híbrido (NcoI y NotI para pSos, y XhoI y Sall o EcoRI para pMyr) como indica la tabla 2. Los cebadores diseñados para amplificar el gen de la PtpA D126A permitirán el subclonado en el plásmido pSos del sistema de doble híbrido. Se diseñaron los cebadores para amplificar los cuatro potenciales sustratos de PtpA que permitirán el subclonado de los mismos en el plásmido pMyr del sistema de doble híbrido. La T<sub>m</sub>, % GC, el largo, la formación de estructuras secundarias fueron determinadas y evaluadas utilizando el programa Oligoanalyser y Primer3web [48,49]. Con el programa NEBcutter V2.0 [50] se verificó que las enzimas de restricción seleccionadas no corten en la secuencia de los genes de interés. Una vez definidos los cebadores, los mismos se obtuvieron comercialmente

(Macrogen, Korea). Los mismos se recibieron liofilizados y se resuspendieron en agua MilliQ autoclavada a una concentración final de 100  $\mu$ M, las alícuotas se almacenaron a -20°C.

También se obtuvo comercialmente los cebadores específicos complementarios a las secuencias flanqueantes de los sitios de clonado de ambos plásmidos pSos y pMyr, útiles para la verificación de las secuencias de los clones a analizar (tabla 3).

**Tabla 2**

Cebadores para la amplificación de los genes:		
PtpA	Fw	5'-AGCCATGGCCATGTCTGATCCGCTGCACGTC-3' %GC: 61 / Tm: 69°C / largo: 31 pb
	Rv	5'-AGGCGGCCGCTCAACTCGGTCCGTTCCG-3' %GC: 71 / Tm: 72°C / largo: 28 pb
	Fw	5'-AGCCTCGAGAAATGGTGGCCTGCCGGGCGATTG-3' %GC: 66 / Tm: 72°C / largo: 32 pb
	Rv	5'-AGGTCTGACTACTGGTAGAACTTCTGTAG-3' %GC: 45 / Tm: 60°C / largo: 31 pb
ATPA	Fw	5'-AGCCTCGAGAAATGCTGTCCGTGCGGTTGCTG-3' %GC: 63 / Tm: 71°C / largo: 32 pb
	Rv	5'-CTAGTCGACTTAAGCTTCAAATCCAGCCAA-3' %GC: 43 / Tm: 60°C / largo: 30 pb
	Fw	5'-AGCCTCGAGAAATGGTGCCACTGGTGGCTGT-3' %GC: 60 / Tm: 69°C / largo: 30 pb
	Rv	5'-CTAGTCGACTTAACTCATACCTAGATGAAACAAC-3' %GC: 38 / Tm: 58°C / largo: 34 pb
6PFK	Fw	5'-AGCGAATTCATGGACGCGGACGACTCC-3' %GC: 59 / Tm: 66°C / largo: 27 pb
	Rv	5'-ATCTCGAGTCAGACACTCCAGGGCTG-3' %GC: 58 / Tm: 63°C / largo: 26 pb

\* En color se señalan los sitios de corte de las enzimas de restricción utilizadas para el sub-clonado en los plásmidos del sistema de doble híbrido (NcoI y NotI para pSos, y XhoI y Sall o EcoRI para pMyr)

**Tabla 3**

Cebadores complementarios a sitio de clonado en pSos y pMyr		
pSos	Fw	5'-CCAAGACCAGGTACCATG-3' %GC: 56 / Tm: 52°C / largo: 18 pb
	Rv	5'-GCCAGGGTTTTCCAGT-3' %GC: 59 / Tm: 53°C / largo: 17 pb
	Fw	5'-ACTACTAGCAGCTGTAATAC-3' %GC: 40 / Tm: 49°C / largo: 20 pb
	Rv	5'-CGTGAATGTAAGCGTGACAT-3' %GC: 45 / Tm: 53°C / largo: 20 pb

### 3.10. Amplificación de la secuencia de los genes de interés

#### 3.10.1. Amplificación del gen de la fosfatasa PtpA de *M. tuberculosis*

Como molde para la amplificación de la secuencia del gen de la fosfatasa PtpA D126A se utilizó un stock de pET28a a 50 ng/ $\mu$ l conteniendo dicho gen. Se realizó una mezcla de PCR

de un volumen final de 50  $\mu$ L, agregando 10  $\mu$ L de 5X HF Phusion Buffer, 1  $\mu$ L de dNTPs 10 mM, 2.5  $\mu$ L de cada cebador (directo y reverso) a una concentración de 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ L de ADN (stock de Pet28a con PtpA D126A) y 0.5  $\mu$ L de la ADN polimerasa (Phusion) 2 U/ $\mu$ L. Se realizó un control negativo sin ADN. Las condiciones de ciclado fueron: un ciclo de desnaturalización inicial de 2 min a 98°C. Luego se realizaron 35 repeticiones de: un ciclo de desnaturalización inicial de 30 seg a 98°C, un segundo ciclo de hibridación de 30 seg a 67°C y un ciclo de extensión de 1 min a 72°C. Finalmente se realizó un último ciclo de extensión final de 10 min a 72°C. Los productos de PCR se verificaron por electroforesis en gel de agarosa 1%. El producto de PCR contenido en la banda del gel de agarosa y correspondiente a la amplificación de PtpA D126A se purificó con un Kit comercial (Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit).

### **3.10.2. Obtención del ADNc de los genes humanos de interés.**

#### **3.10.2.1. Extracción de ARN de células THP-1 en cultivo**

Los potenciales sustratos de PtpA son proteínas eucariotas, por lo tanto fue necesario obtener el ADNc. Para ello se realizó una extracción y purificación del ARN mensajero de las células THP-1 premonocíticas (actividad realizada junto a la estudiante de doctorado M. Margenat). Cabe destacar que fue de extractos proteicos de estas células, previamente diferenciadas a macrófagos, de donde se aislaron e identificaron los potenciales sustratos de PtpA [31]. Para la obtención del mensajero previamente se realizó una extracción de ARN total siguiendo el protocolo de extracción fenólica con TRIZOL. Se partió de células THP-1 en monocapa, se retiró el medio de cultivo y se hicieron dos lavados de las células con PBS apirógeno. Se agregó Trizol directamente al frasco de cultivo (1 ml de trizol por cada 10  $\text{cm}^2$ ). Se despegaron las células con un *scraper*, se pipeteó vigorosamente y se pasó a tubos la suspensión. Se dividió en alícuotas de 1 ml y se conservaron a -80°C. Se incubaron los homogeneizados por 5 min a temperatura ambiente (TA). Luego se agregó 0.2 ml de cloroformo por cada 1 ml de Trizol, se agitaron los tubos vigorosamente por 15 seg y se incubó por 2-3 min a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugó a 12000g por 15 min a 4°C, quedando una fase inferior roja (fenol-cloroformo), una fase intermedia y una fase superior incolora acuosa (aprox 60% del vol TRizol agregado en la homogenización). Para la precipitación del ARN se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio y el ARN se precipitó mediante el agregado de alcohol isopropílico (0.5 ml por cada 1 ml de TRizol usado en la

homogenización). Se incubó 10 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 12000 g por 15 min a 4°C quedando en el pellet el ARN precipitado. El sobrenadante se descartó y se lavó el pellet 1 vez con etanol 75% preparado en agua sin RNAasa ( tratada con DEPC), 1 ml de etanol por cada ml de TRizol inicial mezclando con vortex por 10 seg. Luego se centrifugo a 7500g por 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet de ARN al aire por 10 min aproximadamente (no más porque si se seca demasiado es difícil de resuspender). Finalmente se resuspendió el ARN en 29  $\mu$ L de DEPC pipeteando varias veces y se incubó 10 min a 50-60 °C. Se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm y se guardó a -80°C. La purificación se evaluó por electroforesis en gel de agarosa 1%. Para ello se lavó la cuba con peróxido al 3% por 20 min para asegurar la eliminación de RNAsas que puedan degradar el ARN.

### **3.10.2.2. Purificación de ARN mensajero y síntesis del ADN copia (ADNc)**

Se purificó el ARN mensajero (ARN<sub>m</sub>) utilizando un kit de purificación (GenElute mRNA Miniprep Kit, SGMA-ALDRICH). El método de purificación de ARN<sub>m</sub> de este kit se basa en inmovilizar específicamente a una columna oligo dT el ARN<sub>m</sub> de la muestra, ya que este último contiene la cola poliA en uno de sus extremos, ausente en el ARN ribosómico y ARN de transferencia. Una vez purificado el ARN<sub>m</sub> se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm. Finalmente el ADNc de los posibles sustratos se obtuvo por transcripción reversa utilizando la enzima SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) y como cebadores se utilizó un oligonucleótidos dT<sub>12-18</sub> (Invitrogen). En un tubo eppendorff libre de RNasa se puso 1  $\mu$ L de oligo (dT) 50  $\mu$ M, 1  $\mu$ L de dNTPs 10 mM, 400 ng de ARN<sub>m</sub> aislado y H<sub>2</sub>O csp 13  $\mu$ L. Se calentó la mezcla a 65°C durante 5 min. Luego se incubo en hielo por 1 minuto para luego agregarle 4  $\mu$ L 5x First-strand Buffer, 1  $\mu$ L DTT 0.1M, 1  $\mu$ L RNAasaout (inhibidor de RNAsas) y 1  $\mu$ L Superscript III Reverse Transcriptase. Se mezcló suavemente con pipeta y se incubó a 50°C por una hora. La reacción se inactivó calentando a 70°C por 15 min y finalmente se le agrego 1  $\mu$ L RNAasa H y se incubó a 37°C por 20 min.

### **3.10.2.3. Amplificación de los genes de los potenciales sustratos de PtpA**

En cada PCR se utilizó como molde para la amplificación el ADNc obtenido y los cebadores específicos para cada gen de interés. La mezcla de PCR de volumen final de 50  $\mu$ L, se realizó mezclando 10  $\mu$ L de 5X HF Phusion Buffer, 1 $\mu$ L de dNTPs 10 mM, 2.5  $\mu$ L de cada cebador a una concentración de 10 $\mu$ M, 2 $\mu$ L de ADNc a una concentración de 30 ng/ $\mu$ L y 0.5  $\mu$ L

polimerasa Phusion 2 U/ $\mu$ L. Se realizó un control negativo sin ADN. Las condiciones de ciclado fueron: un ciclo de desnaturalización inicial de 2 min a 98°C. Luego se realizaron 35 repeticiones de: un ciclo de desnaturalización inicial de 30 seg a 98°C, un segundo ciclo de hibridación de 30 seg, a 65°C para ECHA y de 70°C para ATPA, 6PFK y SQRD, y un ciclo de extensión de 1 min a 72°C. Finalmente se realizó un último ciclo de extensión final de 10 min a 72°C. La presencia de productos de PCR se evaluó por electroforesis en gel de agarosa 1%. Las bandas conteniendo ADN del tamaño esperado se purificaron utilizando un protocolo comercial (Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit).

### **3.11. Clonado del gen de la PtpA D126A y del candidato a sustrato ECHA en los plásmidos correspondientes.**

#### **3.11.1. Clonado del gen de PtpA D126A en el plásmido pSos**

Para insertar el gen de la PtpA D126A en el plásmido pSos se realizó una digestión de dicho plásmido y del producto de PCR del gen de la PtpA D126A con las enzimas de restricción NcoI y NotI. La mezcla de reactivos para la digestión del ADN de PtpA fue 5  $\mu$ L de 10x NEB 3 Buffer, 5  $\mu$ g de ADN, 1  $\mu$ L de enzima NotI 10 U/ $\mu$ L, 1  $\mu$ L de enzima NcoI 10 U/ $\mu$ L y H<sub>2</sub>O csp 50  $\mu$ L. La mezcla de reactivos para la digestión del plásmido pSos fue 5  $\mu$ L de 10x NEB 3 Buffer, 1  $\mu$ g de plásmido, 1  $\mu$ L enzima NotI 10 U/ $\mu$ L, 1  $\mu$ L enzima NcoI 10 U/ $\mu$ L y H<sub>2</sub>O csp 50  $\mu$ L. Ambas reacciones se incubaron 2 h a 37°C. Los productos de digestión se purificaron por electroforesis en gel de agarosa 1%, purificándose el ADN utilizando un protocolo comercial que permite extraerlo de la banda del gel (Thermo Scientific Gene JET Gel Extraction Kit). Los productos se cuantificaron espectrofotométricamente (Nanodorp LITE, Thermo Scientific). El plásmido y el correspondiente inserto se ligó utilizando enzima ligasa, T4 DNA ligase (Thermo Scientific), utilizando una relación vector:inserto 1:5. Finalmente se transformaron células *Escherichia coli* DH5- $\alpha$  con los productos de ligación (siguiendo el protocolo de transformación para células quimiocompetentes ya descrito en 3.9) y se incubaron ON a 37°C en medio LB con el antibiótico correspondiente para su selección.

#### **3.11.2. Clonado del gen de la ECHA en el plásmido pMyr**

Para insertar el gen de la ECHA en el plásmido pMyr se realizó la digestión con las enzimas XhoI y Sall. La mezcla de reactivos para la digestión del ADNc de ECHA fue 5  $\mu$ L de 10x NEB 3 Buffer, 5  $\mu$ g de ADN, 1  $\mu$ L enzima XhoI 10 U/ $\mu$ L, 1  $\mu$ L enzima Sall 10 U/ $\mu$ L y H<sub>2</sub>O csp 50  $\mu$ L. La mezcla de reactivos para la digestión del plásmido pMyr fue 5  $\mu$ L de 10x NEB 3 Buffer, 1



μg de plásmido, 1 μL de enzima XhoI 10 U/μL, 1 μL de enzima Sall 10 U/μL y H<sub>2</sub>O csp 50 μL. Ambas reacciones se incubaron 2 h a 37°C. Dado que estas enzimas generan extremos cohesivos complementarios, se tuvo la precaución de pre-tratar al plásmido pMyr digerido con una fosfatasa (Fast AP Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Thermo Scientific) para evitar que este se religue. Luego se procedió como en 3.12.1.

### **3.12. Purificación de los plásmidos conteniendo el gen de interés**

Para purificar el ADN plasmídico se siguió el protocolo de purificación por lisis alcalina utilizado en el laboratorio [51]. Se inocularon varias colonias transformantes de *E.coli* DH5α por separado en 3 mL de medio LB con el antibiótico correspondiente a cada plásmido (ampicilina para pSos y cloranfenicol para pMyr). Dichos pre-cultivos se incubaron a 37°C a 200 rpm ON. Se traspasó los pre-cultivos a eppendorf de 1.5 mL limpios y se centrifugaron por 30 seg a velocidad máxima. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 200 μL de Solución I *miniprep* (Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM). Se agregó 1 μL de ARNasa 10 mg/mL y luego se le agregó 200 μL de Solución II *miniprep* (NaOH 200 mM, SDS 1%, ésta debe ser preparada en el momento), se mezcló por inversión suavemente y se dejó 5 min a temperatura ambiente. Luego se agregó 200 μL de Solución III *miniprep* previamente termostatzada a 4°C (acetato de potasio frío 3M pH 4.8), se mezcló bien y posteriormente se centrifugo a 12000 rpm por 15 min. Se recuperó el sobrenadante y se pasó a otro tubo (se puede repetir los últimos dos pasos en caso de sospechar que el sobrenadante esté contaminado por ADN genómico) y se le agregó 0.6 volúmenes de isopropanol. Se dejó incubando en hielo por 15 min y luego se centrifugó 20 minutos a 12000 rpm a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 1 mL de etanol 70%. Se dejó secar el pellet al aire durante varios minutos y se resuspendió en 30 μL de agua MilliQ. Luego se procedió a verificar la presencia de inserto.

### **3.13. Verificación del inserto**

#### **3.13.1 Verificación del inserto del gen de PtpA D126A en pSos**

Para verificar la presencia del gen de PtpA D126A en el plásmido pSos se analizaron los plásmidos purificados de los clones transformados con la construcción pSos-PtpA D126A. Se

realizó una PCR para la amplificación del inserto. La mezcla de reactivos de PCR, para un volumen total de 50  $\mu$ l, se realizó agregando 5  $\mu$ l de 10X Taq Buffer, 1  $\mu$ l de dNTPs a una concentración de 10 mM, 2  $\mu$ l de cada cebador específicos para PtpA a una concentración de 10  $\mu$ M cada uno, 4  $\mu$ l de una solución 25 mM  $MgCl_2$ , 1  $\mu$ l de ADN 500 ng/ $\mu$ l y 0.5  $\mu$ l polimerasa Taq 5 U/ $\mu$ l. Las condiciones de ciclado fueron: un ciclo de desnaturalización inicial de 1 min a 95°C. Luego se realizaron 30 repeticiones de: un ciclo de desnaturalización inicial de 2 min a 95°C, un segundo ciclo de hibridación de 30 seg a 67°C y un ciclo de extensión de 1 min a 72°C. Finalmente se realizó un último ciclo de extensión final de 10 min a 72°C. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 1%, se seleccionaron los clones positivos, y se mandó a secuenciar (Macrogen) analizándose los resultados utilizando el programa MEGA [52].

Para obtener mayor información de si se encontraba o no el inserto se realizó digestión del plásmido. Para la digestión se analizó la secuencia del plásmido con y sin inserto en búsqueda de una enzima de restricción que genere un patrón distintivo entre el plásmido sin inserto y con inserto. La digestión se realizó con la enzima de restricción BglI la cual corta 4 veces el pSos y una vez en PtpA D126A ver figura 4.5. La mezcla de reactivos de digestión, para un volumen total de 20  $\mu$ l, se realizó agregando 2  $\mu$ l 10x Fast Digest buffer (Fermentas), 1  $\mu$ l de ADN (500 ng/ $\mu$ l) y 1  $\mu$ l de la enzima BglI. Se incubo a 37°C durante 20 min. Se analizó el resultado de la digestión por electroforesis en gel de agarosa 1%. Se seleccionaron los clones positivos, y se mandó a secuenciar los plásmidos utilizando cebadores específicos para las secuencias flanqueantes al sitio de clonado (Macrogen) analizándose los resultados utilizando el programa MEGA [52].

### **3.13.2. Verificación del inserto del gen ECHA en pMyr**

Para verificar la presencia del gen de ECHA en el plásmido pMyr se analizaron por PCR los plásmidos purificados de los clones transformados con la construcción pMyr-ECHA. La mezcla de reactivos de PCR, para un volumen total de 50  $\mu$ l, se realizó agregando 5 $\mu$ l de 10X Taq Buffer, 1  $\mu$ l de dNTPs a una concentración de 10 mM, 1.5  $\mu$ l de cada cebador específico a una concentración de 10  $\mu$ M, 4  $\mu$ l de una solución 25 mM  $MgCl_2$ , 1  $\mu$ l de ADN 150 ng/ $\mu$ l y 0.5  $\mu$ l polimerasa Taq 5 U/ $\mu$ l. Se realizó control negativo sin ADN. Las condiciones de ciclado fueron: un ciclo de desnaturalización inicial de 1 min a 95°C. Luego se realizaron 30 repeticiones de: un ciclo de desnaturalización inicial de 2 min a 95°C, un segundo ciclo de

hibridación de 30 seg a 65°C y un ciclo de extensión de 1 min a 72°C. Finalmente se realizó un último ciclo de extensión final de 10 min a 72°C. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 1%, se seleccionaron los clones positivos y se mandaron a secuenciar, analizándose los resultados utilizando el programa MEGA [52].

### **3.14. Co-transformaciones con los plásmidos del ensayo de doble híbrido**

#### **3.14.1. Preparación de células de levadura competentes**

Se prepararon las células competentes de *Saccharomyces cerevisiae* cdc25H a partir de colonias frescas (3 o 4 días de cultivo, máximo una semana) crecidas en medio YPAD agar a 25°C. En paralelo, como control de sensibilidad de la temperatura, se incubó en medio YPAD agar a 37°C un inóculo de células *Saccharomyces cerevisiae* cdc25H obtenido a partir del stock -80°C. La preparación de células competentes se hizo siguiendo un protocolo utilizado usualmente en la Sección de Bioquímica [53]. Para ello, se inoculó 10 ml de medio YPAD con algunas colonias (de 4 a 5) de levadura cdc25H crecida a 25°C y se incubó ON a 23°C. Se midió la  $DO_{600\text{ nm}}$  de una dilución 1/20 de dicho pre-cultivo. A continuación, en un matraz de 250 ml autoclavado se realizó una dilución del pre-cultivo hasta una  $DO_{600\text{ nm}}$  final de 0.3. El volumen final de esta dilución depende del número de transformaciones a realizarse, siendo 10 ml por cada transformación. Dado que se realizaron 9 transformaciones y se necesitaba 75 µL extra de células (para el control de reversión de sensibilidad a la temperatura), el volumen final fue de 100 ml y el volumen a agregar de pre-cultivo fue de 12 µL ( $DO_{600\text{ nm pre-cultivo}} \times V_i = 0.3 \times 100\text{ mL}$ ). Se incubó el cultivo a 23°C y a 200 rpm hasta llegar a una  $DO_{600\text{ nm}}$  entre 0.6-0.8 (aproximadamente, 3h30 min, el kit recomienda como mínimo 3 h de cultivo). Como control de sensibilidad de la temperatura, un volumen de 75 µl se sembró en placas de YPAD-agar y se incubó a 37°C.

Posteriormente, se centrifugó el cultivo en 3 tubos falcon de 50 mL autoclavados (cada uno con aprox. 30 ml), a temperatura ambiente, durante 15 min y a 4000 rpm. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron (suavemente) en 1 mL de TE/LiAc cada uno. Se centrifugó nuevamente 5 min a 4000 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células suavemente en 1 mL de TE/LiAc, se transfirieron a un tubo ependorff y nuevamente se centrifugó 5 min a 4000 rpm. El pellet de células se resuspendió nuevamente en TE/LiAc. El volumen en el cual se resuspendieron depende de la cantidad de transformaciones a realizar, siendo 100 µL por transformación, por lo que se resuspendieron

en 1000  $\mu$ l finales y se alicuotaron de a 100  $\mu$ l por tubo. Estas células deben ser preparadas el mismo día que serán utilizadas.

### **3.14.2. Transformación**

Previo a la transformación y luego de alicuotar las células competentes se desnaturalizó el ADN de esperma de salmón 10 mg/mL durante 5 minutos a 96°C y se dejó en hielo hasta el momento de usarlo. A cada tubo conteniendo las células competentes (100  $\mu$ l) se agregó 1  $\mu$ l de las construcciones correspondientes a cada co-transformación, a las concentraciones descritas en la tabla 4. Luego se agregó 10  $\mu$ L de ADN de esperma de salmón 10 mg/mL y finalmente 550  $\mu$ L de la solución TE/LiAc/PEG. Los tubos se agitaron por 30 min en un rotor a temperatura ambiente y se realizó a continuación un shock térmico de 15 min en baño de agua a 42°C. Luego, se centrifugaron los tubos a 4000 rpm durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 200  $\mu$ L de MM (Medio mínimo). Se sembraron las diferentes transformaciones en medio SD/Glucosa (-UL). Para la co-transformación 1 se sembró por separado 10  $\mu$ L y 100  $\mu$ L lo que permitirá evaluar la eficiencia de la transformación y se incubó a 25°C durante 6 días. El resto se sembró en una tercera placa y se incubó a 37°C durante 6 días, para evaluar la aparición de posibles reversiones de la sensibilidad a la temperatura. Para el resto de las co-trasformaciones se sembró el total de células (200  $\mu$ L) en una placa SD/Glucosa (-UL) y se incubó a 25°C durante 6 días. Luego de transcurrido este tiempo, se seleccionaron tres colonias de cada una de las trasformaciones y se realizó una suspensión de células en 25  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O estéril en una placa de 96 pocillos estéril. Se tomó 2,5  $\mu$ L de esta suspensión y se sembraron (en forma de spot) por separado en una placa de SD/Glucosa (-UL) a 25 °C y 37°C y SD/Galactosa (-UL) a 25 °C y 37 °C, incubando las mismas entre 6 y 10 días.

Tabla 4: Descripción de las co-transformaciones del sistema de doble híbrido

Co-transformación	Plásmidos	Concentración (ng/μL)	
1	pSos	348	Ensayo para el cálculo la eficiencia de transformación
	pMyr	280	
2	pSos MAFB	100	Control positivo del sistema doble híbrido
	pMyr MAFB	140	
3	pSos MAFB	100	Control negativo del sistema doble híbrido
	pMyr Lamin C	160	
4	pSos Col I	110	Control negativo del sistema doble híbrido
	pMyr MAFB	140	
5	pSos MAFB	100	Control positivo del sistema doble híbrido
	pMyr SB	142	
6	pSos PtpA	500	Control negativo de interacción inespecífica
	pMyr Lamin C	160	
7	pSos PtpA D126A	500	Control positivo de correcta localización citosólica de PtpA D126A
	pMyr SB	142	
8	pSos PtpA D126A	500	Ensayo en el cuál se evalúa la interacción entre la PtpA D126A y ECHA
	pMyr ECHA	114	

A continuación se detalla cada una de las co-transformación realizadas y descritas en la tabla 4.

- La co-transformación 1 se realizó con el fin de calcular la eficiencia de transformación, utilizándose los plásmidos pSos y pMyr.
- La co-transformación 2 y 5 fueron utilizados como control positivo de que el sistema doble híbrido está funcionando, ya que las proteínas expresadas en estos vectores (hSos-MAFB y Myr-MAFB para la co-transformación 2 y hSos-MAFB y Myr-SB para la co-transformación 5) interaccionan entre ellas *in vivo* (MAFB con MAFB en la co-transformación 2 y hSos con SB en la co-transformación 5) permitiendo la activación de la vía RAS.
- Las co-transformaciones 3 y 4 se utilizan como controles negativos ya que las proteínas expresadas (MAFB con Lamin C en la co-transformación 3, o Coll con MAFB en la co-transformación 4) no interaccionan entre ellas *in vivo*.
- La co-transformación 6 se utiliza como control negativo de que no existe interacción entre el la fosfatasa PtpA D126A (carnada) y la Lamin C.

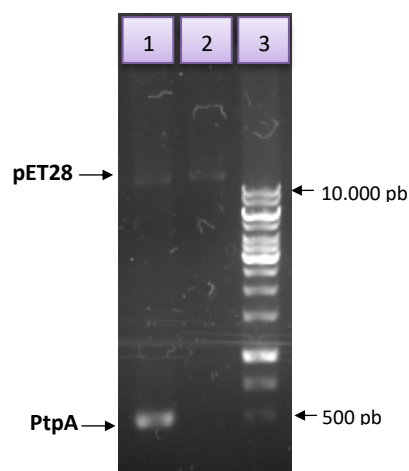
- En la co-transformación 7 se utiliza el plásmido pSos-PtpA D126A (que expresa la proteína de fusión hSos-PtpA D126A) y el plásmido pMyr SB (que expresa la proteína SB de unión a hSos fusionada a la señal de myristilación). Por tanto si hSos-PtpA D126A está presente en el citosol hSos podrá llegar a la membrana e interactuar con la proteína SB, activando la cascada de señalización, permitiendo el crecimiento de la levadura cdc25H a 37°C. Esto indirectamente confirma que la proteína de fusión hSos-PtpA D126A de *M. tuberculosis* está en citosol.
- La co-transformación 8 corresponde al ensayo en el cuál se evalúa la interacción entre la PtpA de *Mtb* y el candidato a sustrato fisiológico, la proteína humana ECHA.

## 4. Resultados y Discusión

### 4.1. Amplificación de la secuencia de los genes de interés

#### 4.1.1. Amplificación del gen de la fosfatasa PtpA D126A de *Mtb*

Se logró amplificar con éxito la secuencia del gen que codifica la fosfatasa en tirosina PtpA D126A de *Mtb* utilizando como molde el gen de la PtpA D126A clonada en el vector pET28a, disponible en laboratorio. En la figura 4.1 se muestra la electroforesis del producto de PCR obtenido. En el carril 1 se observa la banda de tamaño esperado (aprox. 500 pb) y también una banda de mayor tamaño correspondiente al plásmido utilizado como molde el cual se sembró como referencia en el carril 2. Luego de purificar la banda de PCR de interés, digerirla con enzimas de restricción específicas y purificarlo se obtuvo una concentración de ADN del orden de 3 ng/ $\mu$ L. Dicha muestra se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior utilización en el sub-clonado en el vector pSos del sistema de doble híbrido.

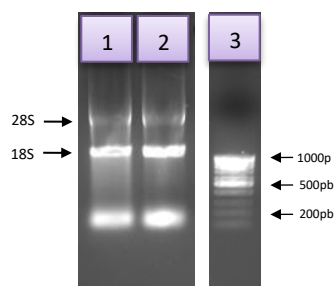


**Figura 4.1:** Electroforesis en gel de agarosa 1% mostrando la amplificación del gen de la PtpA D126A de *Mtb* utilizando como molde el plásmido pET28a-PtpA. Carril 1: Producto de PCR obtenido, Carril 2: Plásmido pET28a-PtpA D126A. Carril 3: Marcador de pares de bases (Fermentas SM0313).

#### 4.1.2. Obtención del ADNc de los candidatos a sustrato de PtpA

Dado que los potenciales sustratos de la fosfatasa PtpA son proteínas eucariotas, se debió obtener el ADNc, con dicho objetivo se extrajo y purificó previamente el ARN total a partir de macrófagos humanos derivados de células THP-1. En la extracción de ARN se obtuvieron 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de ARN total (200  $\mu\text{g}$  totales). En la figura 4.2 se muestra la electroforesis del ARN total obtenido. En los carriles 1 y 2 se observa el patrón típico de bandas de ARN, una banda de mayor tamaño correspondiente al ARN ribosómico 28S, una banda de tamaño

intermedio correspondiente al ARN ribosómico 18S y finalmente se observa una banda de menor tamaño que no siempre se logra ver y que corresponde al ARN transferencia, al ARN ribosómico 5S y otros pequeños ARNs. Entre medio de las bandas se observa un “smear” que se correspondería con el ARN<sub>m</sub>. Este ensayo permitió evaluar la integridad del ARN total y continuar con la etapa de purificación del ARN<sub>m</sub>. Este último se purificó mediante un kit comercial (GenElute mRNA Miniprep kit, Sigma) obteniéndose una concentración final de ARN<sub>m</sub> de 100 ng/μL, correspondiente a 5 μg totales, coherente con el rendimiento estipulado por dicho kit (2 a 5 μg de ARN<sub>m</sub> cada 100 μg de ARN total).

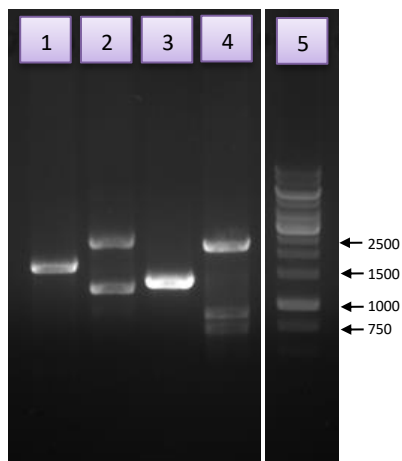


**Figura 4.2:** Electroforesis en gel de agarosa 1% mostrando el producto de purificación del ARN<sub>total</sub> extraído de macrófagos humanos derivados de células THP1. Carril 1: 2μL ARN<sub>total</sub>; carril 2: 3μL ARN<sub>total</sub>; carril 3: marcador de pares de bases (304005 Bioron).

Posteriormente, se obtuvo mediante retrotranscripción el ADNc a partir de 400 ng del ARN<sub>m</sub> obtenido. Dicho ADNc se utilizó como molde para la amplificación de los genes de los candidatos a sustrato de PtpA utilizando cebadores específicos. En la figura 4.3 se muestra la electroforesis de los productos de PCR obtenidos para los posibles sustratos de PtpA: ECHA, ATPA, K6PP y SQRD. Para seleccionar la banda adecuada, se tuvo en cuenta la información extraída de la base de datos de Uniprot de los tamaños de cada uno de los genes y sus posibles isoformas. En el carril 1 se observa una única banda conteniendo el producto de amplificación de la ATPA. Esta banda puede contener cualquiera de las isoformas de la ATPA reportadas en Uniprot, isoforma 1 de 1662 pb (P25705-1), isoforma 2 de 1596 pb (P25705-2) e isoforma 3 de 1512 pb (P25705-3), lo que deberá ser confirmado por secuenciación. En el carril 2, se observan dos bandas de diferente tamaño pero similares en intensidad, correspondientes al producto de la amplificación para la K6PP. Una de ellas se encuentra entre 2300-2400 pb y la otra es de unos 1500 pb. En este caso seleccionamos la banda superior que pensamos puede corresponder a alguna de las dos isoformas descritas en Uniprot, isoforma 1 de 2355 pb (Q01813-1) e isoforma 2 de 2531pb (Q01813-2), lo que deberá confirmarse por secuenciación. En el carril 3 se muestra el producto de PCR para la SQRD, dónde se observa una única banda intensa que se corresponde con la



única isoforma de dicha proteína de 1353 pb (Q9Y6N5-1). Finalmente, en el carril 4, se muestra el producto de PCR obtenido para la ECHA donde se observan 3 bandas, una más intensa cercana a 2500 pb y las otras dos menos intensas de menos de 1000 pb. En este caso seleccionamos la banda más intensa que pensamos puede corresponderse con la isoforma 1 de la ECHA, secuencia completa de 763 aa y 2292 pb (P40939-1). Esto fue confirmado posteriormente por secuenciación una vez subclonado dicho gen en el vector pMyr del sistema de doble híbrido (ver punto 4.2.2). Es posible que las bandas menores se correspondan con la isoforma 2 descrita en Uniprot de 262 aa y 786 pb (P40939-2), la cual carece de uno de los dominios catalíticos.



**Figura 4.3:** Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de amplificación de los genes de los posibles sustratos de PtpA. Carril 1: producto de PCR utilizando cebadores para la ATPA. Carril 2: productos de PCR utilizando cebadores para la K6PP. Carril 3: producto de PCR utilizando cebadores para la SQRD. Carril 4: productos de PCR utilizando cebadores para la ECHA. Carril 5: Marcador de peso molecular (Fermentas SM0313).

Hasta ahora sólo hemos confirmado la secuencia del gen de la proteína entera ECHA, dado que el presente trabajo se centró en este candidato a sustrato de PtpA. Los otros productos serán enviados a secuenciar a medida que sean sub-clonados por nuestro grupo.

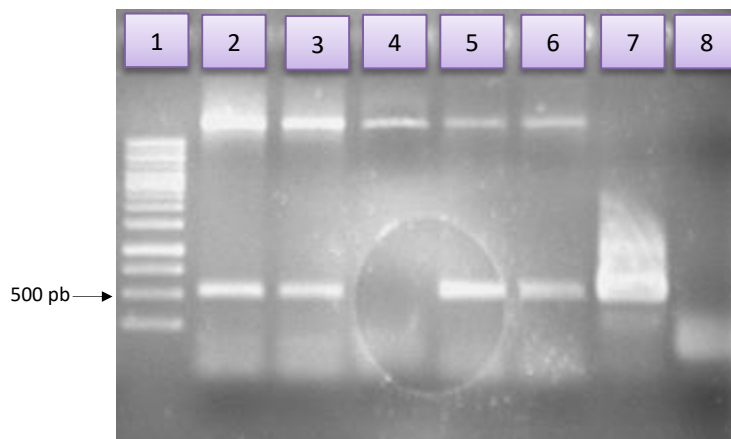
#### **4.2. Clonado de las secuencias de interés en los plásmidos pSos y pMyr**

En el marco de esta tesis se logró clonar exitosamente el gen de PtpA D126A en el plásmido pSos y el gen de ECHA en el plásmido pMyr, para el estudio de su interacción mediante el sistema de doble híbrido. Para el clonado de estos genes se realizó la digestión del plásmido (pMyr o pSos) y del producto de PCR purificado (PtpA D126A o ECHA) con las enzimas de restricción correspondientes, tal como se detalla en la metodología. Los productos de ligación se utilizaron para transformar células de *E. coli* DH5 $\alpha$  quimiocompetentes,

observándose colonias en los respectivos medios de selección (LB ampicilina para pSos y LB cloranfenicol para pMyr). Se realizó con éxito las extracciones de ADN plasmídico de los clones seleccionados, verificándose la presencia del plásmido por electroforesis en gel de agarosa 1% (figuras no mostradas). Posteriormente, para la verificación de la presencia de los insertos de interés se realizó una PCR utilizando los plásmidos purificados como molde y cebadores específicos. Los clones PCR positivos se mandaron a secuenciar con el objetivo de verificar y obtener la secuencia del inserto.

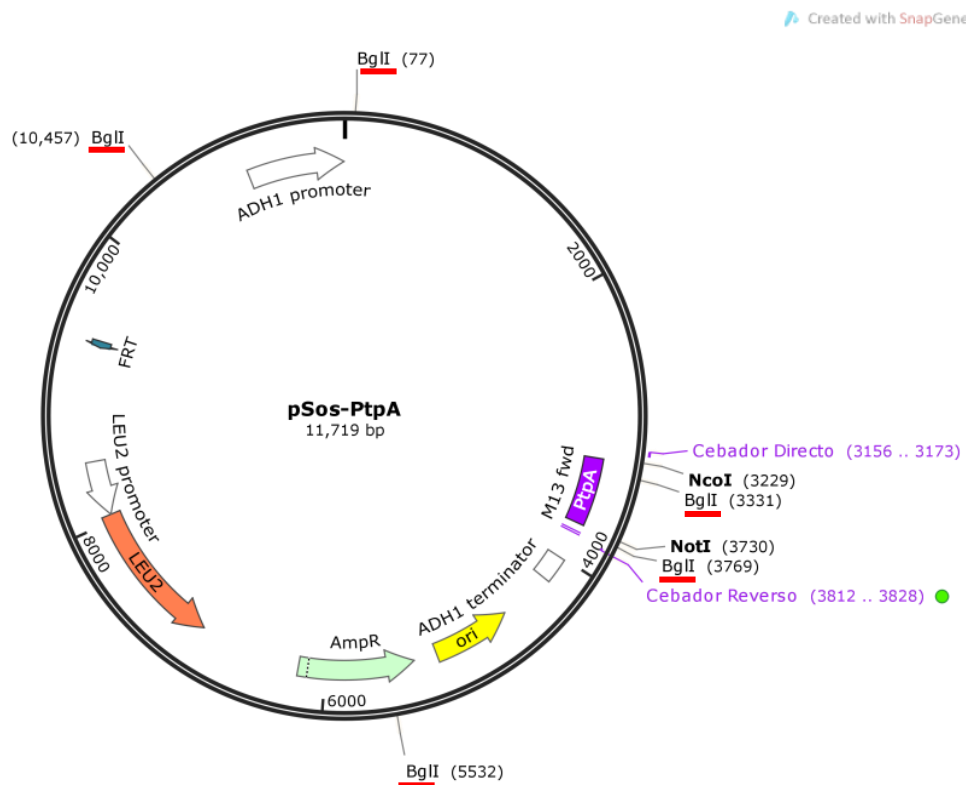
#### 4.2.1. Confirmación de la presencia del gen de PtpA D126A en el plásmido pSos

Se evaluaron por PCR un total de 21 clones. En una primera etapa, de 12 clones evaluados 11 fueron positivos. En la figura 4.4 se muestra a modo de ejemplo el resultado de 5 clones (4 positivos y uno negativo). En los casos positivos, mostrados en el carril 2, 3, 5 y 6, se detectó una banda del tamaño esperado (~ 500 pb).



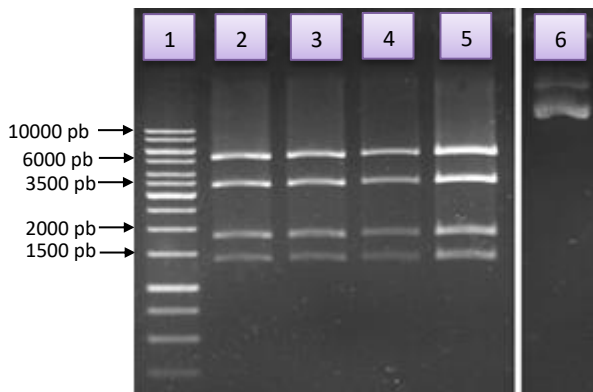
**Figura 4.4:** Electroforesis en gel de agarosa 1% mostrando la amplificación del gen de la PtpA D126A de *Mtb* utilizando como molde pSos-PtpA D126A y cebadores complementarios a los extremos del gen de PtpA. Carril 1: Marcador de pares de bases (Fermentas SM0313). Carril 2: producto de PCR clon 1. Carril 3: producto de PCR clon 2. Carril 4: producto de PCR clon 3. Carril 5: producto de PCR clon 4. Carril 6: producto de PCR clon 5. Carril 7: control positivo de amplificación de PtpA D126A utilizando como molde pET28a-PtpA D126A. Carril 8: control negativo sin ADN.

De este grupo de clones positivos, se enviaron a secuenciar 6 clones (Macrogen), cuyas secuencias fueron analizadas utilizando el programa MEGA [52]. Con los resultados de secuenciación provistos por Macrogen no fue posible alinear con éxito ninguna de las secuencias de los clones con la secuencia consenso de PtpA extraída del sitio Tuberculist [54], lo que impidió en esta etapa confirmar la presencia del inserto en el plásmido pSos. En este caso para la secuenciación se utilizaron cebadores complementarios al gen de la PtpA, los mismos utilizados para el subclonado de PtpA. Como alternativa para verificar que estos clones realmente tenían el gen de la PtpA se realizó también una digestión con la enzima de restricción BglII la cual genera un patrón de 5 bandas en caso de estar presente el inserto y uno de 4 bandas si no está presente el inserto. En la figura 4.5 se representan un esquema del plásmido pSos PtpA D126A resaltándose los sitios de corte por BglII.



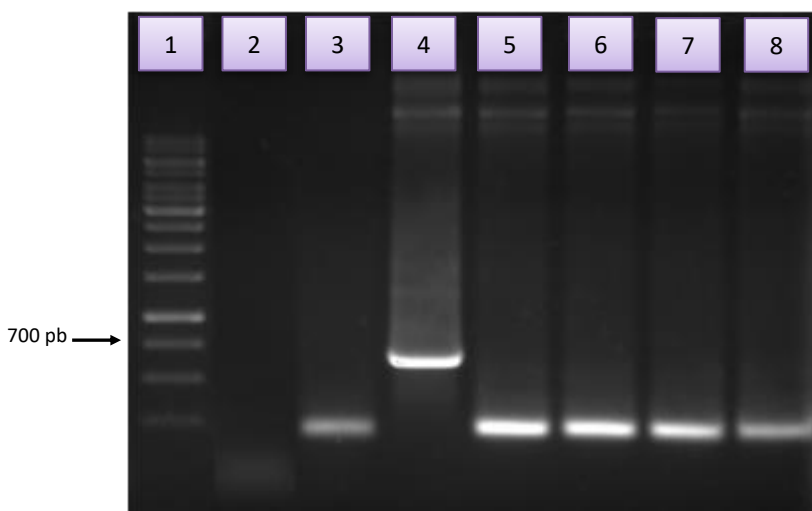
**Figura 4.5:** Esquema del plásmido pSos-PtpA D126A. Subrayado en rojo se indican los sitios de corte por BglII. Fragmentos generados al digerir dicho plásmido por BglII: el mayor de 4924 pb, seguido de uno de 3257 pb, otro de 1763pb, otro de 1339 pb, y el de menor tamaño de 438 pb.

Sin embargo, como muestra figura 4.6, se observó el mismo patrón de 4 bandas tanto para pSos como para los diferentes clones digeridos, por tanto estos clones no tendrían inserto PtpA D126A. La obtención de productos de PCR a partir de estos clones podría deberse a que alguno de los reactivos estuviera contaminado (ADN genómico) que haya permitido amplificar de manera inespecífica un gen de tamaño similar al esperado.



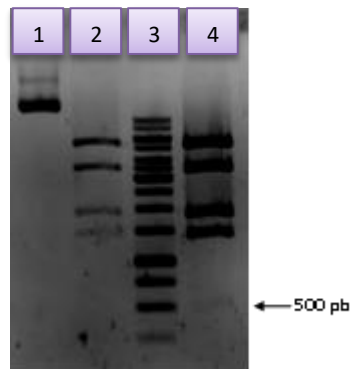
**Figura 4.6:** Electroforesis en gel de agarosa 1%. Carril 1: Marcador de pares de bases (Fermentas SM0313). Carril 2: producto digestión con BglI del clon 1. Carril 3: producto digestión con BglI del clon 2. Carril 4: producto digestión con BglI del clon 3. Carril 5: producto digestión con BglI del clon 4. Carril 6: pSos sin digerir.

En una segunda etapa, se decidió cambiar de cebadores para intentar mejorar la calidad de las secuencias, utilizando cebadores complementarios a las secuencias flanqueantes al sitio de clonado de pSos (donde se espera se inserte PtpA D126A). Se analizaron 9 clones más por PCR, de los cuales en la figura 4.7 se muestra a modo de ejemplo los productos de PCR de 6 de estos clones. Como puede observarse sólo uno de ellos fue positivo (clon 14 en el carril 4), detectándose una banda del tamaño esperado de unos 700 pb (492 pb de PtpA D126A más 181 pb de la secuencia flanqueante al sitio de clonado).



**Figura 4.7:** Electroforesis en gel de agarosa 1% mostrando la amplificación del gen de la PtpA D126A de *Mtb* utilizando como molde pSos-PtpA D126A y cebadores complementarios a secuencia flanqueante al sitio de clonado de pSos. Carril 1: Marcador de pares de bases (Fermentas SM0313). Carril 2: control negativo sin ADN. Carril 3: producto PCR del clon 13. Carril 4: producto PCR clon 14. Carril 5: producto PCR clon 15. Carril 6: producto PCR clon 16. Carril 7: producto PCR clon 17. Carril 8: producto PCR clon 18.

Para el clon positivo obtenido, se realizó la digestión con la enzima de restricción BglI y tal como se muestra en la figura 4.8, en este caso se obtuvo el patrón de 5 bandas esperado que indica la presencia del gen de PtpA D126A en el plásmido pSos (carril 4). Además, la secuencia de este clon se alineó con éxito con la secuencia consenso de PtpA, lo que permitió confirmar la presencia del inserto en el plásmido pSos.



**Figura 4.8:** Electroforesis en gel de agarosa 1%. Carril 1: pSos sin digerir con BglI. Carril 2: pSos digerido con BglI. Carril 3 Marcador de pares de bases (Fermentas SM0313). Carril 4: producto digestión del clon 14 con BglI.

Como última etapa se obtuvo la secuencia de dicho clon la cuál alineó perfectamente con el gen de la PtpA salvaje. En la figura 4.9 se muestra el alineamiento de la secuencia del inserto del plásmido pSos-PtpA con los resultados de macrogen para el clon 14. Para ello, se introdujo la secuencia consenso de PtpA salvaje, extraída del sitio Tuberculist [54], en el sitio de clonado de pSos. Se observa una única diferencia la cual es esperada ya que estamos comparando la PtpA salvaje con el mutante D126A. En el nucleótido 377 del clon 14, se detecta una adenina A en la PtpA D126A, el cual es una citosina (C) en el gen de la PtpA-salvaje, correspondiente al cambio de codón (GAT por GCT).

```

F : -----CGAAATTAGTTATAGTACGATCCCAATGGGATGCTGATCCGCTGCACGTACATTCCTTTGACGGCAACAATCTCCCGTGGCAAATGCGCGAAGAATGTTCC : 125
R : AGCAAGCAAAATAGTTATAGTACGATCCCAATGGGATGCTGATCCGCTGCACGTACATTCCTTTGACGGCAACAATCTCCCGTGGCAAATGCGCGAAGAATGTTCC : 798
PtpA : -----ATGCTGATCCGCTGCACGTACATTCCTTTGACGGCAACAATCTCCCGTGGCAAATGCGCGAAGAATGTTCC : 76
g aaattagttatagtagtccccatgctctgattccgctgcacgtcacattcctttgacggcaacaatctccgctggcaaatgccccgaagaatgttcc
00 * 820 * 840 * 860 * 880 * 900 *
F : CCCAACAGTTCGCCAACCCTGGCTGGGTGACGGGTGGAGTAGCAGTGGGGGACCGGAACTGGCAATGAGCAATGGCCGACGAGCGGGCGCGGGTGTTCGGAG : 239
R : CCCAACAGTTCGCCAACCCTGGCTGGGTGACGGGTGGAGTAGCAGTGGGGGACCGGAACTGGCAATGAGCAATGGCCGACGAGCGGGCGCGGGTGTTCGGAG : 912
PtpA : CCCAACAGTTCGCCAACCCTGGCTGGGTGACGGGTGGAGTAGCAGTGGGGGACCGGAACTGGCAATGAGCAATGGCCGACGAGCGGGCGCGGGTGTTCGGAG : 190
CCCAACAGTTCGCCAACCCTGGCTGGGTGACGGGTGGAGTAGCAGTGGGGGACCGGAACTGGCAATGAGCAATGGCCGACGAGCGGGCGCGGGTGTTCGGAG
920 * 940 * 960 * 980 * 1000 * 1020
F : CCCAGGCTACCCFACCGACACCGGGCGGCAAAAGTGGCACCGCAACCTGGGGCAGACCTGTGGTGGCTTGGACCGCAACCACCGCTGGCTGGCGCAGCTGGCGG : 353
R : CCCAGGCTACCCFACCGACACCGGGCGGCAAAAGTGGCACCGCAACCTGGGGCAGACCTGTGGTGGCTTGGACCGCAACCACCGCTGGCTGGCGCAGCTGGCGG : 1026
PtpA : CCCAGGCTACCCFACCGACACCGGGCGGCAAAAGTGGCACCGCAACCTGGGGCAGACCTGTGGTGGCTTGGACCGCAACCACCGCTGGCTGGCGCAGCTGGCGG : 304
CCCAGGCTACCCFACCGACACCGGGCGGCAAAAGTGGCACCGCAACCTGGGGCAGACCTGTGGTGGCTTGGACCGCAACCACCGCTGGCTGGCGCAGCTGGCGG
1040 * 1060 * 1080 * 1100 * 1120 * 1140
F : TCGAAGCCCGGGTACGGAATGCTGGTCAATTCGACCCACGCTCGGACCCCATGGCTCGATGTCGAGCTCCCTACTATGGCGATCACTCCGACTTCGAGGAGGCTTCC : 467
R : TCGAAGCCCGGGTACGGAATGCTGGTCAATTCGACCCACGCTCGGACCCCATGGCTCGATGTCGAGCTCCCTACTATGGCGATCACTCCGACTTCGAGGAGGCTTCC : 1140
PtpA : TCGAAGCCCGGGTACGGAATGCTGGTCAATTCGACCCACGCTCGGACCCCATGGCTCGATGTCGAGCTCCCTACTATGGCGATCACTCCGACTTCGAGGAGGCTTCC : 418
TCGAAGCCCGGGTACGGAATGCTGGTCAATTCGACCCACGCTCGGACCCCATGGCTCGATGTCGAGCTCCCTACTATGGCGATCACTCCGACTTCGAGGAGGCTTCC
* 1160 * 1180 * 1200 * 1220 * 1240 *
F : CCGTCATCGAATCCGCGCTCCCGCTGCACGACTGGTTCGACGAAGCTCTCGCGGGAACCGGACCGAGTTGACCGCGCGCGGTTAAATTAATTAACCGCGCCCTTT : 581
R : CCGTCATCGAATCCGCGCTCCCGCTGCACGACTGGTTCGACGAAGCTCTCGCGGGAACCGGACCGAGTTGACCGCGCGCGGTTAAATTAATTAACCGCGCCCTTT : 1254
PtpA : CCGTCATCGAATCCGCGCTCCCGCTGCACGACTGGTTCGACGAAGCTCTCGCGGGAACCGGACCGAGTTGACCGCGCGCGGTTAAATTAATTAACCGCGCCCTTT : 492
CCGTCATCGAATCCGCGCTCCCGCTGCACGACTGGTTCGCGGGAACCGGACCGAGTTGAGgggcccgggtaattaattaacccggcgccttt

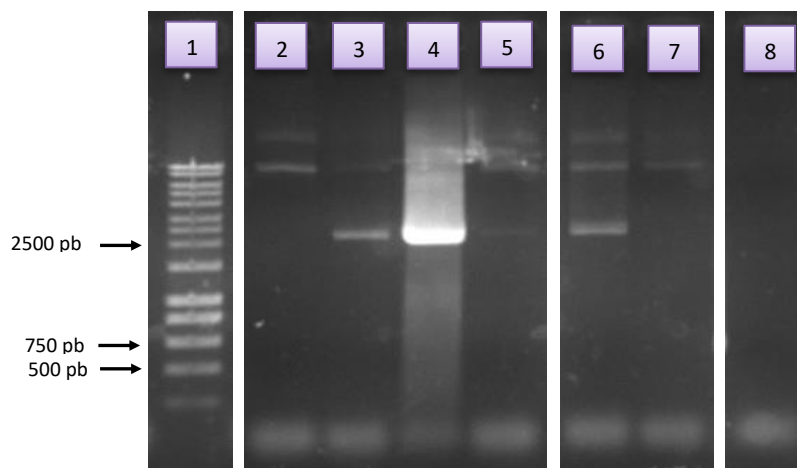
```

Figura 4.9. Alineamiento de las secuencias obtenidas de PtpA D126S.

En negro se observa la secuencia del gen de PtpA alineada con ambos productos de secuenciación. En gris se observa las secuencias flanqueantes al sitio de clonado alineadas con ambos productos de secuenciación. F: producto secuenciación utilizando cebador universal directo de pSos. R: Producto secuenciación utilizando cebador universal reverso de pSos. PtpA: secuencia gen de PtpA salvaje de *Mtb* extraído de Tuberculist [54].

#### 4.2.2. Confirmación de la presencia del gen de ECHA en pMyr

La presencia del gen ECHA en pMyr se analizó evaluando por PCR el ADN plasmídico extraído de 12 de los clones obtenidos, utilizando como cebadores las secuencias complementarias a los extremos del gen de ECHA. En la figura 4.10 se muestran a modo de ejemplo la electroforesis de los productos de PCR de 6 de los clones analizados. De estos clones, 4 fueron positivos (carril 3, 4, 5 y 6) detectándose la banda del tamaño esperado para el gen de la ECHA, de aprox. 2500 pb.



**Figura 4.10:** Electroforesis en gel de agarosa 1% mostrando la amplificación del gen de ECHA utilizando como molde pMyr-ECHA y cebadores complementarios a los extremos del gen de ECHA. Carril 1: Marcador de pares de bases (Fermentas SM0313). Carril 2: producto de PCR clon a. Carril 3: producto de PCR clon b. Carril 4: producto de PCR clon c. Carril 5: producto de PCR clon d. Carril 6: producto de PCR clon e. Carril 7: producto de PCR clon f. Carril 8: control negativo sin ADN.

A continuación se secuenciaron los insertos de tres de los clones positivos y las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa MEGA comparándolas con la secuencia consenso de ECHA de Uniprot (P40939). De estos tres clones sólo uno mostró identidad (clon b) con la secuencia consenso de ECHA (Figura 4.11). El resultado del resto de los clones fue inconcluso ya que las secuencias fueron de muy mala calidad.

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130  
 ECHA  
 F ATGGTGGCCGCGGGCGATTGGCATCTCAGCCGCTTTCTGCTTCAGGATCTCCGCTCCGAGGTTATATATGCCGCAATTTTACAGGGTCTTCTGCTTGTGACAGARCCCATATTAACATATG  
 R GGGCATC-TCAGCCGCTTTCTGCTTCAGGATCTCCGCTCCGAGGTTATATATGCCGCAATTTTACAGGGTCTTCTGCTTGTGACAGARCCCATATTAACATATG  
 Consenso .....ggcatc.tcagccgcttttctgcttcaggatcctccgctccgaggttatatatgccgcaatlttacagggtcttctgcttggctgaccagaacctatlaactatg

131 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260  
 ECHA  
 F GAGTCAARAGGGGATGTGGCAGTGTTCGATTAACCTCCCAATTCARAGGTAARATACACTGAGTAARAGGCTACATTCAGAGTTCAGAGGTTATGAATGAARCTGGGCTAGTGATCAATCAGAG  
 R GAGTCAARAGGGGATGTGGCAGTGTTCGATTAACCTCCCAATTCARAGGTAARATACACTGAGTAARAGGCTACATTCAGAGTTCAGAGGTTATGAATGAARCTGGGCTAGTGATCAATCAGAG  
 Consenso gagtcaaaggggatgtggcagttgttcgaatlaactctccaattcaaaggtlaatacactgagtaaagagctacattcagagttctcagaagttatgaatgaaatctgggctagtgatcaaatcagaag

261 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390  
 ECHA  
 F TGCCGTCTTATCTCATCAARAGCCAGGCTGCTTTATTGCAAGTCTGATATCAACATGTTAGCCGCTTCAAGACCTTCAAGAGTAAACACAGCTATCACAAGAGCACAGAGATAGTTGAGAACCT  
 R TGCCGTCTTATCTCATCAARAGCCAGGCTGCTTTATTGCAAGTCTGATATCAACATGTTAGCCGCTTCAAGACCTTCAAGAGTAAACACAGCTATCACAAGAGCACAGAGATAGTTGAGAACCT  
 Consenso tggcgtccttatctcatcaaagccaggtgctttattgcaaggtgctgatatacaatgtagccgcttcaagagccttcaagaagtaacacagctatcacaagaagcacagagaatagttgagaaactt

391 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520  
 ECHA  
 F GAAAGTCCACAAAGCCTATTGTGGCTGCCATCAATGGATCTGCCGAGGAGGAGGACTTGAGGTTGCCATTTCAATGCCAATACAGATAGCAACAAAGACAGAAAACAGTATTAGGTACCCCTGAG  
 R GAAAGTCCACAAAGCCTATTGTGGCTGCCATCAATGGATCTGCCGAGGAGGAGGACTTGAGGTTGCCATTTCAATGCCAATACAGATAGCAACAAAGACAGAAAACAGTATTAGGTACCCCTGAG  
 Consenso gaaaagtcacaaagcctattgtggctgccatcaatggatcctgctgggagggagacttgaggttgcatttcatgccaatacagaatagcaacaaagacagaaaaacagattaggtaccctgaag

521 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650  
 ECHA  
 F TTTTGTGGGGGCTTACCAGGAGCAGGAGGACACAAAGGCTGCCAARATGGTGGTGTGCCGTGCTGCTTTGGACATGATGCTGACTGGTAGAAGCATTCTGTCAGACAGGGCAAGAAATGGGACT  
 R TTTTGTGGGGGCTTACCAGGAGCAGGAGGACACAAAGGCTGCCAARATGGTGGTGTGCCGTGCTGCTTTGGACATGATGCTGACTGGTAGAAGCATTCTGTCAGACAGGGCAAGAAATGGGACT  
 Consenso ttttgtgggggcttaccaggagcaggaggcacacaaagctgccaaaatggtgggtgtgctgctgcttggacatgatgctgactggtagaagcattcgtgcagacagggcaagaaaaatgggact

651 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750 760 770 780  
 ECHA  
 F GGTGACCACTGGTGGARCCCTGGGACCAGGACTAAACCTCCAGAGGACGGACATAGATACCTAGAAGAGTTGCAATTACTTTTGCCAAAGGACTAGCTGATAGAAGATCTCTCCAAGAGA  
 R GGTGACCACTGGTGGARCCCTGGGACCAGGACTAAACCTCCAGAGGACGGACATAGATACCTAGAAGAGTTGCAATTACTTTTGCCAAAGGACTAGCTGATAGAAGATCTCTCCAAGAGA  
 Consenso ggttgaccaactggtggaaccctgggaccaggactaaaacctccagaggaacggacaataagaatctagaagaagttgcaatcttggccaagagactagctgataagaagatctctccaagaga

781 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900 910  
 ECHA  
 F GACRAGGGATTGGTGGAAAATGACAGCGTATGCCATGACTATTCCATTGTGACGGACACAGGTTTACAAAAGTGGAGAAAAGTGGCAAGCAGACTAARAGGCTTTATCTGCACCTCTGAAA  
 R GACRAGGGATTGGTGGAAAATGACAGCGTATGCCATGACTATTCCATTGTGACGGACACAGGTTTACAAAAGTGGAGAAAAGTGGCAAGCAGACTAARAGGCTTTATCTGCACCTCTGAAA  
 Consenso gacaagggattggtggaaaaattgacagcgtatgccatgactattccattgtcaggcaacaggttcaaaaaaagtggaagaaaaagtgcaaaagcagactaaagcctttatcctgcacctctgaaaa

911 920 930 940 950 960 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040  
 ECHA  
 F TAATTGATGTGGTAAGACTGGAAATGAGCAGGGAGTGTGCCGGTATCTCTGTGATCTCA-GAAATTTGGAGAG--CTTGTAAATGACC-AAAGAAAT-CAAGGGCTTG-ATGGGACTCT--ACCAT  
 R TAATTGATGTGGTAAGACTGGAAATGAGCAGGGAGTGTGCCGGTATCTCTGTGATCTCA-GAAATTTGGAGAG--CTTGTAAATGACC-AAAGAAAT-CAAGGGCTTG-ATGGGACTCT--ACCAT  
 TCCGGAATTA--GACCAAAAGGAGGATACCCGGTTTATTTCT-TGAAATTTCAAGAAATTTGGAGAGGCTTGTAAATGACC-AAAGAAAT-CAAGGGCTTGATGGGAAATTTAACCAT  
 Consenso taattgatgtggtaagactggaattgagcaggagatgccggttatctctgtgattctca-gaaatttggagag,.cttgtaatgacc,.aaagaaat,.caagggcttg,.atgggactct,.accat

1041 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170  
 ECHA  
 F GGT-CAGGTCCTGTG--CAGAGAGAAATAATTTGGAGCTCCACAGAGGATGTTAAGCAT-CTGGCTATTCTTGGTGCAGGGCT-GATGGGAGC-AGGCATCGCCCAAG--TCTCCGTGGATAGGGGCT  
 R GGT-CAGGTCCTGTG--CAGAGAGAAATAATTTGGAGCTCCACAGAGGATGTTAAGCAT-CTGGCTATTCTTGGTGCAGGGCT-GATGGGAGC-AGGCATCGCCCAAG--TCTCCGTGGATAGGGGCT  
 GGTTCAGGTTCTTGGCCAGAGAAATAATTTGAGTCCACAGAGGATGTTAAGCATCTGCTATTCTTGGTGCAGGGCTGATGGGAGCAGGCATTCGCCAAGTTTCCGTGGATAGGGGCT  
 Consenso ggt,caggtcctgtg,.cagagagaaataatttggagctccacagagatgtttaagcat,ctggctattcttgggtgcagggct,gatgggagc,aggcatcgcccaag,.tctccgtggataggggct

1171 1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300  
 ECHA  
 F AARAGCTAATCTTAARAGATGCCACCCTCACTGCGCTAGACCGAGGACAGCAACAGTGTTCARAGGATTGAATGACAAAGTGAAAGAAAGCTCTAATCATCTT-GAAGGGATTCCATCTT-CAGCA  
 R AARAGCTAATCTTAARAGATGCCACCCTCACTGCGCTAGACCGAGGACAGCAACAGTGTTCARAGGATTGAATGACAAAGTGAAAGAAAGCTCTAATCATCTT-GAAGGGATTCCATCTT-CAGCA  
 AARAGCTTTACTTAARAGATGCCACCCTCACTGCGCTAGACCGAGGACAGCAACAGTGTTCARAGGATTGAATGACAAAGTGAAAGAAAGCTCTAATCATCTT-GAAGGGATTCCATCTT-CAGCA  
 Consenso AARAGCTaTACTTAARAGATGCCACCCTCACTGCGCTAGACCGAGGACAGCAACAGTGTTCARAGGATTGAATGACAAAGTGAAAGAAAGCTCTAATCATCTT,GAAAGGGATTCCATCTT,CAGCA



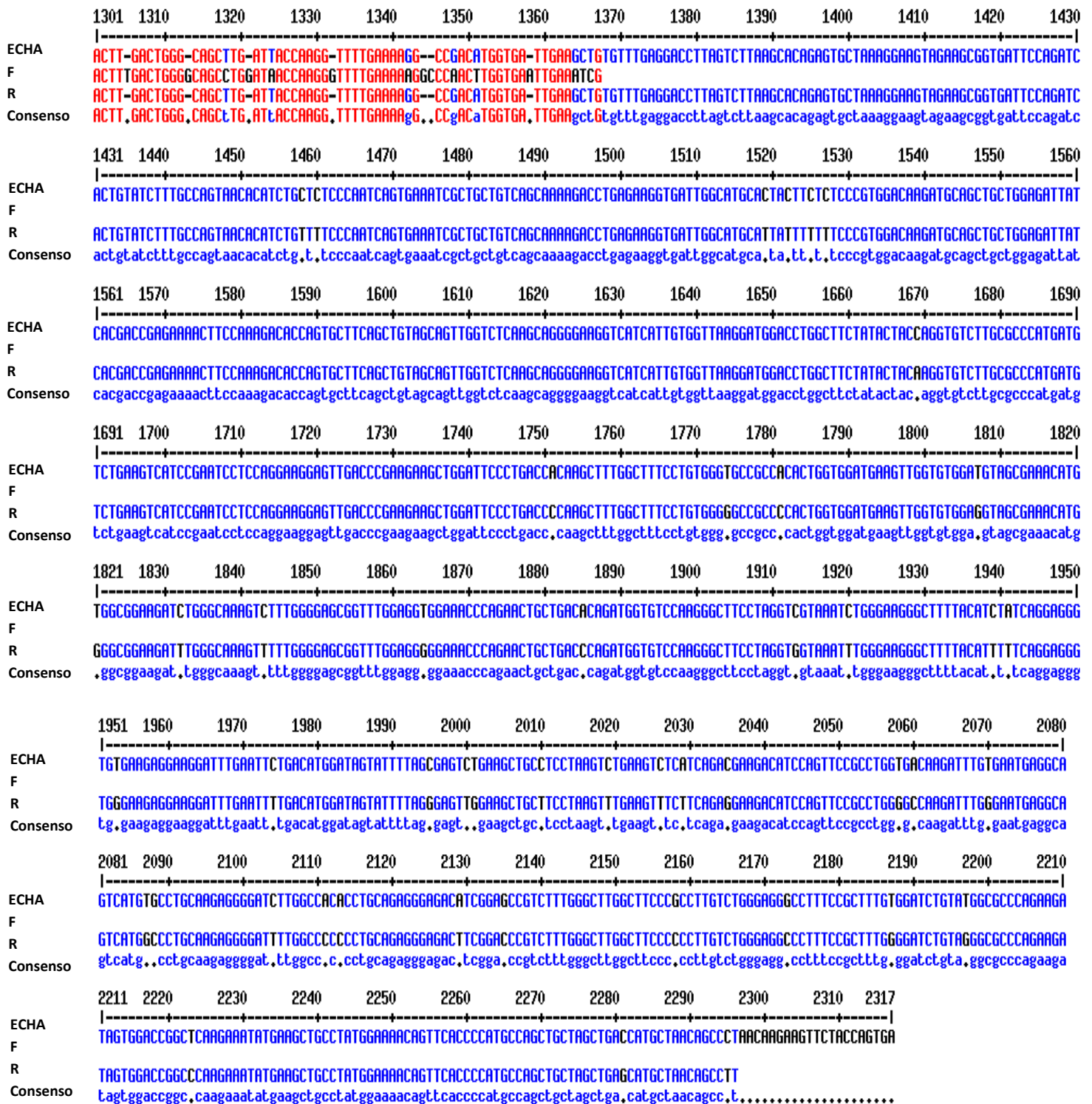


Figura 4.11. Alineamiento de la secuencia de ECHA clonada en pMyr con la secuencia consenso de ECHA.

ECHA: secuencia consenso de gen de ECHA extraída de Uniprot (P40939).  
 F: producto secuenciación utilizando cebador directo específico de ECHA.  
 R: producto secuenciación utilizando cebador reverso específico de ECHA.

### 4.3. Resultados del ensayo de Doble Híbrido

#### Ensayo de ausencia de reversión de sensibilidad a la temperatura

Previamente a realizar el ensayo de doble híbrido se verificó la ausencia de reversión de sensibilidad a la temperatura de la cepa *S. cerevisiae* cdc25H o presencia de contaminación. Esto se realizó tanto para el stock de levadura conservado a -80°C como para el cultivo utilizado en la preparación de las células competentes. Para ellos se sembró dicha cepa en medio YPAD a 37°C, no observándose crecimiento al cabo de 6 días de incubación. Este control es importante, ya que el sistema de doble híbrido sugiere que si crecen más de 30 colonias en este control no es posible tomar en cuenta los resultados de las co-transformaciones de los ensayos de doble híbrido, ya que implicaría un alto grado de reversión de sensibilidad a la temperatura o la presencia de una contaminación. Por el contrario esta cepa creció sin problema a 25°C, mostrando colonias típicas de levadura, de color blanco y olor característico.

#### Cálculo de eficiencia de co-transformación

Se determinó la eficiencia de la co-transformación de la cepa de levadura transformada con los plásmidos pSos y pMyr y cultivada en el medio selectivo SD/glucosa (-UL) a 25°C. Este medio permite solo el crecimiento de las levaduras que han incorporado ambos plásmidos, ya que aquellas colonias que porten el plásmido pSos serán capaces de crecer en medio carente de leucina y aquellas que posean el plásmido pMyr serán capaces de crecer en medio carente de uracilo (tal como indica los marcadores de selección de cada uno de estos plásmidos descritos en la metodología). Al sembrar 10 µl de la mezcla de transformación se obtuvieron 2 ufc, y al sembrar 100 µl se obtuvieron 23 ufc en medio SD/glucosa (-UL) a 25°C, no observándose crecimiento a 37°C (control de reversión de sensibilidad a la temperatura). Se utilizó el valor de 23 ufc para el cálculo de la eficiencia de transformación utilizando la siguiente ecuación:

$$\frac{n^{\circ} \text{ ufc} \times V_{\text{total de suspensión}}}{V_{\text{plaqueado}} \times \mu\text{g ADN usado}} = \text{ufc}/\mu\text{g de ADN}$$

En este ensayo el volumen total de suspensión fue de 660 µl y la cantidad de ADN de 0.3 µg. Con dichos valores, la eficiencia de la transformación fue de  $0.51 \times 10^3$  ufc/µg,

encontrándose dentro del límite inferior del rango sugerido por el kit comercial de doble híbrido utilizado ( $0.5 \times 10^3$  -  $10 \times 10^4$  ufc/ $\mu$ g de ADN).

### Ensayo doble híbrido

El ensayo de doble híbrido, incluye un primera etapa en la que se verifica si existe co-transformación con cada uno de los pares de plásmidos utilizados, sembrando las mismas en placas de SD/Glucosa (-UL) e incubándolas a 25°C. En nuestro caso, en todas las co-transformaciones realizadas se obtuvieron transformantes, indicando el éxito de la transformación con cada par de plásmidos utilizados.

La siguiente etapa implicó evaluar la interacción del doble híbrido. Una vez transformadas se seleccionaron tres colonias de cada una de las transformaciones y se realizó una suspensión de células con cada una de ellas, la cual se sembró en duplicado (en forma de spot) en placas de SD/Glucosa (-UL) y SD/Galactosa (-UL), incubándolas a 25 °C y 37°C durante un máximo de diez días. El resultado esperado y obtenido en cada una de estas co-transformaciones del ensayo de doble híbrido (incluyendo los controles positivos, negativos y el ensayo de interés) se muestra en la tabla 5. Los mismos representan el resultado de un único ensayo obtenido a los siete días de incubación, ya que luego de este tiempo comienzan a observarse reversiones de la sensibilidad a la temperatura en el medio SD/Glucosa (-UL).

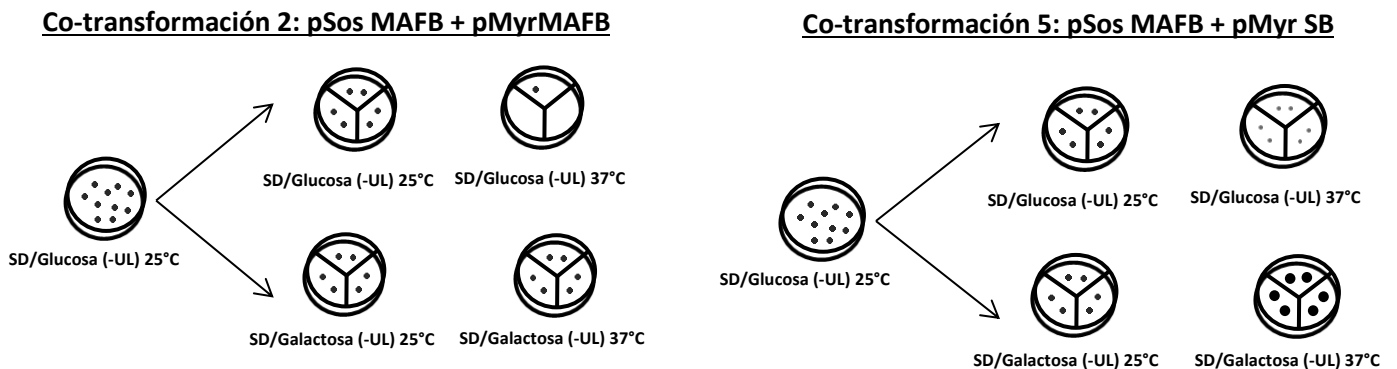
Tabla 5

Co-transformación			Resultados esperados				Resultados obtenidos			
			SD/Glucosa (-UL)		SD/Galactosa (-UL)		SD/Glucosa (-UL)		SD/Galactosa (-UL)	
			25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C
2	Control positivo	pSosMAFB + pMyrMAFB	+	-	+	+	+	-	+	+
3	Control negativo	pSosMAFB + pMyr Lamin C	+	-	+	-	+	-	+	-
4	Control negativo	pSos Col I + pMyrMAFB	+	-	+	-	Control eliminado por error experimental			
5	Control positivo	pSosMAFB + pMyr SB	+	-	+	+	+	-	+	+
6	Control negativo	pSos PtpA + pMyr Lamin C	+	-	+	-	+	-	+	+
7	Control positivo	pSos PtpA + pMyr SB	+	-	+	+	+	-	+	+
8	PtpAD126A-ECHA	pSos PtpA + pMyr ECHA	+	-	+	+	+	-	+	+

Como podemos observar en dicha tabla, de manera general se obtuvo el resultado esperado para los controles positivos y el de interacción entre la PtpA y la ECHA. Sin embargo uno de los controles negativos no dio como esperado. A continuación se detallan los resultados de cada una de las co-transformaciones descritas en la tabla con el objetivo de dejar documentado lo observado y que sirva como base para las próximas réplicas de dicho ensayo.

### Resultado de los controles positivos.

Los controles positivos se realizaron co-transformando plásmidos tales que sus productos de expresión proteica interaccionen entre sí pudiendo rescatar la vía de crecimiento a 37°C de la levadura *S. cerevisiae* cdc25H (activación vía RAS). Para ello se realizaron dos co-transformaciones. En la primera se co-transformó las células cdc25H competentes con pSosMAFB y pMyrMAFB (co-transformación 2) y en la segunda con los plásmidos pSosMAFB y pMyrSB (co-transformación 5). El siguiente esquema resume el resultado observado.



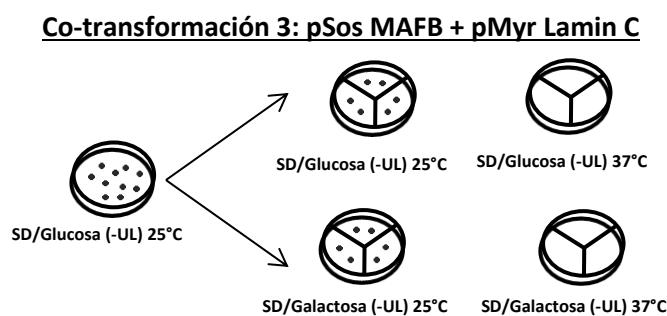
Podemos observar que en la co-trasformación 2 presenta crecimiento en medio SD/Galactosa (-UL) a 37°C de los tres duplicados coincidiendo con lo esperado. Sin embargo uno de los spot duplicados proveniente de una de las colonias seleccionadas creció en medio SD/Glucosa (-UL) a 37°C, posiblemente por aparición de mutantes de reversión. Para la transformación 5 fue difícil asegurar la ausencia total de crecimiento en las placas de SD/Glucosa (-UL) a 37°C, sin embargo este crecimiento fue notoriamente menor que el observado en el medio SD/Galactosa (-UL) a 37°C, por lo cual consideramos el resultado como el esperado, aunque nuevas réplicas deberán ser realizadas para confirmar este

resultado promisorio. Cabe destacar que las colonias observadas en el medio SD/Glucosa (-UL) incubadas a 37°C presentaron un fenotipo diferente al observado en medio SD/Galactosa (-UL).

En resumen, podemos considerar que el resultado con los controles positivos de manera general fue el esperado lo que confirma el correcto funcionamiento del ensayo del doble híbrido, ya que en ambas co-transformaciones se activó la vía Ras por medio de la interacción de las proteínas MAFB en el caso de la co-transformación 2 y por la interacción de la proteína hSos con SB en el caso de la co-transformación 5. Este último control también nos asegura la correcta localización de hSos en el citosol de la levadura.

### Resultado de los controles negativos:

Los controles negativos se realizaron co-transformando plásmidos tales que sus productos proteicos no interaccionen entre sí impidiendo el rescate la vía RAS de crecimiento a 37°C de la levadura *S. cerevisiae* cdc25H. Para ello se realizaron dos co-transformaciones. En la primera se co-transformó las células cdc25H competentes con pSosMAFB y pMyr LaminC (co-transformación 3) y en la segunda con los plásmidos pSos Col I y pMyrMAFB (co-transformación 4). Se descartó uno de ellos por error experimental quedando como válida solo la transformación 3 para evaluar como control negativo. El siguiente esquema resume el resultado observado.

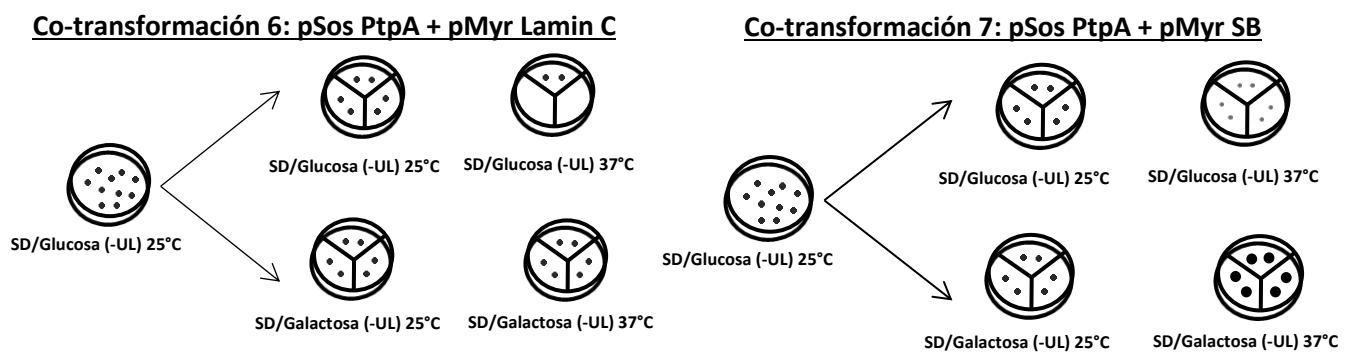


Podemos observar que en la co-trasformación 3 no presenta crecimiento en ninguno de los dos medios (SD/Glucosa (-UL) y SD/Galactosa (-UL)) incubados a 37°C, coincidiendo con los resultados esperados. No se observó crecimiento por lo que no hubo activación de la vía Ras

ya que las proteínas MAFB y Lamin C no interaccionan por lo tanto la proteína hSos no llega a la membrana para poder activar a Ras y por lo tanto la vía de crecimiento a 37°C.

### Resultado de los controles con pSos-PtpA D126A y pMyr SB o pMyr LaminC

Estas co-transformaciones se realizaron con el fin de evaluar la correcta localización citosólica de hSos-PtpA D126A y asegurarnos que PtpA D126A no esté interaccionando inespecíficamente con otra proteína (Lamin C en nuestro caso). Para ello se realizaron dos co-transformaciones. En la primera se co-transformó las células cdc25H competentes con pSos-PtpA y pMyr Lamin C (co-transformación 6) y en la segunda con los plásmidos pSos-PtpA y pMyrSB (co-transformación 7), siendo el resultado esperado el de un control negativo y positivo, respectivamente. El siguiente esquema resume el resultado observado.



Podemos observar en el esquema que en la co-transformación 6 presenta crecimiento en medio SD/Galactosa (-UL) a 37°C para las tres colonias evaluadas, lo cual no es lo esperado. Por otro lado, ambos spots provenientes de una de las colonias seleccionadas crecieron en medio SD/Glucosa (-UL) a 37°C, posiblemente por aparición de mutantes de reversión ya que presentaron un fenotipo diferente al observado en medio SD/Galactosa (-UL).

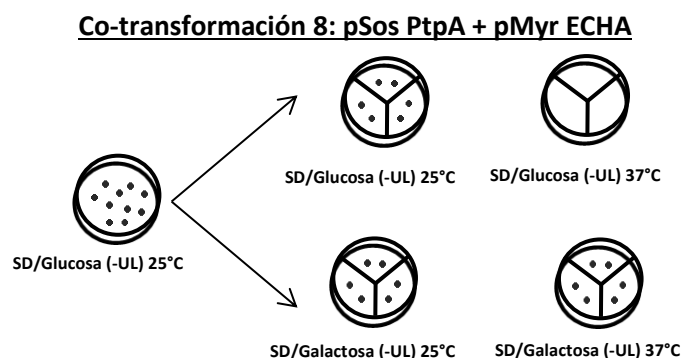
Al observarse crecimiento a 37°C en el medio SD/Galactosa se concluye hay activación de la vía Ras, lo que sugiere que la PtpA está interaccionando de forma inespecífica con la señal de mirisitlación o con la lamin C. Si bien dicho control debe ser repetido, podemos igualmente sugerir una posible interpretación del mismo. Para ello debemos tener en cuenta el hecho que las fosfatasa son proteínas que actúan sobre múltiples sustratos. Por lo tanto, no podemos descartar que la fosfatasa en tirosina PtpA D126A haya

interaccionado con la LaminC humana (aa 67-230), la cual ha sido reportada en sitio Phosphosite [41] como fosforilada en tirosina (Y81, Y211). Por otro lado podríamos realizar una co-transformación con la pSos-PtpA-D126A y pMyr, con el objetivo de analizar si la fosfatasa está interaccionando de manera inespecífica con la señal de miristilación. Si este resultado se confirma, esto indicaría que la PtpA D126A no es una buena proteína para utilizar como carnada en el doble híbrido y por lo tanto este método no es adecuado para el estudio de la interacción específica de esta fosfatasa con sus posibles sustratos.

Para la co-transformación 7 fue difícil asegurar la ausencia total de crecimiento en las placas de SD/Glucosa (-UL) a 37°C, sin embargo este crecimiento fue notoriamente menor que el observado en el medio SD/Galactosa (-UL) a 37°C. Este resultado es similar al observado para el control positivo realizado en la co-transformación 5. Al igual que pasó para los controles positivos las colonias observadas en el medio SD/Glucosa (-UL) incubadas a 37°C presentaron un fenotipo diferente al observado en medio SD/Galactosa (-UL). En este primer análisis, consideramos que esta notoria diferencia de crecimiento podría corresponder con el resultado esperado, confirmando la correcta localización en el citosol de la levadura de la proteína de fusión hSos-PtpA. Sin embargo nuevas réplicas deberán ser realizadas para confirmar este resultado promisorio.

### Resultado del ensayo de doble híbrido con pSos PtpA D126A y pMyr ECHA

En este ensayo se evaluó la existencia o no de interacción entre las proteínas en estudio, es decir entre la PtpA D126A y su posible sustrato ECHA. En caso de que interaccionen entre sí la vía de crecimiento a 37°C de la levadura *S. cerevisiae* cdc25H se va a activar (activación vía RAS) permitiendo el crecimiento a esta temperatura. Para ello se co-transformaron las células de *S. cerevisiae* cdc25H competentes con pSos-PtpA y pMyr ECHA (co-transformación 8). El siguiente esquema resume el resultado observado.



Podemos observar que la co-transformación 8 presenta crecimiento en medio SD/Galactosa (-UL) a 37°C en las tres colonias evaluadas, no observándose crecimiento en medio SD/Glucosa (-UL) a 37°C, coincidiendo con lo esperado.

En resumen, si bien los resultados sugieren que la ECHA interacciona en un contexto celular con la PtpA D126A, es necesario repetir el ensayo de doble híbrido en su totalidad para poder corroborarlo. Sobre todo es necesario verificar el resultado no esperado obtenido en el control negativo de la co-transformación 6, el cual evalúa en cierta forma la posibilidad que la PtpA interaccione de manera inespecífica con otras proteínas. A la hora de repetir el ensayo es fundamental agregar como control negativo la co-transformación con los plásmidos pSos-PtpA-D126A y pMyr tal como ya lo hemos sugerimos anteriormente. Otro de los controles negativos, que he visto en un trabajo donde se utilizó el mismo método de doble híbrido [55], es la co-transformación con el plásmido pSos y pMyr-presa (en nuestro caso ECHA) para confirmar la ausencia de interacción entre la hSos y la ECHA. A su vez, en dicho trabajo, hacen el ensayo en su totalidad, intercambiando los roles de las proteínas de interés como carnada o presa, es decir, realizan dos ensayos de doble híbrido donde si en el primer ensayo una de las proteínas cumple rol de carnada en el otro cumple el rol de presa y viceversa para la otra proteína.

## **5. Conclusiones y Perspectivas**

La proteína PtpA, es un componente clave en la biología de *Mtb*, tal como lo han demostrado los estudios con cepas mutantes en esta fosfatasa y su rol en diversos procesos celulares [20, 28, 30, 31, 56]. Por lo tanto, la validación de la interacción con sus posibles sustratos es de gran importancia para avanzar en la determinación de cuáles de estos son relevantes a nivel fisiológico, profundizando en la comprensión de la relación bacteria-hospedero. Para ello era necesario contar con una estrategia que nos permitiera evaluar la interacción en un contexto celular entre la PtpA de *Mtb* y los candidatos a sustrato identificados por nuestro grupo [31]. En el marco de la tesis se logró poner en marcha el sistema de doble híbrido en el laboratorio, utilizando diferentes plásmidos control y con éste avanzamos en el estudio de la interacción entre la PtpA D126A (carnada en el sistema doble híbrido) y uno de los sustratos seleccionados, la proteína eucariota ECHA (presa en el



sistema doble híbrido). Esto implicó insertar ambos genes en los plásmidos del sistema de doble híbrido mediante herramientas de biología molecular, objetivo que fue alcanzado y será continuado para los otros tres candidatos a sustrato. En este trabajo se logró clonar el gen de la PtpA D126A en el plásmido pSos y confirmamos su secuencia, comparándola con la secuencia disponible en la base de datos de Tuberculist [54]. El gen de la ECHA se clonó en el pMyr, obteniéndose la secuencia de esta proteína humana, la cual corresponde a la isoforma 1 anotada en Uniprot (P40939-1). Contar con dicha secuencia clonada en un plásmido, facilitará el sub-clonado para su futura expresión recombinante, por ejemplo por RF-cloning y expresión en sistemas bacterianos o eucariotas [57, 58, 59]. Por otro lado se logró la obtención de productos de amplificación de los otros tres candidatos a sustratos de PtpA a partir de ADNc obtenido, cuyas secuencias deben ser aún confirmadas.

Con respecto al ensayo de doble híbrido, podemos decir que se logró hacer funcionar el mismo en nuestro laboratorio, logrando en un primer ensayo, obtener de manera general el resultado esperado para los controles del ensayo, excepto para el control negativo correspondiente a la co-transformación 6, tal como se describió y discutió en los resultados. Cuando utilizamos dicho sistema para evaluar si existe interacción en un contexto celular entre la PtpA-D126A y la ECHA humana, el resultado fue promisorio. Sin embargo, debemos ser críticos ya que hasta ahora sólo hemos realizado un único ensayo completo, por lo cual las conclusiones aún son preliminares. Es necesario aumentar las réplicas de dicho experimento y adquirir experiencia en lectura de los resultados obtenidos en dicho ensayo, lo cual no fue fácil en este trabajo. Recientemente una estudiante de nuestro grupo, Natalia Faguaga se encuentra realizando réplicas de estos ensayos que buscan confirmar los resultados preliminares obtenidos.

No se descarta evaluar otra estrategia de doble híbrido para la validación de los candidatos a sustrato identificados por nuestro grupo y la fosfatasa PtpA de *Mtb*. Un posible método podría ser la técnica de doble híbrido en células de mamífero (mammalian two hybrid) el cual se recomienda para el estudio de la interacción entre proteínas que presentan modificaciones post traduccionales como la fosforilación [60]. Este método podría servir de alternativa en el caso que el sistema evaluado en esta tesis, en las réplicas siguientes no se comporte como esperado, en lo que respecta a sus controles. Por otro lado, falta, verificar si las proteínas realmente se están expresando en las células eucariotas, independientemente

del sistema de doble híbrido que utilizemos. Una alternativa para demostrarlo, que además contribuiría a evidenciar la interacción, sería inmunopurificar la ECHA (mediante un anticuerpo disponible en el laboratorio) y analizar (por espectrometría de masa) si copurifica junto a la PtpA.

Finalmente, es importante lograr comprender cuál es el efecto de la interacción de PtpA con los candidatos a sustrato en estudio durante la infección del macrófago. Vale la pena recordar, que tres de las cuatro proteínas candidato a sustrato de PtpA identificadas son proteínas cuya localización final es la mitocondria y se encuentran vinculadas al metabolismo energético [31]. Además existen evidencias recientes que en macrófagos infectados con una cepa virulenta de *Mtb* (y no con una cepa avirulenta) estas tres proteínas dejan de ser detectadas en la mitocondria [42]. La proteína ECHA, la cual es modelo de estudio en este trabajo, presenta numerosos residuos de tirosina, algunos de ellos ya reportados como fosforilados en el sitio Phosphosite [49], pero se desconoce el rol de dicha fosforilación. Nuestra hipótesis es que PtpA pueda ser el factor bacteriano que una vez introducido en el citosol del macrófago, desfosforile la proteína eucariota ECHA alterando así su tránsito a la mitocondria y/o afectando su actividad. Nuestro grupo ha logrado modelar la estructura de la ECHA humana (no resuelta aún) y evaluar la exposición de las diferentes tirosinas, realizando ensayos *in silico* de acoplamiento molecular con la PtpA. Contamos ya con tirosinas candidatas a ser mutadas una vez que se obtenga producir la ECHA de manera recombinantes. Además, podríamos repetir el ensayo de doble híbrido con mutantes de la ECHA, para evaluar si eliminamos la interacción o no con la PtpA.

Avanzar en el conocimiento de cuáles son las vías de señalización moduladas por PtpA e identificar los residuos o características estructurales que definan la interacción/especificidad por sus sustratos podrá contribuir a futuro con un diseño racional de nuevos y potenciales inhibidores de este tipo de enzimas, que puedan afectar la división y persistencia de *Mtb* dentro de los macrófagos. Cabe destacar que diseñar inhibidores contra la PtpA, la cual actúa dentro del citosol del macrófago, tiene la ventaja que no es necesario sortear los mecanismos de resistencia a las drogas de *Mtb*: la escasa permeabilidad de la pared celular a las drogas y la actividad de bombas que evitan la acumulación de droga dentro de la bacteria [61]. Por otro lado, en la Sección de Bioquímica

y Biología Molecular dónde se desarrolló el presente trabajo, existe un interés metodológico en la estrategia de doble híbrido ya que es importante contar con diferentes metodologías que permitan evaluar la interacción en un contexto celular de diferentes proteínas de estudio. En especial, para nuestro grupo, será fundamental para continuar el estudio de potenciales interactores de fosfatasa de otros microorganismos patógenos que el grupo estudia, como *Listeria monocytogenes* y el virus ORF.

## 6. Bibliografía

1. Fanlo, P., & Tiberio, G. (2007). Tuberculosis extrapulmonar. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 30, 143-162.
2. OMS | Tuberculosis. (s. f.). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>
3. Hett, E. C., and Rubin, E. J. (2008) Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective, *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* 72, 126-156
4. Kieser, K. J., and Rubin, E. J. (2014). How sisters grow apart: mycobacterial growth and division, *Nat Rev Microbiol* 12, 550-562
5. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. (s. f.). Fichas de agentes biológicos.
6. Russell, D. G. (2001). Mycobacterium tuberculosis: here today, and here tomorrow. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(8), 569-586. <http://doi.org/10.1038/35085034>
7. Reporte Tuberculosis 2015 Organización Mundial de la Salud 9789241565059\_eng.pdf. (s. f.). [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf?ua=1)
8. Koul, A., Arnoult, E., Lounis, N., Guillemont, J., & Andries, K. (2011). The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature*, 469(7331), 483-490. <http://doi.org/10.1038/nature09657>
9. Dr. Mercedes Weissenbacher, Dr. Roberto Salvatella, & Dr., M. H. (s. f.). Sindicato Médico del Uruguay. <http://www.smu.org.uy/publicaciones/rmu/1998v1/h-weiss.htm>
10. Thaiss, C. A., & Kaufmann, S. H. E. (2010). Toward novel vaccines against tuberculosis: current hopes and obstacles. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 83(4), 209-215
11. Niedergang, F., and Chavrier, P. (2004) Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagos(R)ome, *Current opinion in cell biology* 16, 422-428
12. Ahmad, S. (2010). Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection. *Clinical and Developmental Immunology*, 2011. <http://downloads.hindawi.com/journals/cdi/2011/814943.pdf>

13. Cooper, A. M. (2009). Cell mediated immune responses in Tuberculosis. *Annual review of immunology*, 27, 393-422. <http://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132703>
14. Russell, D. G. (2007). Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nature Reviews. Microbiology*, 5(1), 39-47. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1538>
15. Chao, J., Wong, D., Zheng, X., Poirier, V., Bach, H., Hmama, Z., & Av-Gay, Y. (2010). Protein kinase and phosphatase signaling in Mycobacterium tuberculosis physiology and pathogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804(3), 620-627. <http://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.09.008>
16. Dye, C. (2006). Global epidemiology of tuberculosis. *TheLancet*, 367(9514), 938-940.
17. Rosqvist, R., Bölin, I., & Wolf-Watz, H. (1988). Inhibition of phagocytosis in Yersinia pseudotuberculosis: a virulence plasmid-encoded ability involving the Yop2b protein. *Infection and Immunity*, 56(8), 2139-2143.
18. Bliska, J. B., & Black, D. S. (1995). Inhibition of the Fc receptor-mediated oxidative burst in macrophages by the Yersinia pseudotuberculosis tyrosine phosphatase. *Infection and Immunity*, 63(2), 681-685.
19. Black, D. S., Marie-Cardine, A., Schraven, B., & Bliska, J. B. (2000). The Yersinia tyrosine phosphatase YopH targets a novel adhesion-regulated signalling complex in macrophages. *Cellular Microbiology*, 2(5), 401-414. <http://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2000.00061.x>
20. Bach, H., Papavinasasundaram, K. G., Wong, D., Hmama, Z., & Av-Gay, Y. (2008). Mycobacterium tuberculosis Virulence Is Mediated by PtpA Dephosphorylation of Human Vacuolar Protein Sorting 33B. *Cell Host & Microbe*, 3(5), 316-322. <http://doi.org/10.1016/j.chom.2008.03.008>
21. Chauhan, P., Reddy, P. V., Singh, R., Jaisinghani, N., Gandotra, S., & Tyagi, A. K. (2013). Secretory Phosphatases Deficient Mutant of Mycobacterium tuberculosis Imparts Protection at the Primary Site of Infection in Guinea Pigs. *PLOS ONE*, 8(10), e77930. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0077930>
22. Singh, R., Rao, V., Shakila, H., Gupta, R., Khera, A., Dhar, N., Tyagi, A. K. (2003). Disruption of mptpB impairs the ability of Mycobacterium tuberculosis to survive in guinea pigs. *Molecular Microbiology*, 50(3), 751-762. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03712.x>
23. Beresford, N. J., Mulhearn, D., Szczepankiewicz, B., Liu, G., Johnson, M. E., Fordham-Skelton, A., Taberner, L. (2009). Inhibition of MptpB phosphatase from Mycobacterium tuberculosis impairs mycobacterial survival in macrophages. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 63(5), 928-936.

24. Mascarello, A., Chiaradia, L. D., Vernal, J., Villarino, A., Guido, R. V. C., Perizzolo, P., Nunes, R. J. (2010). Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* tyrosine phosphatase PtpA by synthetic chalcones: Kinetics, molecular modeling, toxicity and effect on growth. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(11), 3783-3789. <http://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.04.051>.
25. Sun, H., & Tonks, N. K. (1994). The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, 19(11), 480-485. [http://doi.org/10.1016/0968-0004\(94\)90134-1](http://doi.org/10.1016/0968-0004(94)90134-1)
26. Madhurantakam C, Rajakumara E, Mazumdar PA, Saha B, Mitra D, Wiker HG, Sankaranarayanan R, Das AK. (2005). Crystal structure of low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis* at 1.9-Å resolution. *J Bacteriol.* 2005 Mar;187(6):2175-81
27. Madhurantakam, C., Chavali, V. R. M., & Das, A. K. (2008). Analyzing the catalytic mechanism of MPtpA: A low molecular weight protein tyrosine phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis* through site-directed mutagenesis. *PROT Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 71(2), 706-714.
28. Wong, D., Bach, H., Sun, J., Hmama, Z., & Av-Gay, Y. (2011). *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H<sup>+</sup>-ATPase to inhibit phagosome acidification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(48), 19371–19376.
29. Poirier, V., Bach, H. & Av-Gay, Y., 2014. *Mycobacterium tuberculosis* Promotes Anti-apoptotic Activity of the Macrophage by PtpA Protein-dependent Dephosphorylation of Host GSK3 $\alpha$ . *Journal of Biological Chemistry*, 289(42), pp.29376–29385.
30. Wang, J. et al., 2015. *Mycobacterium tuberculosis* suppresses innate immunity by coopting the host ubiquitin system. *Nature immunology*, 16(3), pp.237–45.
31. Margenat, M., Labandera, A.-M., Gil, M., Carrion, F., Purificação, M., Razzera, G., ... Villarino, A. (2015). New potential eukaryotic substrates of the mycobacterial protein tyrosine phosphatase PtpA: hints of a bacterial modulation of macrophage bioenergetics state. *Scientific Reports*, 5, 8819. <http://doi.org/10.1038/srep08819>.
32. Flint, A. J., Tiganis, T., Barford, D., & Tonks, N. K. (1997). Development of «substrate-trapping» mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(5), 1680-1685.
33. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

34. Tommasini, R., Endrenyi, L., Taylor, P. A., Mahuran, D. J., & Lowden, J. A. (1985). A statistical comparison of parameter estimation for the Michaelis–Menten kinetics of human placental hexosaminidase. *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *63*(3), 225-230. <http://doi.org/10.1139/o85-032>
35. Eaton, S., Bursby, T., Middleton, B., Pourfarzam, M., Mills, K., Johnson, A. W., & Bartlecc, K. (2000). The mitochondrial trifunctional protein: centre of a  $\beta$ -oxidation metabolon? *Biochemical Society Transactions*, *28*(2), 177-182. <http://doi.org/10.1042/bst0280177>
36. Beke-Somfai, T., Lincoln, P., & Nordén, B. (2013). Rate of hydrolysis in ATP synthase is fine-tuned by  $\alpha$ -subunit motif controlling active site conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(6), 2117-2122. <http://doi.org/10.1073/pnas.1214741110>
37. Jonckheere, A. I., Smeitink, J. A. M., & Rodenburg, R. J. T. (2011). Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *35*(2), 211-225. <http://doi.org/10.1007/s10545-011-9382-9>
38. Bouillaud, F., & Blachier, F. (2010). Mitochondria and Sulfide: A Very Old Story of Poisoning, Feeding, and Signaling? *Antioxidants & Redox Signaling*, *15*(2), 379-391. <http://doi.org/10.1089/ars.2010.3678>
39. Lagoutte, E., Mimoun, S., Andriamihaja, M., Chaumontet, C., Blachier, F., & Bouillaud, F. (2010). Oxidation of hydrogen sulfide remains a priority in mammalian cells and causes reverse electron transfer in colonocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1797*(8), 1500-1511. <http://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.04.004>
40. Evans, P. R., Farrants, G. W., Hudson, P. J., & Britton, H. G. (1981). Phosphofructokinase: Structure and Control [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *293*(1063), 53-62. <http://doi.org/10.1098/rstb.1981.0059>
41. PhosphoSitePlus: a resource for protein phosphorylation and other post-translational modifications. (s. f.). <http://www.phosphosite.org/homeAction.action>
42. Jamwal, S., Midha, M. K., Verma, H. N., Basu, A., Rao, K. V. S., & Manivel, V. (2013). Characterizing virulence-specific perturbations in the mitochondrial function of macrophages infected with mycobacterium tuberculosis. *Scientific Reports*, *3*, 1328. <http://doi.org/10.1038/srep01328>
43. Suter, B., Auerbach, D., & Stagljar, I. (2006). Yeast-based functional genomics and proteomics technologies: the first 15 years and beyond. *Biotechniques*, *40*(5), 625.

44. Meng, J.-J., Rojas, M., Bacon, W., Stickney, J., & Ip, W. (2005). Methods to Study Protein-Protein Interactions. En K. Turksen (Ed.), *Epidermal Cells* (pp. 341-357). Humana Press. Recuperado a partir de <http://dx.doi.org/10.1385/1-59259-830-7%3A341>
45. Crieckinge, W. V., & Beyaert, R. (1999). Yeast two-hybrid: State of the art. *Biological Procedures Online*, 2(1), 1-38. <http://doi.org/10.1251/bpo16>
46. Bergman, L. (2001). Growth and Maintenance of Yeast. En P. MacDonald (Ed.), *Two-Hybrid Systems* (pp. 9-14). Humana Press. <http://dx.doi.org/10.1385/1-59259-210-4%3A009>
47. Mandel, M., & Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of molecular biology*, 53(1), 159-62.
48. Oligoanalyser: <https://www.idtdna.com/calc/analyser>
49. Primer3plus: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>
50. NEB cutter V0.2: <http://www.neb.com/tools/index.aspx?reg=nebcutter>
51. Miniprep Maniatis Molecular Cloning: <http://www.molecularcloning.com/>
52. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, and Kumar S (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725-2729.
53. Segovia, D. (2014) Clonado y evaluación de la funcionalidad de mutante sinónimo de Tp53 humano en *Saccharomyces cerevisiae*. Tesina de Grado, Facultad de ciencias, Udelar.
54. <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>
55. Heinrich, J. N., Kwak, S. P., Howland, D. S., Chen, J., Sturner, S., Sullivan, K., Lipinski, K., Cheng, K., She, Y., Lo, F., Ghavami, A. (2006) Disruption of ShcA signaling halts cell proliferation characterization of ShcC residues that influence signaling pathways using yeast. *Cellular Signalling* 18 (2006) 795 – 806
56. Cowley, S. C., Babakaiff, R. & Av-Gay, (2002). Expression and localization of the *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase PtpA. *Res Microbiol.* 153, 233–41(2002).
57. Fusinita van den Ent. RF cloning: A restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. Volume 67, Issue 1, 30 April 2006, Pages 67–74
58. Cereghino, J. L., Cregg, J. M. (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x> 45-66 First published online: 1 January 2000

- 60.** Lee, J. W., Lee SK. Mammalian Two-Hybrid Assay for Detecting Protein–Protein Interactions In Vivo. *Methods in Molecular Biology*, vol. 261: Protein–Protein Interactions: Methods and Protocols .Edited by: H. Fu © Humana Press Inc., Totowa, NJ
- 61.** Wong, D., Chao, JD., Av-Gay (2013). Mycobacterium tuberculosis-secreted phosphatases: from pathogenesis to targets for TB drug development. *Trends in microbiology*, 2013 - Elsevier