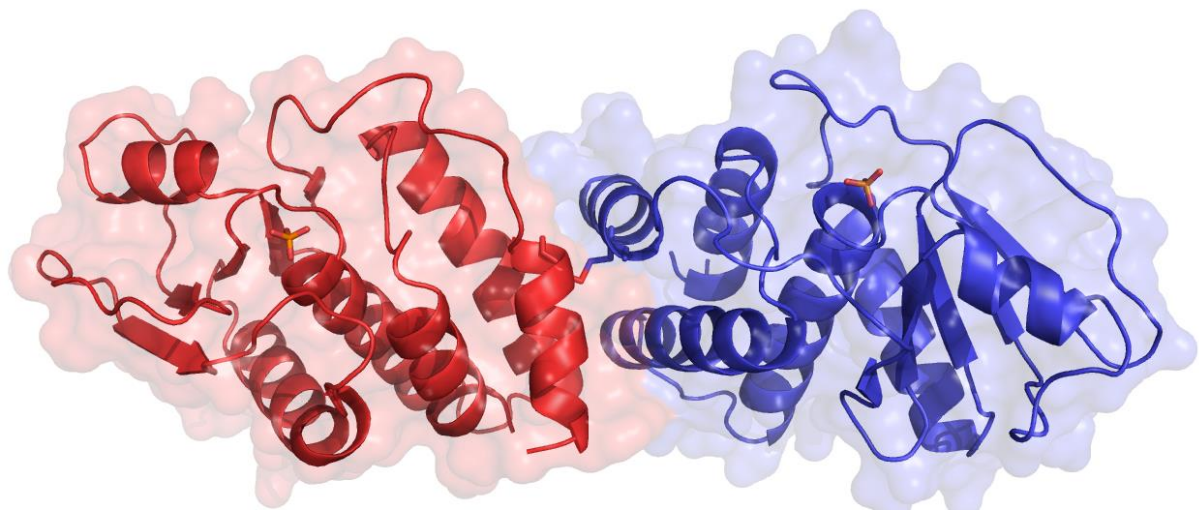


PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS

TESIS DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Caracterización estructural y funcional de la única fosfatasa del virus *Orf*



Lic. Danilo Segovia

Orientadores: Dra. Andrea Villarino, Dra. Mabel Berois
Sección Bioquímica y Biología Molecular – Sección Virología
Facultad de Ciencias, UdelaR

Tribunal:
Dra. Ana Denicola
Dr. Alejandro Buschiazzo
Dra. Pilar Moreno

Junio 2016

AGRADECIMIENTOS

A las Dras. Andrea Villarino y Mabel Berois, por aceptarme como estudiante de maestría y compartir conmigo toda su experiencia tanto en el laboratorio como en el camino de la ciencia.

A la Dra. Gwenaëlle André-LeRoux, por su gran contribución a este trabajo, y por recibirme en París para introducirme al mundo "*in silico*".

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

A la Dra. Mónica Marín, por todo lo aprendido desde mi ingreso a la Sección Bioquímica de la Facultad de Ciencias.

A los Profs. Marc Blondel y Cécile Voisset, y la MSc. María José Lista, por recibirme y enseñarme mucho durante mis dos meses en Brest.

A la Comisión Sectorial de Investigación Científica, PEDECIBA y a ECOS-Sud, por el apoyo económico otorgado.

A mis compañeros de la Sección Bioquímica, especialmente a los del laboratorio 305 y a los del laboratorio 314 por compartir conmigo momentos de gran alegría y entusiasmo.

RESUMEN

La fosforilación en tirosina es una de las modificaciones post traduccionales más utilizadas en las vías de transducción de señales de organismos multicelulares. Esta juega un rol central en la regulación de procesos bioquímicos fundamentales para la coordinación y comunicación celular. Este tipo de señalización involucra a tres componentes principales: las quinasas en tirosina (PTKs), que son las proteínas que catalizan la adición de un grupo fosfato desde el ATP al grupo hidroxilo del aminoácido tirosina; los dominios responsables de reconocer y unir fosfotirosina (SH2, PTB); y las fosfatasas en tirosina (PTPs), enzimas que catalizan la remoción del grupo fosfato.

La familia de las PTPs puede clasificarse en varios grupos, según sus características estructurales y funcionales. Las fosfatasas de doble especificidad (DUSPs) conforman un grupo que inicialmente incluía a PTPs que actúan tanto sobre sustratos fosforilados en tirosina como sobre aquellos fosforilados en serina/treonina, pero en la actualidad también incluye a enzimas que desfosforilan fosfolípidos, ARNm y glicanos.

Varios patógenos intracelulares han evolucionado para codificar fosfatasas en tirosina, a fin de potenciar su capacidad para infectar y persistir en sus hospederos. De hecho, la primera DUSP reportada en la literatura es la codificada por el virus Vaccinia. Este trabajo se centra en el estudio de la PTP del virus Orf (OVH1). Este virus es la especie tipo del género Parapoxvirus de la familia *Poxviridae* y es el agente causante del ectima contagioso, una enfermedad zoonótica que afecta a ovinos, caprinos y a humanos en contacto con animales infectados. Diversos estudios han demostrado que la evasión de la respuesta inmune mediante diferentes estrategias es una característica general de los Poxvirus. En ese sentido, se ha demostrado que tanto la infección de células HeLa con el virus Orf, así como la expresión transitoria del gen de la fosfatasa disminuye el estado fosforilado de la proteína STAT1, un factor clave en las vías de señalización que activan la respuesta antiviral por parte de la célula.

En esta tesis se realizó la primera caracterización estructural y funcional de la fosfatasa OVH1, obteniéndose la estructura tridimensional de esta proteína. El análisis del estado de oligomerización reveló que OVH1 es un dímero, y la estructura cristalográfica sugirió que este podría estar estabilizado de forma covalente por un puente disulfuro, el cual no sería esencial para la dimerización. El análisis de la actividad *in vitro* mostró que OVH1 es una fosfatasa de doble especificidad que también presenta actividad frente a moléculas de fosfatidil inositol fosfato. Estos resultados sugieren la posibilidad de un nuevo rol de esta enzima en el ciclo replicativo del virus. Finalmente, se inició la adaptación de una cepa del virus Orf a la replicación en cultivo celular, la cual podrá ser útil como modelo de infección viral en futuros estudios proteómicos y de validación funcional de esta proteína.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

2. AGRADECIMIENTOS

3. RESUMEN

4. ÍNDICE DE CONTENIDOS

6. INTRODUCCIÓN

6. El virus Orf y su fosfatasa en tirosina

8. Biología del virus Orf y el ectima contagioso

9. El virus Orf y sus mecanismos de evasión de la respuesta inmune

11. La vía JAK/STAT y la fosfatasa en tirosina OVH1

12. Señalización celular mediada por fosforilación en tirosina

13. Fosforilación en tirosina

14. Estructura y función de fosfatasa en tirosina

16. Fosfatasa de doble especificidad

17. Estructura de las fosfatasa de Poxvirus

18. Antecedentes del grupo de investigación

20. Objetivos generales

20. Objetivos específicos

21. MATERIALES Y MÉTODOS

21. Materiales

21. Plásmidos

23. Células

23. Métodos asociados a la caracterización funcional y estructural de OVH1

23. Amplificación por PCR

24. Electroforesis de ADN y purificación de fragmentos de interés

24. Expansión y cuantificación de plásmidos de interés

24. Digestión con enzimas de restricción

25. Ligación de fragmentos de ADN con extremos cohesivos

25. Generación de mutantes de interés

27. Secuenciación de ADN y análisis de secuencias

27. Optimización de la expresión de proteínas

27. Expresión y purificación de OVH1

29. Cuantificación de proteínas

29. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

30. Determinación del coeficiente de sedimentación para la evaluación del estado de oligomerización de OVH1

31. Determinación de la actividad fosfatasa y de los parámetros cinéticos de OVH1

31. Análisis de la especificidad de sustrato

32. Análisis del estado de oxidación de cisteínas

33. Análisis por espectrometría de masas

- 33. Ensayos de cristalización y colección de datos de difracción
- 34. Determinación de la estructura y refinamiento
- 36. Ensayos de acoplamiento molecular *in silico* (*docking*)
- 37. **Métodos asociados a la adaptación a la replicación en cultivo celular del virus Orf**
- 37. Descongelamiento y congelamiento de líneas celulares de mamífero
- 37. Mantenimiento y pasaje de líneas celulares de mamífero
- 38. Conteo de células
- 38. Adaptación del virus Orf al crecimiento en cultivo celular
- 39. Extracción de ADN de cultivos celular y amplificación por PCR del gen B2L
- 41. **RESULTADOS**
- 41. **Análisis de la estructura primaria de OVH1**
- 41. El análisis de la estructura primaria de OVH1 revela características propias del género Parapoxvirus
- 43. **Producción recombinante de OVH1, análisis del estado de oligomerización y de la actividad fosfatasa**
- 44. Clonado de OVH1 y generación de mutantes
- 45. OVH1 salvaje y sus mutantes puntuales se expresan en forma soluble, mientras que los mutantes de delección generan agregados solubles e insolubles
- 47. OVH1 salvaje y sus mutantes puntuales fueron expresados y purificados con alto rendimiento
- 47. OVH1 salvaje y sus mutantes puntuales son dímeros en solución
- 49. Evaluación de la presencia de un puente disulfuro intermolecular en el dímero de OVH1
- 51. OVH1 presenta actividad fosfatasa con el sustrato artificial pNPP
- 52. **Obtención y análisis de la estructura cristalográfica de OVH1**
- 52. Cristalización y difracción de rayos X
- 52. Resolución y análisis de la estructura de OVH1-C112S
- 59. **Análisis de la especificidad de sustrato de OVH1**
- 59. OVH1 es una fosfatasa de especificidad dual capaz de desfosforilar *in vitro* moléculas de fosfatidil inositol fosfato
- 62. **Hacia la adaptación del virus Orf a la replicación en cultivo celular**
- 65. **DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS**
- 65. OVH1-C112S es un dímero estabilizado en forma covalente que presenta un plegamiento característico de fosfatasas de doble especificidad
- 69. La capacidad de OVH1 de desfosforilar fosfoinositoles podría tener un rol fisiológico
- 71. Perspectivas de la adaptación a la replicación en cultivo celular del virus Orf
- 72. **CONCLUSIONES**
- 73. **REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**
- 78. **ANEXO A: COMPLEMENTO DE MATERIALES**
- 80. **ANEXO B: COMPLEMENTO DE MÉTODOS**
- 82. **ANEXO C: COMPLEMENTO DE RESULTADOS**
- 88. **ANEXO D: ABREVIACIONES UTILIZADAS**

INTRODUCCIÓN

1. EL VIRUS ORF Y SU FOSFATASA EN TIROSINA

El virus Orf es un virus perteneciente al género Parapoxvirus de la familia *Poxviridae*. Los Poxvirus son patógenos intracelulares ampliamente distribuidos, que infectan a un extenso rango de animales y que han sido responsables de la muerte masiva de sus hospederos, como fue el caso de la epidemia en humanos causada por el virus de la viruela. Estos virus se caracterizan por presentar un genoma de ADN doble hebra lineal, de unos 130 a 365 kpb, y por replicarse exclusivamente en el citoplasma de las células que infectan. La familia *Poxviridae* agrupa por lo menos a 69 especies, que se dividen en dos subfamilias. La subfamilia *Chordopoxvirinae* incluye a 10 géneros que infectan vertebrados, mientras que en la subfamilia *Entomopoxvirinae* se clasifica a los 3 géneros que infectan insectos (1).

Dentro de los Chordopoxvirus encontramos a los géneros Avipoxvirus, Molluscipoxvirus, Parapoxvirus, Orthopoxvirus, Yatapoxvirus, Leporipoxvirus, Capripoxvirus, Cervidopoxvirus, Suipoxvirus, Crocodylipoxvirus y otros virus como Yoka poxvirus que aún no tienen género asignado (ICTV) (1). Todos ellos comparten características morfológicas, como su forma de “ladrillo” y su gran tamaño. Casi la mitad de estos géneros contienen especies capaces de infectar a humanos, algunas de forma exclusiva, como el virus de la viruela y el virus Molluscum contagiosum, y otros de forma zoonótica. Las consecuencias de la infección con los distintos tipos de Poxvirus pueden variar desde una enfermedad severa con alta mortalidad, a infecciones benignas que se resuelven en poco tiempo (2).

El genoma de los Poxvirus comprende a cientos de marcos abiertos de lectura e incluye secuencias de repetidos invertidos en tándem terminales, que forman horquillas cerradas covalentemente. Por lo menos 90 genes son específicamente conservados y son requeridos para el proceso de replicación y morfogénesis, mientras que el resto son más divergentes y proporcionan características únicas de rango de hospedero y patogénesis (3).

En cuanto al ciclo replicativo (Figura 1), este ha sido estudiado en el virus Vaccinia (perteneciente al género Orthopoxvirus), y se piensa que el mecanismo general se encuentra conservado en los diferentes géneros. Existen dos tipos diferentes de viriones, el Virión Maduro Intracelular (IMV) y el Virión Envuelto Extracelular (EEV), ambos capaces de iniciar un ciclo infeccioso. Estos dos tipos de partícula viral difieren en ciertas glicoproteínas de superficie y en el número de membranas que las envuelven, y se cree que ingresan a la célula mediante mecanismos diferentes. Hasta el momento, varias proteínas del virión han sido identificadas como indispensables para la unión a la superficie celular, mientras que los determinantes celulares de la unión serían glucoaminoglicanos (GAGs) y otros componentes de la matriz extracelular.

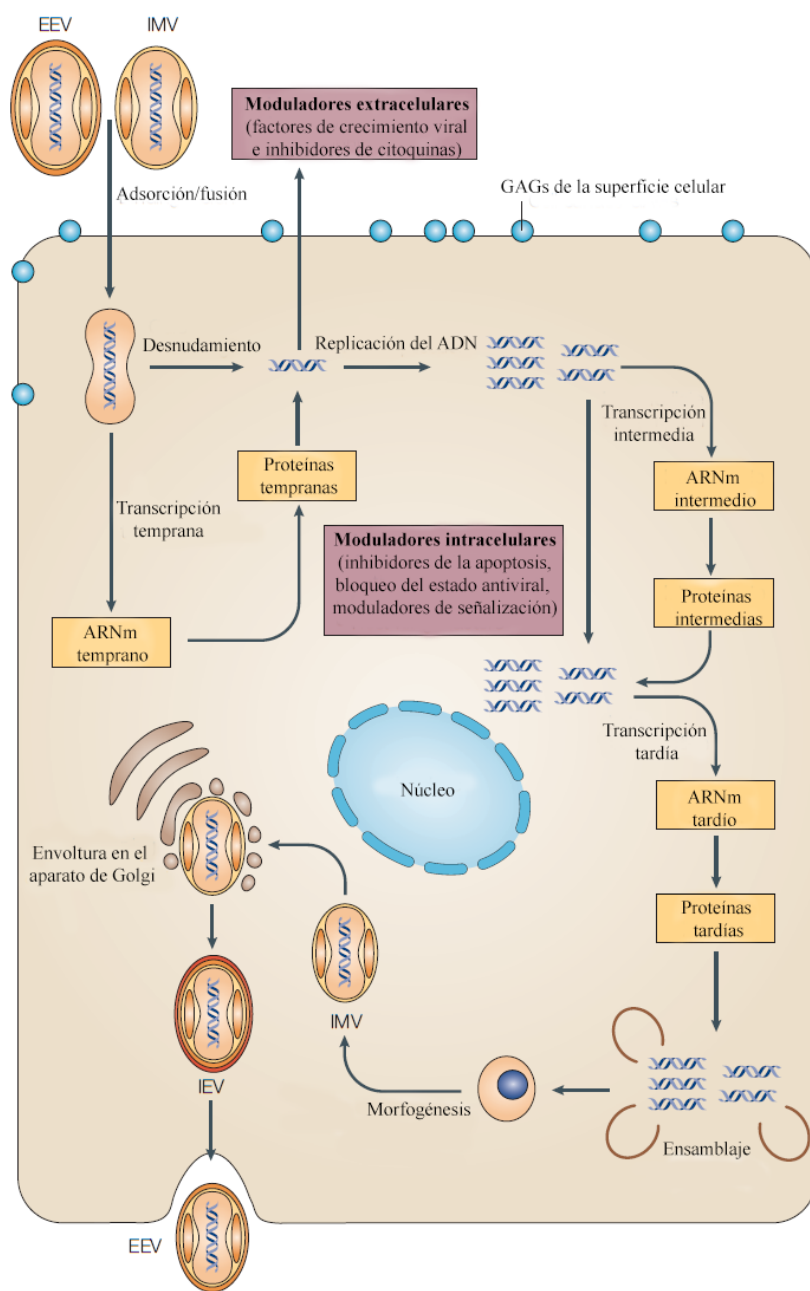


Figura 1. Esquema del ciclo replicativo de los Poxvirus

Los Poxvirus se replican en el citoplasma de las células infectadas. Tanto las partículas EEV como las IMV son capaces de iniciar la infección. La unión del virión con la membrana celular es mediada por proteínas del virión y por GAGs de la superficie celular. En el ciclo viral completo se observan tres rondas de transcripción y síntesis de proteínas (temprana, intermedia y tardía), seguidas por la morfogénesis y el ensamblado de nuevas partículas. En el aparato de Golgi, los IMVs adquieren envolturas lipídicas, transformándose en IEVs. Luego de la fusión con la membrana plasmática, las IEVs liberadas pasan a llamarse EEVs. Los Poxvirus expresan una serie de moduladores intra y extracelulares que facilitan la realización del ciclo en forma exitosa. (Adaptado de MacFadden, 2005) (2).

Luego de la adsorción, ocurre el evento de fusión entre la membrana de la célula hospedera y la membrana externa del virión. Una vez que el *core* viral es liberado en el citoplasma, la ARN polimerasa viral junto con factores de transcripción virales (que conforman el “transcriptosoma viral”) comienzan la primera cascada de transcripción de genes tempranos. Seguidamente, el desnudamiento libera al ADN genómico, el cual puede funcionar como molde para la replicación de ADN en el citoplasma celular, y para las próximas rondas de transcripción, que utilizan factores de transcripción tanto virales como celulares. El proceso de morfogénesis y ensamblaje de las nuevas partículas virales comienza con la acumulación de los productos de genes virales tardíos, formándose entonces los IMVs. Estas migran hacia el aparato de Golgi, donde adquieren una envoltura derivada de este organelo, para formar Viriones Intracelulares Envueltos (IEVs). Los IEVs pierden una de sus membranas al fusionarse con la membrana

plasmática celular para formar Viriones Envueltos Asociados a Células (CEVs), los que son propulsados hacia células vecinas o liberados directamente como partículas EEV libres. Se piensa que las formas CEV y EEV son particularmente importantes para la transmisión rápida de célula a célula *in vivo*, mientras que las IMV probablemente contribuyen a la dispersión del virus solo después de la muerte celular y la ruptura de la membrana de la célula hospedera. Además de los factores de transcripción virales ya mencionados, los Poxvirus expresan un conjunto de proteínas moduladoras que modifican tanto el ambiente intracelular como el extracelular, afectando la respuesta antiviral del hospedero y vías importantes como la apoptosis, la inducción del estado antiviral mediante interferón, entre otras (2).

a. Biología del virus Orf y el ectima contagioso

El virus Orf, virus prototipo del género Parapoxvirus, es el agente causante de ectima contagioso en ovinos, caprinos y humanos. El nombre "Orf" proviene de la palabra en inglés antiguo que significa "áspero", haciendo referencia al aspecto de las lesiones ocasionadas por el virus en los animales infectados (4).

Los viriones de este género presentan una estructura ovoide de unos 260 nm de largo y 160 nm de ancho. En imágenes de microscopía electrónica de transmisión el virus Orf puede aparecer de dos formas. En preparados donde la tinción penetra al virión, se observa una fina membrana que rodea al *core* viral amorfo, mientras que en muestras impermeables a la tinción se revela un arreglo regular de una estructura de tipo tubular, entrecruzada a lo largo de la partícula. Este patrón entrecruzado se debe a la superposición de imágenes de una estructura en forma de túbulo, que se enrolla alrededor de la partícula viral como un ovillo de lana (Figura 2). Al encontrarse únicamente en los Parapoxvirus, esta observación fue determinante en un primer momento para clasificarlos en un género propio dentro de la familia *Poxviridae* (5).

Pocos estudios se han realizado para caracterizar a las proteínas que forman parte de la partícula viral. Hasta 35 polipéptidos diferentes han podido ser separados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, algunos de los cuales han sido identificados utilizando anticuerpos generados contra las partículas virales enteras. Muchas de estas proteínas tienen homólogos en el virus Vaccinia, por lo que se sugiere que la estructura y morfogénesis de ambos virus podría ser similar (5).

El genoma del virus Orf tiene un tamaño de 138 kpb, un 64% de contenido G+C y codifica para 132 genes diferentes. En el genoma se puede distinguir una región central más conservada conteniendo muchos genes homólogos al virus Vaccinia, involucrados en procesos como la replicación y transcripción del ADN, así como genes codificantes para proteínas asociadas con la estructura del virión y su morfogénesis. En las regiones terminales del genoma aparecen genes que carecen de homología con otros Poxvirus, que se encuentran mayormente vinculados con la patogénesis y virulencia (6).

El ectima contagioso es una enfermedad muy común en países productores de ovinos y caprinos en todo el mundo, capaz de causar un impacto económico importante para productores que dependen de la crianza de estos animales (7). Se piensa que la amplia dispersión y mantención de esta enfermedad podría estar relacionada con la naturaleza resistente de los viriones frente

al ambiente, así como a su capacidad de causar infecciones reiteradas en los animales. En estos, la enfermedad se encuentra confinada a la mucosa oral y al tejido epitelial. El virus Orf infecta principalmente a animales pequeños, en el período que va desde el nacimiento hasta los 4 meses. Los adultos también son susceptibles a la infección, y los brotes pueden darse en cualquier época del año. La incidencia del virus puede alcanzar hasta al 90% de la población, pero la mortalidad es usualmente baja. En humanos, las infecciones se dan comúnmente en las manos de personas en estrecho contacto con animales infectados (5).

El ingreso del virus a sus hospederos usualmente ocurre a través de abrasiones o roturas en la piel, y la patología clínica observada en los sitios de infección consiste típicamente en la formación de pústulas y costras. Usualmente, la resolución de la infección en animales suele tomar de unas cuatro a seis semanas, existiendo escasos reportes de infecciones más largas. En ovejas y cabras infectadas, las lesiones a menudo ocurren en la cavidad bucal, afectando la habilidad de estos animales de alimentarse. En ocasiones, complicaciones más severas pueden ocurrir debido a infecciones secundarias de otros patógenos, como bacterias y hongos (5).



Figura 2. El virus Orf

En la imagen de la izquierda se muestra una microscopía electrónica de transmisión de partículas virales de Orf. Se destaca el patrón de “ovillo de lana”, característico de los Parapoxvirus.

A la derecha se observa una cabra infectada con el virus, presentado lesiones características en su cavidad bucal.

(Imágenes tomadas de Murphy, 1999) (4).

b. El virus Orf y sus mecanismos de evasión de la respuesta inmune

Los Poxvirus son patógenos que logran replicarse en células epiteliales evadiendo la respuesta inmune e inflamatoria de sus hospederos. Parte de esta adaptación ha involucrado la adquisición de genes moduladores de la respuesta inmune, que pueden no ser esenciales para la replicación en cultivo celular, pero que sí son muy importantes durante el proceso de infección en animales. En particular, la evasión de la respuesta inmune por parte del virus Orf juega un papel importante, lo que se evidencia en la habilidad de este virus de infectar repetidamente a animales sanos previamente expuestos al mismo. Sin embargo, la inmunidad del hospedero tiene cierto efecto, ya que durante las reinfecciones el tamaño de las lesiones, así como el tiempo de resolución de la enfermedad se ven disminuidos en comparación con la primera infección (8).

A continuación, se enumeran algunos de los genes vinculados a la virulencia que son característicos del virus Orf.

(i) Un gen ampliamente caracterizado es el de la IL-10 viral, que presenta un alto grado de identidad de secuencia con la IL-10 ovina en su región carboxilo terminal, y posiblemente sea derivada de alguna interleuquina del hospedero. Se piensa que la IL-10 del virus Orf tendría un

rol importante en la supresión de la inflamación y del desarrollo de la inmunidad innata y adaptativa (8).

(ii) El virus Orf codifica también para una proteína de unión a quimioquinas (CKBP), que se une con alta afinidad a tres clases diferentes de quimioquinas, y que ha sido recientemente caracterizada estructuralmente. Las CKBPs facilitan la replicación viral exitosa al reducir la activación de leucocitos y la quimiotaxis de monocitos, macrófagos, células dendríticas, células NK (del inglés "Natural Killer") y células T hacia el sitio de infección (9).

(iii) Otro gen presente en el genoma viral codifica para la proteína GIF, un inhibidor del factor de proliferación GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor) y de la IL-2. El GM-CSF es producido por varios tipos celulares, incluyendo células T. Su función es estimular la generación de neutrófilos, monocitos y eosinófilos, y el reclutamiento y activación de estos tipos celulares en los tejidos. Adicionalmente, este se encuentra involucrado en eventos tempranos de la respuesta inmune, regulando la diferenciación y la función de células dendríticas presentadoras de antígeno.

La IL-2 es una linfocina que estimula la activación de células T y células NK y la proliferación y activación de células B.

La habilidad de la proteína viral GIF de unir e inactivar múltiples citoquinas es una propiedad que representa una forma económica de controlar la inmunidad del hospedero. La proteína GIF del virus Orf se une con alta afinidad a la IL-2 ovina, pero no a su equivalente humano. Esto es señal del importante nivel de adaptación de este virus para la replicación en su hospedero ovino (10).

(iv) Otro gen importante durante la infección del virus Orf es el codificante para el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). Esta proteína sería responsable de la gran proliferación de células endoteliales y la dilatación de vasos sanguíneos e hinchazón dermal observado en las lesiones ocasionadas por este virus. El receptor celular para este factor de virulencia es principalmente el VEGFR-2 (11).

(v) El virus Orf logra contribuir a la inhibición de la apoptosis en las células que infecta mediante la proteína codificada por el marco de lectura ORFV125, la cual se ha mostrado logra bloquear la liberación de citocromo c de la mitocondria, inhibiendo la vía intrínseca de la apoptosis. Se ha visto que ORFV125 interactúa con varios iniciadores del tipo BH3-only (como Bim, Bik y Puma) previniendo que estos activen a las proteínas pro apoptóticas Bax y Bak (12).

(vi) Otra de las vías que se ve afectada por medio de factores virales durante la infección es la vía regulada por el factor nuclear κ B (NF- κ B). Esta vía se relaciona con la expresión de un amplio rango de genes celulares que son críticos para la respuesta antiviral temprana, y modulan la inmunidad innata, la inflamación y la apoptosis. Los genes virales que inhiben esta vía de señalización son el ORFV024, ORFV002 y ORFV121, y todos interfieren a nivel de la inhibición de la fosforilación y/o translocación nuclear del NF- κ B (13).

(vii) Finalmente, el virus Orf codifica para una fosfatasa en tirosina (que en este trabajo denominaremos OVH1), localizada en la región central conservada del genoma. Esta fosfatasa está presente en todos los miembros de la sub familia *Chordopoxvirinae*, y ha sido ampliamente caracterizada en el virus Vaccinia, y parcialmente caracterizada en el virus Orf. En el virus

Vaccinia, esta proteína se denomina VH1, y se ha mostrado que presenta un efecto inhibitorio en la vía JAK/STAT de respuesta al interferón γ . Se cuenta con estructuras tridimensionales de VH1, así como numerosas evidencias sobre su funcionalidad. (14-17). En el virus Orf se han realizado ensayos funcionales que sugieren que esta fosfatasa tendría un rol análogo al de la fosfatasa del virus Vaccinia en la inhibición de la vía JAK/STAT (18).

Los genes enumerados en esta sección representan solo una parte de las herramientas utilizadas por este virus y otros Poxvirus para la evasión de la respuesta inmune en el hospedero. El hecho de que estos virus se han adaptado a la replicación en la piel de sus hospederos, un ambiente preparado para la rápida respuesta frente a la invasión de patógenos, resalta la importancia de estas estrategias para lograr una replicación exitosa (13).

c. La vía JAK/STAT y la fosfatasa en tirosina OVH1

La vía de transducción de señales JAK/STAT transmite información recibida a partir de polipéptidos extracelulares que unen receptores transmembrana y resulta en la activación de la transcripción de genes nucleares. Esta vía se encuentra conservada en organismos eucariotas, desde mohos deslizantes hasta humanos (19). El mensajero extracelular es una citoquina o un factor de crecimiento, el cual es reconocido por un receptor de superficie celular específico. Esta unión resulta en la dimerización del receptor y la subsecuente activación de las quinasas en tirosina JAK, (Janus quinasas), las que se encuentran constitutivamente asociadas al receptor. Residuos de tirosina específicos del receptor son entonces fosforilados por las JAKs activadas y sirven como sitios de anclaje para las proteínas STAT (Transductores de Señales y Activadores de la Transcripción). Seguidamente, los STAT son fosforilados por las JAKs, y forman dímeros que subsecuentemente dejan el receptor para ser translocados al núcleo celular, donde activan la transcripción de genes. Esto lleva a una rápida reprogramación de la expresión de genes en la célula. Existen cuatro tipos diferentes de proteínas JAK y siete tipos de STATs, los cuales a su vez pueden formar homodímeros y heterodímeros, lo que permite a la célula responder en forma diferente a diversos estímulos. La vía JAK/STAT se encuentra finamente regulada a múltiples niveles. Algunos ejemplos son fosfatasas que remueven el fosfato de las proteínas STAT, proteínas SOCs (supresores de la señalización por citoquinas) que se unen a JAKs e inhiben su actividad, proteínas que median la degradación de JAKs por la vía de ubiquitinación y proteínas PIAS (Inhibidores de STATs) que actúan en el núcleo y median la inhibición de la activación de la transcripción por parte de STAT, entre otros (20). En la Figura 3 se muestra un esquema de la vía y algunos puntos de regulación.

La inducción de genes de respuesta mediada por IFN a través de la vía de señalización JAK/STAT es una respuesta innata crítica que permite al hospedero limitar o eliminar la expansión viral antes de que las respuestas adaptativas sean movilizadas. En ensayos de infección de células HeLa en cultivo celular con el virus Orf, se ha observado la inhibición de la expresión de genes de respuesta al interferón γ . Esta inhibición es independiente de la transcripción viral, es decir, sería causada por una proteína estructural del virión y es posible revertirla utilizando un inhibidor de fosfatasas en tirosina, el orto-vanadato de sodio. Esto último sugirió la participación de una fosfatasa viral en dicho proceso. Además, se observó una

correlación positiva entre la desfosforilación de la proteína STAT1 en la tirosina 701 y el aumento de la multiplicidad de infección con virus Orf. Debido a que el virus Orf codifica para una fosfatasa en tirosina (OVH1), los autores realizaron ensayos de transfección transitoria para estudiar el rol de la fosfatasa en el efecto descrito durante los ensayos de infección viral.

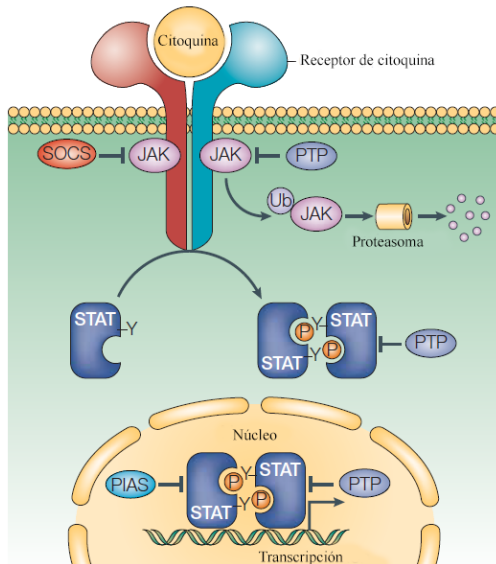


Figura 3. Vía JAK/STAT

En esta vía de transducción de señales, la unión de un ligando al receptor (por ejemplo, una citoquina), desencadena el reclutamiento de la proteína STAT al receptor, la cual es entonces fosforilada por la quinasa JAK. Una vez fosforilada, la proteína STAT forma un dímero que es capaz de translocarse al núcleo celular y activar la transcripción de genes.

Esta vía es regulada de forma negativa en todos los niveles, como se esquematiza en el diagrama.

(Adaptado de Shuai & Liu, 2003) (20).

En estos ensayos se confirmó la disminución en el estado de fosforilación de STAT1 en las células transfectadas con OVH1 (18). Si bien esto sugiere que STAT1 sea posiblemente sustrato de OVH1, experimentos adicionales con un mutante inactivo de la fosfatasa viral, así como ensayos *in vitro* de actividad e interacción con las proteínas purificadas son aún necesarios para confirmar dicha hipótesis.

La fosfatasa OVH1 presenta un 42% de identidad de secuencia con la fosfatasa VH1 del virus Vaccinia. VH1 fue la primera fosfatasa de especificidad dual (con actividad fosfatasa frente a sustratos de fosforilados en tirosina y en serina) descrita en la literatura (21). Desde su identificación, se ha demostrado que es un gen esencial para la replicación viral, así como para el bloqueo de la transducción de señales mediada por interferón γ , a través de la desfosforilación de STAT1 (17,22). Se ha reportado también que VH1 tiene sustratos virales, que son la proteína F18 de unión al ADN y las proteínas de membrana A14 y A17, relacionadas a la morfogénesis temprana de las IMV, lo que muestra su importancia para el ciclo infeccioso (23). Adicionalmente, se ha demostrado que esta fosfatasa forma parte del virión y se ha estimado por inmuno ensayos que cada partícula viral lleva unas 200 moléculas de VH1(16).

2. SEÑALIZACIÓN CELULAR MEDIADA POR FOSFORILACIÓN EN TIROSINA

La fosforilación es el tipo de modificación post traduccional más ampliamente estudiado, y se puede decir que se encuentra íntimamente involucrado con casi cualquier proceso celular. Esta consiste en la adición covalente de un grupo fosfato a la cadena lateral de un residuo de aminoácido. La fosforilación de proteínas se ha encontrado en diferentes tipos de aminoácidos. Esta puede estar presente formando un monoéster (como en la fosfoserina, fosfotreonina y

fosfotirosina), un amidato (fosfohistidina, fosfoarginina y fosfolisina), un acil-fosfato (fosfoaspartato) y un tiofosfato (fosfocisteína). En células eucariotas la fosforilación en serina, treonina y tirosina es reconocida ampliamente como modificación clave de diversas vías de transducción de señales (24). A nivel estructural, la fosforilación genera cambios en las interacciones entre el residuo fosforilado y los residuos cercanos, pudiendo crear sitios de anclaje para interacciones intra o inter proteína. A su vez, esta induce cambios conformacionales que pueden resultar en la modulación de la actividad. Estos cambios también pueden tener consecuencias a nivel de la estabilidad, la localización subcelular y el recambio de las proteínas blanco (25).

a. Fosforilación en tirosina

La señalización por fosforilación en tirosina es un sistema de transducción de señales que se cree surgió recientemente en la evolución, hace unos 600 millones de años, previo a la emergencia de los organismos multicelulares. Este se compone de tres módulos funcionales distintos: las quinasas en tirosina (PTKs), las fosfatasa en tirosina (PTPs) y los dominios de unión a fosfotirosina (SH2, PTB y otros). La combinación de estos módulos funcionales permite generar funciones de orden superior, y se piensa que el desarrollo de este nuevo sistema de comunicación fue clave para el salto evolutivo hacia la multicelularidad (26).

El primer módulo funcional de la señalización por fosforilación en tirosina es el de las quinasas. Estas son las proteínas encargadas de añadir los grupos fosfato a aminoácidos de tirosina y se pueden clasificar en dos clases: las del tipo receptor y las no receptoras. Las quinasas de tipo receptor suelen tener un dominio extracelular amino terminal de unión al ligando activador, un dominio transmembrana, y un dominio catalítico carboxilo terminal, citoplásmico. La unión del ligando desencadena la oligomerización y la subsecuente activación del dominio catalítico, resultando en la fosforilación en tirosina de proteínas citoplásmicas reclutadas, transduciendo señales extracelulares a través de la membrana plasmática. Las quinasas no receptoras, son proteínas solubles intracelulares, que en ocasiones pueden estar asociadas a membrana vía modificaciones post traduccionales, como la miristilación amino terminal. Las quinasas en tirosina no presentan una fuerte preferencia por la secuencia primaria que rodea a la tirosina blanco. Sin embargo, su especificidad parece estar dictada principalmente por interacciones en sitios secundarios entre la quinasa y el sustrato potencial, o por la localización subcelular compartida (27).

Un paso importante en el entendimiento del mecanismo por el cual las quinasas en tirosina inician la señalización intracelular fue el descubrimiento de que residuos de fosfotirosina son reconocidos por un dominio de unión a fosfotirosina, el dominio SH2. El reclutamiento de dominios SH2 a quinasas en tirosina autofosforiladas es esencial para la iniciación y la propagación de la señalización. Las proteínas con dominios SH2 pueden tener una variedad de funciones, incluyendo proteínas adaptadoras para reclutar otras proteínas señalizadoras, enzimas que actúan sobre moléculas en la membrana como fosfolipasas, E3 ubiquitina ligasas, factores de transcripción, entre otros. Otro tipo de dominio de unión a tirosina, el dominio PTB, también está involucrado en la señalización de las quinasas en tirosina (28).

Las fosfatasa en tirosina conforman el ultimo componente del sistema, y están encargadas de remover los grupos fosfato de los residuos de fosfotirosina. Al igual que las PTKs, estas carecen de una secuencia primaria altamente específica para la fosfotirosina blanco, si bien en algunos casos el dominio catalítico tiene un bolsillo para la unión a un residuo ácido secundario. La acción de las fosfatasa en tirosina también está limitada por interacciones secundarias con blancos potenciales y la localización subcelular. De manera análoga a lo que ocurre con las quinasas, también existen fosfatasa de tipo receptor, asociadas a la membrana celular, y fosfatasa no receptoras que actúan en el núcleo o en el citoplasma. En un primer momento se consideró a las PTPs como enzimas “house keeping” cuya única función sería la de volver al estado normal de la célula luego de la acción de las PTKs. Sin embargo, hoy en día se reconoce que ambos componentes tienen una importancia equivalente para la señalización celular. (27)

b. Estructura y función de fosfatasa en tirosina

Las fosfatasa en tirosina (PTPs) conforman una de las familias génicas más grandes en el genoma humano y se clasifican en cuatro subfamilias diferentes: las PTPs clásicas, las DUSPs (fosfatasa de doble especificidad, capaces de desfosforilar residuos de fosfotirosina y fosfoserina/treonina), las fosfatasa de bajo peso molecular y las fosfatasa Cdc25. Todas las PTPs catalizan la desfosforilación de fosfoaminoácidos, utilizando un intermediario covalente de fosfocisteína que facilita la hidrólisis del grupo fosfato. Es remarcable el hecho de que la secuencia característica del sitio activo, HCXXGXXR(S/T), represente al único motivo verdaderamente común a todos los miembros de las diferentes subfamilias de PTPs (Figura 4) (29).

En cuanto a la estructura de las PTPs clásicas, se ha observado que el dominio catalítico se expande por aproximadamente 280 residuos de aminoácido y contiene 10 motivos conservados. El motivo característico del sitio activo contiene a una cisteína y una arginina que son esenciales para la catálisis, y se encuentra en el denominado “bucle P”. Este, junto con dos motivos adicionales, el bucle WPD y el bucle Q, definen el *core* catalítico mínimo. El resto de los motivos presentan un rol principalmente de soporte estructural al dominio catalítico. En las PTPs clásicas, la cisteína catalítica se encuentra en la base de una pronunciada hendidura en la superficie de la proteína. Esto contribuye a la especificidad absoluta de las PTPs clásicas por residuos de fosfotirosina, ya que los residuos más pequeños de fosfoserina/treonina no llegan a alcanzar al residuo nucleofílico de cisteína en la base de la hendidura (30).

La catálisis en las PTPs ocurre mediante un mecanismo de dos pasos. En el primer paso, luego de la unión del sustrato, el fosfato sufre un ataque nucleofílico por el átomo de azufre de la cadena lateral del residuo de cisteína esencial. La unión al sustrato es acompañada por un gran cambio conformacional en el sitio activo en el cual el bucle WPD se cierra alrededor de la cadena lateral del residuo de fosfotirosina del sustrato. Este cambio posiciona al residuo invariante de Asp para funcionar como ácido general en el primer paso de la catálisis, y protonar el grupo tirosilo saliente del sustrato.

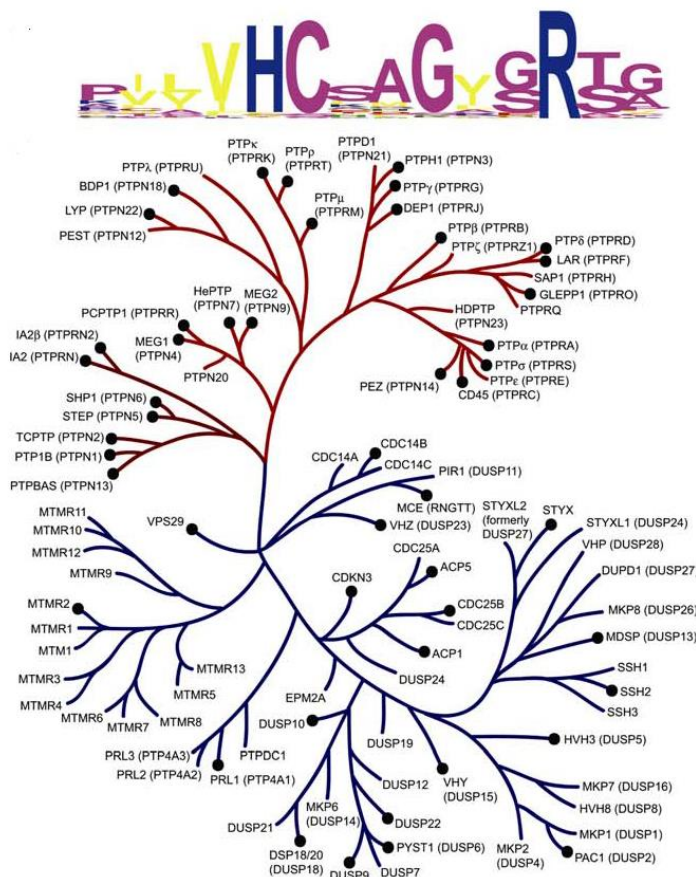


Figura 4. PTPs y DUSPs

En la parte superior de la figura se representa la conservación del motivo del sitio activo de las PTPs clásicas y las DUSPs, los miembros más numerosos de la familia de las PTPs.

El esquema de la parte inferior es un dendrograma construido a partir de la secuencia conservada del sitio activo de las PTPs clásicas y las DUSPs. La rama de color rojo agrupa a las PTPs clásicas, mientras que la de color azul a las DUSPs. (Adaptado de Almo *et al.*, 2007) (29).

El residuo arginina conservado en el motivo catalítico contribuye en la unión al sustrato y en la estabilización del intermediario formado. El segundo paso de la catálisis involucra la hidrólisis del intermediario cisteinil-fosfato. Esta es promovida por un residuo de glutamina del bucle Q, que coordina una molécula de agua, y el aspartato del bucle WPD. Este último funciona como base general, tomando un protón de la molécula de agua, la cual entonces ataca al intermediario cisteinil-fosfato, culminando en la liberación de la molécula de fosfato (30,31) (Figura 5).

Estas características generales del mecanismo catalítico son conservadas a través de la familia de las PTPs, si bien la arquitectura precisa del sitio activo puede ser diferente a fin de ajustarse a los requerimientos de cada enzima. En el caso de las fosfatasas de doble especificidad, la hendidura del sitio activo es mucho más superficial, esto permitiría que residuos de fosfoserina y fosfotreonina logren alcanzar a la cisteína catalítica. En la fosfatasa PTEN, la hendidura es aún más amplia, para acomodar el grupo de cabeza del fosfatidil inositol 3, 4, 5 trifosfato. En la Figura 6 se muestra un esquema en donde se evidencia la diferencia de profundidad en el sitio activo de las PTPs clásicas y las DUSPs. Ejemplos de otras variaciones son las presentes en la subfamilia de las Cdc25, donde la protonación del grupo tirosilo saliente en el primer paso de la catálisis no está mediada por un ácido general en la fosfatasa, sino por el grupo fosfato monoprotonado en el sustrato. Otro ejemplo son las miotubularinas (MTM), un tipo especial de fosfatasas de doble especificidad, especializado en la desfosforilación de fosfatidil inositol fosfato. En estas, tampoco se encuentra presente el residuo ácido en el bucle que corresponde

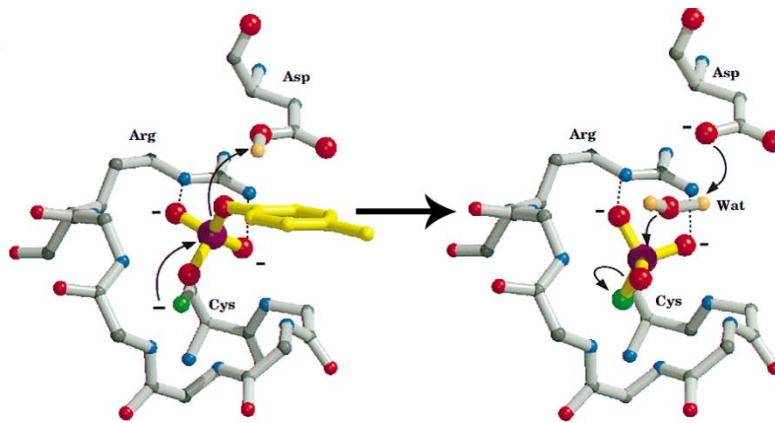


Figura 5. Mecanismo catalítico de las PTPs clásicas

Representación con bastones y esferas del sitio activo de las PTPs, donde la esfera verde representa al átomo de azufre de la Cys catalítica, las esferas azules representan a los nitrógenos de la Arg catalítica y las rojas a los de oxígenos del Asp catalítico. En este último la esfera amarilla representa el protón del Asp. En el primer paso, que se observa a la izquierda, la Cys catalítica realiza un ataque nucleofílico al fosfato del sustrato, y el Asp del bucle WPD promueve la escisión del grupo tirosilo al ceder un protón. El resultado es la formación de un intermediario cisteinil-fosfato.

Para la remoción del grupo fosfato del intermediario es necesaria una molécula de agua (Wat), la cual es coordinada por un residuo conservado de glutamina (que no se muestra en la imagen). El Asp catalítico actúa ahora como una base, tomando un protón de la molécula de agua, la cual promueve la escisión del grupo fosfato de la cisteína, regenerándose entonces la configuración inicial del sitio activo (Adaptado de Denu *et al.*, 1996) (31).

estructuralmente al bucle WPD en las PTPs clásicas y uno de los residuos de Asp conservados del motivo firma (VHCSDGWDRT) podría funcionar como ácido general en la catálisis (30).

c. Fosfatasas de doble especificidad

Poco después de la identificación de la fosfatasa VH1 del virus Vaccinia (la primera DUSP reportada), se descubrió en humanos la fosfatasa DUSP3 o VHR (por Vaccinia H1- Related). Esta proteína presenta una identidad de secuencia limitada con VH1, (solamente un 24.56 % y un 31.95% de similitud) y presenta también una especificidad dual, si bien en sus sustratos fisiológicos tiene una preferencia por residuos de fosfotirosina (32). En la actualidad, han sido identificadas más de 40 fosfatasas de doble especificidad que presentan cierto nivel de identidad de secuencia con VH1, y juegan un rol importante en muchos aspectos de la función celular, incluyendo la organización del citoesqueleto, el control del ciclo celular, la apoptosis y el metabolismo del ARN. Este grupo inicialmente incluía a PTPs que actúan sobre sustratos fosforilados tanto en tirosina como en serina/treonina, pero hoy en día también incluye a enzimas que desfosforilan fosfolípidos, ARNm y glicanos (33).

Entre las DUSPs se encuentran las fosfatasas que desfosforilan a las MAPK (Quinasas activadas por mitógeno), involucradas en la vía de respuesta celular frente a la estimulación con factores de crecimiento, ciertas hormonas y citoquinas. La fosfatasa VHR podría clasificarse dentro de este grupo, ya que desfosforila a tres tipos de MAPKs (ERK $\frac{1}{2}$, JNK y p38), si bien la relevancia fisiológica de estos sustratos aún se encuentra en discusión.

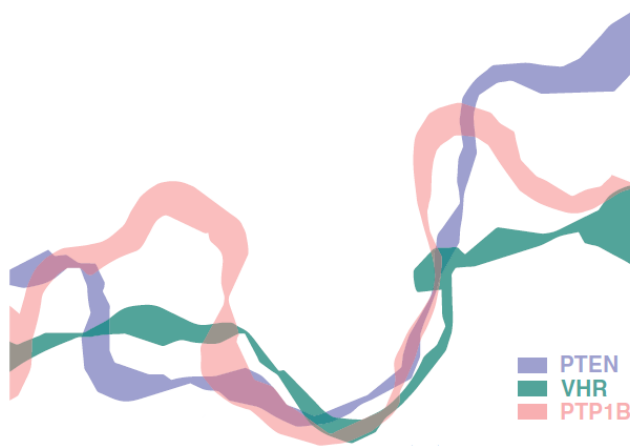


Figura 6. Esquema de la profundidad del sitio activo de las PTPs

En rosado se representa la profundidad del sitio activo de PTP1B, una PTP clásica, en verde la profundidad correspondiente al de VHR, una DUSP, y en violeta la de PTEN, una DUSP especializada en desfosforilar fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato. Las PTPs clásicas presentan una hendidura más profunda, que solo permite la desfosforilación de fosfotirosina. (Adaptado de Tonks, 2013) (30).

Adicionalmente, se ha encontrado que VHR también tiene como sustrato a la proteína STAT5, al factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y a la proteína ErbB2 (de su denominación en inglés: erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2) (34).

Otra clase de DUSPs son las fosfatasa del tipo "PTEN". El gen más conocido de esta familia es el de la fosfatasa PTEN (también conocido como MMAC1), el cual hoy en día es reconocido como un gen supresor de tumores. PTEN es una proteína de 403 aminoácidos que presenta un dominio amino terminal PTP, el cual forma una interface extensiva con un dominio denominado "C2", el cual ejerce la función de unión a fosfolípidos y facilitaría la localización de esta proteína en membranas. Adicionalmente, el dominio carboxilo terminal se caracteriza por presentar múltiples sitios de fosforilación y un motivo de unión a proteínas vinculadas a la regulación. La característica más sorprendente de PTEN es su especificidad de sustrato, ya que se ha demostrado su habilidad para desfosforilar al segundo mensajero lipídico fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato, específicamente en la posición 3' del anillo inositol (35).

d. Estructura de las fosfatasa de Poxvirus

En la actualidad, se cuenta con estructuras cristalográficas para dos fosfatasa de la familia *Poxviridae*, las cuales corresponden a las VH1 codificadas por los virus Vaccinia y Variola mayor (el virus causante de la viruela), ambos virus pertenecientes al género Orthopoxvirus.

La estructura de la VH1 de Variola fue resultado por la técnica de difracción anómala de múltiple longitud de onda (MAD) utilizando una proteína sustituida en selenometionina, a una resolución final de 1.8 Å. La fosfatasa cristalizó como un dímero por intercambio de dominios (*domain swapping*). El elemento intercambiado por ambos monómeros es la hélice amino terminal α_1 , la cual rota alrededor de un único enlace a fin de interactuar con la molécula de proteína vecina. Como se observa para otras estructuras con intercambio de dominios, las interacciones intermoleculares son en su mayoría de naturaleza hidrofóbica. En la posición intercambiada, la hélice amino terminal forma un haz de cuatro hélices α , junto con las tres hélices del extremo carboxilo terminal del otro monómero. La hélice α_1 se encuentra orientada en forma perpendicular a la hélice α_5 de su propia cadena, e interactúa con la hélice α_5 del otro monómero

(Figura 7). Las hélices $\alpha 1$ de cada monómero se encuentran orientadas hacia lados opuestos y forman un ángulo recto. Los autores discuten que esta hélice amino terminal podría adoptar una posición muy similar a la de su contraparte en la molécula vecina, en una conformación alternativa en la cual el mismo tipo de interacciones podría darse en forma intramolecular. El plegamiento general de esta fosfatasa es muy similar al de VHR y otras fosfatasas de doble especificidad, incluyendo al dominio PTP de PTEN (36).

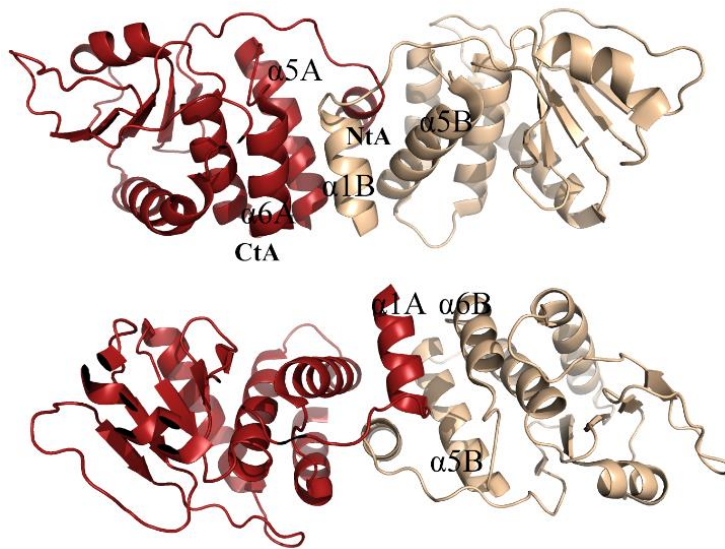


Figura 7. Estructura de la fosfatasa VH1 del virus Variola major

Se pueden observar dos representaciones de la estructura de la proteína VH1. Se destaca el intercambio de dominios, en el cual la hélice $\alpha 1$ de cada monómero es intercambiada por la del otro. En el intercambio, la hélice $\alpha 1$ de la cadena A interacciona con la hélice $\alpha 5$ de la cadena B, que se posiciona de forma paralela a esta. Las hélices $\alpha 1$ de cada cadena quedan perpendiculares entre sí. (Imágenes generadas en Pymol, a partir de la estructura 2P4D)

La estructura cristalográfica del mutante inactivo C110S de la fosfatasa VH1 del virus Vaccinia fue resuelta por reemplazamiento molecular utilizando la estructura de la fosfatasa de Variola (2P4D) como modelo de búsqueda, a una resolución de 1.32 Å. Un homodímero similar al observado para la fosfatasa de Variola puede generarse por simetría en la estructura, involucrando intercambio de dominios. El sitio activo aparece como una hendidura de 6 Å de profundidad, y contiene una molécula de fosfato mimetizando la posición del sustrato fosforilado. Además de la resolución de la estructura tridimensional, los autores lograron demostrar que la proteína VH1 del virus Vaccinia es un dímero estable en solución, y que la dimerización de la fosfatasa es importante para el reconocimiento del sustrato STAT1 fosforilado (14,15).

3. ANTECEDENTES DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

Desde hace ya varios años, nuestro grupo de trabajo ha ido adquiriendo experiencia en la caracterización genética de aislamientos de virus Orf realizados en Uruguay, que han mostrado considerable variación para algunos genes, como el gen VEGF y la proteína de envoltura B2L. El estudio de los mecanismos genéticos que proporcionan variación a este virus fue tema central de la tesis de la MSc. Natalia Olivero (37). En ese trabajo, también se propuso realizar aislamientos del virus en diferentes modelos, como huevos embrionados, líneas celulares de mamífero (MDBK, Vero) y cultivos primarios, a fin de comparar el comportamiento de las cepas estudiadas en estos sistemas. Diferentes cepas del virus fueron capaces de infectar huevos

embrionados, pero no se logró detectar la replicación del virus en las líneas celulares de mamífero mediante detección del ADN viral. En particular, el aislamiento en cultivo celular de Parapoxvirus ha mostrado ser dificultoso. Sin embargo, sí se ha mostrado la capacidad del virus de entrar en células Vero y activar la expresión de un gen reportero con un promotor específicamente activado por Poxvirus (37).

La posibilidad de contar con un modelo de replicación del virus en cultivo celular sería de alta relevancia para nuestro grupo de trabajo, ya que nos permitiría la realización de ensayos de infección, para estudiar el comportamiento de las células en respuesta a la combinación de factores presentes en el virus, como por ejemplo la fosfatasa en tirosina junto con el resto de proteínas virales. El modelo ideal para intentar adaptar cepas del virus al crecimiento en cultivo celular, sería una línea celular derivada de ovinos, ya que este virus se encuentra altamente adaptado a la replicación en este hospedero. Sin embargo, debido a que no contamos con líneas de origen ovino, se intentará en este trabajo continuar con los intentos de adaptación al crecimiento en cultivo celular en líneas MDBK, Vero y se incorporarán las células HeLa. Estas últimas han sido utilizadas en ensayos puntuales de infección, por lo que se sabe entonces que el virus es capaz de ingresar en ellas (18).

Además de continuar con líneas previamente abordadas en nuestro laboratorio, el presente trabajo se centrará particularmente en la fosfatasa del virus Orf. Como ya se ha mencionado antes, este es un gen altamente conservado en los Poxvirus, que jugaría un rol importante en la inactivación de la vía JAK/STAT del hospedero. Se buscará contribuir al conocimiento de las características estructurales y funcionales de la fosfatasa OVH1, realizando un aporte valioso para el entendimiento de la biología de este virus, así como para el estudio de las características estructurales y funcionales de las DUSPs. Adicionalmente, si se logra el aislamiento en cultivo celular, se contará con una fuente de partículas virales libre de contaminación con proteínas provenientes del hospedero para la caracterización proteómica de los viriones de Orf. Esto permitiría responder la pregunta de si la fosfatasa OVH1 se encuentra formando parte de la partícula viral.

4. OBJETIVOS GENERALES

Este trabajo busca profundizar en la caracterización estructural y funcional de la fosfatasa del virus Orf, un gen ampliamente conservado en la familia *Poxviridae* que se ha visto implicado en la inhibición de la vía de respuesta al interferón γ en sus células hospederas. Adicionalmente, se propone adaptar a una cepa del virus Orf a la replicación en diferentes líneas celulares, a fin de contar con un modelo que permita continuar el estudio de esta proteína en el contexto de la infección viral.

5. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Concretamente, en este trabajo se propone:

- 1) Resolver y analizar la estructura tridimensional de la fosfatasa del virus Orf.
- 2) Evaluar el estado de oligomerización y la actividad fosfatasa mediante el estudio de la proteína salvaje y mutantes de interés.
- 3) Adaptar a la replicación en cultivo celular una cepa del virus Orf.

MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación, se describen las metodologías utilizadas en este trabajo. En el Anexo A se brindan más detalles sobre los materiales utilizados y la preparación de soluciones y medios de cultivo. En el Anexo B se describen metodologías complementarias utilizadas en el desarrollo de esta tesis.

1. MATERIALES

a. Plásmidos

Para clonar la secuencia codificante de la fosfatasa del virus Orf (OVH1) se utilizó el plásmido pET28a (+), el cual pertenece al sistema de vectores pET. El vector pET28a (+) se clasifica como vector de traducción, ya que contiene el sitio de unión al ribosoma de la proteína principal de la cápside del fago T7. Adicionalmente, este vector permite la adición de una cola de seis histidinas (His-Tag) en el extremo amino y/o carboxilo terminal de la proteína, la que puede ser utilizada durante la purificación de la proteína recombinante o para facilitar el reconocimiento de la misma mediante el uso de anticuerpos específicos para esta marca. El mapa del pET28a (+) se muestra en la Figura 8a, y el detalle del sitio de clonado se indica en la Figura 8c.

Para clonar el mutante de delección $\Delta 21Nt$, se utilizó el plásmido pT7-MBP-GFP, perteneciente a la serie de vectores generada por Correa *et al.* (38), amablemente cedido a nuestro laboratorio por la Unidad de Proteínas Recombinantes del Instituto Pasteur de Montevideo. Este fue construido a partir de modificaciones del vector plasmídico pET32a (+). Entre las modificaciones más relevantes, se destaca eliminación de la fusión con tioredoxina, la adición de la proteína de fusión MBP (*Maltose Binding Protein*), así como un sitio de clivaje para la proteasa del virus del mosaico del tabaco (TEV), y la adición de un Strep-Tag II en el extremo carboxilo terminal (38). Además, este plásmido contiene la secuencia codificante para la proteína fluorescente verde (GFP) fusionada a MBP. El mapa del vector pET32a (+) y un esquema de las modificaciones realizadas, se muestran en la Figura 8b y 8d respectivamente.

Tanto el pET28a (+) como el plásmido pT7-MBP plásmidos permiten el clonado de genes bajo el control del promotor para la ARN polimerasa del fago T7. La utilización de este promotor supone una ventaja para la producción de proteínas recombinantes debido a la gran selectividad de esta enzima por el mismo, sumado a su elevado nivel de actividad, lo que permite alcanzar niveles de proteína recombinante cercanos al 50% de la proteína total en la célula (39).

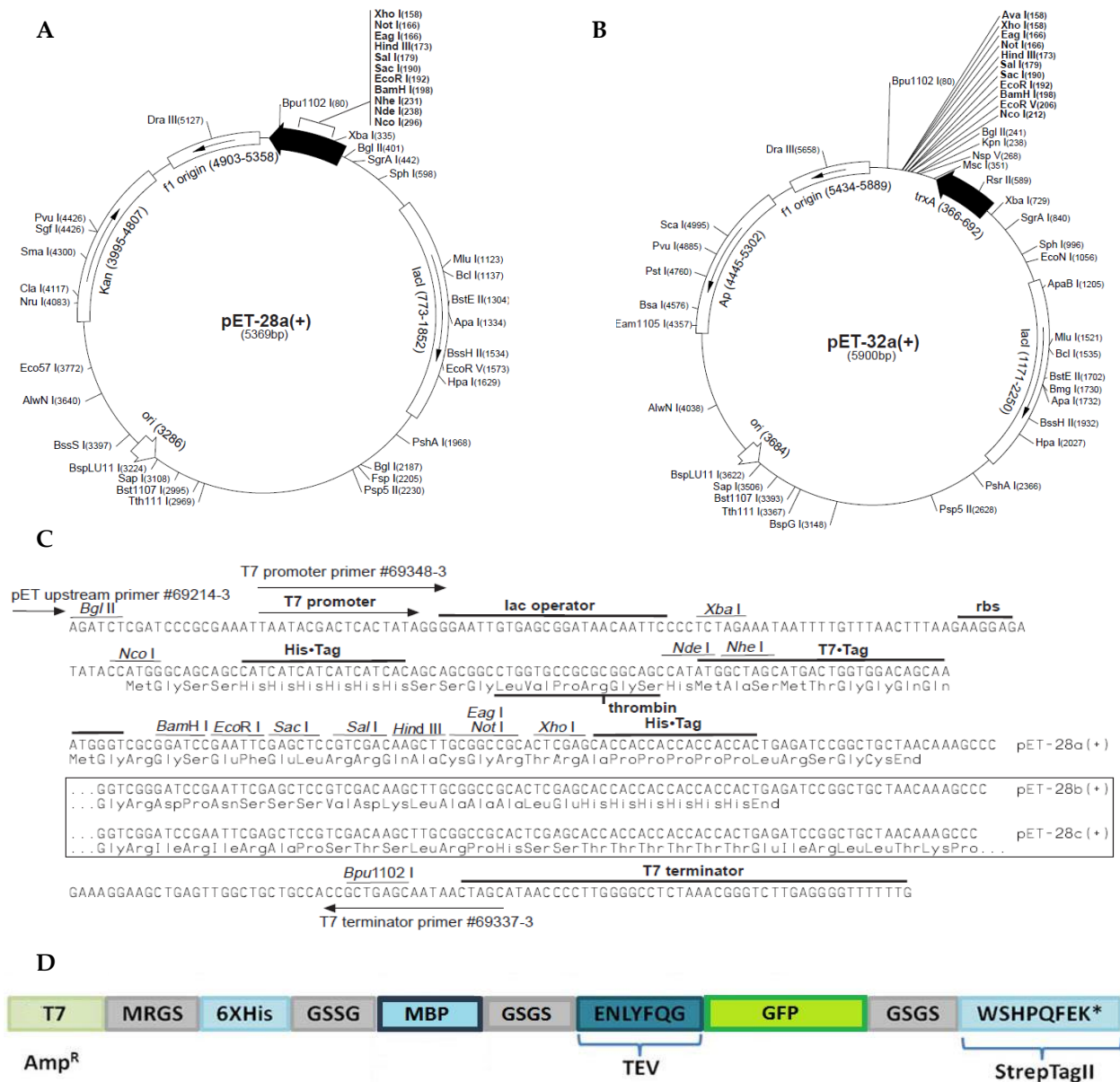


Figura 8. Plásmidos – Se observan los mapas de los plásmidos utilizados.

A. pET28a (+). Se esquematiza el gen de resistencia a kanamicina (Kan), el origen de replicación de ADN del bacteriófago f1 (f1 origin), la secuencia codificante del represor lac (lacI), el origen de replicación bacteriano pBR322 (ori). Se muestran además todos los sitios de restricción en el plásmido, destacándose los del sitio de policlonado. (Adaptado del manual de vectores pET, Novagen® pET systems).

B. pET32a (+). Se representa el gen de resistencia a la ampicilina (Ap), y la fusión con tioredoxina (trxA). (Adaptado del manual de vectores pET, Novagen® pET systems).

C. Sitio de clonado y expresión del pET28a (+). La letra “a” en el nombre del vector designa el marco de lectura relativo al sitio de restricción de BamHI, GGATCC, que en este caso está en marco con el codón GGA. Se muestra la secuencia del promotor T7, la secuencia del operador lac, la secuencia de unión al ribosoma (rbs), la cola de histidinas (His-Tag), el tag T7, el terminador T7 y la secuencia para el sitio de corte con trombina. En este trabajo se utilizaron los sitios NdeI (238) y HindIII (173). (Adaptado del manual de vectores pET, Novagen® pET systems).

D. Esquema de las modificaciones realizadas en el pET32a (+) para generar el vector pT7-MBP-GFP. Se agrega un His-Tag, seguido por una fusión a MBP, el sitio de corte de la proteasa TEV, la proteína fluorescente verde (GFP) y un StrepTagII carboxilo terminal. Se elimina la fusión original con tioredoxina (Adaptado de Correa *et al.*, 2014) (38).

b. Células

Para la amplificación de los plásmidos, se utilizaron células *E. coli* de la cepa DH5- α . Esta cepa permite el tamizaje de los posibles insertos mediante el sistema de complementación en alfa, debido a que presenta una delección en el gen *lacZ*. A su vez, la mutación *endA1* proporciona una menor actividad nucleasa, y la mutación *recA1* reduce la recombinación homóloga, favoreciendo una mayor estabilidad de los plásmidos. Estas características hacen que esta sea una cepa generalmente utilizada en el clonado molecular.

Para la expresión de proteínas recombinantes se utilizaron células *E. coli* de la cepa BL21(DE3) Star. La designación DE3 indica que contienen el gen de la ARN polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor *lacUV5*. Esta cepa también proporciona una mayor estabilidad del ARN mensajero, debido a una mutación en el gen de la RNasa E (*rne131*). Adicionalmente, el rendimiento de proteína recombinante obtenido en esta cepa se encuentra potenciado por la ausencia de las proteasas Ion y OmpT.

Para los ensayos de adaptación del virus Orf al crecimiento en cultivo celular, se utilizaron tres líneas celulares:

- (i) las células Vero (ATCC: CCL-81), células epiteliales derivadas de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) que crecen adheridas al sustrato;
- (ii) las células MDBK (ATCC: CRL-6071), células epiteliales derivadas de riñón de vaca (*Bos taurus*), que crecen adheridas al sustrato.
- (iii) las células HeLa (ATCC: CCL2), células epiteliales inicialmente derivadas de cuello de útero humano (*Homo sapiens*) con adenocarcinoma, que crecen adheridas al sustrato.

2. MÉTODOS ASOCIADOS A LA CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y ESTRUCTURAL DE OVH1

a. Amplificación por PCR

Para el clonado de la fosfatasa OVH1 en el vector pET28a (+), se diseñaron cebadores en base a la secuencia de ADN genómico de la cepa NZ2 del virus Orf (Gene bank DQ184476.1). La fosfatasa corresponde al marco de lectura ORFV057. Los cebadores diseñados fueron los siguientes: OVH1F (5' GGC AGC CAT ATG GAG AAC CTC TAC TTC CAG GGG ATG GGC GAT AAG AGC GAG TGG 3') y OVH1R (5' GGC CGC AAG CTT TTA GGA CGG CGA GTC GCA G 3'). El cebador OVH1F añade el sitio de restricción de la enzima *NdeI* y el sitio de corte de la proteasa del virus del mosaico de tabaco corriente arriba de la secuencia de OVH1. El cebador OVH1R añade un sitio de restricción de *HindIII* en el extremo 3' de la secuencia. Los sitios de restricción se muestran en *itálica*, se subraya la secuencia que codifica para el sitio de reconocimiento de la proteasa TEV y en *negrita* se muestran las secuencias complementarias al gen blanco.

El molde utilizado para las reacciones de PCR se obtuvo a partir de extracciones de ADN genómico correspondiente a cepas de virus Orf obtenidas en Uruguay, durante la tesis de la MSc

Natalia Olivero (37). La reacción de PCR se realizó con la ADN polimerasa de alta fidelidad *Phusion* de *Thermo Scientific* (F-530S), en un volumen final de 50 μL , conteniendo 10 μL de 5x *Phusion HF Buffer*, 1 μL de solución de dNTPs [10 mM] cada uno, 2 μL de cada cebador [10 μM], 1 μL de ADN polimerasa [2 U/ μL] y 100 ng de ADN molde. El ciclado utilizado fue el siguiente: desnaturalización inicial a 98°C durante 1 minuto, seguido de 34 ciclos de repetición de desnaturalización a 98°C durante 10 segundos, hibridación de los cebadores a 65°C durante 30 segundos, extensión a 72 °C durante 1 minuto, y una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

b. Electroforesis de ADN y purificación de fragmentos de interés

Los productos de PCR, plásmidos y productos de digestión fueron visualizados mediante electroforesis de ADN en geles de agarosa al 1% en buffer TAE (Tris-acetato-EDTA) 0.5X. El buffer de carga utilizado fue el de *Thermo Scientific* (#R0611). La migración fue realizada a 100 V durante 20 minutos en una cuba de electroforesis MiniRun-GE 100 de BIOER. Los geles fueron preteñidos con 2 μL de GelRed cada 50 mL y visualizados bajo luz ultravioleta.

Cundo se requirió purificar fragmentos de ADN de interés a partir de bandas del gel de agarosa se utilizó el kit GeneJET de *Thermo Scientific* (#K0691), siguiendo las instrucciones del fabricante.

c. Expansión y cuantificación de los plásmidos de interés

Los plásmidos utilizados se amplificaron mediante transformación por shock térmico (40) de bacterias *E. coli* DH5- α quimio competentes obtenidas por el método de Inoue (41). Las células transformadas se sembraron en placas de LB (*Lysogeny Broth*) agar con el antibiótico adecuado y se incubaron a 37°C toda la noche. Luego de la transformación se realizaron precultivos de 3 mL de LB líquido con el antibiótico apropiado. Al día siguiente, los plásmidos se extrajeron mediante el método de lisis alcalina (40).

Para la cuantificación de los plásmidos, se midió la absorbancia a 260 nm con un espectrofotómetro de micro volúmenes, NanoDrop Lite de *Thermo Scientific*.

d. Digestión con enzimas de restricción

Los productos de PCR obtenidos para la realización del clonado de OVH1 en el plásmido pET28a (+), se separaron en un gel de agarosa y la banda conteniendo el producto esperado se purificó como se describe en (b). A continuación, un volumen de hasta 25 μL de producto purificado se digirió con 20 unidades de las enzimas de restricción *NdeI* y *HindIII* (NEB, R0111S y R0104S) en buffer NEB 2, durante dos horas a 37°C en un volumen final de 50 μL . En paralelo se digirieron 5 μg del plásmido pET28a (+) con estas enzimas, en las mismas condiciones descritas para los productos de PCR. Ambos productos de digestión fueron posteriormente purificados como se describe en (b).

e. Ligación de fragmentos de ADN con extremos cohesivos

Para la ligación de los productos de PCR digeridos con el vector pET28a (+) se utilizaron 50 ng de plásmido linealizado y 13.6 ng del producto digerido conteniendo el inserto, en una relación de 3 moléculas de inserto por cada molécula de vector. La reacción de ligación se realizó con 20 unidades de enzima T4 ADN ligasa de *Thermo Scientific* (EL004), durante 15 minutos a temperatura ambiente, en un volumen final de 20 μ L. Pasado ese tiempo, se transformaron células *E. coli* DH5- α quimio competentes, por el método de shock térmico (40).

f. Generación de mutantes de interés

Para la obtención de los mutantes de OVH1 C112S y C15S/C112S, se utilizó la estrategia de mutagénesis sitio dirigida *Quick Change (Stratagene)*. Esta se basa en el diseño de un par de cebadores mutagénicos, complementarios entre sí, portadores de la mutación deseada. Estos son utilizados en ciclos de extensión largos, donde se copia todo el plásmido. La extensión genera plásmidos mutados que contienen una mella. Seguidamente, el resultado de la mutagénesis es tratado con la endonucleasa *DpnI*, que degrada el ADN molde metilado. El plásmido sintetizado en la reacción, portador de la mutación deseada es seguidamente transformado en células competentes *E. coli* DH5- α , en donde se liga la mella y se generan múltiples copias.

Para el mutante de actividad C112S se utilizaron los siguientes cebadores mutagénicos: C112S-F (5' CAC GCT CGT GCA CTC CGT GGC CGG CGT C 3') y C112S-R (5' GAC GCC GGC CAC GGA GTG CAC GAG CGT G 3'). Subrayada se muestra la mutación puntual introducida por el par de cebadores. Como molde se utilizó el plásmido pET28a (+)-OVH1 salvaje. La reacción de PCR se realizó con la ADN polimerasa de alta fidelidad *Phusion* de *Thermo Scientific* (F-530S), en un volumen final de 50 μ L, conteniendo 10 μ L de 5x *Phusion HF Buffer*, 1 μ L de solución de dNTPs [10 mM] cada uno, 2.5 μ L de cada cebador [10 μ M], 1 μ L de ADN polimerasa [2 U/ μ L] y 100 ng de ADN molde. Se utilizó el siguiente programa de ciclado: desnaturalización inicial a 98°C 1 minuto, seguida de 24 ciclos de repetición de desnaturalización a 98°C durante 10 segundos, hibridación de los cebadores a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72 °C durante 6 minutos, y finalmente una extensión a 72°C durante 10 minutos. El producto de mutagénesis se digirió con 1 μ L *DpnI* (*Thermo Scientific*, ER1701) durante 2 hs a 37°C, y con este se transformaron células *E. coli* DH5- α quimiocompetentes.

El mutante doble C15S/C112S se generó de forma análoga al mutante C112S, utilizando como molde el plásmido pET28a (+)-OVH1-C112S, con los siguientes cebadores mutagénicos: C15S-F (5' CTC CTG CTG CGG AGC ACG CGC GCG G 3') y C15S-R (5' CCG CGC GCG TGC ICC GCA GCA GGA G 3'). Subrayada se destaca la mutación puntual en ambos cebadores.

Para generar los mutantes de delección OVH1- Δ 20Nt y OVH1- Δ 21Nt se utilizó una estrategia que buscaba amplificar la secuencia codificante de la fosfatasa a partir del aminoácido 21 o 22. La diferencia entre estas delecciones es que OVH1- Δ 20Nt presenta una prolina en su extremo amino terminal, la cual se decidió eliminar en el mutante OVH1- Δ 21Nt, para generar un mutante más similar al mutante de delección reportado para VH1 del virus Vaccinia (14). Este

presenta una alanina amino terminal, un residuo hidrofóbico más similar a la leucina 22 en OVH1.

Para el mutante OVH1- Δ 20Nt, se diseñó el cebador sentido Δ 20Nt-F, (5' GGC AGC CAT ATG GAG AAC CTC TAC TTC CAG GGG CCG CTG GCC CTG CCC TCG GGC), que comparte las mismas características que el cebador OVH1F, con la única diferencia de que en lugar de hibridarse con el primer codón de OVH1, se hibrida con la prolina número 21, generando entonces un producto de amplificación con la delección deseada. Se utilizaron las mismas condiciones que en la amplificación de la fosfatasa salvaje, utilizando como primer antisentido al cebador OVH1R. Este producto de amplificación se clonó en el vector pET28a (+) en forma análoga a lo realizado con la secuencia salvaje utilizando enzimas de restricción.

Para clonar el mutante OVH1- Δ 21Nt en el plásmido pT7-MBP-GFP, se utilizó la estrategia de *RF-cloning* (42) en la cual el gen de interés es amplificado por PCR utilizando cebadores que contienen una secuencia complementaria al gen blanco, y una secuencia que hibrida con los sitios de inserción en el vector de destino. Este producto de PCR doble hebra es utilizado como un conjunto de mega cebadores en una segunda reacción de amplificación. En este paso, cada hebra de los cebadores se hibrida con el vector de destino en la posición prediseñada, y es extendido en una reacción de amplificación lineal. Las dos nuevas hebras de ADN forman un plásmido doble hebra con una mella. En ADN parental es removido con la endonucleasa *DpnI*, y el plásmido sintetizado es transformado células *E. coli* (43).

El plásmido pT7-MBP-GFP contiene a la proteína MBP fusionada a la proteína GFP. Los cebadores de este *RF-cloning* se diseñaron para reemplazar el gen de la GFP por la fosfatasa del virus Orf deletada en los primeros 21 aminoácidos. En la primera PCR se utilizaron los siguientes cebadores: D21NtF (5' GGA TCG GAA AAC CTG TAT TTT CAG GGA TCC CTG **GCC CTG CCC TCG GGC ATG** 3') y D21NtR (5' GAA CTG CGG GTG GCT CCA GCT GCC **GGA TCC TTA GGA CGG CGA GTC GCA G** 3'). En negrita se destacan las secuencias complementarias al gen blanco, mientras que las otras corresponden al vector. Como molde se utilizó el plásmido pET28a (+)-OVH1 salvaje y las mismas condiciones utilizadas para amplificar el gen de la fosfatasa salvaje. El producto de esta amplificación se purificó por gel de agarosa para ser posteriormente utilizado como mega cebador en la segunda PCR. Esta se realizó con la ADN polimerasa de alta fidelidad *Phusion* de *Thermo Scientific* (F-530S), en un volumen final de 50 μ L, conteniendo 10 μ L de 5x *Phusion HF Buffer*, 1 μ L de solución de dNTPs [10 mM] cada uno, 120 ng de megacebador, 1 μ L de ADN polimerasa [2 U/ μ L] y 30 ng de plásmido pT7-MBP-GFP. Se utilizaron las siguientes condiciones de ciclado: desnaturalización inicial a 98°C 1 minuto, seguida de 30 ciclos de repetición de desnaturalización a 98°C durante 10 segundos, hibridación de los mega cebadores a 60°C durante 1 minuto, extensión a 72 °C durante 5 minutos, con una extensión final a 72°C durante 7 minutos. El producto de esta segunda PCR se trató de forma análoga a los productos de mutagénesis generados con la estrategia *Quick Change*, descrito en esta sección.

g. Secuenciación de ADN y análisis de secuencias

Las diferentes construcciones realizadas se secuenciaron mediante el servicio de Macrogen Korea, a fin de verificar la identidad de las secuencias clonadas, tanto salvaje como la de las mutaciones generadas. Para el secuenciado se utilizaron cebadores universales complementarios al promotor T7 y al terminador T7, disponibles en el servicio de secuenciado. La calidad de las secuencias se analizó utilizando el programa BioEdit (44). En el análisis se realizaron alineamientos de las secuencias reportadas por el servicio de secuenciación con la secuencia codificante para la fosfatasa salvaje, así como un análisis de la calidad de los picos de los cromatogramas de secuenciación obtenidos.

Para la realización de *Blast* con la secuencia aminoacídica de OVH1 se utilizó la herramienta disponible en uniprot.org/blast. Los alineamientos de secuencias se realizaron en el programa Seaview, que utiliza el programa Clustal o Muscle. Los árboles filogenéticos de máxima parsimonia se realizaron también en seaview, utilizando el algoritmo protpars de PHYLIP, ignorando los gaps del alineamiento, con un Bootstrap de 1000 (45).

h. Optimización de la expresión de proteínas

Para encontrar las condiciones óptimas de expresión de OVH1-salvaje, se realizaron ensayos de expresión en cultivos de 50 mL de medio LB, 2YT (*2x Yeast extract and Tryptone*), TB (*Terrific Broth*) y el medio auto inductor ZY(*N-Z amine Yeast extract*)M 5052 (46). La composición de los medios se detalla en el Anexo A. Se evaluó la inducción de la expresión de proteínas con IPTG o con la lactosa presente en el medio auto inductor a 20 y a 16°C. Se seleccionaron las condiciones de expresión que rindieron más cantidad de proteína soluble en relación al volumen de medio de cultivo utilizado.

i. Expresión y purificación de OVH1¹

Se transformaron células *E. coli* de la cepa BL21(DE3)Star quimio competentes obtenidas por el método de cloruro de calcio (40) con 50 ng del plásmido adecuado.

Se realizó un precultivo en 3 mL de LB con el antibiótico apropiado a partir de una colonia o de un stock en glicerol incubando toda la noche a 37°C bajo agitación de 200rpm.

Al día siguiente, se inoculó el medio ZYM 5052 con 1 mL de precultivo cada 100 mL de medio fresco con el antibiótico adecuado. Se dejó crecer las células a 37°C con agitación a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.6. Una vez alcanzado este punto, se continuó el cultivo a 16°C bajo con agitación de 200 rpm hasta alcanzar una DO_{600nm} mayor o igual a 10 (~24hs).

Una vez finalizada la expresión, se colectaron las células mediante centrifugación durante 15 minutos a 4°C y 6000 rpm. Las mismas fueron resuspendidas en buffer de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 0.5 M, glicerol 10%) en una relación de 5 mL por gramo de peso húmedo de células.

¹ Durante la Beca de Iniciación a la Investigación de la Bach. Eliana Segovia (2012-2013) se obtuvieron valiosos datos preliminares del proceso de purificación de esta proteína que sirvieron de antecedentes para este trabajo.

A las células resuspendidas se le agregó 1 pastilla de cocktail de inhibidores de proteasa cada 100 mL (SIGMA S8830) y lisozima a una concentración final de 0.1 mg/mL. Seguidamente, la lisis celular se realizó mediante sonicación (*Omni International Ultrasonic Homogenizer, Sonic Ruptor 250*), en 20 ciclos de 1 minuto, *Power output* 50 y *Pulser* de 40%, con intervalos de 30 segundos de descanso, siempre manteniendo el lisado en hielo. El lisado posteriormente se incubó con ADNasa I (AppliChem A3778) a una concentración de 5 µg/mL y MgCl₂ a 10 mM, durante una hora a 4°C. Luego, se procedió a centrifugar el lisado durante 1 hora a 4°C y 13000 rpm. El sobrenadante se rotuló como “fracción soluble”, y el precipitado se resuspendió con buffer de lisis con Urea 2 M en el mismo volumen que la fracción soluble y se rotuló como “fracción insoluble”. La fracción soluble se filtró por 0.22 µm y las proteínas recombinantes se purificaron mediante cromatografía de afinidad a metal inmovilizado (*IMAC*).

Para realizar la *IMAC*, previamente se cargó la matriz *Chelating Sepharose Fast Flow* (SIGMA) con iones Cu²⁺, y se equilibró con buffer de lisis tal como se detalla en el Anexo B. Para la cromatografía, se utilizaron 3 mL de matriz cargada por cada 40 mL de fracción soluble de proteínas. Se incubó durante 40 minutos, a temperatura ambiente y en *batch*. Luego de esta, se recogió el percolado (que contiene las proteínas que no se unieron a la matriz) y se realizan seis lavados de 5 minutos con 5 mL de buffer de lisis conteniendo imidazol 20 mM, incubando la matriz en *batch*. La elución de las proteínas inmovilizadas se realizó con buffer de lisis conteniendo imidazol 300 mM. Se colectaron fracciones de proteína de 3 mL, hasta no detectar más proteína por el método de Bradford visible. Finalmente, la columna se lavó con H₂O MQ y se conservó en EtOH 20% hasta su regeneración (ver Anexo B). Las muestras obtenidas se analizaron por SDS-PAGE, como se describe en (k), y se realizó una única mezcla con aquellas fracciones que contenían la mayor cantidad de proteína recombinante. Esta mezcla se digirió con la proteasa TEV_{SH} recombinante (47), para eliminar el His-Tag. La digestión se realizó durante una diálisis en la cual se removió de forma secuencial el imidazol. Se añadió 1 mg de proteasa TEV_{SH} cada 20 mg de proteínas totales. La diálisis se realizó a 18°C, contra buffer de lisis con 1 mM de DTT y 150 mM de imidazol durante las primeras 2 horas, y haciendo diluciones seriadas al medio con buffer de lisis sin imidazol, a fin de ir eliminando el imidazol de forma gradual. Los primeros dos pasos de la secuencia se realizaron el mismo día, luego se continuó dializando toda la noche, y se terminó la diálisis al llegar a una concentración final de imidazol de 20 mM. Durante todos los pasos se mantuvo constante la concentración de DTT al 1 mM. El producto de digestión se aplicó de forma secuencial a tres columnas *IMAC* de 1 mL de matriz equilibradas con buffer de lisis con 20 mM de imidazol. Se mantuvo esta concentración de imidazol para evitar la interacción inespecífica de la proteína recombinante con la matriz. El producto digerido fue aplicado en la primera columna, el percolado de la primera columna fue aplicado en la segunda, y el de la segunda en la tercera. Se realizaron estos pasos para eliminar a proteínas que no hayan sido digeridas por la TEV_{SH}, y por lo tanto conservan el His-Tag, además de la propia proteasa TEV_{SH} junto con otras posibles proteínas contaminantes. La proteína de interés digerida se recuperó entonces en el percolado, el cual se concentró a 10 mg/mL, hasta un volumen preferentemente menor a 4 mL, utilizando centricones de 10 kDa de corte.

Como último paso de purificación, hasta 4 mL de proteína se inyectaron en una columna de exclusión molecular *Hi Load 16/60 Superdex 200* (GE), previamente equilibrada en Tris-HCl pH 8.0, NaCl 0.05 M, glicerol 10%, DTT 1mM, EDTA 5 mM. La exclusión molecular se realizó en un equipo *AKTA prime plus* (GE Healthcare) a un flujo constante de 1 mL/min, durante 120 minutos. Por experiencia previa del grupo sabemos que la fosfatasa eluye a los 84 mL en estas condiciones. Este pico se colectó y concentró a 10 mg/mL suplementándose con DTT a una concentración final de 5 mM, y se almacenó a 4°C o a -20°C dependiendo de la utilización posterior.

j. Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método de Bradford en placa de 96 pocillos. El método se basa en la interacción del azul de *Coomassie* G-250 con residuos de arginina, triptófano, histidina y fenilalanina, presentes en las proteínas, la cual provoca un corrimiento en el espectro de absorción del azul de *Coomassie* hacia el color azul, que se puede detectar midiendo la absorbancia a 595 nm. El método de Bradford requiere la utilización de una curva de calibración, que en este caso se realizó con soluciones de concentración conocida de seroalbúmina bovina, en el rango de 0.1 mg/mL a 1 mg/mL (48).

Para realizar la reacción, se mezclaron 140 µL de reactivo de Bradford con 10 µL de muestra en un pocillo de la placa. Se dejó desarrollar el color durante 5 minutos y se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro que permite la lectura de placas de 96 pocillos (mrc). Tanto las muestras como los puntos de la curva de calibración se analizaron por triplicado.

Para determinar la concentración, se grafican las medidas de absorbancia en función de la concentración de proteína y se realiza un ajuste lineal. La concentración de las muestras se obtiene utilizando la ecuación del ajuste en el rango de la curva de calibración.

Como método de cuantificación alternativo para las proteínas purificadas, se utilizó la medida de absorbancia a 280 nm. Para esto, se obtuvo el coeficiente de extinción molar teórico a partir de la secuencia aminoacídica de la proteína recombinante, utilizando la herramienta bioinformática *ProtPam* (web.expasy.org/protparam). Este es obtenido utilizando la siguiente ecuación: $\epsilon = nW(5500) + nY(1490)$, donde nW representa la cantidad de aminoácidos de triptófano y nY la de tirosinas. El valor teórico obtenido está en unidades de $M^{-1}\cdot cm^{-1}$. A su vez, es posible expresar este valor en unidades de gramos de proteína cada 100 mL, ($\epsilon_{1\%}$) o gramos de proteína por litro ($\epsilon_{0.1\%}$). Estos valores equivalen a la absorbancia de una solución de la proteína a 10 mg/mL y 1 mg/mL respectivamente, los que pueden ser utilizados para determinar la concentración de proteína con un espectrofotómetro de microvolúmenes.

El coeficiente de extinción molar teórico calculado para OVH1 fue $18910 M^{-1}\cdot cm^{-1}$.

k. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

Para visualizar las proteínas en sus diferentes etapas de purificación, se realizaron electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se prepararon geles al 12% de acrilamida de 1 mm de espesor, los que fueron migrados en cubas de electroforesis BioRad (Mini-PROTEAN Tetra Cell 165-8000). La migración siempre se realizó a 90 mV hasta

la salida de las proteínas del gel concentrador, y a 140 - 180mV hasta el final del gel separador en buffer de corrida Tris-glicina (Tris base 25 mM, glicina 250 mM, SDS 0.1%). La tinción de los geles de proteínas se realizó con solución de azul de *Coomassie* (ácido acético 7%, EtOH 30%, Coomassie R 0.2%) durante 1 hora con agitación. Los geles se decoloraron en solución de ácido acético 7%, EtOH 30%.

Cuando se migraron muestras en condiciones reductoras, se utilizó un buffer de carga con 100 mM de DTT. Las muestras analizadas en condiciones no reductoras, se desalaron en una PD-10 (GE) para eliminar el DTT siguiendo el protocolo del fabricante (Anexo B), y se mezclaron con buffer de carga sin DTT. En todos los casos, se desnaturalizaron las proteínas por incubación a 95°C durante 5 minutos previo a la migración, se dejaron enfriar a temperatura ambiente, y se sembraron en el gel.

1. Determinación del coeficiente de sedimentación para la evaluación del estado de oligomerización de OVH1

Para determinar y comparar el estado de oligomerización de OVH1-salvaje y del mutante C112S se realizaron análisis de velocidad de sedimentación. Esta metodología se basa en la aplicación de una fuerza centrífuga a una solución de proteína. En un comienzo, las moléculas de proteína están distribuidas de forma uniforme en la solución. Cuando comienza la centrifugación, las moléculas comienzan a moverse, y la región superior comienza a aclararse de soluto. Por tanto, una frontera móvil se forma entre el solvente y el soluto, viajando a través del tubo de centrifuga con una velocidad dependiente del coeficiente de sedimentación, s , de la molécula. El movimiento de este frente es seguido mediante la medida de absorbancia a 280 nm a lo largo del tubo, en diferentes tiempos. El coeficiente de sedimentación es una propiedad característica de cada macromolécula biológica. Sin embargo, como depende del volumen específico parcial, la densidad y el coeficiente de fricción, que varían según la temperatura y del buffer en el cual la molécula es disuelta, es necesario corregir los valores obtenidos en las condiciones experimentales a condiciones estándar. Estas corresponden a la sedimentación hipotética en agua pura a 20 °C, obteniendo el valor de $s_{w,20}$, el cual es comparable con cualquier otro valor (49).

En nuestro estudio, los experimentos de velocidad de sedimentación se realizaron en una ultracentrífuga analítica XL-1 (Beckman-Coulter) capaz de medir absorbancia a 280 nm (Plataforma de Biofísica de Proteínas y sus Interacciones del Institut Pasteur de Paris, a cargo del Dr. Bertrand Raynal). Se evaluaron las muestras a tres concentraciones de proteína (17.5 μ M, 50 μ M, 175 μ M) en buffer de análisis (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 0.05M, DTT 1 mM y EDTA 5 mM) y a 20 °C. Se determinaron los parámetros del buffer siendo: densidad 0.998 g/ mL, viscosidad 0.01002 P. Se utilizó para OVH1 salvaje y OVH1-C112S el coeficiente de extinción molar teórico 18910 M⁻¹ cm⁻¹ y los volúmenes específicos parciales estimados a partir de la secuencia aminoacídica utilizando el software Sednterp (0.737 ml/g para OVH1-salvaje y 0.738 ml/g para OVH1-C112S). El mismo software se utilizó para estimar la viscosidad del buffer (η = 1.002 centipoises) y su densidad (ρ = 0.998 g·ml⁻¹). Las muestras se centrifugaron utilizando un rotor An60Ti con piezas centrales de 12-mm, a 42,000 rpm, y los perfiles de absorbancia se

tomaron cada cinco minutos. Las distribuciones de coeficiente de sedimentación, $c(s)$, se determinaron utilizando el software Sedfit 14.1 (50).

m. Determinación de la actividad fosfatasa y de los parámetros cinéticos de OVH1

La actividad fosfatasa tanto de la proteína OVH1 salvaje como del mutante de actividad OVH1-C112S fue determinada utilizando el sustrato artificial para-nitro fenilfosfato (p-NPP). La reacción de hidrólisis del grupo fosfato generado por la actividad fosfatasa se puede seguir en el tiempo detectando el aumento de la absorbancia a 405nm, debido a la liberación gradual del producto de la reacción, el para-nitro fenol (p-NP), que en condiciones alcalinas es de color amarillo (Figura 9a). La actividad fosfatasa se analizó a tres temperaturas diferentes (20°C, 30°C y 37°C) en buffer de actividad (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 0.05 M, DTT 1 mM, EDTA 3 mM, glicerol 5% y Tween 0.005%). El coeficiente de extinción molar del pNP (por el camino óptico) se determinó en las condiciones experimentales utilizadas siendo $\epsilon \cdot b = 13.29 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 300 μL , utilizando una concentración de enzima de 0.009 mg/mL (0.4 μM) y un rango de concentraciones de pNPP entre 1 mM y 20 mM. La actividad fue expresada como $\mu\text{moles de pNP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína recombinante. Las constantes cinéticas K_m y $V_{m\acute{a}x}$ se calcularon utilizando el mejor ajuste de la ecuación de Michaelis Menten (GraphPad Prism). La K_{cat} fue calculada a partir de la $V_{m\acute{a}x}$ expresada en μM de pNP $\cdot \text{s}^{-1}$ y la concentración de enzima utilizada en el ensayo en μM .

n. Análisis de la especificidad de sustrato

El ensayo de *Malachite Green* (Abcam) se utilizó para determinar la cantidad de fosfato liberado en reacciones de desfosforilación *in vitro* con diferentes tipos de sustrato, a fin de evaluar la especificidad de sustrato de la fosfatasa OVH1. Este ensayo se basa en la formación de un complejo de color verde entre molibdato de amonio, el fosfato liberado en la reacción enzimática y el *Malachite Green*, en condiciones ácidas (Figura 9b).

Para determinar la concentración de fosfato liberado es necesaria la realización de una curva de calibración con soluciones de concentración de fosfato conocida. La desfosforilación *in vitro* se realizó en un volumen final de 50 μL , conteniendo buffer de actividad, diferentes concentraciones de la fosfatasa, y una concentración constante de cada sustrato. Se analizó la dependencia de la liberación de fosfato en función de la concentración de enzima. Como sustratos se evaluaron: el mutante de actividad PtpA D126A fosforilado en tirosina de *Mycobacterium tuberculosis* previamente inactivado por calor, a una concentración final de 15 μM ; un péptido sintético² de 15 aminoácidos fosforilado en treonina de secuencia Nt S D E V E T T P S V F R A A F L Ct (*Thermo Scientific*) a una concentración final de 30 μM ; y tres tipos de fosfatidilinositol fosfato (*Echelon Bioscience*) fosforilados en diferentes posiciones (monofosforilado en la posición 3', o bifosforilado en las posiciones 3', 4' o 3',5'), a una concentración de 30 μM en la reacción.

² Este péptido fue cedido amablemente a nuestro laboratorio por el Dr. Pedro Alzari (Institut Pasteur de Paris).

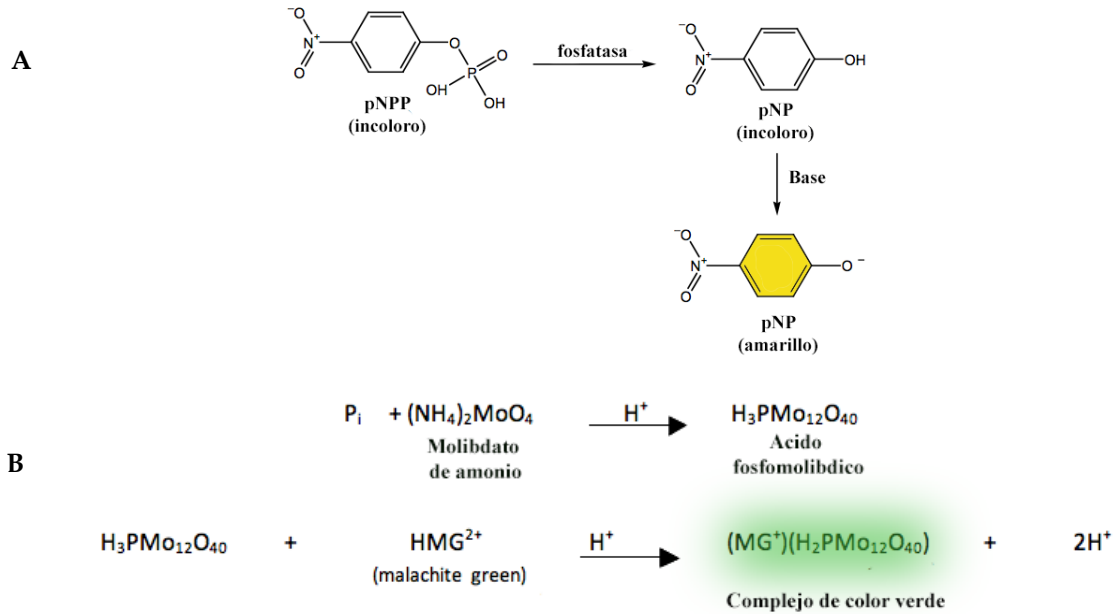


Figura 9. Reacciones utilizadas para determinar la actividad fosfatasa de OVH1

A. Determinación de actividad con el sustrato artificial para nitrofenil fosfato.

B. Ensayo del *Malachite Green* para detectar fosfato liberado en una reacción de desfosforilación de sustratos proteicos y lipídicos.

Las reacciones de desfosforilación se realizaron en placa de 96 pocillos a 37°C, durante media hora, utilizando un rango de concentraciones de enzima de 2 a 6 µM. Para la detección de fosfato libre y frenado de la reacción, se añadieron 150 µL de H₂O MQ, seguidos de 30 µL de *Malachite Green*. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos y la absorbancia a 650 nm se registró en un lector de microplacas. Todas las reacciones se realizaron por lo menos en triplicado, incluyendo los controles sin sustrato y sin enzima. La curva de calibración para la cuantificación del fosfato liberado en la reacción se realizó a partir de una solución madre de fosfato 100 µM, en el rango de 5 a 35 µM.

o. Análisis del estado de oxidación de cisteínas

Para analizar el estado de oxidación de las cisteínas en la proteína OVH1-salvaje se procedió a realizar la titulación de tioles en condiciones no reductoras y desnaturalizantes. Se utilizó el compuesto 4-ditiopiridina (DTPy), que reacciona con las cisteínas reducidas (Cys-SH), para formar 4-tiopiridona, que absorbe a 324 nm y presenta un coeficiente de extinción molar de 21400 M⁻¹cm⁻¹.

En primer lugar, se realizó un desalado de la proteína para eliminar el DTT presente en la muestra. Para ello se utilizó una columna PD-10 (GE) equilibrada en el mismo buffer en que se encuentra la proteína, pero sin DTT. El pico de elución de proteína se determinó mediante cuantificación de la absorbancia a 280 nm.

Para realizar la reacción, se mezclaron 50 μL de proteína a una concentración de 5 μM , en presencia de SDS 2%, con 50 μL de DTPy a una concentración de 30 μM . El SDS desnaturaliza parcialmente la proteína, haciendo más accesibles las cisteínas al DTPy.

En el caso en que todas las cisteínas de la proteína estén reducidas, se espera obtener una relación molar 1:1 entre estas y los moles obtenidos de 4-tiopiridona. Teniendo en cuenta las condiciones del ensayo, si esta relación es menor, el resultado sugeriría que algunas cisteínas no reaccionaron, posiblemente por encontrarse oxidadas.

p. Análisis por espectrometría de masas

Se utilizó el servicio de análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS y MS/MS) de la unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas del Instituto Pasteur de Montevideo para la confirmación de la identidad de OVH1 y para la búsqueda de posibles puentes disulfuro en la secuencia de la misma. Esto último se logra comparando los picos m/z obtenidos de la muestra de OVH1 tratada o no con agente reductor, previamente digerida con tripsina. Los picos diferenciales y que por su masa podrían contener puentes disulfuro, se fragmentaron con la finalidad de obtener su secuencia. Cuando existe un puente disulfuro, se espera encontrar la continuidad de secuencias de la proteína que no deberían estar conectadas si no existiese tal interacción.

q. Ensayos de cristalización y colección de datos de difracción

Para determinar la estructura cristalográfica de una proteína, el primer paso es la obtención de cristales de proteína que logren generar un patrón de difracción de rayos X. Un cristal es un sólido compuesto por moléculas repetidas que conforman un motivo simétrico, regular y altamente ordenado (51). Para generar cristales de proteína, es necesario lograr su precipitación de la solución en una forma ordenada. Esto se logra al llevar la concentración de proteína a condiciones de supersaturación. En los métodos más comunes de generación de cristales, la proteína purificada es disuelta en una solución acuosa que contiene un precipitante a una concentración justo por debajo de la necesaria para hacer que la proteína precipite. A continuación, el agua es removida mediante evaporación controlada para aumentar tanto la concentración de proteína como la concentración de precipitante, lo que permite la aparición de cristales en un proceso de dos pasos. El primero de estos es la “nucleación”, que implica la formación de los primeros núcleos cristalinos y el siguiente es el “crecimiento”, que supone la adición de moléculas al núcleo ya formado (Figura 10). Los cristales de proteína mantienen su estructura mediante fuerzas débiles, principalmente puentes de hidrógeno entre superficies proteicas hidratadas, lo que los hace mucho más frágiles que los cristales inorgánicos (52).

Todo sistema simétrico puede ser reducido a un nivel en el cual ya no es simétrico. En un cristal, el nivel al cual ya no hay simetría se denomina “unidad asimétrica”. A partir de la unidad asimétrica, es posible aplicar operadores rotacionales para construir un motivo de red. El motivo de red es trasladado en una forma tridimensional formando un arreglo regular y repetitivo, llamado red cristalina, donde cada motivo repetido forma un punto en la red. Los puntos de la

red pueden conectarse para formar los vértices de “cajas” tridimensionales. Estas se denominan “celda unidad”.

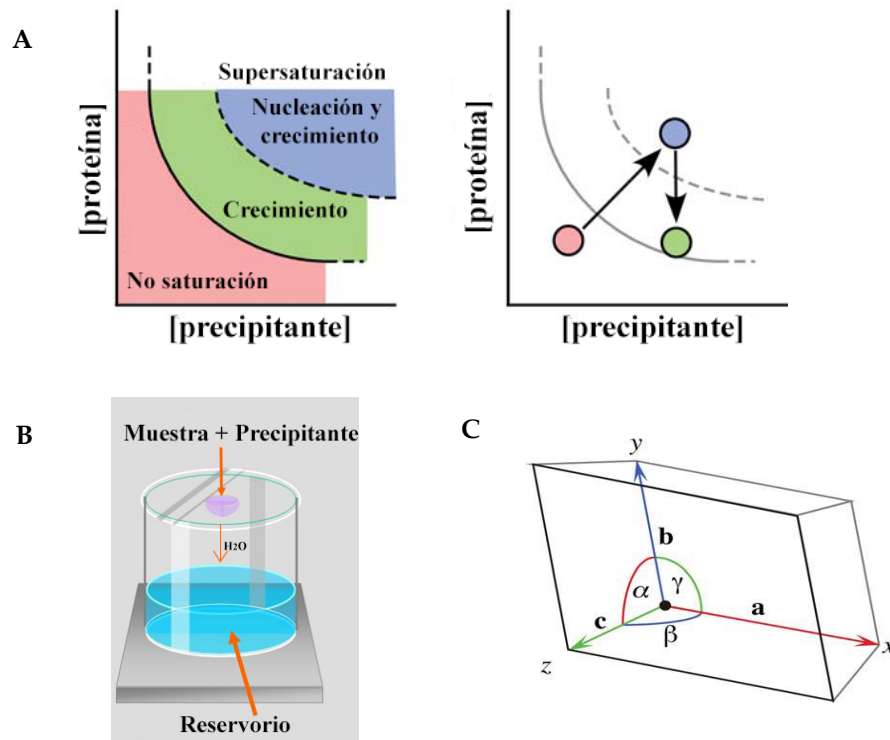


Figura 10. Obtención de cristales de proteína y características de la celda unidad

A. Se observan dos gráficos de [proteína] en función de la [precipitante] que muestran las regiones que favorecen la nucleación y el crecimiento inicial de cristales (supersaturación), y las condiciones por debajo de la saturación que favorecen el crecimiento. Durante el proceso de cristalización, la proteína al inicio está en una condición de no saturación. Al evaporarse el disolvente, aumentan las concentraciones tanto de proteína como de precipitante, que llevan a la misma a una condición de supersaturación. A medida que se van formando cristales, la concentración de proteína empieza a bajar, ubicándose entonces en la zona que favorece el crecimiento de los mismos.

B. Se muestra un esquema de método de cristalización por difusión de vapor en el diseño experimental de “gota colgante”. En este método, la solución de muestra con precipitante es separada de un volumen mayor de solución que contiene precipitante llamado “reservorio”. Ambos son localizados en un sistema cerrado, donde el solvente es transferido de acuerdo a la diferencia de presión de vapor entre la muestra y el reservorio. El agua es extraída desde la muestra hacia el reservorio, haciendo que el volumen de la muestra disminuya sistemáticamente hasta que la presión de vapor entre la muestra y el reservorio llega al equilibrio.

C. Se presenta un esquema de una celda unidad, con sus ejes a , b , c y ángulos α , β y γ característicos. (Imágenes adaptadas de Rhodes, 2006) (52).

Los lados de la celda unidad definen un conjunto de ejes vectoriales denominados a , b y c . Los ángulos existentes entre estos ejes se denominan α , β y γ . La relación entre las dimensiones de a , b y c y los ángulos α , β y γ de la celda unidad definen la forma y tamaño de la misma (Figura 10c). Como todas las celdas unidad en el cristal son idénticas, la morfología del cristal es definida por el tamaño y la forma de la misma y la por la simetría del motivo. Cada nivel del cristal, a excepción de la unidad asimétrica, puede ser generado utilizando operadores matemáticos. Por lo tanto, para resolver su estructura solo es necesario determinar la

conformación de los átomos en la unidad asimétrica. Los grupos de espacio asignados a un cristal definen de forma única el número de unidades asimétricas que se ensamblan para formar la celda unidad del cristal, así como también especifican el tipo de red y la simetría de la misma (51).

Para la obtención de cristales de proteína de OVH1, se realizó un *screening* de condiciones de cristalización tanto con la proteína OVH1-salvaje como con OVH1-C112S. El método utilizado fue el de difusión de vapor, mediante gota sentada. Para hacer las placas de cristalización, se utilizó el sistema de dispensación robotizado Mosquito (TTP Labtech). Se evaluaron 500 condiciones variando el pH, el tipo y la concentración de precipitante, la fuerza iónica y la concentración de proteína (5mg/mL o 10 mg/mL). Los cristales obtenidos se criopreservaron en glicerol y se congelaron en nitrógeno líquido. Una vez verificado que se trataba de cristales de proteína, se colectaron datos de difracción de rayos X en el Sincrotrón Soleil (Saint-Aubin, France) en beamline Proxima 1. Estos datos de difracción fueron procesados utilizando XDS (53) y escalados con la herramienta Aimless de la serie de programas CCP4 (54). Este trabajo se realizó en la plataforma de cristalografía del Institut Pasteur de Paris a cargo del Dr. Ahmed Haouz.

r. Determinación de la estructura y refinamiento

La longitud de onda de los rayos X es adecuada para resolver átomos separados por la distancia de un enlace covalente. La energía de un cuanto de esta radiación es aproximadamente 8000 eV, lo que está en el orden de la energía de los electrones en sus orbitales. Esta equivalencia permite que los electrones en un átomo sean responsables de la difracción de los rayos X. El número de electrones en un volumen de espacio dado (la densidad electrónica) determina la fuerza con que un átomo dispersa rayos X. La interferencia constructiva de los rayos X dispersados lleva al fenómeno de la difracción (51).

El patrón de difracción se relaciona con el objeto que difractó los rayos X a través de la transformada de Fourier. Las ondas electromagnéticas están definidas por una longitud de onda, fase y amplitud. Las intensidades medidas de los rayos difractados se relacionan con la amplitud de los rayos X. Sin embargo, es necesario recurrir a otras herramientas para la obtención de información sobre las fases de los rayos difractados. El método más común para resolver este problema es el "reemplazamiento molecular". Este consiste en el empleo de una molécula de estructura conocida para calcular las fases iniciales de una segunda molécula con elementos estructurales comunes con la primera. La desventaja del reemplazamiento molecular es que las fases obtenidas están sesgadas hacia la estructura utilizada como punto de partida. El éxito de este método depende de algoritmos sofisticados para detectar y eliminar este sesgo durante el refinamiento de las fases.

Luego de resolver el problema de las fases, se procede a construir el modelo de la estructura en el mapa de densidad electrónica obtenido. El modelo es mejorado en un proceso iterativo de refinamiento y construcción de nuevos modelos, generando fases y mapas de densidad electrónica de mayor calidad. Para la evaluación del modelo refinado y la eliminación de sesgos, se excluye un 5 -10 % de los datos de difracción durante todo el proceso de refinamiento, y se

utiliza este conjunto de datos (conocido como R_{free}) como una medida de que tan correcto es el refinamiento de la estructura. Durante el refinamiento, se compara entonces que tan bien el modelo estructural predice al conjunto de datos del R_{free} . Los valores de R de trabajo (R_{work}) obtenidos y de R_{free} en una estructura de buena calidad deben ser similares, siendo el valor de R_{free} siempre un poco superior (2 – 6%). El análisis de Ramachandran también es importante para evaluar la calidad de la estructura obtenida, ya que evalúa que el posicionamiento de la cadena de aminoácidos este en posiciones permitidas o preferidas (51,55).

La estructura cristalográfica de OVH1-C112S se resolvió por reemplazamiento molecular utilizando Phaser (56) y la estructura de la fosfatasa VH1 del virus Vaccinia (3CM3) como modelo de búsqueda. Esta proteína presenta un 42% de identidad de secuencia con la fosfatasa del virus Orf. La hélice amino terminal $\alpha 1$ se removió durante las primeras rondas de refinamiento y se reconstruyó a través de ciclos iterativos de construcción de modelos manual en COOT (57) y fue refinada con Refmac (54) y Buster (Bricogne 2016). La molécula de fosfato en el sitio activo, así como el puente disulfuro entre la cisteína 15 de las cadenas A y B, se agregaron manualmente en los mapas de densidad electrónica con el programa COOT. El modelo final se validó a través del servidor Molprobity (<http://molprobity.biochem.duke.edu>). Las imágenes de la estructura se generaron con el programa Pymol (Schrödinger, LLC). Para la realización de algunas imágenes se utilizó el Plugin APBS-tools, que permite la generación del perfil electrostático de la superficie de la proteína. Los alineamientos estructurales se realizaron utilizando la herramienta ENDSCRIPT (58). La mayor parte de la determinación de la estructura fue realizada por la Dra. Gwenaëlle André-LeRoux³, de la Unidad de Matemática e Informática Aplicadas al Genoma y al Ambiente del INRA, Jouy en Josas; y la Unidad de Microbiología Estructural del Institut Pasteur de Paris.

s. Ensayos de acoplamiento molecular *in silico* (docking)

Se realizó un *docking* molecular del grupo cabeza de diferentes fosfatidil inositol fosfato con el sitio activo de OVH1-C112S. Para ello se utilizó el programa Autodock tools (59). La estructura del grupo de cabeza del fosfatidilinositol 3 fosfato fue extraída de la estructura 3LJU, correspondiente a la centaurina alfa 1 co-cristalizada con el grupo cabeza de PIP3. El resto de los fosfatidil inositol fosfato fue generado modificando a este mismo con el programa COOT.

El modelo de la estructura de OVH1 obtenido fue cargado en Pymol, donde se removieron las moléculas de agua, y se generó un archivo PDB únicamente con la cadena B. Este fue cargado en Autodock tools, donde se agregaron los átomos de hidrógeno y se asignaron cargas parciales a los átomos de proteína. A su vez, se cargaron los ligandos, para añadir las cargas parciales de sus átomos y para la definición de la rotación de sus enlaces. Una vez preparada la proteína y los ligandos, se centró una grilla cúbica de 20 Å de lado, en el residuo de serina que reemplaza a la cisteína catalítica (C112). El docking se realizó utilizando el algoritmo genético de Lamarck.

³ Durante una pasantía de 2 meses en el INRA y en el Institut Pasteur de Paris (Programa ECOS-Sud) bajo la orientación de la Dra André-Leroux, logré familiarizarme con parte de los programas utilizados en la construcción de modelos para la resolución de la estructura cristalográfica.

Entre numerosas conformaciones generadas, las diez mejores fueron analizadas y ordenadas en base al criterio de energía de interacción, y se visualizaron mediante Pymol (Schrödinger, LLC).

3. MÉTODOS ASOCIADOS A LA ADAPTACIÓN A LA REPLICACIÓN EN CULTIVO CELULAR DEL VIRUS ORF

a. Descongelamiento y congelamiento de líneas celulares de mamífero

Los stocks de líneas celulares de mamífero son preservados en nitrógeno líquido. Para iniciar el trabajo con los cultivos celulares se debe proceder a descongelar una semilla stock y reponer la misma en los primeros pasajes de la misma. Para ello, se descongeló un criotubo con células en baño de agua a 37°C. Una vez descongeladas, estas se agregaron en condiciones asépticas a un frasco de cultivo F25 (que posee una superficie de 25 cm²) conteniendo 5 mL de medio MEM 431, suplementado con antibióticos (penicilina 100 U/mL, estreptomina 100 µg/mL), L-glutamina (2 mM) y suero fetal bovino (SFB) al 10%. El frasco con las células se incubó toda la noche a 37°C y en una atmósfera al 5% de CO₂. Al día siguiente se observaron las células en el microscopio invertido para evaluar su estado y se realizó un cambio de medio para eliminar el DMSO utilizado como crio preservante para el congelamiento.

Para el congelamiento de líneas celulares con el fin de reponer la semilla extraída del nitrógeno líquido, se utilizó una monocapa confluyente de células con bajo número de pasaje en un frasco de cultivo F25. Las células se disgregaron mediante la incubación con una solución de tripsina (Gibco) y se centrifugaron durante 5 minutos a 1200 rpm. El sedimento de células fue resuspendido en 900 µL de SFB y estas se colocaron en un criotubo. Seguidamente, se agregaron 100 µL de DMSO y se congeló el tubo con las células de forma gradual durante toda la noche a -80 °C. Al día siguiente estos se transportaron al nitrógeno líquido, donde fueron almacenados a largo plazo.

b. Mantenimiento y pasaje de líneas celulares de mamífero

Las líneas celulares en cultivo se observaron diariamente para el monitoreo de su estado y su crecimiento. Para el pasaje de células, en primer lugar, se retiró completamente el medio de cultivo del frasco F25. A continuación, se lavó la monocapa con 2 mL de solución de tripsina y posteriormente se incubó con solo 500 µL de la misma solución durante 5 minutos a 37°C. Pasado este tiempo, se observaron las células en el microscopio invertido para verificar que se hayan despegado de la superficie del frasco. Una vez logrado esto, se neutralizó la acción de la tripsina agregando medio de cultivo MEM 431 suplementado con antibióticos, glutamina y SFB al 10%. El número de células fue contabilizado mediante el empleo de una cámara de *Neubauer* y se sembró en un nuevo frasco o en placa el volumen de células deseado según el objetivo del experimento.

c. Conteo de células

Para el conteo de células, se despegó la monocapa con el protocolo habitual, descrito en (b). En el último paso de la tripsinización, se agregaron 10 mL de medio de cultivo. Se realizó una dilución 1/10 de las células en medio de cultivo y se cargó una cámara *Neubauer* con una gota de células. Se realizó el conteo de células en 5 cuadrantes de cada grilla de la cámara *Neubauer* (10 en total), utilizando el microscopio invertido. Como el volumen de los 10 cuadrantes sumados es de 1 μL , se multiplicó por 1000 el número de células contadas para obtener el número de células por mililitro en la dilución 1/10. Para calcular el número correspondiente a la suspensión original, bastó con multiplicar por el factor de dilución (10 en este caso).

d. Adaptación del virus Orf al crecimiento en cultivo celular

Para adaptar la cepa del virus Orf "URU13" (37) al crecimiento en cultivo celular, se realizó una serie de pasajes en ciego utilizando como primer inóculo a una muestra de dicha cepa almacenada en la Sección Virología de la Facultad de Ciencias. Previamente se procedió a concentrar las partículas virales presentes en la muestra biológica mediante centrifugación en colchón de sacarosa. Para ello, se resuspendieron 0.5 g de costra pulverizada en 15 mL de buffer TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 0.1 mM) esterilizado mediante filtración por 0.22 μm . Seguidamente, se homogeneizó la suspensión mediante vórtex durante 15 minutos y se clarificó mediante centrifugación a 4000 rpm. Se conservó el sobrenadante, rico en partículas virales. A continuación, se colocaron 12 mL de sacarosa al 36% esterilizada por filtración en un tubo de ultracentrífuga (rotor 50Ti *Beckman*), y se agregaron suavemente 13.5 mL del sobrenadante de la centrifugación anterior. La suspensión de partículas virales fue entonces centrifugada en dicho colchón de sacarosa a 45000g durante 1 hora a 4 °C. El sedimento obtenido fue resuspendido en 3 mL de MEM 431 suplementado con antibióticos 3X. El mismo procedimiento de concentración se realizó en otro tubo empleando buffer TE sin muestra. El resultado de este tubo fue empleado como control de contaminación proveniente del procesamiento de la muestra.

El día anterior, se sembraron en placas de 12 pocillos 2.5×10^5 células de cada línea celular (Vero, HeLa y MDBK) en 4 pocillos cada una, las que crecieron hasta la confluencia durante toda la noche. Previo a la inoculación, las monocapas celulares se lavaron con MEM 431 sin SFB. Seguidamente, se inoculó un pocillo de cada línea con 330 μL de la suspensión de partículas virales concentradas y resuspendidas en TE, otro con el mismo volumen de la suspensión obtenida del procesamiento del tubo con TE sin muestra (control de tubo), otro pocillo con el mismo volumen de MEM 431 con Ab 3X (control de antibiótico) y el último con 330 μL de MEM 431 SFB al 1%, suplementado con antibióticos y glutamina (control de células). En la Figura 11 se muestra un esquema de la placa.

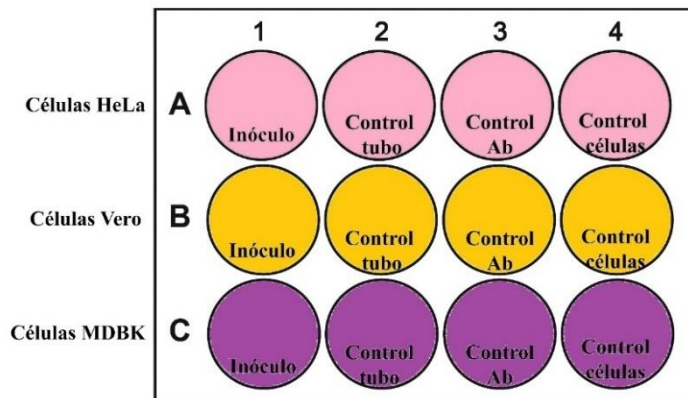


Figura 11. Diseño de la placa de 12 pocillos para la adaptación del virus al crecimiento en cultivo celular.

Se esquematizan las líneas celulares utilizadas, la posición de los inóculos y los diferentes controles del experimento.

Las monocapas celulares fueron incubadas durante 2 horas en estufa de 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, se agregaron 700 µL de MEM 431 SFB al 1%, suplementado con antibióticos y glutamina a cada pocillo. La evolución de los cultivos fue observada diariamente en el microscopio óptico invertido. A las 48 horas se realizó un cambio de medio, retirando completamente el inóculo. A los cinco días post inoculación, se levantaron las células mediante raspado con punta de micropipeta y se lisaron las células mediante shock térmico (incubación a -80 y descongelamiento a 37°C sin utilizar crio preservante, dos veces seguidas).

Para el primer pasaje en ciego, se preparó una placa de 12 pocillos análoga a la del pasaje cero. Estas células fueron inoculadas con 300 µL de lisado celular proveniente del pasaje anterior, a excepción de las células del cuarto pocillo, las que continuaron siendo control de células sin inóculo. Se continuó con los pasajes en ciego en busca de la aparición de efecto citopático o la detección de ADN viral en los lisados celulares.

e. Extracción de ADN de cultivo celular y amplificación por PCR del gen B2L

Para extraer ADN genómico de los lisados provenientes de cultivos celulares, se tomaron 350 µL de lisado celular y se mezclaron con 1 volumen de buffer EB 2X Dellaporta (Tris-HCl 0.2M pH 8.0, EDTA 20 mM, NaCl 0.2M, SDS 2%, β mercaptoetanol 20 mM). Se homogeneizó con vórtex y se incubó 10 minutos a 65°C. Seguidamente, se agregaron 250 µL de acetato de potasio 5 M y se mezcló por inversión 20 veces. Se centrifugó 30 minutos a 10000 rpm y se tomaron 700 µL de sobrenadante a los que se añadió un volumen igual de isopropanol absoluto. Se mezcló por inversión y se centrifugó 20 minutos a 12000 rpm a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 500 µL de EtOH 70% dos veces. Se centrifugó 15 minutos a 10000 rpm, y el sedimento se dejó secar a temperatura ambiente. Se resuspendió el sedimento con 50 µL de H₂O MQ, y la integridad del ADN extraído fue analizada mediante electroforesis de ADN en geles de agarosa. El ADN extraído se utilizó para amplificar mediante PCR el gen viral B2L. Si se logra adaptar el virus al crecimiento en cultivo celular, este logrará replicarse durante los sucesivos pasajes en ciego, y su ADN podrá ser detectado en pasajes altos del proceso de adaptación. Los cebadores utilizados para amplificar el gen B2L fueron el PPP1 (5' GTC GTC CAC GAT GAG CAG CT 3') y PPP4 (TAC GTG GGA ACG GCC TCG CT 3') (60).

La reacción de PCR se realizó con la ADN Taq polimerasa de *Thermo Scientific* (EP0402), en un volumen final de 50 μL , conteniendo 5 μL de 10x Taq Buffer, 3 μL de MgCl_2 [25mM], 1 μL de solución de dNTPs [10 mM] cada uno, 2.5 μL de cada cebador [10 μM], 0.3 μL de ADN polimerasa [5 U/ μL] y 100 ng de ADN molde. Se utilizó el siguiente programa de ciclado: desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 34 ciclos de repetición de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, hibridación de los cebadores a 50°C durante 30 segundos, extensión a 72 °C durante 1 minuto y finalmente una extensión a 72°C durante 10 minutos.

RESULTADOS

1. ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE OVH1

a. El análisis de la estructura primaria de OVH1 revela características propias del género *Parapoxvirus*

El marco abierto de lectura codificante para la fosfatasa del virus Orf se amplificó a partir de varias extracciones de ADN genómico, provenientes de distintas muestras tanto de campo como vacunales (37). La secuencia de OVH1 presentó muy poca variabilidad en las diferentes amplificaciones. Las variantes encontradas correspondían a mutaciones sinónimas y mutaciones de cambio de aminoácido que generaban la sustitución de uno a tres residuos por secuencia. En algunos casos, los polimorfismos encontrados ya estaban representados en cepas de otros países, mientras que en otros aparecieron mutaciones diferentes. Como se contaba con varias opciones, se seleccionó arbitrariamente una de las secuencias para realizar el clonado (cepa UR11/07) y continuar el trabajo, a la que a partir de ahora denominaremos “Orf-virus-UY”.

La secuencia seleccionada fue comparada con las secuencias disponibles en el Genbank provenientes de aislamientos de Nueva Zelanda (DQ184476.1, cepa NZ2), de Estados Unidos (cepas SA200 (NP957834.1) e IA82 (AAR98152.1)), de China (AHZ33754.1, AKU76678.1, KU76546.1, AKU76934.1) y de Alemania (AHH34246.1). El porcentaje de identidad de secuencia con estos aislamientos se mantuvo en el rango que va desde el 97% al 99%. En las primeras 4 secuencias de la Figura 12a se puede observar el alineamiento de la secuencia aminoacídica de OVH1 seleccionada con la secuencia de tres cepas de otros países. Si bien los polimorfismos de la cepa Orf-virus-UY están representados en las otras cepas, la combinación de los mismos se encuentra en forma novedosa. En la posición 88 del alineamiento, la secuencia Orf-virus-UY es igual a la de la cepa SA200, presentando una lisina, mientras que las otras dos presentan una treonina. Sin embargo, en la posición 92 del alineamiento, la cepa Orf-virus-UY presenta el mismo residuo que las cepas NZ2 e IA82, una alanina, mientras que la cepa SA200 presenta una treonina. Esta combinación de mutaciones, propia de Orf-virus-UY, no se encontró para ninguna de las otras secuencias analizadas.

Utilizando la herramienta “BLAST” de la base de datos Uniprot, logramos encontrar secuencias de alta similitud con la de nuestra fosfatasa. Dentro de los primeros 50 resultados, se obtuvieron fosfatasas codificadas por los diferentes miembros de la subfamilia *Chordopoxvirinae*, que presentan entre un 40 y un 90% de identidad de secuencia con Orf-virus-UY. En el alineamiento de la Figura 12a, se observan algunas de las secuencias recuperadas en el *Blast*. Como es de esperar, las secuencias características del sitio activo de las fosfatasas en tirosina se encuentran altamente conservadas, como el motivo LVHCVAGVNRS (comenzando en la posición 113), y el aspartato del bucle WPD (posición 85).

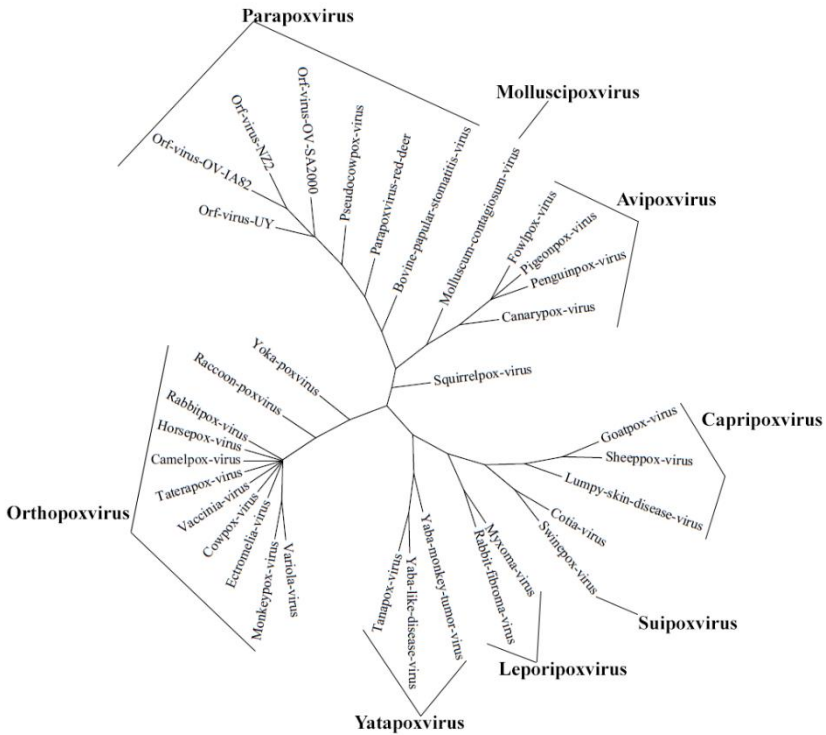
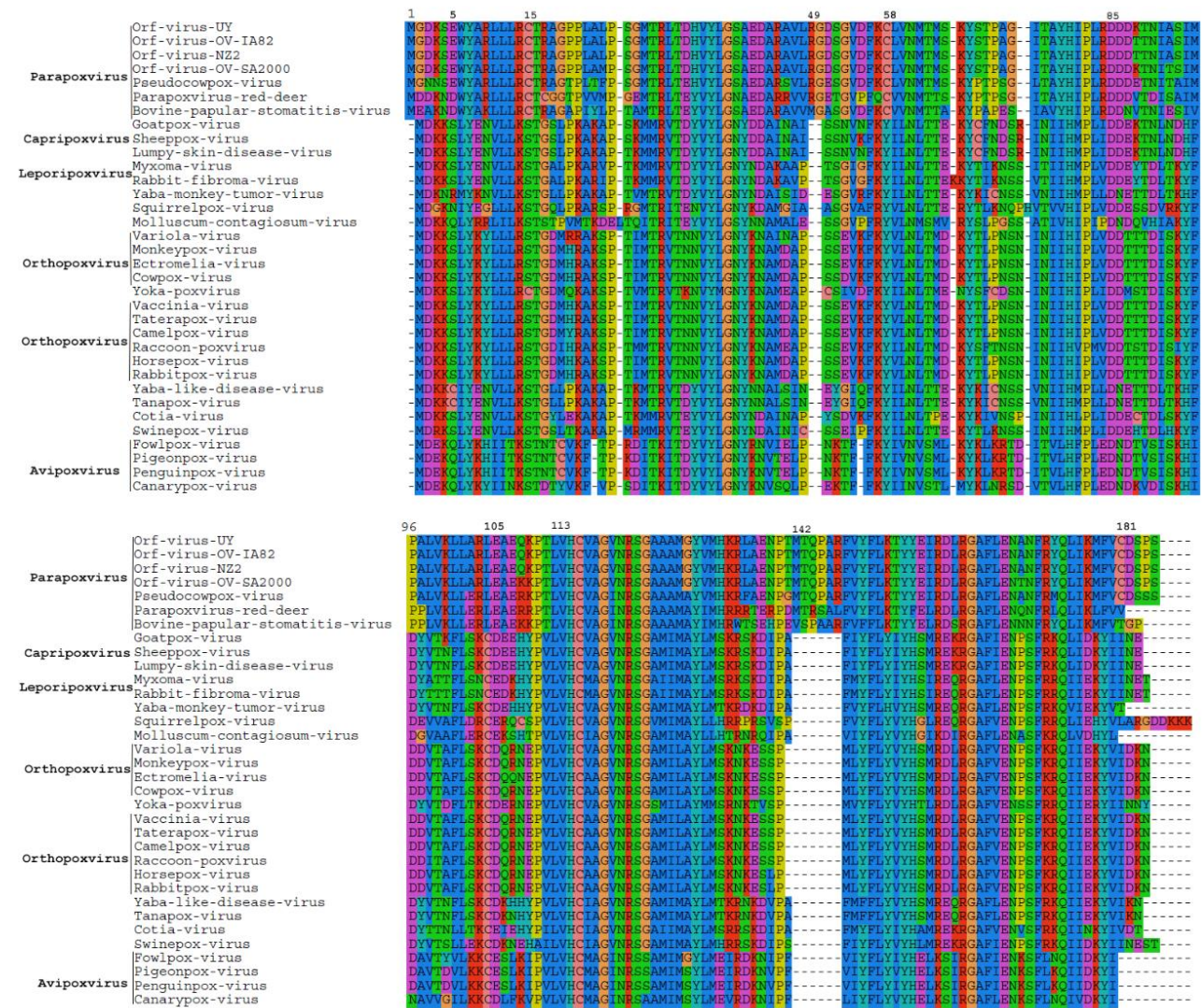


Figura 12. PTPs de Poxvirus.
A. Alineamiento de secuencias de PTPs de distintos Poxvirus. Las secuencias fueron obtenidas mediante el blast realizado con la secuencia de OVH1.
B. Árbol de Máxima Parsimonia obtenido a partir del alineamiento en A. Se destaca la forma en la que las fosfatasa pertenecientes a un mismo género se agrupan en el árbol.

En la Figura 12b, se muestra un árbol filogenético de máxima parsimonia, obtenido a partir del alineamiento. Se observa como las secuencias de las fosfatasa pertenecientes al mismo género son agrupadas en el mismo clado. Los virus Yoka Poxvirus, Cotia virus, y Squirrel Poxvirus aún no se encuentran asignados a ningún género, y es posible que sean miembros de nuevos géneros dentro de la subfamilia *Chrodopoxvirinae*.

La secuencia primaria de los Parapoxvirus se encuentra dentro de las más extensas, siendo las del virus Orf y Pseudocowpox virus las de mayor longitud con 181 aminoácidos, seguidas por el virus de la Estomatitis Papular Bovina con 179 aminoácidos, y el Parapoxvirus del Venado Rojo con 177 aminoácidos. Esto se debe a la presencia de tres inserciones características de los Parapoxvirus, una de 6 aminoácidos (MTQPAR en el virus Orf) comenzando en la posición 142, otra de 2 aminoácidos (RG o MG) en la posición 49, y una glicina en la posición 2 del alineamiento. La inserción de 6 aminoácidos, debido a su mayor extensión, podría llegar a tener consecuencias a nivel estructural. La fosfatasa del virus Squirrelpox virus también se cuenta dentro de las más largas, (178 aminoácidos) debido a la presencia de una inserción carboxilo terminal. Por otro lado, las fosfatasas de menor tamaño son las del género Avipoxvirus, con solo 166 aminoácidos.

La composición en cisteínas de las fosfatasas de Poxvirus es un tanto variable, pudiendo ir desde 2 a 5 cisteínas. Los Parapoxvirus se encuentran entre los géneros con más cantidad de cisteínas, presentando hasta 4, como en el caso del virus Orf. El virus Yoka Poxvirus es el que presenta más cisteínas (un total de 5), mientras que los Orthopoxvirus, Molluscipoxvirus y Leporipoxvirus presentan solo 2. La presencia de cisteínas adicionales a la cisteína catalítica puede llegar a tener cierta relevancia a nivel estructural, ya que podría permitir la formación de puentes disulfuro intra o intermoleculares. En particular, se destaca la presencia de cisteínas en el extremo amino terminal de la secuencia, en el caso de Parapoxvirus (posición 15), Yoka poxvirus (posición 15), Avipoxvirus (posición 19) y Yatapoxvirus (posición 5). En la estructura cristalográfica de las fosfatasas VH1 ya resueltas, pertenecientes a miembros del género Orthopoxvirus (15,36), la región amino terminal corresponde a la hélice $\alpha 1$, involucrada en la dimerización de la proteína. La presencia de un aminoácido de cisteína en esta región podría estar sugiriendo la posibilidad del establecimiento de interacciones del tipo puente disulfuro en la interface de dimerización de estas fosfatasas.

2. PRODUCCIÓN RECOMBINANTE DE OVH1, ANÁLISIS DEL ESTADO DE OLIGOMERIZACIÓN Y DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA

Una vez seleccionada la secuencia de OVH1 se procedió a clonar la forma salvaje de la misma, y a partir de esta se generaron los mutantes OVH1-C112S, el doble mutante OVH1-C15S/C112S y los mutantes de delección OVH1- $\Delta 20$ Nt y OVH1- $\Delta 21$ Nt.

El clonado de la OVH1 salvaje en un vector de expresión nos permitió producir la fosfatasa en forma recombinante para los ensayos de actividad, especificidad de sustrato y cristalización.

El mutante OVH1-C112S, en el cual se sustituye a la cisteína catalítica por una serina, nos permitió obtener un mutante sin actividad fosfatasa, para utilizar como control en los ensayos

de actividad, así como para utilizarlo en los ensayos de cristalización. Se ha reportado que los mutantes inactivos en la cisteína catalítica de las PTPs cristalizan con mayor facilidad que la forma salvaje. Esto es porque la cisteína catalítica es muy susceptible a oxidarse, generando una fuente de heterogeneidad en la proteína salvaje no deseable para la formación de cristales. Un ejemplo del uso de este tipo de mutante es la estructura de la fosfatasa VH1 del virus Vaccinia, (PDB 3CM3) (15).

El doble mutante OVH1-C15S/C112S es de interés debido a que afecta a la cisteína 15 de la secuencia primaria de la fosfatasa. Esta cisteína se encuentra en el extremo amino terminal de OVH1, región que en las fosfatasas VH1 de Orthopoxvirus contiene a la hélice $\alpha 1$ involucrada en la dimerización por intercambio de dominios. La aparición de cisteínas amino terminales en varios géneros de Poxvirus podría sugerir un modo de estabilización adicional del dímero, involucrando la formación de un puente disulfuro entre los monómeros de proteína. Por lo tanto, un análisis del estado de oligomerización del doble mutante OVH1-C15S/C112S podría proporcionar datos de interés sobre el rol de este residuo para la estabilización de la dimerización.

Finalmente, para estudiar el rol del extremo amino terminal en la dimerización de OVH1, se generaron mutantes de delección de los primeros 20 y 21 aminoácidos, OVH1- $\Delta 20$ Nt y OVH1- $\Delta 21$ Nt. A continuación, se describen los resultados obtenidos durante el clonado y obtención de los mutantes descritos, así como la producción de las proteínas recombinantes, respectivas.

a. Clonado de OVH1 y generación de mutantes

El producto de amplificación por PCR de la fosfatasa OVH1, fue clonado en el vector de expresión pET28a (+). En la Figura 13 se muestran los productos de amplificación obtenidos y el resultado del clonado. El plásmido con la secuencia confirmada, fue utilizado como molde para obtener al mutantes OVH1-C112S mediante mutagénesis sitio dirigida. Este último fue utilizado como molde para obtener el mutante doble OVH1-C15S/C112S, en una nueva mutagénesis.

Para el mutante de delección de 20 aminoácidos OVH1- $\Delta 20$ Nt, se utilizó como molde el plásmido pET28a (+)-OVH1 salvaje y se amplificó la secuencia codificante de la fosfatasa a partir del codón número 21. En la Figura 13 se evidencia la diferencia de tamaño entre el producto de amplificación de la secuencia salvaje y este mutante de delección. Para el resto del clonado se procedió de forma análoga al clonado de la fosfatasa salvaje. El mutante de delección de 21 aminoácidos OVH1- $\Delta 21$ Nt con la fusión a MBP fue clonado en el vector pT7-MBP-GFP mediante *RF-Cloning*. Los plásmidos resultantes reemplazaron la secuencia codificante para la GFP por la secuencia de la fosfatasa OVH1- $\Delta 21$ Nt fusionada a MBP. Se espera que la fusión con MBP mejore la solubilidad del mutante de delección cuando es expresado en *E. coli*.

Todas las construcciones generadas fueron confirmadas mediante secuenciación de ADN (Anexo C).

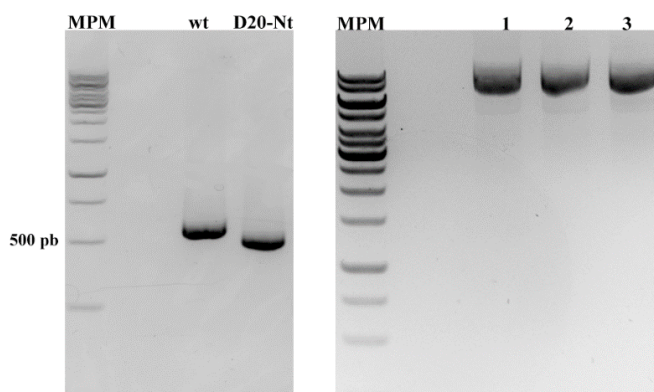


Figura 13. Amplificación por PCR y clonado de OVH1

Se muestran dos geles de agarosa al 1%. A la izquierda, se observan los productos de amplificación por PCR de la fosfatasa salvaje (wt) y la fosfatasa con la delección de los primeros 20 aminoácidos (OVH1- Δ 20Nt). A la derecha, se muestran los productos del clonado de la fosfatasa salvaje en pET28a(+) (carril 1), el mutante de delección (carril 2) y el plásmido obtenido luego de la mutagénesis para generar el mutante C112S (carril 3).

b. OVH1 salvaje y sus mutantes puntuales se expresan de forma soluble, mientras que los mutantes de delección generan agregados solubles e insolubles

Para la optimización de la expresión de OVH1-salvaje en *E. coli* BL21 (DE3), se utilizaron diferentes medios de cultivo (ZYM 5052, LB, 2YT, TB), y se indujo la expresión de la proteína dos temperaturas (16°C y 20°C). La proteína se obtuvo tanto en la fracción soluble como en la fracción insoluble en todas las condiciones. Al expresar a 16°C, se observó un incremento la cantidad de proteína en la fracción soluble, en consecuencia, se seleccionó esta temperatura para los futuros ensayos. Una desventaja de la expresión a baja temperatura es que el crecimiento del cultivo se vuelve más lento. Sin embargo, la pre-incubación del cultivo a 37°C durante varias horas (hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.6-0.8), permite un crecimiento inicial más acelerado, lo que posibilita que con 24hs de cultivo adicionales a 16°C se alcance una buena expresión de la proteína. En cuanto al medio de cultivo, se seleccionó el medio auto inductor ZYM 5052 por varias razones. En primer lugar, este medio tiene la ventaja de que permite la obtención de cultivos de alta densidad óptica, pudiendo llegar a valores de DO_{600nm} de hasta 20, lo que maximiza la cantidad de células obtenidas por mL de medio utilizado, y como resultado, permite obtener más cantidad de proteína. Adicionalmente, al ser un medio auto inductor, no requiere la adición de IPTG, ya que la expresión de la proteína se induce cuando comienza a consumirse la lactosa del medio.

El protocolo de expresión de la fosfatasa salvaje fue efectivo también para expresar los mutantes puntuales. En la Figura 14 se muestra la expresión de la proteína en las condiciones optimizadas.

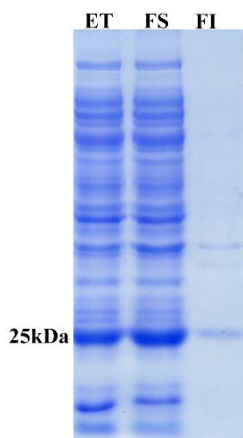


Figura 14. Expresión de OVH1-salvaje en medio ZYM 5052

La fosfatasa se observa presente en la banda principal de 25 kDa, tanto en el extracto total (ET), en la fracción soluble (FS) y en poca cantidad en la fracción insoluble (FI) en las condiciones de expresión optimizadas.

En cuanto a los mutantes de delección, en una primera instancia, se intentó expresar el mutante OVH1- Δ 20Nt clonado en pET28a (+) sin proteína de fusión, pero la proteína se expresó de forma insoluble en las diferentes condiciones ensayadas. Para intentar obtener la proteína en forma soluble, se expresó el mutante OVH1- Δ 21Nt con la fusión a MBP, clonado en el

vector pT7-MBP-GFP. La proteína de fusión se sobre expresó de forma soluble tanto en medio ZYM 5052 como en TB induciendo con 1mM de IPTG, ambos a 16°C. Sin embargo, al momento de purificar esta proteína, no se pudo lograr la unión de la misma a la matriz da la IMAC. Esto puede ser debido a que la proteína de fusión se encuentra formando agregados solubles. Ya se ha reportado para otras proteínas, como la proteína E6 del virus del papiloma humano, que cuando se intenta expresarla sin fusión, la proteína aparece en la fracción insoluble formando cuerpos de inclusión. Sin embargo, cuando se utiliza la fusión con MBP, la proteína pasa a estar en la fracción soluble, pero formando agregados (61).

Lo que podría estar ocurriendo es que la proteína de fusión se encuentre en la fracción soluble debido a que la MBP se encuentra plegada de forma correcta. Sin embargo, el dominio correspondiente al mutante de delección se encontraría mal plegado, promoviendo la formación de agregados. Estos agregados impedirían la interacción eficiente de la proteína con la matriz de afinidad, imposibilitando su purificación. En la Figura 15, se muestra el perfil de purificación de la proteína con y sin fusión. Debido al bajo rendimiento obtenido en los primeros pasos de purificación, no se continuó con la optimización del método de purificación. Sin embargo, el hecho de que la delección de los primeros 20-21 aminoácidos de la proteína genere una proteína con problemas de plegamiento, nos brinda información indirecta sobre la importancia de esta región para la estabilidad de la proteína.

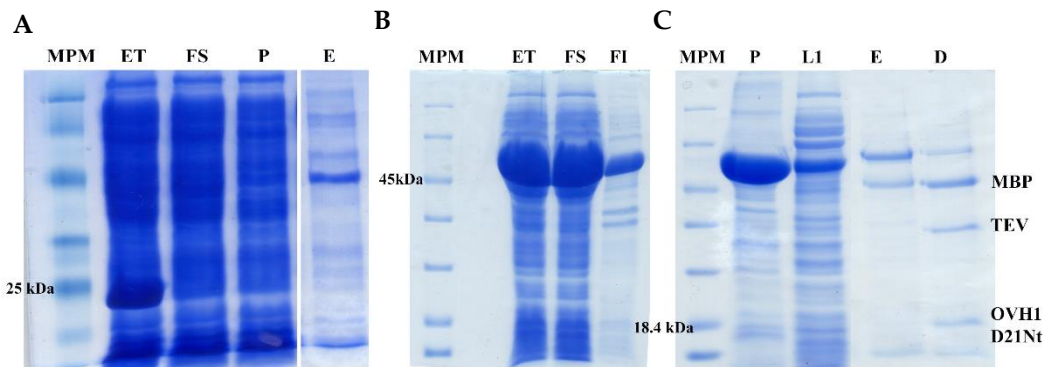


Figura 15. Expresión y purificación de mutantes de delección

A. Se muestra un gel SDS-PAGE al 12%, con la expresión del mutante de delección sin fusión a MBP. En el extracto total (ET), se observa una banda principal por debajo de los 25 kDa, que corresponde a la fosfatasa. Sin embargo, en la fracción soluble (FS) ya deja de ser notoria dicha banda, así como en el resto de los pasos de purificación (P, percolado de la IMAC; E, elución de la IMAC).

B. Se observa la sobre expresión de OVH1- Δ 21Nt fusionada a MBP, en el extracto total (ET) y en la fracción soluble (FS), con muy poca proteína en la fracción insoluble (FI).

C. Se muestra un gel de poliacrilamida donde se migraron muestras de diferentes pasos de purificación por IMAC de OVH1- Δ 21Nt fusionada a MBP. En el percolado (P) se observa la mayor parte de la proteína recombinante, en el lavado 1 (L1) se pierde aún más proteína. La proteína que logra unirse a la matriz se observa en la elución (E), y representa una proporción muy pequeña de la proteína inicial. Luego de la digestión con la proteasa TEV_{SH}, se libera a la proteína de fusión, que puede observarse a 45 kDa, y el mutante de delección, que aparece como una banda tenue de 18 kDa.

c. OVH1 salvaje y sus mutantes puntuales fueron purificados con alto rendimiento

Utilizando el protocolo de expresión optimizado descrito en el punto anterior, se procedió a purificar la fosfatasa OVH1 salvaje y los mutantes puntuales por cromatografía de afinidad, seguida de diálisis y remoción del His-Tag, para terminar con un último paso de purificación mediante cromatografía de exclusión molecular. En la Figura 16 se visualizan geles de poliacrilamida donde se observa el perfil de proteínas de los diferentes pasos de expresión y purificación. En el paso final de purificación, se observa una banda principal de aproximadamente 20 kDa, que corresponde a la fosfatasa. El rendimiento final de proteína purificada fue de 60 mg de proteína por litro de cultivo, o 3.15 mg por gramo de peso húmedo de células. Los mutantes C112S y C15S/C112S presentaron un rendimiento del mismo orden.

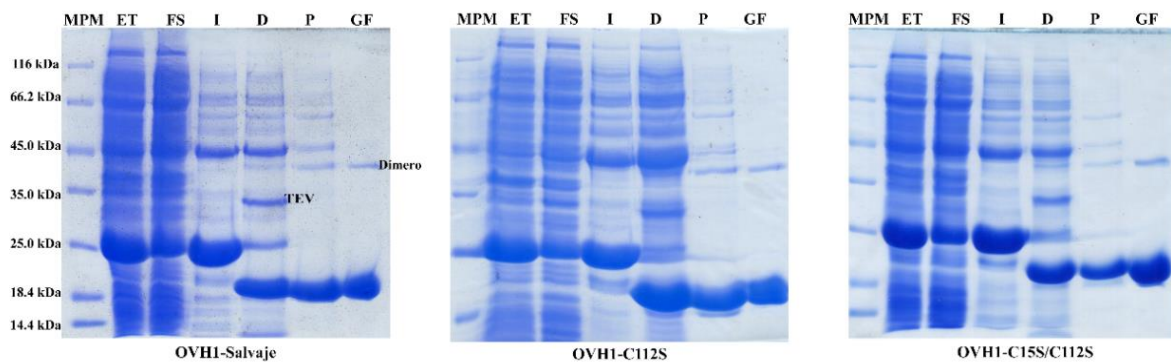


Figura 16. Purificación de OVH1-salvaje y mutantes C112S y C15S/C112S

Se muestran tres geles de poliacrilamida al 12%, donde se migraron muestras correspondientes a los diferentes pasos de purificación de la fosfatasa salvaje y los mutantes. En todos los casos se sembró el marcador de peso molecular (MPM), el extracto total (ET), la fracción soluble (FS) el pool de eluciones de la cromatografía de afinidad (IMAC, I), el resultado de la digestión con la proteasa TEV_{SH} (D), el percolado de la IMAC post digestión enriquecido en la proteína digerida (P) y el producto de la cromatografía de exclusión molecular (GF). La banda principal de 25 kDa corresponde a la fosfatasa con el His-Tag, la cual, luego de la digestión pasa a ser de 20 kDa. En la imagen se resalta la banda correspondiente a la proteasa TEV_{SH}, la cual aparece durante la digestión; y se remarca la banda a 40 kDa correspondiente al dímero de la fosfatasa.

d. OVH1 salvaje y sus mutantes puntuales son dímeros en solución

Durante el último paso de purificación por cromatografía de exclusión molecular se pudo determinar la masa nativa de OVH1-salvaje, OVH1-C112S y OVH1-C15S/C112S. En todos los cromatogramas se observó un pico principal, que se obtiene aproximadamente a los 84 mL, y contiene a la fosfatasa; y sobre el final de la cromatografía una serie de picos secundarios, que corresponden a restos de imidazol inyectados junto con la proteína (Figura 17). El pico de elución de la proteína OVH1-salvaje fue a los 83.4 mL, equivalente a una masa nativa de 38.9 kDa, el de OVH1-C112S fue a 84.0 mL, correspondiente a 36.3 kDa, y el del mutante doble C15S/C112S fue a 84.1 mL, lo que da una masa molecular calculada de 36.2 kDa. Estos resultados sugieren que tanto OVH1-salvaje como los mutantes puntuales se encontrarían formando dímeros.

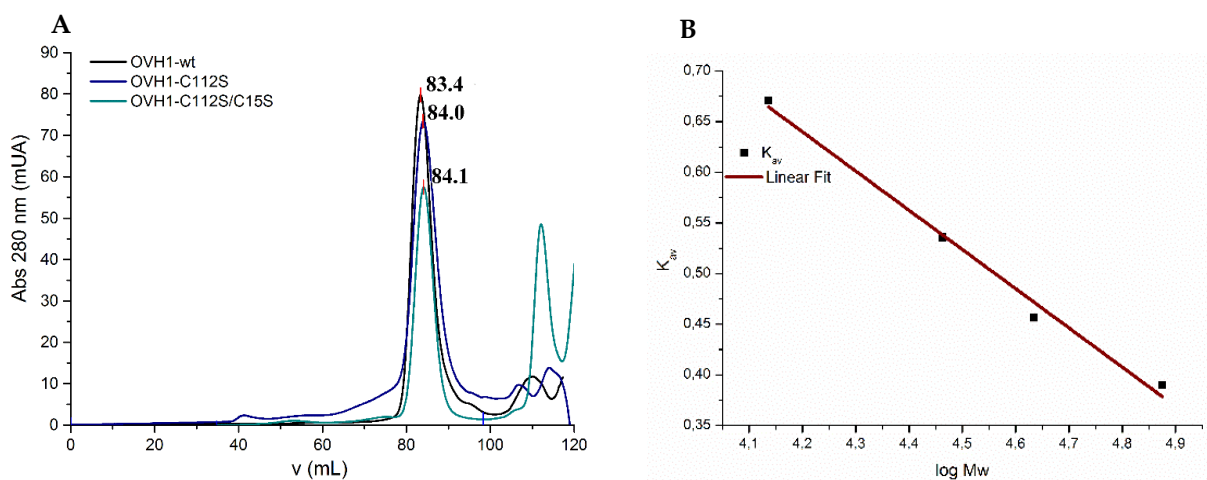


Figura 17. Cromatografía de exclusión molecular preparativa.

A. Se muestra el gráfico correspondiente al cromatograma de elución de las tres proteínas analizadas, indicando el pico principal que contiene a la fosfatasa OVH1-salvaje, OVH1-C112S y OVH1-C15S/C112S. Los picos minoritarios que se observan a la derecha corresponden a restos de imidazol presente en la muestra inyectada.

Para la purificación por exclusión molecular se inyectaron hasta 4 mL de proteína a 5 -10 mg/mL.

B. Se muestra la calibración de la columna Superdex 16/60, realizada previamente en el laboratorio utilizando estándares de peso molecular conocido.

La ecuación del ajuste es $K_{av} = -0.3872(\log MW) + 2.2662$. Para calcular los pesos moleculares, se calcula el valor de K_{av} ($(V_e - V_0) / (V_t - V_0)$) a partir del volumen total de la columna (120 mL, el volumen muerto obtenido utilizando azul dextrano (48.07 mL) y el volumen de elución.

Para profundizar en el análisis del estado de oligomerización de OVH1 y evaluarlo a diferentes concentraciones de proteína, se determinó el coeficiente de sedimentación de OVH1-salvaje y del mutante inactivo OVH1-C112S. Las concentraciones analizadas fueron 175, 50 y 17.5 μM . Para OVH1-salvaje, los respectivos coeficientes obtenidos fueron 3.058, 3.046 y 3.025 S. Estos valores de $S_{w/20}$ se corresponden con la masa molecular nativa de un dímero, 40.9, 40.3 y 37.3 kDa. No se observaron otros picos que pudieran corresponder a estados de agregación mayores o al monómero. Para el caso del mutante OVH1-C112S, los valores de $S_{w/20}$ obtenidos a partir del pico principal fueron 3.149, 3.238 y 3.096 S. Estos valores corresponden también a la masa molecular nativa de un dímero, de 45.1, 38.3 y 39.3 kDa respectivamente. Para este mutante, a la concentración más alta (175 μM), además del pico principal se observó un pico adicional minoritario correspondiente a un mayor coeficiente de sedimentación, de una masa de 77 kDa. Este valor es cercano al valor de un agregado de 4 monómeros, que sería de alrededor de 80 kDa. En la Figura 18 se muestran los gráficos de $c(s)$ en función de S obtenidos para ambas proteínas, en cada una de las condiciones de concentración ensayadas. El mutante doble OVH1-C112S/C15S no pudo ser analizado mediante esta metodología, debido que al momento de realizar estos ensayos aun no se disponía de la proteína recombinante.

Los resultados tanto de la cromatografía de exclusión molecular como de los análisis de velocidad de sedimentación, permiten concluir que OVH1-salvaje y OVH1-C112S son dímeros en solución en el rango de concentraciones analizado. El hecho de que el mutante C15S/C112S también sea un dímero, implica que la cisteína 15 de la región amino terminal de la proteína, en el caso de estar formando un puente disulfuro con el otro monómero, no sería esencial para la

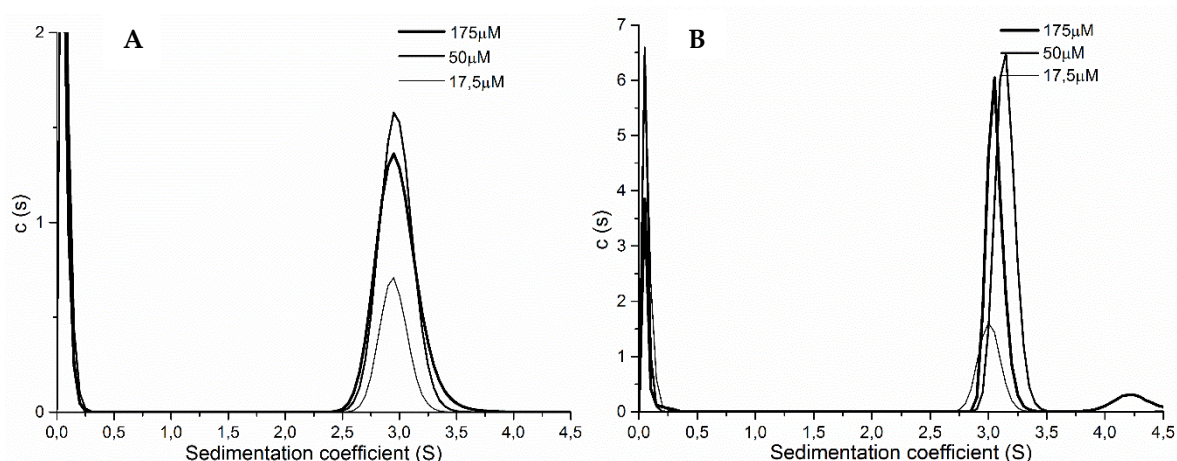


Figura 18. Velocidad de sedimentación.

Se muestran los gráficos de $c(s)$ en función de S para OVH1-salvaje (A) y OVH1-C112S (B).

Se destaca la presencia de un pico principal correspondiente al dímero de la proteína, y para el caso del mutante, dos picos minoritarios representando mayores estados de agregación.

formación del dímero de la fosfatasa. Esto podría deberse a que no existe tal puente disulfuro o a que en ausencia de dicha cisteína existen mecanismos alternativos para estabilizar el dímero de la proteína. Es posible que la presencia de una interacción por intercambio de dominios, como se ha visto en la estructura de fosfatasas de Orthopoxvirus, rica en interacciones hidrofóbicas, sea más que suficiente para generar un dímero estable de OVH1.

d. Evaluación de la presencia de un puente disulfuro intermolecular en el dímero de OVH1

Como ya se ha mencionado antes, el peso molecular de la fosfatasa OVH1 es de unos 20 kDa. Sin embargo, como puede observarse en la Figura 16, en los geles de poliacrilamida siempre se observa una banda adicional minoritaria de unos 40 kDa. Para investigar la identidad de ambas bandas, se mandaron a analizar por espectrometría de masas (MALDI-TOF). Los resultados permitieron identificarlas como la fosfatasa en tirosina del virus Orf (Anexo C). Este resultado nos llevó a considerar la posibilidad de que efectivamente un puente disulfuro se encuentre involucrado en la formación del dímero de la fosfatasa. Este puente disulfuro no se estaría logrando romper a pesar de estar trabajando en condiciones reductoras (5 mM del agente reductor DTT en el buffer de almacenamiento de la proteína, y 100 mM de DTT en el buffer de muestra de SDS-PAGE).

Para evaluar en mayor detalle la posibilidad de la existencia de un puente disulfuro entre los monómeros de OVH1 en solución, se realizó un análisis por SDS-PAGE de la proteína, incubada en presencia o ausencia de DTT. En estos ensayos, inicialmente se eliminó el DTT del buffer de la proteína mediante un desalado, y luego se incubó la misma con buffer de carga con y sin DTT. En la Figura 19 se muestra el perfil SDS-PAGE obtenido al separar dichas muestras, observándose como en ausencia de DTT la mayor parte de la proteína migra como un dímero de 40 kDa, mientras que al agregar el agente reductor, la mayoría pasa a migrar como un

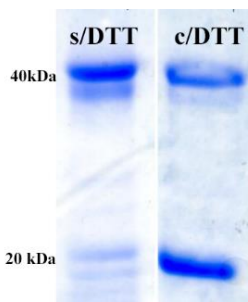


Figura 19. Migración de OVH1 en condiciones reductoras y no reductoras

Se observa el patrón de migración en SDS-PAGE de la proteína OVH1-salvaje en ausencia y en presencia de 100 mM de DTT. Frente a la adición de este agente reductor, la proteína pasa a migrar en su mayoría como un monómero.

monómero de 20 kDa. Estos resultados apoyarían la hipótesis de que un puente disulfuro estaría contribuyendo a la estabilización de la unión de los monómeros de OVH1.

Para seguir evaluando esta posibilidad, se realizó la titulación de tioles con DTPy, en condiciones no reductoras. La proteína OVH1 contiene en su secuencia 4 residuos de cisteína (Cys15, Cys57, Cys112, Cys177). Si todas estuvieran reducidas, ninguna podría estar formando un puente disulfuro. Sin embargo, si alguno de los residuos de cisteína estuviera involucrado en la formación de un puente disulfuro con una cisteína de otra proteína, en la titulación se obtendría el valor de 3 cisteínas reducidas por molécula, o menos. La titulación fue realizada en presencia de 2% de SDS, a fin de lograr que todos los residuos de cisteína queden accesibles para reaccionar con el DTPy. Los residuos de cisteína reducidos, reaccionan con el DTPy en una relación 1:1, dando el producto 4-tiopiridona, que puede ser detectado mediante la medición de absorbancia a 324 nm. Una concentración de 2.5 μM de OVH1 salvaje, generó aproximadamente 5.0 μM de 4-tiopiridona, lo que indica que solo 2 de las 4 cisteínas estarían reducidas. Esto sugiere que aquellas que no se encuentran reducidas podrían estar formando un puente disulfuro.

Otra aproximación para la identificación de puentes disulfuro, fue el análisis por espectrometría de masas las bandas correspondientes al dímero, obtenidas en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras y no reductoras para buscar posibles péptidos que contengan un puente disulfuro. En ambas bandas, se detectó la presencia de un puente disulfuro entre la cisteína 177 y la cisteína 112 de la proteína. Sin embargo, este puente disulfuro posiblemente sea artefactual, ya que involucra a la cisteína catalítica de la fosfatasa (Cys 112) (Anexo C). Es probable entonces que se puedan formar varios tipos de puentes disulfuro inespecíficos una vez que la proteína se encuentra desnaturalizada, en los momentos previos a la migración en el gel, o luego de la digestión con tripsina. En esta línea, la observación de una banda de 40 kDa en los geles correspondientes al mutante C15S/C112S (Figura 16), indica que es posible la formación de puentes disulfuro solo en presencia de las cisteínas 57 y 177, pudiendo estos ser artefactuales o no. No obstante, la observación de un puente disulfuro artefactual no quita la posibilidad de que en efecto pueda existir un puente disulfuro estabilizando la estructura cuaternaria de esta proteína, ya que no todos los péptidos son detectables por espectrometría de masa. Por ejemplo, los péptidos que contienen a la cisteína 15 de OVH1 no pudieron ser detectados en el experimento, debido a que el péptido generado en la digestión con tripsina previo al análisis es demasiado pequeño.

f. OVH1 presenta actividad fosfatasa con el sustrato artificial pNPP.

Para estudiar la actividad fosfatasa de OVH1, se realizaron análisis cinéticos con el sustrato artificial pNPP. Se realizaron ensayos de desfosforilación a 20, 30 y 37°C. La temperatura a la cual se registró la mayor actividad fue a 37°C. La fosfatasa salvaje logró desfosforilar el pNPP, mientras que el mutante OVH1-C112S, como era de esperarse, fue incapaz de catalizar esta reacción. En la Figura 20a, se observa a modo de ejemplo, un gráfico representando la cantidad de pNP generada en la reacción en función del tiempo, correspondiente a una reacción con 0.4 μM (0.009 mg/mL) de OVH1-salvaje o OVH1-C112S en presencia de 20 mM de pNPP. La fosfatasa salvaje presentó una cinética de Michaelis-Menten, con una K_m de 2.6 mM, una $V_{m\acute{a}x}$ de 0.2295 $\mu\text{mol pNP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína y una k_{cat} de 0.08 s^{-1} .

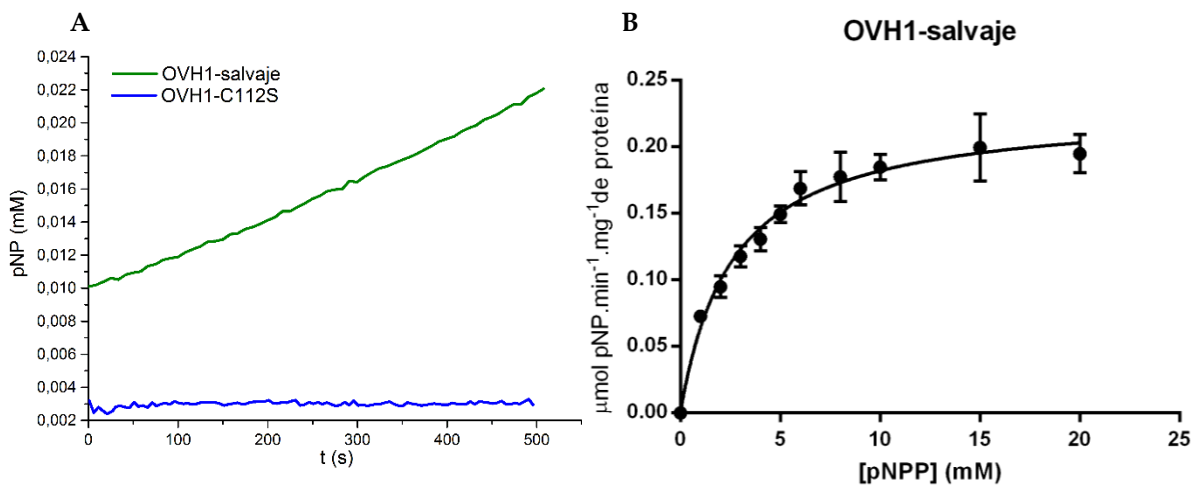


Figura 20. Actividad fosfatasa con pNPP.

A. Se muestra un gráfico de concentración de pNP en función del tiempo para OVH1-salvaje y OVH1-C112S representativo de los ensayos de actividad realizados. La proteína salvaje presenta actividad, mientras que el mutante C112S es inactivo.

B. Se presenta el gráfico de Michaelis-Menten obtenido para la fosfatasa salvaje. Las barras de error indican el desvío estándar obtenido a partir de dos experimentos completamente independientes, realizados con el mismo lote de enzima.

En la Figura 20b se presenta el gráfico de Michaelis Menten obtenido para OVH1-salvaje. Los parámetros cinéticos fueron obtenidos mediante el ajuste de los datos a una hipérbola rectangular. El valor de los parámetros cinéticos con pNPP obtenido para OVH1 sugiere que esta enzima presenta una menor afinidad por el sustrato y un menor número de recambio en comparación con valores reportados para la proteína VH1 del virus Vaccinia ($K_m = 0.293$ mM, $k_{cat} = 0.56$ s^{-1}) (62). Por otro lado, se han reportado valores aún más altos de K_m el caso de la fosfatasa VHR, si bien esta presenta un valor mucho más alto de número de recambio ($K_m = 7.99$ mM, $k_{cat} = 3.65$ s^{-1}) (63). De todas formas, las condiciones de los ensayos cinéticos, si bien son similares, no son del todo equivalentes, lo que relativiza las conclusiones que se puedan obtener a partir de esta comparación. Adicionalmente, el pNPP no es el sustrato biológico de ninguna de estas fosfatasas, por tanto, una baja eficacia en su desfosforilación no es indicativo de una baja eficacia en la desfosforilación de sus potenciales sustratos fisiológicos en el contexto celular.

3. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA CRISTALOGRÁFICA DE OVH1

a. Cristalización y Difracción de rayos X

Para intentar obtener cristales de OVH1, se realizó un *screening* de 500 condiciones con la proteína salvaje y con el mutante C112S. A los tres días de comenzado el mismo, se obtuvieron cristales de la fosfatasa mutante C112S. Sin embargo, para la proteína salvaje aún no se han obtenido cristales.

Las condiciones de cristalización para OVH1-C112S fueron NH_4SO_4 0,2 M, acetato de sodio 100 mM pH 4.6, PEG MME 2K 30% y 10 mg/mL de proteína. Los cristales presentaron una morfología similar a la bipiramidal. La fotografía de los cristales y del patrón de difracción se muestra en la Figura 21. La celda unidad presentó un grupo de espacio del tipo 2_1 , con dimensiones $a = 49.6 \text{ \AA}$, $b = 63.5 \text{ \AA}$, $c = 55.4 \text{ \AA}$ y ángulos $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 97.1^\circ$ y $\gamma = 90^\circ$.

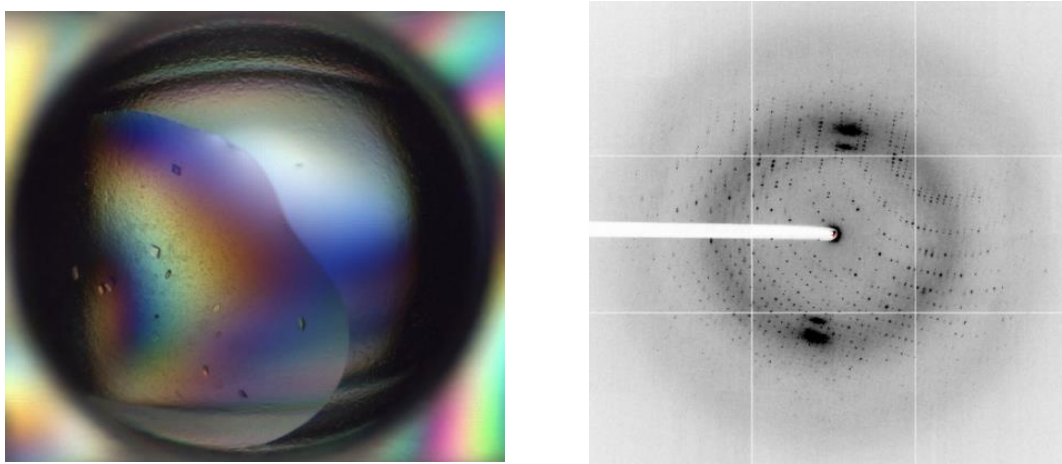


Figura 21. Cristalización y Difracción de Rayos X

A la izquierda se observan los cristales obtenidos de la proteína OVH1-C112S, y la derecha el patrón de difracción generado a partir de los rayos X del sincrotrón Soleil.

b. Resolución y análisis de la estructura de OVH1-C112S

A partir del patrón de difracción de rayos X obtenido de los cristales de la proteína OVH1-C112S, se obtuvieron datos de densidad electrónica que permitieron la determinación de la estructura cristalográfica por reemplazamiento molecular, utilizando la estructura de VH1 del virus Vaccinia (3CM3) como modelo de búsqueda. Se observaron dos moléculas de proteína por unidad asimétrica, y se realizó un refinamiento de la estructura con Refmac y Buster hasta un valor de $R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ de 19.81/23.00, a una resolución final de 1.89 \AA . El índice de Ramachandran para el modelo final fue de 97.06% de aminoácidos en regiones preferidas y 2.94% en regiones permitidas, sin presencia de *outliers*. Se logró determinar la ubicación de 173 residuos de aminoácido de cada monómero, de un total de 181, desde el glutamato 6 hasta el aspartato 178. En la Tabla 1 se muestran los estadísticos de la colección de datos y del refinamiento.

Tabla 1. Estadísticos de Colección de datos y Refinamiento

Colección de datos		Refinamiento	
Grupo de espacio:	P2 ₁	N° de reflexiones	26404
Celda unidad:	a, b, c (Å): 49.6, 63.5, 55.4 α , β , γ (°): 90.0, 97.1, 90.0	R _{work} /R _{free}	19.81/23.00
Resolución (Å):	54.94 – 1.89	Resolución (Å):	17.73-1.89
Complejidad (%):	96.31	Átomos de proteína:	2708
Redundancia (%):	69.8	Átomos de ligando (PO ₄):	168
R _{sym} – Merge:	0.141	Átomos de H ₂ O:	158
1/ σ :	1.89	Wilson plot:	30.56
		Desviaciones rms:	largo de enlace: 0.01 ángulos de enlace: 1.05

En la estructura tridimensional de OVH1, las dos moléculas que componen la unidad asimétrica se encuentran formando un dímero que no involucra un intercambio de dominios, como se puede observar en la Figura 22a. Con diferentes colores se resaltan las regiones de la estructura que representan motivos característicos de las PTPs, así como la hélice α 1 y la posición de las inserciones. Las dimensiones del dímero son 89.2 Å de ancho por 36.2 Å de largo y 33.7 Å de profundidad, aproximadamente. Cada monómero de proteína presenta una serie de hojas β rodeadas de hélices α , (6 hélices α y 5 hojas β), componiéndose de un 40% de hélices α y un 10% de hojas β (Figura 22b-c).

En la Figura 23 se observa la estructura primaria y secundaria de la cadena A de la fosfatasa OVH1-C112S, en un alineamiento con estructuras altamente relacionadas generado con el programa ENDSCRIPT (58). Entre las estructuras recuperadas en el *BLAST*, se encuentra la fosfatasa VH1 del virus Vaccinia (2Q05 y 2RF6), la fosfatasa del virus de la viruela (2P4D), y la fosfatasa humana de doble especificidad DUSP9 (2HXP). Se puede observar la conservación a nivel de estructura secundaria y a nivel de secuencia aminoacídica. Los posibles contactos de la cadena A de OVH1 con la cadena B se señalan en la parte inferior del alineamiento como una letra "B". Se puede ver como las hélices que estarían involucradas en estos son la hélice α 1 y α 5.

El área de la interface de dimerización para OVH1-C112S fue calculada utilizando el servidor PISA (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/cgi-bin/piserver) y es de unos 678 Å², sensiblemente menor al área observada para fosfatasas con intercambio de dominios (en Vaccinia 978 Å², Variola major, 1014 Å²). En la estructura de OVH1, la dimerización está mediada por un puente disulfuro entre los residuos de cisteína 15 de cada monómero, el cual se visualizó como una continuidad en la densidad electrónica de ambos monómeros en esta posición. En la Figura 24a se muestra la posición de las cuatro cisteínas de OVH1 en la estructura tridimensional. La cisteína 15 se encuentra en la hélice α 1, que se observa en detalle y color anaranjado en la Figura 24b. En la Figura 23 también se señala el puente disulfuro con un número 1 de color verde en la posición de este residuo. Es importante destacar que el resto de

los residuos de cisteína de OVH1 (Cys57, Cys112 y Cys177) se encuentran en posiciones alejadas entre sí, y en algunos casos no muy expuestas (Cys57 y Cys112). Esto indica que el puente disulfuro observado en la espectrometría de masa entre la Cys112 y la Cys177 sería artefactual, lo cual se ve respaldado a su vez por el hecho de que OVH1-salvaje presenta actividad fosfatasa.

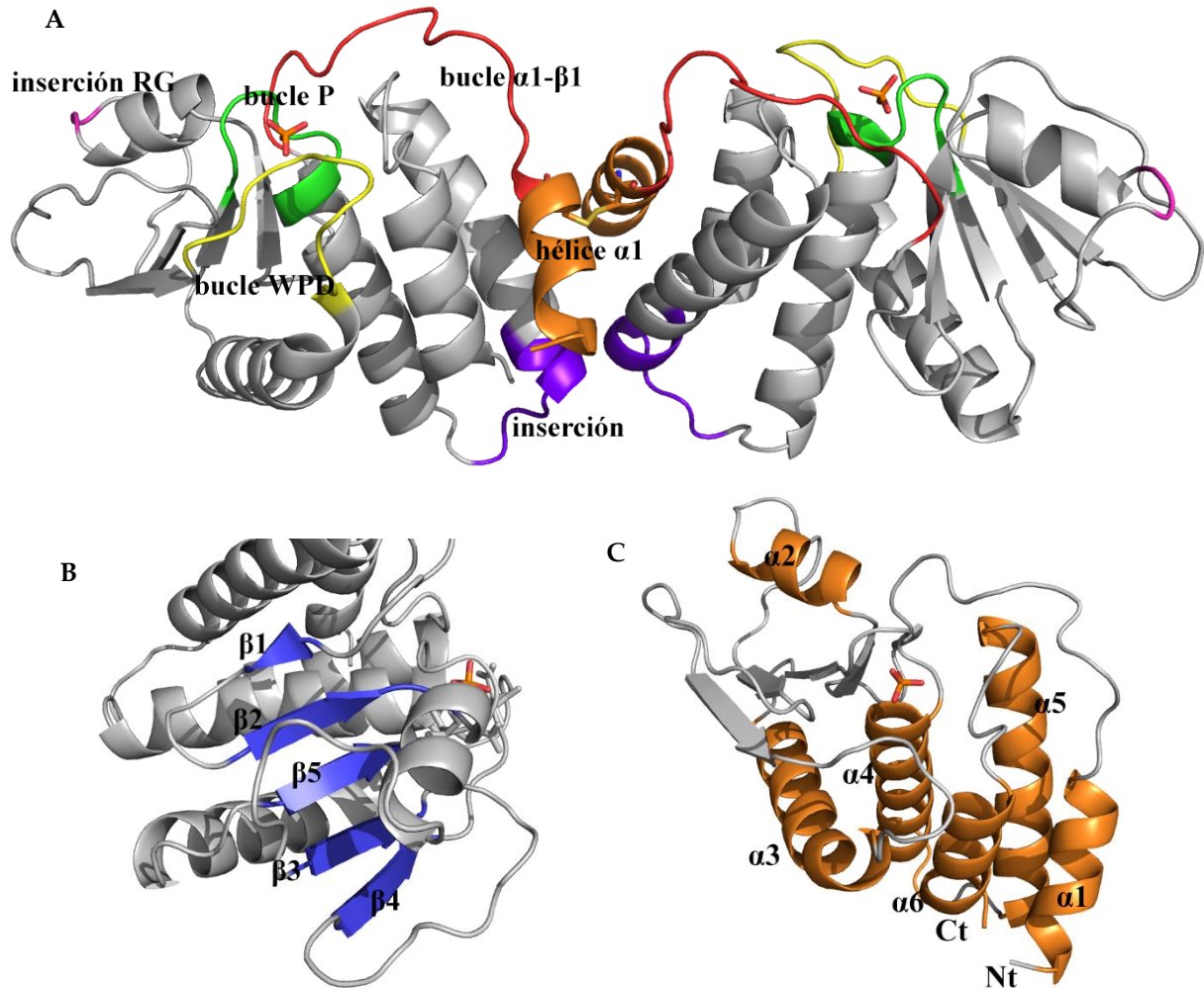


Figura 22. Estructura de OVH1

A. Se muestra la estructura general del dímico de la fosfatasa. Con diferentes colores se destacan las regiones de interés, como la hélice $\alpha 1$ (naranja), la inserción de 6 aminoácidos (violeta), la inserción dos aminoácidos "RG" (magenta), el bucle P (verde), el bucle WPD (amarillos) y el bucle $\alpha 1$ - $\beta 1$ (rojo).

B. Se detallan las hojas β presentes en la estructura de OVH1.

C. Se presentan las diferentes hélices α de la estructura de OVH1

En cuanto a los dímeros por puente disulfuro observados en los SDS-PAGE del mutante doble OVH1-C112S/C15S, estos también serían artefactuales, y se generarían luego de la desnaturalización de la proteína, ya que no parece posible la interacción de estas dos cisteínas para la formación de dímeros en la estructura tridimensional. Adicionalmente, la distancia que separa a todas las cisteínas dentro de un mismo monómero descarta la posibilidad de la aparición de puentes disulfuro intramoleculares. Estos resultados sugieren que el único puente

disulfuro con un posible rol en la estabilización de la estructura cuaternaria de OVH1 es el observado en la cristalografía.

En la estructura de OVH1-C112S se observaron interacciones adicionales que contribuyen a la estabilización del dímero, que involucran a residuos de las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 5$. Un ejemplo es la interacción hidrofóbica entre el residuo de Phe 144 en la hélice $\alpha 5$ de la cadena A, con los residuos Leu148 y Val145 en la misma hélice, pero en la cadena B (Figura 24c).

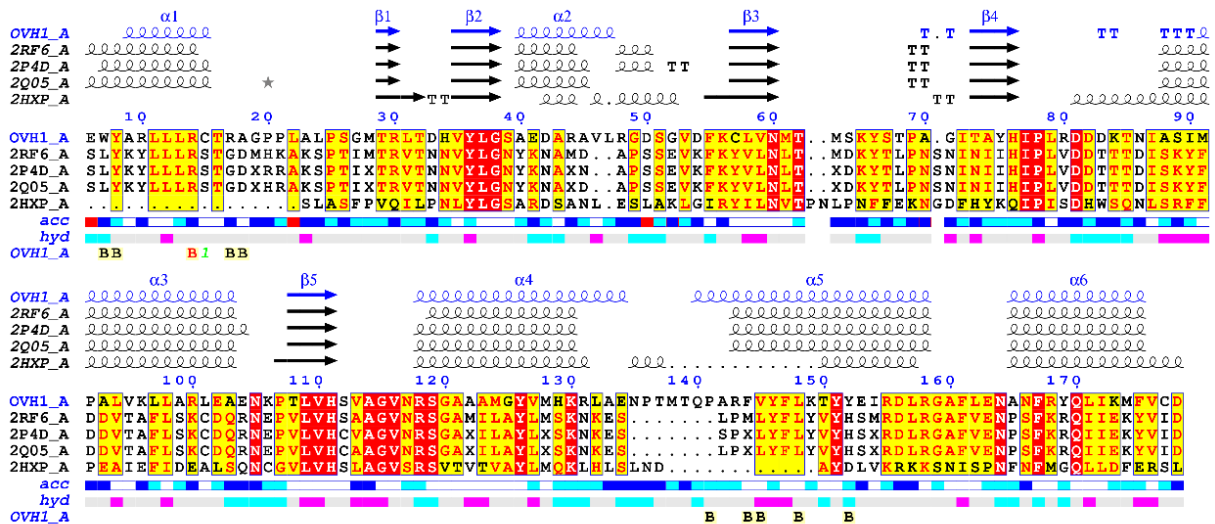


Figura 23. Estructura primaria y secundaria de OVH1-C112S

En azul se señala la estructura secundaria y primaria de OVH1-C112S. El nivel de accesibilidad al solvente de cada residuo de OVH1-C112S se muestra por debajo de la secuencia (acc), siendo blanco poco accesible, cian intermedio, azul accesible y rojo no calculado. El nivel de hidrofobicidad (hyd) se representa con colores, cian es hidrofílico, gris es intermedio, y rosado hidrofóbico. El puente disulfuro se señala con el número 1 de color verde. Los posibles contactos intermoleculares se representan con una B, de color rojo cuando la interacción es menor a 3.2 Å, y de color negro para interacciones en el rango de los 3.2-5.0 Å. Las hélices representan a hélices α y las flechas a hojas β . Los giros- α - y giros- β estrictos son marcados como TTT o TT, respectivamente.

En algunos casos, la falta de información sobre el posicionamiento de la cadena lateral de residuos de la hélice $\alpha 1$ de ambas cadenas imposibilitó la determinación de otras interacciones intermoleculares con seguridad.

Al no presentar intercambio de dominios, la estructura de OVH1 tiene un posicionamiento de la hélice $\alpha 1$ diferente al observado para las fosfatasa de los Orthopoxvirus. En OVH1, las hélices $\alpha 1$ de cada monómero se encuentran orientadas a 90° una de la otra, y de forma paralela a las hélices $\alpha 5$, $\alpha 6$ y $\alpha 4$ del mismo monómero. Este posicionamiento podría estar determinado en parte por la formación del puente disulfuro con el otro monómero. Asimismo, la presencia de interacciones hidrofóbicas intramoleculares entre las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 5$ podría ayudar a estabilizar esta conformación. Entre estas interacciones hidrofóbicas se destaca la interacción de la leucina 12 de la hélice $\alpha 1$ con los residuos hidrofóbicos de las hélices $\alpha 5$ (Phe 147), y $\alpha 6$ (Ile 171). Por otro lado, la presencia de tres prolinas (Pro20, Pro21 y Pro25) en el bucle $\alpha 1$ - $\beta 1$ podrían contribuir al posicionamiento de la hélice $\alpha 1$, ya que este tipo de aminoácido contribuye a los cambios de sentido de la cadena polipeptídica y genera cierta rigidez estructural (Figura 25).

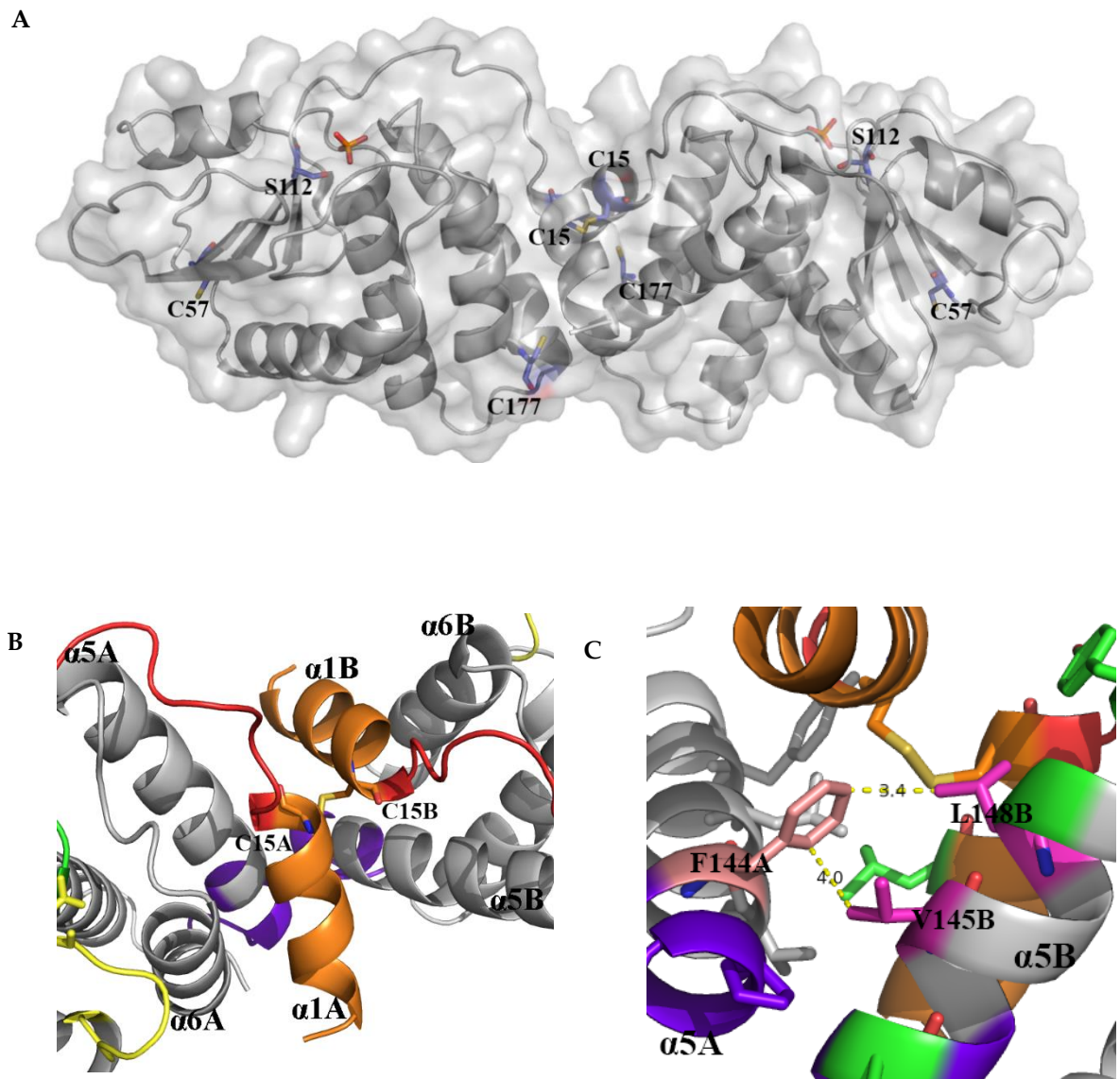


Figura 24. Cisteínas en OVH1 e interacciones que estabilizan la dimerización

A. Se muestra la distribución espacial de los cuatro residuos de cisteína de OVH1. En el caso de la cisteína C112S, esta es reemplazada por una serina en este mutante.

B. Se presenta un acercamiento al puente disulfuro entre los residuos de cisteína 15 de cada monómero, en las hélices $\alpha 1$.

C. Se visualiza una interacción hidrofóbica entre la hélice $\alpha 5$ de la cadena A, mediante la Phe144, y la hélice $\alpha 5$ de la cadena B, con la Leu148 y la Val145. Este tipo de interacciones podría proporcionar estabilidad adicional a la dimerización.

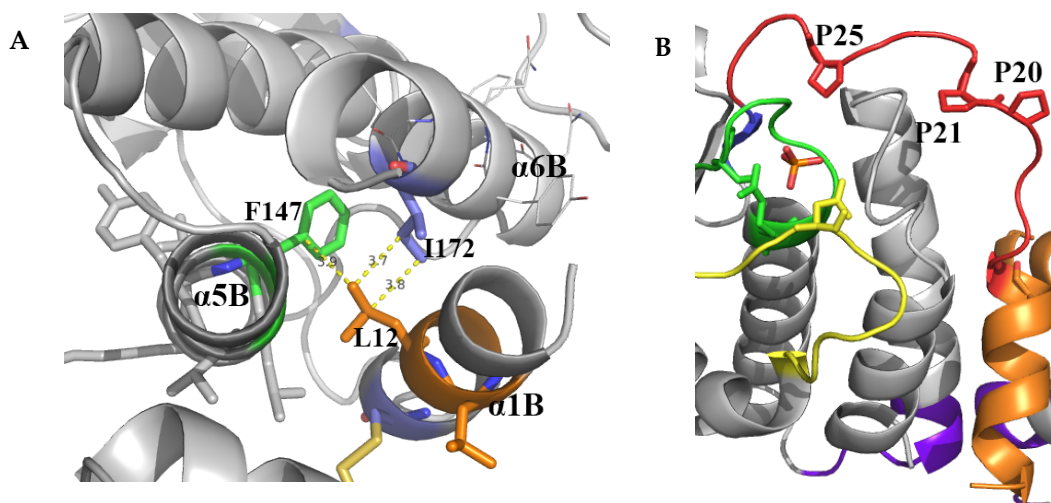


Figura 25. Estabilización la posición de la hélice $\alpha 1$ de OVH1

A. Se observa la proximidad del residuo L12 de la hélice $\alpha 1$, con residuos hidrofóbicos de las hélices $\alpha 5$ y $\alpha 6$ (F147 e I172). Estos podrían interactuar para estabilizar la posición de la hélice $\alpha 1$ observada en la estructura.
B. Se destacan las tres prolinas del bucle $\alpha 1$ - $\beta 1$ que también podrían jugar un rol en el posicionamiento de la hélice $\alpha 1$.

En la Figura 26 se muestra en violeta el detalle de los residuos pertenecientes a la inserción de 6 aminoácidos que presentan los Parapoxvirus. Esta inserción resulta en una extensión de la hélice $\alpha 5$ y del bucle $\alpha 4$ - $\alpha 5$. El residuo de glutamina de la inserción (Gln140) es el que se encontraría más cercano a la hélice $\alpha 1$, y podría ser candidato a presentar interacciones con algún aminoácido de esta cadena. Sin embargo, la densidad electrónica de los primeros residuos de la hélice $\alpha 1$ no es suficiente para determinar con seguridad la posición de las cadenas laterales de los residuos cercanos a Gln140, lo que nos impide proponer candidatos a interacciones. En cuanto a la pequeña inserción "Arg46Gly47", esta que se puede observar en la Figura 21a donde se puede apreciar su posición alejada de la región de dimerización y del sitio activo, al comienzo del bucle $\alpha 2$ - $\beta 3$.

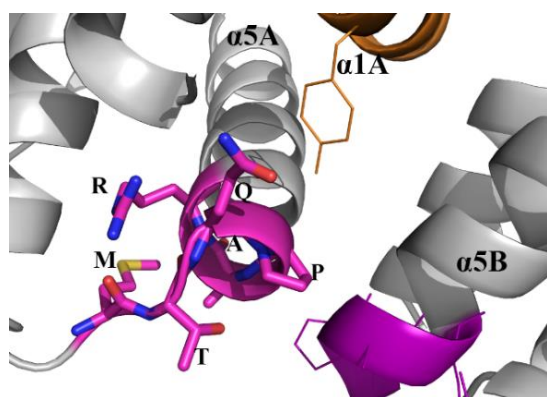


Figura 26. Inserción de 6 aminoácidos en OVH1

Se presenta el detalle del posicionamiento de los residuos de aminoácido que conforman la inserción característica de los Parapoxvirus (MTQPAR). El residuo de ácido glutámico (Q) se encuentra orientado hacia la hélice $\alpha 1$ del mismo monómero.

En la Figura 27, se muestra la representación de la estructura coloreada según el factor B. Cuanto mayor es este factor (color amarillo a rojo) la estructura presenta un mayor movimiento térmico,

lo que se puede relacionar con una mayor flexibilidad en la región, mientras que un valor menor (color celeste al azul), representa mayor rigidez y estabilidad. La hélice $\alpha 1$ de la cadena A presenta un factor B relativamente alto en comparación con el resto de la estructura al igual que cisteínas que forman el puente disulfuro. No se observa lo mismo para la hélice $\alpha 1$ de la cadena B. El hecho de que se observe esta flexibilidad podría indicar que este tipo de dimerización pueda no ser del todo estable. Es posible que esta proteína pueda formar un dímero mediante intercambio de dominios. La evidencia experimental de que el mutante en cisteína 15 también es dimérica, apoyaría la proposición de que ambos tipos de dimerización podrían ser posibles.

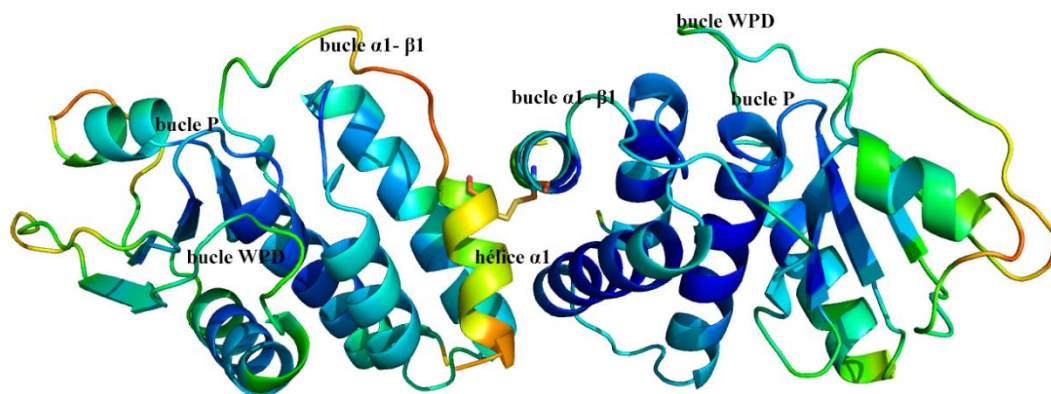


Figura 27. Factor B de la estructura de OVH1

Se muestra una representación de la estructura, con una coloración según factor B. El color azul indica un menor valor de factor B, mientras que el color amarillo y rojo, representa un valor mayor. Los valores elevados de factor B se relacionan con una mayor flexibilidad estructural.

En cuanto al sitio activo, en la Figura 22 se destaca en verde el bucle P, que contiene la secuencia característica del sitio activo y en amarillo el bucle WPD, que contiene al aspartato de la tríada catalítica. En la Figura 28a se resaltan los tres residuos que conforman la triada catalítica (Asp81, Arg118 y Cys112, que en este mutante es reemplazada por una serina). Junto con la densidad electrónica de la fosfatasa, se encontró densidad correspondiente a moléculas de fosfato localizadas en el sitio activo, mimetizando la posición del posible sustrato. Como en las condiciones de cristalización no se añadió fosfato, estas moléculas deberían haber sido incorporadas durante la expresión en *E. coli*. Las moléculas de fosfato de cada monómero se encuentran a 44.6 Å de distancia. La profundidad del bolsillo del sitio activo es de unos 6 Å, similar a lo observado para otras fosfatasas de doble especificidad como VHR y las VH1 de Orthopoxvirus. En la Figura 28b se muestra una representación de la densidad de cargas en la superficie de la proteína, generada con la herramienta APBS-tools en Pymol. Se destaca el color azul intenso del bolsillo del sitio activo, que determina una carga positiva, que favorece la unión de las moléculas de fosfato, cargadas negativamente.

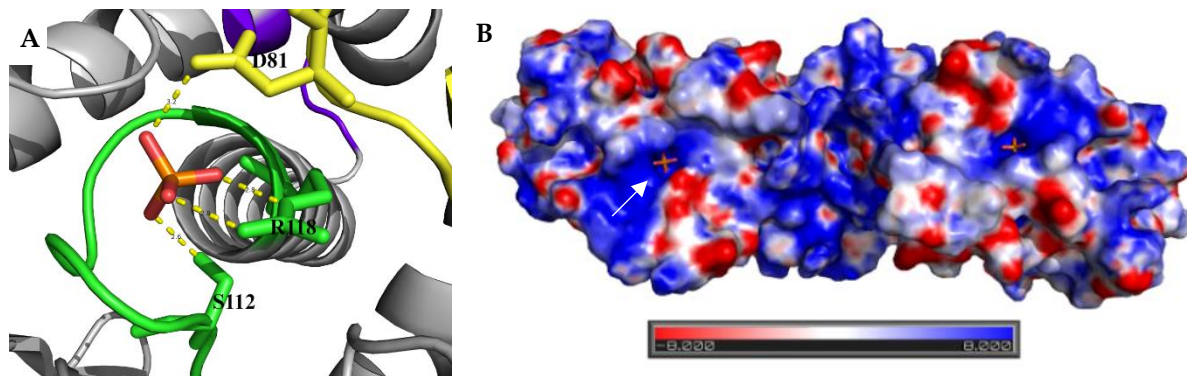


Figura 28. Sitio activo de OVH1

A. Se muestra un acercamiento al sitio activo de la fosfatasa, donde se puede apreciar la presencia de una molécula de fosfato interactuando con los residuos de la tríada catalítica. Las Cys112 es reemplazada por una Ser en este mutante.

B. Se presenta el perfil de distribución de cargas de la superficie del dímero de OVH1. Se destaca una zona de color azul intenso, de carga positiva, que aloja a la molécula de fosfato y conforma el bolsillo del sitio activo.

4. ANÁLISIS DE LA ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO DE OVH1

a. OVH1 es una fosfatasa de especificidad dual capaz de desfosforilar *in vitro* moléculas de fosfatidil inositol fosfato

Las fosfatasas codificadas por los Orthopoxvirus que han sido previamente caracterizadas, presentaron una especificidad de sustrato dual, desfosforilando residuos tanto de fosfotirosina como de fosfoserina/treonina. Para evaluar la especificidad dual de OVH1-salvaje, se realizaron ensayos de desfosforilación *in vitro*, utilizando sustratos proteicos fosforilados en fosfotirosina o en fosfotreonina. La reacción de desfosforilación se evidenció mediante la detección del fosfato liberado en la misma, utilizando el reactivo *Malachite Green*. Como sustrato fosforilado en tirosina, se utilizó la proteína recombinante PtpA-D126A de *M. tuberculosis*. Para inactivar completamente a PtpA-D126A y facilitar su interacción con la enzima OVH1-salvaje, esta fue desnaturalizada a 95°C durante 15 minutos antes de los ensayos de desfosforilación. Como sustrato fosforilado en treonina se utilizó un péptido sintético de 15 residuos de aminoácido, derivado de la proteína GarA de *M. tuberculosis*, que presenta una treonina fosforilada.

Los ensayos de desfosforilación se realizaron con 3 concentraciones diferentes de enzima, para observar si existía una dependencia de la concentración de enzima en las reacciones con los distintos sustratos. En todos los casos se realizaron controles sin enzima y sin sustrato, para verificar que lo observado es efectivamente producto de la reacción de desfosforilación por OVH1.

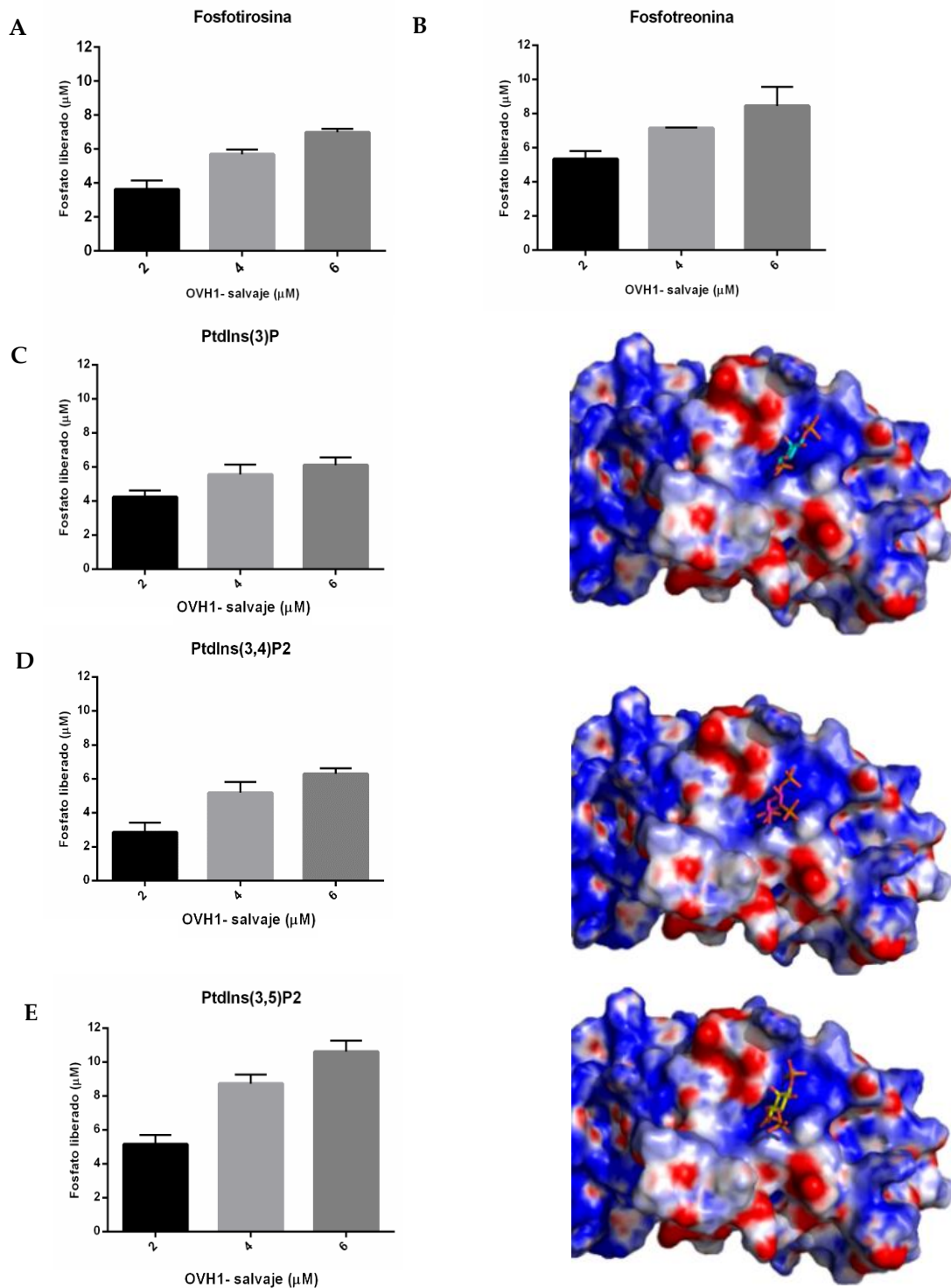


Figura 29. Especificidad de sustrato

Se presentan los gráficos de liberación de fosfato en la reacción de desfosforilación *in vitro* en función de la concentración de OVH1-salvaje, con el sustrato fosforilado en tirosina (A), y en treonina (B). En (C), (D) y (E) se muestran los gráficos correspondientes a los diferentes fosfatidil inositol fosfato, y a la derecha de cada gráfico se muestra el resultado del *docking* molecular del grupo de cabeza de cada fosfatidil inositol en la estructura de la cadena B de OVH1. La mayor relación enzima:sustrato en los diferentes experimentos fue de (1:2.5) para el sustrato fosforilado en tirosina, y (1:15) para el sustrato fosforilado en treonina y las tres moléculas de fosfatidil inositol fosfato ensayadas.

Los gráficos representan la liberación de fosfato luego de la incubación de los sustratos con OVH1 a 37°C durante 30 minutos.

En la Figura 29a se muestra el resultado correspondiente al sustrato fosforilado en tirosina y en 29b al fosforilado en treonina. La enzima OVH1-salvaje fue capaz de desfosforilar ambos sustratos *in vitro*, comprobándose así su especificidad dual.

Debido a que algunas PTPs de especificidad dual son también capaces de desfosforilar fosfolípidos, resultó interesante evaluar la capacidad de OVH1 de desfosforilar *in vitro* a tres tipos de fosfatidil inositol fosfato disponibles en el laboratorio. Estos fueron fosfatidil inositol 3 fosfato (PtdIns(3)P), fosforilado en el hidroxilo del carbono 3'; fosfatidil inositol 3, 4 bifosfato (PtdIns(3,4)bP), y fosfatidil inositol 3, 5 bifosfato (PtdIns(3,5)bP). Estas moléculas están formadas por un grupo de cabeza myo-inositol (cis-1,2,3,5-trans-4,6-cyclohexanehexol), que en el carbono 1' contiene unido un grupo fosfato, que lo conecta a una molécula de ácido fosfático. Esta última contiene esterificado al glicerol a dos cadenas de ácidos grasos. Las moléculas de fosfatidil inositol fosfato son componentes de las membranas celulares, y pueden participar en vías de señalización mediante la fosforilación y desfosforilación de los hidroxilos de los carbonos 3', 4' y 5' del grupo cabeza inositol (64).

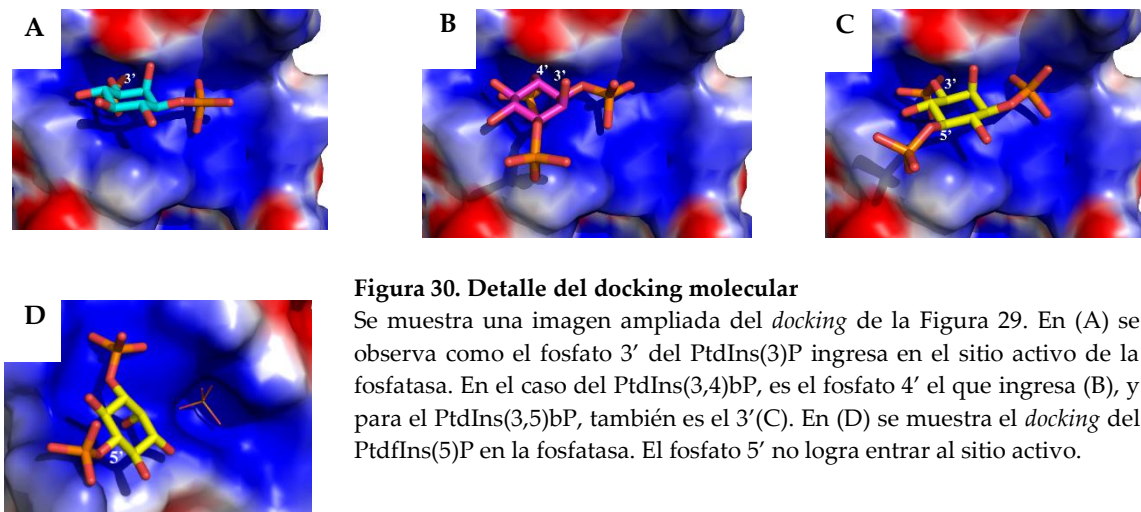
Como se puede observar en las Figuras 29c, d y e, OVH1-salvaje fue capaz de desfosforilar a estos tres sustratos, observándose un mayor nivel de fosfato liberado con el sustrato PtdIns(3,5)bP para las tres concentraciones de OVH1 ensayadas. A la derecha de cada gráfico de desfosforilación se muestra el resultado del *docking* molecular del grupo inositol de cada sustrato fosforilado y la fosfatasa. En todos los casos se obtuvieron varias conformaciones posibles, y se seleccionó en cada caso la de menor energía de unión, que se encontraba en el rango de -8.65 a -6.98 kcal/mol. Uno de los fosfatos del anillo inositol siempre ocupó un lugar equivalente al correspondiente a la molécula de fosfato en el sitio activo de la fosfatasa (Figura 30).

Tanto para el grupo de cabeza del PtdIns(3)P y el PtdIns(3,5)bP es el fosfato de la posición 3' el que ingresa al sitio activo. Para este último la molécula resultante de la reacción de desfosforilación sería el PtdIns(5)P. En el *docking* molecular, esta molécula no logra entrar al sitio activo de la fosfatasa en ninguna de las conformaciones generadas. Sería interesante poder contar con el PtdIns(5)P para determinar si lo que se observa en el *docking* se cumple en las condiciones experimentales.

En el caso del PtdIns(3,4)bP, en el *docking* molecular es el fosfato de la posición 4' el que ingresa al sitio activo. Se podría proponer que luego de ser desfosforilada por OVH1 en esta posición, la molécula resultante de PtdIns(3)P podría volver a ser desfosforilada por la enzima.

De este estudio preliminar, es importante destacar el hecho de que con el PtdIns(3,5)bP la fosfatasa OVH1 parecería presentar una mayor actividad respecto a las otras moléculas ensayadas. Una explicación posible podría ser que la presencia de un segundo grupo fosforilado en la posición 5' facilite a dirigir a la molécula de fosfatidil inositol al sitio activo cargado positivamente de la enzima. Si este fuera el caso, OVH1 podría presentar una mayor afinidad hacia este sustrato en comparación con los otros ensayados. Sin embargo, para complementar estos resultados, es necesario determinar a corto plazo los parámetros cinéticos de la reacción para cada uno de estos sustratos, con el objetivo de calcular los valores de k_{cat}/K_m y así evaluar la preferencia de OVH1 por los diferentes tipos de fosfatidil inositol fosfato. Adicionalmente,

estos ensayos nos permitirán evaluar si en los ensayos realizados hasta ahora nos encontramos en condiciones de $V_{máx}$, lo que permitirá una interpretación mejor del conjunto de los resultados.

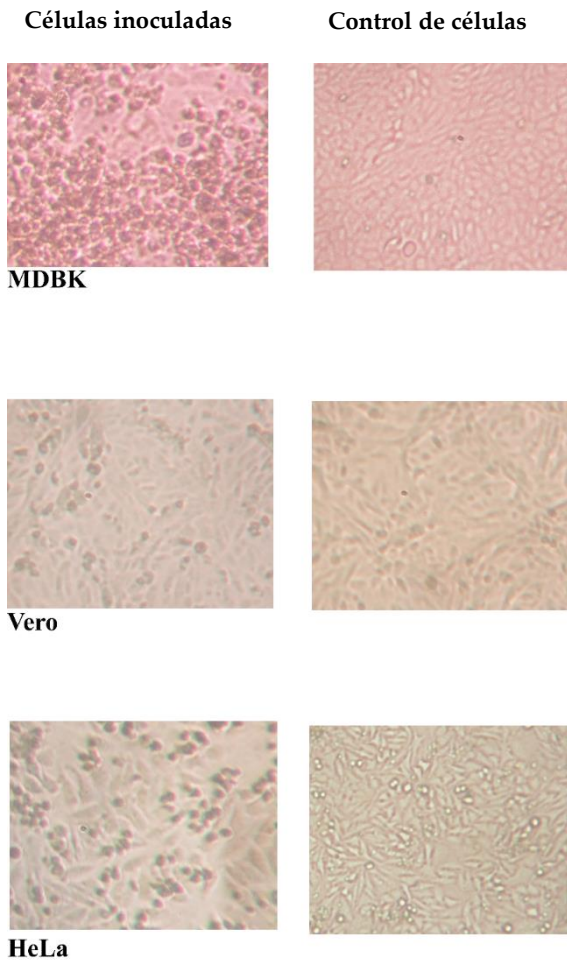
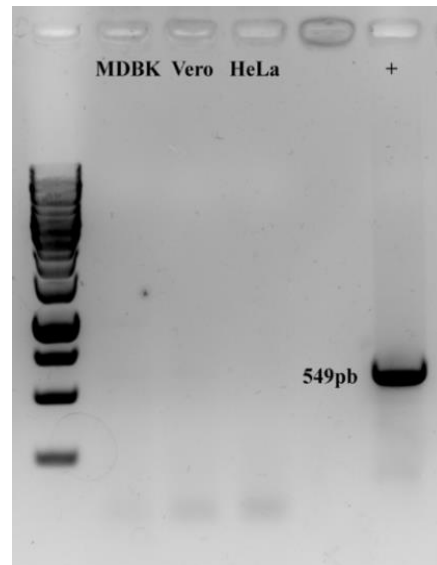


5. HACIA LA ADAPTACIÓN DEL VIRUS ORF A LA REPLICACIÓN EN CULTIVO CELULAR

El segundo objetivo principal de esta tesis buscó la adaptación de la cepa vacunal del virus Orf a la replicación en tres líneas celulares disponibles en nuestro laboratorio. Esto sería deseable para intentar responder si la fosfatasa del virus Orf forma parte del virión, como ocurre en otros Poxvirus como en el virus Vaccinia. Si se logra la adaptación, se podría realizar una purificación de partículas virales a partir de células en cultivo celular, lo que facilitaría el proceso de purificación y disminuiría considerablemente la contaminación con proteínas del hospedero. Estas purificaciones podrían ser utilizadas para la realización de un análisis proteómico.

Para la adaptación, se utilizaron las líneas celulares de mamífero, MDBK, Vero y HeLa. Cada una de ellas fue inoculada con una muestra enriquecida en partículas virales obtenida a partir de la vacuna de virus Orf. En paralelo, se inocularon células con diferentes controles, como se describe en la sección Materiales y Métodos.

Durante el primer pasaje, se observó un efecto considerable en las monocapas inoculadas con la muestra enriquecida en partículas virales. En todos los casos se observó un gran desprendimiento celular, y las células que permanecían adheridas al sustrato presentaron una morfología muy afectada. Este primer efecto citotóxico observado era esperable, debido a que el inóculo inicial contiene partículas virales junto con otros contaminantes que afectan la viabilidad celular. Este efecto se fue diluyendo a medida que se realizaban los sucesivos pasajes. Luego de cinco pasajes en ciego, fue posible la observación de un efecto en las monocapas que estaban siendo inoculadas con lisados celulares del pasaje anterior.

A**B****Figura 31. Adaptación a la replicación en cultivos celulares**

A. Se pueden observar micrografías de las monocapas correspondientes al día cinco luego del quinto pasaje en ciego, tomadas con aumento 10x. En las células MDBK se destaca un desprendimiento celular incrementado en la monocapa correspondiente a la inoculación con el virus.

B. Se muestra un gel de agarosa al 1% con el resultado de la PCR para amplificar el gen B2L. En las reacciones en las que se utilizó como molde extracciones de ADN correspondientes a las monocapas del quinto pasaje en ciego que habían sido inicialmente inoculadas con el virus, no se observa amplificación. Para el control positivo (+), donde se amplificó a partir de una extracción de ADN viral, se observa una banda del tamaño esperado (549pb).

El efecto observado puede deberse a un efecto citopático ocasionado por la replicación del virus, aunque no se puede descartar aún la presencia de un efecto tóxico asociado al procesamiento de la muestra. Esto debido a que los controles de contaminación y de carga de antibióticos mostraban cierta diferencia con el control sin infectar, aunque no equiparable al observado en las células inoculadas con la muestra viral. Es importante destacar que cuando se realizan los pasajes en ciego, se pone en contacto a la monocapa de células con restos de células lisadas del pasaje anterior, los que también influyen en el estado de la nueva monocapa.

Como puede observarse en la Figura 31a, la monocapa de células MDBK que había sido inoculada con las muestras del virus; mostró un mayor desprendimiento celular al observado en los controles de dicho ensayo. En el caso de las células Vero y HeLa, el nivel de desprendimiento fue similar, tanto para la monocapa inoculada con virus como para los controles.

La prueba definitiva de que el virus se está replicando en las células en cultivo, es la detección del ADN viral en extracciones de ADN provenientes de los pasajes en ciego. Con este fin, se realizaron extracciones de ADN de monocapas correspondientes al pasaje cinco, y se realizó una amplificación por PCR el gen viral B2L. Como control positivo, se realizó en paralelo la amplificación de dicho gen, utilizando una extracción de ADN genómico viral. Como se muestra en la Figura 31.b, no se logró detectar ADN viral en las extracciones de ADN provenientes del quinto pasaje en ciego, pero sí en el control positivo de la PCR. Este resultado indica que el virus no se estaría replicando en las células en cultivo, o que el nivel de replicación es demasiado bajo y por lo tanto no pudo ser detectada.

Es posible entonces que el efecto observado, particularmente en el caso de las células MDBK, pueda deberse al efecto citotóxico independiente del virus. De lo contrario, si en efecto está habiendo replicación viral, en futuros pasajes es de esperar que se logre detectar la presencia de ADN viral.

DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

Este trabajo de tesis buscó avanzar en el conocimiento de la estructura y la funcionalidad de la fosfatasa en tirosina codificada por el virus Orf (OVH1). En este sentido, logramos un avance sustancial logrando determinar la estructura de la proteína OVH1, la cual presentó características novedosas respecto a estructuras relacionadas previamente reportadas. Además, los ensayos de especificidad de sustrato revelaron que esta enzima es una fosfatasa de especificidad dual, que además es capaz de desfosforilar *in vitro* a moléculas de fosfatidil inositol fosfato, lo que abre nuevas hipótesis de trabajo acerca de la implicancia de esta actividad durante la infección. En cuanto a la obtención de un modelo de infección viral a nivel celular se logró comenzar el proceso de adaptación de una cepa del virus Orf en varias líneas celulares, siendo necesario continuar con los pasajes en ciego para poder detectar la replicación del virus. En las siguientes secciones se discuten diferentes aspectos de los resultados obtenidos en este trabajo y las eventuales repercusiones que la información generada tiene sobre el conocimiento actual de la fosfatasa OVH1 del virus Orf.

a. OVH1-C112S es un dímero estabilizado en forma covalente que presenta un plegamiento característico de fosfatasas de doble especificidad

Si comparamos el plegamiento del monómero de OVH1 con VH1 del virus Vaccinia y Variola mayor (Figura 32), así como con otras fosfatasas de doble especificidad como VHR y el dominio catalítico de PTEN (Figura 33), se observa un plegamiento general similar. Todas estas estructuras se conforman por un *core* central de hojas β rodeado por varias hélices α . Es remarcable este nivel de conservación estructural, a pesar de que las fosfatasas virales presentan limitada identidad de secuencia con ambas proteínas eucariotas.

La comparación entre OVH1 y la estructura de las dos fosfatasas de Orthopoxvirus (Figura 32) revela que la principal diferencia yace en la orientación de la hélice $\alpha 1$. En las fosfatasas de Orthopoxvirus, esta se ubica de forma perpendicular a la hélice $\alpha 5$ del monómero, para interactuar con la cadena $\alpha 5$ del otro monómero, mediante el intercambio de dominios. En contraste, la hélice $\alpha 1$ de OVH1 se encuentra de forma paralela a las hélices $\alpha 5$ y $\alpha 6$ formando un haz y no se involucra en un intercambio de dominios. De esta forma, el tipo de interacciones hidrofóbicas que estabilizan el intercambio de dominios en Orthopoxvirus, puede establecerse en OVH1 con la hélice $\alpha 1$ del mismo monómero.

Cuando se resolvió la estructura cristalográfica de la fosfatasa VH1 de Variola mayor, los autores habían comentado que el intercambio de dominios observado en la estructura podría representar uno de los posicionamientos posibles de la hélice $\alpha 1$, y que la hélice de cada monómero podría ocupar una posición alternativa, ahora equivalente a la observada para OVH1. Esto en parte estaba motivado por la observación por cromatografía de exclusión molecular de que la fosfatasa VH1 de Variola parecía ser un monómero, similar a lo que ocurre

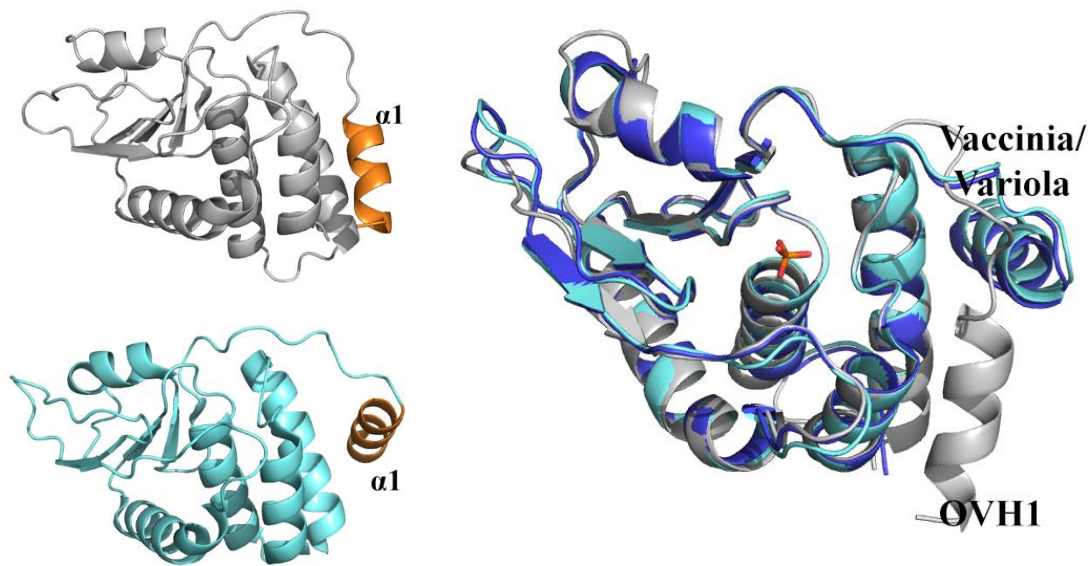


Figura 32. Estructuras cristalográficas de fosfatasas de Poxvirus

Se observa la estructura del monómero de OVH1 (color gris) y del monómero de VH1 de Variola mayor (cian). Se destaca la diferencia en la posición de la hélice $\alpha 1$, que se representa en color naranja en ambas estructuras. A la derecha se muestra una superposición de las estructuras de Orthopoxvirus (Vccinia virus y Variola mayor) con la de OVH1, donde se hace más evidente la diferencia en la posición de la hélice $\alpha 1$.

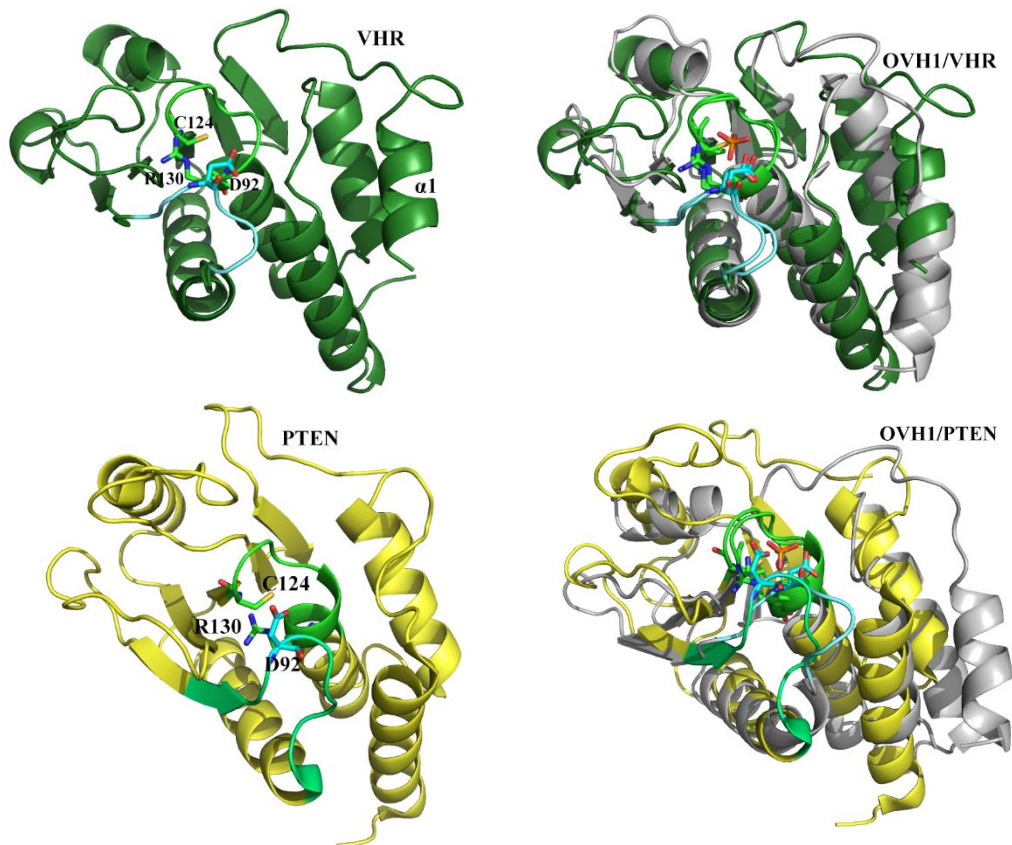


Figura 33. Comparación de la estructura de OVH1 con la estructura de VHR y PTEN

A la izquierda se muestran las fosfatasas VHR (PDB:1VHR) (verde) y PTEN (PDB: 1D5R) (amarillo). Se destacan los residuos que conforman la triada catalítica. A la derecha se muestran los alineamientos estructurales de estas proteínas con OVH1.

en la fosfatasa VHR. Sin embargo, los autores no hacen más comentarios sobre el estado de oligomerización de VH1, y posteriormente se demostró que VH1 del virus Vaccinia era un dímero en solución (15,36).

La otra gran diferencia entre la fosfatasa OVH1 y las fosfatasas de VH1 de Orthopoxvirus es el modo de estabilización del dímero. En OVH1, este es estabilizado por un puente disulfuro establecido entre las cisteínas 15 de cada monómero, en lugar del intercambio de dominios observado en las VH1. Debido a que las fosfatasas de Orthopoxvirus carecen de esta cisteína (solo presentan dos en su secuencia, siendo una de ellas la cisteína catalítica), este tipo de interacción es imposible para estas. En contraste, como se mencionó durante el análisis de la secuencia de OVH1 y de las otras fosfatasas de Poxvirus, varios géneros presentan residuos de cisteína en su extremo terminal (Figura 12). Este cambio podría estar marcando un modo diferente de estabilización de la dimerización para las fosfatasas de estos virus. Es posible que la estabilización covalente del dímero genere estabilidad adicional, tal vez aumentando la vida media del dímero de OVH1 en la célula. La estabilización covalente del dímero podría tener también un efecto en la actividad fosfatasa, ya que se ha mostrado para VH1 del virus Vaccinia la importancia de la dimerización en el reconocimiento del sustrato STAT1 fosforilado (14).

Para estudiar la importancia del puente disulfuro se analizó el doble mutante OVH1 C15S/C112S. Los resultados obtenidos demostraron que esta proteína continúa siendo un dímero en solución a pesar de carecer de la Cys 15. Recientemente obtuvimos el mutante simple OVH1-C15S que nos permitirá profundizar en el papel de este residuo en la dimerización. Con este mutante podremos analizar si la mutación afecta el grado de oligomerización, la actividad y/o estabilidad de la proteína *in vitro*. Se podría evaluar, por ejemplo, la resistencia de los dímeros de la proteína salvaje y mutantes a la desestabilización con DMSO y con DTT. El DMSO se utiliza para desestabilizar la formación de dímeros formados por interacciones hidrofóbicas. Si la fosfatasa OVH1-salvaje se encuentra formando un puente disulfuro como el observado en la cristalografía, esta debería permanecer en su forma dimérica a pesar del incremento de las concentraciones de DMSO. Sin embargo, el mutante OVH1 C15S, incapaz de establecer esta interacción, debería eventualmente pasar a una forma monomérica. Por otro lado, en el análisis del estado de oligomerización de las proteínas a altas concentraciones de DTT, que permitan la reducción del puente disulfuro, debería favorecer la formación de un monómero únicamente para la proteína OVH1-salvaje. Este análisis del estado de oligomerización en presencia de DMSO o DTT podría realizarse utilizando una columna de exclusión molecular analítica. Adicionalmente, el clonado de OVH1 salvaje y de OVH1 C15S en un vector de expresión en células de mamífero posibilitará evaluar si este cambio tiene algún efecto en la capacidad de desfosforilar a la proteína STAT1, uno de los sustratos de OVH1 sugeridos en la bibliografía (18).

Es muy importante lograr detectar la presencia de este puente disulfuro por una técnica complementaria a la cristalografía, ya que siempre existe la posibilidad de que lo observado en el cristal se deba a un artefacto del empaquetamiento, es decir, una interacción que ocurre solamente en el cristal. A favor de la presencia del puente disulfuro está hecho de la conservación de la Cys 15, la presencia de dímeros de OVH1 en geles SDS-PAGE en condiciones

no reductoras y los resultados de la titulación de tioles que sugieren la existencia de dos cisteínas oxidadas por molécula. Sin embargo, en los análisis por espectrometría de masas, no se logró detectar el péptido que podría contener este puente disulfuro, y si se encontró otro puente claramente artefactual, involucrando a la cisteína catalítica (Cys112). Una revisión del procedimiento nos llevó a concluir que la estrategia utilizada no fue la adecuada para la detección del péptido conteniendo la Cys 15. En efecto, durante la digestión de la fosfatasa con tripsina se genera un péptido de masa molecular muy pequeña por debajo del límite de detección del equipo, aun formando un puente disulfuro. La tripsina realiza su corte proteolítico en residuos de lisina y arginina. La cisteína 15 de OVH1 se encuentra entre dos argininas (secuencia RCTR). De esta forma, los péptidos generados siempre van a tener una masa muy pequeña. Algo que se podría hacer para intentar detectar este péptido es disminuir el tiempo de digestión con tripsina previo al análisis con espectrometría de masas, esperando obtener una digestión parcial de la proteína en la cual el péptido generado pudiera tener mayor masa molecular. Adicionalmente, se podrían utilizar otras proteasas que corten en sitios distantes de las Cys 15, o modificarla químicamente con el objetivo de aumentar el peso molecular de estos péptidos, por ejemplo con bromobimano (que añade 271 daltons) (65).

La observación de que el mutante OVH1-C15S/C112S sigue siendo dimerico a pesar de no poseer la cisteína 15 que formaría el puente disulfuro es interesante. Si este mutante hubiera sido monomérico, podríamos haber inferido que el puente disulfuro entre las cisteínas 15 era esencial para la dimerización. Sin embargo, lo observado para el mutante C15S/C112S demuestra que OVH1 logra la formación de dímeros por un mecanismo alternativo. Como se mencionó anteriormente, la interface de dimerización en la estructura de OVH1-C112S es sensiblemente menor a la observada en fosfatasas de Orthopoxvirus. En este contexto es difícil suponer que el posicionamiento de la hélice $\alpha 1$ en el dímero de mutante doble OVH1 C15S/C112S sea el mismo que el observado en nuestra estructura de OVH1 C112S. Adicionalmente, en la estructura de OVH1-C112S, la hélice $\alpha 1$ de la cadena A presentó un valor relativamente alto de factor B (Figura 27), lo cual indicaría la posibilidad de cierta flexibilidad en su ubicación. En consecuencia, una hipótesis a evaluar es si en el doble mutante ocurre la formación de un dímero estabilizado por intercambio de dominios, similar al observado en VH1. Para definir el posicionamiento de la hélice $\alpha 1$, se prevé intentar cristalizarla utilizando las condiciones optimizadas para el simple mutante OVH1 C112S.

La posibilidad de establecer un intercambio de dominios nos hace preguntarnos entonces si la estabilización del dímero por un puente disulfuro, observado en la estructura de OVH1 C112S, corresponde a un tipo de conformación alternativa o preferencial. Tal vez no sea improbable que estas proteínas puedan cambiar el tipo de estabilización según las condiciones redox en las que se encuentran.

Finalmente, lo observado para el mutante de delección también tiene cierta relevancia para la discusión de la dimerización. Si bien se estudiaron varias condiciones de expresión, no fue posible obtener cantidades importantes del mutante de delección en forma soluble, ya que siempre formó agregados. Esto evidencia una inestabilidad de la proteína ocasionada por la pérdida de la hélice $\alpha 1$. El análisis del perfil electrostático del mutante de delección generado en

Pymol mediante la remoción de la hélice $\alpha 1$, (Figura 34), permite teorizar sobre la causa de esta inestabilidad. Si comparamos la distribución de cargas en la superficie del mutante de delección de OVH1 con la que se observa para el mutante equivalente de VH1 del virus Vaccinia o para la proteína VHR (que es monomérica), se puede apreciar que OVH1 presenta la menor cantidad de regiones cargadas en la zona normalmente protegida por la hélice $\alpha 1$. De esta forma, la delección de la hélice $\alpha 1$ en OVH1 expondría esta región “hidrofóbica” al solvente, lo que podría contribuir a la formación de agregados de proteína. A su vez, esto resalta la importancia de la dimerización para proteger la exposición de esta región al solvente.

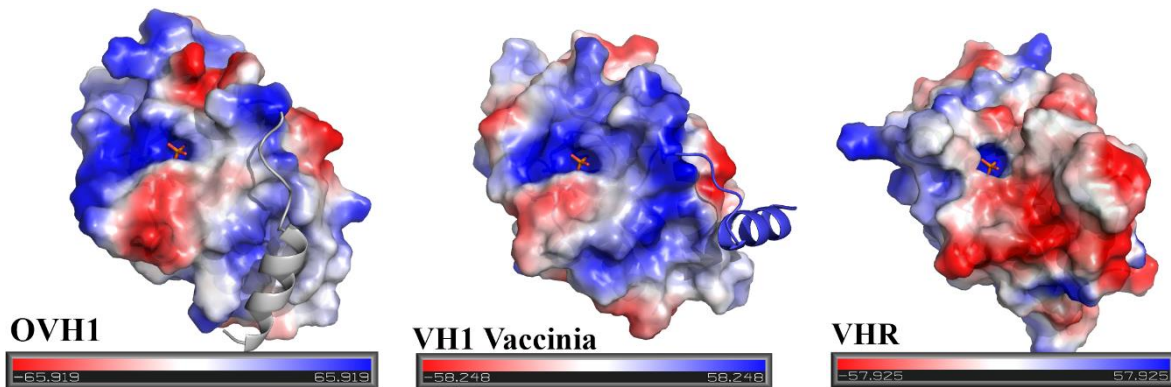


Figura 34. Perfil electrostático de mutantes de delección y VHR

Se muestra el perfil electrostático para los mutantes de delección de OVH1 y VH1 del virus Vaccinia, y para la proteína monomérica VHR. Superpuesta se observa la posición de la hélice $\alpha 1$ para las fosfatasa virales. La fosfatasa OVH1 es la que presentaría menos densidad de carga en la región protegida por la hélice $\alpha 1$, en comparación con la densidad de carga presente en VH1 del virus Vaccinia y en la fosfatasa monomérica VHR.

b. La capacidad de OVH1 de desfosforilar fosfoinositoles podría tener un rol fisiológico

La modificación del estado de fosforilación de fosfoinositoles de las membranas de la célula hospedera es un recurso utilizado por muchos patógenos, tanto virales como de tipo bacteriano, para adaptar las funciones celulares a su replicación y sobrevivencia. Las moléculas de fosfatidil inositol fosfato son componentes de varios tipos de membranas celulares y su fosforilación juega un rol central en el tráfico de proteínas y membranas en eucariotas, debido a su acción como “códigos postales”, determinando la identidad de la membrana de diferentes organelos y su destino. Adicionalmente, estas moléculas presentan un rol central en varias vías de señalización celular, como por ejemplo la vía PI3K/Akt, que participa en el control del metabolismo de la glucosa, de la síntesis de proteínas y la proliferación celular. Esta vía es un blanco frecuente de patógenos celulares, que buscan activarla de forma constitutiva para mantener la inhibición de la vía apoptótica, favoreciendo así su replicación (66).

Con el fin de alterar el perfil de fosforilación de fosfoinositoles, muchos virus codifican para proteínas virales que interactúan con quinasas y fosfatasa de fosfatidil inositol fosfato pertenecientes al hospedero. Como ejemplo, podemos mencionar al virus de la Hepatitis C, el cual codifica para la proteína NS5A. Esta proteína viral interactúa con la quinasa PI4KIII α , resultando en el incremento en su actividad quinasa y generando un incremento en la composición de PtdIns(4)P en el retículo endoplásmico de la célula hospedera. Las moléculas de

PtdIns(4)P podrían actuar entonces en varios pasos de la replicación viral, facilitando el reclutamiento de proteínas a la membrana, modulando la actividad de proteínas, así como promoviendo el ensamblaje de nuevas partículas virales (67). Otros patógenos, como es el caso de la bacteria *Shigella flexneri*, codifican para proteínas con actividad de fosfatidil inositol fosfatasa. Esta bacteria es un patógeno intracelular facultativo que causa la enfermedad de “disentería bacilar” en humanos. En este caso particular, la bacteria inyecta en células la proteína IpgD, la cual desfosforila moléculas de fosfatidil inositol 4,5 bifosfato, generando fosfatidil inositol 5 fosfato. Este cambio causaría el desprendimiento local del citoesqueleto de actina de la membrana plasmática, permitiendo la formación de “filipodios” que facilitarían la entrada del patógeno a la célula (68).

El hallazgo de que la fosfatasa OVH1 presenta especificidad dual y también es capaz de desfosforilar moléculas de fosfatidil inositol fosfato *in vitro* es novedoso y podría tener alguna implicancia para el ciclo replicativo del virus Orf. Esto no sería sorprendente, ya que estos virus suelen aprovechar al máximo su potencial codificante, muchas veces generando proteínas con múltiples sustratos o actividades en la célula. En esta dirección, existen antecedentes sobre el efecto de cambios en el estado de fosforilación de moléculas de fosfatidil inositol fosfato sobre la eficacia del ciclo replicativo de Poxvirus. En experimentos realizados con inhibidores de quinasas de fosfatidil inositol 3 fosfato (PI3Ks) codificadas por el hospedero, se ha observado que la falta de esta actividad genera una interferencia en la correcta maduración y morfogénesis de varios tipos de Orthopoxirus. Adicionalmente, se ha demostrado la co-localización de PI3Ks con centros de replicación del virus Vaccinia en células infectadas (69). Por otro lado, se ha visto que los Poxvirus codifican proteínas VAMPs (Proteínas virales de ensamblaje de membranas), las cuales son proteínas esenciales para la replicación en el virus Vaccinia. Dentro de las VAMPs encontramos a las proteínas A11, H7, L2 y A6. La proteína H7 ha sido caracterizada estructuralmente y presenta una región positiva compuesta por residuos básicos que ha mostrado unirse de forma específica a fosfatidil inositol 3 fosfato y 4 fosfato. Mutaciones que anulan esta unión dificultan la replicación del virus en cultivo celular (70). Como ya se mencionado anteriormente, los Poxvirus presentan una envoltura compleja formada por más de una bicapa lipídica, derivada tanto del aparato de Golgi como del retículo endoplásmico. Se ha constatado que las membranas del aparato de Golgi se encuentran particularmente enriquecidas en moléculas de fosfatidil inositol 4 fosfato. A su vez, se ha observado que las partículas virales maduras de varios Poxvirus se encuentran enriquecidas en moléculas de fosfatidil inositol fosfato, si bien no se ha analizado en detalle el tipo de fosforilación en estas moléculas (71,72).

En resumen, todos estos hallazgos, sumado a la demostración de una actividad de OVH1 frente a fosfatidil inositol fosfato, sugieren un rol importante de estas moléculas en el ciclo replicativo de estos virus, dónde la fosfatasa OVH1 podría cumplir un papel interesante de explorar. Para avanzar en esta dirección, sería importante determinar si OVH1 presenta una preferencia por algún tipo particular de fosfatidil inositol fosfato. La realización de ensayos de desfosforilación *in vitro* para determinar los parámetros cinéticos, permitiría realizar comparaciones de K_{cat}/K_m para los diferentes sustratos. A modo complementario, mediante ensayos de interacción

proteína-fosfoinositol por inmunoblot o por resonancia plasmónica de superficie (SPR) se podría determinar si existen diferencias en cuanto a la unión de la fosfatasa a los diferentes tipos de fosfatidil inositol fosfato (73). Si se logra encontrar una mayor especificidad de OVH1 para uno de los fosfoinositoles, sería interesante analizar los cambios en el estado de fosforilación del mismo durante una infección con virus Orf, o en células transfectadas con OVH1 salvaje y mutada en la Cys catalítica. Las diferentes formas fosforiladas de inositol fosfato pueden ser detectadas mediante el uso de anticuerpos específicos. Para los experimentos de infección, es fundamental contar con una cepa del virus Orf adaptada a la replicación en cultivo celular, lo que resalta la importancia de la búsqueda de este modelo. Los ensayos de infección serían particularmente importantes, ya que teniendo en cuenta los antecedentes descritos en la literatura, es posible que la fosfatasa por sí sola no acceda a sus sustratos en membranas celulares, debido al posible requerimiento de la interacción con otras proteínas virales o celulares.

c. Perspectivas de la adaptación a la replicación del virus Orf en cultivo celular

Si bien aún no se ha logrado la obtención de un modelo celular de infección con virus Orf, consideramos que es muy importante la continuación de este trabajo o la implementación de alternativas que nos permitan analizar el comportamiento de la fosfatasa en el contexto de la infección viral. Una alternativa posible sería la utilización de cultivos primarios derivados de ovinos para la mantención y la obtención de altos títulos del virus, para la infección posterior de células HeLa. Esta aproximación ya ha sido utilizada en trabajos de otros grupos, y si bien es más difícil, parecería ser la opción más plausible de poder contar con un modelo de infección a corto plazo (18). De todas formas, no sería muy costoso continuar con los intentos de adaptación a la replicación en cultivo celular, y es posible que eventualmente se logre este objetivo. Los resultados observados para la línea celular MDBK serían los más prometedores para la continuación de estos ensayos. Sin embargo, es importante retomar la adaptación también en las otras líneas celulares, utilizando diversos tipos de inóculo y en diferentes condiciones. Finalmente, la eventual incorporación de una línea celular ovina a los estudios de adaptación podría ser la clave para llegar a un resultado exitoso.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se logró una primera caracterización funcional y estructural de la fosfatasa en tirosina del virus Orf. OVH1 mostró ser un dímero en solución que no solo presenta doble especificidad de sustrato *in vitro*, desfosforilando residuos de fosfotirosina y fosfoserina, sino que también logró la desfosforilación de moléculas de fosfatidil inositol. Adicionalmente, la resolución de la estructura tridimensional del mutante inactivo de esta fosfatasa mostró características nunca antes descritas para fosfatasas de Poxvirus. Entre estas se destaca la dimerización por medio de un puente disulfuro intermolecular.

El conjunto de resultados obtenidos en este trabajo estimula a seguir indagando en el rol de esta fosfatasa en el ciclo de replicación del virus Orf, para identificar posibles sustratos e interactores aún no descritos. Adicionalmente, la caracterización estructural de nuevos mutantes de la fosfatasa, como el mutante de la cisteína 15, podrán brindar información sobre diferentes mecanismos posibles de dimerización. Sería de interés realizar también la caracterización estructural de fosfatasas representantes de géneros adicionales de Poxvirus para investigar la posible conservación de las características observadas, como el puente disulfuro entre los monómeros de proteína.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Bratke, K. A., McLysaght, A., and Rothenburg, S. (2013) A survey of host range genes in poxvirus genomes. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **14**, 406-425
2. McFadden, G. (2005) Poxvirus tropism. *Nature reviews. Microbiology* **3**, 201-213
3. Mercer, A. A., Fraser, K. M., and Esposito, J. J. (1996) Gene homology between orf virus and smallpox variola virus. *Virus genes* **13**, 175-178
4. Murphy, F. A., Gibbs, P., Horzinek, M. C., and Studdert, M. J. (1999) Poxviridae. in *Veterinary Virology* (Murphy, F. A. ed.), 3rd Ed., Elsevier Academic Press, San Diego, California. pp 277-291
5. Fleming, S. B., and Mercer, A. A. (2007) Genus Parapoxvirus. in *Poxviruses* (Mercer, A. A., Schmidt, A., and Weber, O. eds.), Birkhäuser Verlag, Switzerland. pp 127-165
6. Mercer, A. A., Ueda, N., Friederichs, S. M., Hofmann, K., Fraser, K. M., Bateman, T., and Fleming, S. B. (2006) Comparative analysis of genome sequences of three isolates of Orf virus reveals unexpected sequence variation. *Virus research* **116**, 146-158
7. Hosamani, M., Scagliarini, A., Bhanuprakash, V., McInnes, C. J., and Singh, R. K. (2009) Orf: an update on current research and future perspectives. *Expert review of anti-infective therapy* **7**, 879-893
8. Haig, D. M., Thomson, J., McInnes, C. J., Deane, D. L., Anderson, I. E., McCaughan, C. A., Imlach, W., Mercer, A. A., Howard, C. J., and Fleming, S. B. (2002) A comparison of the anti-inflammatory and immuno-stimulatory activities of orf virus and ovine interleukin-10. *Virus research* **90**, 303-316
9. Counago, R. M., Knapp, K. M., Nakatani, Y., Fleming, S. B., Corbett, M., Wise, L. M., Mercer, A. A., and Krause, K. L. (2015) Structures of Orf Virus Chemokine Binding Protein in Complex with Host Chemokines Reveal Clues to Broad Binding Specificity. *Structure* **23**, 1199-1213
10. Deane, D., McInnes, C. J., Percival, A., Wood, A., Thomson, J., Lear, A., Gilray, J., Fleming, S., Mercer, A., and Haig, D. (2000) Orf virus encodes a novel secreted protein inhibitor of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2. *Journal of virology* **74**, 1313-1320
11. Pieren, M., Prota, A. E., Ruch, C., Kostrewa, D., Wagner, A., Biedermann, K., Winkler, F. K., and Ballmer-Hofer, K. (2006) Crystal structure of the Orf virus NZ2 variant of vascular endothelial growth factor-E. Implications for receptor specificity. *The Journal of biological chemistry* **281**, 19578-19587
12. Westphal, D., Ledgerwood, E. C., Tyndall, J. D., Hibma, M. H., Ueda, N., Fleming, S. B., and Mercer, A. A. (2009) The orf virus inhibitor of apoptosis functions in a Bcl-2-like manner, binding and neutralizing a set of BH3-only proteins and active Bax. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **14**, 1317-1330
13. Fleming, S. B., Wise, L. M., and Mercer, A. A. (2015) Molecular genetic analysis of orf virus: a poxvirus that has adapted to skin. *Viruses* **7**, 1505-1539
14. Koksai, A. C., and Cingolani, G. (2011) Dimerization of Vaccinia virus VH1 is essential for dephosphorylation of STAT1 at tyrosine 701. *The Journal of biological chemistry* **286**, 14373-14382

15. Koksai, A. C., Nardozzi, J. D., and Cingolani, G. (2009) Dimeric quaternary structure of the prototypical dual specificity phosphatase VH1. *The Journal of biological chemistry* **284**, 10129-10137
16. Liu, K., Lemon, B., and Traktman, P. (1995) The dual-specificity phosphatase encoded by vaccinia virus, VH1, is essential for viral transcription in vivo and in vitro. *Journal of virology* **69**, 7823-7834
17. Najarro, P., Traktman, P., and Lewis, J. A. (2001) Vaccinia virus blocks gamma interferon signal transduction: viral VH1 phosphatase reverses Stat1 activation. *Journal of virology* **75**, 3185-3196
18. Harvey, R., McCaughan, C., Wise, L. M., Mercer, A. A., and Fleming, S. B. (2015) Orf virus inhibits interferon stimulated gene expression and modulates the JAK/STAT signalling pathway. *Virus research* **208**, 180-188
19. Aaronson, D. S., and Horvath, C. M. (2002) A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* **296**, 1653-1655
20. Shuai, K., and Liu, B. (2003) Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nature reviews. Immunology* **3**, 900-911
21. Guan, K. L., Broyles, S. S., and Dixon, J. E. (1991) A Tyr/Ser protein phosphatase encoded by vaccinia virus. *Nature* **350**, 359-362
22. Gounaris, K., Thomas, S., Najarro, P., and Selkirk, M. E. (2001) Secreted variant of nucleoside diphosphate kinase from the intracellular parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Infection and immunity* **69**, 3658-3662
23. Derrien, M., Punjabi, A., Khanna, M., Grubisha, O., and Traktman, P. (1999) Tyrosine phosphorylation of A17 during vaccinia virus infection: involvement of the H1 phosphatase and the F10 kinase. *Journal of virology* **73**, 7287-7296
24. Ciesla, J., Fraczyk, T., and Rode, W. (2011) Phosphorylation of basic amino acid residues in proteins: important but easily missed. *Acta biochimica Polonica* **58**, 137-148
25. Humphrey, S. J., James, D. E., and Mann, M. (2015) Protein Phosphorylation: A Major Switch Mechanism for Metabolic Regulation. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **26**, 676-687
26. Lim, W. A., and Pawson, T. (2010) Phosphotyrosine signaling: evolving a new cellular communication system. *Cell* **142**, 661-667
27. Hunter, T. (2009) Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting. *Current opinion in cell biology* **21**, 140-146
28. Schlessinger, J., and Lemmon, M. A. (2003) SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **2003**, RE12
29. Almo, S. C., Bonanno, J. B., Sauder, J. M., Emtage, S., Dilorenzo, T. P., Malashkevich, V., Wasserman, S. R., Swaminathan, S., Eswaramoorthy, S., Agarwal, R., Kumaran, D., Madegowda, M., Ragumani, S., Patskovsky, Y., Alvarado, J., Ramagopal, U. A., Faber-Barata, J., Chance, M. R., Sali, A., Fiser, A., Zhang, Z. Y., Lawrence, D. S., and Burley, S. K. (2007) Structural genomics of protein phosphatases. *Journal of structural and functional genomics* **8**, 121-140
30. Tonks, N. K. (2013) Protein tyrosine phosphatases--from housekeeping enzymes to master regulators of signal transduction. *The FEBS journal* **280**, 346-378
31. Denu, J. M., Stuckey, J. A., Saper, M. A., and Dixon, J. E. (1996) Form and function in protein dephosphorylation. *Cell* **87**, 361-364

32. Ishibashi, T., Bottaro, D. P., Chan, A., Miki, T., and Aaronson, S. A. (1992) Expression cloning of a human dual-specificity phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 12170-12174
33. Patterson, K. I., Brummer, T., O'Brien, P. M., and Daly, R. J. (2009) Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *The Biochemical journal* **418**, 475-489
34. Pavic, K., Duan, G., and Kohn, M. (2015) VHR/DUSP3 phosphatase: structure, function and regulation. *The FEBS journal* **282**, 1871-1890
35. Maehama, T., and Dixon, J. E. (1998) The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *The Journal of biological chemistry* **273**, 13375-13378
36. Phan, J., Tropea, J. E., and Waugh, D. S. (2007) Structure-assisted discovery of Variola major H1 phosphatase inhibitors. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **63**, 698-704
37. Olivero, N. (2012) *Estudio de los mecanismos genéticos implicados en la variabilidad del virus causante del ectima contagioso en ovinos*. Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad de la República, Facultad de Ciencias
38. Correa, A., Ortega, C., Obal, G., Alzari, P., Vincentelli, R., and Oppezzo, P. (2014) Generation of a vector suite for protein solubility screening. *Frontiers in microbiology* **5**, 67
39. Studier, F. W., and Moffatt, B. A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of molecular biology* **189**, 113-130
40. Sambrook, J., and Russel, D. W. (2011) *Molecular Cloning, a laboratory manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
41. Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* **96**, 23-28
42. van den Ent, F., and Lowe, J. (2006) RF cloning: a restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *Journal of biochemical and biophysical methods* **67**, 67-74
43. Unger, T., Jacobovitch, Y., Dantes, A., Bernheim, R., and Peleg, Y. (2010) Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression. *Journal of structural biology* **172**, 34-44
44. Hall, T. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series* **1**, 95-98
45. Gouy, M., Guindon, S., and Gascuel, O. (2010) SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular biology and evolution* **27**, 221-224
46. Studier, F. W. (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein expression and purification* **41**, 207-234
47. van den Berg, S., Lofdahl, P. A., Hard, T., and Berglund, H. (2006) Improved solubility of TEV protease by directed evolution. *Journal of biotechnology* **121**, 291-298
48. Hammond, J. B., and Kruger, N. J. (1988) The Bradford method for protein quantitation. *Methods in molecular biology* **3**, 25-32
49. van Holde, K. E. (2006) Methods for the Separation and Characterization of Macromolecules. in *Principles of Physical Biochemistry* (Carlson, G. ed.), 2nd Ed., Pearson, Prentice Hall, Upper Sadle River, NJ. pp 213-275
50. Schuck, P. (2000) Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modeling. *Biophysical journal* **78**, 1606-1619

51. van Holde, K. E., Johnson, W. C., and Ho, P. S. (2006) X-ray Diffraction. in *Principles of Physical Biochemistry* (Carlson, G. ed.), 2nd Ed., Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ. pp 276-350
52. Rhodes, G. (2006) Protein Crystals. in *Crystallography Made Crystal Clear, A guide for users of macromolecular models* (Hayhurst ed.), 3rd Ed., Elsevier, Canada. pp 31-47
53. Kabsch, W. (2010) Xds. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **66**, 125-132
54. Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., Keegan, R. M., Krissinel, E. B., Leslie, A. G., McCoy, A., McNicholas, S. J., Murshudov, G. N., Pannu, N. S., Potterton, E. A., Powell, H. R., Read, R. J., Vagin, A., and Wilson, K. S. (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **67**, 235-242
55. Minor, D. L., Jr. (2007) The neurobiologist's guide to structural biology: a primer on why macromolecular structure matters and how to evaluate structural data. *Neuron* **54**, 511-533
56. McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., and Read, R. J. (2007) Phaser crystallographic software. *Journal of applied crystallography* **40**, 658-674
57. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., and Cowtan, K. (2010) Features and development of Coot. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **66**, 486-501
58. Robert, X., and Gouet, P. (2014) Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic acids research* **42**, W320-324
59. Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., and Olson, A. J. (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry* **30**, 2785-2791
60. Chan, K. W., Lin, J. W., Lee, S. H., Liao, C. J., Tsai, M. C., Hsu, W. L., Wong, M. L., and Shih, H. C. (2007) Identification and phylogenetic analysis of orf virus from goats in Taiwan. *Virus genes* **35**, 705-712
61. Nomine, Y., Ristriani, T., Laurent, C., Lefevre, J. F., Weiss, E., and Trave, G. (2001) Formation of soluble inclusion bodies by hpv e6 oncoprotein fused to maltose-binding protein. *Protein expression and purification* **23**, 22-32
62. Tropea, J. E., Phan, J., and Waugh, D. S. (2006) Overproduction, purification, and biochemical characterization of the dual specificity H1 protein phosphatase encoded by variola major virus. *Protein expression and purification* **50**, 31-36
63. Denu, J. M., Zhou, G., Wu, L., Zhao, R., Yuvaniyama, J., Saper, M. A., and Dixon, J. E. (1995) The purification and characterization of a human dual-specific protein tyrosine phosphatase. *The Journal of biological chemistry* **270**, 3796-3803
64. Kim, Y. J., Jahan, N., and Bahk, Y. Y. (2013) Biochemistry and structure of phosphoinositide phosphatases. *BMB reports* **46**, 1-8
65. Lindahl, M., Mata-Cabana, A., and Kieselbach, T. (2011) The disulfide proteome and other reactive cysteine proteomes: analysis and functional significance. *Antioxidants & redox signaling* **14**, 2581-2642
66. Diehl, N., and Schaal, H. (2013) Make yourself at home: viral hijacking of the PI3K/Akt signaling pathway. *Viruses* **5**, 3192-3212
67. Bishe, B., Syed, G., and Siddiqui, A. (2012) Phosphoinositides in the hepatitis C virus life cycle. *Viruses* **4**, 2340-2358

68. Niebuhr, K., Giuriato, S., Pedron, T., Philpott, D. J., Gaits, F., Sable, J., Sheetz, M. P., Parsot, C., Sansonetti, P. J., and Payrastre, B. (2002) Conversion of PtdIns(4,5)P(2) into PtdIns(5)P by the *S.flexneri* effector IpgD reorganizes host cell morphology. *The EMBO journal* **21**, 5069-5078
69. McNulty, S., Bornmann, W., Schriewer, J., Werner, C., Smith, S. K., Olson, V. A., Damon, I. K., Buller, R. M., Heuser, J., and Kalman, D. (2010) Multiple phosphatidylinositol 3-kinases regulate vaccinia virus morphogenesis. *PloS one* **5**, e10884
70. Kolli, S., Meng, X., Wu, X., Shengjuler, D., Cameron, C. E., Xiang, Y., and Deng, J. (2015) Structure-function analysis of vaccinia virus H7 protein reveals a novel phosphoinositide binding fold essential for poxvirus replication. *Journal of virology* **89**, 2209-2219
71. Krijnse Locker, J., Chlanda, P., Sachsenheimer, T., and Brugger, B. (2013) Poxvirus membrane biogenesis: rupture not disruption. *Cellular microbiology* **15**, 190-199
72. Sodeik, B., Doms, R. W., Ericsson, M., Hiller, G., Machamer, C. E., van 't Hof, W., van Meer, G., Moss, B., and Griffiths, G. (1993) Assembly of vaccinia virus: role of the intermediate compartment between the endoplasmic reticulum and the Golgi stacks. *The Journal of cell biology* **121**, 521-541
73. Narayan, K., and Lemmon, M. A. (2006) Determining selectivity of phosphoinositide-binding domains. *Methods* **39**, 122-133

ANEXO A: COMPLEMENTO DE MATERIALES

a. Reactivos químicos utilizados

A continuación, se detallan los principales reactivos utilizados, especificando su procedencia comercial.

Sales inorgánicas: tris (hidroximetil) aminometano (TRIS) (SIGMA), Ditiotreitól (DTT) (Applichem); Ácido etilen- diamino tetracético (EDTA) (SIGMA).

Inhibidores de proteasas: benzamidina, inhibidor de tripsina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), cocktail de inhibidores de proteasas sin EDTA, todos obtenidos en SIGMA.

Sustrato artificial de fosfatasas para-nitro fenilfosfato (Applichem)

Reactivos para electroforesis: agarosa (sbs), y los reactivos siguientes obtenidos en SIGMA: acrilamida, N,N'-metilen-bis-acrilamida, glicina, N,N,N',N'-Tetrametiletildiamine (TEMED), azul de bromofenol, azul de Coomasie R-250, azul de Coomasie G-250, seroalbúmina bovina.

Solventes orgánicos: etanol (SIGMA), glicerol (Cicarelli), dimetilsulfóxido (DMSO) (SIGMA).

Reactivos para la preparación de medios de cultivo para bacterias: Triptona (Fluka), extracto de levadura (SIGMA), agar (Fluka).

Antibióticos: ampicilina, kanamicina, penicilina, estreptomina, clornfenicol obtenidos en SIGMA.

Detergentes: lauril sulfato de sodio (SDS) (Carlo Erba), polisorbato 20 (Tween 20) (Amresco), t-octil fenoxi- polietoxietanol (Tritón X-100) (Amresco).

Marcadores de masa molecular: para proteínas, *Thermo Scientific* #0431. Para ADN, *Thermo Scientific* #SM0311.

Medios de cultivo de líneas celulares: MEM431 (Santa Elena)

b. Composición de medios y soluciones

LB (Lysogeny Broth) – Medio rico para bacterias.

Para un litro, se disuelven 10g de triptona, 5 gramos de extracto de levadura y 10g de NaCl en agua destilada. Para hacerlo sólido se agregan 15g de agar por litro. Esterilizar con autoclave. Cuando se utiliza para expresar proteínas recombinantes en células *E. coli* (DE3) Star, es necesaria la adición de IPTG para inducir la expresión en las células de la ARN polimerasa del fago T7. La concentración de IPTG puede variar según el protocolo de expresión de la proteína recombinante.

2YT (2x Yeast extract and Tyryptone) – Medio para expresión de proteínas en E. coli.

Para un litro, se disuelven 16g de triptona, 10g de extracto de levadura y 5g de NaCl en agua destilada. Esterilizar con autoclave. Para expresar proteínas recombinantes en células *E.coli* (DE3) Star, es necesaria la adición de IPTG.

TB (Terrific Broth) – Medio para expresión de proteínas en E. coli.

Para preparar un litro, se preparan dos mezclas por separado. La primera se compone por 12g de triptona, 24g de extracto de levadura, 4 mL de glicerol 100%, y agua destilada hasta un volumen de 900 mL. La segunda es una solución de 100 mL de KH_2PO_4 0.17M y K_2HPO_4 0.72 M. Las dos soluciones son esterilizadas mediante autoclave por separado, y se mezclan en el momento previo a la utilización, generando un litro de medio. Para expresar proteínas recombinantes en células *E. coli* (DE3) Star, es necesaria la adición de IPTG.

ZYM5052 – Medio autoinductor para la expresión de proteínas en E. coli

Para preparar un litro de este medio, es necesario obtener por separado el caldo ZY y las soluciones M 25x y 5052 25x. Para preparar 918 mL de ZY, se disuelven 10g de triptona y 5g de extracto de levadura en agua destilada. A esta mezcla se le agregan 2 mL de MgCl_2 1M y 0.2 mL de elementos traza 1000x (para 10 mL, mezclar 3.2 mL de H_2O , con 5 mL de FeCl_3 0.1 M, y 0.2 mL de cada una de las soluciones siguientes: CaCl_2 1 M, MnCl_2 0.5 M, CoCl_2 0.1 M, Na_2MoO_4 0.1M, ZnSO_4 0.5 M, CuCl_2 0.1 M, Na_2SeO_3 0.1 M, NiCl_2 0.1 M, H_3BO_3 0.1 M. Es necesario esterilizar por autoclave cada una de estas soluciones por separado, así como el agua utilizada para la mezcla). Luego del agregado del cloruro de magnesio y los oligoelementos 1000x, el caldo ZY es esterilizado por autoclave. En paralelo se prepara y se esteriliza la solución M 25x: (Na_2HPO_4 0.625 M, KH_2PO_4 0.625 M, NH_4Cl 1.25 M y Na_2SO_4 0.125 M) y la solución 5052 25x (glicerol 12.5%, glucosa 1.25%, lactosa 5%). Luego de esterilizadas, se mezcla el caldo ZY con las soluciones M y 5052, llevándolas a una concentración de 1x, completándose el volumen final a un litro. Este medio no requiere la adición de IPTG para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* (DE3) Star, ya que se utiliza la lactosa aportada por la solución 5052.

c. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

El buffer de muestra 6x utilizado fue Tris.Cl pH 6.8 0.375 M, SDS 12%, glicerol 60%, azul de bromo fenol 0.06%. Para los geles en condiciones reductoras se añadió DTT 100 mM.

Los geles de 1 mm de espesor al 12% de acrilamida en el separador se prepararon como se indica a continuación:

Gel separador		Gel concentrador	
H ₂ O MQ	1.7 mL	H ₂ O MQ	0.675 mL
Acrilamida/Bis 30/0.8%	2 mL	Acrilamida/Bis 30/0.8%	0.25 mL
Tris.Cl 1.5 M pH 8.8	1.25 mL	Tris.Cl 0.5 M pH 6.8	0.312 mL
SDS 10%	50 μL	SDS 10%	12.5 μL
APS 10%	25 μL	APS 10%	7.5 μL
TEMED	5 μL	TEMED	1.25 μL

ANEXO B: COMPLEMENTO DE MÉTODOS

a. Producción y purificación de la proteasa TEV_{SH} recombinante

A partir de una colonia o de un stock en glicerol de células *E. coli* Rosseta pLys (DE3) transformadas con el plásmido de expresión de la TEV_{SH} (descrito en van der Berg, 2006, (47)) se realizó un precultivo en 3 mL de LB conteniendo los antibióticos cloranfenicol (34 µg/mL) y ampicilina (100 µg/mL), y se incubó toda la noche a 37°C bajo agitación de 200rpm. Al día siguiente, se inoculó el medio 2YT con 0.5 mL de precultivo cada 100 mL de medio fresco con los antibióticos adecuados. Se dejó crecer las células a 37°C con agitación a 220 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.6. Una vez alcanzado este punto, se cambió el cultivo a un incubador a 20°C bajo con agitación de 230 rpm, y una vez enfriado el cultivo se indujo la expresión de la ARN polimerasa del fago T7 mediante la adición de 1 mM de IPTG. La inducción se realizó durante 16 horas en las condiciones mencionadas.

Una vez finalizada la expresión, se colectaron las células mediante centrifugación durante 15 minutos a 4°C y 6000 rpm. Las mismas fueron resuspendidas en buffer de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 0.3 M) en una relación de 5 mL por gramo de peso húmedo de células. A las células resuspendidas se le agregaron los inhibidores de proteasa PMSF a una concentración final de 1 mM, SBTI a 1 µg/mL, benzamidina a 1 mM, además de lisozima a una concentración final de 1.0 mg/mL. Seguidamente, la lisis celular se realizó mediante sonicación (*Omni International Ultrasonic Homogenizer, Sonic Ruptor 250*), en 20 ciclos de 1 minuto, *Power output 50* y *Pulser* de 40%, con intervalos de 30 segundos de descanso, siempre manteniendo el lisado en hielo. El lisado posteriormente se incubó con ADNasa I (AppliChem A3778) a una concentración de 5 µg/mL y MgCl₂ a 10 mM, durante una hora a 4°C. Adicionalmente, se agregó al lisado el detergente Triton X100 a una concentración final de 1%. Luego, se procedió a centrifugar el lisado durante 1 hora a 4°C y 13000 rpm. La fracción soluble recuperada se filtró por 0.22 µm y las proteínas recombinantes se purificaron mediante cromatografía de afinidad a metal inmovilizado (*IMAC*), de forma análoga a la purificación de OVH1. La elución de las proteínas inmovilizadas se realizó con buffer de lisis conteniendo imidazol 500 mM. Se colectaron fracciones de proteína de 3 mL, hasta no detectar más proteína por el método de Bradford visible. Se realizó una única mezcla con las fracciones que contenían la mayor cantidad de proteína recombinante, a la que se incubó toda la noche con un suplemento de DTT 5 mM y EDTA 2 mM, a 4°C. A día siguiente, la mezcla fue dializada contra el buffer de almacenamiento de la TEV_{SH} (buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7.0, NaCl 0.2 M, DTT 2 mM, EDTA 2 mM, glicerol 10%). Una vez finalizado el cambio de buffer, la muestra fue cuantificada por el método de Bradford y concentrada a 1-2 mg/mL, alicuotada de a 200 µL y almacenada a largo plazo a -80°C.

b. Protocolo de inmovilización de iones cobre en la matriz de sefarosa quelante

Para el almacenamiento a largo plazo, la matriz de sefarosa es mantenida en etanol 20% a 4°C. Para la inmovilización de iones cobre, el volumen de matriz a utilizar se colocó en una columna PD-10 vacía (GE), y se lavó con 2 volúmenes de columna (CV) de H₂O MQ para eliminar el etanol. Seguidamente, se aplicaron 0.2 CV de una solución de Cu₂SO₄ 0.2 M, y se lavó con 5 CV de H₂O M. A continuación, se lavó con 5 CV de solución ácida (acetato de potasio 0.02M, NaCl 0.5 M, pH 4.0) para eliminar iones cobre no fuertemente unidos y finalmente se equilibró la columna con 2 CV de buffer de lisis de la proteína a purificar.

c. Regeneración de la matriz de sefarosa quelante

Luego de realizar la IMAC, se realizó un tratamiento de regeneración de la matriz para eliminar proteínas que aun estén retenidas en la misma, así como otros posibles contaminantes. Se lavó la matriz con 0.5 CV de una solución de EDTA 0.2 M y NaCl 0.5 M, para remover los átomos de cobre inmovilizados. Luego, se lavó la matriz con 3 CV de una solución de NaCl 0.5 M, para remover el EDTA residual, y se incubó la matriz en batch con 0.2 CV de una solución 2 M de NaCl durante 15 minutos a temperatura ambiente. En este paso se remueven proteínas unidas mediante interacciones iónicas a la matriz. Seguidamente se incubó la matriz en batch con 3 CV de una solución 1 M de NaOH, durante 15 minutos a temperatura ambiente. En este paso se remueven proteínas unidas mediante interacciones hidrofóbicas, proteínas precipitadas y lipoproteínas. La matriz se lavó a continuación con 4 CV de una solución de etanol 70% en columna, seguida de un lavado con 10 CV de H₂O MQ. Finalmente, para su conservación, la matriz se lavó con etanol 20% y se almacenó a 4°C hasta la próxima utilización.

d. Desalado en columna PD-10 (GE)

Para eliminar el DTT de las muestras de proteínas, se realizó una exclusión molecular en columnas PD-10 G-25. Estas columnas se almacenan en etanol 20% a 4°C. Para realizar el desalado, se lavó la columna con 50 mL de H₂O MQ. A continuación, se equilibró la columna con 50 mL de buffer de gel filtración sin DTT (Tris-HCl pH 8.0, NaCl 0.05 M, glicerol 10% y EDTA 5 mM). Seguidamente, se sembraron 2.5 mL de proteína y se descartaron los 2.5 mL de buffer que eluyeron de la columna. Luego, se pasaron 3.5 mL más de buffer y se recuperaron 3.5 mL de eluato que contienen la proteína en fracciones de 0.5 mL. La columna se continuó lavando con 50 mL de H₂O MQ y finalmente con 50 mL de etanol 20% para su almacenamiento a largo plazo. Las fracciones de proteína recuperadas fueron cuantificadas y mezcladas para obtener la fracción de proteína libre de DTT.

ANEXO C: COMPLEMENTO DE RESULTADOS

a. Secuenciación de OVH1 salvaje

En la Figura D.1 se muestra un cromatograma obtenido para la secuenciación de OVH1 salvaje clonada en el vector pET28 a (+). Cromatogramas de calidad equivalente se obtuvieron para el resto de las construcciones obtenidas en este trabajo.

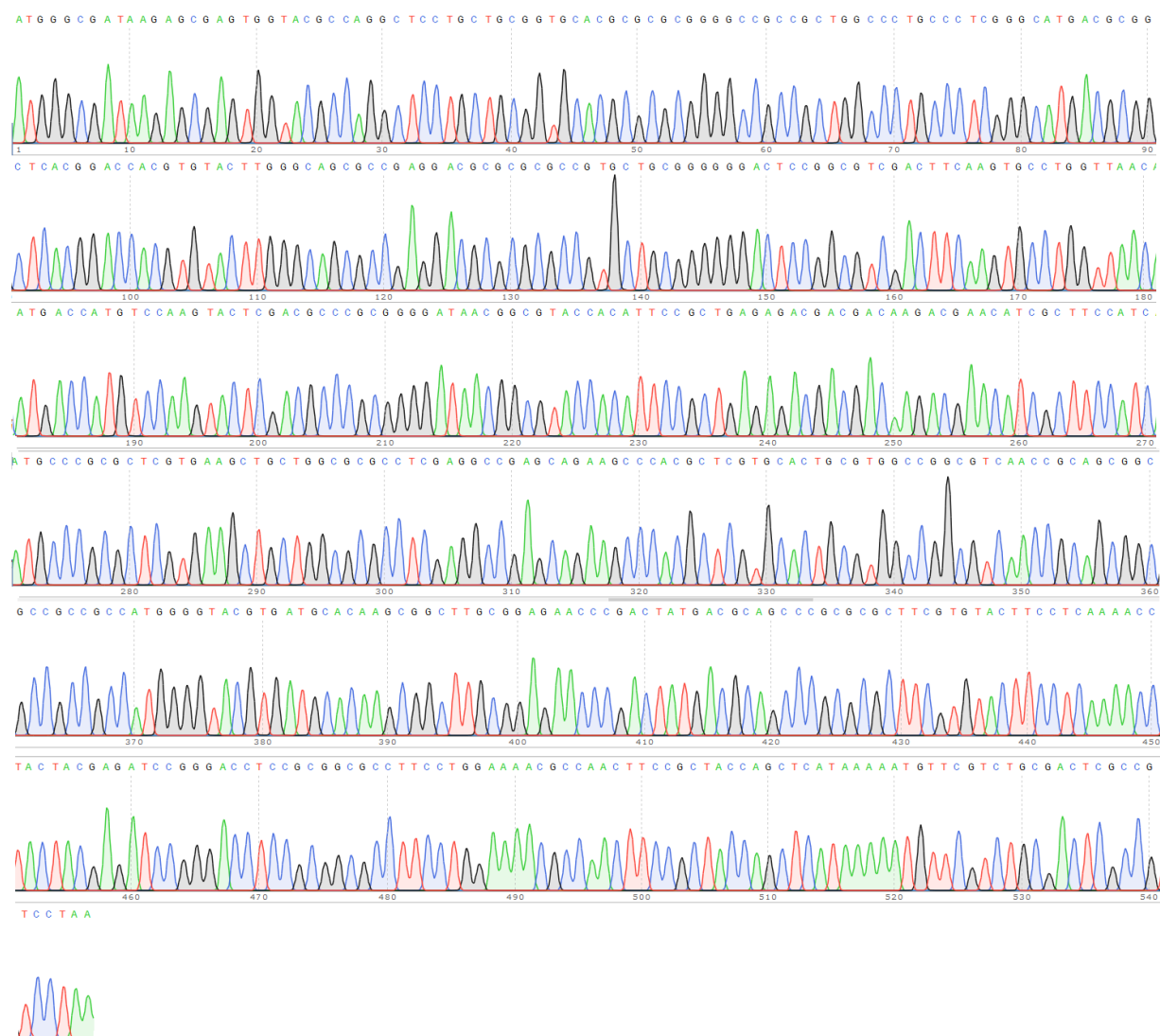


Figura D1. Cromatograma de secuenciación de OVH1 salvaje en pET28a(+)

Se muestra la calidad de los picos obtenidos para la secuenciación de OVH1 salvaje clonada en el vector de expresión. La secuencia completa consta de 546 nucleótidos. Esta secuencia fue confirmada tanto con el cebador T7 promotor como con el cebador T7 terminador. Cromatogramas análogos se analizaron para cada una de las construcciones realizadas en este trabajo. La visualización de los cromatogramas se realizó con el programa Snap Gene Viewer.

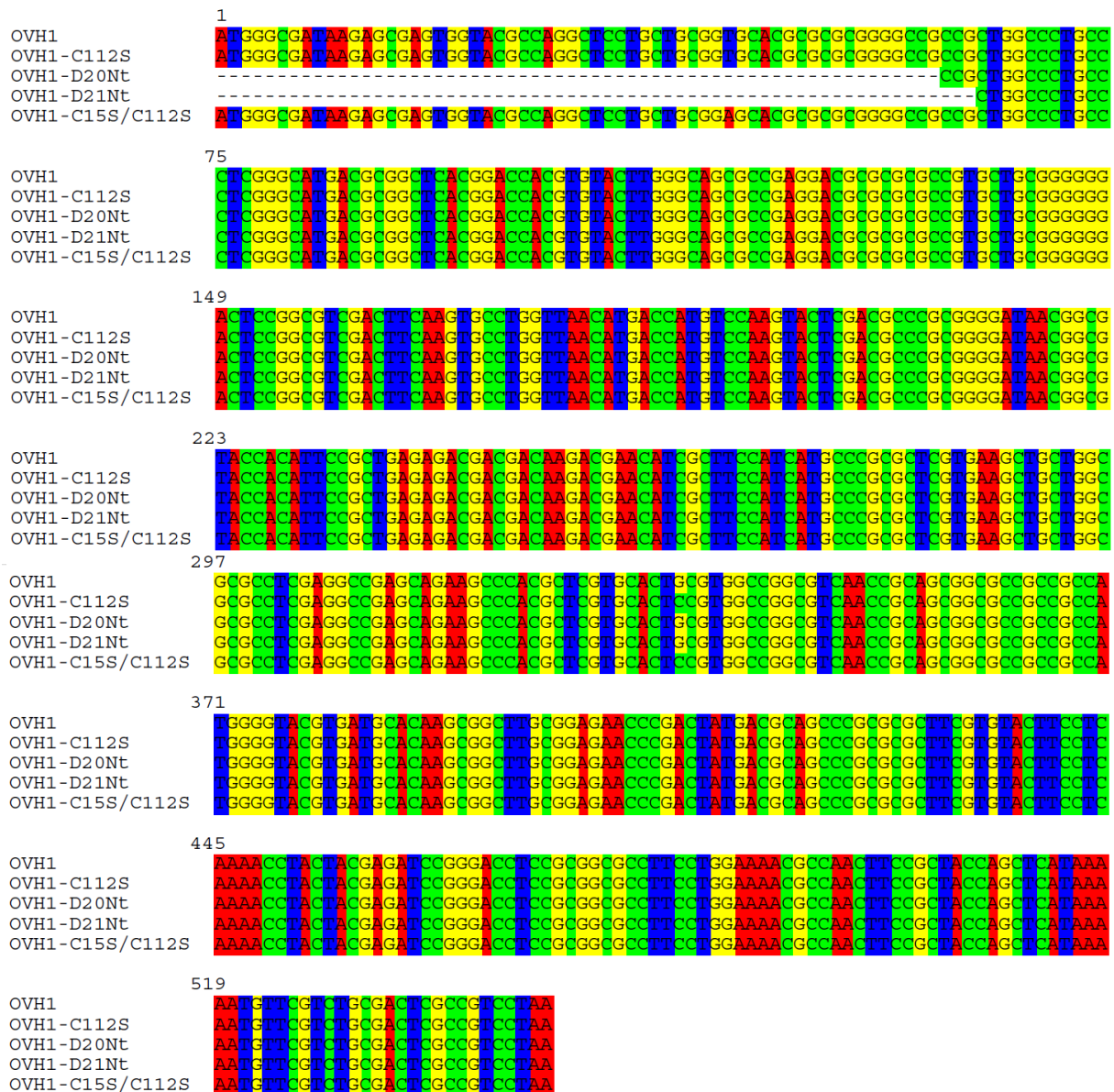


Figura D2. Alineamiento de secuencias de ADN

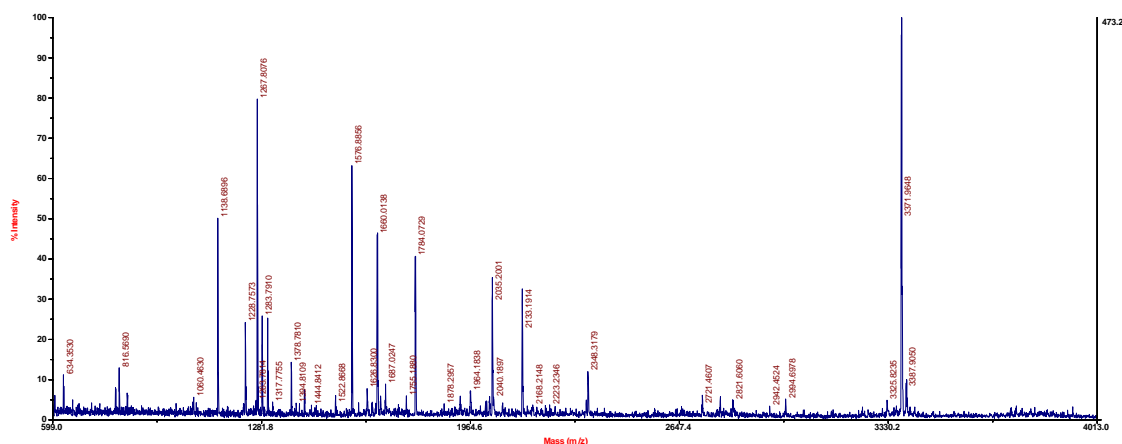
Se presenta el alineamiento de la secuencia de OVH1-salvaje que se muestra en la Figura D1 con la secuencia de todos los mutantes utilizados durante la tesis.

En la Figura D2 se muestra el alineamiento de las secuencias obtenidas para la fosfatasa salvaje y todos los mutantes generados en este trabajo.

b. Análisis por espectrometría de masas

Las bandas de SDS-PAGE conteniendo el dímero en condiciones reductoras y no reductoras, así como la banda del monómero en condiciones reductoras, fueron enviadas analizar por espectrometría de masas, para realizar una identificación de las proteínas y para la búsqueda de señales diferenciales que puedan contener un puente disulfuro en las muestras correspondientes al dímero observado en SDS-PAGE.

4700 Reflector Spec #1 MC=>B C=>NF0.7(BP= 3373.9,473)



Search title :
 Database : NCBI nr 20141114 (52482795 sequences; 18863293126 residues)
 Timestamp : 19 Nov 2014 at 18:40:22 GMT
 Protein hits :

gi 41018544	ORF057 putative protein-tyrosine phosphatase [Orf virus]
gi 695042232	PREDICTED: protein IQ-DOMAIN 14 [Musa acuminata subsp. malaccensis]
gi 573892557	PREDICTED: rho GTPase-activating protein 21-like [Lepisosteus oculatus]
gi 663242328	PREDICTED: tetratricopeptide repeat protein 26 [Calypte anna]
gi 548319757	microcin-processing peptidase 2 [Clostridium sp. CAG:609]
gi 449450207	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: respiratory burst oxidase homolog protein E-like [Cucumis sativus]
gi 492861601	phospholipid N-methyltransferase [Glaciecola pallidula]
gi 489241981	hypothetical protein [Atopobium rimae]
gi 303278990	intraflagellar transport protein 20 [Micromonas pusilla CCMP1545]
gi 357162605	PREDICTED: uncharacterized protein LOC100833951 [Brachypodium distachyon]
gi 67540300	hypothetical protein AN6320.2 [Aspergillus nidulans FGSC A4]
gi 653654949	Thiamin biosynthesis lipoprotein ApbE [Marinobacterium sp. AK27]
gi 493112026	amino acid adenylation enzyme/thioester reductase family protein [Variovorax sp. CF313]
gi 503655490	hypothetical protein [Helicobacter bizzozeronii]
gi 545500409	PREDICTED: A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 18 [Canis lupus familiaris]
gi 563102265	UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase [Mesorhizobium sp. LNJ391B00]
gi 663254255	PREDICTED: peroxisomal coenzyme A diphosphatase NUDT7 [Calypte anna]
gi 493607539	TonB-dependent receptor [Acetobacter tropicalis]
gi 157867295	conserved hypothetical protein [Leishmania major strain Friedlin]
gi 168046403	predicted protein [Physcomitrella patens]

Mascot Score Histogram

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 59 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.

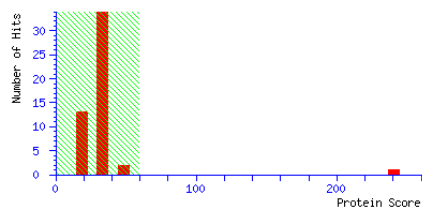
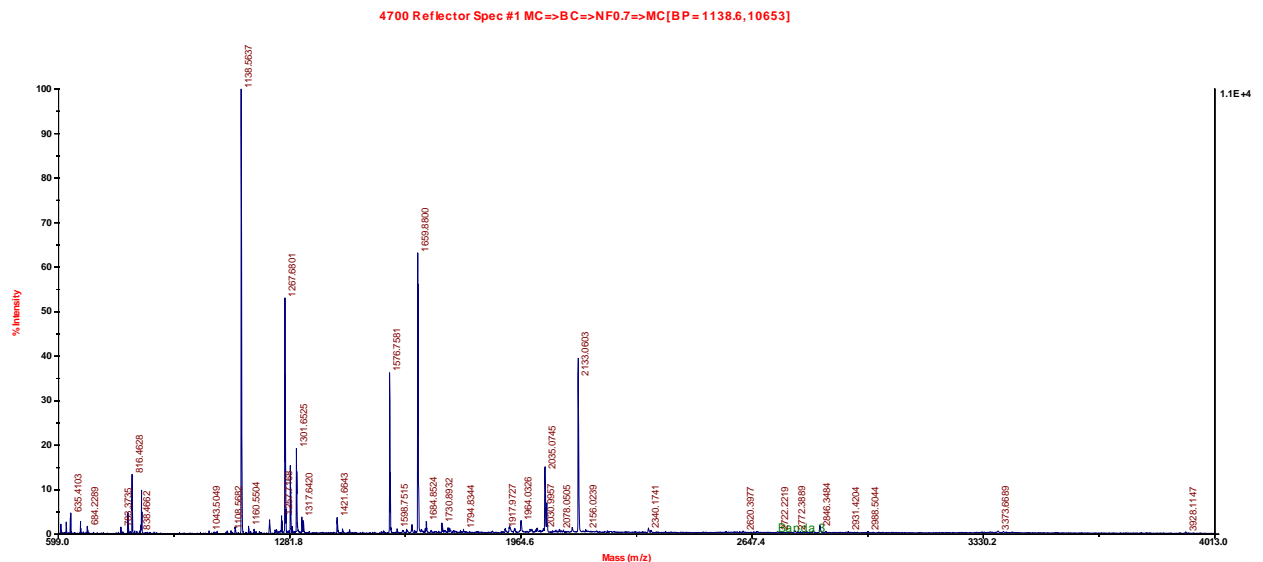


Figura D4. Monómero en condiciones no reductoras

Se presenta el espectro de masas obtenido en modo reflector positivo luego de la digestión trípica de la proteína contenida en la banda correspondiente al monómero en condiciones no reductoras. En el panel inferior se muestra el resultado del análisis utilizando el motor de búsqueda Mascot en la base de datos publica, en el cual se identifica a esta proteína como la fosfatasa en tirosina del virus Orf (www.matrixscience.com)



```

Search title      :
Database         : NCBIInr 20141114 (52482795 sequences; 18863293126 residues)
Timestamp        : 19 Nov 2014 at 18:51:33 GMT
Protein hits     : gi|41018544|ORF057 putative protein-tyrosine phosphatase [Orf virus]
                  gi|380020925|PREDICTED: glutamyl aminopeptidase-like [Apis florea]
                  gi|648552443|membrane protein [Streptomyces sp. FxanaD5]
                  gi|503655490|hypothetical protein [Helicobacter bizzozeronii]
                  gi|489594576|amidohydrolase [Agrobacterium tumefaciens]
                  gi|502783549|MerR family transcriptional regulator [Stackebrandtia nassauensis]
                  gi|684998399|hypothetical protein KU74_06140 [Pectobacterium carotovorum subsp. brasiliense]
                  gi|548319757|microcin-processing peptidase 2 [Clostridium sp. CAG:609]
                  gi|648482496|MFS transporter [Allicyclobacillus pohliae]
                  gi|531989912|trichodiene oxygenase [Fusarium fujikuroi IMI 58289]
                  gi|602540148|hypothetical protein EN978_05810 [Mycobacterium mageritense DSM 44476]
                  gi|651392440|hypothetical protein [Butyrivibrio sp. NC3005]
                  gi|514437514|2-oxopent-4-enoate hydratase [Streptomyces albulus]
                  gi|647625076|hypothetical protein [Sneathiella glossodoripedis]
                  gi|569544209|hypothetical protein NX02_20925 [Sphingomonas sanxanigenens DSM 19645 = NX02]
                  gi|490035237|hypothetical protein [Rhodococcus ruber]
                  gi|532252056|diguanylate cyclase [Marinobacter sp. ES-1]
                  gi|505041445|type I restriction-modification system methyltransferase subunit [Dactylococcopsis salina]
                  gi|667817710|Histidine kinase-like ATPase domain/Stage II sporulation protein E (SpoIIE) [Frankia sp. Allo2]
  
```

Mascot Score Histogram

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 61 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.

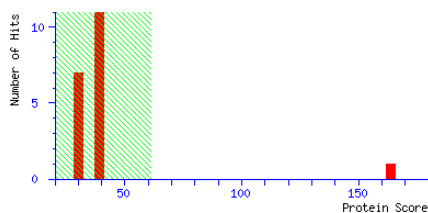


Figura D5. Dímero en condiciones reductoras

Se presenta el espectro de masas obtenido en modo reflector positivo luego de la digestión trípica de la proteína contenida en la banda correspondiente al dímero en condiciones reductoras. En el panel inferior se muestra el resultado del análisis utilizando el motor de búsqueda Mascot en la base de datos publica, en el cual se identifica a esta proteína como la fosfatasa en tirosina del virus Orf (www.matrixscience.com)

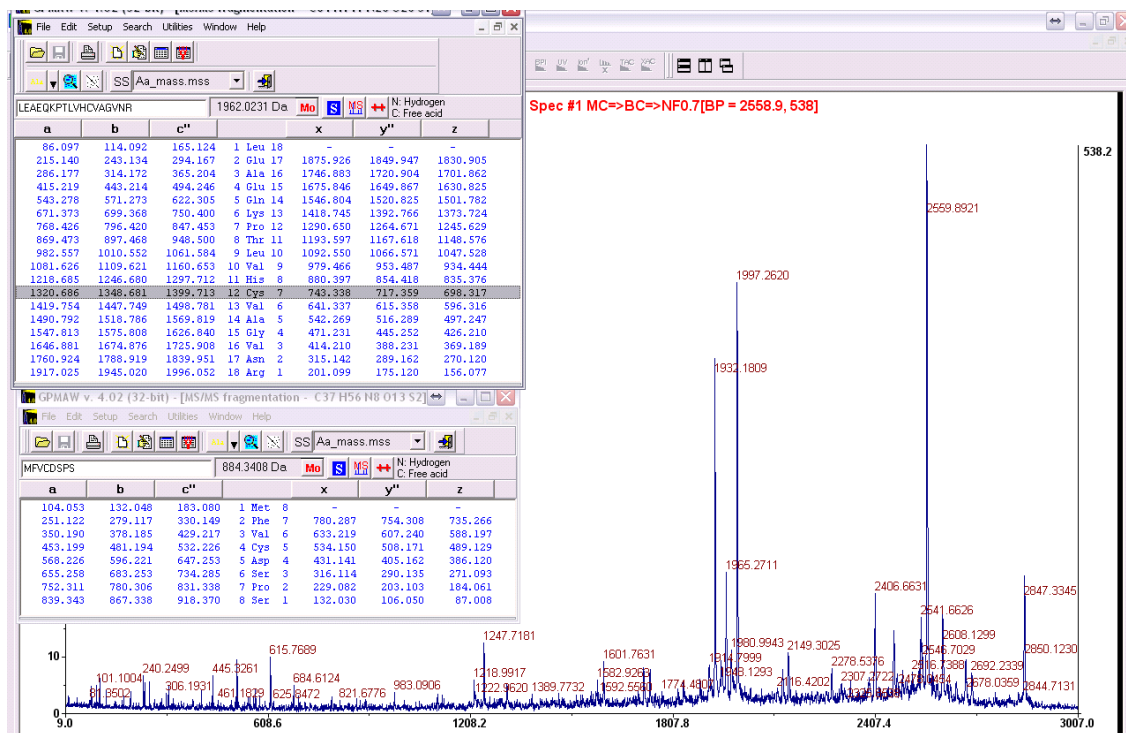
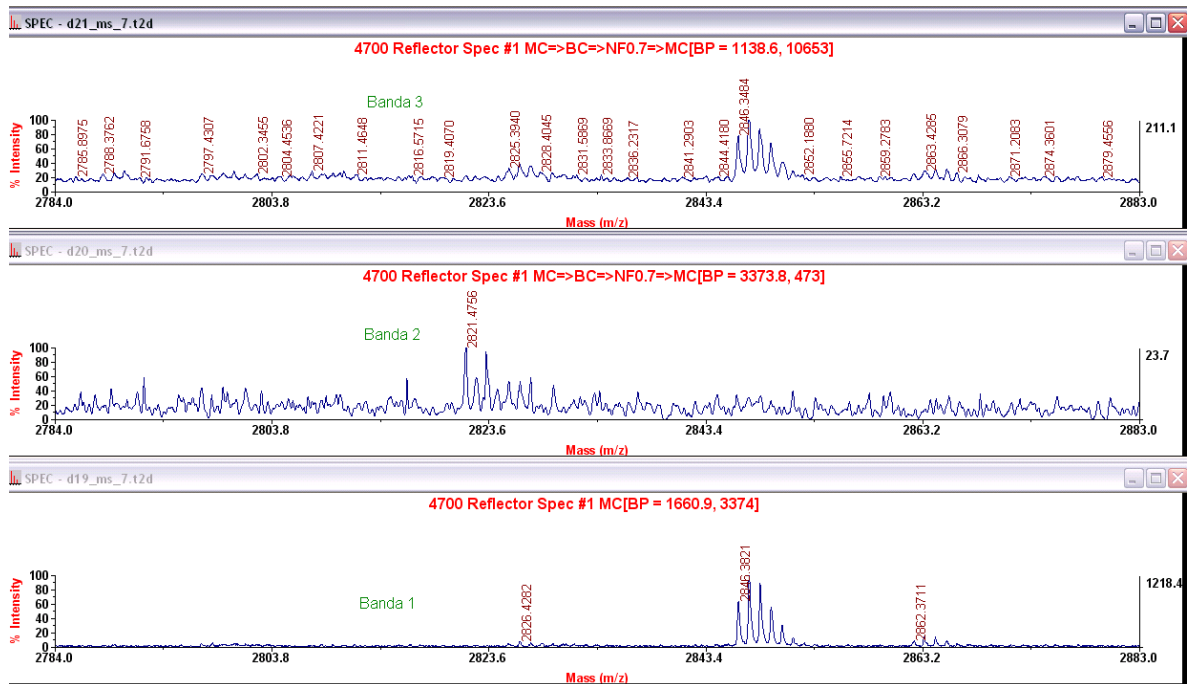


Figura D6. Búsqueda de puentes disulfuro

Para encontrar puentes disulfuro, se analizó la señal diferencial de $m/z = 2846.8$ que está presente para las muestras correspondientes a dímeros (Bandas 1 y 3), pero no para la correspondiente al monómero (Banda 2). Esto se puede observar claramente en el panel superior, donde se muestra el gráfico de Ms para las tres muestras en un rango acotado para mostrar mejor esta señal.

En el panel inferior, se puede observar la fragmentación Ms/Ms de la señal $dm/z = 2846.8$ con las fragmentaciones teóricas de los dos péptidos que la componen, que permitió detectar el puente disulfuro entre la C112 y la C177.

ANEXO D: ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADN: Ácido desoxiribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ATP: *Adenosine Triphosphate* (Trifosfato de Adenosina)

CDS: *Coding sequence* (secuencia codificante)

Ct: Carboxilo terminal

dNTP: desoxiribonucleótido trifosfato

DUSP: *Dual Specificity Phosphatase* (Fosfatasa de Doble Especificidad)

IFN: Interferón

MEM: *Minimum Essential Media* (Medio Mínimo Esencial)

Nt: Amino terminal

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa)

PEG: Polietilenglicol

PTEN: *Phosphatase and tensin homolog*

PTB: *Phosphotyrosine Binding* (de unión a fosfotirosina)

PTK: *Protein Tyrosine Kinase* (Proteína quinasa en tirosina)

PTP: *Protein Tyrosine Phosphatase* (Proteína Fosfatasa en Tirosina)

SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (electroforesis en gel de poliacrilamida con docecil sulfato de sodio)

SH2: *Src Homology 2*, dominio estructuralmente muy conservado en la oncoproteína Src2 y en muchas otras proteínas de transducción de señales intracelulares, de unión a fosfotirosina.