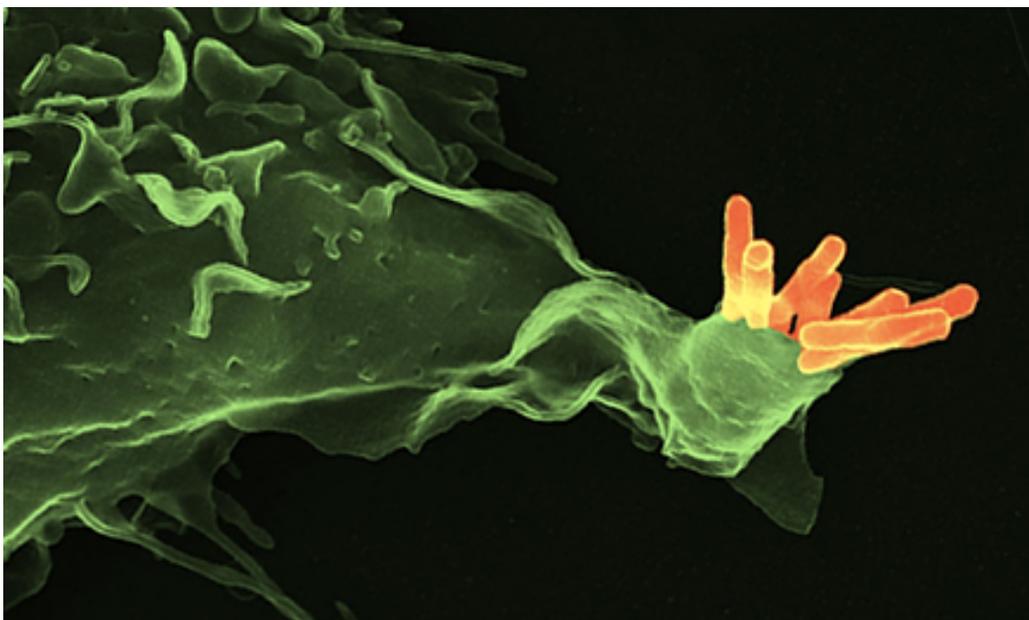


Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

**Fosfatasas en tirosina de *Mycobacterium tuberculosis*:  
avances en la identificación de sustratos  
y posible rol en la adaptación de la bacteria al macrófago**

Mariana Margenat

Orientadoras: Dra. Andrea Villarino  
Dra. Ana María Ferreira



# AGRADECIMIENTOS

---

En primer lugar quiero agradecer a Andrea y a Ana por todo el tiempo que me dedicaron durante la realización de esta tesis, por transmitirme siempre energía para seguir adelante, y por su amistad.

Agradezco el apoyo de todos los integrantes del laboratorio, a mis compañeros de la 305 con quienes empecé este trabajo, en especial a Anne-Marie y a Lucía Rodríguez como integrantes del equipo, a los compañeros de la 314, a Danilo, Susana, Lorena, Juan, Mauri, César, por la buena onda y por alegrar las jornadas en el laboratorio, y a todo el grupo de la Sección Bioquímica.

A las chicas de Inmunología, María, Maite y Valeria por estar siempre dispuestas a ayudarme cuando precisaba ayuda en el cultivo de las THP-1.

A Mabel Berois y a Darío Porley, por ayudarme en poner a punto el modelo de transducción de los macrófagos con el vector viral.

A Federico Carrión, por toda la ayuda durante la realización de los ensayos de SPR, siempre con buena disposición.

Quiero agradecer especialmente a Madelón, por enseñarme a usar el MALDI e introducirme en el mundo de la espectrometría de masa. A todas las compañeras del laboratorio de Espectrometría de masa del IPMon, a Analía, a Maggie por ayudarme con todo el procesamiento de datos, y a Rosario, por toda su ayuda en esta parte del proyecto de identificación por MS.

A Victoria Veroli, mil gracias por ayudarnos con el modelado del acoplamiento molecular entre la PtpA y ECHA humana.

A Karen y a la Dra. Mariela Bollati de la UBC del IPMon por permitirme utilizar el analizador de glucosa y lactato.

A Gerardo Ferrer, por ayudarnos a realizar los ensayos para determinar el pKa de las Cys.

A las agencias financiadoras, ANNI y PEDECIBA.

A los miembros del tribunal, Ana Ramón, Otto Pritsch y Carlos Robello por aceptar ser parte del Tribunal de esta Tesis.

A toda mi familia, a Javier, y a mis hijos Joaquín, Federico y Martín, por apoyarme siempre.

# RESUMEN

---

Existen evidencias que demuestran que las fosfatasa en tirosina (PTPs) de numerosos patógenos intracelulares juegan un papel importante durante la infección, controlando el nivel de fosforilación en tirosina de moléculas claves para la biología de la célula hospedera. De esta forma el patógeno modula diferentes vías de señalización eucariota contribuyendo a la evasión de la respuesta inmune y sobrevive dentro del hospedero. Un ejemplo son las dos únicas fosfatasas en tirosina de *Mycobacterium tuberculosis*, PtpA y PtpB, consideradas factores claves de virulencia. En este trabajo, nos propusimos avanzar en la identificación de nuevos sustratos de estas fosfatasas, como un paso esencial para avanzar en la comprensión del papel que cumplen las mismas en la adaptación de *Mtb* a la célula hospedera. En primer lugar, se optimizaron diversas etapas de la estrategia global de *Substrate Trapping* (ST), ampliamente utilizada para aislar sustratos de PTPs. La misma se basa en generar una fosfatasa mutante en aminoácidos conservados del sitio activo, de forma de retener al sustrato por más tiempo en este sitio, facilitando así su aislamiento. Se generaron los mutantes para la PtpA y PtpB, y se profundizó en la caracterización estructural y funcional de uno de ellos, el mutante PtpA-D126A. Dicha caracterización demostró que la mutación no introdujo grandes alteraciones en la estructura de la fosfatasa y que el mutante presentó las características cinéticas adecuadas para su utilización en el aislamiento de potenciales sustratos. Utilizando este mutante y ajustando las condiciones de lavado y elución que fueron optimizadas previamente con el objetivo de minimizar el aislamiento de interactores inespecíficos, se aislaron cuatro nuevos potenciales sustratos de PtpA a partir de extractos de macrófagos enriquecidos en P-Tyr. Entre ellos, tres proteínas sintetizadas en el citosol y cuyo destino final es la mitocondria, la subunidad alfa (ECHA) de la proteína trifuncional (TFP), la subunidad alfa de la ATP sintasa (ATPA) y la sulfuro quinona oxidoreductasa (SQRD), y una cuarta proteína exclusivamente citosólica, la fosfofructoquinasa (PFK). En este trabajo nos focalizamos en la TFP humana (ECHA/ECHB), enzima central de la beta-oxidación de ácidos grasos, habiendo logrado demostrar que *in vitro* interacciona con la PtpA a través del sitio activo y es sustrato de esta última. Llamó la atención que todos los potenciales sustratos identificados se encuentran directa o indirectamente vinculados con el metabolismo energético celular. Se puso en marcha un modelo de transducción de macrófagos, derivados de la línea celular THP-1 humana, con un vector viral que permite la sobre-expresión transitoria de la PtpA bacteriana en las células. El objetivo fue utilizar este modelo para evaluar el efecto de la PtpA en la funcionalidad de vías metabólicas centrales, tratando de identificar posibles transiciones metabólicas, así como el efecto de la PtpA sobre las propiedades inflamatorias de los macrófagos. En un primer ensayo de transducción con el vector viral que expresa PtpA conjugado a la EGFP y con el vector control (EGFP), obtuvimos un porcentaje de transducción del orden de 27%, que esperamos sea posible aumentar a futuro. En estas condiciones, evaluamos el efecto de la transducción sobre los niveles de glucosa, lactato, y de las interleuquinas IL-1beta e IL-6 en los sobrenadantes de cultivo celular. No se registraron cambios en los niveles de glucosa y lactato, pero si un aumento notorio en los niveles de IL-1beta e IL-6, del orden de 4 y 9 veces, respectivamente. En conjunto, los resultados estimulan a seguir investigando el rol de la PtpA de *Mtb* en el metabolismo lipídico del macrófago, en especial examinando cómo se ve afectada la actividad o localización de la TFP una vez desfosforilada por PtpA, y como esto podría influir en la disponibilidad de ácidos grasos y en la respuesta inflamatoria del macrófago.

# ABREVIATURAS

---

A o Ala:	Alanina
Abs:	Absorbancia
ACN:	acetoniitrilo
ADN:	ácido desoxirribonucleico
ARN:	ácido ribonucleico
ARNm:	ARN mensajero
ATB/AM:	antibiótico/antimicótico
ATPA:	subunidad alfa de la ATPsintasa
BCG :	Bacille Calmette-Guérine
BSA:	seroalbúmina bovina
C o Cys:	cisteína
CD:	dicroísmo circular
D o Asp:	aspartato
DTPy:	4-ditiopiridina
DTT:	ditiotreitól
DO:	densidad óptica
ECHA (HADHA):	subunidad $\alpha$ de la proteína trifuncional humana
ECHB:	subunidad $\beta$ de la proteína trifuncional humana
EDTA :	ácido etilendiaminotetraacético
FA:	fosfatasa alcalina
GSK3 $\alpha$ :	<i>Glycogen Synthase Kinase 3, subunit alpha</i>
HEPES:	ácido 4-(2-hidroxietil) -1-piperazina-etano sulfónico
HRP:	del inglés <i>horseradish peroxidase</i>
hs:	horas
IAA:	iodoacetamida
IPTG:	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
kDa:	kilodalton
K6PP o PFK:	6-fosfofructoquinasa
LB:	<i>Lysogeny broth</i>
LMW-PTP:	Proteínas fosfatasas de tirosina de bajo PM
LPS:	Lipopolisacárido
MALDI-TOF:	del inglés <i>matrix assisted light desorption-time of flight</i>
mBBr:	monobromobimano
MDR-TB:	cepa multi-resistentes de TB
MES:	ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
min:	minutos

<i>Mtb</i> :	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> :	ortovanadato de sodio
NHS:	N-Hidroxisuccinimida
PBS:	buffer fosfato salino
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
PMSF:	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PMA:	éster de forbol miristato
<i>p</i> -NP:	<i>para</i> -nitro fenol
<i>p</i> -NPP:	<i>para</i> -nitro fenil fosfato
PTP:	proteína fosfatasa en tirosina
R o Arg:	Arginina
S o Ser:	serina
s:	segundo
SBF:	suero bovino fetal
SDS-PAGE:	electroforesis en geles de poliacrilamida
SPR:	Resonancia Plasmónica de Superficie
SQRD:	sulfuro quinona oxidoreductasa
ST:	<i>substrate trapping</i>
T o Thr:	Treonina
TB:	tuberculosis
TBS:	Tris-Cl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM
TBS-T:	TBS - Tween-20 al 0.1%
TEMED:	N,N,N',N'-Tetrametiletildiamine
TFA:	ácido trifluoroacético
TFP:	proteína trifuncional humana
TRIS:	tris(hidroximetil) aminometano
Tritón X-100:	t-octil- fenoxipolietoxietanol
Tween 20:	polisorbato 20
VPS33B:	<i>Vacuolar Protein sorting 33B</i>
W o Trp:	triptófano
WB:	<i>western blot</i>
WHO:	Organización Mundial de la Salud
wt:	<i>wild type</i> , tipo salvaje
Y o Tyr:	Tirosina

# ÍNDICE GENERAL

## Capítulo 1. Introducción

<b>1.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....</b>	<b>5</b>
<b>1.2. Interacción entre <i>Mtb</i> y el hospedero .....</b>	<b>10</b>
1.2.1. Entrada de <i>Mtb</i> en los macrófagos .....	10
1.2.2. Mecanismos de evasión de <i>Mtb</i> .....	12
1.2.3. Cambios en la expresión y síntesis de proteínas de <i>Mtb</i> durante la infección .....	15
1.2.4. Cambios transcripcionales y proteómicos del macrófago durante la infección con <i>Mtb</i> .....	19
<b>1.3. Las fosfatasa en tirosina como factores de virulencia bacterianos.....</b>	<b>22</b>
1.3.1. PtpA y PtpB, las dos únicas fosfatasas de tirosina de <i>Mtb</i> .....	24
1.3.2. Características estructurales de PtpA y PtpB .....	25
1.3.2.1. PtpA, una fosfatasa de la familia LMW-PTP .....	25
1.3.3. Sustratos de las PtpA y PtpB: hacia la elucidación de su papel en la biología de <i>Mtb</i> .....	29
<b>1.4. Objetivos y abordaje experimental .....</b>	<b>32</b>
1.4.1. Objetivo general .....	32
1.4.2. Objetivos específicos .....	32
1.4.3. Estrategia experimental .....	33

## Capítulo 2. Materiales y Métodos

<b>2.1. Materiales.....</b>	<b>34</b>
2.1.1. Reactivos químicos y bioquímicos .....	34
2.1.2. Líneas celulares .....	35
2.1.2.1. Cultivo de monocitos de la línea THP-1 humana .....	35
2.1.2.2. Cultivo de la línea celular Vero 2.2.....	35
<b>2.2 . Métodos generales de biología molecular .....</b>	<b>35</b>
2.2.1. Preparación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> .....	35
2.2.1.2. Obtención de células de <i>E. coli</i> quimio-competentes .....	35
2.2.1.3. Obtención de células <i>E.coli</i> XL-1 blue y <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ electro-competentes.....	36
2.2.2. Transformación de células de <i>E. coli</i> .....	36
2.2.2.1. Transformación química de <i>E. coli</i> con los vectores de interés .....	36
2.2.2.2 Transformación de células por electroporación .....	37
2.2.3. Purificación de los plásmidos conteniendo el gen de interés .....	37
2.2.4. Cuantificación de ácidos nucleicos .....	38
2.2.5. Electroforesis en geles de agarosa .....	38

<b>2.2. Métodos generales de bioquímica de proteínas .....</b>	<b>38</b>
2.2.1. Determinación de la concentración de proteínas .....	38
2.2.2. Electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	39
2.2.3. Electrotransferencia e inmunodetección (inmunoblot) .....	39
<b>2.3. Obtención de los mutantes de las fosfatasa PtpA y PtpB.....</b>	<b>40</b>
<b>2.4. Producción de las proteínas recombinantes .....</b>	<b>43</b>
2.4.1. Expresión de las proteínas recombinantes en <i>E. coli</i> BL21 (DE3) .....	43
2.4.2. Purificación de las proteínas recombinantes por afinidad a metales .....	43
2.4.3. Purificación de las proteínas por cromatografía de exclusión molecular .....	44
2.5. Caracterización de PtpA-wt y del mutante PtpA-D126A a ser utilizado en la estrategia de <i>Substrate Trapping</i> .....	45
2.5.1. Análisis del estado de oligomerización por cromatografía de exclusión molecular analítica .....	45
2.5.2. Determinación de la actividad fosfatasa y de los parámetros cinéticos. ....	45
2.5.3. Determinación del pK <sub>a</sub> de las cisteínas de PtpA-wt y PtpA-D126A .....	46
2.5.4. Medición de la fluorescencia del triptófano .....	47
<b>2.6. Preparación de extractos de macrófagos (derivados de la línea THP-1) enriquecidos en proteínas solubles .....</b>	<b>48</b>
<b>2.7. Estudio por resonancia plasmónica de superficie (SPR) de la interacción entre PtpA-wt o PtpA-D126A y las proteínas del extracto de macrófagos .....</b>	<b>48</b>
<b>2.8. Metodología <i>Substrate Trapping</i> para el aislamiento de potenciales sustratos de PtpA .</b>	<b>51</b>
<b>2.9. Identificación de proteínas por espectrometría de masa .....</b>	<b>53</b>
<b>2.10. Validación <i>in vitro</i> de los potenciales sustratos eucariotas de PtpA de <i>M. tuberculosis</i>.</b>	<b>55</b>
2.10.1. Purificación de los candidatos a sustrato de PtpA .....	55
2.10.1.1. Inmunoprecipitación de la proteína trifuncional (TFP o ECHA/ECHB) .....	55
2.10.1.2. Inmunoprecipitación de la proteína 6-fosfofructoquinasa (K6PP).....	56
2.10.1.3. Inmunoprecipitación de la proteína ATP sintasa subunidad alfa (ATPA).....	57
2.10.2. Estudio por SPR de la interacción entre la TFP (ECHA/ECHB) y la PtpA de <i>Mtb</i> .....	58
2.10.3. Desfosforilación <i>in vitro</i> de la TFP (ECHA/ECHB) con PtpA-wt .....	59
<b>2.11. Evaluación del efecto de la actividad PtpA de <i>Mtb</i> en los macrófagos humanos .....</b>	<b>59</b>
2.11.1. Producción del plásmido amplicón pHSV1-IRES-PtpA-wt .....	61
2.11.2. Producción y purificación del bácido .....	62
2.11.4. Transducción de los macrófagos con los vectores amplicón obtenidos .....	65
2.11.4.1. Optimización del número de células a ser utilizadas .....	65
2.11.4.2. Optimización del medio de cultivo a utilizar .....	65
2.11.4.3. Ensayo de transducción .....	66

## Capítulo 3. Resultados

<b>3.1. Obtención y caracterización de los mutantes de <i>Substrate Trapping</i> (ST)</b> .....	<b>69</b>
3.1.1. Obtención de los mutantes de ST .....	69
3.1.2. Caracterización estructural y funcional del mutante PtpA-D126A.....	75
3.1.2.1. Análisis del grado de oligomerización por cromatografía de exclusión molecular analítica	75
3.1.2.2. Medición de la fluorescencia intrínseca del triptófano .....	76
3.1.2.3. Caracterización funcional del mutante PtpA-D126A .....	77
<b>3.2. Caracterización de la interacción entre PtpA y los componentes del extracto de macrófagos</b> .....	<b>81</b>
3.2.1. Obtención de extractos de macrófagos derivados de la línea celular THP-1 .....	81
3.2.2. Estudio de la interacción entre PtpA-D126A y las proteínas del extracto de macrófagos por resonancia plasmónica de superficie (SPR) .....	83
<b>3.3. Identificación de potenciales sustratos eucariotas de PtpA de <i>Mtb</i></b> .....	<b>87</b>
3.3.1. Preparación de la matriz para el ST.....	87
3.3.2. Aislamiento e identificación de potenciales sustratos de PtpA mediante ST.....	89
3.3.2.1. Elución con buffer disociante.....	89
3.3.2.2. Elución a pH ácido.....	93
3.3.3. Identidad de los potenciales sustratos de PtpA identificados.....	98
<b>3.4. Hacia una validación <i>in vitro</i> de los candidatos a sustratos identificados</b> .....	<b>100</b>
3.4.1. Evaluación preliminar de la fosforilación en tirosina de los potenciales sustratos de PtpA .....	100
3.4.2. Validación de la TFP humana como sustrato de PtpA de <i>Mtb</i> .....	103
3.4.3. Ensayos realizados para lograr la validación de los otros candidatos a sustratos de la PtpA ...	108
3.4.4. Hacia la obtención de los posibles sustratos en forma recombinante.....	111
<b>3.5. Evaluación de un posible rol de la actividad PtpA de <i>Mtb</i> en la modulación del metabolismo energético del macrófago</b> .....	<b>113</b>
3.5.1. Transducción de los macrófagos con los vectores amplicón.....	114
3.5.1.1. Obtención del vector viral HSV-1 amplicón .....	115
3.5.1.2. Optimización del número de macrófagos y medio de cultivo a ser utilizado para la medición de niveles de glucosa y lactato.....	116
3.5.1.3. Transducción del vector viral en los macrófagos humanos .....	118

## Capítulo 4. Discusión

<b>4.1. Mejoras introducidas en la estrategia global de ST</b> .....	<b>125</b>
<b>4.2. Sustratos de PtpA: hacia la elucidación del papel de esta fosfatasa en la biología de <i>Mtb</i></b> .....	<b>128</b>
4.2.1. Sustratos de PtpA ya reportados .....	128
4.2.2. TFP humana como sustrato de la PtpA de <i>Mtb</i> .....	131
4.2.3. SQRD, ATPA y PFK como potenciales sustratos de PtpA .....	133

4.2.4. La mitocondria, blanco de patógenos intracelulares .....	135
<b>4.3. Avances para el estudio de la modulación del fenotipo de macrófagos por PtpA.....</b>	<b>136</b>
<b>Referencias Bibliográficas.....</b>	<b>141</b>

## **ANEXOS**

<b>ANEXO 1.</b> Obtención de los mutantes PtpA-C11S y PtpB-C160S.....	152
<b>ANEXO 2.</b> Confirmación de la identidad de PtpA de <i>Mtb</i> por MALDI-TOF-MS.....	154
<b>ANEXO 3.</b> Determicación del pKa de las Cys de PtpA y PtpA-D126A.....	156
<b>ANEXO 4.</b> Detalle de la identificación por Nano-LC-MS de los posibles sustratos de PtpA. ....	157
<b>ANEXO 5.</b> Identificación de potenciales sustratos eucariotas de PtpA de <i>Mtb</i> en un extracto sin IAA...160	
<b>ANEXO 6.</b> Análisis de la fracción obtenida mediante IP con el Ac anti-TFP(ECHA/ECHB) a partir de extractos de macrófagos.....	161
<b>ANEXO 7.</b> Determinación de la constante de interacción entre PtpA y la TFP(ECHA/ECHB).....	162
<b>ANEXO 8.</b> Obtención del vector viral HSV-1 amplicón.....	164
<b>ANEXO 9.</b> Artículo publicado en la revista Scientific Reports (Margenat <i>et al.</i> 2015).....	168

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

---

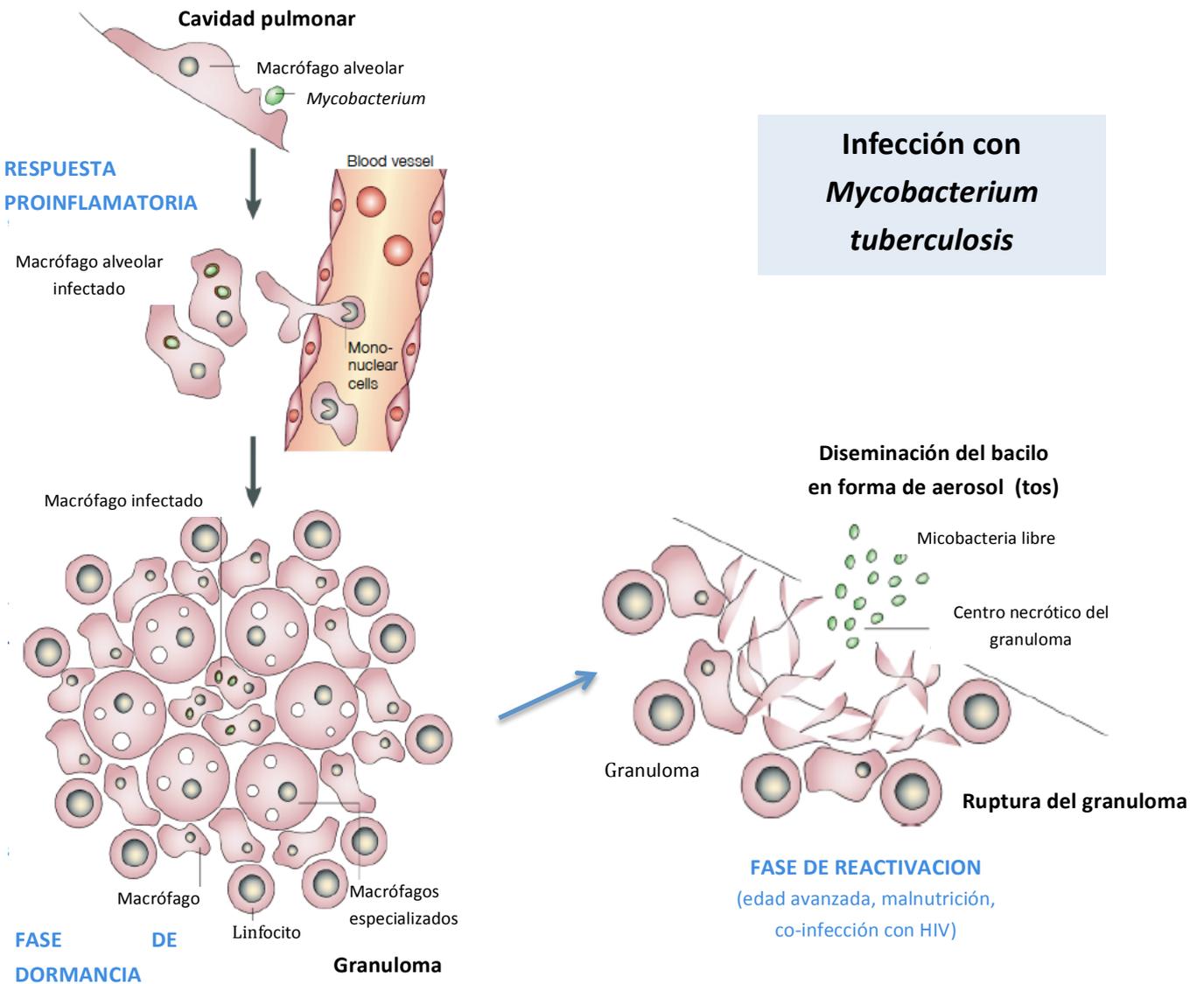
La señalización celular mediada por fosforilación/defosforilación controla fenómenos como la adhesión celular, el metabolismo, la división celular y la proliferación. En particular, durante la infección por bacterias intracelulares, la desfosforilación de tirosinas en moléculas claves para la biología de la célula hospedera parece tener relevancia en el éxito de la infección. Esta desfosforilación es llevada adelante por fosfatasas en tirosina (PTPs). Nuestro grupo ha trabajado desde hace años en las propiedades bioquímicas de las dos únicas PTPs de *Mycobacterium tuberculosis*, PtpA y PtpB, con el objetivo de elucidar su importancia en la adaptación de la bacteria al hospedero. En esta tesis nos interesó profundizar en la búsqueda de nuevos sustratos eucariotas. En este contexto comenzaremos desarrollando los antecedentes en relación con la biología de *Mycobacterium*, centrándonos en los mecanismos asociados a la adaptación, los cambios transcripcionales y proteómicos que ocurren en *Mtb* y en el macrófago durante la infección. Luego, describimos las propiedades bioquímicas de las PTPs de *Mtb* y los sustratos hasta ahora reportados.

### 1.1. *Mycobacterium tuberculosis*

*Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) es el agente causal de la tuberculosis (TB), enfermedad infecto-contagiosa que ha sido declarada de emergencia mundial por la Organización Mundial de la Salud (WHO, del inglés *World Health Organization*) en 1993. *Mtb* es una bacteria aeróbica y patógena intracelular, identificada por Robert Koch en 1882 como el agente causante de la enfermedad, descubrimiento por el cual recibió el premio Nobel de Fisiología en 1905. *Mtb* afecta principalmente los pulmones (TB pulmonar), pero también puede afectar otros órganos (TB extrapulmonar). La enfermedad se propaga a través del aire cuando una persona que padece TB pulmonar activa, tose y expulsa la bacteria en forma de aerosol. Las bacterias que son inhaladas en forma de pequeñas gotas, llegan a los alvéolos pulmonares donde son fagocitadas principalmente por los macrófagos alveolares (Figura 1.1). El riesgo de que un individuo se infecte depende del grado de contacto con la persona enferma, de la carga bacteriana inhalada y de su estado inmunológico. En la primera etapa de infección, *Mtb* se replica intracelularmente dentro de los macrófagos. En la mayoría de los individuos infectados, se desarrolla una respuesta inmune celular efectiva entre las 2-8 semanas luego de la infección, que impide que la bacteria se siga multiplicando. Se forma una estructura compleja y ordenada llamada granuloma, que consiste en un núcleo de macrófagos infectados y células necróticas producto de la infección, rodeado por una capa de células especializadas derivadas de los

macrófagos, conocidas como células gigantes multinucleadas, células espumosas y células epiteloides. Por fuera de esta capa, se encuentran otras células del sistema inmune principalmente linfocitos T efectores, que se rodean de tejido fibroso, y que contribuyen a limitar la replicación y propagación de la bacteria. En general, una baja proporción de las personas infectadas con *Mtb* desarrollan la enfermedad.

**INHALACIÓN DEL BACILO**



**Figura 1.1.** Ciclo de vida de *Mycobacterium tuberculosis*. Imagen adaptada del trabajo publicado por Russell en Nature Reviews Molecular Cell Biology (Russell 2001).

*Mtb* es capaz de evadir el sistema inmune logrando sobrevivir en el hospedero en un estado no replicativo, normalmente denominado latencia. Durante este período la persona no presenta síntomas de la enfermedad, y tampoco transmite la infección. *Mtb* puede permanecer en este

estado de latencia por muchos años hasta su reactivación debido a la edad avanzada de la persona infectada, malnutrición u otras condiciones que comprometen el sistema inmune como la co-infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV).

La vacuna existente contra la tuberculosis es la Bacille Calmette-Guérine (BCG), empleada por primera vez en humanos en 1921, sin embargo actualmente es efectiva principalmente en niños, ya que en adultos el porcentaje de protección varía entre 0 a 80%. Sin tratamiento, la mortalidad de TB es alta. En el año 1940 se desarrollaron las primeras drogas efectivas contra la enfermedad, y a partir del año 1960 estuvo disponible la droga anti-TB de primera línea más efectiva, la rifampicina. Actualmente, el tratamiento recomendado contra la TB combina el uso de por lo menos cuatro antibióticos de primera línea durante un período de seis meses: se basa en una fase inicial de 2 meses que combina el uso de isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida (Tabla 1.1); y una segunda fase del tratamiento que tiene una duración de 4 meses y combina sólo el uso de isoniazida y rifampicina.

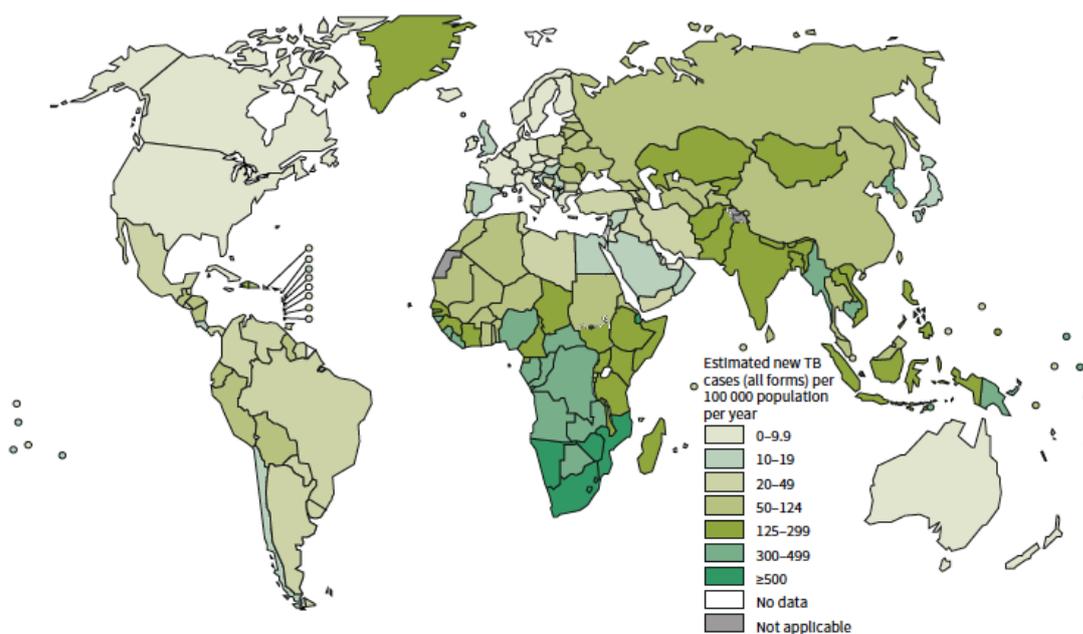
**Tabla 1.1.** Quimioterapia actual contra la Tuberculosis.

Antibiótico	Blanco/Mecanismo	Resistencia
Rifampicina	Se une a la ARN polimerasa micobacteriana bloqueando la elongación del ARN que está siendo sintetizado.	Asociada a una mutación en el gen de la subunidad $\beta$ de la ARN polimerasa (gen <i>rpoB</i> ).
Isoniazida	Interfiere con numerosas vías metabólicas de <i>Mtb</i> . La isoniazida entra a la bacteria por difusión y es activada por la enzima catalasa-peroxidasa (KatG) de <i>Mtb</i> generándose una amplia variedad de especies reactivas con actividad bactericida que afectan la síntesis de ácido micólico, dañan el ADN, oxidan lípidos, y alteran el metabolismo del NAD <sup>+</sup> .	Asociada a mutaciones en los genes <i>katG</i> , <i>inhA</i> (NADH enoil acil carrier proteína reductasa), <i>kasA</i> (cetoacil ACP sintasa), <i>ndh</i> (NADH deshidrogenasa), <i>ahpC</i> (hidroperóxido reductasa).
Etambutol	Interfiere con la síntesis e integridad de la pared celular de la micobacteria inhibiendo las arabinosil transferasas codificadas por el locus <i>embCAB</i> esencial para la síntesis de arabinogalactano ( <i>EmbA</i> y <i>EmbB</i> ) y lipoarabinomannano ( <i>EmbC</i> ).	Asociada a mutaciones en el locus <i>embCAB</i> , principalmente en <i>embB</i> .
Pirazinamida	Este antibiótico es activado a ácido pirazinoico (POA), por la enzima pirazinamidasa-nicotinamidasa de <i>Mtb</i> codificada por el gen <i>pncA</i> . Uno de los blancos es la proteína ribosomal RpsA, una proteína necesaria para el ensamblado y estabilidad de los ribosomas en la traducción. Estudios recientes indican que la enzima L-aspartato $\alpha$ -decarboxilasa codificada por el gen <i>panD</i> , también sería un nuevo blanco involucrado en la acción de PZA. Esta enzima participa en la síntesis del pantotenato (Vitamina B5), requerida para la síntesis de coenzima A, una molécula central en el metabolismo energético.	Asociada a mutaciones en el gen <i>pncA</i> , aunque también mutaciones en el gen <i>rpsA</i> y <i>panD</i> están asociados con resistencia a la droga.

Tabla generada con información extraída de Shi *et al* 2007 (Shi et al. 2007) y Borssier *et al* 2015 (Brossier et al. 2015).

Este tratamiento es exitoso en más del 85% de los casos, sin embargo esta terapia larga y de difícil implementación ha contribuido a la aparición de cepas multi-resistentes (del inglés *multidrug-resistant*, MDR) resistentes a isoniazida y rifampicina (las drogas más eficaces para la TB) y cepas ultra-resistentes (*extreme-drug resistant*, EDR) a todas las drogas utilizadas actualmente. Para la mayoría de los pacientes con MDR-TB, los protocolos recomendados por la WHO tienen una duración de 20 meses y la probabilidad de éxito del tratamiento es mucho menor (Who 2014).

La TB es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial, los últimos datos indican que en el año 2013, se reportaron cerca de 9 millones de nuevos casos de TB a nivel mundial, y alrededor de 1.5 millones de personas murieron debido a esta enfermedad (Global tuberculosis report 2014, who; www.who.int) (Who 2014). En la Figura 1.2 se muestra la distribución a nivel mundial de la tasa de incidencia de TB durante el año 2013, definida como el número de nuevos casos de TB por cada 100.000 habitantes.

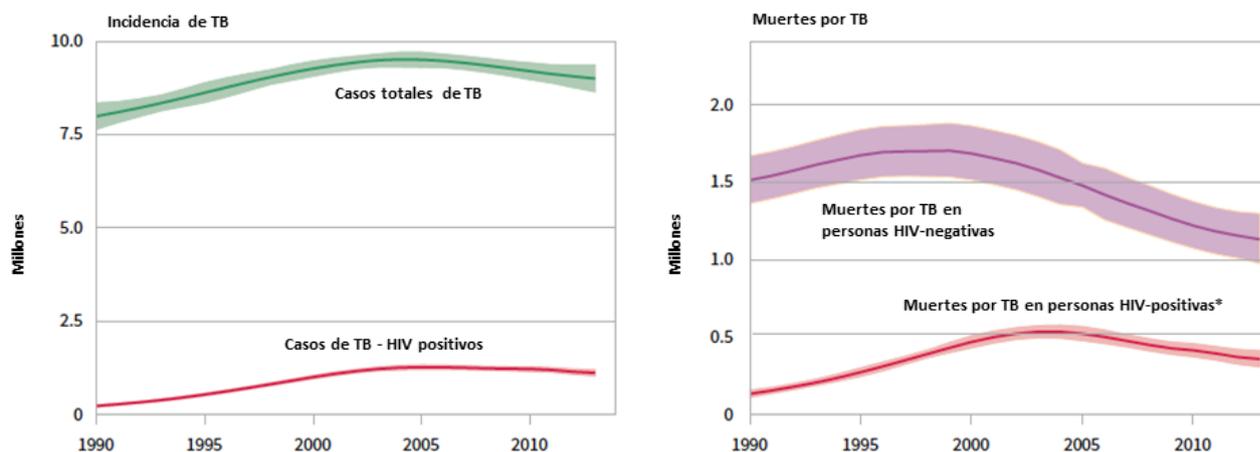


**Figura 1.2.** Tasa de incidencia de TB cada 100.000 habitantes, estimada por la OMS en el año 2013 (Adaptada de Global tuberculosis control WHO: report 2014) (Who 2014).

Las tasas de incidencia más altas se encuentran en África y Asia, generalmente en países de bajos ingresos. Los países con mayor incidencia son Mozambique, Sudáfrica, y Zimbawe, con más de 500 casos por 100 mil habitantes. La mayoría de los países en la región de las Américas tienen tasas menores a 50 por 100 mil habitantes por año, y en promedio es la región con menor incidencia de TB. En Uruguay se diagnostican en la actualidad algo más de 600 nuevos casos de TB por año ([www.chlaep.org.uy](http://www.chlaep.org.uy)), lo cual corresponde a una tasa de incidencia de

aproximadamente 20 casos por cada 100 mil habitantes. Las zonas con mayor incidencia son las más pobladas, Montevideo, Canelones, Maldonado, y las zonas fronterizas con Brasil.

La WHO desarrolló una estrategia global para detener la tuberculosis (*Stop TB Strategy*) en el período 2006-2015. La estrategia global planteó como meta reducir en 2015 la prevalencia y las muertes por TB en un 50% respecto a los valores iniciales de 1990; y para el año 2050 eliminar la TB como un problema de salud mundial (definido como < 1 caso por 1 millón de habitantes por año). La estrategia plantea asegurar el acceso universal a la atención de alta calidad para todos los pacientes con TB. La estrategia plantea: (i) garantizar un compromiso político con financiación adecuada y sostenida; (ii) asegurar la detección temprana de casos mediante pruebas bacteriológicas de calidad garantizada; (iii) proporcionar un tratamiento estandarizado con supervisión y apoyo al paciente, evitando que estos abandonen el tratamiento; (iv) asegurar un sistema eficaz de suministro y gestión de medicamentos; (v) monitorear y evaluar el desempeño e impacto de las acciones de control; (vi) abordar la co-infección TB/HIV, la MDR-TB y las necesidades de las poblaciones pobres y vulnerables; (vii) posibilitar y promover investigaciones para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico, medicamentos y vacunas. A nivel mundial, la infección y las muertes por TB se están controlando (Figura 1.3), y la meta de detener y comenzar a reducir la incidencia de tuberculosis para 2015 se ha alcanzado casi globalmente. La tasa de incidencia disminuyó en un promedio de 1.5% por año entre 2000 y 2013. Globalmente, en el año 2013 la tasa de mortalidad (muertes por 100.000 habitantes) cayó en un 45% desde 1990 y la tasa de prevalencia cayó en un 41% desde 1990.



**Figura 1.3.** Números absolutos estimados de casos de TB y muertes por TB (en millones por año) en el período 1990-2013. Adaptada de Global tuberculosis control WHO: report 2014, (Who 2014).

La región de las Américas y la región oeste del Pacífico ya han alcanzado los tres objetivos propuestos para 2015 a nivel de la reducción en la carga de TB (incidencia, prevalencia y

mortalidad). La región del sureste Asiático parecería estar en camino de lograrlo. Las otras tres regiones, África, este mediterráneo y regiones europeas aparentemente no alcanzarían la meta, aunque las tasas de incidencia, prevalencia y mortalidad también están disminuyendo. En el año 2012 la WHO inició el desarrollo de una nueva estrategia: *post-2015 global strategy*, con la finalidad de eliminar la epidemia de TB para el año 2035, con las correspondientes metas globales de reducir un 95% el número de muertes por TB y reducir un 90% la tasa de incidencia de TB con respecto al año 2015. Durante estos últimos diez años se han intensificado los esfuerzos por desarrollar nuevos métodos de diagnóstico de TB, nuevas drogas y vacunas. Hay 10 drogas anti-TB nuevas que están actualmente en las últimas etapas de desarrollo clínico, y en los últimos años se ha aprobado el uso de dos drogas nuevas para el tratamiento de MDR-TB bajo condiciones específicas: bedaquilina (inhibidor de la ATP sintasa) y delamanid (inhibe la síntesis de ácido micólico). Actualmente hay 15 candidatos a vacunas en etapa de ensayos clínicos. Varias de ellas están ahora o entrarán en breve en fase II y IIb y serán testeadas en ensayos de fase III. La investigación y el desarrollo es uno de los pilares de la estrategia *WHO post-2015 global TB*, y juega un rol fundamental en acelerar la reducción en la incidencia y mortalidad necesarias para alcanzar la meta propuesta. Un pre-requisito importante para el rápido desarrollo de nuevas drogas clínicamente relevantes, es la comprensión a nivel molecular, de las interacciones bacteria-hospedero, responsables de la patogénesis de la enfermedad.

## **1.2. Interacción entre *Mtb* y el hospedero**

*Mtb* es considerado uno de los patógenos humanos más exitosos por su habilidad de sobrevivir y replicarse principalmente en los macrófagos del hospedero. Los macrófagos son células claves del sistema inmune capaces de neutralizar los patógenos intracelulares e iniciar una respuesta inflamatoria que contribuye a la activación de los mecanismos de la respuesta inmune adaptativa. En esta sección presentaré una revisión de los mecanismos de entrada, evasión y de los cambios transcriptómicos, proteómicos y metabólicos asociados a la infección.

### **1.2.1. Entrada de *Mtb* en los macrófagos**

La entrada de *Mtb* a los macrófagos alveolares puede estar mediada ya sea por un proceso no específico de macropinocitosis, o mediante fagocitosis a través de la interacción con una gran variedad de receptores específicos (Hmama et al. 2015). Entre ellos encontramos: receptores denominados PRRs (*pattern recognition receptor*) que reconocen patrones moleculares altamente conservados en los patógenos PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) (Akira et al. 2006), receptores de complemento de tipo 3 (CR3), que reconocen bacterias opsonizadas por el componente C3bi, receptores barrenderos conocidos como *scavengers* (por

su nombre en inglés), y en el marco de la respuesta adaptativa receptores de Fc $\gamma$ , que reconocen la porción Fc $\gamma$  de IgG unidas a su antígeno. El reconocimiento de uno u otro receptor da origen a diferente tipo de fagocitosis y compromete la activación de distintas vías de señalización. Para el reconocimiento de *Mtb*, en el marco de la respuesta innata participarían varios PRRs del macrófago. Los receptores lectina de tipo C y los receptores barrenderos pueden participar directamente en el reconocimiento y fagocitosis del bacilo, mientras que otros PRRs, como los receptores de tipo (TLRs) y de tipo NOD (NLRs) mediarán señales que contribuyen a la activación del macrófago (Huynh et al. 2011; Court et al. 2010; Hossain & Norazmi 2013). Los receptores lectina de tipo C reconocen moléculas ricas en carbohidratos, y entre ellos, el receptor de manosa (ManR) reconoce lipoarabinomano (LAM) y manosil-LAM (ManLAM), que son glicolípidos abundantes expresados en la superficie de la micobacteria. Se ha reportado que la fagocitosis de *Mtb* por parte de los macrófagos ocurre principalmente vía el ManR (Schlesinger 1993). La unión de *Mtb* a dicho receptor vía Man-LAM no resulta en la muerte de la bacteria, sino que desencadena una respuesta anti-inflamatoria (Nigou et al. 2001) e inhibe fuertemente la fusión fagosoma-lisosoma (Kang et al. 2005). El CR3 y los receptores barrenderos también contribuirían a la fagocitosis directa de la micobacteria, compartiendo con el ManR la propiedad de ser poco eficientes en la promoción de la fagocitosis. En contraste, la Dectina-1, otro receptor de tipo lectina, mediaría una fagocitosis más eficiente induciendo además señales inflamatorias en la célula. Por otro lado, la interacción de *Mtb* con los TLRs (principalmente TLR2, TLR4 and TLR9) así como también con el receptor NOD2 desencadena una cascada de señalización celular que deriva en una respuesta inmune innata antimicrobiana y pro-inflamatoria, con activación de la vía mediada por NF $\kappa$ B y diferentes MAP-quinasas, que conducen a la producción de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, quimioquinas y óxido nítrico (Quesniaux et al. 2004). La contribución de la respuesta mediada por los TLRs a la eliminación de *Mtb* está en discusión ya que se han observado resultados contradictorios utilizando modelos de infección en ratones deficientes en uno o varios de estos receptores (Huynh et al. 2011). Redundancia en el empleo de receptores para el reconocimiento o diferencias entre cepas de *Mtb* podrían explicar estos resultados.

En general se acepta que la internalización de *Mtb* a través del ManR está fuertemente ligada al éxito de la infección mientras que las señales inflamatorias mediadas por TLRs y NLRs, si bien no son eficientes en potenciar la fagocitosis de forma de eliminar completamente a la bacteria, contribuirían a limitar su replicación y diseminación. Además, vale la pena recalcar que la inflamación inducida por el reconocimiento innato tiene un papel fundamental en el desencadenamiento de la respuesta adaptativa, caracterizada por la generación de células TCD4<sup>+</sup> efectoras capaces de colaborar en la potenciación de los mecanismos efectoros de los macrófagos, contribuyendo al control de la infección.

### 1.2.2. Mecanismos de evasión de *Mtb*

En los macrófagos, la primera forma de defensa contra los patógenos intracelulares consiste en la fusión del fagosoma con el lisosoma, que conlleva a la acidificación del contenido del fagolisosoma, y la destrucción de la bacteria. Desde hace tiempo está claramente demostrada la habilidad de *Mtb* de inhibir la fusión del fagosoma con el lisosoma, lo cual le permite sobrevivir y replicarse dentro de los macrófagos hospederos (Koul et al. 2004; Russell 2011). Esta inhibición impediría la degradación proteolítica de proteínas de la bacteria y la presentación de antígenos requerida para desarrollar una respuesta inmune adaptativa, por lo cual cumpliría un papel esencial en el éxito de la infección del macrófago. La importancia de evadir la fusión del fagosoma con el lisosoma se refleja en el desarrollo por *Mtb* de varios mecanismos asociados a este punto de control.

En primer lugar, se ha demostrado que los lípidos de membrana de la micobacteria como el lipoarabinomano (LAM) (Fratti et al. 2003), el glicolípido fenólico fenolftiocerol (PGL-1) (Robinson et al. 2007), el isoprenoide exadieno (Mann et al. 2009), y la trehalosa dimicolato (TDM) (Axelrod et al. 2008) son capaces de modular la maduración del fagosoma. LAM es capaz de inhibir la actividad de la quinasa eucariota Vps34, limitando la acumulación del lípido de membrana fosfatidil inositol 3-P (PI3-P) en el fagosoma. De esta forma se impide la unión de moléculas efectoras que se unen a PI3-P, como el antígeno EEA1 (*early endosome antigen 1*), necesario para la pérdida de la proteína rab5 de la membrana del fagosoma y su reemplazo por rab7, que dirige la fusión del fagosoma con los endosomas tardíos y compartimentos lisosomales (Vergne et al. 2004; Vergne et al. 2003b; Vergne et al. 2003a; Vergne et al. 2005). Varios estudios han mostrado que *Mtb* produce quinasas y fosfatasa implicadas en alterar la maduración del fagosoma, que incluyen a PknG, una quinasa en serina/treonina, la fosfatasa ácida SapM y la fosfatasa en tirosina PtpA. PknG es una de las 11 quinasas de serina/treonina que posee *Mtb* la cual ha sido sugerida como factor de virulencia clave en la infección (Scherr et al. 2009). Se ha propuesto que dicha quinasa es liberada al citoplasma donde modifica enzimas del hospedero aún no determinadas pero que conllevan a una inhibición de la maduración del fagosoma (Walburger 2004). A su vez PknG tendría un rol dentro de la bacteria participando en la regulación del metabolismo del glutamato (O'Hare et al. 2008) mediante un mecanismo que está siendo dilucidado (Lisa et al. 2015). Con respecto a la fosfatasa ácida SapM, se ha descrito que es liberada al citoplasma de la célula hospedera donde desfosforilaría el fosfolípido PI3P, esencial para la maduración del fagosoma a fagolisosoma (Vergne et al. 2005). Por último, PtpA es una fosfatasa en tirosina que sería secretada al citosol del macrófago, y considerada esencial para la patogenicidad de *Mtb*. Se propuso que PtpA desfosforila la proteína eucariota *Vacuolar Protein sorting 33B* (VPS33B) implicada en la regulación de la fusión de los compartimentos vesiculares durante el tráfico en la vía endocítica. Se observó que la defosforilación de VPS33B por PtpA detiene la maduración del fagosoma (Bach et al. 2008). La inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma se evaluó utilizando

un modelo en el cual los macrófagos fueron expuestos a esferas unidas no covalentemente a PtpA, a BSA o a los mutantes de la fosfatasa. Luego de fagocitadas las esferas se evaluó la maduración del fagosoma utilizando citometría de flujo, evaluando la colocalización de los lisosomas cargados con FITC-dextrano y los fagosomas conteniendo las esferas. Asimismo, PtpA también se une a la subunidad H de la V-ATPasa, quien regula el transporte de protones a través de la membrana, bloqueando de esta forma la acidificación del fagosoma contribuyendo a la eliminación de la bacteria (Wong et al. 2011).

Finalmente, otra proteína esencial para la sobrevivencia de *Mtb* en el fagosoma es la proteína eucariota conocida como coronina 1. Esta proteína se encuentra presente en la membrana del fagosoma y se asocia al citoesqueleto. Durante la fagocitosis, dicha proteína es liberada desde el fagosoma en maduración hacia el citosol donde activa la fosfatasa dependiente de  $Ca^{2+}$ , calcineurina, desencadenando la fusión del fagosoma con el lisosoma. Sin embargo, luego de la infección con *Mtb*, la bacteria impide la liberación de coronina 1, a través de un mecanismo todavía no esclarecido. Recientemente se ha reportado que la proteína micobacteriana lipoamida deshidrogenasa (Lpd) estaría involucrada en la retención prolongada de coronina 1 en la membrana del fagosoma (Deghmane et al. 2007).

Otra importante actividad antimicrobiana a la cual se enfrenta *Mtb* es el estallido respiratorio generado por el complejo eucariota NADPH oxidasa (NOX2), responsable de generar superóxido, el cual luego se convierte en peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo, especies altamente tóxicas para muchos patógenos. *Mtb* posee varias formas de evadir esta respuesta oxidante, entre ellas la dismutación del superóxido por la enzima superóxido dismutasa (Spagnolo et al. 2004; Dussurget et al. 2001; Piddington et al. 2001), y la neutralización de estos radicales por lípidoglicanos de su pared (Chan et al. 1989). Asimismo, se ha reportado que *Mtb* posee una nucleósido difosfato quinasa (Ndk) que interactúa con Rac-1, una GTPasa necesaria para la formación del complejo NOX2, inhibiendo el ensamblaje del mismo y disminuyendo entonces la producción de especies reactivas del oxígeno mediada por la enzima (Sun et al. 2013).

Con respecto a la inducción de la respuesta adaptativa, *Mtb* interfiere con un paso esencial de este proceso que es la presentación de antígenos por las células dendríticas a las células T CD4+ vírgenes. Esta interferencia parece ser principalmente producto del deficiente muestreo de antígenos bacterianos en los complejos de MHC de clase II (Grace & Ernst 2016) el cual sería resultado del control del proceso fagocítico en las células dendríticas, de forma similar a lo que sucede en macrófagos. Estos mecanismos limitan la generación de células T efectoras, en particular T CD4+ *helper* de tipo 1, secretoras de IFN $\gamma$  capaces de activar macrófagos potenciando sus efectos tóxicos. Por otro lado, a nivel de los macrófagos residentes en el tejido, también ocurre atenuación de la presentación de antígenos a las células T-helper CD4+ efectoras; en este caso también se ha propuesto que *Mtb* limita la expresión de MHC de clase II

en la superficie del macrófago (Baena & Porcelli 2009; Cooper 2009). Varios estudios han reportado que la disminución en la expresión de los genes de MHC clase II es la principal estrategia utilizada por *Mtb* para inhibir la presentación de antígenos; esta inhibición estaría mediada por algunas lipoproteínas bacterianas como LpqH, LprG y LprA (revisado por Hmama et al (Hmama et al. 2015)) así como por glicolípidos de membrana LAM, lipomanano (LM) y fosfatidilinositol manósido (PIM) (Harding & Boom 2010) (Saraav et al. 2014), que actuarían como agonistas del receptor TLR2 induciendo una excesiva y prolongada señalización que resulta en la inhibición de la expresión de MHC de clase II. Otros estudios muestran que *Mtb* interfiere con el tráfico endosomal y maduración de las moléculas de MHC clase II, resultando en una alteración en la presentación de antígenos (Hestvik et al. 2005).

Varios reportes indican que las células infectadas por patógenos intracelulares utilizan el mecanismo de autofagia como parte de la respuesta inmune contra el patógeno. La autofagia, conocida como una respuesta a un estrés nutricional, es un proceso que busca restablecer la homeostasis celular mediante la degradación de componentes celulares secuestrados en vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas. Sin embargo, nuevas evidencias indican que la autofagia es más que un proceso para reciclar nutrientes. De hecho, se ha reportado que en la infección con *Mtb*, la estimulación de la autofagia contribuye a la eliminación de la micobacteria en las células hospederas (Colombo et al. 2006). Para controlar esta vía de defensa *Mtb* ha desarrollado estrategias para inhibir la vía autofágica desencadenada en la célula dendrítica hospedera durante la etapa de fusión autofagosoma-lisosoma, a través de un mecanismo mediado por el sistema de secreción ESX-1 (tipo VII) (Romagnoli et al. 2012).

La apoptosis es otro mecanismo de defensa utilizado por la célula hospedera que permitiría eliminar el nicho intracelular donde se mantiene la bacteria. *Mtb* ha desarrollado varios mecanismos para bloquear la apoptosis del macrófago, basado en la disminución de especies reactivas del oxígeno (ROS). En dicho proceso se encuentran involucradas las proteínas SecA2, NuoG, Ndk y PtpA de *Mtb*. SecA2 dirige el transporte de la superóxido dismutasa (SodA) fuera de la bacteria. La secreción de la misma le permite a *Mtb* la detoxificación de ROS, evitando se alcancen valores altos que inducen la apoptosis (Hinchey et al. 2007). NuoG es una subunidad del complejo NADH deshidrogenasa tipo I, para la cual existen evidencias que la infección con una cepa de *Mtb knockout* en este gen resulta en un fenotipo pro-apoptótico (Velmurugan et al. 2007). La proteína de *Mtb* Ndk, como se describió anteriormente, afecta el ensamblado del complejo eucariota NOX2 afectando la producción de ROS (Sun et al. 2013).

Por otro lado, la fosfatasa micobacteriana PtpA es capaz de desfosforilar la subunidad alfa de la glicógeno sintasa quinasa (GSK3 $\alpha$ ), enzima implicada en la activación de la vía apoptótica celular (Poirier et al. 2014). Este trabajo, sugiere que la desfosforilación de la Tyr<sup>279</sup> de la

GSK3 $\alpha$  por la PtpA disminuye su actividad, lo cual conlleva a una disminución de la apoptosis celular de las células infectadas.

Si bien la habilidad de *Mtb* de impedir la maduración del fagosoma y permanecer en el mismo parece ser esencial para la virulencia de la bacteria, recientemente se ha reportado que *Mtb* es también capaz de translocarse desde el fagosoma hacia el citosol. Esto desafía el paradigma que *Mtb* se localiza exclusivamente dentro del fagosoma de la célula hospedera (van der Wel et al. 2007). La translocación de *Mtb* al citoplasma está mediada por el antígeno de secreción temprana de 6kDa (ESAT-6) y el sistema responsable de su secreción ESX-1 (tipo VII). Además dicha translocación se correlaciona con el aumento en la patogenicidad de la bacteria. Especies de micobacterias patógenas como *Mtb*, *M. leprae*, *M. bovis* y *M. marinum* son encontradas en el citosol, mientras que especies no patógenas como *M. smegmatis* y *M. bovis BCG* permanecen en el fagosoma (Houben et al. 2012). Esto se verificó demostrando que en una cepa de *M. bovis BCG* donde se introdujo parte del sistema ESX-1, BCG::ESX-1, capaz de secretar ESAT-6, se logró inducir translocación al citosol, aumentando con esto la virulencia de la bacteria (Houben et al. 2012). Por otro lado, se ha demostrado que el daño en la membrana del fagosoma durante la infección con *Mtb* sería dependiente de ESAT-6 (Wong & Jacobs 2011). Durante la infección con *Mtb* o con *M. marinum*, se observó que la ruptura del fagolisosoma es seguida de la muerte celular por necrosis de los macrófagos, sin embargo, al infectar con las cepas portando la delección del gen ESX-1, las bacterias permanecen dentro del fagolisosoma y no inducen dicha toxicidad. De esta forma, las cepas virulentas de *Mtb* y *M. marinum* inducen la muerte celular escapando de las defensas innatas del hospedero y favoreciendo su propagación a otras nuevas células.

### **1.2.3. Cambios en la expresión y síntesis de proteínas de *Mtb* durante la infección**

El estudio del transcriptoma y del proteoma de *Mtb* a partir de bacterias aisladas de células o tejidos infectados ha permitido estudiar la interacción de *Mtb* con su célula hospedera principal, el macrófago (D Schnappinger et al. 2003; Schnappinger et al. 2006; Kruh et al. 2010). Estos estudios vinculan componentes de *Mtb* algunos de los mecanismos de evasión descritos anteriormente, pero también revelan la participación de otros componentes en funciones vitales para la bacteria.

La síntesis, remodelación y mantenimiento de la pared bacteriana son fenómenos que parecen estar fuertemente regulados en *Mtb* durante la infección y que contribuyen a la sobrevivencia de la bacteria ya que la pared no es sólo una barrera de protección, sino también la superficie que sensea señales del medioambiente y expone los motivos de reconocimiento para las células del hospedero. Los estudios realizados muestran que la infección induce rápidamente la expresión

del gen regulador transcripcional *PhoPR* que controla dos operones necesarios para la síntesis de deaciltrehalosas, poliaciltrehalosas, y sulfolípidos, todos importantes componentes de la pared celular de *Mtb* (Asensio et al. 2006). Apoyan la importancia de *PhoR* en la biología de *Mtb* el hecho que la inhibición farmacológica de la acidificación del fagosoma impide la inducción del gen micobacteriano *PhoPR* y de los genes que éste regula (Rohde et al. 2007), y que la cepa *Mtb* depletada en dicho gen muestra una importante atenuación en la sobrevivencia en los macrófagos (Walters et al. 2006). Otro gen inducido durante la infección que podría participar en el mantenimiento de la pared celular es *sigE*, un regulador de la transcripción perteneciente a una familia de factores llamados sigma; *sigE* tiene función extracitoplásmica (ECF, *extracytoplasmic function*) (Manganelli et al. 2001) y regularía la expresión de *rmlB2*, gen que codifica para una epimerasa de galactosa involucrada posiblemente en la síntesis de galactofurano, componente esencial para la unión del peptidoglicano y el ácido micólico (Dirk Schnappinger et al. 2003) (Fontán et al. 2008). Es importante mencionar que *sigE* regularía también la expresión de otros genes que le permiten a la bacteria adaptarse a los cambios ambientales, algunos de los cuales son importantes para la virulencia (Manganelli et al. 2004; Manganelli 2014; Rodrigue et al. 2006). Además de *sigE*, se ha reportado la expresión de los genes de otros factores sigma conocidos como *sigB*, *sigG* y *sigH* durante la infección de los macrófagos humanos (Graham & Clark-Curtiss 1999; Cappelli et al. 2006), así como de *sigD* quien juega un rol importante en la virulencia de *Mtb* (Mukhopadhyay et al. 2012). Estudios a nivel proteómico mostraron que durante la infección *Mtb* sintetiza proteínas involucradas en la síntesis de ácido micólico, como la proteína Fas y miembros de la vía FASII. La proteína Fas, que cataliza la síntesis *de novo* de ácidos grasos de cadena corta, se observó sólo a los 30 días, mientras que los miembros de la vía FASII, que catalizan la elongación de los ácidos grasos producidos por Fas, aparecieron principalmente a los 90 días. Interesantemente, la mayoría de las proteínas involucradas en la síntesis de peptidoglicano fueron encontradas a los 30 días sugiriendo que en la etapa crónica la bacteria disminuye la síntesis de pared celular. Otras proteínas inducidas a lo largo de la infección fueron varias poliketido sintasas (PKS), y proteínas asociadas a PKSs, llamadas PapAs, que participan en la síntesis de lípidos complejos, algunos de los cuales constituirían componentes de la pared celular de *Mtb* (Mukhopadhyay et al. 2012). Asimismo, se identificaron nueve de las doce MmpLs (*large membrane-spanning proteins*) involucradas en la translocación de lípidos, apoyando la hipótesis que cumplen un rol en la infección y están involucradas en la virulencia. (Lamichhane et al. 2005) (Domenech et al. 2005). Finalmente, otro grupo de proteínas abundantes de *Mtb* expresadas y sintetizadas en la fase aguda y crónica de la infección son las proteínas del grupo PE/PEE, que si bien no se conoce su función con exactitud, se piensa que integran la pared celular y están implicadas en aumentar la variación antigénica (Cole et al. 1998).

Otros factores importantes que la bacteria debe controlar son el estrés y el daño provocado por productos tóxicos derivados de la activación celular. Para este control, *Mtb* induciría

rápidamente la expresión de un regulador transcripcional conocido como DosR que controla la expresión de cerca de 50 genes bacterianos (Boon & Dick 2002; Sherman et al. 2001; Park et al. 2003; Voskuil et al. 2003; Voskuil et al. 2004; Kumar et al. 2007; Dirk Schnappinger et al. 2003; Tan & Russell 2015). Varios de estos genes son proteínas de respuesta al estrés. Asimismo en la fase intrevacuolar de *Mtb*, se ha observado la inducción de diferentes chaperonas bajo el control del regulador transcripcional hspR (incluyendo la hsp70)(Dirk Schnappinger et al. 2003) y de varios genes que corresponden a enzimas responsables de la reparación de ADN (*alkA*, *recX*, *recC*, *dinF*, and *radA*) (Dirk Schnappinger et al. 2003). Finalmente, genes de reguladores transcripcionales de la familia WhiB se encontraron también expresados durante la infección (Rohde et al. 2007). Estos poseen un centro Fe-S que actuaría como sensor redox (Green & Paget 2004) y en *Mtb* jugarían un rol en la respuesta frente a los altos niveles de NO· y a la hipoxia generada durante la infección (Singh et al. 2007; Crack et al. 2013). Cabe notar que si bien el NO· es una rica fuente de nitrógeno y puede ser metabolizado e incorporado por *Mtb*, los productos tóxicos derivados de él deben ser eliminados por la bacteria. Se han identificado proteínas involucradas en el transporte de nitrato/nitrito (NarX, (Fenhalls et al. 2002) y en la detoxificación del nitrito (el producto del gen *narU* y la proteína NirB). También se ha observado un aumento en la expresión de la quinasa PknE en bacterias que sufren estrés por NO·, y se ha propuesto también que esta quinasa está implicada en la inhibición de la apoptosis de la célula hospedera (Jayakumar et al. 2008).

Otro grupo de genes inducidos en *Mtb* como consecuencia de su entrada en el macrófago son genes de respuesta a la baja concentración de hierro que encuentra la bacteria en el ambiente intracelular, y que aparecen fuertemente inducidos en los macrófagos activados con IFN $\gamma$  (Dirk Schnappinger et al. 2003). Éstos incluyen el operón *mbt*, que dirige la síntesis de sideróforos, componentes capaces de secuestrar este metal, denominados micobactinas. El hierro es un constituyente esencial para todos los organismos, forma parte de la estructura y sitio catalítico de al menos 40 enzimas en *Mtb*, y es esencial para su virulencia (Voss et al. 1999). *Mtb* es capaz de sobrevivir en ambientes con bajos niveles de hierro gracias a la síntesis de las micobactinas. El regulador transcripcional IdeR (*iron-dependent repressor*) regula los genes de micobactinas. En presencia de Fe, IdeR reprime la transcripción de los mismos mientras que en presencia de baja concentración de hierro IdeR no puede unirse a dichos genes y se desreprime la transcripción de los genes *mbt*. IdeR también regula la transcripción del gen *bfrA* que codifica para bactoferina, una proteína de almacenamiento de hierro (Krithika et al. 2006) (Mukhopadhyay et al. 2012). Mediante estudios proteómicos se observó también que durante la infección del macrófago *Mtb* aumenta la síntesis de enzimas que participan en la síntesis de micobactinas, incluyendo MbtA, B, C y D (Kruh et al. 2010).

Por último, gran parte de los cambios en la expresión de proteínas de *Mtb* durante la infección se relacionan con su adaptación metabólica al ambiente de la célula hospedera. El regulador transcripcional DosR también sería esencial en la regulación de la actividad metabólica de la bacteria durante la fase de anoxia y latencia (Leistikow et al. 2010). Globalmente, la información disponible sugiere que la bacteria dirige su metabolismo hacia la utilización de los lípidos como fuente principal de carbono. De acuerdo con esto, genes que participan en el metabolismo de los lípidos se han visto inducidos (Dirk Schnappinger et al. 2003; Dubnau et al. 2002; Waddell & Butcher 2007). Entre ellos se encuentran los genes de acil-CoA sintetasas (*fadD3*, *fadD9*, *fadD10*, *fadD19*), acil-CoA deshidrogenasas (*fadE5*, *fadE14*, *fadE22-24*, *fadE27-29*, *fadE31*), enoil-CoA hidratasa (*echA19*), hidroxibutiril-CoA deshidrogenasas (*fadB2*, *fadB3*), y acetil-CoA transferasas (*fadA5*, *fadA6*) (Dirk Schnappinger et al. 2003) (Waddell & Butcher 2007). Además, también está altamente expresado el gen de la isocitrato liasa (gen *icl*), una enzima clave en el ciclo del glioxilato que constituye un *by pass* del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y permite generar glucosa a partir de ácidos grasos (McKinney et al. 2000). Asimismo, también se encuentra inducida la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (*pckA*), enzima que cataliza una de las etapas de la gluconeogénesis que utiliza oxalacetato como sustrato, el cual puede estar siendo generado gracias a la oxidación de ácidos grasos (Dirk Schnappinger et al. 2003). A nivel proteómico varias proteínas relacionadas al metabolismo son inducidas en *Mtb* durante la infección; todas las proteínas que participan en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) fueron identificadas a los 30 días post-infección, sin embargo sólo una fue identificada en la etapa crónica (90 días). De la misma forma, sólo en la etapa crónica se identificaron proteínas que participan en la unión y transporte de fosfato, los transportadores PitA y PstS1/PstS3 y una lipoproteína de unión a fosfato llamada UgpB (Van Veen 1997). Estos resultados sugieren una disminución de la actividad respiratoria a medida que transcurre la infección, hecho que se correlaciona con la disminución de los niveles de oxígeno a la que se enfrenta la bacteria al formarse los granulomas. También, similarmente a lo observado en los estudios transcriptómicos, a los 90 días de la infección se identificaron fosfolipasas capaces de degradar los lípidos del hospedero: fosfolipasa C; lisofosfolipasa (LipR), una estearasa lipolítica; y LipY una triacilglicerol lipasa. Esto refuerza la idea que *Mtb* experimenta un cambio metabólico que favorece el consumo de los lípidos del hospedero como principal fuente de carbono y energía.

Como ya se comentó, la fosforilación y desfosforilación podría ser un mecanismo útil para la regulación de vías de señalización asociadas a la respuesta de adaptación de la bacteria a la célula hospedera. *Mtb* posee 11 quinasas de serina/treonina, y se observó que 9 de ellas son inducidas durante la infección. Dentro de éstas, PknA, PknB y PknG han sido postuladas como componentes esenciales de *Mtb* (Sasseti et al. 2003; Cowley et al. 2004). Por otro lado, se ha propuesto que PknH sería necesaria para el desarrollo de la infección crónica (Papavinasandaram et al. 2005), lo cual estaría en acuerdo con la identificación de PknH

únicamente a los 90 días en un modelo experimental de infección en cobayos. Los mecanismos específicos de control de estas quinasas están aún en estudio; PknB y PknL podrían participar en procesos asociados a la división celular y la síntesis de la pared bacteriana (Narayan et al. 2007). Sorprendentemente, ni en los estudios transcriptómicos ni proteómicos se detectó la inducción de las fosfatasa de *Mtb*, PtpA y PtpB. Este hecho no significa que estas moléculas no estén presentes en algún momento de la infección ya que los estudios no abarcan quizás las ventanas de tiempo en que se expresan, o bien sus niveles podrían ser muy inferiores a los de otras proteínas, aún cuando fueran significativos en términos de la actividad.

#### **1.2.4. Cambios transcripcionales y proteómicos del macrófago durante la infección con *Mtb***

Durante la infección con *Mtb* existen también grandes cambios transcripcionales en el macrófago. Estudios en células infectadas revelan la activación de la expresión de un grupo de genes no específicos de patógeno (*core response genes*), entre los cuales predominan genes que codifican receptores, moléculas de adhesión y proteínas vinculadas a la remodelación de tejidos, así como genes que participan en la transducción de señales (Nau et al. 2002) (Schnappinger et al. 2006). Pero además, otro grupo importante (alcanza a ser el 32% del total) de genes inducidos por la infección con *Mtb* están relacionados con la inmunidad y la inflamación. Muchos de estos genes están regulados por el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, el cual como ya se comentó podría ser activado como consecuencia del reconocimiento de motivos de *Mtb* por TLRs (Schnappinger et al. 2006). Entre los genes más inducidos se encuentran aquellos que codifican quimioquinas como IL-8, RANTES (*regulated in activated normal T cells, expressed and secreted*), IP-10 (*IFN $\gamma$  inducible protein-10*), MIP2 (*macrophage inflammation protein*), MIP1 $\alpha$  y MIP1 $\beta$  (*macrophage inflammatory proteins-1 alfa and beta*), MCP (*monocyte chemoattractant protein*) y receptores de quimioquinas. La fuerte inducción de los genes MIG, (*monoquine induced by IFN $\gamma$* ) RANTES y IP-10 podría contribuir a la formación del granuloma (Sadek et al. 1998). Otro factor de transcripción inducido por *Mtb* y asociado a la respuesta inflamatoria es STAT-1 (Wang et al. 2003), que cumple un rol importante en mediar la señalización celular por citoquinas, en particular por los interferones. Por otro lado, también se observó aumento de la expresión de genes antimicrobianos como consecuencia de la infección por *Mtb*, dentro de los cuales el de mayor relevancia es el gen de la enzima óxido nítrico sintasa (*Nos2*), que se sabe es crítica para el control de *Mtb* en ratón. Es interesante que en los macrófagos las especies reactivas del nitrógeno, como también las derivadas del oxígeno, además de tener actividad antimicrobiana, pueden afectar la señalización celular, incluyendo la respuesta transcripcional (Bogdan 2001; Ehart 2001). De hecho, en la infección de macrófagos murinos la delección de *Nos2* afecta aproximadamente el 58% de los genes cuya expresión se modifica por la infección con *Mtb*, mientras que la delección de *phox* causa un

efecto algo menor, indicando que tanto *Nos2* como *Phox* estarían modulando directa o indirectamente el transcriptoma del macrófago infectado (Ehrt 2001). Algunos de los genes afectados por estas especies están asociados al metabolismo celular (Brune & Lapetina 1995; Drapier & Hibbs 1996; Riobó et al. 2001), por lo cual se asocia la infección a un cambio metabólico importante.

Los cambios en el metabolismo de los macrófagos infectados son múltiples. Estudios metabolómicos realizados en ratones y cobayos infectados con *Mtb* (Shin et al. 2011; Somashekar et al. 2011; Somashekar et al. 2012) mostraron que *Mtb* es capaz de modular los procesos metabólicos de la célula hospedera. Estos cambios –determinados en función de los metabolitos producidos por las principales vías catabólicas y anabólicas– fueron similares en todos los órganos testeados (pulmón, hígado y bazo), pero fueron más significativos en el pulmón, órgano blanco de *Mtb*. Los niveles de glucosa y glucógeno así como los de NAD y NADP disminuyeron, lo que sugiere un aumento en el consumo de glucosa por la vía glucolítica y por la vía de las pentosas fosfato. Los niveles de oxalacetato y fumarato (intermediarios del TCA) disminuyeron, sugiriendo una actividad reducida del ciclo TCA. En cambio, la concentración de lactato aumentó. La acumulación de lactato en el tejido granulomatoso puede ser consistente con la hipoxia existente dentro del granuloma, sin embargo la acumulación de lactato fue observada también en los tejidos no granulomatosos (no forman granulomas). Este perfil metabólico sugiere que la célula responde llevando adelante una glucólisis aeróbica, mecanismo conocido como efecto Warburg, caracterizado por un alto consumo de glucosa con producción de lactato aún en condiciones aeróbicas. De esta forma el ATP es generado principalmente por la vía glucolítica y no por fosforilación oxidativa. Este metabolismo fue observado por primera vez en células cancerosas (Hsu & Sabatini 2008), pero es característico también del fenotipo inflamatorio del macrófago inducido por agonistas de TLRs e IFN $\gamma$  (Zhu et al. 2015).

Por otro lado, el aumento observado en los niveles de succinato sugiere que ocurre un aumento en la glutaminólisis en la mitocondria, inducido probablemente por el estrés oxidativo que tiene lugar durante la infección (Fedotcheva et al. 2006). Alternativamente, el succinato podría ser secretado por *Mtb*; se ha reportado que la producción de succinato en otras bacterias podría aumentar debido a la inducción del ciclo del glioxilato, causado por el cambio en el metabolismo de carbono de *Mtb*, hacia la  $\beta$  oxidación de ácidos grasos (Muñoz-Elías & McKinney 2005). También se han descrito cambios en el nivel de varios aminoácidos que sugieren un aumento en la proteólisis y un aumento en los niveles de glutatión (GSH) en tejidos (pulmón y bazo) que podría representar una reacción de defensa contra el estrés oxidativo.

Resulta interesante que la infección con la cepa virulenta *Mtb* H37Rv (y no con la avirulenta) induce cambios significativos en la ultraestructura y función de la mitocondria de los macrófagos, las cuales mostraron un aumento en la densidad electrónica y las crestas

claramente definidas (Jamwal et al. 2013). Estas mitocondrias son más alargadas, algunas de ellas están interconectadas y con tendencia a agregarse alrededor de los fagosomas conteniendo *Mtb*. Los autores sugieren que estas características reflejan un aumento en la actividad funcional de la mitocondria. Sin embargo, estas observaciones se contradicen, al menos parcialmente, con la caracterización del proteoma mitocondrial de macrófagos infectados con la cepa virulenta H37Rv y con la cepa avirulenta H37Ra. En las células infectadas con la cepa virulenta se observó que el nivel de 12 proteínas se modificó en más de 10 veces respecto al observado en las células no infectadas. Seis proteínas aumentaron sus niveles: HCLS1, ACSL1, VDAC2, ATP50, PRDX1, and ATAD3A. La ACSL1 (*Long-chain-fatty acid-CoA ligase*) participa en la síntesis de fosfolípidos (Suzuki et al. 1990) y contribuiría a aumentar la integridad estructural de la mitocondria. Las proteínas VDAC2 (*Voltage-dependent anion-selective channel protein 2*), PRDX1 (*Peroxiredoxin 1*), y ATAD3A (*ATPase family AAA domain containing 3A protein*), tendrían un rol antiapoptótico (Jamwal et al. 2013). La ATP50 es esencial para la actividad de la ATP sintasa y la HCLS1 (*hematopoietic cell-specific Lyn substrate protein*) es una proteína cuya función en la mitocondria aún se desconoce (Jamwal et al. 2013). Sin embargo, otras seis proteínas dejaron de ser detectadas sólo en los macrófagos infectados con la cepa virulenta. Estas proteínas son la ATP5B, ATP5A1, OAS2, PRDX3, ECHA, y la SQRD. La disminución en el nivel de la ATP5A1 y ATP5B (subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del componente F1 de la FoF1 ATP sintasa) indicaría pérdida de la síntesis de ATP a través de la ATP sintasa. La ECHA (subunidad  $\alpha$  de la proteína trifuncional TFP) es una enzima clave de la beta-oxidación de ácidos grasos (Eaton et al. 2000) y su disminución causaría una inhibición del catabolismo lipídico, facilitando la utilización de los ácidos grasos del hospedero por parte de la bacteria. La SQRD (sulfide quinone oxidoreductasa mitocondrial) es responsable de oxidar el  $H_2S$  a sulfuro ( $S^2$ ). En las células de mamíferos el  $H_2S$  es generado por la actividad de dos enzimas dependientes de fosfato, la cistationina- $\gamma$ -liasa (CSE) y la cistationina - $\beta$ -sintetasa (Li et al. 2006). Este  $H_2S$  interactúa con el anión peroxinitrito formado por la reacción entre el  $NO\cdot$  y el superóxido, neutralizando de esta forma el efecto antimicrobiano y pro-apoptótico del  $NO\cdot$ . Los autores sugieren entonces que la disminución del nivel de SQRD favorecería la acumulación de  $H_2S$ , neutralizando la actividad  $NO\cdot$  que pueda generarse, y protegiendo a la bacteria. Los factores bacterianos responsable de dichos cambios aún no han sido sugeridos ni identificados.

***En resumen, poco se conoce hasta ahora de cómo eventos de fosforilación y desfosforilación podrían estar vinculados a los mecanismos de adaptación de Mtb a su hospedero. Sabemos del uso por Mtb de varias quinasas y de dos fosfatasa en tirosina; entre estas PtpA parece participar en el bloqueo de la acidificación del fagolisosoma, pero además llegaría al citosol, donde podría interactuar con otros blancos. Por otro lado, tanto la bacteria como los macrófagos que la hospedan parecen alterar su metabolismo a medida que transcurre la infección, destacándose en la bacteria una transición hacia un metabolismo compatible con bajas concentraciones de oxígeno, y capaz de utilizar en mayor medida los lípidos como***

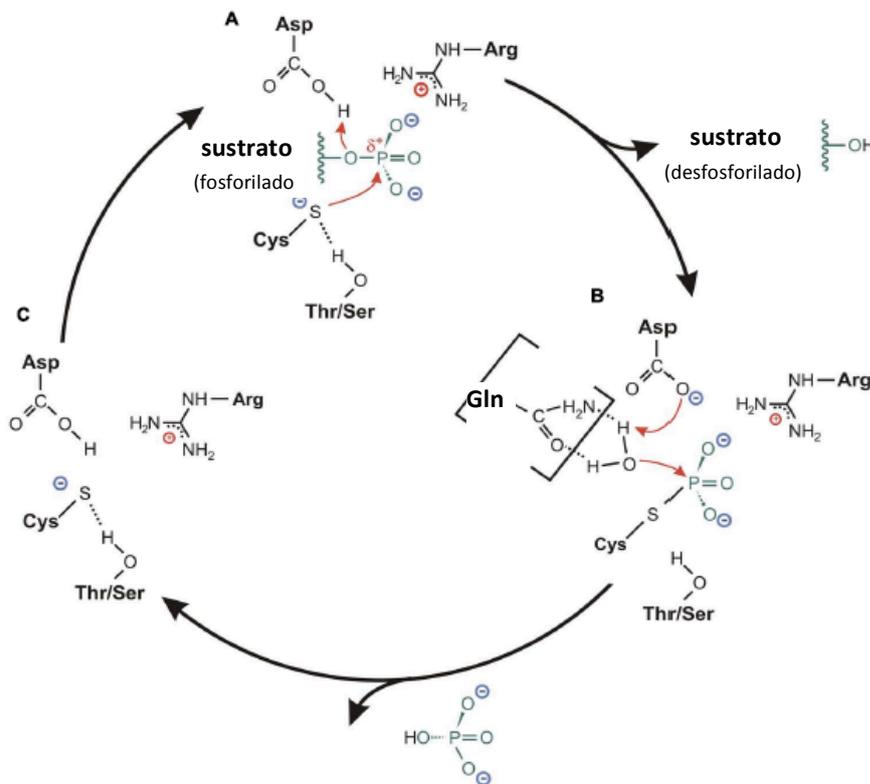
**recurso energético y fuente de C. A nivel del macrófago, la infección induce cambios metabólicos que se traducen en el efecto Warburg y en sorprendentes cambios a nivel mitocondrial, donde claramente enzimas importantes implicadas en el metabolismo energético del macrófago dejan de ser detectadas durante la infección con la cepa virulenta, pero no con la no-virulenta de *Mtb*. No se conoce que eventos moleculares asociados a la infección regulan estos cambios metabólicos.**

### **1.3. Las fosfatasa en tirosina como factores de virulencia bacterianos**

Como ya mencionamos, la señalización celular mediada por fosforilación/desfosforilación controla fenómenos como la adhesión celular, el metabolismo, la división celular y la proliferación. En particular, el control de la fosforilación en Tyr de factores del hospedero por las PTPs sería uno de los mecanismos utilizados por los patógenos para facilitar la infección y su sobrevivencia. De hecho, se ha visto que muchas PTPs bacterianas juegan un rol clave como factor de virulencia. *Yersinia pseudotuberculosis*, secreta una PTP, YopH, que inhibe la fagocitosis, suprime el estallido respiratorio y desestabiliza las adhesiones focales (Bliska & Black 1995) (Black & Bliska 1997)(Black et al. 2000). *Salmonella typhimurium*, secreta la proteína SptP que tiene actividad fosfatasa en Tyr y GTPasa. La actividad PTP actúa específicamente sobre la proteína VCP (del inglés, *valosin-containing protein*), un regulador de la fusión de membranas que facilita la replicación bacteriana en las vacuolas replicativas intracelulares (Humphreys et al. 2009) y también es responsable de la modulación de la inhibición de la vía ERK mediada por Raf-1 en las células del hospedero (Kaniga et al. 1996; Lin et al. 2003). En el caso de *Mtb* las dos PTPs, PtpA y PtpB, parecen actuar como factores de virulencia claves durante la infección.

Las PTPs son fosfatasa que poseen un dominio catalítico conservado cuya secuencia es CX<sub>5</sub>RS/T y catalizan la hidrólisis del fosfato ligado a residuos de Tyr en proteínas y pueden dividirse en dos clases: (i) son en su mayoría PTPs de masa molecular cercana a 30kDa que incluye las PTPs clásicas que desfosforilan sustratos fosforilados en Tyr y las fosfatasa de doble especificidad (DSPs) que también son activas frente a fosfoserina y fosfotreonina, y (ii) incluye las llamadas LMW-PTPs (de inglés, *low molecular weight PTPs*), tienen una masa molecular cercana a 18kDa y desfosforilan solamente fosfotirosina (Shi et al. 1998) (Moorhead et al. 2009). El mecanismo catalítico involucra el dominio conservado CX<sub>5</sub>RS/T (Figura 1.4). Los residuos en este dominio forman el loop de unión a fosfato (P-loop), el cual está ubicado en la base de la hendidura del sitio activo. Los residuos de cisteína y de arginina en este motivo conservado son esenciales para la actividad catalítica. El sitio activo está formado también por un residuo de aspartato esencial cuya localización en la secuencia varía según las familias (loop DPYY en las LMW-PTPs). La cisteína catalítica actúa en la primera etapa de la catálisis, en donde el átomo de azufre del grupo tiolato realiza un ataque nucleofílico al grupo fosfato unido a la tirosina del sustrato (Figura 1.4), conduciendo a la formación de un intermediario cisteinil-

fosfato. El residuo arginina contribuye en la unión al sustrato y estabiliza el intermediario formado. En el caso de las LMW-PTPs, el aspartato catalítico, que se desplaza varios angstroms luego de la unión al sustrato [8–12 Å], queda alrededor de la cadena lateral del residuo fosfotirosina. Este cambio conformacional posiciona al residuo aspartato en una posición que le permite actuar como ácido en la primera etapa de la catálisis. Este paso involucra la protonación del grupo tiosilo saliente, clivando entonces el fosfato de la tirosina y formando el intermediario cisteinil-fosfato. Este mismo residuo de aspartato también actúa como una base en la segunda etapa de la catálisis (Figura 1.4), el cual junto a un residuo de glutamina altamente conservado que coordina una molécula esencial de agua, promueve la hidrólisis del intermediario, liberando el grupo fosfato y regenerando el sitio activo de la PTP.



**Figura 1.4.** Esquema del mecanismo catalítico de las PTPs. A) El azufre de la cisteína catalítica se encuentra estabilizado como tiolato, debido el enlace de hidrógeno entre el azufre y el grupo hidroxilo de la cadena lateral de la Thr/Ser conservada en el P-loop. Seguido a la unión del sustrato, en la cual la Arg del P-loop participa en posicionar el sustrato, el grupo tiolato actúa como nucleófilo atacando al grupo fosfato del sustrato. La formación del intermediario cisteinil-fosfato es facilitado por el Asp (loop conservado DPYY- flanqueando el sitio activo en las LMW-PTP) que dona un protón al grupo tiosilo saliente. A continuación, el sustrato desfosforilado se disocia del sitio de unión. B) La hidrólisis del intermediario cisteinil fosfato es mediada por una molécula de H<sub>2</sub>O. Aquí, el Asp o el residuo correspondiente actúa como base aceptando un protón de la molécula de H<sub>2</sub>O. En algunas clases de PTPs la molécula de agua es activada a través de puentes de hidrógeno con uno o dos aminoácidos polares, como se muestra en la figura para la interacción con la glutamina. Luego de aceptar el protón, el fosfato se disocia de la cisteína catalítica, y se regenera la conformación del sitio activo de la PTP.

Figura adaptada de (Hobiger & Friedrich 2015).

### 1.3.1. PtpA y PtpB, las dos únicas fosfatasa de tirosina de *Mtb*

PtpA y PtpB si bien no son esenciales para el crecimiento de *Mtb* son consideradas factores de virulencia necesarios para su adaptación al hospedero, según lo demostrado tanto en modelos de infección celulares como animales (Bach et al. 2008; Singh et al. 2003; Beresford et al. 2009). Ambas fosfatasa PtpA y PtpB se expresan en cultivos de la cepa virulenta de *Mtb* H37Rv (Koul et al. 2000). Asimismo, la presencia del gen PtpA se ha reportado también en otras micobacterias como *M. bovis*, *M. leprae*, *M. smegmatis* y *M. marinum*. A pesar de la presencia del gen, algunas evidencias sugieren que la PtpA se expresa sólo en las especies patógenas *Mtb*, y *M. bovis* (Cowley et al. 2002). Sin embargo, recientemente se demostró que *M. smegmatis* expresa una forma mucho menos activa de la PtpA en comparación con la enzima expresada por *Mtb* (Chatterjee et al. 2015). Por otro lado, el gen de PtpB se encuentra también en *M. bovis*, *M. marinum* y *M. smegmatis*.

A pesar de carecer de secuencia N-terminal de exportación conocida, PtpA y PtpB han sido detectadas fuera de la bacteria, en el filtrado de medio de cultivo de *Mtb*. Esta localización extracelular ha sido confirmada mediante *western blot* de los filtrados de medio de cultivo (Koul et al. 2000)(Cowley et al. 2002). El mecanismo por el cual ambas fosfatasa son exportadas todavía aún no se ha elucidado. Estudios recientes sugieren que los sistemas de exportación de proteínas SecA2 y el ESX/tipo VII podrían ser los responsables (Sullivan et al. 2012) (Wong et al. 2013). En el caso de PtpA, es interesante que ha sido detectada en el citoplasma de macrófagos infectados con *Mtb* (mediante inmunomicroscopía electrónica, y *western blot* de la fracción citosólica) (Bach et al. 2008). Además, en *M. avium subsp. paratuberculosis* se ha demostrado que el homólogo a PtpA también es detectado en el citoplasma de los macrófagos infectados (Bach et al. 2006). Para PtpB al día de hoy no existen datos que demuestren su localización citosólica en los macrófagos infectados con *Mtb*. Por tanto, aunque en la literatura ambas fosfatasa son consideradas proteínas vertidas al citosol de los macrófagos infectados, esto no ha sido comprobado aún en el caso de PtpB.

Como ya se mencionó, PtpA y PtpB actúan como factores de virulencia. Varios estudios han demostrado que PtpA es necesaria para la sobrevivencia de *Mtb* dentro del macrófago. Por un lado, la cepa mutante de *Mtb* que carece del gen PtpA ( $\Delta$ PtpA) mostró una disminución significativa en la sobrevivencia intracelular en macrófagos humanos derivados de la línea THP-1 a las 48 hs post-infección. Asimismo, la expresión celular de anticuerpos neutralizantes contra PtpA o el uso de inhibidores específicos, produce el mismo efecto sobre la sobrevivencia intracelular de la bacteria (Bach et al. 2008). Por el contrario, en estudios de infección en ratones C57BL/6 utilizando una cepa mutante de *Mtb* $\Delta$ PtpA, Grundner *et al.* observaron que no existen diferencias significativas entre la carga bacteriana obtenida en ratones infectados con la cepa salvaje y con la cepa  $\Delta$ PtpA, sugiriendo que el ratón no es un modelo apropiado de

infección para el estudio de la función de PtpA (Grundner et al. 2008). Recientemente Wang *et al.* sugieren que lo observado para PtpA en la infección en ratón puede deberse a que pueda existir algún otro factor de virulencia de *Mtb* que sea redundante de PtpA (Wang et al. 2015). Para demostrarlo, utilizaron una cepa de *M. bovis*, la cual carece de varios factores de virulencia y con esta infectaron la misma cepa de ratones, observando que la delección de PtpA causó un aumento en los niveles de citoquinas proinflamatorias (TNF, IL-1 $\beta$  e IL-12), así como una disminución de la carga bacteriana en pulmón respecto a la infección con la cepa salvaje. Estos resultados sugieren que PtpA inhibe la respuesta inmune innata para promover la sobrevivencia de la bacteria.

En el caso de PtpB, ensayos de infección realizados en un modelo animal (cobayo) con una cepa mutante de *Mtb* en que se suprimió el gen de PtpB, mostraron una reducción de 70 veces (1.8 log) en la carga bacteriana inicial luego de seis semanas de infección comparado con animales infectados con la bacteria portando el gen salvaje de PtpB (Singh et al. 2003). Por otro lado, los autores evaluaron el efecto de la disrupción del gen de PtpB en la sobrevivencia intracelular de *Mtb* en macrófagos murinos sin activar y activados. En macrófagos no estimulados no se observaron diferencias en la sobrevivencia de la cepa mutante para el gen PtpB respecto a la cepa salvaje. Sin embargo, cuando se infectaron macrófagos previamente activados con IFN $\gamma$ , se observó que la sobrevivencia de la cepa mutante para el gen de PtpB se reduce 7 veces respecto a la cepa salvaje. Este resultado fue confirmado mediante el uso de inhibidores específicos de PtpB, los cuales también causaron una disminución en la sobrevivencia de la bacteria dentro de los macrófagos.

Recientemente, Chauhan *et al.* generaron una cepa mutante (*Mtb* $\Delta$ mms) eliminando los tres genes de fosfatasa involucrados en la virulencia de *Mtb*, el gen de la PtpA, PtpB y el gen de la fosfatasa ácida SapM (Chauhan et al. 2013). Este triple mutante mostró una reducción significativa en la capacidad de infectar y crecer en macrófagos derivados de la línea THP-1. Además, luego de 10 semanas de una infección en cobayos con dicho mutante *Mtb* $\Delta$ mms, no se recuperaron bacilos en bazo y pulmones, lo cual sugiere un rol importante de estas fosfatasas en la colonización de estos órganos (Chauhan et al. 2013).

### **1.3.2. Características estructurales de PtpA y PtpB**

#### **1.3.2.1. PtpA, una fosfatasa de la familia LMW-PTP**

PtpA pertenece a la familia de las LMW-PTPs (18kDa), es monomérica y posee similitud con la fosfatasa humana hLMW-PTP o ACP1 (37% de identidad y 57% de similitud a nivel de la secuencia aminoacídica y alta homología estructural). Sorprendentemente, el genoma humano codifica para 107 PTPs pero sólo un gen pertenece a la familia de LMW-PTPs; este gen origina cuatro isoformas proteicas (ACP1s) producto del *splicing* alternativo (Alonso et al. 2004). La

estructura cristalográfica de la PtpA de *Mtb* muestra un único dominio, con el plegamiento clásico del dominio catalítico presente en las LMW-PTP, compuesto por un núcleo de 4 hojas  $\beta$  paralelas, rodeado por  $\alpha$ -hélices (protein data bank [PDB]: 1U2Q). Al igual que en otras LMW-PTPs, la cavidad del sitio activo de PtpA es profunda, lo cual favorece la entrada específica de la P-Tyr del sustrato. Además, la conformación del sitio activo, el P-loop que contiene la Cys catalítica y el loop DPYY que contiene el residuo catalítico Asp se encuentran conservados cuando se compara con la estructura de otras LMW-PTPs (Zhang et al. 1997) (Zhang et al. 1998).

Las principales diferencias entre la PTP humana y la de *Mtb* se ubican en dos regiones, una delección (D1) en hLMW-PTP (residuos 104-107) y una inserción (I1) en PtpA (residuos 118-120) (Figura 1.5). En otras PTPs, el *loop* variable (residuos 44-56 en PtpA) se ha visto implicado en definir la especificidad por los sustratos (Wang et al. 2000)(Zhang et al. 1998). Dicho loop forma una de las paredes y el fondo de la hendidura del sitio activo. El residuo Trp 48 de dicho *loop* junto a la Tyr 128 y Tyr 129 generan una superficie hidrofóbica a la entrada del sitio activo, característica específica de la PtpA. Además la presencia de la His 49 y Ser 52, comparado con el Glu 50 y Asn 53 en hLMW-PTP contribuyen en generar una distribución de cargas diferencial. Otra región de PtpA cercana al sitio activo, a lo largo de  $\alpha$ 4, muestra diferencias significativas, debido a la sustitución de los residuos cargados Asp-98/Lys-102 en hLMW-PTP, por los residuos hidrofóbicos Leu-96/Leu100 en PtpA. Estas regiones menos cargadas en PtpA respecto a su homólogo humano, se piensa jugarían un rol importante en definir el reclutamiento y/o unión al sustrato fisiológico de PtpA (Wang et al. 2000)(Zhang et al. 1998). Por lo tanto, a pesar que la estructura 3D de estas fosfatasas es similar, existen claras diferencias en la distribución de cargas superficiales, que han estimulado la búsqueda de inhibidores específicos. Al día de hoy se han reportado alrededor de 12 inhibidores para PtpA (Chiaradia et al. 2008; Chiaradia et al. 2012; Mascarello et al. 2010; Silva & Taberner 2010; Wong et al. 2013; Chatterjee et al. 2015).

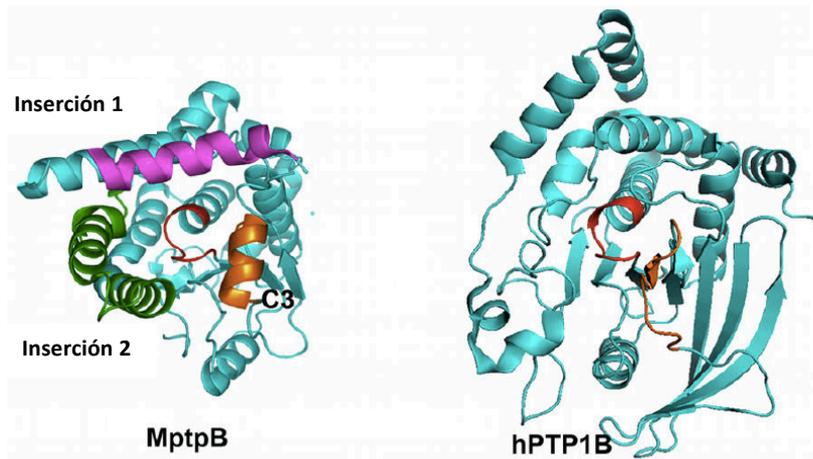
Por otro lado, existen evidencias *in vitro* que demuestran que la actividad de PtpA está regulada por fosforilación en dos Tyr específicas: Tyr-128 y Tyr-129. La fosforilación de PtpA en estas Tyr se ha reportado aumenta la actividad fosfatasa. Es discutido quién fosforila PtpA. El grupo de Av-Gay plantea que se trata de una quinasa de Tyr atípica de *Mtb*, la PtkA (Bach et al. 2009; Zhou et al. 2015). Asimismo, este grupo reportó *in vitro* que PtpA también puede ser fosforilada por varias Ser/Thr proteína quinasas (STPKs) de tipo eucariota (Zhou et al. 2015), entre ellas, la quinasa PknA de *Mtb* que activa a la PtpA a través de la fosforilación de la Thr 45. Sin embargo, en un trabajo reciente se realizaron experimentos que demuestran que la PtkA no sería una quinasa de Tyr y sugiere que las responsables de la fosforilación en Tyr en *Mtb* son Ser/Thr quinasas de la bacteria(Kusebauch et al. 2014).



### 1.3.2.2. PtpB, una fosfatasa de una nueva familia de fosfatasas lipídicas atípicas

PtpB es una fosfatasa monomérica de 30kDa, que en el primer estudio estructural fue clasificada como miembro de la familia de las DSPs, es decir una fosfatasa capaz de defosforilar P-Tyr y P-Ser/P-Thr. En este estudio se determinó que la Cys 160 y el Asp 82 eran los residuos catalíticos (Grundner et al. 2005). Sin embargo en un nuevo estudio estructural, se clasificó a la PtpB como una fosfatasa lipídica atípica (ALP), observándose que *in vitro* presenta triple especificidad, pudiendo actuar también sobre fosfoinositolfosfatos, incluyendo PI(3)P y PI(3,5)P<sub>2</sub> (Beresford et al. 2007).

PtpB, no presenta homólogo humano y la familia a la que pertenece se caracteriza por presentar una secuencia consenso distintiva en el sitio activo: HCXXGKDR, compartiendo características con las fosfatasas lipídicas eucariotas y con las PTPs. En PtpB la secuencia exacta del sitio activo es -CFAGKDRT- la cuál define el P-loop (residuos 160-167), similar a la de las fosfatasas lipídicas eucariotas PTEN (*lipid phosphatases phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*) y MTMs (miotubularinas). Estudios cinéticos muestran que el Asp 165 y no el Asp 82 previamente reportado sería el residuo importante para la actividad fosfatasa y que la Lys 164 es importante para la actividad sobre fosfoinositol sustratos como en las fosfatasas lipídicas eucariotas MTMs y FYVE-DSP1/2 (fosfatasas de tipo DSP que contienen un dominio FYVE) (Beresford et al. 2007). La estructura cristalográfica de PtpB reveló un plegamiento inusual, no visto en otras estructuras de PTPs (Grundner et al. 2005). A pesar de que tiene el típico dominio fosfatasa con una hoja beta central rodeada por hélices alfa, posee dos inserciones que rodean el dominio central; la inserción 1 (residuos 85-117) e inserción 2 (residuos 197-235) (Figura 1.6). Estas inserciones parecen ser importantes para regular la función de PtpB. La inserción 2 forma una "tapa" de dos hélices ( $\alpha 7$  y  $\alpha 8$ ), que cubre el sitio activo, definiendo una estructura cerrada de la enzima (PDB: 1YWF). La hélice  $\alpha 8$  contiene una PheX, la cual mimetiza a la P-Tyr y se ubica en el sitio activo. Otra característica estructural de PtpB es la presencia de una hélice alfa ( $\alpha 3$ ) en un motivo conservado que generalmente no tiene estructura secundaria en las PTPs ni en las DSPs. Esta hélice proporciona un segundo sitio de unión para inhibidores OMTS diferente al sitio activo (Grundner et al. 2007). La presencia de dos sitios de unión en PtpB facilitaría el diseño de inhibidores más específicos, con afinidad combinada. Asimismo, la diferencia en los sitios de unión respecto a las fosfatasas humanas también ha motivado la búsqueda de inhibidores altamente selectivos. Al día de hoy se han reportado alrededor de 16 inhibidores para PtpB (Chiaradia et al. 2012) (Dhanjal et al. 2014) (Silva & Taberner 2010).



**Figura 1.6.** Características estructurales de las fosfatasa lipídicas atípicas (ALPs) en comparación con una PTB humana de la familia de las DSP. La estructura de PtpB de *Mtb* (PDB ID 2OZ5), a la izquierda, muestra las 2 inserciones características, la inserción 1 ( $\alpha7$ - $\alpha8$ ) en magenta, y la inserción 2 ( $\alpha3A$ ) en verde, junto con la hélice C3 ( $\alpha3$ ) conservada en las ALP, en naranja. La estructura de la PTP1B humana (PDB ID 1AAX), a la derecha, muestra que la región análoga a C3 (en naranja) adopta una conformación no-helicoidal. El sitio activo (P-loop) se muestra en rojo. Extraído de Beresford et al. (Beresford et al. 2010).

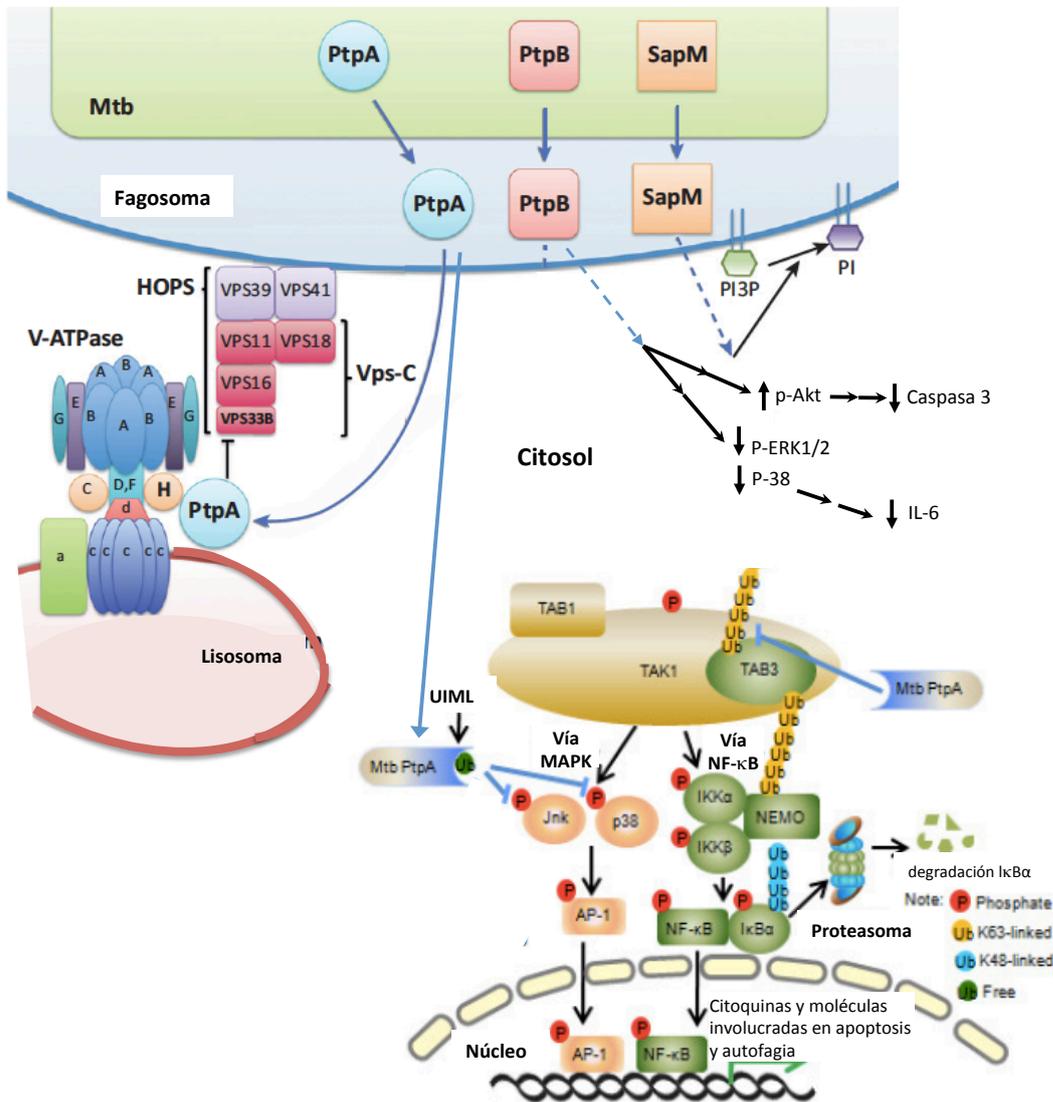
### 1.3.3. Sustratos de las PtpA y PtpB: hacia la elucidación de su papel en la biología de *Mtb*

De acuerdo con los antecedentes expuestos anteriormente, PtpA y PtpB constituyen moléculas relevantes en la biología de *Mtb* lo cual justifica el estudio de sus blancos o sustratos fisiológicos. El hecho que ambas fosfatasa se recuperen en los sobrenadantes de cultivos bacterianos, y en el caso de PtpA, en el citosol de los macrófagos infectados, orienta la búsqueda hacia blancos en el macrófago, aunque no deberíamos descartar totalmente la posibilidad de que existan blancos en la bacteria. La búsqueda de sustratos de fosfatasa ha resultado más compleja que en el caso de las quinasas ya que implica detectar la remoción y no la adición del grupo fosfato a una proteína; la adición resulta más sencilla de detectar porque se puede marcar al grupo fosfato, por ejemplo utilizando átomos radioactivos. La estrategia más comúnmente utilizada para identificar potenciales sustratos de PTPs es la estrategia conocida como *substrate trapping* (ST), que se basa en la generación de mutantes de la fosfatasa que retienen la habilidad de unirse a sus sustratos ( $K_m$  similar a la proteína salvaje), pero tendrían ausente o disminuida la capacidad de defosforilarlos ( $k_{cat}$  muy baja o nula), permitiendo la captura del complejo enzima-sustrato (Flint et al. 1997) (Blanchetot et al. 2005) (Tiganis & Bennett 2007). Inicialmente el mutante más utilizado para las PTPs ha sido el mutante en la Cys catalítica la cual es sustituida generalmente por una serina (mutante C/S) (Blanchetot et al. 2005). Como se mostró en la Figura 1.4, en la proteína salvaje esta Cys conservada del motivo C[X]<sub>5</sub>R[S/T] del sitio activo de las PTPs actúa como nucleófilo sobre el

sustrato fosforilado para formar un intermediario tiofosforilado (E-P), por lo cual el mutante C/S presenta pérdida total de actividad. Actualmente, el mutante más utilizado es el producido por la sustitución del Asp catalítico por un residuo de Ala (mutante D/A). Este Asp conservado se encuentra presente en el loop DPY, y en la proteína salvaje asiste la formación e hidrólisis del complejo E-P. La mutagénesis de este residuo crítico de Asp resulta en una disminución importante pero no total de la actividad. Desde que se describió el uso de este mutante D/A, se han obtenido grandes progresos en la identificación de sustratos de PTPs.

En 2008, antes del inicio de este trabajo, Bach et al. Identificaron la proteína "Vacuolar Protein sorting 33B" (VPS33B) empleando la estrategia de ST con el mutante PtpA-D126A. VPS33B es un componente del complejo proteico de clase C requerido para el tráfico y fusión de membranas de compartimientos vesiculares de la vía endocítica (Bach et al. 2008). Por un lado, la desfosforilación de VPS33B por parte de PtpA excluiría la subunidad H del complejo V-ATPasa (*Vacuolar H<sup>+</sup>-ATP-ase*), inhibiendo la acidificación y maduración del fagosoma. Se ha reportado que PtpA interaccionaría primero con la subunidad H de la V-ATPasa, lo cual contribuiría a aproximar a PtpA a su sustrato VPS33B ubicado en la interfase de unión del fagosoma con el lisosoma. La unión de PtpA a la V-ATPasa sería entonces un pre-requisito para la defosforilación de VPS33B dentro del macrófago (Bach et al. 2008) (Wong et al. 2011).

Más tarde, en el año 2014 el mismo grupo reportó un segundo sustrato de PtpA: la proteína *Glycogen Synthase Kinase 3, subunit alpha* (GSK3 $\alpha$ ) (Poirier et al. 2014). Los autores esta vez utilizaron una estrategia proteómica denominada *kinome analysis*, para identificar proteínas que participan en las vías de señalización del macrófago y cuya fosforilación es modificada por la PtpA de *Mtb*. Para estudiar el efecto de PtpA, los autores compararon el estado de fosforilación de una serie de proteínas señalizadoras provenientes de macrófagos no infectados, macrófagos infectados con *Mtb* y macrófagos infectados con  $\Delta$ PtpA *Mtb*. Mediante este método, observaron que la PtpA afecta el patrón de fosforilación de varias proteínas señalizadoras, entre ellas GSK3 $\alpha$ . Determinaron que PtpA defosforila *in vitro* la Tyr279 de la GSK3 $\alpha$ , y luego confirmaron la interacción entre PtpA y GSK3 $\alpha$  mediante la tecnología ALPHA Screen (amplified luminescent proximity homogeneous assay). La defosforilación de GSK3 $\alpha$  por PtpA induciría la vía anti-apoptótica durante la infección temprana, favoreciendo la sobrevivencia del patógeno dentro del macrófago hospedero. Recientemente, Wang et al. 2015, encontraron que PtpA interacciona de forma no-covalente con la ubiquitina del hospedero a través de una región de PtpA previamente desconocida y nombrada *ubiquitin-interacting motif-like* (UIML). Esta interacción activaría a PtpA la cual según este trabajo sería capaz de defosforilar las quinasas Jnk y p38, con la consecuente inhibición de la respuesta inflamatoria del macrófago (medida en término de la disminución de la secreción de citoquinas TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y IL-12). La defosforilación de Jnk y p38 no sólo afectaría vías asociadas a la expresión de citoquinas sino también regularía otras moléculas *downstream* en la vía de señalización involucradas en la apoptosis, autofagia, respuesta al estrés y proliferación (Figura 1.7).



**Figura 1.7.** Esquema representativo de las vías de señalización que serían alteradas por las fosfatasa de *Mtb*, PtpA, PtpB y SapM, que son secretadas por *Mtb* durante la infección del macrófago. Mientras que PtpA se ha demostrado que es traslocada al citosol, éste fenómeno no se ha observado directamente para PtpB y SapM (líneas azules interrumpidas). **SapM** actuaría desfosforilando PI3P en la membrana del fagosoma, inhibiendo las vías de señalización del hospedero y el reclutamiento de proteínas del tráfico de membranas hacia el fagosoma. La actividad de **PtpB** llevaría a una disminución en la fosforilación de las quinasas ERK1/2 y p38, y un aumento en la fosforilación de Akt, resultando en una disminución en la producción de IL-6 y una disminución de la apoptosis respectivamente. **PtpA**: actuaría desfosforilando VPS33B, lo cual resulta en la exclusión de la V-ATPasa del fagosoma, inhibiendo la acidificación y maduración del fagosoma. Asimismo, PtpA interaccionaría no covalentemente con la ubiquitina del hospedero a través de la región UIML, activando PtpA que desfosforilaría la quinasa Jnk y la MAPK p38 suprimiendo así la respuesta. Por otro lado PtpA bloquea la respuesta inmune innata mediada por el adaptador TAB3 y dependiente de NF-κB.

Hasta ahora no se han identificado sustratos para PtpB, pero se han sugerido varios teniendo en cuenta evidencias experimentales indirectas. Se piensa que PtpB cumple un rol en atenuar la respuesta inflamatoria del hospedero, interfiriendo con la señalización mediada por interferón gamma (IFN $\gamma$ ) en macrófagos (Zhou et al. 2010). Los autores sugieren que PtpB desfosforila dos quinasas del macrófago (ERK1/2 y p38), bloqueando la producción de IL-6, e inhibiendo así la respuesta inmune innata del hospedero. Asimismo, se postula que PtpB activaría en paralelo la vía mediada por la quinasa Akt, inhibiendo la apoptosis de los macrófagos, lo que permitiría la persistencia de la bacteria dentro de las células eucariotas (Zhou et al. 2010).

Finalmente, dada su actividad *in vitro* sobre fosfoinositoles, se postula que PtpB podría alterar el metabolismo del fosfoinositol y las vías de señalización asociadas, que juegan un rol importante en la maduración del fagosoma (Beresford et al. 2007).

***En resumen, teniendo en cuenta los antecedentes expuestos, surge que las fosfatasa en Tyr son capaces de utilizar múltiples sustratos proteicos, mostrando potencial para modular una variedad de vías de señalización asociadas a propiedades funcionales del macrófago. Esta modulación parecería contribuir a la adaptación y sobrevivencia de Mtb en el macrófago.***

## **1.4. Objetivos y estrategia experimental**

### **1.4.1. Objetivo general**

El objetivo general de esta tesis es avanzar en la comprensión del papel que cumplen las fosfatasa PtpA y PtpB en la adaptación de *Mtb* a su célula hospedera.

### **1.4.2. Objetivos específicos**

1. Aislar e identificar nuevos sustratos de la fosfatasa PtpA de *Mtb*.
2. Validar los nuevos sustratos de la fosfatasa PtpA de *Mtb*, como punto de partida para orientar el análisis de las propiedades celulares que podría modular en los macrófagos.
  - 2.1. Se analizará la interacción entre la PtpA y los sustratos identificados, previamente obtenidos en forma pura, así como la capacidad de la PtpA de desfosforilarlos.
  - 2.2. Se introducirá el gen de la PtpA en macrófagos humanos mediante la utilización de un vector viral para evaluar el efecto de la PtpA en las propiedades funcionales de los macrófagos, asociadas a los candidatos identificados.
3. Con respecto a la PtpB, prepararemos mutantes que permitan a futuro reproducir el trabajo que desarrollemos con la PtpA.

### 1.4.3. Estrategia experimental

Como metodología para abordar la identificación de los sustratos se utilizará una estrategia de ST, pero optimizando etapas de la metodología que consideramos cruciales para su éxito. En primer lugar, sabemos que un mutante para ser utilizado en ST debe: (i) ser inactivo o parcialmente inactivo ( $k_{cat}$  muy baja o nula, determinada con un sustrato artificial), (ii) unir eficientemente a su sustrato ( $K_m$  similar a la de la proteína salvaje) y (iii) mantener prácticamente su estructura integral. Vale la pena mencionar que en muchos de los trabajos publicados que usan ST (incluyendo como ya se mencionó el de Bach et al.), el mutante utilizado no ha sido caracterizado estructuralmente, poniendo en duda la pertinencia de los sustratos identificados. Nos proponemos trabajar con el mutante PtpA-D126A previamente utilizado por Bach et al, pero estudiaremos las propiedades estructurales y funcionales para asegurarnos que la enzima obtenida es adecuada para su uso en la estrategia de ST. Además, para el ST emplearemos extractos de macrófagos enriquecidos en P-Tyr mediante el uso de inhibidores de fosfatasas como el ortovanadato de sodio y la iodoacetamida durante su preparación. Por otro lado, para el aislamiento de potenciales sustratos por ST, es fundamental cuidar las condiciones experimentales de los ensayos de asociación, definiendo cuales son las condiciones más favorables a emplear en las etapas de lavado y elución, de forma de evitar la captura de proteínas abundantes e inespecíficas que dificultan el aislamiento de las proteínas de interés. Para optimizar el ST, evaluaremos en forma previa por Resonancia Plasmónica de Superficie (SPR) la interacción de la PtpA D126A con componentes del extracto de macrófagos humanos enriquecidos en P-Tyr, y determinaremos las características específicas de dicha interacción.

A la identificación por espectrometría de masas de las proteínas aisladas por ST seguirá una etapa posterior de validación como sustratos de la PtpA. Se han descrito diferentes aproximaciones experimentales y criterios para la validación de sustratos, no existiendo un estándar experimental mínimo para definir una molécula como sustrato de una PTP, hecho que discuten Tiganis & Benett (Tiganis & Bennett 2007). Estos autores han propuesto tres criterios para esta definición: (i) demostración de la interacción directa entre el potencial sustrato y la PTP; además, la formación de este complejo debería inhibirse con ortovanadato de sodio, un inhibidor competitivo de las PTPs; (ii) desfosforilación *in vitro* del sustrato por parte de la fosfatasa; (iii) modulación a nivel celular por parte de la PTP de la fosforilación en Tyr del potencial sustrato. Cada una de estas aproximaciones proporciona evidencias que sugieren la identificación de un potencial sustrato de PTP, pero todas tienen limitaciones. En este trabajo buscaremos validar *in vitro* los sustratos aislados por ST. Además, teniendo en cuenta la identidad de los mismos y la información en la literatura sobre sus funciones, nos proponemos poner a punto un modelo experimental -basado en la expresión de PtpA en macrófagos humanos- que nos permita examinar si PtpA modifica aquellas propiedades funcionales de los macrófagos que están asociadas a la actividad de los candidatos identificados.

# CAPÍTULO 2

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 2.1. Materiales

#### 2.1.1. Reactivos químicos y bioquímicos

Todos los productos que se detallan a continuación se obtuvieron de Sigma o AppliChem, o según se detalla.

Sales inorgánicas; compuestos utilizados en la preparación de soluciones amortiguadoras (buffer): ácido 4-(2-hidroxietil) -1-piperazina-etano sulfónico (HEPES), tris(hidroximetil) aminometano (TRIS).

Ditiotreitol (DTT); iodoacetamida (IAA); ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y etanolamina.

Inhibidores de proteasas: benzamidina, inhibidor de tripsina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), coctail de inhibidores de proteasas sin EDTA (Sigma S8830). Sustrato artificial de fosfatasas: *para*-nitro fenil fosfato (*p*-NPP).

Agarosa, acrilamida, N,N'-metilen-bis-acrilamida, glicina, N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamine (TEMED), azul de bromofenol, azul de Coomasie R-250, azul de Coomasie G-250, nitrato de plata, seroalbúmina bovina (BSA), azida de sodio.

Solventes orgánicos: etanol, glicerol, formalina, acetonitrilo, dimetilsulfóxido (DMSO).

Reactivos utilizados en la preparación de medios de cultivo de bacterias: triptona, extracto de levadura, Lysogeny broth (LB), agar.

Antibióticos: ampicilina, kanamicina, tetraciclina.

Detergentes: lauril sulfato de sodio (SDS), polisorbato 20 (Tween 20), t-octil-fenoxipolietoxietanol (Tritón X-100).

Marcadores de PM de proteínas: Fermentas SM 0431 y Fermentas SM0431 prestained kit.

Marcadores de PM para ADN: 100 bp DNA Ladder Bioron 304005; 1 Kb Fermentas SM0311.

Bloqueante comercial : *Blocking solution*, Invitrogen #00-0105.

Medios de cultivo de líneas celulares: RPMI 1640 (Sigma), DMEM (Gibco 12320032).

## 2.1.2. Líneas celulares

### 2.1.2.1. Cultivo de monocitos de la línea THP-1 humana

La línea celular pre-monocítica humana THP-1 (American Type Culture Collection, ATCC TIB-202) se cultivó a 37°C bajo una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub> en medio RPMI 1640 (Sigma) suplementado con L-glutamina 2 mM (Invitrogen), bicarbonato de sodio 1.5 g/l, piruvato de sodio 1 mM, Hepes a pH 7.0, suero fetal bovino 10% (SBF, Invitrogen), antibiótico y antimicótico (penicilina, streptomina, anfotericina, Sigma # A5955) (ATB/AM Sigma). Los cultivos se mantuvieron a una concentración entre 0.2-1.0 x 10<sup>6</sup> células/mL. Estas células crecen en suspensión, por lo cual para expandir el cultivo, las células se centrifugaron (10 min a 800 rpm) cuando alcanzaron una concentración de 1.0 x 10<sup>6</sup> cel/ml, y se resuspendieron a una concentración entre 0.2-0.3 x 10<sup>6</sup> cel/ml.

### 2.1.2.2. Cultivo de la línea celular Vero 2.2

La línea celular Vero 2-2 (provista por el Dr. Cornel Fraefel del Instituto de Virología de la Universidad de Zurich, Suiza) es una línea celular derivada de la línea Vero de epitelio de hígado de mono africano, a la cual se le incorporó al genoma un plásmido conteniendo el promotor y el gen ICP27 de HSV-1. Dicha línea celular se cultivó en medio DMEM completo (DMEM, conteniendo SBF 10%, antibiótico-antimicótico 1% (Penicilina, Streptomina, anfotericina B, Gibco #15240-062) (ATB/AM Gibco), G418 sulfato (Geneticina, Gibco) 500 µg/mL, a 37°C bajo una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>. Las células Vero se adhieren a la superficie, por lo cual para mantener y/o expandir el cultivo las células se disgregaron con tratamiento con una solución de Tripsina 0.25%-EDTA 0.02%. Para mantener la línea celular se realizaron 2 pasajes semanales realizando una dilución 1:5 de la suspensión con medio fresco.

## 2.2 . Métodos generales de biología molecular

### 2.2.1. Preparación de células competentes de *Escherichia coli*

Se prepararon células *E.coli* DH5α y células *E coli* BL21 (DE3) quimio-competentes y células *E.coli* DH5α y *E.coli* XL-1 blue electro-competentes. Las células DH5α y XL-1 blue se utilizaron para la evaluación de las mutagénesis realizadas y en la expansión de los vectores utilizados a lo largo de la tesis: el pET28a conteniendo el gen de la PtpA salvaje (PtpA-wt del inglés *wild type*) y el gen de PtpA-D126A; el pET28a conteniendo el gen de la PtpB salvaje (PtpB-wt); y el bácmido fHSV-Δpac-ΔICP27. Las células BL21(DE3) se utilizaron para los ensayos de expresión de los genes de interés especificados.

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

El protocolo utilizado para la producción de células quimio-competentes está basado en el uso de CaCl<sub>2</sub> (Mandel & Higa 1970). Se inoculó un tubo de 3 mL de *Lysogeny broth* (LB) con una

colonia fresca de la cepa de células *E.coli* DH5 $\alpha$  o *E.coli* BL21 (DE3). Se dejó crecer toda la noche a 37°C bajo una agitación de 200 rpm. Al día siguiente se inocularon 250 mL de LB en un matraz de 1 L, con 2.5 mL (1/100) del precultivo. Se creció a 37°C hasta que la densidad óptica (D.O.) a 620 nm alcanzara 0.3. Se centrifugó a 3500 rpm, durante 10 min a 4°C. A partir de ese momento las células y reactivos se mantuvieron en frío. Se descartó el sobrenadante, se lavó el pellet con 100 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M estéril, agregando de a poco hasta resuspender el pellet. Posteriormente se centrifugó a 3500 rpm, durante 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 100 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M. Se incubó 1 h a 4°C en la solución de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M. Se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min a 4°C y se resuspendió el pellet en 3 mL de CaCl<sub>2</sub> con 20% glicerol estéril. Finalmente, la suspensión de células se alicuotó de a 50-100  $\mu$ L en eppendorf pre-enfriados en hielo, y se almacenó rápidamente a -80°C.

### **2.2.1.3. Obtención de células *E.coli* XL-1 blue y *E.coli* DH5 $\alpha$ electro-competentes**

Las células *E.coli* XL-1 blue tienen resistencia a tetraciclina por lo cual se preparó un precultivo en 5 mL de LB con 12.5  $\mu$ g/mL de tetraciclina, a partir de una colonia fresca de la bacteria. Se dejó crecer toda la noche a 37°C bajo una agitación de 200 rpm. Posteriormente se inoculó 1L de LB conteniendo tetraciclina con 4.5 mL del precultivo y se puso a crecer a 37°C bajo agitación a 200 rpm, hasta que la DO<sub>600 nm</sub> alcanzara 0.65. Se puso a enfriar el cultivo 15-30 min en hielo, y luego se centrifugaron las células a 4000 rpm, durante 15 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en un volumen final de 1L de agua fría estéril, manteniendo siempre en hielo. Se centrifugaron las células a 4000 rpm, durante 15 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante, se lavaron las células con un volumen final de 500 mL de agua fría estéril y se centrifugaron nuevamente a 4000 rpm, durante 15 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y resuspendió en 20 mL de glicerol al 10% estéril frío. Finalmente, luego de centrifugar a 4000 rpm, durante 15 min a 4°C se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 2.5 mL de glicerol al 10% estéril y frío. Se alicuotaron las células rápidamente de a 50-100  $\mu$ L en tubos previamente enfriados, manteniéndolos en hielo y se almacenaron rápidamente a -80°C. En el caso de la producción de *E.coli* DH5 $\alpha$  electro-competentes se utilizó el mismo protocolo pero preparándose el precultivo y cultivo sin antibiótico.

Para cada lote de células competentes preparadas se calculó la eficiencia de la transformación, realizando para ello una transformación con un plásmido de concentración conocida y sembrando varias diluciones de la mezcla de transformación en las placas de LB adecuadas.

## **2.2.2. Transformación de células de *E. coli***

### **2.2.2.1. Transformación química de *E. coli* con los vectores de interés**

Se transformaron bacterias quimio-competentes *E.coli* DH5 $\alpha$  con el vector de interés, por la técnica de shock térmico. Para ello, se descongeló una alícuota de 50  $\mu$ L de células durante 10 min en hielo; pasado ese tiempo se agregaron 100-200 ng del ADN plasmídico de interés (o 5

μL del producto de mutagénesis tratado con DpnI), se incubó 30 min en hielo, se realizó el shock térmico en baño de agua a 42°C durante 90 s e inmediatamente se enfriaron 2 min en hielo. Luego se agregaron 500 μL de medio de cultivo LB y se incubaron 1 h a 37°C bajo agitación a 200 rpm. El vector pET28a contiene un gen de resistencia a la kanamicina, por lo cual se sembraron 100-200 μL de la mezcla de transformación en placas de LB Agar conteniendo 50 μg/mL de kanamicina (LB-kanamicina). Las placas se incubaron en una estufa a 37°C por 16 hs para posterior evaluación del crecimiento de colonias transformantes.

### **2.2.2.2 Transformación de células por electroporación**

Para realizar la transformación de las células electro-competentes se siguió el protocolo del equipo *Gene Pulser X Cell Electroporation System* (BioRad). Se descongeló una alícuota de 50 μL de células electro-competentes *E. coli* XL-1 blue durante 10 min en hielo. En un eppendorf previamente enfriado en hielo se colocaron 40 μL de la suspensión de células. Se agregó 1 μL del ADN plasmídico de interés, se homogeneizó bien y se dejó 1-2 min en hielo. Se pasó la mezcla a una celda de electroporación de 2 mm de espesor previamente enfriada. En el equipo se seleccionó el protocolo para bacterias, se colocó la celda en el electroporador, se dio un pulso de 5 ms, 2.5 kv y luego rápidamente se agregó 1 mL de LB o SOC a la celda y se mezcló por inversión. Se pasó la suspensión de células a un eppendorf y se incubó 1 h a 37°C bajo agitación a 200 rpm. Se sembraron 100-200 μL de la mezcla de transformación en placas de LB-kanamicina. Las placas se incubaron en una estufa a 37°C por 16 hs para posterior evaluación del crecimiento de colonias transformantes.

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

Para purificar el ADN plasmídico se siguió el protocolo de purificación por lisis alcalina. Para la obtención de un precultivo se inoculó una colonia de una placa fresca de *E. coli* DH5 alfa o XL1-blue conteniendo el vector pET 28a(+) con el gen de interés en 3 mL de medio LB-kanamicina, dejándose crecer a 37°C bajo agitación a 200 rpm por 16 hs. Se centrifugó 1 min a 12.000 rpm (2 veces, para coleccionar todo el cultivo) y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 200 μL de Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM y se agregaron 5 μL de ARNasa 10 mg/mL. Posteriormente se agregaron 200 μL de una solución recién preparada de NaOH 200 mM, SDS 1% y se mezcló por inversión suavemente, incubando 5 min a temperatura ambiente (TA). Pasado este tiempo se agregaron 200 μL de una solución de acetato de potasio 3 M pH 4.8 (fría), observándose la aparición de turbidez blanca al precipitar las proteínas y el ADN cromosómico. Se mezcló por inversión, se dejó 5 min en hielo y posteriormente se centrifugó a 12.000 rpm por 20 min recuperándose en el sobrenadante el ADN plasmídico. Al sobrenadante se le agregó 0.6 volúmenes de isopropanol para concentrar el ADN plasmídico por precipitación. Se incubó 15 min en hielo y se centrifugó a 12.000 rpm esta vez a 4°C por 20 min.

Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 mL de etanol 70% frío. Se centrifugó a 12.000 rpm 5 min a TA, se descartó todo el sobrenadante y se secó el pellet bajo lámpara para finalmente resuspenderlo en 35  $\mu$ L de agua miliQ. El ADN plasmídico obtenido se conservó a -20°C.

#### **2.2.4. Cuantificación de ácidos nucleicos**

La cuantificación se realizó mediante medida espectrofotométrica en Nano Drop Lite (Thermo Scientific) y en paralelo mediante electroforesis en gel de agarosa, comparando la intensidad de la banda de interés con la intensidad correspondiente a la banda del estándar de tamaño similar y concentración conocida.

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

Se prepararon geles de agarosa 1% en buffer 0.5x TBE (Tris acetato 20 mM, EDTA 2 mM, pH 8) y se le agregó 2  $\mu$ L del reactivo GoodView (SBS Genetech) por cada 50 mL de gel para detectar la presencia de ácidos nucleicos por exposición al UV. A las muestras se les agregó buffer de carga 6x (glicerol 50%, azul de bromofenol 0.02%, xilencianol 0.002%) y se sembraron junto con un marcador de ácidos nucleicos de tamaño adecuado. Se realizó la electroforesis en buffer TBE 0.5x a 80V. Las imágenes se registraron con la cámara fotográfica.

## **2.2. Métodos generales de bioquímica de proteínas**

### **2.2.1. Determinación de la concentración de proteínas**

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford 1976) que se basa en la detección de la interacción del Azul de Coomassie G-250 con ciertos aminoácidos presentes en las proteínas (Arg, Trp, Tyr, His, Phe), lo que provoca un corrimiento en el espectro de absorción del compuesto de un color rojo/amarronado al color azul, fácilmente detectable a 595 nm. El método se adaptó para su realización en placa de 96 pocillos. Las muestras y diluciones conocidas del estándar de seroalbúmina bovina (BSA) se analizaron por triplicado. A 10  $\mu$ L de cada muestra se le agregaron 200  $\mu$ L del reactivo de Bradford (Coomassie Brilliant Blue G-250 10% (p/v) en una solución de etanol 95%, ácido fosfórico 85% (p/v) y agua miliQ (5:10:85). Se mezcló e incubó 5 min, y se midió la  $Abs_{595nm}$ . Con los valores de absorbancia de las concentraciones del estándar de BSA se realizó una curva de calibración la cual se ajustó a una ecuación cuadrática de la forma  $y=ax^2+bx+c$  siendo  $y= \mu g \text{ BSA}/\mu L$  y  $x= Abs_{595nm}$  tal como recomiendan Olson, B.J. & Markwell (Olson & Markwell 2007).

### **2.2.2. Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Las proteínas se separaron según su peso molecular mediante SDS-PAGE siguiendo el protocolo convencional (Laemmli 1970), utilizando un gel concentrador al 6% (p/v) y un gel separador de 12 o 15% de acrilamida dependiendo de la muestra. Las muestras se diluyeron con buffer muestra 6X (Tris 0.35 M, SDS 10%, glicerol 30%, azul de bromofenol 0.02%) hasta una concentración 1x de dicho buffer, se les agregó DTT a una concentración final 50-100 mM, se calentaron 5 min a 95°C, y se dejaron enfriar previo a ser sembradas en los pocillos del gel de electroforesis. La misma se realizó a 60 V durante el pasaje por el gel concentrador, y luego a 180 V durante el pasaje por el gel separador, en un buffer Tris glicina (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1% pH 8.3). El peso molecular de las muestras se estimó por comparación con estándares de PM. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250, o con plata, o se transfirieron a membranas de nitrocelulosa por electrotransferencia (ver sección 2.2.3) dependiendo del experimento.

La tinción de Coomassie se realizó por inmersión en una solución de Coomassie blue R250 0.2% (p/v), etanol 30% (v/v), ácido acético 7% (v/v) durante 60 min y luego se decoloró con una solución de etanol 30% (v/v) y ácido acético 7% (v/v). La tinción de plata se llevó a cabo siguiendo el siguiente protocolo: (i) se fijaron las proteínas incubando el gel en una solución de ácido acético al 10%, etanol 50%, formalina 0.05%, durante al menos 1 h con agitación. ii) se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con etanol 50%, y se enjuagó 1 min con agua mQ; (iii) se incubó rápidamente (no más de 30 seg) con la solución de sensibilización ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 0.02%) y luego se hicieron 3 lavados de 1 min con agua mQ; (iii) se incubó en oscuridad durante 20 min con solución de tinción (nitrate de plata 0.2% (p/v), formalina 0.075% (v/v)) y finalmente se hicieron 3 lavados de 1 min con agua mQ; (iv) por último se incubó con solución de revelado ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  3%,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.0004 %, formalina 0.05%), hasta que se visualizaron las bandas, deteniéndose la reacción con solución de fijación.

### **2.2.3. Electrotransferencia e inmunodetección (immunoblot)**

Las muestras separadas por SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Thermo) utilizando el sistema de transferencia húmeda de BioRad, en Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%, etanol 20%. Las proteínas se transfirieron durante 1 h a 100 V. Una vez finalizada la transferencia, la membrana se bloqueó con Bloqueante comercial, durante toda la noche a 4°C. Luego se lavó la membrana dos veces con TBS (Tris-Cl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM) conteniendo Tween-20 al 0.1% (TBS-T) y se incubó con el anticuerpo diluido en TBS-T

durante 90 min o toda la noche según el anticuerpo utilizado. Luego de 3 lavados de 5 min cada uno se incubó la membrana durante 1 h con el anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina (FA) o a peroxidasa (HRP) según el experimento. Posteriormente, luego de 4 lavados con TBS-T, y un lavado con TBS se procedió al revelado. En los ensayos en que se utilizó el anticuerpo secundario conjugado a FA, se agregó el sustrato comercial BCIP/NBT (*blue liquid substrate system* Sigma #B3804) hasta la aparición de las bandas; cuando se utilizó el anticuerpo conjugado a HRP se reveló con el sustrato comercial *Super Signal West Pico Chemiluminescent substrate* (Thermo). En este caso se incubó la membrana 5 min con el sustrato, y luego se expuso en el equipo de quimioluminiscencia GBOX Chemi System (SynGene), haciendo exposiciones en general de entre 10 s y 2 min según el anticuerpo utilizado.

A lo largo de la tesis, se utilizó en varias oportunidades la metodología de inmunodetección por inmunoblot (*western blot*), y se utilizaron los siguientes anticuerpos comerciales:

#### Anticuerpos primarios:

Anticuerpo	Origen	Procedencia	Dilución
anti fosfotirosina	Monoclonal en ratón	Invitrogen #136600	1/500
anti fosfotirosina	Monoclonal en ratón	Cell Signalling # 9411	1/2000
anti ECHA/ECHB	Monoclonal en ratón	Abcam #ab110302	1/500
anti K6PP	Policlonal en conejo	Abcam #ab186132	1/2000
anti ATP5A	Monoclonal en ratón	Abcam #ab14748	1/1000

#### Anticuerpos secundarios:

Anticuerpo	Origen	Procedencia	Dilución
anti-mouse- FA	Cabra	Sigma #A3562	1/30000
anti mouse-HRP	Cabra	Santa cruz sc2005	1/2000
anti mouse-HRP	Cabra	Sigma #A4416	1/10000
anti rabbit-HRP	Cabra	Sigma #A6154	1/5000

### 2.3. Obtención de los mutantes de las fosfatasas PtpA y PtpB

Los vectores pET 28a(+) conteniendo el gen de la PtpA-wt y PtpB-wt fueron obtenidos previamente por la Dra. Villarino en el laboratorio dirigido por el Dr. Pedro Alzari (Unité de Biochimie Structurale, Institut Pasteur, París-Francia). El vector pET 28a(+) confiere a las bacterias transformadas resistencia al antibiótico kanamicina, y presenta el promotor del fago T7, por lo cual la inducción de la síntesis de la T7 polimerasa promueve la expresión de la proteína recombinante. El mutante PtpA-D126A a ser utilizado en la estrategia de *Substrate*

*Trapping* fue obtenido también por la Dra. Villarino por mutagénesis sitio dirigida, utilizando como molde el gen de PtpA-wt clonado en el vector pET 28a(+). En la figura 1 se muestra un esquema del vector pET 28a(+) y la secuencia del mismo indicando el sitio donde fue clonado el gen de PtpA-wt y PtpB-wt.

Los mutantes en la Cys catalítica de PtpA: *PtpA-C11S* y PtpB: *PtpB-C160S* fueron obtenidos por mutagénesis sitio dirigida utilizando el protocolo descrito en Stratagene, QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit, utilizando como molde el plásmido conteniendo el gen de PtpA (Rv2234) o el de PtpB (Rv0153c), e iniciadores conteniendo el codón con la mutación.

Los iniciadores utilizados para la producción de *PtpA-C11S* (cambio de TGT a TCT), fueron:

Sentido: 5' - TTC GTT TCT ACG GGC AAC ATC TG-3'

Antisentido: 5' - CAG ATG TTG CCC GTA GAA ACG AA - 3'

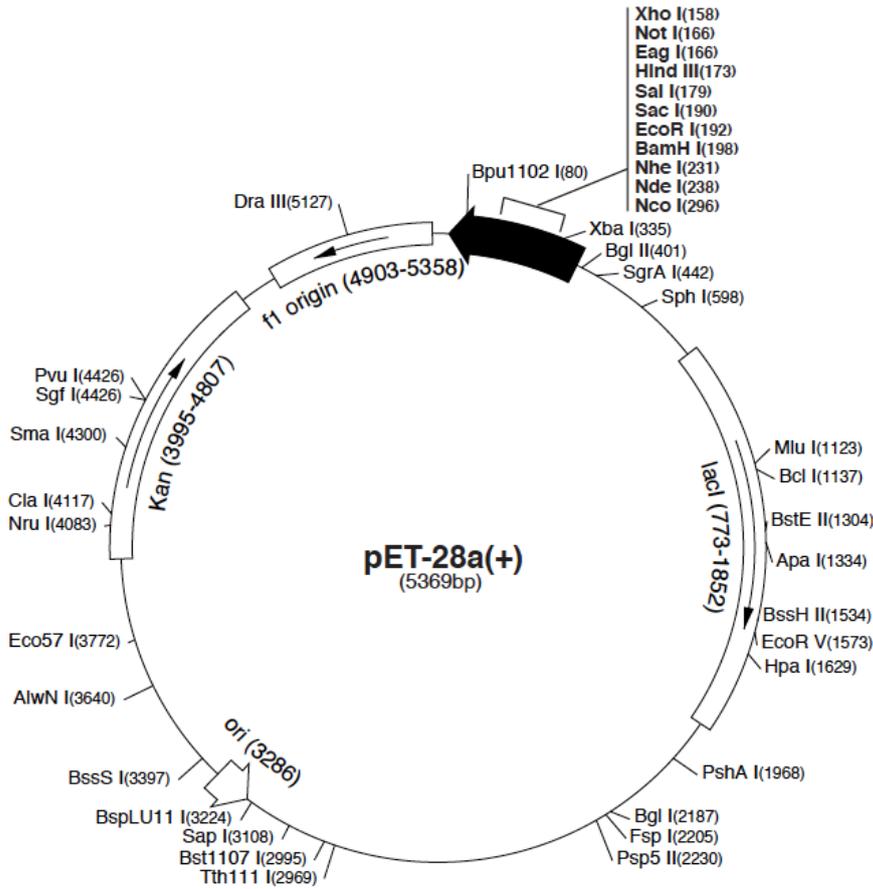
Los iniciadores utilizados para la producción de *PtpB-C160S* (cambio de TGC a AGC), fueron:

Sentido: 5' - CCA CAG CTT CGC GGG TAA GGA TGC - 3'

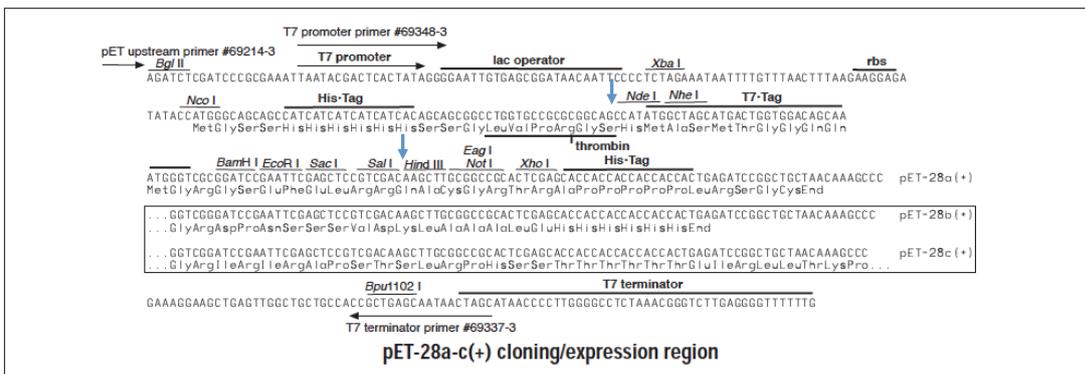
Antisentido: 5' - CGA TCC TTA CCC GCG AAG CTG TGG - 3'

La reacción de PCR se realizó utilizando 50 ng del ADN molde (PtpA-wt o PtpB-wt), 125 ng de cada uno de los iniciadores, 1 µL dNTP mix (10 mM), y 1.25 UI de Pfu ADN polimerasa (Stratagene), en un volumen final de 50 µL conteniendo 2 mM MgSO<sub>4</sub>. Las condiciones de reacción fueron: 30 s a 95°C, y 16 ciclos de 30 s a 95°C seguido de 1 min a 55°C y 5 min a 68°C. Luego de la reacción de PCR, 10 µL del producto se trataron con 1 µL de la enzima Dpn I (10 U/µL) (Invitrogen) que se utilizó para digerir el ADN parental metilado y dejar sólo el vector conteniendo la mutación. Se incubó la reacción con la enzima durante 1 h a 37°C. Con el vector obtenido se transformaron células *E. coli* DH5α quimiocompetentes en uno de los casos o células *E. coli* XL-1 electrocompetentes (con mayor eficiencia de transformación). Con las colonias transformantes obtenidas se realizaron precultivos en LB-kanamicina, a partir de los cuales se purificó el ADN plasmídico, y se almacenó a -20°C. La pureza del mismo se analizó en gel de agarosa al 1% y la secuencia del gen de interés fue verificada por secuenciación (Servicio de secuenciación del Institut Pasteur de Montevideo).

A



B



**Figura 2.1.** Vector de clonación pET-28a(+). (A) Esquema del vector mostrando los diferentes elementos que contiene, entre ellos el gen que confiere resistencia a la kanamicina y los sitios de corte de enzimas de restricción ([www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pET\\_vectors/pET-28a-c\\_map.pdf](http://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pET_vectors/pET-28a-c_map.pdf)). (B) Secuencia del vector indicando en azul el sitio donde fue clonado el gen de PtpA y PtpB de *M. tuberculosis*, utilizando las enzimas de restricción NdeI y HindIII. Se puede observar que de esta forma al gen de la fosfatasa se le adiciona una secuencia que codifica para un His-tag en la región N-terminal.

## 2.4. Producción de las proteínas recombinantes

### 2.4.1. Expresión de las proteínas recombinantes en *E. coli* BL21 (DE3)

Se expresaron en forma recombinante PtpA-wt, PtpB-wt, PtpA-D126A y PtpB-C160S. Las proteínas wt fueron producidas para ser utilizadas como referencia en la caracterización de los mutantes puntuales obtenidos. El mutante PtpA-D126A fue utilizado en los ensayos de *substrate trapping* con el objetivo de aislar posibles sustratos de PtpA.

Para expresar las proteínas recombinantes se transformaron células de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) quimio-competentes con el vector pET28a conteniendo el gen de PtpA-wt, PtpA-D126A, PtpB-wt o PtpB-C160S, siguiendo el protocolo de transformación química detallado en el punto 1.2.1. Se utilizaron 100-200 ng de ADN plasmídico para realizar la transformación. Se realizó un precultivo en medio LB-kanamicina inoculando unas 3-5 colonias de *E. coli* BL21 (DE3) de la placa conteniendo transformantes. Se incubó a 37°C bajo agitación de 200 rpm por 16 hs. Pasado ese tiempo se diluyó el precultivo en medio LB-kanamicina fresco (1 mL de precultivo por litro de medio). El cultivo se incubó a 37°C bajo agitación (180 rpm) hasta llegar a una  $DO_{600nm}$  de entre 0.7-0.8, correspondiente al final de la fase exponencial de crecimiento bacteriano, determinado previamente (Purificação 2008). Alcanzada la  $DO_{600nm}$  óptima, se dejó alcanzar los 15°C (20 min) y luego se indujo la expresión de la proteína de interés con 0.5 mM de isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) durante 16 hs a dicha temperatura, bajo agitación a 180 rpm. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 4°C y 6000 rpm por 15 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en buffer de lisis frío (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, y glicerol al 10%) suplementado con un cocktail de inhibidores de proteasas sin EDTA. Se utilizó 1 mL de buffer de lisis por cada 0.06 gramos de pellet húmedo. Se agregó 0.1 mg/mL de lisozima para debilitar la pared celular, y se mantuvo en hielo por 30 min. Las células se lisaron por sonicación en hielo realizando 10 ciclos de 1 min a 25% de amplitud y 1 min de descanso en hielo (Branson digital sonifer), luego se agregó ADNasa a una concentración final de 5  $\mu$ g/mL, se incubó 15 min en hielo y posteriormente la suspensión se centrifugó a 12.000 g durante 1 h a 4°C, y el sobrenadante de lisis se filtró por 0.22  $\mu$ m.

### 2.4.2. Purificación de las proteínas recombinantes por afinidad a metales

Las proteínas recombinantes expresadas como se describió anteriormente presentan en el extremo N-terminal una cola de seis histidinas (*His-tag*), lo que permite su purificación por cromatografía de afinidad por metales (IMAC) (Porath 1992). Se preparó una columna utilizando 2 mL de la matriz comercial *Chelating sepharose fast flow* (GE Healthcare #28-4047-39 AC) a la cual se le cargó el metal mezclando la matriz con 600  $\mu$ L de  $CuSO_4$  0.2 M. Para eliminar el exceso de metal se lavó la matriz con agua destilada y con acetato de sodio 0.02 M pH 4 conteniendo NaCl 1 M, hasta que el pH a la salida de la columna alcanzó un valor de 4.

Finalmente se equilibró con buffer de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 0.5 M, glicerol 10%). El sobrenadante de lisis filtrado conteniendo las proteínas solubles, preparado como se describió anteriormente, se mezcló con la matriz cargada de cobre y se incubó durante 40 min a TA bajo agitación suave. Transcurrido el tiempo se recuperó la matriz en la columna vacía y se guardó la fracción no pegada a la columna. Las proteínas no unidas o unidas de manera muy débil se removieron mediante 3 lavados de 5 mL con buffer de lisis sin imidazol (L1), 3 lavados de 5 mL con buffer de lisis con imidazol 10 mM (L2), 3 lavados de 5 mL con buffer de lisis con imidazol 20 mM (L3). A continuación se prosiguió con la elución de la proteína inmovilizada, con buffer de lisis conteniendo imidazol 300 mM, realizando 6 eluciones de 3 mL cada una. Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE y aquellas conteniendo la proteína recombinante purificada se mezclaron y dializaron a 4°C en 4 etapas de 2 hs cada una contra buffer de elución en el cual se fue disminuyendo gradualmente la concentración de imidazol (150 mM, 75 mM, 35 mM y sin imidazol). La composición del último buffer de diálisis fue Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 50mM, EDTA 5 mM, glicerol 10%, DTT 5 mM. Las proteínas se concentraron por ultrafiltración utilizando una membrana de corte 10 kDa (Amicon Ultra-15 Millipore). La concentración de proteínas se determinó utilizando el reactivo de Bradford (detallado en 2.2.1) y la muestra de proteínas dializadas se conservó a 4°C hasta la siguiente etapa de purificación.

### **2.4.3. Purificación de las proteínas por cromatografía de exclusión molecular**

Para separar las especies agregadas de la forma monomérica de PtpA-wt, PtpA-D126A, PtpB-wt y PtpB-C160S, se realizó otra etapa de purificación por cromatografía de exclusión molecular llevada a cabo en un sistema AKTA (GE Healthcare). Se utilizó una columna Superdex 200 16/60 (GE Healthcare) que se equilibró con dos volúmenes de columna del buffer de gel filtración (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 50mM, EDTA 5 mM, glicerol 10%, DTT 5 mM). En primer lugar la columna fue calibrada utilizando marcadores de masa molecular conocida (*Gel filtration molecular weight markers*, Sigma), obteniéndose la recta  $y = -0,3872x + 2,2662$ , siendo  $y=K_{av}$ ;  $x=\log$  masa molecular (kDa). El  $K_{av}$  se calculó como el cociente  $(V_e - V_o) / (V_t - V_o)$ , siendo  $V_e$  el volumen de elución de la muestra de interés,  $V_t$  el volumen total de la columna y  $V_o$  el volumen muerto de la columna (correspondiente al volumen de elución del Blue Dextrano, 2000 kDa). En la cromatografía de exclusión molecular de las proteínas de interés, se inyectaron 5 mL de la proteína dializada y concentrada (aproximadamente 5 mg). Las fracciones correspondientes a los picos de elución se concentraron por ultrafiltración, utilizando una membrana de corte 10kDa (Amicon Ultra-15 Millipore). Se determinó la concentración de proteínas en las fracciones por el método de Bradford, se suplementaron a una concentración final de DTT 20 mM para su conservación, se analizaron por SDS-PAGE y finalmente se alicuotaron y almacenaron a -20 °C las fracciones de interés.

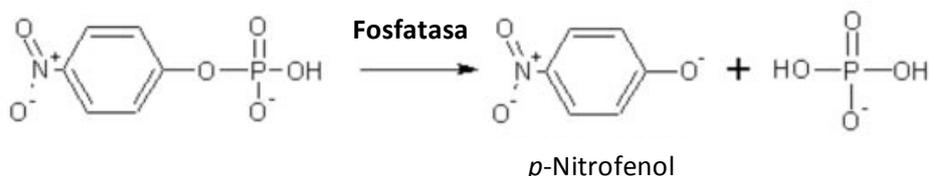
## 2.5. Caracterización de PtpA-wt y del mutante PtpA-D126A a ser utilizado en la estrategia de *Substrate Trapping*

### 2.5.1. Análisis del estado de oligomerización por cromatografía de exclusión molecular analítica

Estudios previos muestran que PtpA-wt es un monómero en solución (Madhurantakam et al. 2005). Por lo tanto, para asegurarnos que tanto PtpA-wt como PtpA-D126A están en forma monomérica realizamos una cromatografía de exclusión molecular, pero utilizando una columna analítica Superdex 75 10/300 GL (sistema AKTA, GE Healthcare) previamente calibrada utilizando blue dextrano para la determinación del volumen muerto y marcadores de masa molecular conocidos (*Gel filtration molecular weight markers*, Sigma). Las proteínas del marcador y sus respectivos pesos moleculares son: albumina (66 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), citocromo-C (12.4 kDa) y aprotinina (6.5 kDa). Se inyectaron 10  $\mu$ L (10  $\mu$ g) de la proteína recombinante en la columna previamente equilibrada con dos volúmenes de columna del buffer de gel filtración. Se determinó el volumen de elución de cada proteína y utilizando la ecuación de calibración de la columna obtenida al inyectar los marcadores de masa molecular ( $y=4154.9e^{-3.2757x}$ , siendo  $y$ = masa molecular de la proteína en kDa y  $x$ = cociente  $V_e/V_o$ ) se determinó la masa molecular en solución de las proteínas purificadas (masa nativa). Esta masa se comparó con la masa teórica calculada a partir de la secuencia aminoacídica utilizando el programa ExPASy (<http://web.expasy.org>).

### 2.5.2. Determinación de la actividad fosfatasa y de los parámetros cinéticos.

La actividad fosfatasa se determinó utilizando un sustrato artificial, *para*-nitro fenil fosfato (*p*-NPP) que presenta un grupo fosfato en posición *para* con respecto al grupo nitro. 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 405 nm debido a la liberación gradual del producto de la reacción de color amarillo, el *para*-nitro fenol (*p*-NP).



**Figura 2.2.** Defosforilación del *p*-nitrofenilfosfato por una fosfatasa.

En estos ensayos se utilizó el buffer previamente reportado en la literatura para PtpA de *M. tuberculosis*, imidazol 25 mM pH 7.0 (Koul et al. 2000). Los ensayos se realizaron a 37°C

utilizando concentraciones crecientes de *p*NPP en un rango de 0.5-40 mM. El volumen de reacción utilizado fue de 520  $\mu$ L y la concentración de enzima utilizada en el ensayo ( $E_o$ ) para PtpA-wt fue entre 0.25-0.3  $\mu$ M y para PtpA D126A entre 9.6-14.8  $\mu$ M.

La actividad fosfatasa se expresó en  $\mu$ moles de *p*-NP formado/min.mg de enzima, utilizando para el cálculo de  $\mu$ moles de *p*-NP la ley de Lambert-Beer,  $Abs = \epsilon \cdot b \cdot c$ , siendo:

$\epsilon$  el coeficiente de extinción molar del pNP ( $\epsilon_{pNP}=7.976 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ),

$b$  la longitud del camino óptico (1 cm),

$c$  la concentración molar del *p*-NP.

Las constantes cinéticas  $K_m$  y  $V_{max}$  fueron calculadas ajustando los datos de velocidad obtenidos variando las concentraciones de sustrato a una hipérbola rectangular (ecuación de Michaelis-Menten). La  $k_{cat}$  ( $s^{-1}$ ) se calculó utilizando la ecuación  $k_{cat}=V_{max}/E_o$ , utilizando la  $V_{max}$  expresada en  $\mu$ M pNP.  $s^{-1}$  y  $E_o$  en  $\mu$ M de PtpA-wt o PtpA-D126A en la reacción.

### 2.5.3. Determinación del $pK_a$ de las cisteínas de PtpA-wt y PtpA-D126A

La cisteína catalítica de este tipo de fosfatasas se caracteriza por tener un  $pK_a$  menor (del orden de 5) respecto al  $pK_a$  de una Cys no catalítica ( $pK_a$  8), ya que según el mecanismo propuesto (Pannifer et al. 1998) durante la catálisis ésta se encuentra estabilizada como tiolato ( $-S^-$ ) favorable para el ataque nucleofílico del P-Tyr sustrato. Con la finalidad de evaluar el  $pK_a$  de la fosfatasa wt y mutante se determinó el  $pK_a$  de las cisteínas por alquilación de éstas con monobromobimano (mBBr) a diferentes pHs. El método se basa en la reacción del tiolato de la proteína con una molécula de mBBr; el aducto formado fluoresce a una longitud de onda de 482 nm al excitarlo a una longitud de onda de 396 nm (Sardi et al. 2013). Para determinar el  $pK_a$  de las cisteínas se calcularon las velocidades iniciales de reacción con mBBr (variación de la fluorescencia/tiempo) al variar el pH de la reacción, ya que la reactividad del tiol varía con el pH. Antes de realizar el experimento fue necesario eliminar el DTT presente en la muestra, ya que el mismo al contener grupos tiol puede reaccionar con el mBBr, interfiriendo con el mismo. El DTT se eliminó por cromatografía de exclusión molecular, utilizando una PD-10 (Sigma) previamente equilibrada con el buffer de trabajo (Tris 30 mM, MES 15 mM, ácido acético 15 mM, NaCl 20 mM, DTPA 0.1 mM, pH 7). La elución de la proteína se realizó con 2 mL y no con 3.5 mL para asegurar la ausencia de trazas de DTT, el cuál al ser de menor masa molecular que las proteínas eluye posteriormente. Se midió la absorbancia a 280 nm del eluido y utilizando la ley de Lambert-Beer se determinó la concentración de proteína utilizando el valor de absortividad molar de la fosfatasa ( $15470 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

El experimento de alquilación de las cisteínas con mBBr se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos en el equipo Varioskan Flash (Thermo Electroncorp). Las muestras se sembraron por cuadruplicado. Se trabajó a temperatura ambiente y a 12 valores de pHs diferentes en un rango entre 2.5 y 9. En cada pocillo se colocaron 65  $\mu$ L de buffer, las cantidades necesarias de HCl 60

mM o NaOH 60 mM para cubrir el rango de pH, agua para completar un volumen final en el pocillo de 200  $\mu\text{L}$ , y 35  $\mu\text{L}$  de enzima. Por último, con el inyector del equipo se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de mBBr, 20  $\mu\text{M}$  para el rango de pH entre 2.5 - 7.0, o 20  $\mu\text{L}$  de mBBr 20  $\mu\text{M}$  para el rango de pH 7.0-8.5. Para PtpA-wt y para PtpA-D126A la concentración final de la fosfatasa en el pocillo fue de 1.4  $\mu\text{M}$  y 1.1  $\mu\text{M}$  respectivamente. A continuación se midió la variación de fluorescencia vs tiempo y con dichos datos se determinaron las velocidades iniciales. Al finalizar el ensayo se verificó el pH en cada pocillo utilizando un micro electrodo (Accumet Electrode-FisherScientific). Para calcular los  $pK_a$ s se realizaron gráficos de velocidad inicial de la reacción en función del pH utilizando el Software OriginPro8. Con la ecuación de la curva que se ajustó a los datos experimentales se determinaron los puntos de inflexión en la curva, cada uno correspondiente a un  $pK_a$  de las Cys.

En paralelo, evaluamos que en las preparaciones de fosfatasa obtenidas las cisteínas se encontraran en su mayoría reducidas. Si la Cys catalítica estuviera oxidada a formas que no fueran reversibles por acción del DTT, éstas no reaccionarían con el mBBr ni serían capaces de reaccionar con los P-sustratos. La aparición de formas oxidadas es un fenómeno no deseado que suele ocurrir durante el proceso de purificación en condiciones aerobias. Por lo tanto, se determinó el número de tioles reducidos por molécula de fosfatasa. Esta determinación se basó en que el compuesto 4-ditiopiridina (DTPy) reacciona específicamente con las cisteínas reducidas (Cys-SH) para producir 4-tiopiridona, que absorbe a 324 nm, siendo el  $\epsilon_{\text{TPY}324\text{nm}}=21400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Se mezclaron 50  $\mu\text{L}$  de la misma fosfatasa utilizada en el ensayo con mBBr, con 50  $\mu\text{L}$  de DTPy 30  $\mu\text{M}$  y se midió la absorbancia a 324 nm, realizando las mediciones por duplicado (Grassetti & Murray 1967). Según los datos estructurales, PtpA contiene tres Cys (Cys11 catalítica, Cys16, Cys53), por lo cual si todas ellas se encuentran reducidas, es de esperar dosificar del orden de 3-SH/molécula de PtpA-wt y PtpA-D126A.

La determinación del  $pK_a$  de las cisteínas se realizó en conjunto con Anne-Marie Labandera y bajo la dirección del Dr. Gerardo Ferrer de Facultad de Ciencias.

#### **2.5.4. Medición de la fluorescencia del triptófano**

La mayoría de las emisiones fluorescentes intrínsecas de una proteína plegada son debidas principalmente a la excitación de los residuos de triptófano (Trp). El triptófano tiene una longitud de onda de máxima absorción de 295 nm y un pico de emisión entre 300-350 nm. De esta forma la fluorescencia debida a Trp puede ser útil para evaluar el estado conformacional de una proteína. Teniendo en cuenta que la PtpA cuenta con dos Trp se analizó el efecto de la mutación D/A introducida en PtpA mediante la comparación del espectro de emisión de PtpA-wt (17 $\mu\text{M}$ ) y PtpA-D126A (20 $\mu\text{M}$ ) con el equipo Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer. Las mediciones se realizaron en el rango 305-550 nm, utilizando una longitud de onda de excitación de 295 nm.

## **2.6. Preparación de extractos de macrófagos (derivados de la línea THP-1) enriquecidos en proteínas solubles**

Se expandió un cultivo de células THP-1, realizando varios pasajes hasta tener un número de entre  $250$  y  $300 \times 10^6$  células, que se consideró suficiente como para preparar extractos celulares. Cuando los cultivos alcanzaron  $1 \times 10^6$  células/mL, las células se estimularon con  $50$  ng/mL de éster de forbol miristato (PMA, Sigma) por  $48$  hs para inducir su diferenciación a macrófagos (macrófagos THP-1).

Se prepararon dos tipos de extractos, a partir de:

- macrófagos THP-1 sin activar, que se mantuvieron a  $37^\circ\text{C}$  y  $5\%$   $\text{CO}_2$
- macrófagos THP-1 activados con LPS ( $0.2 \mu\text{g/mL}$ ), durante  $30$  min a  $37^\circ\text{C}$  y  $5\%$   $\text{CO}_2$ .

Para preservar la fosforilación en tirosina (P-Tyr) en las proteínas, las PTPs endógenas se inactivaron con el inhibidor competitivo ortovanadato de sodio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) y con iodoacetamida (IAA), inhibidor irreversible por alquilación de las Cys (Poirier et al. 2014)(Garton et al. 1996). Brevemente, las células se incubaron durante  $20$  min con  $100 \mu\text{M}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , se lavaron con PBS y se lisaron con buffer de lisis (Hepes  $25$  mM pH  $7.4$ , EDTA  $1$  mM, NaCl  $150$  mM, Triton X-100  $1\%$ , glicerol  $10\%$ , benzamidina  $1$  mM, inhibidor de tripsina  $1 \mu\text{g/mL}$ , PMSF  $1$  mM). Se despegaron las células con un *scraper*, y se completó la lisis utilizando un homogeneizador manual, manteniendo el extracto en hielo. Por último se agregó IAA a una concentración final de  $5$  mM, se mantuvo en hielo por  $30$  min, y luego se inactivó el exceso de IAA mediante el agregado de DTT a una concentración final de  $10$  mM durante  $15$  min. Los lisados se centrifugaron a  $15.000$  g por  $25$  min a  $4^\circ\text{C}$ , y luego los sobrenadantes se filtraron por  $0.22 \mu\text{m}$  y guardaron a  $-80^\circ\text{C}$ . A lo largo de la tesis se prepararon diferentes lotes de extractos de macrófagos.

Como control, para evaluar si el tratamiento con IAA es realmente necesario se obtuvo también un extracto de macrófagos THP-1 sin activar al cuál se le realizó el tratamiento con  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  pero no con IAA. El enriquecimiento en proteínas fosforiladas en los extractos obtenidos se analizó mediante *western blot* utilizando un anticuerpo anti fosfo-tirosin-proteínas (Ver punto 2.2.3). Para comparar los niveles de fosfo-tirosina (P-Tyr) se cuantificó la intensidad de fluorescencia por unidad de área utilizando la herramienta raw volumen del GBOX ChemiSystem (SynGene).

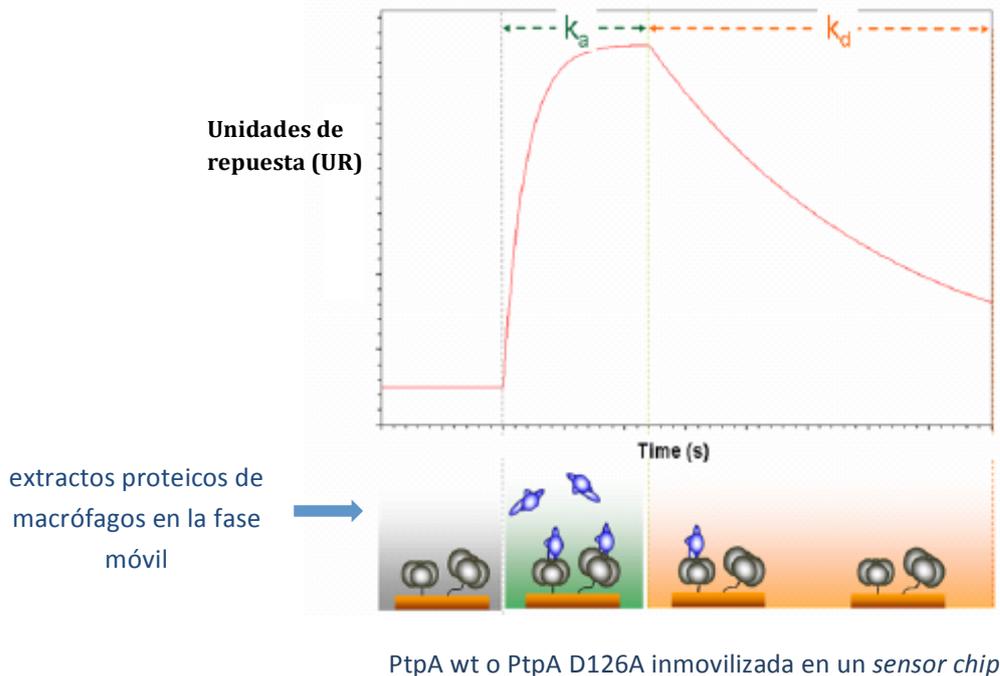
## **2.7. Estudio por resonancia plasmónica de superficie (SPR) de la interacción entre PtpA-wt o PtpA-D126A y las proteínas del extracto de macrófagos**

Los experimentos se realizaron en un equipo Biacore 3000 (GE Healthcare instrument) de la Unidad de Biofísica de Proteínas del Instituto Pasteur de Montevideo (IPMon), bajo la supervisión de Federico Carrión. Estos experimentos se realizaron con la finalidad de

caracterizar la interacción entre la fosfatasa y los componentes del extracto de macrófagos de forma de conocer cuales serían las condiciones de trabajo adecuadas para los ensayos de *Substrate Trapping*. La proteína recombinante PtpA-wt o PtpA-D126A fue inmovilizada en un sensorchip de tipo CM5 (carboximetildextrano, GE Healthcare) a través de grupos amino de la proteína de interés utilizando procedimientos estándares de acoplamiento (Amine Coupling Kit, GE Healthcare). En nuestro caso, el acoplamiento pudo ocurrir solamente a través del grupo amino del extremo N-terminal o el correspondiente al grupo prostético de la única Lys presente en PtpA (Madhurantakam et al. 2005). La activación de la superficie del chip se realizó con NHS (N-hidroxisuccinimida) 0.05 M y EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) 0.2 M. Previo a la inmovilización fue necesario eliminar el buffer Tris en el que estaban solubilizadas las fosfatasas, ya que el Tris contiene grupos amino que interferirían con la inmovilización. Así, se cambió éste por el buffer de corrida usado tradicionalmente en este análisis (HEPES 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, Tween-20 0.005% y DTT 1 mM) mediante ultrafiltración, utilizando un centrífugo de corte 3 KDa. Luego las proteínas PtpA-D126A y PtpA-wt fueron diluídas en acetato de sodio 10 mM pH 4.5 a una concentración de 5 µg/mL e inyectadas a una velocidad de flujo de 5 µL/min hasta alcanzar una densidad final de 1600 y 400 RU, respectivamente. Los sitios remanentes fueron bloqueados con etanolamina 1M pH 8.5. Otro canal de superficie del chip fue activado y bloqueado de la misma forma pero sin inyectar ningún ligando, y utilizado como superficie de referencia. Finalmente, la superficie del sensorchip se lavó con NaCl 1.0 M y se estabilizó con buffer de corrida antes de la inyección de las muestras. La inyección de los extractos de macrófagos (1.2 µg de proteína total) se realizó en buffer de corrida a 25°C, y una velocidad de flujo de 10 µL/min.

La interacción fue evaluada mediante el análisis de sensogramas de asociación/disociación en tiempo real. El equipo detecta modificaciones en la masa que interacciona sobre la superficie del chip. Estas modificaciones causan un aumento o disminución proporcional en el índice de refracción, el cual conduce a cambios en el ángulo de resonancia. Estos cambios son registrados por el equipo como aumento o disminución de unidades de respuesta (UR) (Figura 2.3), que mediante el software BIAevaluation 4.1 (GE Healthcare) genera curvas de asociación y disociación.

### Sensograma de asociación-disociación en tiempo real



**Figura 2.3.** Diagrama mostrando el estudio de la interacción de PtpA con los extractos proteicos de macrófagos por resonancia plasmónica de superficie (SPR).

La estabilidad de la interacción entre la(s) fosfatasa(s) y los componentes del extracto se evaluó mediante la inyección de pulsos de altas concentraciones salinas y por descenso brusco de pH. Se realizaron dos pulsos consecutivos de 30 s de NaCl 1.0 M, o dos pulsos de 40 s de glicina 10 mM pH 2.0. Para verificar si la fosfatasa inmovilizada a la superficie del sensorchip no se vio alterada por los pulsos de pH ácido, se repitió el experimento de interacción por SPR analizando en cada ciclo si las UR obtenidas eran similares a las iniciales. En paralelo se evaluó si la fosfatasa pierde actividad luego de ser expuesta a condiciones de pH ácido. Para ello en un experimento aparte se incubó la fosfatasa en ausencia y presencia de buffer glicina 10 mM a pH 2.5, durante 1 y 5 min. Posteriormente se agregó buffer de corrida SPR (pH 7.4) suficiente como para neutralizar el pH, se adicionó DTT a una concentración final de 5 mM, y se evaluó la actividad fosfatasa con el agregado de 10 mM del sustrato artificial *pNPP*. Se determinó la actividad a TA y a punto final (5 y 15 min), determinándose el % de actividad remanente luego del tratamiento.

Para analizar si los componentes del extracto de macrófago podrían estar interaccionando a través del sitio activo de la fosfatasa se analizó el efecto del agregado de concentraciones crecientes (2.5-25 mM) del inhibidor competitivo  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  al extracto de proteínas de macrófago inyectado..

## 2.8. Metodología *Substrate Trapping* para el aislamiento de potenciales sustratos de PtpA

La estrategia de *Substrate Trapping* (ST) consiste en aislar *in vitro* potenciales sustratos incubando la fosfatasa PtpA-D126A con el extracto de proteínas de macrófago. Como se detalló en la introducción esta estrategia consiste en aislar potenciales sustratos mediante el uso de mutantes puntuales en residuos catalíticos conservados de la fosfatasa de Tyr. Dichos mutantes permitirán la captura del complejo enzima-sustrato ya que es de esperar que la mutación no afecte la capacidad de la fosfatasa de unirse a su sustrato ( $K_m$  similar a la proteína salvaje, determinada con un sustrato artificial), pero tendrán ausente o disminuida la capacidad de desfosforilarlos ( $k_{cat}$  nula o muy baja). En nuestro caso utilizaremos el mutante PtpA-D126A. La PtpA-D126A fue inmovilizada en base a las mismas reacciones químicas que las utilizadas en los ensayos de SPR, es decir que se inmovilizó a través de los grupos  $\epsilon$ -amino a una matriz de NHS-Sefarosa activada (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se lavó la matriz (100  $\mu$ L) con HCl 1 mM frío, se agregaron inmediatamente 300  $\mu$ g de PtpA-D126A diluida en buffer de inmovilización ( $\text{NaHCO}_3$  0.2 M, NaCl 0.5 M pH 8.3) y se incubó durante 16 hs a 4°C. A continuación los grupos libres de la matriz se bloquearon con etanolamina 0.5 M pH 8.3, NaCl 0.5 M, durante toda la noche a 4°C. Luego se lavó la matriz con buffer Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 y buffer acetato 0.1 M pH 4.5, NaCl 0.5 M (Figura 2.3.A). Para determinar el rendimiento de la inmovilización se determinó la concentración de proteínas en el sobrenadante de inmovilización y se comparó con la cantidad de PtpA-D126A ofrecida a la matriz.

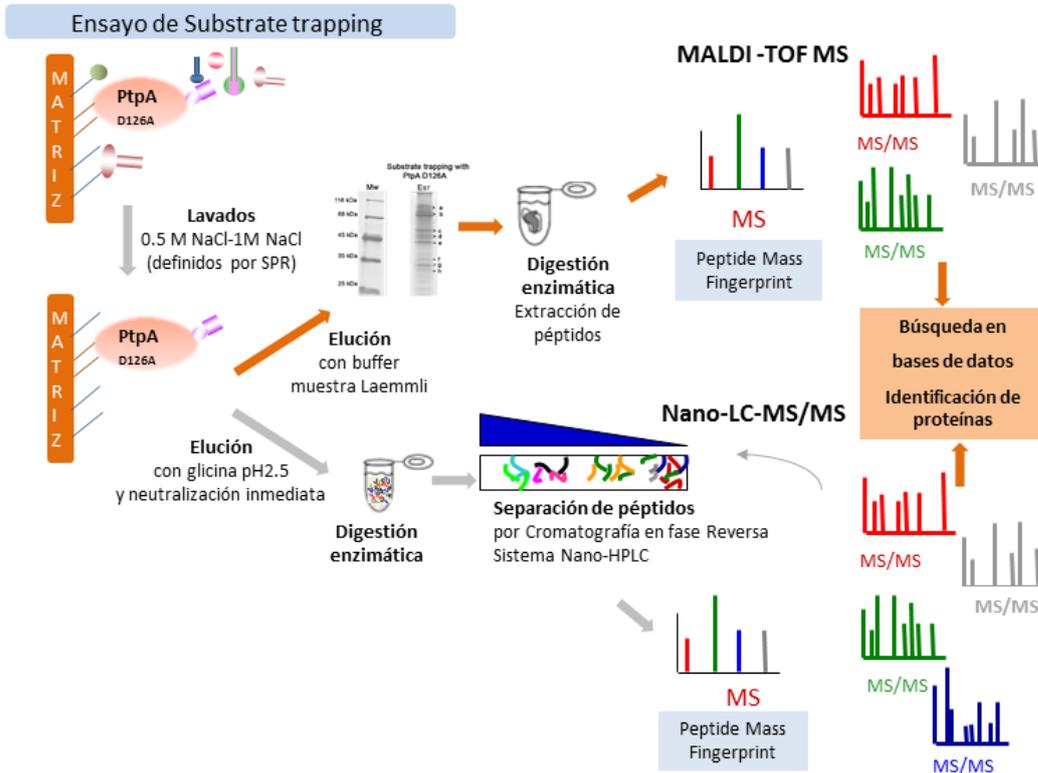
En paralelo, se preparó una matriz control, repitiendo todos los pasos de incubación con la misma cantidad de matriz pero sin agregar PtpA-D126A al buffer de inmovilización. Esta matriz fue utilizada como control de unión inespecífica de proteínas del extracto de macrófago a la matriz de Sefarosa, durante los ensayos de ST.

Teniendo en cuenta que PtpA sólo cuenta con dos grupos  $\epsilon$ -amino (el del N-terminal y el de la Lys43) la inmovilización será sólo uni o bi-puntual, por lo cual no se espera que distorsione en forma significativa la estructura de la fosfatasa. Para estar seguros de ello, se realizó un control de actividad de la fosfatasa a punto final, antes y después de la inmovilización a la matriz de NHS-Sefarosa. Para ello se incubó la matriz conteniendo la fosfatasa inmovilizada, con el sustrato en condiciones de velocidad máxima (concentración de sustrato a 10  $K_m$ , siendo la  $K_m$  2 mM, determinada previamente por nuestro grupo para la PtpA-wt), en buffer de gel filtración y a TA. En paralelo, se incubó la misma cantidad de fosfatasa en solución. En ambos casos a los 30 min se midió la absorbancia a 405 nm (en el caso de la fosfatasa inmovilizada se centrifugó la matriz, se separó el sobrenadante y se midió). Se determinó la actividad en cada caso, evaluándose si hubo pérdida de actividad debido al proceso de inmovilización. En la comparación se tuvo en cuenta el % de PtpA-D126A inmovilizada.

Para cada ensayo de ST se incubaron 100  $\mu$ L de la matriz con y sin PtpA-D126A inmovilizada, con 5 mg de extracto de macrófagos diluido a 0.17 mg/mL en el mismo buffer utilizado en el ensayo de SPR (HEPES 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, Tween 20 0.005% y DTT 1 mM), conteniendo benzamidina 1 mM, PMSF 1 mM y SBTI 1  $\mu$ g/mL durante 1 h at 4°C con agitación suave en un rotor orbital. La matriz se colectó por centrifugación suave (1000 g) y luego se lavó dos veces y en forma consecutiva con 100  $\mu$ L de buffer de corrida SPR, buffer conteniendo NaCl 0.5 M y NaCl 1.0 M a 4°C (ver Figura 2.4), está última condición definida previamente en los ensayos de SPR. Las proteínas retenidas se eluyeron siguiendo una de las dos aproximaciones descritas a continuación. En el primer caso, la elución de las proteínas retenidas se realizó con buffer de muestra SDS-PAGE. Se agregaron 50  $\mu$ L de buffer muestra 2X a la matriz y se calentó a 95°C por 5 min. Se centrifugó y separó el sobrenadante. Luego, se agregaron 50  $\mu$ L de buffer muestra y se repitió el procedimiento para tener una segunda elución. Todos los lavados y eluatos fueron analizados por SDS-PAGE seguido de tinción con nitrato de plata. Esta aproximación de elución con buffer muestra se realizó con el extracto de macrófagos sin activar y con el extracto activado con LPS. Los carriles del gel SDS-PAGE correspondientes a las proteínas eluidas se cortaron en bandas de 2 mm de gel, y cada fragmento del gel se analizó por MALDI-TOF MS. Para uno de los ensayos se analizaron también las bandas por un método de espectrometría de masa más sensible, Nano-LC-MS/MS. Los detalles del análisis por espectrometría de masas se describen en 2.9.

En la segunda aproximación, se utilizó la información obtenida de los ensayos de interacción por SPR en el diseño de la estrategia de elución. Luego de lavada la matriz como se especificó anteriormente, las proteínas se eluyeron con agregados sucesivos de 50  $\mu$ L de 10 mM glicina pH 2.5 (un total de 7 eluciones). Se centrifugó para separar la matriz, y el sobrenadante se neutralizó inmediatamente con 2  $\mu$ L de Tris-HCl 1 M, pH 7.5. Las muestras se guardaron a -20°C y fueron analizadas por el método de espectrometría de masa más sensible, Nano-LC-MS/MS, ya que el contenido proteico en estas muestras es tan bajo que impide el análisis por SDS-PAGE y posterior MALDI-TOF MS. Tanto para el ST con PtpA-D126A como para el ST control (sin PtpA-D126A) los análisis por Nano-LC-MS/MS de los eluatos se realizaron sobre pools de las eluciones (2+3, 4+5 y 6+7). Esta estrategia de elución se realizó para 3 ensayos de ST (dos en los que se utilizó el extracto de proteínas de macrófagos sin activar con LPS y un ensayo en que se utilizó el extracto de proteínas de macrófago activado con LPS).

Cada réplica biológica fue realizada preparando una nueva matriz con PtpA-D126A inmovilizada, utilizando diferentes lotes de proteína purificada y diferentes lotes de extracto de macrófagos.



**Figura 2.4.** Esquema mostrando la metodología de ST indicando las dos estrategias utilizadas para la elución de los posibles sustratos de PtpA y su posterior identificación mediante espectrometría de masa.

## 2.9. Identificación de proteínas por espectrometría de masa

El análisis de las muestras por MALDI-TOF MS fue realizado en el marco de una pasantía que realicé en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica, del Instituto Pasteur de Montevideo bajo la supervisión de Rosario Durán y Madelón Portela. Durante esta etapa realicé tanto la preparación y procesamiento de las muestras como el análisis de los espectros e identificación de las proteínas por MALDI-TOF MS. En el caso del análisis por nano-LC-MS, la inyección de las muestras en el sistema nano-LC-MS y las búsquedas en las bases de datos fue realizada por la Dra. Rosario Durán y la Lic. Magdalena Gil, pero fui responsable de la preparación de las muestras, del procesamiento y el análisis de los datos obtenidos en las búsquedas.

Para el análisis de proteínas por MALDI-TOF MS, las proteínas fueron digeridas con tripsina en el mismo gel, como se describe en (Hellman et al. 2000). Para ello, las bandas del gel teñido con plata se cortaron manualmente con bisturí y se colocaron en tubos de 1.5 mL. Se lavaron dos veces (2 x 10 min) con una mezcla 1:1 de una solución 30 mM de  $K_3(FeCN_6)$  y una solución 100 mM de  $Na_2S_2O_3$  en agitación. Luego se lavaron con agua miliQ y se incubaron agitando con buffer bicarbonato de amonio 0.2 M durante 20 min. A continuación se deshidrataron con

acetonitrilo puro, y se dejaron secar. Las proteínas se digirieron con tripsina (grado secuenciación, Promega), empleando 0.25 µg de enzima por banda, en buffer bicarbonato de amonio 50 mM pH 8.3, durante toda la noche a 37°C. La extracción de péptidos del gel se realizó incubando las muestras, dos veces, durante 1 h y en agitación con una solución acetonitrilo (ACN) 60% en agua, conteniendo trifluoroacético (TFA) 0.1%. Posteriormente, las soluciones conteniendo los péptidos se concentraron por centrifugación bajo vacío hasta un volumen final de aproximadamente 20 µL. Previo al análisis por MS, las muestras se desalaron utilizando micro-columnas de fase reversa de tipo C18 (Omix®Tips, Varian) y se eluyeron directamente sobre la placa de MALDI con 2.5 µL de la solución de matriz, ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (CHCA, Sigma) en ACN 60% conteniendo TFA 0.1 %. Para minimizar la contaminación con queratina humana, todos los pasos de preparación de las muestras se llevaron a cabo en cámara de flujo laminar.

El espectro de masa de la mezcla de péptidos se obtuvo utilizando un instrumento 4800 MALDI TOF/TOF (ABi Sciex), en modo reflector positivo, y haciendo una calibración externa con una mezcla de estándares de péptidos (Applied Biosystems). Posteriormente, se realizaron fragmentaciones de péptidos seleccionados, por espectroscopía de masa en tándem (MS/MS). Las proteínas se identificaron utilizando los valores de m/z medidos en los modos de adquisición MS y MS/MS y utilizando el motor de búsqueda MASCOT (Matrix Science, <http://www.matrixscience.com>) en el modo de búsqueda *Sequence Query*. Para realizar las búsquedas en la base de datos NCBI nr (NCBI nr 20130721) se utilizaron los siguientes parámetros: taxonomía *homo sapiens*; masa molecular de la proteína sin restricción; tolerancia en la masa mono isotópica de 0.05 Da, tolerancia en la masa de los fragmentos de 0.3 Da; modificaciones posibles: oxidación parcial de la metionina, carbamido-metilación de la cisteína, y fosforilación de la Tyr; y omisión de un sitio de corte triptico permitido. Como criterio para identificación positiva de cada proteína se utilizó la presencia de un *score* positivo para la proteína ( $p < 0.05$ ) y al menos un ión peptídico con *score* significativo ( $p < 0.05$ ).

Para el análisis por nano-LC-MS, las proteínas se digirieron con tripsina como se describió anteriormente. En este caso al tratarse de muestras líquidas (50 µL), las mismas se incubaron con 0.25 µg tripsina durante 12 hs a 37°C. Posteriormente fueron desaladas, secadas en vacío y resuspendidas en 20 µL de ácido fórmico 0.1% (v/v) en agua. Una vez preparadas las mismas se inyectaron en un sistema nano-HPLC (Proxeon easynLC, Thermo Scientific) equipado con una columna de fase reversa (easy C18 column, 3 µm; 75 µm ID x10 cm; Proxeon, Thermo Scientific) y los péptidos se separaron con un gradiente de ACN - 0.1% ácido fórmico (0-60% en 60 min) a una velocidad de flujo de 400 nL/min. La detección *online* y el análisis de los espectros de masa se llevó a cabo en un LTQ Velos nano-ESI-Linear Ion Trap Instrument (Thermo Scientific) en el modo que permite un escaneo completo de los picos correspondientes a los diferentes péptidos, seguido de MS/MS de los 5 picos mayoritarios en cada segmento, utilizando una lista

de exclusión dinámica, es decir, luego de transcurrido un lapso de tiempo prefijado se realiza un nuevo escaneo y se descartan los picos que ya fueron fragmentados, realizando fragmentación de los nuevos 5 picos mayoritarios. De esta forma se realiza un análisis completo de todas las proteínas identificando también las que están poco representadas en la mezcla. Las proteínas se identificaron mediante búsqueda en la base de datos SwissProt (Noviembre 2012), taxonomía *homo sapiens*, utilizando los siguientes parámetros en el modo de búsqueda de iones MS/MS del motor de búsqueda MASCOT: tolerancia en la masa de los péptidos de 1.5 Da, tolerancia MS/MS de 0.8 Da, modificaciones posibles carbamido-metilación de cisteína, oxidación parcial de metionina, y fosforilación de Tyr. El límite de significancia para la identificación de proteínas se fijó en  $p < 0.01$  y un *ion cut off*  $< 40$  (es decir, se descartaron las proteínas identificadas con un score menor de 40). Solo las proteínas identificadas con dos o más péptidos se consideraron positivas.

Para focalizarnos en aquellas proteínas de macrófago identificadas, que seguramente se tratan de interactores de PtpA-D126A, decidimos definir la lista de proteínas candidatas eliminando de esta aquellas proteínas que fueron identificadas en los ensayos utilizando ST control (sin PtpA-D126A inmovilizada). Por otro lado, para centrarnos en los candidatos más representados, sólo se consideraron como potenciales sustratos las proteínas identificadas en todos los ensayos de ST (4 réplicas biológicas para el extracto de macrófagos sin activar y dos replicas para el extracto activado con LPS).

## **2.10. Validación *in vitro* de los potenciales sustratos eucariotas de PtpA de *M. tuberculosis***

En una primera etapa, intentamos validar los potenciales sustratos identificados mediante una estrategia *in vitro*. Tres de los cuatro sustratos identificados (ECHA/ECHB o TFP, K6PP y ATPA) se purificaron a partir de los extractos de macrófagos utilizando Ac disponibles comercialmente para luego realizar ensayos de interacción y actividad. Previamente a la purificación se verificó que cada anticuerpo detectaba el candidato a sustrato respectivo en los extractos proteicos de macrófagos.

### **2.10.1. Purificación de los candidatos a sustrato de PtpA**

#### **2.10.1.1. Inmunoprecipitación de la proteína trifuncional (TFP o ECHA/ECHB)**

La proteína trifuncional (TFP) es un octámero de cuatro subunidades alfa (ECHA) y cuatro subunidades beta (ECHB). La misma la purificamos a partir de extractos de macrófagos con un anticuerpo anti-TFP (ECHA/ECHB) humana (ab110302, MitoSciences). Para ello se utilizaron esferas magnéticas comerciales que cuentan con un anticuerpo anti-IgG de ratón inmovilizado

covalentemente a la superficie de las esferas (Dynabeads 11201D, Life technologies). A éstas le unimos covalentemente el anticuerpo anti-ECHA/ECHB utilizando un reactivo bi-funcional BS<sup>3</sup> (bis sulfo succinimidil suberato, Sigma) siguiendo el protocolo sugerido por Life technologies. Brevemente, se incubaron 100 µL de las esferas magnéticas con 8 µg del anticuerpo anti TFP (ECHA/ECHB) durante 2 hs a 4°C. Las esferas se lavaron y se procedió al entrecruzamiento de los anticuerpos con 5 mM del reactivo BS<sup>3</sup> en 20 mM de buffer fosfato de sodio pH 8.0, NaCl 0.15M, durante 30 min. La reacción se detuvo con el agregado de Tris-HCl 1M pH 7.5 y luego de lavar las esferas se procedió a realizar la inmunoprecipitación. Para ello se incubaron las esferas con 750 µg del extracto de proteínas de macrófagos diluido a 0.5 mg/mL en HEPES 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, Tween 20 0.005%, conteniendo inhibidores de proteasas (Sigma # S8830), durante 2-3 hs a 4°C bajo agitación suave en agitador orbital. Luego de realizada la inmunoprecipitación se recuperaron las esferas con un imán (Dynamag Spin, Life technologies) y se procedió a realizar 4 lavados con 1 mL de PBS-T (0.05%) y posterior elución de las proteínas unidas con citrato 25 mM pH 2.6 (2x 100 µL). Los eluatos se neutralizaron inmediatamente con Tris-HCl 1 M pH 9.5 y se analizaron por SDS-PAGE. Los geles se tiñeron con plata o se transfirieron a nitrocelulosa. La cantidad de proteína obtenida se estimó por comparación con la intensidad de tinción con Coomassie coloidal obtenida para una cantidad de proteína conocida. Con las membranas conteniendo las proteínas transferidas se procedió a realizar un *western blot* para confirmar la presencia o ausencia de la TFP, utilizando el anticuerpo anti-TFP según se detalla en 2.2.3. La identidad de la TFP en el inmunoprecipitado se confirmó por espectrometría de masa utilizando nano LC-MS.

#### **2.10.1.2. Inmunoprecipitación de la proteína 6-fosfofructoquinasa (K6PP)**

La K6PP se obtuvo a partir de extractos de macrófagos por inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-K6PP (Abcam ab 1186132). En este caso no se pudieron utilizar las esferas magnéticas ya que las mismas cuentan con un anticuerpo anti-IgG de ratón inmovilizado covalentemente a la superficie y el anticuerpo anti-K6PP es un anticuerpo de conejo. Para realizar la inmunoprecipitación se utilizaron esferas de Sefarosa unidas a proteína A. Inicialmente, se incubó 1 mL del extracto de proteínas de macrófagos diluido a 0.5 mg/mL en HEPES 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, Tween 20 0.005%, conteniendo inhibidores de proteasas (Sigma # S8830), con 4 µL del anticuerpo anti K6PP, durante 2.5 hs a 4°C, con agitación suave. Para aislar los complejos K6PP-anticuerpo, dicha mezcla de reacción se incubó luego durante 2 hs a 4°C, con agitación suave con la matriz de Sefarosa unida a proteína A previamente lavada y equilibrada (EZview Red Protein A Affinity Gel, SigmaP6486). Para el lavado y equilibrado de la matriz se siguió el protocolo indicado por el fabricante: un volumen de 50 µL de la suspensión de matriz se lavó 2 veces con 750 µL del mismo buffer en el que se diluyó el extracto de proteínas de macrófago, se centrifugó 30 s a 8.200 g y se retiró el

sobrenadante. Luego del aislamiento de los complejos K6PP-Ac, se centrifugó la suspensión 30s a 8.200 g, se retiró el sobrenadante y se hicieron 4 lavados de la matriz con 1 mL de PBS-T (0.05%). La elución de las proteínas retenidas se realizó agregando 50  $\mu$ L de buffer muestra SDS-PAGE 2x, se agitó y dejó 5 min a 96 °C. Luego de mezclar bien se centrifugó, separó el sobrenadante y éste se guardó a -20 °C. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE y los geles se tiñeron con plata o se transfirieron a nitrocelulosa. Con las membranas conteniendo las proteínas transferidas se procedió a realizar un *western blot* para confirmar la presencia o ausencia de la K6PP según se detalla en 2.2.3.

### **2.10.1.3. Inmunoprecipitación de la proteína ATP sintasa subunidad alfa (ATPA)**

En este caso se utilizaron esferas magnéticas con el anticuerpo anti-IgG de ratón (Dynabeads 11201D, Life technologies) a las cuales se unió covalentemente el anticuerpo Anti-ATP5A (ab14748, MitoSciences) utilizando el reactivo BS<sup>3</sup>, siguiendo el mismo procedimiento realizado en la inmunoprecipitación de la TFP. Se utilizaron 5  $\mu$ g del anticuerpo anti-ATPA y 750  $\mu$ g de extracto de macrófagos.

Como segunda aproximación para lograr purificar la ATPA se realizó una inmunoprecipitación utilizando las esferas magnéticas sin realizar el entrecruzamiento entre el anticuerpo primario y el secundario ya unido a las esferas. Para ello se incubó el extracto de macrófagos (700  $\mu$ g) diluido a 0.5 mg/mL en el mismo buffer usado anteriormente, con 3  $\mu$ g del anticuerpo anti ATPA, durante 2 hs a 4°C con agitación suave. Posteriormente, la mezcla se incubó con 100  $\mu$ L de las esferas magnéticas durante 2 hs a 4°C y luego de 4 lavados de las esferas, se realizó la elución con buffer muestra 2x y calentamiento a 96 °C durante 5 min.

Como alternativa para inmunoprecipitar la ATPA se utilizaron las esferas conteniendo proteína A (EZview Red Protein A Affinity Gel, Sigma). En este caso, con el objetivo de favorecer la exposición de epítopes de la ATPA y lograr que la proteína sea reconocida por el Ac, se hizo un pre-tratamiento del extracto de macrófagos en un buffer desnaturizante. Para ello, al volumen de extracto de proteínas de macrófagos a utilizar (500  $\mu$ g, 150  $\mu$ L, en buffer de lisis), se le agregó 1% concentración final de SDS, y se calentó a 95 °C durante 5 min. Luego de dicho tratamiento, se diluyó 1/10 con buffer no desnaturizante, Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, Triton X-100 1% y EDTA 2 mM, con inhibidores de proteasas (Sigma). A esta dilución se le agregó 3  $\mu$ g del anticuerpo y se incubó durante toda la noche a 4°C con agitación suave en un rotor. A continuación se agregó 50  $\mu$ L de la matriz de Sefarosa-proteína A ya equilibrada (en el mismo buffer no desnaturizante) y se incubó dicha suspensión durante 3 hs a 4°C. Se centrifugó durante 30 s a 8.200 g, se retiró el sobrenadante y se hicieron 4 lavados de la matriz con 1 mL de PBS-T (0.05%). La elución se realizó de la misma forma que para la K6PP, y se confirmó la presencia o ausencia de la ATPA por *western blot* con el Ac anti-ATP5A.

### 2.10.2. Estudio por SPR de la interacción entre la TFP (ECHA/ECHB) y la PtpA de *Mtb*

Para verificar la interacción de la PtpA con el candidato a sustrato TFP se propuso realizar ensayos de SPR. Los mismos se realizaron inmovilizando la proteína TFP sobre la superficie de un sensorchip CM5 utilizando la metodología general descrita en el punto 2.7. La TFP diluida en buffer acetato de sodio, pH 5.6 se inyectó sobre la superficie activada con una mezcla 1:1 de EDC/NHS a un flujo de 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  y los grupos remanentes se bloquearon con etanolamina, alcanzándose una densidad final de 360 UR. En este experimento no se pudo utilizar el mismo buffer de corrida y se utilizó el buffer Tris-HCl 20 mM, pH 8.0, NaCl 50mM, EDTA 5 mM, Tween20 0.005% y DTT 1mM. Este cambio se debió a que la fosfatasa a las diferentes concentraciones ensayadas resultó ser más estable en este buffer, respecto al utilizado anteriormente en los ensayos de SPR. Las fosfatasas se inyectaron en la fase móvil (sobre la superficie inmovilizada y una superficie control sin activar) a un flujo de 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Para evaluar si la interacción ocurre a través del sitio activo de la enzima, se evaluó también el efecto de la co-inyección de concentraciones crecientes (entre 2.5-25mM) de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (un inhibidor competitivo de PtpA).

Con el objetivo de determinar la constante de afinidad entre la TFP y la PtpA se realizó un estudio cinético utilizando la modalidad denominada *Kinetic Titration* (Karlsson et al. 2006), que consistió en realizar 5 inyecciones consecutivas de PtpA-D126A a concentraciones crecientes. Cada inyección consistió de un período de asociación de 5 min seguido por un período de disociación de 8 min para dar lugar a la siguiente inyección. Esta modalidad permite ajustar la reacción a un modelo cinético sin necesidad de regenerar la superficie luego de cada inyección. Brevemente, sobre la superficie del chip conteniendo TFP inmovilizada a una densidad de 360 UR preparada como se detalló anteriormente y una superficie control sin derivatizar, se realizó una inyección de PtpA-D126A a una concentración de 3.15  $\mu\text{M}$ , durante 5 min a un flujo de 40  $\mu\text{L}/\text{min}$  y luego de un período de disociación de 8 min se realizó la siguiente inyección de PtpA-D126A de igual manera pero a una concentración 1.5 veces mayor. Siguiendo esta metodología se realizaron en total 5 inyecciones (3.15, 4.72, 7.09, 10.63, 15.94  $\mu\text{M}$ ). La concentración de la solución stock de PtpA-D126A se determinó mediante Abs 280 utilizando el valor de  $\epsilon_{\text{PtpA}}=15470 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . A continuación, se sustrajo la señal de la superficie control y de inyecciones de buffer realizadas de la misma forma (doble referenciación) y se analizaron los resultados obtenidos ajustando por regresión no lineal de mínimos cuadrados al modelo *Kinetic Titration*, con el objetivo de determinar los parámetros cinéticos de la interacción (Karlsson et al. 2006).

### **2.10.3. Desfosforilación *in vitro* de la TFP (ECHA/ECHB) con PtpA-wt**

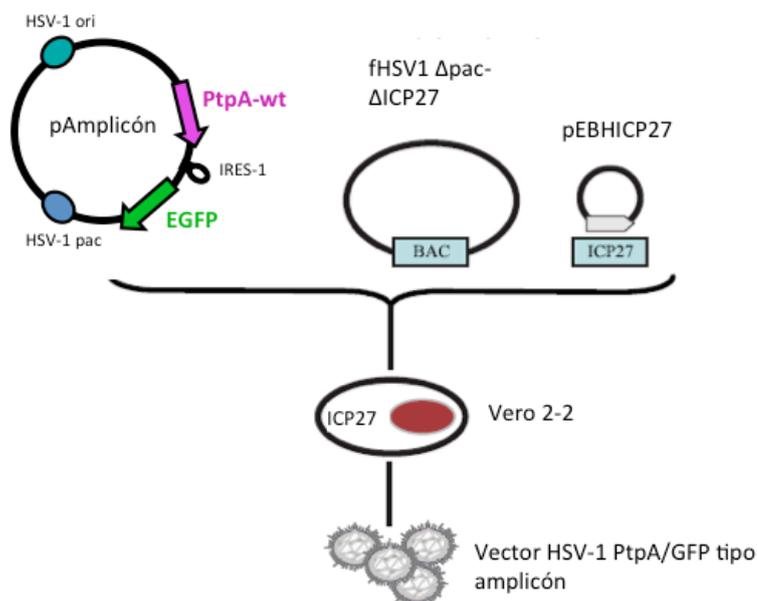
La evaluación de la actividad de PtpA-wt sobre los candidatos a sustrato identificados se realizó hasta el momento sólo con la TFP (ECHA/ECHB), el único de los sustratos identificados que logramos purificar en cantidad suficiente. Antes de utilizar dicha proteína en el ensayo de desfosforilación, verificamos que la misma se encontraba fosforilada en Tyr, utilizando un anticuerpo anti P-Tyr. Para el ensayo de actividad fosfatasa se utilizó un protocolo experimental descrito en la literatura para la fosfatasa viral VH1 (Najarro et al. 2001). El mismo se inicia con la separación por SDS-PAGE de cantidades iguales del sustrato inmunopurificado sembrado en carriles consecutivos (15 µl del eluato, aprox. 20 ng de TFP). Las proteínas de estos carriles son a continuación electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa, separados ambos carriles y luego de ser bloqueada se incubaba a 30 °C durante 1 h en presencia y ausencia de la fosfatasa (PtpA-wt), a una concentración final 0.75 y 1.5 µM en Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 50 mM, glicerol 5 %, EDTA 3 mM, Tween 20 0.005 %, TCEP 3 mM. A continuación se lavan las membranas con TBS-T y se evalúa en cada una de ellas el nivel de fosforilación en Tyr con el anticuerpo anti-P-Tyr (Invitrogen #136600) a 0.6 µg/mL. Se utilizó como anticuerpo secundario un Ac anti IgG de ratón unido a peroxidasa (HRP) (Sigma-Aldrich A4416, 1/10000) y se siguió la metodología descrita en 2.3. Las bandas inmunoreactivas se visualizaron y analizaron utilizando el equipo GBOX ChemiSystem (SynGene). Se utilizó como índice del nivel de señal la intensidad de fluorescencia por unidad de área (raw volume) determinado por el software del equipo. El ensayo se realizó dos veces con diferentes lotes de TFP inmunoprecipitada.

### **2.11. Evaluación del efecto de la actividad PtpA de *Mtb* en los macrófagos humanos**

La estrategia adoptada consiste en introducir la actividad de PtpA-wt en los macrófagos humanos derivados de la línea celular THP-1, para luego evaluar el efecto sobre propiedades celulares que pensamos que se afectarían de acuerdo con los sustratos identificados y validados según se describió en 2.9 y 2.10, respectivamente. Uno de los efectos que suponemos PtpA podría tener sobre las células es un redireccionamiento del metabolismo, por lo cual nos propusimos medir los niveles de glucosa y lactato en células transfectadas y sus controles.

Para introducir PtpA en los macrófagos utilizamos un vector viral (HSV-1 tipo amplicón, Herpes Simple Virus). En primer lugar se clonó el gen de la PtpA en el plásmido amplicón pHSV1-IRES-EGFP cedido por el Dr. Cornell Fraefel (Universidad de Zurich, Suiza). Este plásmido lleva un bloque de expresión que permite la inserción del gen de interés bajo el promotor temprano IE4/5 de HSV-1, seguido de un elemento IRES que favorece el reclutamiento de ribosomas para la traducción y el gen de la proteína verde fluorescente (EGFP). Una vez obtenido el plásmido amplicón recombinante pHSV1-PtpA-IRES-EGFP se procedió a la construcción del vector HSV-1 amplicón. Para ello se realizó una transfección múltiple en células Vero 2-2 con: (i) el plásmido amplicón pHSV1-PtpA-IRES-EGFP que contiene además la información para la replicación y el empaquetamiento del genoma HSV-1; (ii) un cromosoma artificial bacteriano (bácmido: fHSV1  $\Delta$ pac  $\Delta$ ICP27) que contiene el genoma del HSV-1 sin su señal de empaquetamiento en la partícula viral y sin el gen esencial ICP27. Este bácmido provee el genoma viral auxiliar que contiene toda la información requerida para la replicación del vector HSV-1 amplicón.; (iii) el plásmido pEBHICP27 que provee en trans el gen esencial ICP27 (Figura 2.5).

De la misma forma también se prepararon vectores virales control, utilizando el plásmido amplicón pHSV1-IRES-EGFP que contiene el gen de la EGFP pero no contiene el gen de la PtpA de *Mtb*.



**Figura 2.5.** Estrategia de producción del vector viral HSV-1 tipo amplicón conteniendo el gen de la PtpA

### 2.11.1. Producción del plásmido amplicón pHSV1-IRES-PtpA-wt

Como primer estrategia para la producción del plásmido amplicón pHSV1-IRES-EGFP conteniendo el gen de la PtpA-wt, se utilizó la metodología de clonaje sin enzimas de restricción *Rf cloning* (*Restriction-enzyme free cloning*) (van den Ent & Löwe 2006). La misma se basa en el uso de un par de cebadores híbridos que son diseñados de tal forma que contienen una secuencia complementaria al gen de interés (PtpA-wt) y otra complementaria al plásmido en donde se va a clonar (pHSV1-IRES-EGFP) (Figura 2.6).

#### **Forward TbPptA (\*)**

5'-AGGAGGAACGTCCTCGTCGATAAGCTTGCA**ATGTCTGATCCGCTGCACGTCACAT**-3'

#### **Reverse TbPptA**

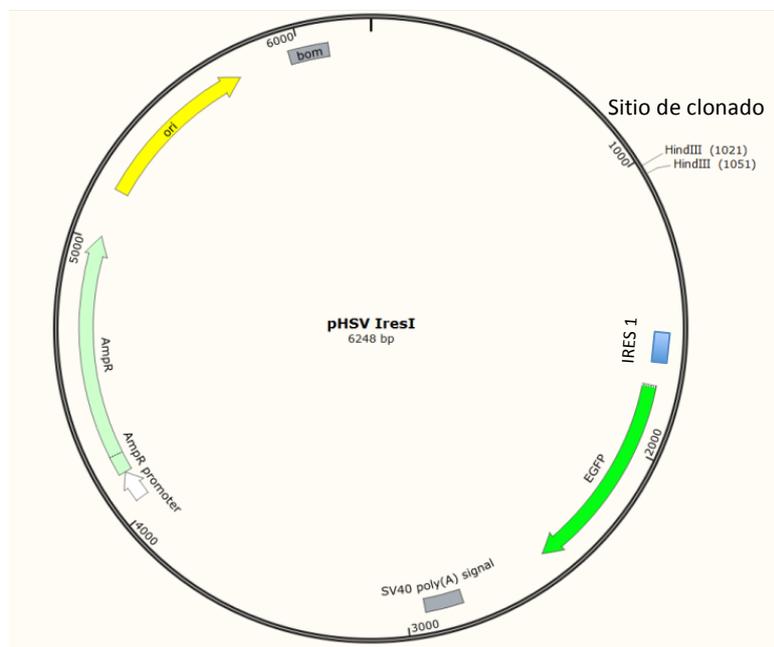
5'-GGTACAACCCAGAGCTGTTTTAAAAGCTTT**CAACTCGGTCCGTTCCGCGGAGA**-3'

(\*) En negro se indica la secuencia complementaria al plásmido pHSV1-IRES-EGFP y en azul la secuencia complementaria a PtpA-wt.

Estos cebadores fueron utilizados para amplificar el gen de interés a partir del plásmido pET28a conteniendo el gen de la PtpA-wt, utilizando la DNA polimerasa Phusion (Thermo Scientific #F530), y siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Las condiciones de reacción fueron: 30 s a 98°C, y 35 ciclos de 8 s a 98°C seguido de 50 s a 72°C y una extensión final de 5 min a 72°C. El producto de PCR obtenido se purificó (Tiagen, Universal DNA Purification Kit) y utilizó como un megacebador en una segunda reacción de PCR utilizando como molde el plásmido pHSV1-IRES-EGFP. El stock del plásmido pHSV1-IRES-EGFP fue suministrado por el estudiante de Maestría Darío Porley, de la Sección Virología con quien pusimos a punto el sistema de transfección viral, en colaboración con la Dra. Mabel Berois. Luego de la reacción de amplificación, se digirió el ADN parental metilado con la enzima DpnI y luego se utilizó el producto final para transformar células *E.coli* DH5 $\alpha$  electrocompetentes. Se ensayaron varias condiciones en la reacción de PCR secundaria sin obtener resultados positivos. Sin embargo, dado que en el diseño de los cebadores utilizados para el *Rf cloning* se incluyeron sitios de corte para la enzima HindIII, se pudo aplicar la estrategia de clonado con enzimas de restricción. El producto obtenido en la primera reacción de PCR (1  $\mu$ g) se digirió con la enzima HindIII durante 30 min a 37°C. Se separó el producto de digestión mediante electroforesis en gel de agarosa, se recortó la banda del gel y se purificó utilizando un kit comercial (Tiagen, Universal DNA Purification Kit). El plásmido pHSV1-IRES-EGFP se digirió también con la enzima Hind III, durante 30 min a 37°C. Luego de la digestión, se desfosforiló utilizando la enzima Fast AP Thermo sensitive Alkaline Phosphatase (Thermo EF0651), durante 10 min a 37°C. A continuación se purificó el plásmido desfosforilado mediante el kit MNnucleospin. Para la ligación, 60 ng del plásmido pHSV1-IRES desfosforilado y purificado, se incubaron con 15 ng del

fragmento conteniendo el gen de PtpA-wt digerido con Hind III y purificado, junto a 0.4  $\mu$ L (2 Weiss U) de T4 DNA ligasa (Thermo), durante 1 h a TA. Posteriormente se inactivó la enzima durante 10 min a 65°C. Con el producto de ligación se transformaron células *E.coli* DH5 $\alpha$  electrocompetentes según el protocolo descrito en 1.2.2. Con algunas de las colonias transformantes obtenidas se realizaron purificaciones del ADN plasmídico y utilizando este como molde se realizó una reacción de PCR para confirmar la presencia del gen de interés y se enviaron a secuenciar aquellos clones que fueron positivos en dicho ensayo.

En la construcción final, el gen de la PtpA-wt se encontrará bajo control del promotor temprano IE4/5 de HSV-1, seguido de un IRES y el gen de la proteína verde fluorescente (EGFP). El plásmido amplicón pHSV1-IRES-EGFP control contará con el gen de la EGFP pero no contendrá el gen de la PtpA-wt.



**Figura 2.6.** Vector de clonación pHSV1-IRES-EGFP

### 2.11.2. Producción y purificación del bécrido

El bécrido utilizado fue cedido por el Dr. Cornell Fraefel (Universidad de Zurich, Suiza) (Saeki et al. 2001): fHSV1- $\Delta$ pac- $\Delta$ ICP27 (*pac-deleted, ICP27 deleted HSV-1 BAC DNA*). El mismo provee todas las funciones requeridas para la replicación de la partícula viral de Herpes, pero éste por sí mismo no puede incorporarse a una partícula viral en formación debido a la falta de la señal de empaquetamiento. Asimismo, para mejorar la seguridad, un gen esencial de HSV-1 (ICP27) también fué eliminado del genoma viral del bécrido, y debe aportarse como un plásmido separado. El stock del bécrido se mantuvo expandiendo el mismo en células *E.coli* DH5 $\alpha$

electrocompetentes. Se guardó un stock en glicerol de células conteniendo el b́acmido, a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para purificar el b́acmido se utilizó el kit QIAGEN Large-Construct Kit #12462, y se siguió el protocolo establecido por el fabricante. Se sembró una placa de LB-cloranfenicol con el stock de células *E.coli* DH5 $\alpha$  conteniendo el b́acmido, guardado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , y a partir de una única colonia se inició un precultivo que se creció a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación a 240 rpm durante 8 hs, para luego iniciar un cultivo de 500 mL que se detuvo al llegar a una densidad de células entre  $3-4 \times 10^9$  ufc/mL a partir del cual se realizó la purificación. Se realizaron curvas de crecimiento para determinar bien las fases de crecimiento y el número de ufc/mL necesario para el ensayo. Una vez purificado, la identidad del b́acmido fué verificada por el estudiante de Maestría Darío Porley, mediante análisis del patrón de restricción en geles de agarosa utilizando las enzimas Hind III y Kpn I además de un b́acmido estándar de patrón de digestión conocido disponible en el laboratorio.

### **2.11.3. Producción del vector amplicón HSV-1**

Para empaquetar el vector amplicón en partículas HSV-1, las células (Vero2-2) deben ser sometidas a una transfección múltiple con el plásmido pHSV1-PtpA-IRES-EGFP o el plásmido pHSV1-IRES-EGFP control, el b́acmido fHSV1  $\Delta\text{pac} \Delta\text{ICP27}$  y el plásmido que codifica para ICP27. El protocolo utilizado para la producción del vector fue el descrito por Laimbacher y Fraefel (Diefenbach & Fraefel 2014). El mismo consiste en las siguientes etapas principales:

*(i) Preparación de las células a ser transfectadas:* se partió de un cultivo de células Vero 2-2, en medio DMEM completo (DMEM, conteniendo SBF 10%, ATB/AM (Gibco) 1%, G418 sulfato (Geneticina, Gibco) 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Las células se disgregaron con tratamiento con una solución de Tripsina 0.25%-EDTA 0.02% y se contaron. Finalmente éstas se sembraron en una placa estéril de 6 cm a una concentración de  $1.2 \times 10^6$  células en 3 mL de DMEM completo y se incubaron toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$  en incubadora con 5%  $\text{CO}_2$ .

*(ii) Co-transfección:* se prepararon dos tubos de 15 mL: tubo D (para la mezcla de ADN) y tubo L (para la mezcla de lipofectamina). Por cada placa a ser transfectada se agregaron 250  $\mu\text{L}$  de Optimem en cada tubo. Se agregaron 16.8  $\mu\text{L}$  lipofectamina al tubo L ; y 2  $\mu\text{g}$  b́acmido (fHSV1- $\Delta\text{pac} \Delta\text{Kn}$ ), 0.2  $\mu\text{g}$  pEBHICP27 y 0.4  $\mu\text{g}$  ADN amplicón (pHSV1-IRES-PtpA-wt o pHSV1-IRES control) al tubo D. Se agitaron ambos tubos y se agregó lentamente 10  $\mu\text{L}$  por placa del reactivo PLUS al tubo D, se incubó 5 min y se mezcló. Luego de dejar 5 min se agregó el contenido del tubo L al tubo D y se dejó 30 min a TA. Se hizo un lavado de las células con Optimem. Se agregó 0.9 mL de Optimem por placa a la mezcla D-L. Se aspiró el sobrenadante de lavado y se agregó 1.3 mL de la suspensión D-L . Se incubó la placa durante 4 hs en incubadora a  $37^{\circ}\text{C}$  con 5%  $\text{CO}_2$ , moviendo suavemente las placas cada 1 h. Se aspiró el líquido

de la placa, se hicieron 3 lavados con 2 mL de Optimem, se agregó 3.5 mL del medio de transfección (DMEM conteniendo SFB al 6%), y se incubó a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> durante 3 o 4 días.

(iii) *Cosecha de los vectores amplicon*: previo a la cosecha, se confirmó la presencia de un efecto citopático característico provocado por la replicación viral en las células Vero 2.2. Luego, empleando un *scraper* se despegaron las células de la placa y se transfirió la suspensión con células a un tubo en hielo. Se centrifugó a 3500 rpm a 4°C, 10 min. Se alicuotó el sobrenadante dejando unos 100 µL. Con el pellet restante se realizaron 3 ciclos de congelado - descongelado utilizando nitrógeno líquido y un baño de agua a 37°C. Se centrifugó nuevamente a 3500 rpm a 4°C, 10 min, se separó el sobrenadante y guardaron las fracciones a -80 °C.

(iv) *Titulación del vector stock*: para ello se prepararon diluciones 1/10 y 1/100 del vector viral, en medio de titulación (DMEM conteniendo SBF 2% y antibiótico-antimicótico 1%). Se tomaron 10 µL del stock del vector y diluciones y se llevaron a 250 µL con medio de titulación. Se transfirieron las diluciones del vector a una placa de 24 pocillos conteniendo 100.000 células Vero 2-2 por pocillo. Se incubó la placa a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> durante 24 hs. Las células positivas debido a la emisión de la EGFP fueron contabilizadas a las 24 hs posteriores al ensayo con la ayuda de un microscopio de epifluorescencia (Olympus IX81). El título se expresó como unidades transductantes por mL (UT/mL) y es igual al número de células fluorescentes contabilizadas por el recíproco de la dilución en la que se contabilizó y por el recíproco del volumen del inóculo expresado en mL.

v) *Concentración del vector stock*: para realizar la transducción de los macrófagos con los vectores amplicón se realizó una producción a gran escala de ambos vectores y luego se concentraron los sobrenadantes conteniendo las partículas virales mediante ultracentrifugación, previo a realizar la titulación de los mismos. Para ello, en cada tubo de ultracentrifuga se colocaron 5.25 mL de sacarosa al 25% en PBS (estéril), y arriba se agregó lentamente 6.5 mL de la suspensión de partículas virales. Se centrifugaron los tubos a 100.000 g durante 3 hs a 4°C, en el rotor 90 Ti, centrifuga Beckman-Coulter Optima L-100K. Se aspiró el sobrenadante y se disolvió cada *pellet* de partículas virales con 130-150 µL de medio de cultivo RPMI 1640 conteniendo 4 g/L glucosa, suplementado con 2 mM L-glutamina, 1.5 g/L bicarbonato de sodio, 10 mM Hepes pH 7.0, antibiótico y antimicótico ATB/AM (Sigma). Se dejaron toda la noche a 4°C y luego se terminaron de disolver y pasaron a tubos eppendorf, juntando todos los tubos correspondientes a una misma producción de partículas virales. Para cada producción se dejó separada una alícuota de 10 µL para realizar la titulación del vector stock, y se guardó a -80°C hasta el momento de la transducción.

## **2.11.4. Transducción de los macrófagos con los vectores amplicón obtenidos**

### **2.11.4.1. Optimización del número de células a ser utilizadas**

En primer lugar fue necesario optimizar las condiciones de cultivo de macrófagos derivados de la línea celular THP-1 para asegurarnos que los niveles de glucosa y lactato en el sobrenadante fueran detectados por el método de medición disponible (ver 2.11.4.3.3). Para ello, se partió de un cultivo de la línea THP-1 obtenido tal como se describió en 2.2 y se plaquearon las células a 50.000, 100.000 y 200.000 células/pocillo (6 pocillos para cada cantidad de células), en un volumen final de 0.6 mL, cultivándolas en presencia de PMA 50 ng/mL por 72 hs en estufa a 37°C, y 5 % CO<sub>2</sub> para inducir su diferenciación. Una vez diferenciados, se descartó el sobrenadante de cultivo de cada pocillo, y se hizo un lavado con 1 mL de RPMI para retirar el PMA remanente. Los macrófagos obtenidos a las 72hs de diferenciación se cultivaron en estufa a 37°C, y 5 % CO<sub>2</sub> en medio RPMI conteniendo 10 % SBF utilizando un volumen de 0,6 mL por pozo por tiempos de 8 hs, 24 hs y 48 hs (por duplicado). Se guardó una muestra del medio de cultivo a tiempo 0 para tener los niveles basales de glucosa y lactato. Finalizado el tiempo de cultivo se colectaron los sobrenadantes, se centrifugaron a 800g durante 10 min y se guardaron los sobrenadantes a -20°C hasta la medición de glucosa y lactato.

### **2.11.4.2. Optimización del medio de cultivo a utilizar**

Con el objetivo de aumentar el nivel de producción de lactato en el cultivo de macrófagos probamos a aumentar la concentración de glucosa que contiene el medio RPMI (2 g/l) hasta obtener una concentración final de 4 g/l de glucosa; y a suprimir el agregado de piruvato 1 mM durante la preparación del RPMI para el ensayo.

Se partió de un cultivo de la línea THP-1 obtenido tal como se describió en 2.2, se plaquearon las células a 100 mil y 200 mil células/pocillo (8 pocillos con cada cantidad), y se diferenciaron a macrófagos con 50 ng/mL de PMA como se describió en el punto anterior. Una vez diferenciados, se descartó el sobrenadante de cultivo de cada pocillo, y se hizo un lavado con 1 mL de RPMI para retirar el PMA remanente. Los macrófagos obtenidos a las 72hs de diferenciación se cultivaron en estufa a 37°C, y 5 % CO<sub>2</sub> : en medio RPMI conteniendo 4 g/l de glucosa, piruvato 10 mM y SBF 10 % (la mitad de los pocillos) o el mismo medio RPMI pero sin piruvato (RPMI sin piruvato), utilizando un volumen de 0,6 mL por pocillo por tiempos de 24 hs y 48 hs. Finalizado el tiempo de cultivo se colectaron los sobrenadantes, se centrifugaron a 800 g durante 10 min y se guardaron los sobrenadantes a -20°C hasta la medición de glucosa y lactato.

### **2.11.4.3. Ensayo de transducción**

Los experimentos realizados anteriormente permitieron definir las condiciones en que se realizaría la transducción de los macrófagos con los vectores virales. Se utilizaron macrófagos THP-1 diferenciados con PMA tal como se describió en 2.11.4.1, a una concentración de 170 mil células por pocillo, en medio RPMI sin piruvato. Luego de lavar con medio RPMI sin fetal, se sembraron en pozos por duplicado 250.000 partículas virales control pHSV1-IRES-EGFP, 250.000 partículas virales pHSV1-IRES-PtpA, y como control medio RPMI sin piruvato y sin SBF. Se incubó la placa durante 2 hs en estufa a 37°C, y 5 % CO<sub>2</sub>, para que transcurra la transducción. Como no se logró obtener suspensiones de partículas virales de concentración suficientemente alta como para adicionar las partículas en volúmenes pequeños, luego de transcurridas las 2 hs de transducción se ajustó el volumen final a 500 µL de RPMI, incluyendo la adición de SBF al 10%. Se mantuvo el cultivo durante 48 hs en estufa a 37°C, y 5 % CO<sub>2</sub>. Además, con el objetivo de comparar el efecto de la transducción viral con el producido por estímulos inflamatorios conocidos, se estimularon células con concentraciones crecientes de LPS (0.01, 0.1 y 1 µg/mL), en las mismas condiciones de cultivo (concentración de células/pozo, volumen final, medio, composición del medio, temperatura y atmósfera de CO<sub>2</sub>). Luego de transcurridas las 48 hs de cultivo se recuperaron los sobrenadantes, se centrifugaron a 1000 g durante 10 min, a 4 °C y se guardaron los sobrenadantes a -20°C para luego analizar las concentraciones de glucosa, lactato y citoquinas inflamatorias (IL-1β e IL-6). Las células adheridas a la placa fueron analizadas para determinar el nivel de transducción obtenido y la actividad fosfatasa.

#### **2.11.4.3.1. Evaluación de la transducción mediante citometría de flujo**

Las células adheridas a la placa se lavaron con RPMI sin SBF (500 µL/ por pocillo), y luego se despegaron mediante el tratamiento con Accutase (3 incubaciones de 5 min a 37°C) y luego con una solución 0.25% tripsina (150 µL), incubaciones de 5-10 min a 37°C durante 30 min. Se frenó la reacción con el agregado de 200 µL RPMI 10% SBF y se terminaron de despegar con pipeta. Se recuperaron las células y juntaron los sobrenadantes de los pocillos duplicados. La suspensión de células se analizó por citometría de flujo en el equipo FACScalibur (BD Bioscience, USA), midiendo la fluorescencia en el detector FL-1 para cuantificar el porcentaje de células infectadas que expresan por tanto la EGFP. Para la medición de la fluorescencia se adquirieron 5.000 eventos dentro de la región de las células vivas (definida en base al gráfico FSC vs SSC) y se ajustó la fluorescencia en el canal FL-1 de forma de que las células control mostraran niveles de fluorescencia menores a 10. Los datos se analizaron utilizando el software FlowJo ([www.flowjo.com](http://www.flowjo.com)). Se construyó un histograma con los datos de fluorescencia de las células control y se tomó como umbral para definir las células positivas y negativas para EGFP

la intensidad de fluorescencia a la cual el 99% de las células control fueron negativas. En función de este umbral se calculó el % de células infectadas que resultaron positivas.

#### ***2.11.4.3.2. Determinación de actividad PtpA en los extractos celulares***

Luego de realizadas las medidas por citometría de flujo, el resto de la suspensión de células se centrifugó a 1000 g, durante 10 min a 4°C y el pellet de células se resuspendió en 70 µL de buffer de lisis (Hepes 25 mM pH 7.4, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, Glicerol 10%, Triton X-100 0.25%, benzamidina 1 mM, SBTI 1 µg/mL, PMSF 1 mM. Se realizaron 3 ciclos de congelado/descongelado a -20 °C, y luego los extractos se centrifugaron a 13.000 g durante 20 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante. La concentración de proteínas de cada extracto se determinó utilizando el reactivo de Bradford. En dichos extractos se midió la actividad fosfatasa utilizando pNPP como sustrato artificial tal como se describió en 2.5.2. Brevemente, a 30 µg de proteínas del extracto problema se les adicionó DTT, concentración final 5 mM y se mezclaron con 5 µL de pNPP 300 mM para obtener una concentración final de pNPP 25 mM. Luego de 15 y 30 min se midió la Abs 420nm.

#### ***2.11.4.3.3. Dosificación de lactato y glucosa en sobrenadantes de cultivo de macrófagos***

Se midió la concentración de glucosa y de lactato en los sobrenadantes de cultivo utilizando el equipo Bioprofile Basic 2 de Nova Medical, del Laboratorio de Biología Celular del IPMon. Este equipo utiliza un biosensor enzimático que combina una enzima inmovilizada y un sensor electroquímico para medir los metabolitos. El potencial o la corriente generada son utilizados para determinar la concentración. El sensor de glucosa posee glucosa oxidasa unida a una membrana, que cataliza la oxidación de β-D-glucosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, el cual es oxidado en el electrodo de platino. La corriente generada por el flujo de electrones en la superficie del electrodo es proporcional a la concentración de glucosa en la muestra. El sensor de lactato posee lactato oxidasa inmovilizada, que en presencia de lactato y O<sub>2</sub> produce ácido pirúvico y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el cual es oxidado en la superficie del electrodo de platino y la corriente generada es proporcional a la concentración de lactato en la muestra. Los electrodos se calibraron con estándares comerciales de 1.00 g/L glucosa y 1.03 g/L de lactato, y las mediciones se realizaron en un volumen de sobrenadantes de cultivo de entre 450 y 500 µL, a TA.

#### ***2.11.4.3.4. Evaluación de la secreción de citoquinas proinflamatorias***

Se determinaron los niveles de citoquinas inflamatorias en los sobrenadantes de cultivo utilizando los kits comerciales de BD Biosciences para la medición de IL-1β (BD OptEIA 558848) e IL-6 humanas (BD OptEIA 555220), siguiendo las instrucciones del fabricante. El

procedimiento de ambos ELISA es básicamente el mismo y se describe a continuación: se sensibilizaron las placas con 100  $\mu\text{L}$ /pozo del anticuerpo de captura (Ac monoclonal anti-IL-1 $\beta$ h o Ac monoclonal anti IL-6h) diluido 1/250 en  $\text{NaHCO}_3$  0.1M pH 9.5, y se incubó ON a 4°C. Luego de lavar 3 veces con 300  $\mu\text{L}$ /pozo de PBS-Tween-20 0.05%, se bloqueó la placa con 200  $\mu\text{L}$ /pozo de PBS-SBF 10% pH 7.0, durante 1 h a TA. Se hicieron 3 lavados con 300  $\mu\text{L}$ /pozo de PBS-Tween-20 0.05%, se sembraron 100  $\mu\text{L}$ /pozo del estándar y las muestras diluidos en PBS-SBF 10% y se incubó la placa durante 2 hs a TA.

En el ELISA IL-1 $\beta$  se sembraron diluciones seriadas del estándar rhIL-1 $\beta$  en PBS-SBF 10%: 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62.5 pg/mL, 31.3 pg/mL, 15.6 pg/mL y diluyente como 0 pg/mL.

En el ELISA IL-6 se sembraron diluciones seriadas del estándar rhIL-6 en PBS-SBF 10%: 300 pg/mL, 150 pg/mL, 75 pg/mL, 37.5 pg/mL, 18.8 pg/mL, 9.4 pg/mL, 4.7 pg/mL y diluyente como 0 pg/mL.

Se realizaron de 5 lavados con 300  $\mu\text{L}$ /pozo de PBS-Tween-20 0.05%, y a continuación la siguiente etapa de incubación con el Ac se realiza en 2 etapas en el ELISA IL-1 y en una única etapa en el ELISA IL-6.

En el ELISA IL-1 se sembraron 100  $\mu\text{L}$ /pozo del anticuerpo de detección (Ac monoclonal anti-IL-1 $\beta$ h-biotinilado) diluido 1/250 en PBS-SBF 10% y se incubó 1h a TA. Se hicieron 5 lavados con 300  $\mu\text{L}$ /pozo de PBS-Tween-20 0.05% y se agregaron 100  $\mu\text{L}$ /pozo del reactivo enzimático (Streptavidina-peroxidasa), diluido 1/250 en PBS-SBF 10%, y se incubó 30 min a TA.

En el ELISA IL-6 se sembraron 100  $\mu\text{L}$ /pozo de la preparación de detección. Se preparó previamente la dilución del anticuerpo de detección (Ac monoclonal anti-IL-6h-biotinilado) diluido 1/250 en PBS-SBF 10%, y 15 min antes de utilizarlo se agregó el reactivo Streptavidina-peroxidasa. Se sembraron 100  $\mu\text{L}$ /pozo de la preparación de detección e incubó 1h a TA.

Luego de 7 lavados con PBS-Tween-20 0.05%, se agregaron 100  $\mu\text{L}$ /pozo de sustrato (0.1 mg/mL de TMB en buffer fosfato-citrato pH 5.0 / $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Se incubó 30 min a TA y oscuridad y luego se detuvo la reacción mediante el agregado de 50  $\mu\text{L}$ /pozo de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N.

Se midió la DO a 450nm en un lector de placas y se realizó la curva de calibración a partir del estándar correspondiente (DO vs concentración de IL) y se estimó la concentración de IL-1 $\beta$  y IL-6 en las muestras.

## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS

---

#### 3.1. Obtención y caracterización de los mutantes de *Substrate Trapping* (ST)

Como ya se mencionó anteriormente, la estrategia de ST consiste en aislar potenciales sustratos de fosfatasa de tirosina mediante el uso de mutantes puntuales en residuos catalíticos conservados de la fosfatasa. Dichos mutantes permitirán la captura del complejo enzima-sustrato ya que es de esperar que la mutación no afecte la capacidad de la fosfatasa de unirse a su sustrato ( $K_m$  similar a la proteína salvaje), pero tendrán ausente o disminuida la capacidad de desfosforilarlos ( $k_{cat}$  nula o muy baja).

El primer paso consistió entonces en obtener los mutantes de las fosfatasas a ser utilizados en la estrategia de ST para aislar e identificar posibles sustratos de las fosfatasas PtpA y PtpB de *Mtb*. Una vez obtenido el mutante de la fosfatasa, se procedió a caracterizarlo estructuralmente y funcionalmente para determinar si se trata de una herramienta adecuada.

##### 3.1.1. Obtención de los mutantes de ST

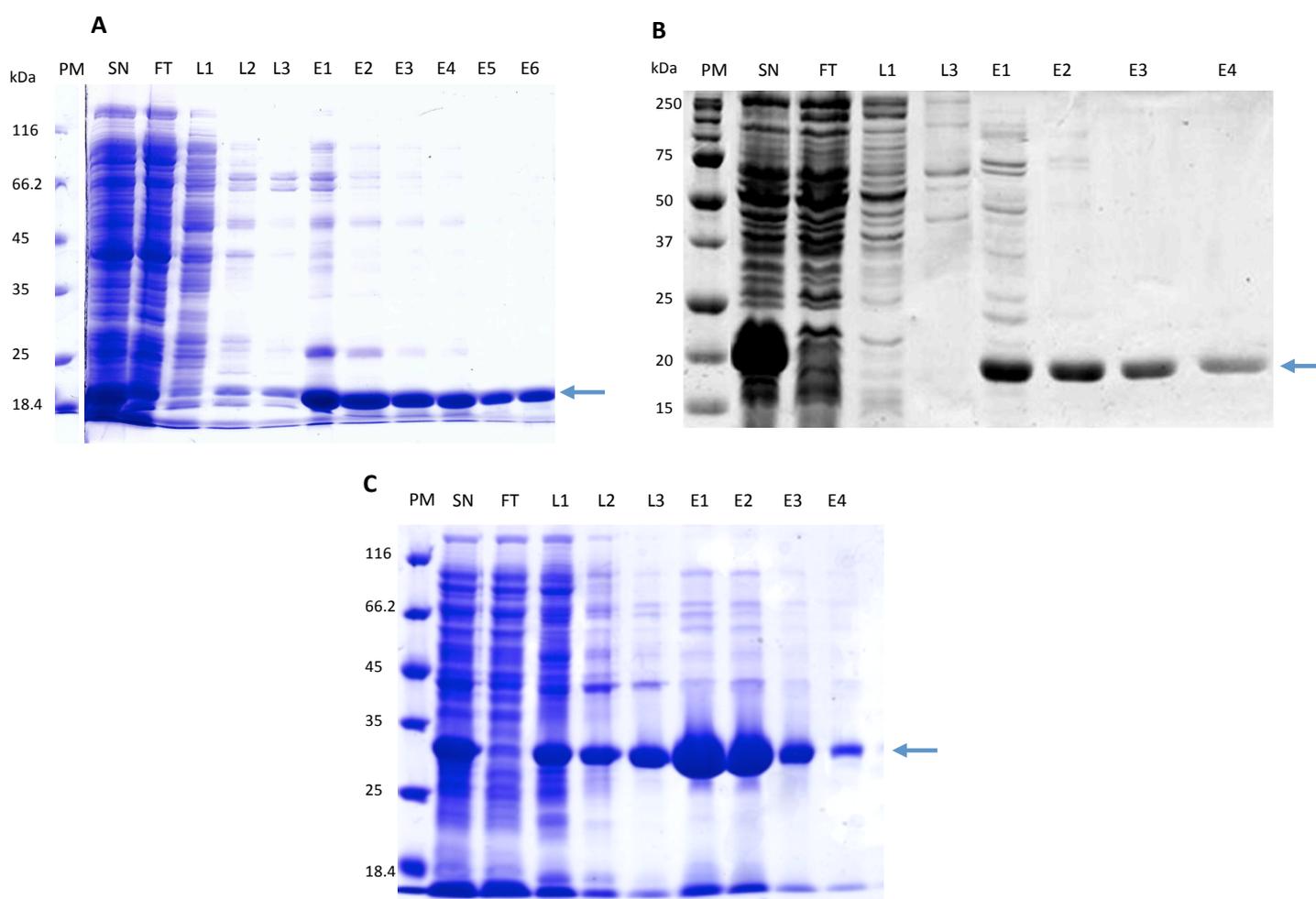
Los mutantes más utilizados en la estrategia de ST son el mutante en el aspartato catalítico del sitio activo, residuo que asiste la formación e hidrólisis del intermediario fosforilado, y que en general se sustituye por un residuo de alanina generando el mutante D/A que presenta pérdida parcial de actividad; y el mutante en la cisteína catalítica, la cual es sustituida por una serina, generando el mutante C/S que presenta pérdida total de actividad.

En el caso de PtpA, el mutante en el aspartato catalítico PtpA-D126A ya había sido obtenido por la Dra. Villarino por mutagénesis sitio dirigida, utilizando como molde el gen de PtpA-wt clonado en el vector pET 28a(+). Se prepararon entonces los mutantes en la Cys catalítica de PtpA y PtpB: *PtpA-C11S* y *PtpB-C160S* por mutagénesis sitio dirigida utilizando como molde el gen salvaje de PtpA o PtpB (wt) clonado en el vector pET 28a(+).

En el caso de PtpB, no priorizamos la obtención del mutante D/A ya que en la literatura no existía consenso sobre cuál es el aspartato catalítico (Grundner et al. 2005; Beresford et al. 2007). La secuenciación de los mutantes evidenció la introducción de las mutaciones deseadas según se muestra en el Anexo 1.

La etapa siguiente fue la producción de las proteínas recombinantes de PtpA y PtpB de *M. tuberculosis*. Se obtuvieron todas las formas mutadas generadas y también las formas salvajes de dichas fosfatasas, estas últimas para realizar una comparación estructural y funcional con las proteínas mutadas.

Las proteínas PtpA-wt, PtpB-wt, PtpA C11S, PtpA-D126A, y PtpB-C160S se produjeron en *E.coli* BL21 (D3), utilizando como condiciones de expresión la inducción con 0.5 mM de IPTG a 15°C durante 16 horas. En estas condiciones tanto las formas salvajes como mutantes se expresan mayoritariamente en la fracción soluble, es decir en el sobrenadante de lisis (SN, Figura 3.1). En la figura 3.1 se muestra a modo de ejemplo el análisis por SDS-PAGE de las muestras obtenidas luego de la purificación por afinidad (IMAC) de uno de los tres lotes producidos de PtpA-wt, PtpA-D126A y PtpB-wt. En todos los casos las proteínas se eluyeron con 300 mM de imidazol (E1-E4 o E6). Las fracciones de eluciones conteniendo las proteínas recombinantes purificadas por afinidad se dializaron para eliminar el imidazol, y esta diálisis se hizo en cuatro etapas para disminuir gradualmente el imidazol, ya que la diálisis en una sola etapa causa la precipitación de estas proteínas (datos previos del grupo).



**Figura 3.1.** Análisis por SDS-PAGE (15% de acrilamida) de las muestras obtenidas luego de la purificación por cromatografía de afinidad de PtpA-wt (Fig A), PtpA-D126A (Fig B) y PtpB-wt (Fig C). En cada uno de los geles se sembraron 10  $\mu$ L del sobrenadante de proteínas solubles aplicado a la matriz de afinidad (SN); 10  $\mu$ L de la fracción que no se unió a la columna (FT por *flow through*); 15  $\mu$ L de los lavados de la matriz (L1 - L3); 10  $\mu$ L de las eluciones con 300 mM de imidazol (E1-E6) y el marcador de PM. Las proteínas se visualizaron por tinción con Coomassie R-250. Se señala con una flecha la altura de las bandas del gel que contienen la proteína de interés.

De la literatura sabemos que tanto PtpA como PtpB son monómeros en solución (Madhurantakam et al. 2005; Grundner et al. 2005), por lo tanto con el objetivo de mejorar la purificación y separar las especies agregadas de la proteína en su forma monomérica, realizamos una etapa adicional de purificación por cromatografía de exclusión molecular. En la Figura 3.2 se muestra el perfil de elución (Abs 280 nm vs tiempo) obtenido durante la purificación por exclusión molecular de PtpA-wt y PtpA-D126A utilizando una columna Superdex 200 16/60. En ambos se observa un pico principal (indicado con una flecha en la figura) que corresponde a un volumen de elución compatible con la masa molecular de las formas monoméricas de las fosfatasa (de acuerdo con la calibración de la columna y datos previos del grupo). En el caso de PtpA-wt el pico principal se eluyó a 95.1 mL, por lo cual estimamos una masa molecular aparente de 18 kDa, siendo la masa molecular teórica del monómero de PtpA-wt 19,9 kDa (Figura 3.2 A). Para PtpA-D126A el pico principal de elución se obtuvo a los 93,8 mL, que correspondería a una masa molecular aparente de 20 kDa, similar a la masa molecular teórica (Figura 3.2 B). En la figura 3.2 A se observa también un pico de mayor  $V_e$  que representa los restos de imidazol remanente en la muestra, no eliminados totalmente durante la diálisis (en la Figura 3.2 B no se observa porque el registro de Abs 280 nm se interrumpió antes).

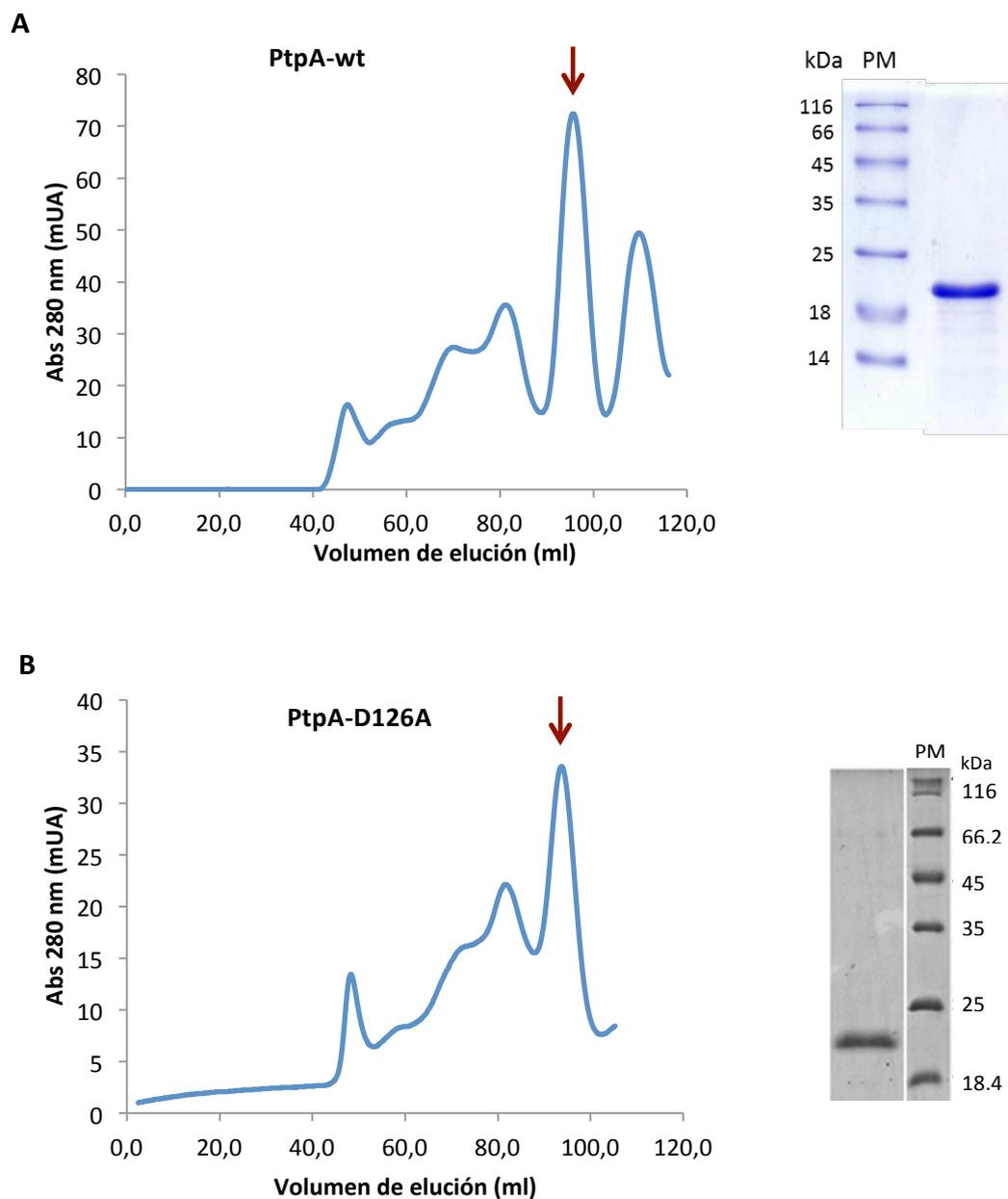
La identidad del componente eluido en el pico principal de estas cromatografías se verificó por SDS-PAGE, seguido de análisis por espectrometría de masa. En la Figura 3.2 A se muestra en el panel de la derecha el perfil obtenido por SDS-PAGE de la muestra proveniente del pico principal, previamente concentrada, donde se observa una banda mayoritaria de aproximadamente 20 kDa correspondiente a PtpA-wt, identidad confirmada por espectrometría de masa. Similarmente, el panel de la derecha de la Figura 3.2 B muestra una banda mayoritaria de aproximadamente 20 kDa correspondiente a PtpA-D126A, identidad confirmada por espectrometría de masa (Anexo 2).

Estos resultados indican que durante todo el proceso de purificación, el mutante PtpA-D126A se comportó de forma similar a la proteína salvaje. Además, de acuerdo al perfil obtenido podemos concluir que ambas fosfatasas se encuentran principalmente como monómeros en solución.

Es importante mencionar que la purificación de PtpA-C11S por cromatografía de afinidad y exclusión molecular condujo a resultados similares (realizado recientemente por el Lic. Danilo Segovia, miembro de nuestro grupo).

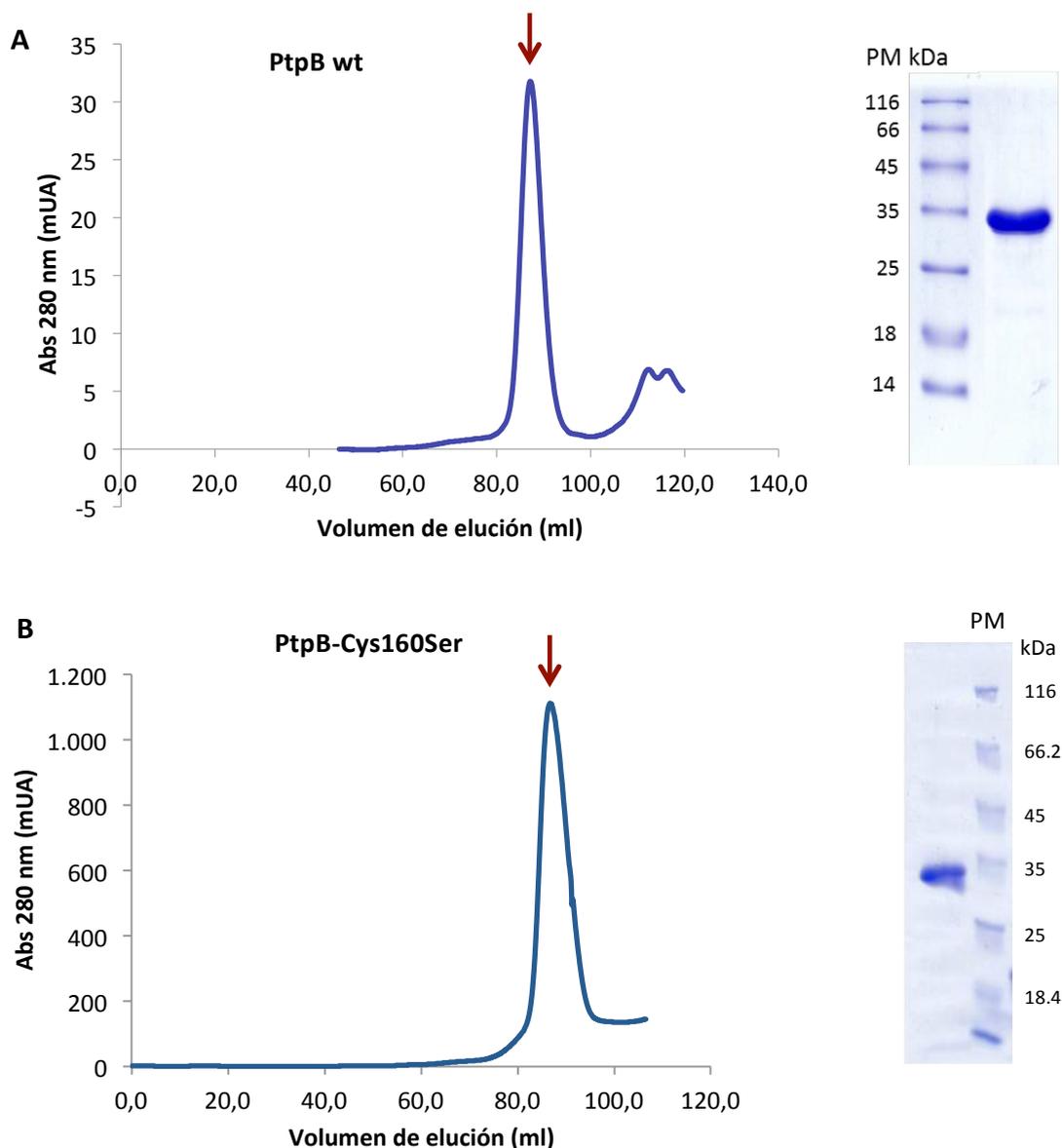
Finalmente, es interesante notar que, el rendimiento de la purificación, estimado a partir de la preparación de tres lotes, fue mayor para el mutante PtpA-D126A que para la proteína PtpA-wt. Se obtuvieron  $8.8 \pm 3.1$  mg de PtpA-D126A y  $4.6 \pm 0.24$  mg de PtpA-wt por litro de cultivo bacteriano. Esta diferencia podría estar asociada a la menor actividad fosfatasa del mutante D126A respecto a la proteína salvaje (determinada en el punto 3.1.2.3). De hecho, expresar una PTP totalmente activa en un organismo que ya posee un sistema tirosin-quinasa/fosfatasa,

como *E. coli* (Vincent et al. 1999) podría causar un desbalance en la fosforilación celular y afectar la producción de la proteína recombinante salvaje.



**Figura 3.2.** Purificación por cromatografía de exclusión molecular de PtpA-wt (A) y PtpA-D126A (B), utilizando el sistema AKTA, y la columna preparativa Superdex 200 16/60 (GE Healthcare). Los gráficos muestran el perfil de la elución obtenido monitoreando la A280 a lo largo de la elución. En ambas figuras se indica con flechas el componente principal eluido en el entorno de los 90 mL. Las diferencias en las mUA obtenidas se deben a la diferencias en la cantidad de proteína inyectada en cada columna previamente equilibrada (protocolo detallado en Materiales y Métodos). A la derecha de cada figura se muestra el análisis por SDS-PAGE de los componentes del pico principal obtenido, en un gel al 15% de acrilamida, donde se sembraron 2-3  $\mu$ g de la proteína y a su lado el marcador de PM.

La Figura 3.3 muestra el gráfico con el perfil de elución de las proteínas durante la purificación por cromatografía de exclusión molecular de PtpB-wt y PtpB-C160S. En ambos se observa un pico principal que corresponde a un volumen de elución compatible con la masa molecular de las formas monoméricas de las fosfatasa (de acuerdo con la calibración de la columna obtenida y datos previos del grupo).



**Figura 3.3.** Purificación por cromatografía de exclusión molecular de PtpB-wt (A) y PtpB-Cys160Ser (B), utilizando el sistema AKTA, y la columna preparativa Superdex 200 16/60 (GE Healthcare). Los gráficos muestran el perfil de la elución obtenido monitoreando la A280 a lo largo de la elución. En ambas figuras se indica con flechas el componente principal eluído en el entorno de los 87 mL. Las diferencias en las mUA obtenidas se deben a la diferencias en la cantidad de proteína inyectada en cada columna previamente equilibrada (protocolo detallado en Materiales y Métodos). A la derecha de cada figura se muestra el análisis por SDS-PAGE de los componentes del pico principal obtenido, en un gel al 15% de acrilamida, donde se sembraron 2-3  $\mu$ g de la proteína y a su lado el marcador de PM.

En el caso de PtpB-wt el pico principal eluyó a los 87,1 ml correspondiente a una masa molecular aparente de 33 kDa, siendo la masa molecular teórica de 32.2 kDa. Para PtpB-C160S, el pico principal de elución se obtuvo a los 86 mL, que correspondería a una masa molecular aparente de 36kDa, similar a la masa molecular teórica de PtpB. A la derecha de los cromatogramas se observan los análisis por SDS-PAGE de los picos principales, previamente concentrados, dónde se observa en ambos casos una banda principal del tamaño esperado.

***En conclusión, tanto las proteínas recombinantes salvajes como mutantes se lograron obtener con un alto grado de pureza y en forma monomérica.***

Al inicio de este trabajo de tesis, nos planteamos aislar posibles sustratos de ambas fosfatasa de Tyr de *Mtb*, PtpA y PtpB. Sin embargo, decidimos centrarnos primero en la búsqueda de sustratos de PtpA, principalmente basándonos en el hecho de que sólo para PtpA existen evidencias que demuestren su presencia en el citosol de los macrófagos infectados (Bach et al. 2008). Sumado a esto PtpA pertenece a una sub-familia de fosfatasa de Tyr de proteínas, en cambio PtpB fue descrita como perteneciente a una nueva familia de fosfatasa lipídica atípica, pudiendo desfosforilar ciertos fosfoinositol fosfatos (Beresford et al. 2010) además de P-Tyr, P-Ser/P-Thr de proteínas.

De los mutantes generados para PtpA (PtpA-C11S y PtpA-D126A), utilizamos el PtpA D126A en los ensayos de ST. La elección se basó en el hecho de que al inicio de la tesis disponíamos de la caracterización estructural por Dicroísmo Circular de dicho mutante (tesis de maestría de Marcela Purificação (Purificação 2008) que sugería no presentaba cambios estructurales importantes, por lo cual era probable constituiría una buena herramienta para aislar sustratos. Sumado a esto, en la literatura existe un reporte que ha descrito que la mutación C/S puede llegar a perturbar la estructura del sitio activo de la fosfatasa, tal como se observó para la fosfatasa humana PTP1B, donde la estructura cristalina del mutante apo-PTP1B C215S revela que los residuos del motivo C[X]<sub>5</sub>R[S/T] del sitio activo están en una conformación dramáticamente diferente a la que presentan en la estructura de la enzima salvaje (Scapin et al. 2001). Además, en la literatura, e independientemente de la fosfatasa estudiada, el mutante de D/A ha sido el más utilizado (Blanchetot et al. 2005; Tiganis & Bennett 2007).

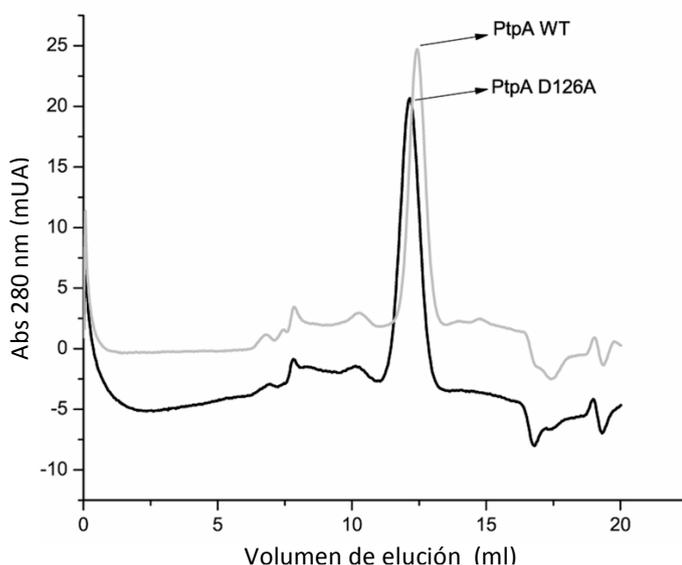
A continuación profundizamos en la caracterización del mutante PtpA-D126A, utilizado posteriormente en los ensayos de ST.

### 3.1.2. Caracterización estructural y funcional del mutante PtpA-D126A

Para obtener una buena herramienta a ser utilizada en la metodología de ST, la mutación introducida en la fosfatasa (D126A) no debe generar cambios sustanciales en la estructura de la proteína que puedan afectar su funcionalidad, alterando por ejemplo su capacidad de unir potenciales sustratos. Como se describió en el punto anterior, el mutante PtpA-D126A a lo largo del proceso de expresión y purificación, se comportó en forma similar a la forma salvaje, sugiriendo que esta mutación no alteró significativamente la estructura de dicha proteína. Para confirmarlo realizamos los estudios complementarios que se describen a continuación.

#### 3.1.2.1. Análisis del grado de oligomerización por cromatografía de exclusión molecular analítica

En primer lugar, como forma de verificar que las preparaciones obtenidas son estables y mantienen a las fosfatasas en su forma monomérica, realizamos un análisis por cromatografía de exclusión molecular analítica, utilizando una columna Superdex 75 10/300 GL. Los resultados mostraron que tanto el mutante como la forma salvaje eluyeron en un único pico mayoritario con una masa molecular aparente correspondiente al estado monomérico (Figura 3.4).



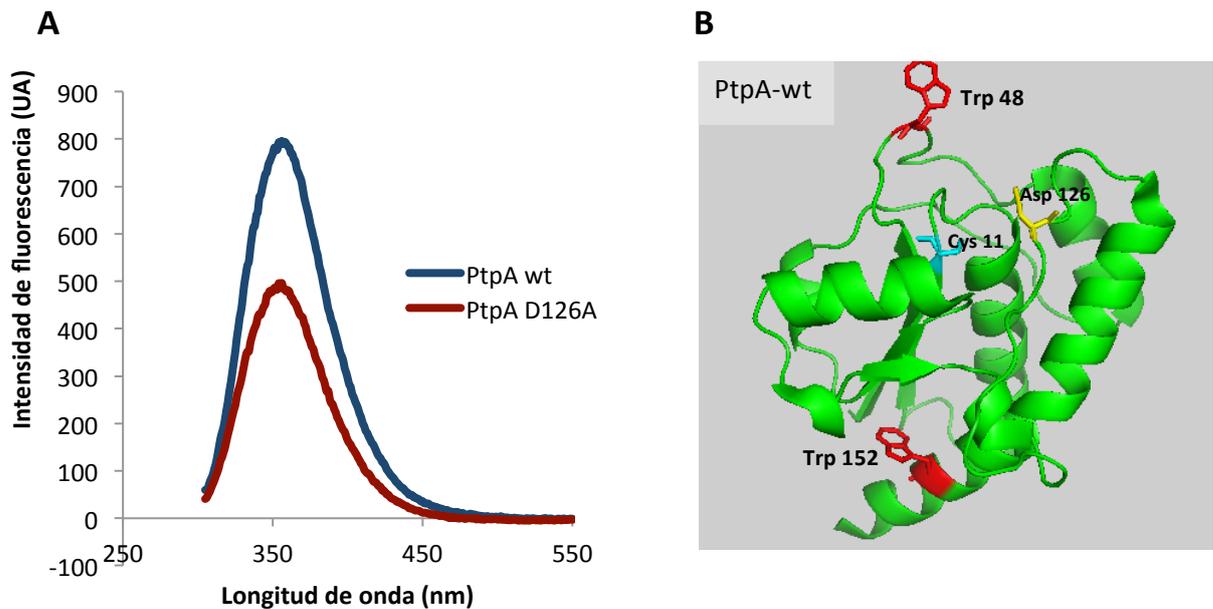
**Figura 3.4.** Análisis por cromatografía de exclusión molecular de PtpA-D126A en la columna analítica Superdex 75 10/300. La cantidad de proteína inyectada en cada corrida fue de 10  $\mu\text{g}$  y se monitoreó la Abs 280 nm durante la elución. El gráfico muestra el perfil de la elución obtenido para cada fosfatasa. La columna fue previamente calibrada utilizando marcadores de peso molecular comerciales (SIGMA) obteniéndose la siguiente ecuación  $y=4154.9e^{-3.2757x}$ , siendo  $y$ = masa molecular de la proteína en kDa y  $x$ = cociente  $V_e/V_o$ , a partir de la cual determinamos la masa molecular aparente de la fosfatasa ( $V_e$ : volumen de elución,  $V_o$ : volumen muerto de la columna).

Concretamente, el volumen de elución de PtpA-D126A y PtpA-wt fue de 12.16 ml y 12.43 ml, correspondientes a una masa molecular aparente de 21 kDa y 19 kDa respectivamente (siendo la masa molecular teórica de PtpA-wt 19.9 kDa). Este incremento de tan solo 2 kDa observada entre la masa estimada y la teórica para PtpA D126A se encuentra dentro de la variación experimental que hemos observado en este tipo de ensayo y sugiere que la introducción de la mutación puntual D126A no genera cambios sustanciales en la conformación global de la fosfatasa. Por lo tanto podemos concluir que ambas preparaciones contienen la fosfatasa en su forma monomérica.

### 3.1.2.2. Medición de la fluorescencia intrínseca del triptófano

La fluorescencia intrínseca de las proteínas se debe a la excitación de los aminoácidos aromáticos, fundamentalmente el triptófano (Trp), y puede medirse selectivamente mediante excitación a 295 nm, ya que a esa longitud de onda la Tyr no absorbe. La fluorescencia del triptófano es altamente sensible a la polaridad de su entorno molecular, y en respuesta a cambios conformacionales que afecten el microambiente que rodea al anillo indol, se puede ver un corrimiento en el espectro de emisión. PtpA posee solo dos residuos de triptófano, Trp 48 y Trp 152, que de acuerdo con el análisis *in silico* realizado con el programa Pymol (Figura 3.5 B) se encuentran en regiones diferentes y en estructuras secundarias diferentes. Por un lado el Trp152 se encuentra en una alfa-hélice distante del sitio activo. Por otro lado el residuo Trp 48 se encuentra en una región no estructurada, flexible y a la entrada del sitio activo. Por lo tanto este último Trp podría servir como indicador de perturbaciones a nivel del sitio activo. Se comparó así el espectro de emisión de PtpA-wt y PtpA-D126A en el rango 305-550 nm, utilizando una longitud de onda de excitación de 295 nm, para evaluar si la mutación D126A generaba cambios en el pico de fluorescencia emitida por el triptófano. Los espectros de emisión se muestran en la Figura 3.5 A. No se observó un corrimiento en el pico de emisión de fluorescencia. Por otro lado, las diferencias en la intensidad no se tienen en cuenta ya que se deben a leves diferencias en la cantidad de cada una de las proteínas presente en la celda del fluorímetro. La ausencia de cambio en el pico de emisión de los Trp de PtpA-D126A respecto a la PtpA-wt sugiere que la mutación no parece provocar cambios conformacionales importantes en la región de los residuos Trp.

Esto concuerda con estudios previos de Dicroísmo Circular (CD) obtenidos por nuestro grupo (Purificação 2008) en dónde la PtpA-D126A y la PtpA-wt, mostraron un nivel de estructura secundaria similar, observándose para el mutante un 34% de estructura  $\alpha$ -hélice, 19% de hojas  $\beta$  y 47% de regiones no estructuradas (o estructuras al azar); y para la proteína salvaje un 37%  $\alpha$ -hélice, 11% de hojas  $\beta$  y 52% de regiones no estructuradas; resultados que concuerdan con los cálculos determinados a partir de la estructura cristalina de PtpA-wt (PDB ID:1U2P)(Madhurantakam et al. 2005).



**Figura 3.5. A)** Espectro de emisión del triptófano para la PtpA-wt y PtpA-D126A. **B)** Localización de los Trp en la estructura de PtpA-wt, obtenida mediante el programa Pymol (DeLano Scientific LLC, EUA), utilizando como modelo la PDB 1U2P correspondiente a la estructura cristalina de PtpA-wt. En rojo se indican los Trp presentes en la fosfatasa, en celeste la Cys catalítica y en amarillo el Asp 126 catalítico que en la proteína mutante se sustituyó por una Ala.

### 3.1.2.3. Caracterización funcional del mutante PtpA-D126A

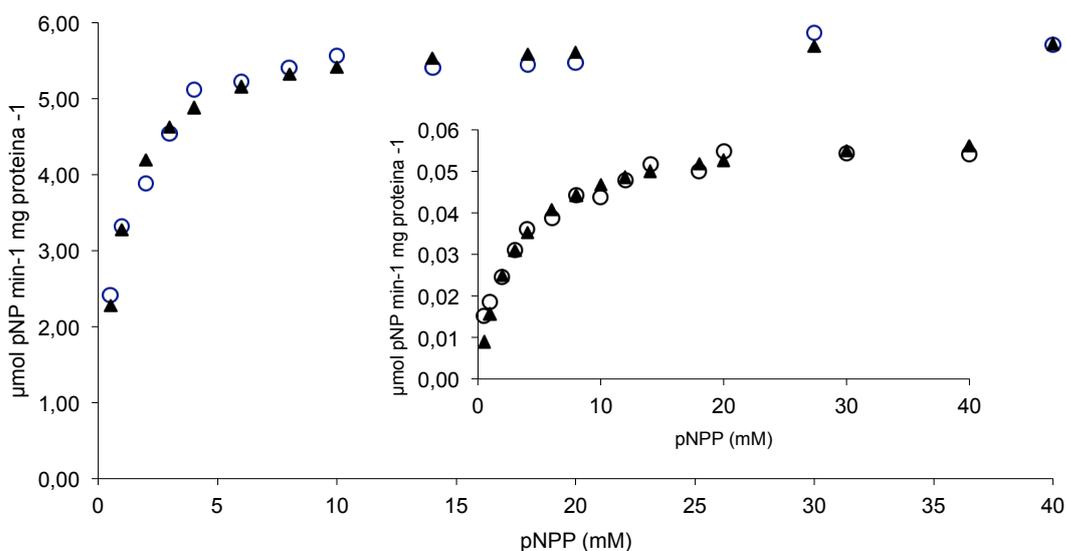
#### 3.1.2.3.1. Determinación de los parámetros cinéticos $K_m$ y $k_{cat}$

A continuación se determinaron los parámetros cinéticos de PtpA-D126A y se compararon con los obtenidos para PtpA-wt. El objetivo de esta etapa es evaluar el efecto de la mutación en los parámetros cinéticos de la enzima, utilizando como sustrato artificial el *p*-nitrofenil fosfato (*p*NPP). Dicho sustrato presenta un grupo fosfato en posición *para* con respecto al grupo nitro, cuya hidrólisis se puede seguir en el tiempo midiendo el aumento de la absorbancia a 405 nm, debido a la liberación del producto *para*-nitro fenol (*p*-NP), de color amarillo.

De acuerdo a la bibliografía, un mutante D/A óptimo para ser utilizado en la estrategia de ST, es de esperar tenga un valor de  $K_m$  similar a la proteína salvaje. Esto indicaría que la región involucrada en el reconocimiento del sustrato permanece sin grandes cambios, manteniéndose la afinidad por el mismo. Somos conscientes de las limitaciones de dicha afirmación ya que la evaluación se realiza con un sustrato artificial no proteico. Por otro lado, debido al rol del Asp en la catálisis es de esperar que el mutante presente una menor constante catalítica ( $k_{cat}$ ), tal como ha sido reportado para ésta y otras fosfatasa (Madhurantakam et al. 2008; Wu & Zhang 1996). Como describimos en la introducción, en el mecanismo catalítico de las PTPs, el grupo tiolato ( $-S^-$ ) de la Cys catalítica actúa como nucleófilo sobre el grupo fosfato unido a la Tyr del

sustrato. A continuación, el Asp catalítico (Asp 126 en PtpA) actúa como ácido, protonando el oxígeno del grupo tirosilo saliente, clivando el fosfato de la Tyr y formando el intermediario cisteinil-fosfato. Este mismo residuo de aspartato también actúa como base en la segunda etapa de la catálisis, que coordina una molécula esencial de agua, y promueve la hidrólisis del intermediario, liberando el grupo fosfato y regenerando la enzima libre. El Asp 126 es entonces crucial en la etapa limitante de la velocidad de la catálisis, y la mutación de este residuo es de esperar que cause una disminución en la  $k_{cat}$  de la fosfatasa. Sin embargo esta mutación se ha visto no causa una pérdida total de la actividad, ya que a la larga las moléculas de aguas pueden ir cumpliendo el rol ácido-base del aspartato eliminado (Madhurantakam et al. 2008).

En nuestro caso, las características esperadas para el mutante D/A se confirmaron, ya que la proteína de tres lotes de purificaciones independientes de PtpA-wt y PtpA-D126A presentaron valores de  $K_m$  para el sustrato pNPP que son del mismo orden ( $7.4 \pm 3.1$  mM y  $5.3 \pm 2.3$  mM, respectivamente). Por otro lado la  $k_{cat}$  para PtpA-D126A ( $0.04 \pm 0.02$  seg<sup>-1</sup>) fue 40 veces más baja que la observada para PtpA-wt ( $1.58 \pm 0.24$  seg<sup>-1</sup>) (Figura 3.6, Tabla 3.1).



**Figura 3.6.** Representación de la curva de Michaelis-Menten para un lote de purificación de PtpA-wt y PtpA-D126A. Los círculos blancos representan los datos experimentales y los triángulos negros representan la curva que mejor se ajusta a la ecuación de Michaelis-Menten, utilizada para determinar los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$ . La velocidad de reacción de PtpA-wt y PtpA-D126A (gráfico inserto) está expresada como  $\mu\text{moles pNP min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína.

**Tabla 3.1.** Parámetros cinéticos de PtpA-wt y PtpA-D126A de *M. tuberculosis*. Los valores corresponden a la media  $\pm$  desvío estándar de tres determinaciones independientes utilizando diferentes lotes de proteína purificada.

	<b>Vmax</b> ( $\mu\text{mol pNP min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	<b>k<sub>cat</sub></b> ( $\text{seg}^{-1}$ )	<b>K<sub>m</sub></b> (mM)
<b>PtpA-wt</b>	4.75 $\pm$ 0.71	1.58 $\pm$ 0.24	7.4 $\pm$ 3.1
<b>PtpA-D126A</b>	0.12 $\pm$ 0.08	0.04 $\pm$ 0.02	5.3 $\pm$ 2.3

Los valores de los parámetros cinéticos reproducen datos previamente reportados en la literatura para PtpA-D126A respecto a la proteína salvaje: un valor de  $K_m$  similar y una importante disminución en  $k_{cat}$  (36-veces) utilizando pNPP como sustrato (Madhurantakam et al. 2008). Estos resultados están de acuerdo con los datos reportados para otros mutantes D/A caracterizados para otras PTPs (Flint et al. 1997; Garton et al. 1996; LaMontagne et al. 1998). En cambio, Bach *et al.* reportaron que la mutación D126A causa una pérdida total de la actividad fosfatasa de PtpA de *M. tuberculosis* (Bach et al. 2008), y no una pérdida parcial de su función como es de esperar para este tipo de mutante, y tal como fue observado en nuestros ensayos (Tabla 3.1). Las diferencias con nuestros resultados seguramente se deben al uso de distintos procedimientos experimentales durante purificación del mutante, que llevan a la obtención de una proteína de calidad diferente. Las diferencias entre los procedimientos serán analizados en la discusión de la presente tesis.

***Por lo tanto, considerando todos los resultados obtenidos hasta ahora, podemos concluir que la disminución en la actividad del mutante de PtpA-D126A no se debe a grandes cambios conformacionales sino que es debida a la pérdida de contactos intramoleculares importantes involucrados en la catálisis, debido a la sustitución del Asp catalítico 126 por Ala (cambio de un grupo cargado carboxilo por un grupo no cargado metilo).***

### **3.1.2.3.2. Determinación del $pK_a$ de las Cys**

En general las Cys del sitio activo de las PTPs (Cys 11 en PtpA) presentan un  $pK_a$  menor (del orden de 5), respecto a una Cys libre o no catalítica ( $pK_a$  8.3). Esto se debe al entorno aminoacídico en el que se encuentra. En el caso de la Cys catalítica de las PTPs, ésta se encuentra estabilizada como tiolato ( $-S^-$ ) principalmente por la interacción con una serina conservada del sitio activo, lo cual favorece el ataque nucleofílico del P-Tyr sustrato (Pannifer et al. 1998; Madhurantakam et al. 2008). Basándonos en esta información resultó interesante evaluar si los  $pK_a$  de las Cys del mutante PtpA D126A eran similares a los obtenidos con la

proteína salvaje. Para ello utilizamos el método de determinación del  $pK_a$  por alquilación de las Cys con monobromobimano (mBBR) a diferentes pHs (Sardi et al. 2013). Previamente a la determinación del  $pK_a$ , nos aseguramos que las preparaciones de PtpA-D126A y PtpA-wt purificada contaran con un alto contenido de Cys no oxidadas, porcentaje que fue del orden de 60-80%, determinado mediante la dosificación de tioles (-SH) reducidos utilizando ditiopiridina. Esto es importante ya que la aparición de formas oxidadas de Cys (incapaces de reaccionar con el mBBR e irreversibles al ser tratadas con DTT) es un fenómeno no deseado que suele ocurrir durante el proceso de purificación en condiciones aerobias (Scopes 1994).

El método de determinación del  $pK_a$  por alquilación de las Cys con mBBR se basa en la formación de un aducto capaz de fluorescer a 482 nm. La formación del mismo puede ser seguida en función del tiempo, esto permite el cálculo de las velocidades iniciales de reacción para cada pH ensayado. La constante de velocidad de primer orden (k) se obtuvo realizando el cociente de la velocidad con la concentración de mBBR utilizada. Para la determinación del  $pK_a$  posteriormente se graficó k en función del pH, ajustando las curvas a la función correspondiente dependiendo de la cantidad de  $pK_a$  observados (Ver Anexo 3 Figura A3.1 y A3.2 para PtpA-wt y D126A, respectivamente). Se determinaron los puntos de inflexión en la curva, cada uno correspondiente a un  $pK_a$ , que se muestran en la Tabla 3.2. La PtpA posee tres cisteínas (Cys11, Cys16 y Cys53), siendo la Cys11 la catalítica. Por lo tanto, esperábamos observar al menos dos  $pK_a$ , uno de ellos del orden de 5, correspondiente a la cisteína catalítica y otro mayor, correspondiente a las demás cisteínas. Sin embargo observamos tres valores de  $pK_a$ , el más bajo podría corresponder al  $pK_a$  de la Cys catalítica, y los otros dos podrían corresponder a las otras Cys no catalíticas. Es conocido que la reactividad del tiolato puede ser diferente dependiendo del entorno, es decir puede variar con la presencia de otros residuos con cadenas laterales de  $pK_a$  bajo, capaces de desprotonarse tales como aspartato y glutamato. Esto podría generar una heterogeneidad en la proteína utilizada en el ensayo, causando una reactividad diferente del tiolato con el mBBR que podría explicar el  $pK_a$  adicional observado. Sería interesante realizar el mismo experimento utilizando el mutante en el cuál sustituimos la Cys catalítica por Ser (recientemente disponible en el laboratorio) para evaluar si con esta proteína detectamos sólo los  $pK_a$  más altos; y utilizar otro método de determinación de  $pK_a$  para interpretar mejor los valores obtenidos de  $pK_a$ . A pesar de esto, tal como se observa en la Tabla 3.2, los valores de  $pK_a$  obtenidos para las Cys de PtpA-D126A fueron similares a los obtenidos para la PtpA salvaje.

**Tabla 3.2.** Valores de  $pK_a$  determinados para PtpA-wt y PtpA-D126A.

$pK_a$ PtpA-wt	$pK_a$ PtpA-D126A
$pKa_1 = 4.90 \pm 0.33$	$pKa_1 = 4.73 \pm 1.78$
$pKa_2 = 6.19 \pm 0.52$	$pKa_2 = 7.08 \pm 1.85$
$pKa_3 = 8.55 \pm 0.48$	$pKa_3 = 10.03 \pm 0.65$

***En resumen, en esta primera etapa de la tesis se logró producir la proteína recombinante PtpA-D126A, la cual se obtuvo con un buen rendimiento y pureza, presentando características estructurales y funcionales que sugieren puede ser utilizada con éxito en la estrategia de ST.***

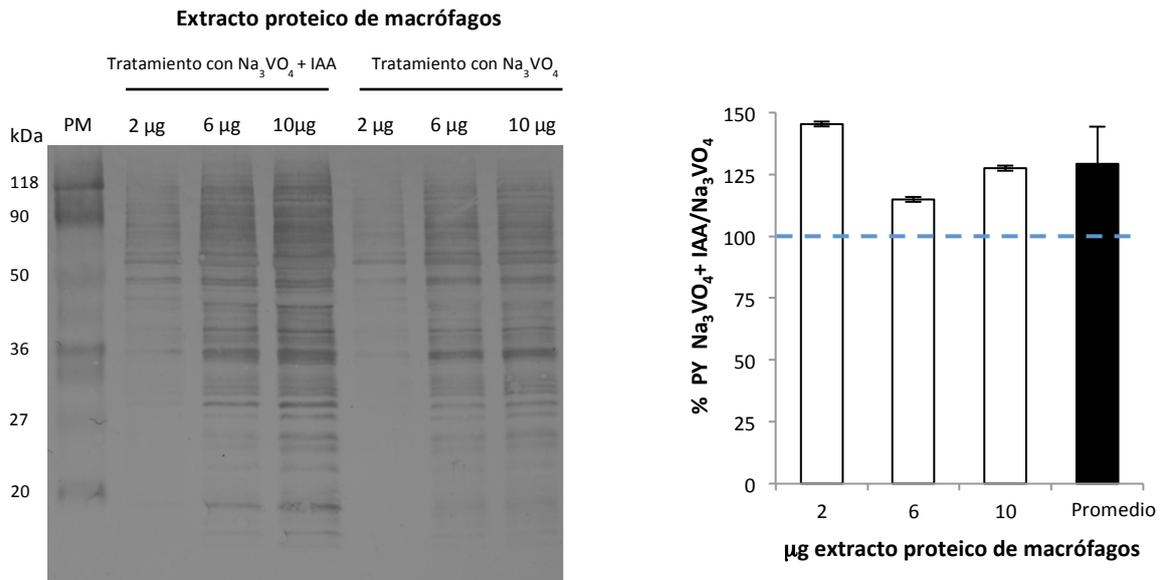
### **3.2. Caracterización de la interacción entre PtpA y los componentes del extracto de macrófagos**

Una vez realizada la caracterización bioquímica de PtpA-D126A, se procedió a preparar los extractos enriquecidos en proteínas solubles de macrófagos, a ser utilizados en los ensayos de aislamiento de los potenciales sustratos de PtpA. Luego, con la fosfatasa PtpA de *Mtb* y los extractos de proteínas de macrófago se realizaron experimentos de SPR para caracterizar la interacción entre la fosfatasa y los componentes del extracto, de forma de conocer cuáles serían las condiciones de trabajo adecuadas para los ensayos de *Substrate Trapping*.

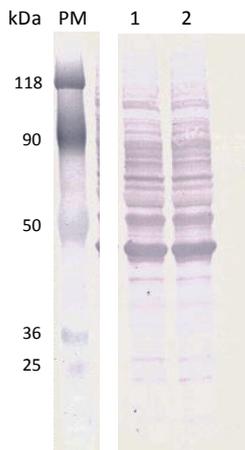
#### **3.2.1. Obtención de extractos de macrófagos derivados de la línea celular THP-1**

Se prepararon extractos de macrófagos derivados de la línea celular THP-1, en dos condiciones: sin estimulación y bajo activación por LPS. La activación con LPS se realizó con el objetivo de obtener un extracto de proteínas a partir de células que estuvieran en un estado de activación similar al que podría encontrarse en macrófagos infectados con *Mtb*. Como se describe en la metodología, en la preparación de estos extractos se intentó preservar la fosforilación de Tyr en las proteínas, mediante la inactivación reversible de las PTPs endógenas con el inhibidor competitivo ortovanadato de sodio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) y la inactivación irreversible con iodoacetamida (IAA). Es sabido que en ausencia de tratamiento con  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , el nivel de P-Y en los extractos celulares proteicos es indetectable (Buist et al. 2000).

En nuestro caso se comprobó que el tratamiento con IAA aumenta el nivel de P-Y en un 25%, respecto a la fosforilación detectada en extractos de macrófagos donde la P-Y fue preservada sólo con  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (Figura 3.7). Por otro lado, tal como se observa en la Figura 3.8 se obtuvo un perfil similar de proteínas fosforiladas con ambos extractos de macrófagos, activado con LPS y sin activar.



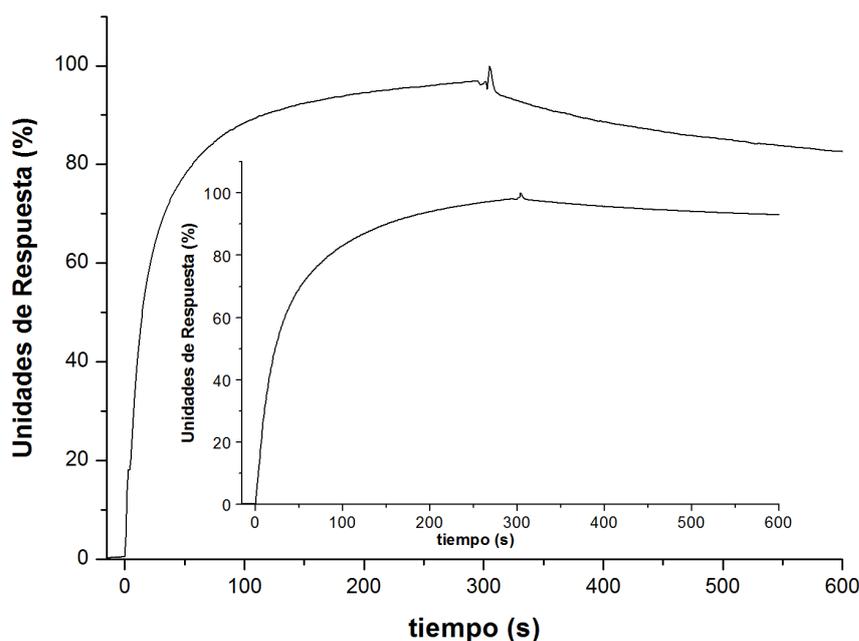
**Figura 3.7.** Inmunodetección de proteínas fosforiladas en Tyr en extractos de macrófagos enriquecidos en P-Y. Muestras conteniendo 2, 6 y 10  $\mu\text{g}$  de extracto de macrófagos tratados con  $\text{Na}_3\text{VO}_4 + \text{IAA}$  o con  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  se separaron por SDS-PAGE seguido de electrotransferencia y WB con un anticuerpo Anti-P-Tyr (Cell Signalling # 9411). El gráfico muestra la relación entre los niveles de P-Y (%) en el extracto de macrófagos tratado con  $\text{Na}_3\text{VO}_4 + \text{IAA}$  respecto al extracto tratado con  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ; esta relación se determinó en base a la cuantificación de las bandas por densitometría con las herramientas del GBOX ChemiSystem (SynGene).



**Figura 3.8.** Inmunodetección de proteínas fosforiladas en Tyr en extractos de macrófagos activados y sin activar con LPS (tratados con  $\text{Na}_3\text{VO}_4 + \text{IAA}$ ). Carril 1: extracto de macrófagos sin activar; carril 2: extracto de macrófagos activados con LPS. Muestras conteniendo 10  $\mu\text{g}$  de extracto se separaron por SDS-PAGE seguido de electrotransferencia y WB con un anticuerpo Anti-P Tyr (Invitrogen #136600).

### 3.2.2. Estudio de la interacción entre PtpA-D126A y las proteínas del extracto de macrófagos por resonancia plasmónica de superficie (SPR)

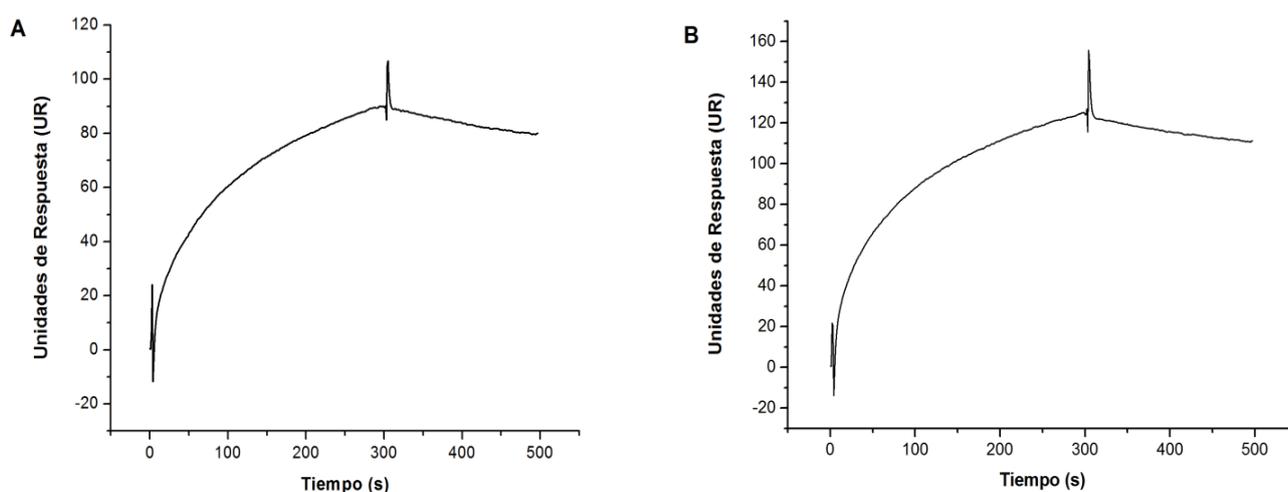
La interacción entre PtpA y el extracto de proteínas de macrófagos se analizó mediante la metodología de resonancia plasmónica de superficie (SPR). Esta metodología permite monitorear con alta sensibilidad y en tiempo real la interacción entre moléculas, sin la necesidad que las mismas estén marcadas. La fosfatasa se inmovilizó covalentemente a la superficie de un *sensor chip* CM5 para analizar entonces su capacidad de interactuar específicamente con componentes del extracto de macrófagos inyectados en la fase móvil. Como se explicó en la metodología (punto 2.7), la interacción entre componentes del extracto de macrófagos con la fosfatasa inmovilizada se evaluó mediante el análisis de sensogramas de asociación/disociación en tiempo real generados utilizando el software BIAevaluation 4.1 (GE Healthcare). En la Figura 3.9 se muestra un sensograma de asociación-disociación en tiempo real entre PtpA-D126A y el extracto de macrófagos control (sin activar con LPS). En el mismo se observó una respuesta que indica una asociación, seguida de una disociación lenta, lo que sugiere que el extracto contiene moléculas capaces de interactuar con PtpA-D126A.



**Figura 3.9.** Análisis por SPR de la interacción entre componentes del extracto de macrófagos control y la PtpA de *M. tuberculosis*. Se muestra un sensograma de asociación-disociación en tiempo real representativo de la interacción del extracto de macrófagos control con PtpA-D126A inmovilizada. Los extractos se aplicaron a una velocidad de flujo de 10  $\mu$ L/min durante 5 min y a una concentración del orden de 20  $\mu$ g/mL en buffer HEPES 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, Tween-20 0.005% y DTT 1 mM. Los valores se expresaron como porcentaje, correspondiendo el 100% a 90 UR. La imagen interior muestra el sensograma de asociación-disociación en tiempo real, del extracto de macrófagos con PtpA-wt inmovilizada. Estos sensogramas son representativos de los resultados obtenidos en más de tres réplicas analíticas y dos réplicas biológicas realizadas con diferentes lotes de PtpA-D126A purificada y extractos de macrófagos.

Este sensograma resultó comparable al obtenido cuando se inmovilizó PtpA-wt al chip CM5 (inserto de la Figura 3.9). Por tanto, este resultado constituye una evidencia más a favor de la utilidad del mutante PtpA-D126A para capturar potenciales sustratos de PtpA presentes en el extracto de macrófagos.

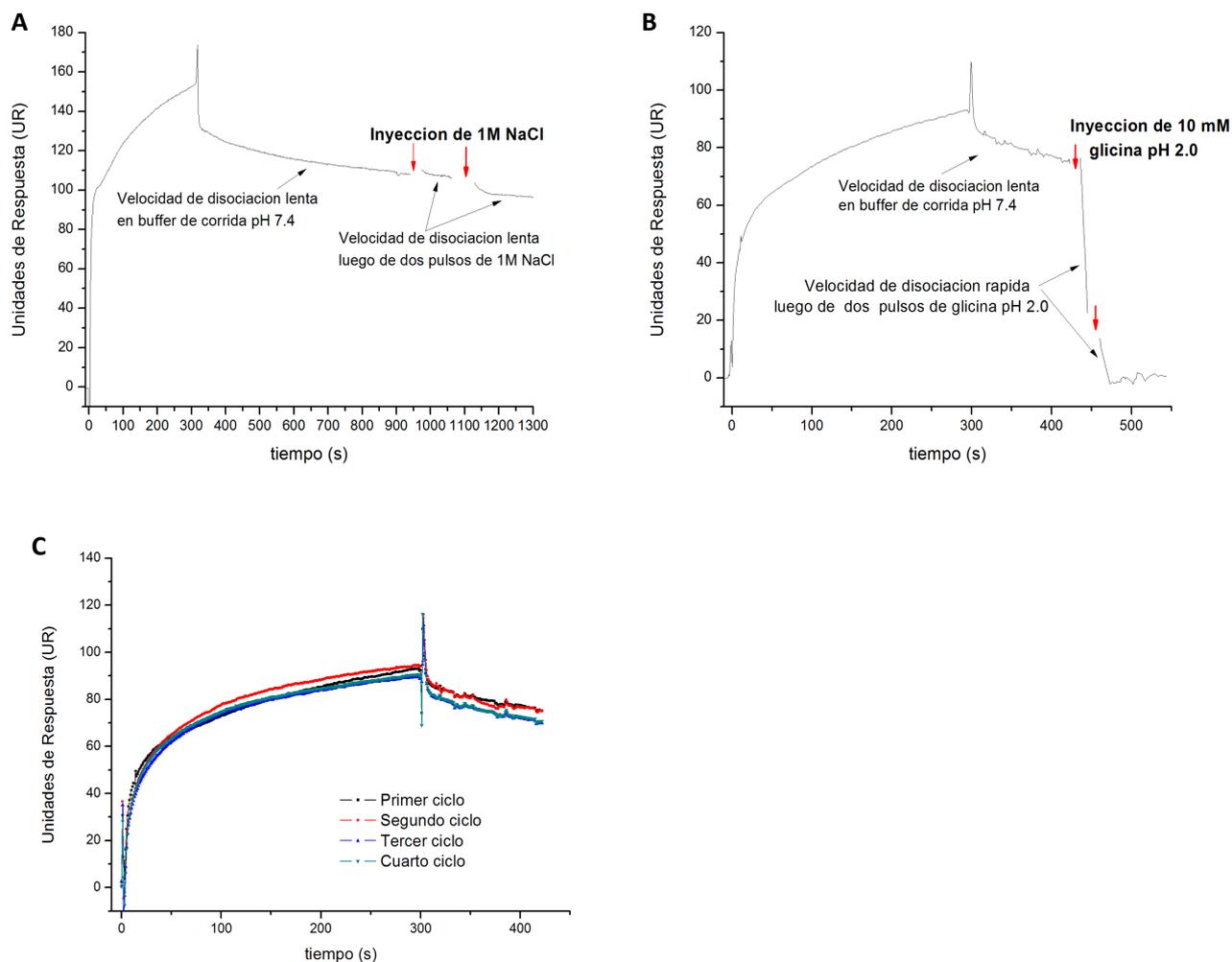
Se realizaron diversos ensayos de SPR para comparar la interacción entre PtpA-D126A con los diferentes extractos de macrófagos control y activados con LPS, y no se observaron diferencias sustanciales en el perfil de asociación-disociación de los mismos (Figura 3.10).



**Figura 3.10.** Comparación de la interacción entre PtpA-D126A y los componentes del extracto de macrófagos control (sin activar con LPS) (A) y activados con LPS (B). Se muestran los sensogramas de asociación-disociación en tiempo real, de PtpA-D126A (inmovilizada al chip) con los diferentes extractos de macrófagos. Los extractos se aplicaron a una velocidad de flujo de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  durante 5 minutos, a una concentración del orden de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en buffer HEPES 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, Tween-20 0.005% y DTT 1 mM.

Luego de detectar que existen componentes del extracto de macrófagos que están interaccionando con la PtpA, procedimos a evaluar la estabilidad de la interacción mediante la aplicación de pulsos de alta concentración salina o de una solución ácida que desciende bruscamente el pH. Como se muestra en la Figura 3.11, cuando se inyectaron dos pulsos sucesivos de NaCl 1.0 M, la velocidad de disociación permaneció similar a la observada antes del agregado de dicho pulso, demostrando que la interacción es resistente a la alta fuerza iónica (Figura 3.11 A). Este resultado está de acuerdo con datos en la bibliografía que sugieren que residuos hidrofóbicos a nivel de la entrada del sitio activo de PtpA, como el Trp 48, Tyr 128, Tyr 129, juegan un rol importante en definir la especificidad por el sustrato de PtpA

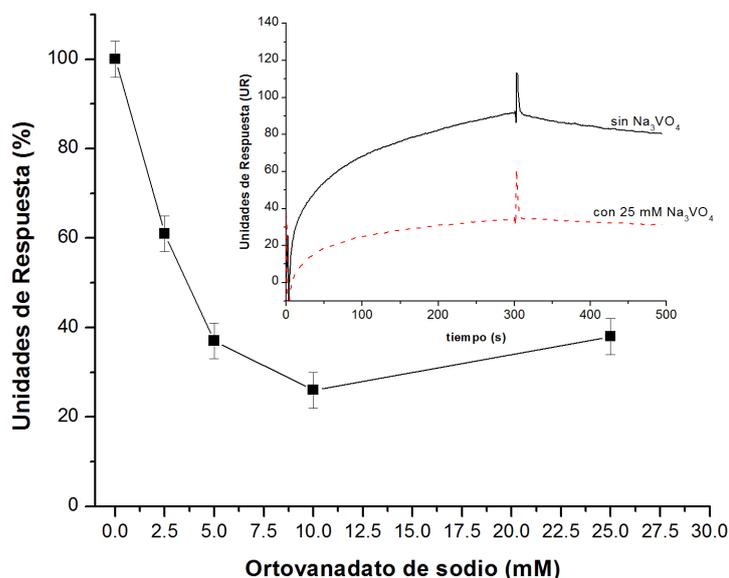
(Madhurantakam et al. 2005). Como era de esperar, pulsos de 10 mM glicina a pH 2.0 causaron una caída abrupta de la señal, acelerando la disociación hasta que ésta alcanza a la totalidad de los complejos (la señal alcanzó nuevamente la línea de base, Figura 3.11 B).



**Figura 3.11.** Estabilidad de la interacción entre PtpA D126A y los componentes del extracto de macrófagos a alta concentración salina, pero no al descenso de pH. Se muestran los sensogramas de asociación-disociación en tiempo real, obtenidos con PtpA-D126A inmovilizada al chip, inyectando el extracto de macrófagos control, a una velocidad de flujo de 10  $\mu$ L/min durante 5 minutos, a una concentración del orden de 20  $\mu$ g/mL en buffer de corrida (HEPES 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, Tween-20 0.005% y DTT 1 mM). **(A)** Efecto sobre la velocidad de disociación de la inyección de dos pulsos de 30 seg de 1.0 M NaCl. **(B)** Efecto sobre la velocidad de disociación de la inyección de dos pulsos de 40 seg de 10 mM glicina pH 2.0. **(C)** Curvas de asociación-disociación luego de 4 ciclos de inyección de extracto de macrófagos control a una velocidad de flujo de 10  $\mu$ L/min, concentración del orden 20  $\mu$ g/mL en el mismo buffer de corrida seguido de 10 mM glicina pH 2.0.

Para evaluar la posibilidad de reutilizar el chip sensibilizado con la PtpA-D126A se realizaron 4 ciclos que constan cada uno de la inyección del extracto de macrófagos seguido de dos inyecciones rápidas de glicina a pH 2.0. Como se muestra en la Figura 3.11 C el mutante inmovilizado de PtpA-D126A es estable, observándose el mismo nivel de respuesta luego de los 4 ciclos de regeneración con glicina a pH 2.0. En paralelo, se verificó que la incubación de PtpA en solución a pH 2.5 durante 1 o 5 minutos no afectó la actividad fosfatasa (evaluada a pH 7.4 utilizando el sustrato artificial *p*NPP).

A continuación se utilizó  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (inhibidor competitivo de las PTPs), para analizar si el sitio activo de la enzima estaba involucrado en la interacción entre PtpA-D126A y los componentes del extracto de macrófagos. La Figura 3.12 muestra que en presencia de una concentración igual o mayor a 2.5 mM del inhibidor, la interacción de la fosfatasa con los componentes del extracto de macrófagos disminuyó, y esta disminución fue mayor al aumentar la concentración del inhibidor. Estos resultados sugieren que el inhibidor está compitiendo con componentes del extracto por la unión con la PtpA, a través del sitio activo. Para completar estos estudios, realizamos también ensayos donde se inyectó primero el extracto de macrófagos, permitiendo la formación de los complejos, y luego se aplicaron pulsos con el inhibidor (25 mM). En este caso, el  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  fue incapaz de promover la disociación entre los componentes proteicos del extracto y la PtpA-D126A en los tiempos ensayados. Esto indicaría que una vez establecida la interacción del mutante PtpA D126A con los componentes del extracto de macrófagos, éstos son difíciles de desplazar con el inhibidor, sugiriendo una importante afinidad de la interacción establecida.



**Figura 3.12.** Efecto del  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  en la asociación de componentes del extracto de macrófagos a la PtpA-D126A. Los resultados se expresaron como porcentaje, considerando como 100% a las unidades de respuesta medidas sin el inhibidor, y los errores corresponden a réplicas experimentales. Gráfico inserto: sensores de asociación-disociación obtenidos mediante la inyección del extracto de macrófagos sin  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  y previamente mezclado con 25 mM de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ .

***En resumen, los análisis de SPR constituyeron una herramienta útil para detectar que existe interacción entre componentes del extracto de macrófagos y la PtpA. Logramos demostrar que existen componentes del extracto que interaccionan con la PtpA-wt y la PtpA-D126A, que dicha interacción involucra el sitio activo de la fosfatasa, y que es estable a pulsos de alta concentración salina pero no a pulsos de pH bajo. Esto nos permitió definir condiciones de lavado y elución para los ensayos posteriores de ST, que contribuyeron a reducir las uniones no específicas, favoreciendo el aislamiento de los potenciales sustratos de PtpA.***

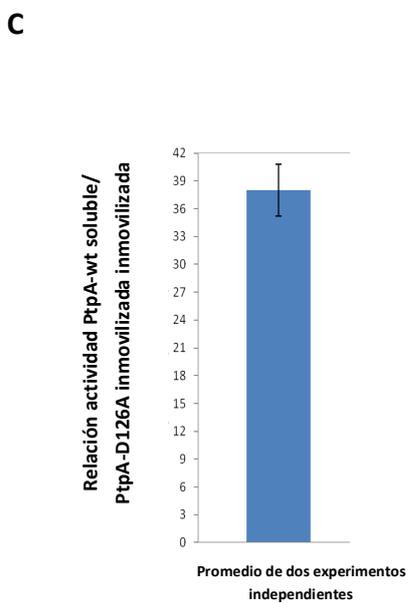
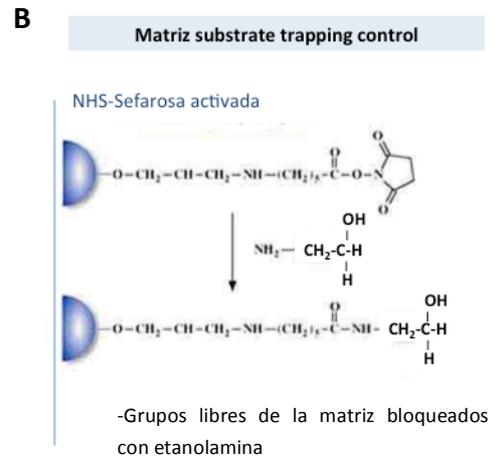
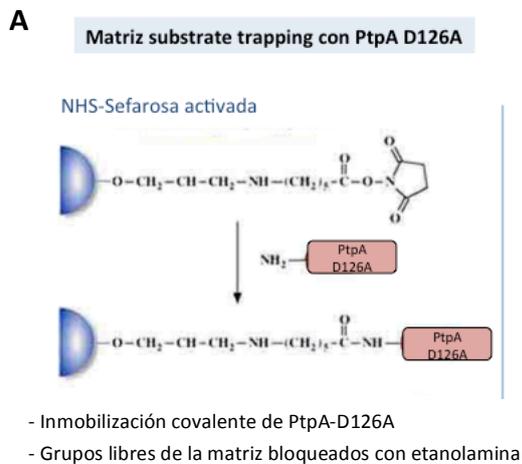
### **3.3. Identificación de potenciales sustratos eucariotas de PtpA de *Mtb***

#### **3.3.1. Preparación de la matriz para el ST**

Basándonos en los resultados obtenidos en los ensayos de SPR diseñamos una estrategia de ST para aislar potenciales sustratos de PtpA a partir de extractos de macrófagos enriquecidos en proteínas fosforiladas en Tyr. Como primer paso, la PtpA-D126A se inmovilizó covalentemente a una matriz de NHS-Sefarosa mediante la misma química de unión utilizada en los experimentos de SPR, es decir a través de los grupos  $\epsilon$ -amino de la fosfatasa. El rendimiento de inmovilización fue del 100%, no observándose proteína en el sobrenadante de inmovilización.

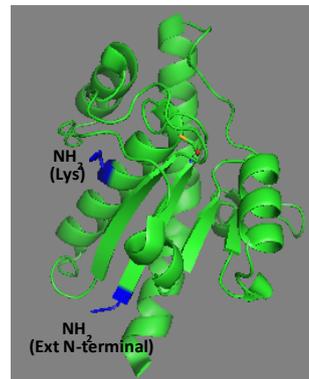
En paralelo, se preparó una matriz control, repitiendo el procedimiento con la misma cantidad de matriz pero sustituyendo a la PtpA-D126A por el buffer de inmovilización. Esta matriz permitió evaluar la unión inespecífica de proteínas del extracto de macrófago durante los ensayos de ST (Figura 3.13. A y B). Es importante notar que la preparación de las matrices con PtpA-D126A y control, implicó el bloqueo de los grupos reactivos remanentes de la matriz con etanolamina, etapa indispensable para minimizar la unión inespecífica de proteínas a la misma.

Toda la PtpA-D126A ofrecida a la matriz fue inmovilizada y es de esperar no distorsione la estructura de la proteína ya que como explicamos en la metodología ésta será uni o bi-puntual, debido a que PtpA cuenta con una única Lys, además del grupo N-terminal, por donde puede unirse a la matriz (Figura 3.13 D). Esto fue confirmado por la ausencia de pérdida significativa de la actividad fosfatasa luego de la inmovilización, resultado obtenido al comparar la actividad de una misma cantidad de proteína inmovilizada y en solución. Para ello tuvimos en cuenta que en condiciones de velocidad máxima, y utilizando el pNPP como sustrato la  $k_{cat}$  de PtpA-D126A es 40 veces menor que la  $k_{cat}$  de PtpA-wt, por lo que es de esperar que esta relación se mantenga cuando se comparan las actividades de la fosfatasa soluble (PtpA-wt) respecto a la fosfatasa inmovilizada (PtpA-D126A). Como se observa en la Figura 3.13 C esta relación o cociente entre la actividad de PtpA-wt respecto a la actividad de PtpA-D126A se mantuvo, confirmándose que no hubo pérdida de actividad durante la inmovilización.



**D** **His-tag-PtpA D126A**

MGSSHHHHHSSGLVPRGSVSDPLHVT FVCTGNICRSPMAEKMF A  
 QQLRHRGLGDAVRVTSAGTGNWHV GSCADERAAGVLR AHGYPTD  
 HR AAQVGTEHLAADLLVALDRNHARLLRQLGV EAARVRLRSFDR  
 SGT HALDVEAPYYGDHSDFEVFAVIESALPGLHDWVDERLARNGPS



**Figura 3.13.** Preparación de las matrices a ser utilizadas durante el ST con PtpA-D126A. **(A)** Diagrama mostrando la estrategia utilizada para la inmovilización covalente de PtpA D126A a la matriz de NHS-Sefarosa. **(B)** Matriz utilizada como control de interacción inespecífica (sin PtpA-D126A). **(C)** Relación o cociente entre la actividad de PtpA-wt soluble respecto a la actividad de PtpA-D126A inmovilizada, utilizando *p*NPP (30 mM) como sustrato artificial. **(D)** Secuencia de PtpA D126A mostrando en rojo la única lisina (K43) presente en la secuencia primaria y la estructura de dicha fosfatasa representada con el programa Pymol (DeLano Scientific LLC, EUA) señalando los dos grupos  $\epsilon$ -amino presentes en la proteína. Se destaca también en la figura la Cys catalítica de la fosfatasa, mostrando que se encuentra alejada del sitio de inmovilización.

### **3.3.2. Aislamiento e identificación de potenciales sustratos de PtpA mediante ST**

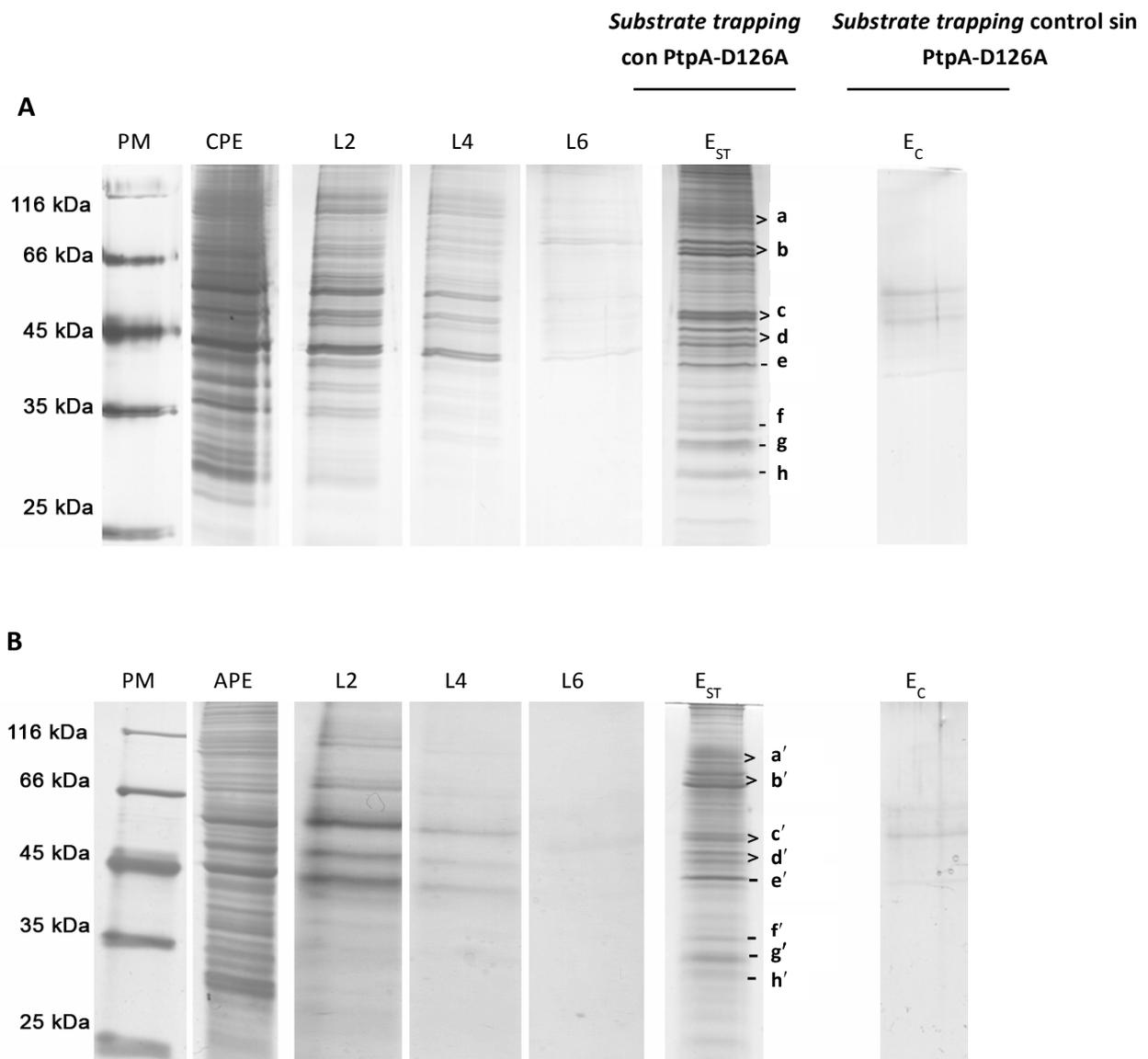
Una vez preparada la matriz con la PtpA-D126A inmovilizada, se realizó el ST tomando ventaja de la información obtenida por SPR sobre la interacción de la enzima con los componentes del extracto de macrófagos. Así, se incubó la matriz con dicho extracto por 1h a 4°C y se realizaron luego lavados con soluciones de alta fuerza iónica (0.5 M y 1 M NaCl), con el objetivo de eliminar las interacciones no específicas. La elución de los posibles interactores de PtpA-D126A presentes en el extracto de macrófagos se realizó de dos maneras diferentes, utilizando agentes fuertemente disociantes (el buffer de muestra del SDS-PAGE) o pH ácido.

#### **3.3.2.1. Elución con buffer disociante**

En primer lugar se utilizó el buffer que se utiliza en el SDS-PAGE para el tratamiento de las muestras (buffer muestra) para recuperar la mayor cantidad de proteínas asociadas a la matriz durante el ST. La Figura 3.14 muestra el análisis por SDS-PAGE de los lavados y las eluciones obtenidas en los ensayos de ST con PtpA-D126A, utilizando un extracto de macrófagos control (Figura A) y un extracto de macrófagos activado con LPS (Figura B).

Como podemos ver, luego de seis lavados de la matriz, casi no se detectaron proteínas en los geles teñidos con nitrato de plata (carril L6). En la fracción eluída con buffer muestra se observaron varias bandas en el gel (carriles E<sub>ST</sub>), y el patrón de distribución de bandas resultó muy similar para ambos extractos proteicos (carriles CPE y APE). Además, en ambas fracciones eluídas (carriles E<sub>ST</sub>) se observó un patrón de bandas visiblemente diferente al patrón de bandas observado en los extractos de macrófagos (carriles CPE y APE) utilizados en el ensayo y en los lavados (carriles L1-L6).

Por otro lado, en los ensayos control del ST, en los cuales el extracto de macrófagos se incubó con una matriz sin PtpA-D126A inmovilizada, se detectaron sólo unas pocas bandas en el eluato (carril E<sub>C</sub>). Tomadas en conjunto estas observaciones sugirieron que el método de ST eluyendo con buffer muestra funcionó, permitiendo obtener muestras enriquecidas en potenciales interactores de PtpA-D126A.



**Figura 3.14.** Análisis por SDS-PAGE de las muestras obtenidas en los ensayos de ST realizados: A) con extracto proteico de macrófagos control (CPE); B) con extracto proteico de macrófagos activados (APE). Las muestras se separaron en un gel al 15 % de acrilamida. Para el análisis de los extractos CPE y APE se sembraron 2  $\mu$ g de proteína total, mientras que para los lavados y eluciones del ST se sembró un volumen de 25  $\mu$ L de muestra. PM: marcador de peso molecular, L2: segundo lavado realizado con 10 mM Hepes pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% Tween 20, L4: cuarto lavado, adicionando 0.5 M NaCl, L6: último lavado, adicionando 1.0 M NaCl. E<sub>ST</sub> representa el pool de cuatro eluciones realizadas con buffer muestra de SDS-PAGE luego del ST con PtpA-D126A inmovilizada y E<sub>C</sub> el pool de las eluciones realizadas en el experimento control con la matriz sin PtpA-D126A inmovilizada. Las proteínas se visualizaron por tinción con nitrato de plata. Se indican los fragmentos de gel recortados en los que se logró identificar proteínas por MALDI-TOF-MS.

Para la identificación de los potenciales interactores se cortaron todas las bandas del carril correspondiente a la elución con buffer muestra ( $E_{ST}$ ) y a la elución del ST control ( $E_C$ ), y se analizaron las proteínas presentes por MALDI-TOF MS. En las bandas correspondientes a los ST con PtpA-D126A se identificaron un total de 11 proteínas eucariotas en 8 fragmentos de gel extraídos del carril  $E_{ST}$  (nombrados a-h y a'-h' en la Figura 3.14), mientras que no se identificaron proteínas en los restantes fragmentos del gel. Las proteínas identificadas se muestran en la Tabla 3.3. Analizando los resultados de dicha Tabla, podemos ver que el ST con PtpA-D126A permitió aislar prácticamente las mismas proteínas de macrófago, independientemente del estado de activación de la célula (ver primer columna, Tabla 3.3). En cambio, en los controles de ST (Fig 3.16 A y B, carril  $E_C$ ) no se pudo identificar ninguna proteína por MALDI-TOF MS. Sin embargo, utilizando una estrategia más sensible de espectrometría de masa (nano-LC MS) se detectaron numerosas proteínas que se unen a la matriz sin PtpA-D126A, entre ellas 4 de las 11 proteínas identificadas utilizando la matriz con PtpA-D126A inmovilizada (HS90, TBB5, TBA1C, ACTB). A pesar de que no podemos excluir la posibilidad de que algunas de estas cuatro proteínas hayan sido enriquecidas en forma específica durante el ST, éstas fueron excluidas de los siguientes análisis ya que también se unen a la matriz sin PtpA-D126A. Además, estas proteínas han sido categorizadas como proteínas abundantes y que se unen inespecíficamente a diferentes matrices (Trinkle-Mulcahy et al. 2008; Mellacheruvu et al. 2013).

Si tenemos en cuenta la identidad y función de los 7 candidatos restantes, podemos observar que la mayoría de las proteínas están relacionadas con el metabolismo energético de la célula. Éstas son 5 proteínas mitocondriales (ECHA, ATPA, SQRD, MPCP and CY1) y dos proteínas citosólicas (K6PP and HSPB1) (Tabla 3.3).

**Tabla 3.3.** Proteínas identificadas por MALDI-TOF-MS en las fracciones eluidas del ST con PtpA-D126A y el extracto de macrófagos control y activado con LPS.

Banda <sup>a</sup>	Proteína identificada	Código proteína	Masa (Da)	Mascot score <sup>b</sup>	No. de secuencias coincidentes <sup>b</sup>	No. de secuencias peptídicas <sup>b</sup>	Cobertura de secuencia <sup>b</sup> (%)	Secuencias peptídicas confirmadas por MS/MS
a/a'	<i>Heat shock protein HSP-90 beta</i>	HS90_HUMAN <sup>f</sup>	83242	134	8	7	13	IDIIPNPQER GVVDSIDLPLNISR
b/b'	<i>Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial</i>	ECHA_HUMAN	82947	127	21	16	28	TLQEVTVQLSQEAQR TVLGTPEVLLGALPGAG GTQR
	<i>6-phosphofructokinase, platelet type</i>	K6PP_HUMAN	85542	118	24	19	31	YLEEIIATQMR AIGVLTSGGDAQGMNAA VR
c/c'	<i>ATP synthase subunit alpha, mitochondrial</i>	ATPA_HUMAN	59714	128	10	9	26	EAYPGDVFYLHSR TGAIVDVPVGEELLGR EVAFAAQFGSDLDAAATQ QLLSR
	<i>Tubulin beta-5 chain<sup>c</sup></i>	TBB5_HUMAN <sup>f</sup>	49640	261	26	21	61	FPGQLNADLR AILVDLEPGTMDSVR ISEQFTAMFR
	<i>Tubulin alpha-1C chain<sup>d</sup></i>	TBA1C_HUMAN <sup>f</sup>	49863	163	18	16	47	AVFVDLEPTVIDEVR
d/d'	<i>Sulfide quinone oxidoreductase, mitochondrial</i>	SQRD_HUMAN	49929	188	22	19	49	IMYLSEAYFR IMYLSEAYFR+Oxid(M) YADALQEIQR GYWGGPAFLR
ele'	<i>Actin, cytoplasmic<sup>e</sup></i>	ACTB_HUMAN <sup>f</sup>	41710	82	4	4	15	SYELPDGQVITIGNER
f/f'	<i>Phosphate carrier protein, mitochondrial</i>	MPCP_HUMAN	39933	76	7	6	18	IQTQPGYANTLR
g'	<i>Cytochrome C1, mitochondrial</i>	CY1_HUMAN <sup>g</sup>	35399	77	3	2	9	AANNGALPPDLSYIVR+ Deamidated NQ
h/h'	<i>Heat Shock protein beta 1</i>	HSPB1_HUMAN	22768	167	5	5	29	LFDQAFGLPR LATQSNEIIPVTFESR

<sup>a</sup> El nombre de la banda corresponde al fragmento de gel indicado en los SDS-PAGE que se muestran en la Figura 3.15.

<sup>b</sup> Para cada proteína, el valor del score, número de secuencias coincidentes, y número de péptidos indicados corresponde al mayor valor obtenido a partir de los dos experimentos.

<sup>c</sup> TBB3\_HUMAN, TBB2A\_HUMAN and TBB4B\_HUMAN también fueron identificados con los mismos péptidos.

<sup>d</sup> TBA1A\_HUMAN, TBA1B\_HUMAN también fueron identificados con los mismos péptidos.

<sup>e</sup> ACTG\_HUMAN también fue identificada con los mismos péptidos.

<sup>f</sup> Proteínas identificadas en los ensayos de ST control sin PtpA-D126A inmovilizada utilizando una estrategia más sensible, Nano LC-MS.

<sup>g</sup> La proteína CY1\_HUMAN fue identificada únicamente en el ensayo de ST utilizando el extracto de macrófagos activado con LPS.

### 3.3.2.2. Elución a pH ácido

Una estrategia alternativa para la elución de los interactores de PtpA, fue el tratamiento a pH ácido (en base a la información obtenida por SPR sobre la interacción entre la fosfatasa y los componentes del extracto). Para ésto se aplicó una la disminución del pH a 2.5 y se recogieron las fracciones E1 a E7 las cuales se neutralizaron inmediatamente. En este caso, sólo se utilizó el extracto de proteínas de macrófagos sin activar. Al realizar la elución ácida de las proteínas retenidas por la PtpA-D126A se recuperó una cantidad mucho menor de proteínas que con la elución con buffer muestra; esto se reflejó en que no se detectaron bandas en las fracciones eluidas cuando se analizaron por SDS-PAGE utilizando tinción con nitrato de plata. Las fracciones fueron entonces digeridas con tripsina y los péptidos resultantes se identificaron mediante análisis por nano-LC MS. En este caso, tanto para el ST con PtpA-D126A como para el ST control, el análisis por espectrometría de masa se realizó sobre pools de eluciones sucesivas (E2+E3, E4+E5, E6+E7). Las proteínas identificadas en cada pool fueron similares, por lo cual se listaron en forma conjunta. Se descartaron luego aquellas proteínas que mostraron una interacción inespecífica con la matriz (identificadas a partir del análisis de los eluatos del ST control (Tabla 3.4). Los interactores potenciales se listan en la Tabla 3.5 y son el resultado del análisis de tres ensayos de ST realizados con lotes independientes de extracto de macrófagos sin activar y diferentes lotes de matriz con PtpA-D126A inmovilizada (réplicas biológicas).

La comparación de la Tabla 3.3 y 3.5 muestra que la alta sensibilidad del análisis por LC-MS/MS permitió identificar un número mayor de proteínas que el obtenido por análisis mediante SDS-PAGE y posterior MALDI-TOF MS. Además, resultó interesante que entre las proteínas que se lograron identificar aparecen las proteínas previamente identificadas (Tabla 3.3), así como otras subunidades de estas proteínas (ECHB, ATPB, ATPO, ATP5H).

Finalmente se realizó un ensayo de ST con el extracto de macrófagos activado con LPS utilizando la estrategia de elución ácida, con el objetivo de evaluar si se aislaban e identificaban proteínas diferenciales. La Tabla 3.6 muestra que al utilizar el extracto de macrófagos activados se aislaron la mayoría de las proteínas identificadas en el ensayo de ST con extracto no activado, con leves variaciones en los parámetros de espectrometría de masa (*score*, iones coincidentes, No. secuencias peptídicas). Es decir que en las condiciones de trabajo utilizadas no encontramos interactores potenciales de PtpA que estén asociados a macrófagos activados hacia un perfil inflamatorio, como se espera sería el fenotipo celular en la infección por *Mtb*.

**Tabla 3.4.** Proteínas identificadas por Nano-LC MS en los ensayos de ST control, sin PtpA-D126A inmovilizada. Esta lista representa las proteínas identificadas que se unen inespecíficamente a la matriz de NHS-sefarosa.

<b>Código proteína</b>	<b>Nombre de la proteína</b>
K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1
K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9
K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10
K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal
K2C6B_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 6B
K1C14_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 14
K1C16_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 16
K2C5_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 5
TBA1A_HUMAN	Tubulin alpha-1A chain
TBA1B_HUMAN	Tubulin alpha-1B chain
TBA1C_HUMAN	Tubulin alpha-1C chain
TBB4A_HUMAN	Tubulin beta-4A chain
TBB4B_HUMAN	Tubulin beta-4B chain
TBB5_HUMAN	Tubulin beta chain
TBB3_HUMAN	Tubulin beta-3 chain
ACTA_HUMAN	Actin, aortic smooth muscle
ACTB_HUMAN	Actin, cytoplasmic 1
ACTC_HUMAN	Actin, alpha cardiac muscle 1
ACTG_HUMAN	Actin, cytoplasmic 2
ACTH_HUMAN	Actin, gamma-enteric smooth muscle
ACTS_HUMAN	Actin, alpha skeletal muscle
HSP7C_HUMAN	Heat shock cognate 71 kDa protein
HS90_HUMAN <sup>f</sup>	Heat shock protein HSP-90 beta
VDAC1_HUMAN	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1
RS3_HUMAN	40S ribosomal protein S3
POTEF_HUMAN	POTE ankyrin domain family member F
POTEE_HUMAN	POTE ankyrin domain family member
TRY1/TRY2/TRY3/TRY6_HUMAN	Trypsin-1/ Trypsin-2/ Trypsin-3/ Trypsin-6
CDK4_HUMAN	Cyclin-dependent kinase 4
MESP2_HUMAN	Mesoderm posterior protein 2
EPCAM_HUMAN	Epithelial cell adhesion molecule
RECK_HUMAN	Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs

**Tabla 3.5** Proteínas identificadas por Nano-LC-MS en los experimentos de ST utilizando el extracto de proteínas de macrófago control sin activar.

Proteínas identificadas en tres réplicas biológicas de ST						
Proceso biológico <sup>a</sup>	Código de la proteína	Nombre de la proteína	Mascot score <sup>b</sup>	Masa (Da)	No. de iones coincidentes <sup>b</sup>	No. de secuencias peptídicas
Metabolismo lipídico, beta oxidación de ácidos grasos	ECHA_HUMAN	<i>Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial</i>	2422	82947	63	23
Oxidación del sulfuro de hidrógeno	SQRD_HUMAN	<i>Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial</i>	705	49929	28	10
Transporte de electrones, cadena respiratoria	ATPA_HUMAN	<i>ATP synthase subunit <math>\alpha</math>, mitochondrial</i>	531	59714	16	7
Glicólisis	K6PP_HUMAN	<i>6-phosphofructokinase, platelet type</i>	922	85542	47	15
	K6PL_HUMAN	<i>6-phosphofructokinase, liver type</i>	567	84964	20	9
Proteínas identificadas en dos réplicas biológicas de ST						
Metabolismo lipídico	GLCM_HUMAN	<i>Glucosylceramidase</i>	806	59678	19	12
	ECHB_HUMAN	<i>Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial</i>	211	51262	5	4
Transducción de señales	CAP1_HUMAN	<i>Adenylate cyclase-associated protein</i>	485	51869	12	6
	ZYX_HUMAN	<i>Zyxin</i>	232	61238	4	3
Transporte de electrones, cadena respiratoria	CY1_HUMAN	<i>Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial</i>	333	35399	11	4
	ATPB_HUMAN	<i>ATP synthase subunit <math>\beta</math>, mitochondrial</i>	274	56525	8	4
	ATPO_HUMAN	<i>ATP synthase subunit O, mitochondrial</i>	251	23263	6	4
	ATP5H_HUMAN	<i>ATP synthase subunit d, mitochondrial</i>	124	18480	3	3
Plegamiento, transporte y/o síntesis, de proteínas	GRP78_HUMAN	<i>78 kDa glucose-regulated protein or Heat shock 70 kDa protein</i>	929	72288	21	13
	GRP75_HUMAN	<i>75 kDa glucose-regulated protein or Heat shock 70 kDa protein 9</i>	199	73635	4	3
	CH60_HUMAN	<i>60 kDa heat shock protein, mitochondrial</i>	458	61016	8	7
	HSPB1_HUMAN	<i>Small heat shock protein Hsp25/27</i>	210	22768	4	3
	COPE_HUMAN	<i>Coatomer subunit epsilon</i>	131	34460	3	2
	EF1A1_HUMAN <sup>c</sup>	<i>Elongation factor 1-alpha 1</i>	258	50109	9	5
Unión a ácidos nucleicos	SSBP_HUMAN	<i>Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial</i>	312	17249	6	3

**Tabla 3.6.** Proteínas identificadas por nano LC-MS en los ensayos de ST utilizando el extracto de proteínas de macrófago activado con LPS. Comparación con los ensayos de ST utilizando el extracto control.

Proteínas identificadas en el ST con extracto activado y en tres réplicas biológicas de ST con extracto sin activar						
Proceso biológico <sup>a</sup>	Código de la Proteína	Nombre de la proteína	Mascot score	Masa (Da)	No. de iones coincidentes	No. de secuencias peptídicas
Metabolismo lipídico, beta oxidación de ácidos grasos	ECHA_HUMAN	<i>Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial</i>	1459	82947	60	19
Transporte de electrones, cadena respiratoria	ATPA_HUMAN	<i>ATP synthase subunit <math>\alpha</math>, mitochondrial</i>	802	59714	19	11
Oxidación del sulfuro	SQRD_HUMAN	<i>Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial</i>	318	49929	11	5
Glicolisis	K6PP_HUMAN	<i>6-phosphofructokinase, platelet type</i>	536	85542	12	7
	K6PL_HUMAN	<i>6-phosphofructokinase, liver type</i>	536	84964	12	7
Proteínas identificadas en el ST con extracto activado y en dos réplicas biológicas de ST con extracto sin activar						
Metabolismo lipídico, beta oxidación de ácidos grasos	GLCM_HUMAN	<i>Glucosylceramidase</i>	633	59678	17	8
	ECHB_HUMAN	<i>Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial</i>	393	51262	12	5
Transporte de electrones, cadena respiratoria	CY1_HUMAN	<i>Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial</i>	363	35399	13	5
	ATPB_HUMAN	<i>ATP synthase subunit <math>\beta</math>, mitochondrial</i>	335	56525	9	6
	ATPO_HUMAN	<i>ATP synthase subunit O, mitochondrial</i>	220	23263	5	3
	ATP5H_HUMAN	<i>ATP synthase subunit d, mitochondrial</i>	227	18480	6	3
Plegamiento, transporte y/o síntesis de proteínas	GRP78_HUMAN	<i>78 kDa glucose-regulated protein or Heat shock 70 kDa protein</i>	538	72288	13	8
	COPE_HUMAN	<i>Coatomer subunit epsilon</i>	222	34460	4	3
	HSPB1_HUMAN	<i>Small heat shock protein Hsp25/27</i>	393	22768	12	5
Unión a ácidos nucleicos	SSBP_HUMAN	<i>60 kDa heat shock protein, mitochondrial</i>	160	61016	2	2
		<i>Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial</i>	231	17249	5	3

En suma, al analizar todos los resultados obtenidos se observa que independientemente de la aproximación experimental utilizada para la elución y la identificación de las proteínas, en un total de cinco ensayos de ST utilizando extracto de macrófagos sin activar y dos ensayos utilizando el extracto de macrófagos activado, se identificaron sistemáticamente sólo cuatro proteínas (Tabla 3.7). Estas proteínas se identificaron con los scores más altos (entre 531 y 2411), un gran número de péptidos coincidentes (154), correspondientes a 69 secuencias peptídicas diferentes (Anexo 2). Tres de ellas cumplen su función en la mitocondria: la subunidad alfa (ECHA) de la proteína trifuncional (TFP), enzima clave de la beta oxidación de ácidos grasos; la sulfuro-quinona-oxido-reductasa (SQRD) enzima que degrada el sulfuro de hidrógeno, y la subunidad A (ATPA) de la ATP sintasa. La cuarta es una proteína citosólica, la 6-fosfofructoquinasa (K6PP), enzima clave en la regulación de la glucólisis. Llama la atención que este grupo de cuatro proteínas está involucrado directa o indirectamente con el metabolismo energético celular. En la sección siguiente se detallan algunas propiedades de cada uno de estos potenciales blancos de la PtpA de *Mtb* ya que esta información contribuyó a elaborar un marco conceptual diferente para la continuación del trabajo.

**Tabla 3.7.** Proteínas identificadas como posibles sustratos de PtpA

Proceso biológico <sup>a</sup>	Código proteína	Nombre de la proteína	Mascot score <sup>b</sup>	Masa (Da)	No. de iones coincidentes <sup>b</sup>	No. secuencias peptídicas
Metabolismo lipídico, beta oxidación de ácidos grasos	ECHA_HUMAN	<i>Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial</i>	2422	82947	63	23
Oxidación del sulfuro de hidrógeno	SQRD_HUMAN	<i>Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial</i>	705	49929	28	10
Transporte de electrones, cadena respiratoria	ATPA_HUMAN	<i>ATP synthase subunit alpha, mitochondrial</i>	531	59714	16	7
Glicólisis	K6PP_HUMAN	<i>6-phosphofructokinase, platelet Type</i>	922	85542	47	15

<sup>a</sup> Se muestra solo el proceso biológico principal de cada proteína, con evidencias publicadas, obtenido en UniProt (<http://www.uniprot.org>) database (Enero 2014) (The UniProt Consortium 2013)

<sup>b</sup> El valor del score, número de iones coincidentes, y secuencias peptídicas indicadas, es el mejor valor obtenido en las réplicas biológicas de ST realizadas con el extracto control.

**En resumen, utilizando el mutante PtpA D126A se identificaron cuatro proteínas como potenciales interactores y/o posibles sustratos de PtpA: ECHA, SQRD, ATPA y K6PP.**

### 3.3.3. Identidad de los potenciales sustratos de PtpA identificados

Las proteínas ECHA, ATPA y SQRD, identificadas como potenciales sustratos de PtpA de *Mtb*, son proteínas cuyos genes son nucleares, son sintetizadas en el citosol y luego transportadas a la mitocondria (Chacinska et al. 2009; Avadhani 2011). Interesantemente, en un trabajo reciente descrito en la introducción se observó que la tanto la ECHA, como la ATPA y la SQRD dejan de ser detectadas específicamente en la mitocondria de los macrófagos infectados con la cepa virulenta *Mtb* H37Rv, pero no en los infectados con una cepa avirulenta *Mtb* H37Ra (Jamwal et al. 2013). En dicho trabajo no se postula cuál pueda ser el factor o los factores de virulencia de *Mtb* responsables de dicho efecto. Teniendo en cuenta que estas proteínas fueron aisladas e identificadas en nuestro trabajo como potenciales sustratos de PtpA y que esta última ha sido localizada en el citosol de los macrófagos infectados (Cowley et al. 2002), surge como hipótesis que PtpA pueda ser el factor de virulencia responsable de desfosforilar estas proteínas, alterando su actividad y/o localización mitocondrial.

La subunidad  $\alpha$  (ECHA) de la proteína trifuncional humana TFP(ECHA/ECHB) es el candidato a sustrato identificado con el *score* más alto. La TFP es un complejo multienzimático formado por 4 subunidades alfa (ECHA, conocida también como HADHA) y 4 subunidades beta (ECHB o HADHB) que se asocia a la membrana interna mitocondrial (Fould et al. 2010).-La ECHA cataliza 2 de las 4 reacciones de la vía de oxidación de ácidos grasos denominada beta oxidación, presenta dos dominios, uno con actividad enoil-CoA-hidratasa y otro con actividad beta-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa. La ECHA humana aún no ha sido cristalizada pero existen estructuras para sus homólogos bacterianos. La subunidad ECHB posee la actividad 3-cetoacil-CoA tiolasa. La TFP (ECHA/ECHB) juega un rol clave en la beta-oxidación, vía que provee de electrones a la cadena de transportes de electrones, para la síntesis de energía en forma de ATP por fosforilación oxidativa (Eaton et al. 2000). En cuanto a la regulación de su actividad por fosforilación/desfosforilación, la ECHA/ECHB humana ha sido reportada como fosforilada en Tyr en la base de datos online PhosphoSitePlus (Hornbeck et al. 2012), pero no existen evidencias aún de tal regulación a nivel de la actividad enzimática. Es importante destacar que la ECHB fue identificada en 4 de los 6 ensayos de ST realizados.

La sulfuro quinona oxidoreductasa (SQRD) humana constituye también un candidato interesante como sustrato de la PtpA, ya que participa en el metabolismo celular y en las vías antimicrobianas del macrófago (Brito et al. 2009) (Goubert et al. 2007)(Cooper & Brown 2008) (Filipovic et al. 2012). La SQRD es una proteína que se asocia a la membrana interna mitocondrial. Esta enzima cataliza la oxidación del sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) producto del metabolismo de aminoácidos que contienen azufre. Los electrones son transferidos a la cadena respiratoria, y existen evidencias que muestran que la oxidación de H<sub>2</sub>S está acoplada a la síntesis de ATP (Goubert et al. 2007). Además, la oxidación de H<sub>2</sub>S por la SQRD contribuye a mantener los niveles de H<sub>2</sub>S por debajo de los niveles tóxicos, que de otra forma inhibirían la citocromo oxidasa (complejo mitocondrial IV), interrumpiendo la cadena respiratoria (Cooper &

Brown 2008). Por otro lado, en macrófagos inflamatorios la acumulación de H<sub>2</sub>S contribuye en disminuir los efectos antimicrobianos y pro-apoptóticos del óxido nítrico, como resultado de la reacción de H<sub>2</sub>S con peroxinitrito (Filipovic et al. 2012). Existen estructuras para varios homólogos bacterianos y en solución podría estar como monómero, dímero o trímero (Cherney et al. 2012). Sin embargo, la estructura de la SQRD humana no ha sido reportada aún. Por otro lado, no existen aún en la literatura información acerca de si la fosforilación/desfosforilación modula la actividad/localización de la SQR.

La subunidad alfa (ATPA) forma parte del dominio F<sub>1</sub> de la ATP sintasa mitocondrial humana (ATP sintasa o Complex V). El dominio F<sub>1</sub> se ubica hacia la matriz mitocondrial y está formado por 3 subunidades  $\alpha$  y tres subunidades  $\beta$  no membranales, y las subunidades  $\gamma$ ,  $\delta$ , y  $\epsilon$  que constituyen el eje central de la ATP sintasa que se conecta con el dominio membranal F<sub>0</sub>. El dominio F<sub>0</sub> se encuentra unido a la membrana mitocondrial interna y contiene las subunidades a, b, c, d, F6 y otras subunidades asociadas. La ATPA es un componente estructural clave del dominio catalítico F1 (Jonckheere et al. 2012) (Beke-Somfai et al. 2013). Se ha reportado la estructura cristalina de la ATPA bovina, que presenta alta homología con la humana. Aunque no se ha reportado fosforilación en Tyr para la ATPA, si se ha reportado para otras subunidades del complejo (Di Pancrazio et al. 2006). Es importante destacar que en 3 de 4 ensayos de ST también se identificaron las subunidades  $\beta$  del dominio F<sub>1</sub>, y las subunidades O y d del dominio F<sub>0</sub>.

La 6-fosfofructoquinasa humana (K6PP o PFK), es la única proteína identificada como potencial sustrato de PtpA que no actúa en la mitocondria, sino que actúa en el citosol. La PFK cataliza la conversión irreversible de fructosa 6-fosfato y ATP a fructosa 1,6-bisfosfato y ADP, la etapa de control más importante de la glucólisis en mamíferos (Evans et al. 1981; Schöneberg et al. 2013). Recordamos que en esta vía se producen dos moléculas de ATP y que el piruvato generado a partir de la oxidación de la glucosa es capaz de entrar a la mitocondria (si existe demanda de energía) donde es transformado en acetil-CoA y posteriormente oxidado en el ciclo de Krebs, suministrando así más electrones para alimentar la cadena de transporte de electrones para aumentar así la síntesis de ATP. El ATP actúa como inhibidor alostérico de dicha enzima, lo que implica que una carga energética alta disminuye la actividad de esta vía metabólica y en estas condiciones el piruvato es utilizado en la síntesis de glucosa la cuál es almacenada en forma de glucógeno. La estructura de la PFK humana ha sido reportada recientemente (Kloos et al. 2015). Las PFK eucariotas forman homo y heterotetrámeros, que muestran tendencia a agregarse en grandes oligómeros. En mamíferos existen en tres tipos de isoenzimas (de músculo, de hígado y de plaquetas) que muestran una expresión diferencial según el tejido. Se ha reportado que la PFK es regulada también por modificación covalente, por fosforilación en el dominio C terminal, y esto afecta su grado de oligomerización y la interacción con otras proteínas (Schöneberg et al. 2013; Harrahy et al. 1997; Cai et al. 1997). Aunque se ha reportado fosforilación en Ser y Tyr, el sitio específico de fosforilación en la PFK

humana aún no se conoce (Zancan & Sola-Penna 2005; Coelho et al. 2007; Coelho & Sola-Penna 2013).

***La hipótesis planteada luego del análisis de los antecedentes existentes para los candidatos a sustrato identificados (ECHA, ATPA, PFK, SQRD), sugiere que PtpA puede ser el factor de virulencia responsable de desfosforilar estas proteínas. Abordar dicha hipótesis requiere realizar la validación in vitro de la interacción ente estos candidatos y PtpA, así como realizar la demostración de que son desfosforilados por la PtpA de Mtb.***

### **3.4. Hacia una validación *in vitro* de los candidatos a sustratos identificados**

La información generada sobre los posibles sustratos de la PtpA en los macrófagos es valiosa, pero es sólo un primer paso para establecer si estas proteínas se comportan como sustratos de la enzima, siendo necesaria su validación. Esta validación tendría al menos dos niveles diferentes. En primer lugar, en un contexto *in vitro*, que permita verificar la interacción de la enzima con el sustrato de interés y los efectos de dicha interacción sobre el sustrato (desfosforilación). En segundo lugar, sería necesario verificar si esta interacción ocurre en el contexto de la infección. En el marco de esta tesis pudimos abordar solamente el análisis *in vitro*. La estrategia elegida para la validación de los potenciales sustratos consistió en purificarlos a partir de los extractos de macrófagos, y confirmar si éstos interactúan con la fosfatasa PtpA de *Mtb*, evaluando si esta interacción involucra el sitio activo de la fosfatasa. Por último se analizó si la fosfatasa era capaz de desfosforilar el candidato a sustrato.

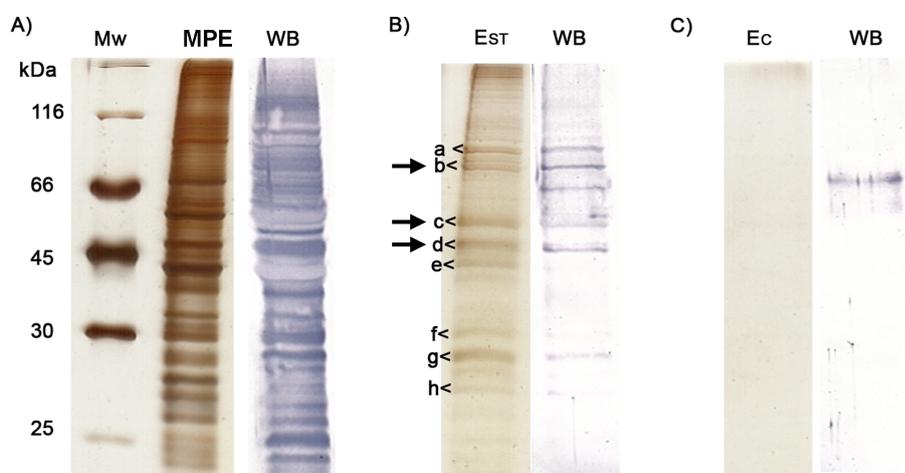
En forma previa a esta validación, resultó pertinente examinar el nivel de fosforilación de los sustratos identificados, pero este análisis no fue posible de llevar adelante con precisión dado que no hay disponibles en el mercado anticuerpos específicos para motivos P-Tyr en las proteínas humanas identificadas. De todas maneras, realizamos un análisis de la presencia de motivos P-Tyr en las bandas en las cuales se identificaron estos potenciales sustratos de PtpA, como una aproximación en la búsqueda de evidencias de la presencia de estos motivos fosforilados.

#### **3.4.1. Evaluación preliminar de la fosforilación en tirosina de los potenciales sustratos de PtpA**

Los candidatos a sustratos de PtpA, recordamos fueron aislados a partir de extractos de macrófagos donde se preservó la fosforilación en Tyr mediante la inactivación reversible e irreversible de las PTPs con Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> y IAA, respectivamente. Esta etapa de preservación de los

motivos P-Tyr fue esencial porque cuando se realizó el ensayo de ST con un extracto de macrófagos preparado sin tratar con IAA, sólo se aislaron 2 de los 4 posibles candidatos y fueron identificados con un score mucho más bajo (ECHA, score 62 y SQRD, score 266). (Ver Anexo 5). Esta observación indicaría que la interacción entre la enzima y su sustrato dependió del nivel de fosforilación en Tyr de los componentes del extracto.

Por otro lado, tal como se describió en el punto 3.1.2.3., PtpA-D126A posee una actividad fosfatasa muy baja en comparación con la PtpA wt, por lo tanto es posible que luego del ST las proteínas aisladas no estén totalmente desfosforiladas. De acuerdo con esto, el análisis por *western blot* utilizando un anticuerpo anti P-Tyr demostró la presencia de residuos fosforilados en Tyr en las bandas en las que fueron identificados los potenciales candidatos a sustratos: banda b (ECHA y K6PP), banda c (ATPA) y banda d (SQRD) (Figura 3.15).



**Figura 3.15.** Análisis de la presencia de motivos P-Tyr en los extractos de macrófagos y los eluatos obtenidos por ST. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE y se detectaron los motivos P-Tyr por *western blot* (WB). Las muestras se sembraron por duplicado en un gel al 15% de acrilamida. Una parte del gel se electrotransfirió a membrana de nitrocelulosa y se realizó un WB con un anticuerpo anti P-Tyr (Invitrogen) y un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a FA; la otra parte del gel se reveló mediante tinción con nitrato de plata. (A) extracto proteico de macrófagos (MPE) y su respectivo WB (5  $\mu$ g de extracto/carril); (B) fracción eluída con buffer muestra luego del ST realizado con PtpA-D126A ( $E_{ST}$ ) y su respectivo WB (14  $\mu$ L de eluato/ carril). Las letras a-h corresponden a las bandas que fueron recortadas del gel, y se indican con una flecha aquellas donde se identificaron los posibles candidatos a sustrato por MALDI-TOF MS (Tabla 3.2); (C) fracción eluída en el ST control utilizando la matriz sin PtpA-D126A inmovilizada ( $E_c$ ) y su respectivo WB (14  $\mu$ L de eluato/carril). La señal P-Tyr observada en este WB del ST control corresponde a un componente minoritario cuyos niveles en la muestra no permitieron su revelado por tinción con plata. Además, su altura no coincide con la de las bandas que contienen a los candidatos de interés, por lo cual no afecta el objetivo del análisis.

Como alternativa al análisis por *western blot*, se intentó la identificación por espectrometría de masa, pero no se logró detectar péptidos fosforilados en las proteínas de interés. Existen factores que complican usualmente la identificación de fosfopéptidos en mezclas complejas

utilizando nHPLC-MS/MS. En el análisis por MS estos factores incluyen, el hecho que la señal de los fosfopéptidos presentes en mezclas complejas es generalmente baja, debido a la poca capacidad de desorción/ionización de las especies cargadas negativamente, la tendencia a sufrir fragmentación *in source*, y al efecto de supresión de iones inducido por la presencia de péptidos no fosforilados predominantes. Durante el análisis por MS/MS la liberación del grupo fosfato es la principal fragmentación, a expensas de la ruptura del enlace peptídico, resultando en espectros MS/MS de menor calidad y menor confiabilidad en la identificación de espectros de fosfopéptidos (Mann et al. 2002; Dephoure et al. 2013). Por lo tanto, no es sorprendente que los péptidos conteniendo P-Tyr no hayan sido detectados en los ensayos de MS realizados.

Por otro lado, como se muestra en la Tabla 3.9, todos los posibles sustratos de PtpA identificados contienen residuos Tyr en la secuencia completa, y algunas de ellas están anotadas como fosforiladas en la base de datos online PhosphoSitePlus la cual recoge la información de los residuos fosforilados identificados principalmente en experimentos de espectrometría de masa (Hornbeck et al. 2012).

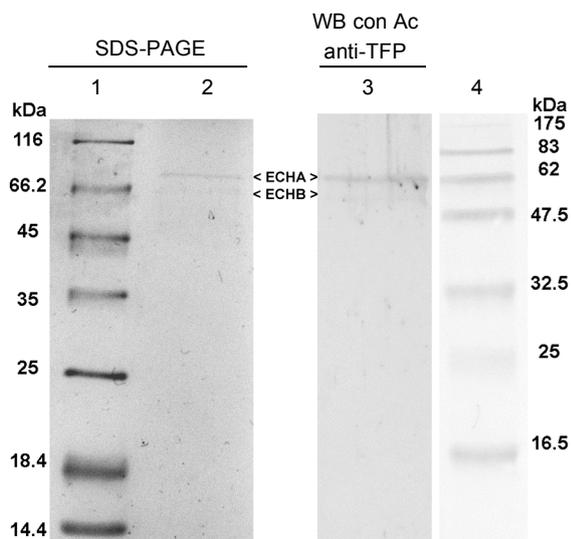
**Tabla 3.9.** Residuos de Tyr y P-Tyr en los potenciales sustratos identificados

Código de acceso	Nombre	Péptido señal <sup>a</sup>	Tyr en el péptido señal	Tyr en la secuencia completa
ECHA_HUMAN	<i>Trifunctional enzyme subunit alfa</i>	>sp P40939 1-35 MVACRAIGILSRFSAFRILRSR GYICRNFTGSSALL	Y24	Y24, Y43, Y158, Y239, Y271, Y283, Y298, Y320, Y343, Y435, Y499, Y546, Y637, Y639, <b>Y724</b> , Y736, Y740, Y762
SQRD_HUMAN	<i>Sulfide quinone oxidoreductase</i>	>sp Q9Y6N5 1-66 MVPLVAVVSGPRAQLFACLLR LGTQQVGPLQLHTGASHAAR NHYEVLVLGGSGGITMAAR MKRK	Y44	Y44, Y82, Y138, Y140, <b>Y151</b> , Y170, Y210, Y215, Y242, <b>Y259</b> , Y289, Y228, Y373, Y376, Y385, Y395, <b>Y415</b> , Y426, Y434
ATPA_HUMAN	<i>ATP synthase subunit alpha</i>	>sp P25705 1-43 MLSVRVAAAVVRRALPRRAGL VSRNALGSSFIAARNFHASNT HL	N	<b>Y243</b> , <b>Y246</b> , Y271, Y287, Y291, <b>Y299</b> , Y311, Y321, <b>Y337</b> , <b>Y343</b> , Y380, Y401, <b>Y440</b> , Y476, Y489, Y495
K6PP_HUMAN	<i>6-phosphofructokinase platelet type</i>	NA	NA	Y52, Y58, Y61, Y56, Y162, Y164, Y223, Y298, Y394, <b>Y447</b> , <b>Y487</b> , Y512, <b>Y586</b> , Y589, Y604, <b>Y645</b> , <b>Y651</b> , <b>Y654</b> , Y764, Y768

<sup>a</sup> Extraído de la fuente online UniProt (The UniProt Consortium 2013) o predicho con MitoProt II (Claros & Vincens 1996). En negrita, residuos tirosina anotados hasta el momento como fosforilados en la base de datos online PhosphoSitePlus (<http://www.phosphosite.org>) (Hornbeck et al. 2012). N: ninguna tirosina en el péptido señal mitocondrial. NA: no aplica pues no contiene péptido señal.

### 3.4.2. Validación de la TFP humana como sustrato de PtpA de *Mtb*

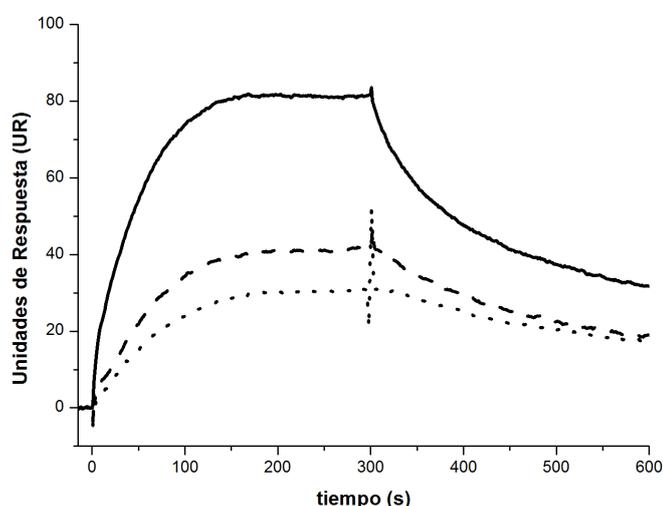
Como estrategia para obtener los potenciales sustratos de PtpA decidimos utilizar anticuerpos comerciales para purificarlos mediante inmunoprecipitación a partir de extractos de macrófagos humanos. En primer lugar, se utilizó un anticuerpo anti-TFP humana (ECHA/ECHB) para purificar la TFP (ECHA/ECHB). El análisis del inmunoprecipitado por SDS-PAGE con tinción con Coomassie coloidal mostró en la muestra obtenida dos bandas de masa molecular acorde a la de las subunidades alfa (ECHA) y beta (ECHB) de la TFP (Figura 3.16). Se analizó además la fracción inmunoprecipitada mediante *western blot* con el anticuerpo anti-TFP (ECHA/ECHB), y se confirmó la presencia de las dos subunidades de la enzima. La identidad de las mismas fue confirmada posteriormente mediante análisis de la fracción inmunoprecipitada por nano-LC/MS (Ver Anexo 6). La cantidad de proteína obtenida fue del orden de 300 ng/500 µg extracto de macrófagos.



**Figura 3.16.** Inmunodetección de TFP (subunidades ECHA y ECHB). A la izquierda se observa el análisis por SDS-PAGE (15% acrilamida) y tinción con Coomassie coloidal: marcador de PM (carril 1) y muestra enriquecida en TFP obtenida en la inmunoprecipitación (aproximadamente 20 ng, carril 2). A la derecha, se muestra el resultado del análisis de la misma fracción por WB utilizando el anticuerpo anti TFP (ECHA/ECHB) y revelando con un anticuerpo secundario anti-Ig de ratón conjugado a fosfatasa alcalina (carril 3) y marcador de PM preteñido (carril 4)

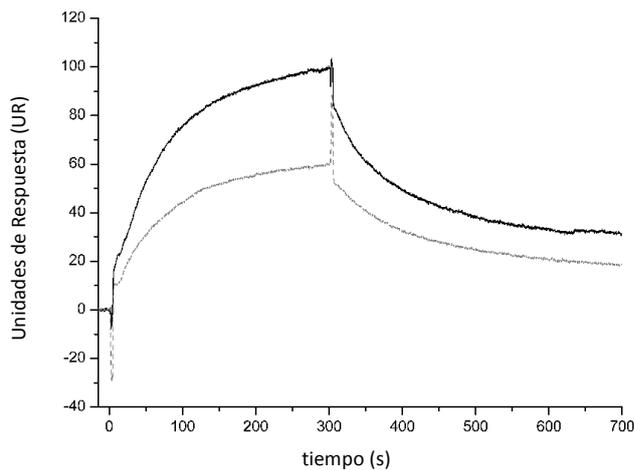
Para confirmar la interacción de PtpA de *Mtb* con la TFP inmunopurificada se realizaron ensayos de SPR, en los cuales inmovilizamos covalentemente la TFP al *sensor chip* y no la PtpA.

Esto se debió a la baja cantidad de TFP que disponíamos para los ensayos, y resultó un diseño experimental diferente que el utilizado en los ensayos de SPR realizados con la PtpA y los extractos de macrófagos, en donde se inmovilizó la PtpA. De todos modos, inmovilizar la TFP en lugar de la PtpA también resultó interesante ya que nos permitió evaluar la interacción inversa, es decir entre la TFP inmovilizada y la PtpA en solución. Los sensogramas de asociación/diseociación que se muestran en la Figura 3.17 confirmaron que la PtpA-D126A es capaz de interactuar con la TFP. Por otro lado, se observó que al inyectar la PtpA junto al inhibidor competitivo  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  disminuyó el nivel de la interacción (en UR), y que dicha disminución dependió de la dosis de inhibidor utilizada. En conjunto estos resultados sugirieron que la interacción de la TFP con la PtpA involucra el sitio activo de la fosfatasa.



**Figura 3.17.** Sensogramas de asociación/diseociación en tiempo real de PtpA-D126A con TFP inmovilizada. La línea continua representa el sensograma obtenido al inyectar la PtpA en ausencia de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ . La línea discontinua y la línea punteada representan el sensograma obtenido al inyectar la PtpA en presencia de 2.5 mM y 5 mM de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  respectivamente. La PtpA-D126A fue inyectada a 5  $\mu\text{M}$ , diluída en buffer de corrida a 25°C, durante 5 min y con un flujo de 30  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

Por otro lado, realizamos nuevos ensayos de SPR para evaluar la interacción de la TFP con la PtpA-wt, inyectando dos concentraciones diferentes de PtpA-wt. La Figura 3.18 confirma que al igual que el mutante PtpA-D126A, la fosfatasa PtpA-wt interactúa con la TFP.



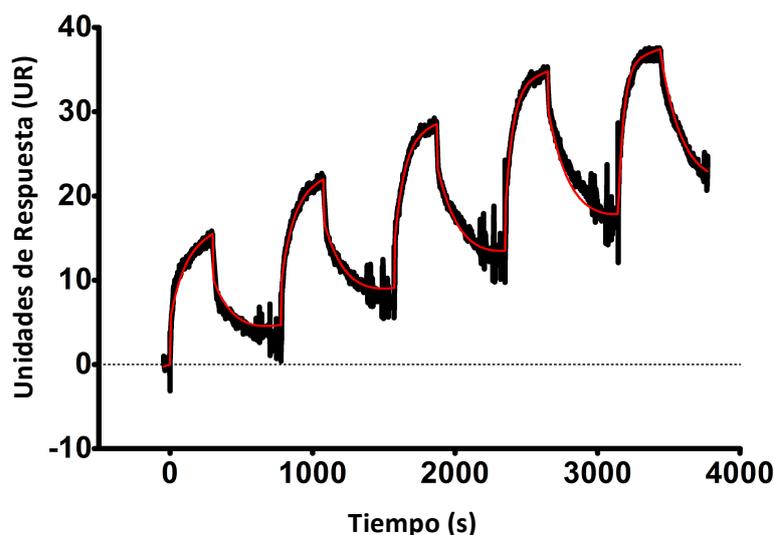
**Figura 3.18.** Sensogramas de asociación/disociación en tiempo real de PtpA-wt con TFP inmovilizada. Inyecciones de 20  $\mu\text{g}$  (línea negra) y 10  $\mu\text{g}$  de PtpA-wt (línea gris), diluída en buffer de corrida a 25°C, durante 5 min y con un flujo de 40  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

En los ensayos de SPR no fue posible regenerar la superficie inicial con alta concentración salina lo que implicó que en los ensayos descritos de SPR fue necesario esperar que la disociación se completara hasta alcanzar la línea de base para la realización del siguiente ensayo. Es posible que durante el protocolo utilizado para la regeneración con alta concentración salina se hayan perdido subunidades de la TFP lo que nos impidió definir una condición de regeneración rápida y contar con una superficie de TFP estable para la repetición de los estudios de interacción con PtpA.

A continuación, se realizaron ensayos de SPR para determinar la constante de afinidad entre la TFP y la PtpA-D126A, mediante el método denominado *Kinetic Titration* (Karlsson et al. 2006). Esta estrategia consiste en la inyección consecutiva de diluciones seriadas de la proteína en solución, sin regenerar la superficie del chip luego de cada inyección. Esta metodología es útil cuando la regeneración de la superficie es problemática, por ejemplo cuando el ligando unido a la superficie es un multímero no covalente, o cuando no es posible asegurar su estabilidad durante la regeneración. Luego de cada inyección se deja que transcurra un período de disociación y se inyecta la siguiente dilución de la proteína sin necesidad de que la disociación sea completa. El modelo toma en cuenta que cuando empieza la segunda inyección todavía queda analito unido al ligando en función de la concentración del mismo y de los parámetros cinéticos de la reacción. En nuestro caso se inmovilizó covalentemente la TFP a la superficie del chip y se inyectaron diluciones seriadas de la fosfatasa PtpA-D126A. Los resultados obtenidos se ajustaron al modelo *Kinetic titration*, utilizando el software BIAevaluation (Figura 3.19). Únicamente se logró un ajuste adecuado cuando asumimos que existe una deriva en la línea de base, lo cual no resulta evidente viendo las curvas obtenidas en la Figura 3.19, pero sí se observa en los datos crudos sin editar.

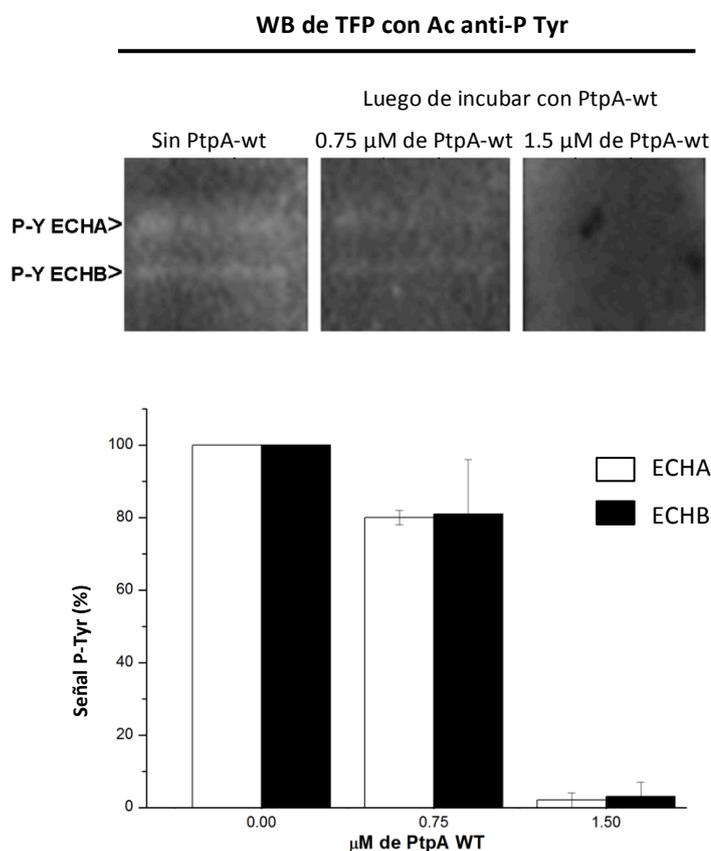
Asumiendo que los resultados se ajustan al modelo 1:1 con la restricción mencionada, obtuvimos una constante de afinidad de  $5\mu\text{M}$  (Ver Anexo 7). Sin embargo es necesario confirmar que este modelo (con la restricción impuesta) es el adecuado (El ajuste al modelo fue realizado por Federico Carrión, UBP-IPMon).

La imposibilidad para ajustar los datos obtenidos a un modelo de interacción 1:1 simple, puede deberse a la compleja estructura de la TFP, que es un octámero de subunidades alfa y beta, lo que lleva a pensar que el valor de la constante obtenida puede ser el resultado de la suma de diferentes constantes de interacción entre las diferentes subunidades de la TFP y la PtpA. Por otro lado, la posible actividad residual de la PtpA-D126A sobre el sustrato TFP inmovilizado durante el ensayo de SPR agrega una nueva variable al sistema, haciendo más complejo aún el análisis de los datos. Estos factores podrían explicar también la dificultad observada para encontrar una condición de regeneración exitosa que asegurara la repetición de los experimentos de SPR y que obligara a recurrir a la metodología *Kinetic Titration* como alternativa.



**Figura 3.19.** Experimento de *Kinetic titration* realizado con la proteína TFP inmovilizada a un sensor chip (360 UR). Inyecciones de PtpA-D126A a una concentración de 3.15, 4.72, 7.09, 10.63, 15.94  $\mu\text{M}$  en buffer de corrida (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 50 mM, EDTA 5 mM, Tween 20 0.005 % y 1 mM DTT), a  $25^{\circ}\text{C}$ , durante 5 min y con un flujo de  $40\mu\text{l}/\text{min}$ . Se realizaron períodos de asociación de 5 min y disociación de 8 min antes de la siguiente inyección. Todas las titulaciones fueron doble referenciadas (se restaron las curvas correspondientes a las inyecciones con tampón de corrida realizadas durante los mismos intervalos de tiempos y la señal sobre la superficie control). La curva de color negro corresponde a los datos obtenidos luego de la doble referenciación y la curva de color rojo representa el ajuste al modelo de interacción 1:1 usando la modalidad de *Kinetic Titration*.

Finalmente, para evaluar si la TFP fosforilada (ECHA/ECHAB) actúa como sustrato *in vitro* de PtpA, analizamos la capacidad de PtpA de defosforilar la TFP inmunopurificada, tomando como base a una estrategia descrita en la literatura para la fosfatasa VH1 del virus Vaccinia que evalúa el nivel de fosforilación por *western blot* (Najarro et al. 2001). Así, en primer lugar, analizamos la presencia de P-Tyr en la proteína TFP (ECHA/ECHB) obtenida por inmunoprecipitación, mediante *western blot* utilizando un anticuerpo anti P-Tyr (Figura 3.20). Esto nos permitió demostrar que la TFP (ECHA/ECHB) contiene P-Tyr. Luego, se sembraron cantidades iguales de la TFP inmunoprecipitada en un SDS-PAGE, se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron posteriormente en solución amortiguadora sin PtpA-wt (como control) y con dos concentraciones de PtpA-wt (0.75 y 1.5  $\mu$ M) para demostrar si la TFP es defosforilada y si esta defosforilación es dependiente de la actividad fosfatasa de PtpA-wt.



**Figura 3.20.** Análisis de la capacidad de PtpA de defosforilar motivos P-Tyr en la TFP humana. Se separó por SDS-PAGE cantidades iguales de la TFP inmunopurificada sembrada en carriles consecutivos (15  $\mu$ l del eluato obtenido en la IP, conteniendo 20 ng de TFP/carril), y se electrotransfirió a membrana de nitrocelulosa. Luego de la incubación sin PtpA-wt, con 0.75 y 1.5  $\mu$ M de PtpA-wt durante 1h a 30°C, se examinó la presencia de motivos P-Tyr por WB utilizando el Ac anti P-Tyr Invitrogen y el Ac secundario anti-IgG de ratón unido a HRP. Para el revelado se utilizó un sustrato quimioluminiscente y las bandas obtenidas fueron cuantificadas utilizando el programa del GBOX ChemiSystem (SynGene). La intensidad de las bandas se normalizó con la señal obtenida para la muestra incubada sin PtpA-wt (considerada

como 100%). Las barras de error representan la variabilidad inter-experimento, correspondiente a dos experimentos independientes utilizando lotes diferentes de TFP inmunoprecipitada.

Se realizó una única incubación de 60 min a 30°C debido a que logramos purificar poca cantidad de TFP. Posteriormente, se analizó el nivel de fosforilación de TFP por *western blot* con el anticuerpo anti P-Tyr; se cuantificó dicho nivel utilizando la herramienta del GBOX ChemiSystem (SynGene). Los resultados mostraron que la incubación con PtpA-wt produjo una reducción en el nivel de fosforilación de la TFP dependiente de la concentración de fosfatasa presente en el ensayo (Figura 3.20).

Además, en dicha figura se muestra que tanto la subunidad ECHA como la ECHB de la TFP son desfosforiladas por la PtpA. El hecho que la ECHB resultó desfosforilada *in vitro* por la PtpA no es sorprendente ya que en 2 ensayos de ST la aislamos e identificamos junto a la ECHA. Por otro lado, la base de datos online PhosphoSitePlus muestra que al igual que en la ECHA, en la ECHB humana se han detectado motivos P-Tyr en los residuos Y336, Y342 y Y357 (Hornbeck et al. 2012). Para complementar estos estudios de actividad fosfatasa, sería deseable realizar ensayos con mayor cantidad de TFP y a diferentes relaciones enzima:sustrato, que permitan determinar los parámetros cinéticos de la reacción.

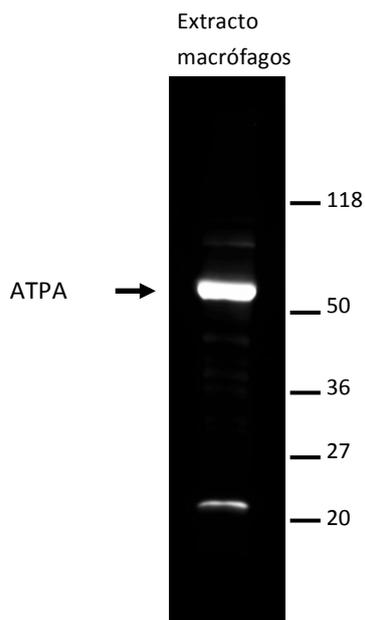
***En resumen, estos resultados indican que in vitro, la TFP (ECHA/ECHAB) humana interactúa con la PtpA de Mtb, esta interacción involucra el sitio activo de la enzima, y como resultado la TFP es desfosforilada por dicha fosfatasa.***

### **3.4.3. Ensayos realizados para lograr la validación de los otros candidatos a sustratos de la PtpA**

Para los otros posibles sustratos identificados (ATPA, SQRD y PFK) intentamos seguir la misma estrategia utilizada para la validación de la TFP, aunque en estos casos, diferentes limitaciones técnicas impidieron la validación.

#### **3.4.3.1. ATP sintasa subunidad alfa (ATPA)**

El anticuerpo anti-ATPA comercial que dispusimos para la inmunopurificación de la proteína fue un anticuerpo monoclonal (anti-ATP5A 15H4C4, producido en ratón, ab 147148) que reconoce claramente a la ATPA en el extracto de macrófagos, tal como pudimos verificarlo por *western blot* (Figura 3.21).

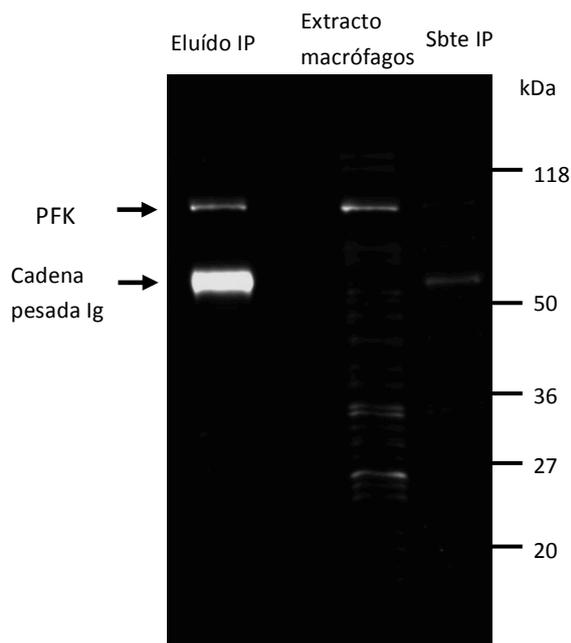


**Figura 3.21.** Análisis por *western blot* de la presencia de ATPase en el extracto de macrófagos. La muestra (30µg de extracto de macrófagos) se separó por SDS-PAGE utilizando geles al 12% de acrilamida. Finalizada la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se analizó la presencia de ATPase por *western blot* utilizando el Ac anti-ATPA, seguido del Ac secundario conjugado a HRP y revelado con un sustrato quimioluminiscente.

Sin embargo, no logramos inmunoprecipitar la ATPase a pesar de haber probado varias estrategias de inmunoprecipitación. En particular se utilizaron Dynabeads con un anticuerpo secundario ya unido, al cual unimos covalentemente o no covalentemente el anticuerpo anti-ATPA y esferas unidas a proteína A, a la cual se le unió el anticuerpo anti-ATPA, utilizando diferentes tiempos y tampones de incubación. Además, pensando que el epítipo de la ATPase reconocido por el anticuerpo no esté expuesto en la proteína nativa en solución, intentamos desnaturalizar parcialmente la proteína mediante calentamiento breve del extracto proteico a 95°C, en presencia de SDS 1%, pero aun así no logramos inmunoprecipitar la ATPase.

#### 3.4.3.2. 6-Fosfofructoquinasa (PFK)

Purificamos con éxito la PFK humana a partir de los extractos de macrófagos mediante inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo anti PFK humana. En la Figura 3.22 se muestra la PFK detectada luego del *western blot* realizado con la muestra eluída de la inmunoprecipitación así como en el extracto de macrófagos a partir del cual se inmunoprecipitó dicha proteína.



**Figura 3.22.** Análisis por *western blot* de la presencia de PFK en el extracto de macrófagos y en la fracción eluída en la inmunoprecipitación. Las muestras: fracción eluída en la inmunoprecipitación (6  $\mu$ l; volumen total de elución 50 $\mu$ l), el extracto de macrófagos (20 $\mu$ g), y el sobrenadante de la IP, depletado de PFK (12.5  $\mu$ g) se separaron por SDS-PAGE utilizando geles al 12% de acrilamida. Finalizada la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se analizó la presencia de PFK por *western blot* utilizando el Ac anti-PFK, seguido del Ac secundario conjugado a HRP y revelado con un sustrato quimioluminiscente.

Se observa también una banda de aproximadamente 55 kDa que corresponde a la cadena pesada de la Ig utilizada durante la inmunoprecipitación. Esto se explica porque durante la elución de la PFK con el buffer muestra usado en el SDS-PAGE, también se rompe la unión del anticuerpo anti-PFK a la proteína A de las esferas de Sefarosa, el cual resulta eluído conjuntamente con la PFK.

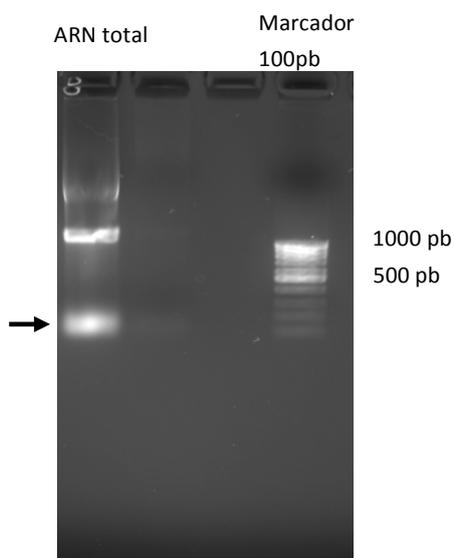
Al igual que para la TFP, previamente a realizar los ensayos de actividad fosfatasa con PtpA, analizamos la presencia de residuos fosforilados en Tyr mediante un anticuerpo anti P-Tyr. Sin embargo, a pesar de que repetimos varias veces la inmunoprecipitación y el ensayo de *western blot*, no pudimos detectar mediante esta aproximación la presencia de residuos fosforilados en Tyr en la proteína PFK. Cabe recordar que tanto en la literatura como en la base de datos online PhosphoSitePlus, la PFK está reportada como fosforilada en tirosina (Hornbeck et al. 2012). Es probable que la PFK estuviera desfosforilada en el momento del ensayo en el cuál se utilizaron extractos preparados hacía ya un tiempo. Desconocemos aún la estabilidad de la fosforilación en muestras de este tipo, pero es sabido que son modificaciones postraduccionales lábiles. Por lo tanto, nuevos ensayos con extractos frescos deberán ser realizados.

### 3.4.3.3. Sulfuro-quinona-oxidoreductasa

Durante el desarrollo del trabajo de tesis no encontramos en el mercado anticuerpos comerciales para realizar la inmunoprecipitación de la proteína. En una búsqueda reciente encontramos que existen anticuerpos comerciales anti SQRD humana (anticuerpo policlonal anti SQRD humana, MY BioSource MBS713707), lo que permitirá intentar su purificación en el corto plazo.

### 3.4.4. Hacia la obtención de los posibles sustratos en forma recombinante

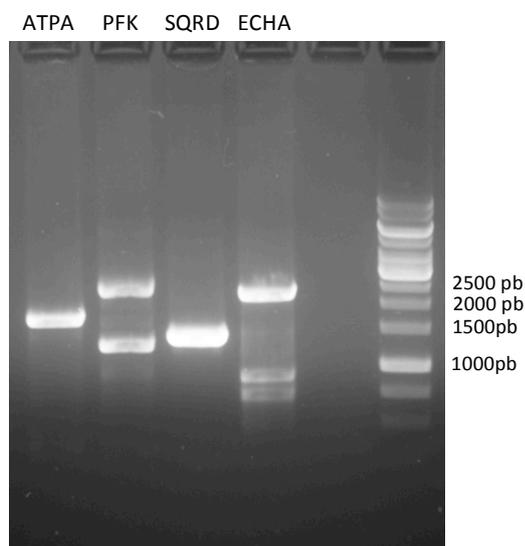
Otra estrategia posible para la obtención de las proteínas candidatos a sustratos es la obtención de las mismas en su forma recombinante. Para ello avanzamos en la obtención del ADNc de cada uno de los candidatos a sustrato. En primer lugar se aisló el ARN total de macrófagos humanos derivados de la línea THP-1. Se obtuvieron alrededor de 200  $\mu$ g de ARN total, cuyo análisis por electroforesis en gel de agarosa se muestra en la Figura 3.23. En la misma se observan dos bandas que corresponden a ARN ribosómico de 28s (4.8 kB) y de 18s (1.8 kB), y una banda de menor tamaño que corresponde al ARN mensajero.



**Figura 3.23.** Separación por electroforesis en gel de agarosa del ARN total aislado a partir de macrófagos de la línea THP-1. Se sembraron aproximadamente 200 ng de ARN en un gel al 1% de agarosa. Con una flecha se indica la banda que contiene los ARNm.

A partir del ARN total se purificó el ARNm utilizando un kit comercial y a continuación se obtuvo el ADNc total por retrotranscripción del ARNm obtenido, utilizando la enzima superscript III. Se utilizaron cebadores específicos para amplificar los genes de la ECHA, ATP5A, SQRD y PFK a partir del ADNc de macrófagos de la línea THP-1 ya obtenido. En la Figura 3.24 se muestra el análisis por electroforesis de agarosa de los productos obtenidos luego de la

amplificación por PCR. Los resultados obtenidos confirman la amplificación de cada uno de los genes de interés.



**Figura 3.24.** Separación por electroforesis en gel de agarosa de las muestras obtenidas luego de la amplificación de los genes correspondientes a cada uno de los posibles sustratos. Se sembraron 5  $\mu$ l de cada producto de la reacción de PCR en un gel al 1% de agarosa.

En la muestra correspondiente a la ATPA se amplificó una banda cercana a los 1500 pb, lo cual concuerda con el tamaño esperado (1659 pb). En el análisis de la muestra correspondiente a la K6PP se observan dos bandas, una con un tamaño aproximado de 2400 pb y otra de 1200 pb. La banda superior correspondería al ADNc de la PFK, ya que el tamaño esperado es de 2352 pb. En el caso de la SQRD, también se obtuvo una banda con el tamaño esperado, 1350 pb, y para la ECHA, la banda de mayor intensidad entre 2000 y 2500 pb, concuerda con el tamaño esperado para dicho ADNc, 2289pb.

Cada uno de los ADNc de interés se purificó a partir de la banda del gel de agarosa luego de separar por electroforesis la totalidad del producto obtenido por PCR. El rendimiento obtenido para cada uno de los ADNc fue en el orden de 0.6-1.5  $\mu$ g.

El ADNc posibilitará la producción recombinante de alguno de los candidatos a sustratos identificados con el objetivo de contar con más material para los ensayos de validación. Para ir definiendo los posibles protocolos realicé un análisis de los antecedentes reportados acerca de la producción recombinante de cada una de las proteínas de interés, que se describe a continuación.

Como ya se describió antes, la TFP (ECHA/ECHB) está formada por 4 subunidades alfa y 4 subunidades beta. Se ha reportado, que la expresión en *E.coli* BL21 de cada una de las

subunidades de la TFP humana por separado da lugar a la ECHA soluble pero a la ECHB muy poco soluble (Fould et al. 2010). Este mismo grupo describió un protocolo exitoso de co-expresión de ambas subunidades, pero que da lugar a una proteína que no parece presentar modificaciones transduccionales (Fould et al. 2010). Esto sugiere, que seguramente para la TFP deberemos abordar estrategias de expresión en bacterias modificadas (que co-expresen una P-Tyr-quinasa poco específica), o en sistemas eucariotas, o alternativamente producir la ECHA *E. coli* pero intentar fosforilarla *in vitro* con alguna quinasa comercial. Para la SQRD humana existen protocolos para su producción recombinante en *E. coli* (Jackson et al. 2012) (Jackson et al. 2015). Sin embargo el mismo no es sencillo e implicó la expresión de la SQRD a baja temperatura y junto a la co-expresión de dos chaperonas. Por lo tanto, no descartaremos contactar a dicho grupo para solicitar los vectores utilizados. En el caso de la ATPA humana, no encontramos trabajos donde la produzcan recombinante, pero sí ha sido aislado el complejo de la ATP sintasa humana a partir de tejido de corazón y fibroblastos en cultivo (Aggeler 2002). La ATPA bovina, que presenta 97.6% de identidad con la ATPA humana fue purificada mediante intercambio iónico a partir de un extracto de mitocondrias de corazón bovino (Buchanan & Walker 1996). Por lo tanto, una posible aproximación alternativa a la producción recombinante será purificarla como se hizo con la ATPA bovina. Para la PFK humana, el camino parece más sencillo ya que existen protocolos sencillos para su producción recombinante en *E. coli* (Kloos et al. 2015). Asimismo se ha reportado también su expresión utilizando baculovirus como sistema de expresión (Webb et al. 2016).

### **3.5. Evaluación de un posible rol de la actividad PtpA de *Mtb* en la modulación del metabolismo energético del macrófago**

Como se describió anteriormente, las cuatro proteínas identificadas como potenciales sustratos de PtpA tienen en común estar relacionadas directa o indirectamente con vías implicadas en el metabolismo energético y la producción de ATP, lo cual sugiere que a través de la actividad de PtpA, *Mtb* podría estar modulando la actividad de dichas vías en el macrófago. Un antecedente que apoya esta hipótesis son los resultados del trabajo de Jamwal et al. (Jamwal et al. 2013) en el cual, como ya hemos descrito, observan que tres de los cuatro potenciales sustratos descritos en la presente tesis (ECHA, ATPA, SQRD) dejan de ser detectadas específicamente en la mitocondria de macrófagos infectados con la cepa virulenta de *Mtb*.

La disminución de los niveles de estas proteínas en la mitocondria de los macrófagos infectados es de suponer afectará la producción de ATP en la mitocondria si como la regeneración del poder reductor. Esto abre la posibilidad de que el macrófago en este contexto re-direccione su metabolismo con el objetivo de mantener los niveles celulares de ATP, activando la vía glucolítica y regenerando el poder reductor mediante la conversión del piruvato (producto de

la glucólisis) en lactato, aún en condiciones de aerobiosis. Como ya fue descrito en la introducción a este cambio metabólico se lo denomina efecto Warburg.

Si esto fuera así, durante la infección con *Mtb* se debería constatar un aumento en los niveles de lactato. La literatura confirma este hecho ya que en estudios de infección en ratones y cobayos con la cepa virulenta de *Mtb* se observaron importantes cambios en los metabolitos producidos por vías catabólicas y anabólicas destacándose la acumulación de lactato en todos los órganos infectados analizados sean granulomatosos o no (pulmón, hígado y bazo) (Shin et al, Somashekar et al, 2011,1012). En estos experimentos el balance global muestra que los niveles de glucosa y glucógeno así como los de NAD<sup>+</sup> y NADP<sup>+</sup> disminuyen, lo que sugiere un aumento en el consumo de glucosa vía glucólisis y la vía de las pentosas fosfato. Además se observa un aumento en el nivel de lactato. Los niveles de oxalacetato y fumarato -intermediarios del ciclo de ácidos tricarboxílicos (TCA)- también disminuyen, lo que sugiere una actividad reducida del ciclo TCA.

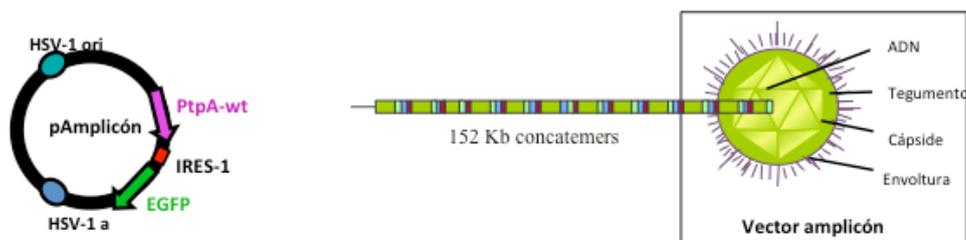
En Uruguay todavía no es posible trabajar en modelos de infección con *Mtb*, por lo cual para evaluar este posible re-direccionamiento metabólico y el rol de la PtpA en el mismo nos planteamos introducir la actividad de PtpA-wt en los macrófagos mediante la utilización de un vector viral. Luego de poner a punto el sistema, evaluamos parámetros metabólicos que nos indicaran posibles cambios en el metabolismo energético. Como primera aproximación nos propusimos medir los niveles de glucosa y lactato en células transducidas y sus controles.

### **3.5.1. Transducción de los macrófagos con los vectores amplicón**

Los macrófagos de tipo THP-1 son células notoriamente difíciles de transfectar. Se ha reportado la transfección de monocitos THP-1 mediante métodos que no involucran el uso de vectores virales, como el uso de liposomas o métodos físicos como la electroporación, pero resultan en baja eficiencia de transfección y pérdida de viabilidad (Kusumawati et al. 1999). Una estrategia que ha tenido bastante éxito en la transfección de células de la línea monocítica es la transducción con vectores virales, como por ejemplo lentivirus, o vectores de tipo HSV (Bambacioni et al. 2001; Stripecke et al. 2000). La estrategia elegida para expresar la PtpA-wt en los macrófagos humanos THP-1 fue la utilización de un vector viral HSV-1 amplicón (trabajo realizado en coordinación con Mabel Berois del Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias).

Los vectores de tipo HSV-1 amplicón son vectores versátiles tienen varias ventajas: permiten la transferencia de genes a una amplia variedad de células con baja inmunogenicidad y toxicidad, su manipulación es relativamente sencilla y no presentan riesgos para el operador (Diefenbach & Fraefel 2014). Además, el vector de tipo HSV-1 amplicón nos permite la incorporación de al menos 22 copias del gen de la PtpA por partícula viral (Figura 3.25). El uso de sitios internos de

entrada del ribosoma (IRES) también posibilita la expresión simultánea de múltiples genes a partir de un único promotor. En este caso, utilizamos el vector viral que se muestra en la Figura 3.25 generado a partir del plásmido amplicón pHSV1-IRES-PtpA; la expresión simultánea de la PtpA-wt y la EGFP es muy útil para evaluar el éxito de la transducción ya que puede monitorearse mediante microscopía de fluorescencia.



**Figura 3.25.** Diagrama mostrando un esquema de la organización del plásmido amplicón pHSV1-IRES-PtpA (panel de la izquierda) y el vector viral amplicón formado a partir de él (panel de la derecha).

### 3.5.1.1. Obtención del vector viral HSV-1 amplicón

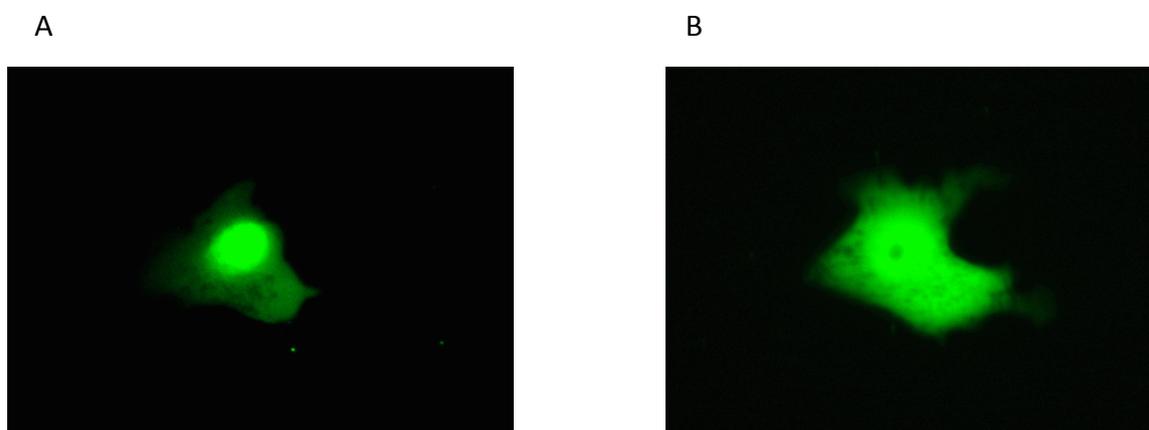
Como ya se describió en materiales y métodos la preparación del vector HSV-1 amplicón se realizó mediante una transfección múltiple en células Vero 2-2 con: (i) el plásmido amplicón pHSV1-IRES-PtpA; (ii) un cromosoma artificial bacteriano (bácmido: fHSV1  $\Delta$ pac  $\Delta$ ICP27) que provee toda la información requerida para la replicación del vector HSV-1 amplicón y (iii) el plásmido pEBHICP27 que provee en trans el gen esencial ICP27. De la misma forma también se prepararon vectores virales control, utilizando el plásmido amplicón pHSV1-IRES-EGFP que no lleva el gen de la PtpA pero que contiene el gen de la EGFP.

En primer etapa se clonó el gen de la PtpA-wt en el plásmido amplicón pHSV1-IRES1, bajo el promotor temprano IE4/5 de HSV-1, seguido de un IRES y el gen de la proteína verde fluorescente (EGFP). En el Anexo 8 se muestra el análisis por electroforesis de agarosa del plásmido pHSV1-PtpA-IRES-EGFP, así como el resultado de la amplificación por PCR del gen de la PtpA-wt que confirma la inserción del gen de la fosfatasa en el plásmido. En el Anexo 8 se muestra también la confirmación de la identidad e integridad de la secuencia del gen de *PtpA* determinada por secuenciación.

En la segunda etapa, se expandió el stock del bácmido fHSV1  $\Delta$ pac  $\Delta$ ICP27, mediante electroporación de células *E.coli* DH5 $\alpha$  electrocompetentes, y se realizó una producción del mismo a gran escala. Luego de purificar el bácmido se verificó la identidad del mismo mediante análisis del patrón de restricción utilizando las enzimas Hind III y Kpn I, además de un bácmido

estándar de patrón de digestión conocido disponible en el laboratorio (resultado en Anexo Figura A8.4 ).

Finalmente, para evaluar la producción de los vectores y titular los mismos se realizó una transducción en células Vero 2-2 con distintas diluciones de cada uno de los vectores virales. El sistema funcionó correctamente y las células transducidas expresaron la EGFP. En la Figura 3.26. se observa la fluorescencia emitida por la EGFP en células transducidas con el vector conteniendo la PtpA (HSV1-PtpA-IRES-EGFP) y con el vector control (HSV1-IRES-EGFP). El título obtenido en las producciones de los vectores previo a la concentración final por ultracentrifugación fue de  $2.4 \times 10^4$  y  $3.0 \times 10^4$  UT (unidades transductantes o partículas virales)/ml suspensión respectivamente.

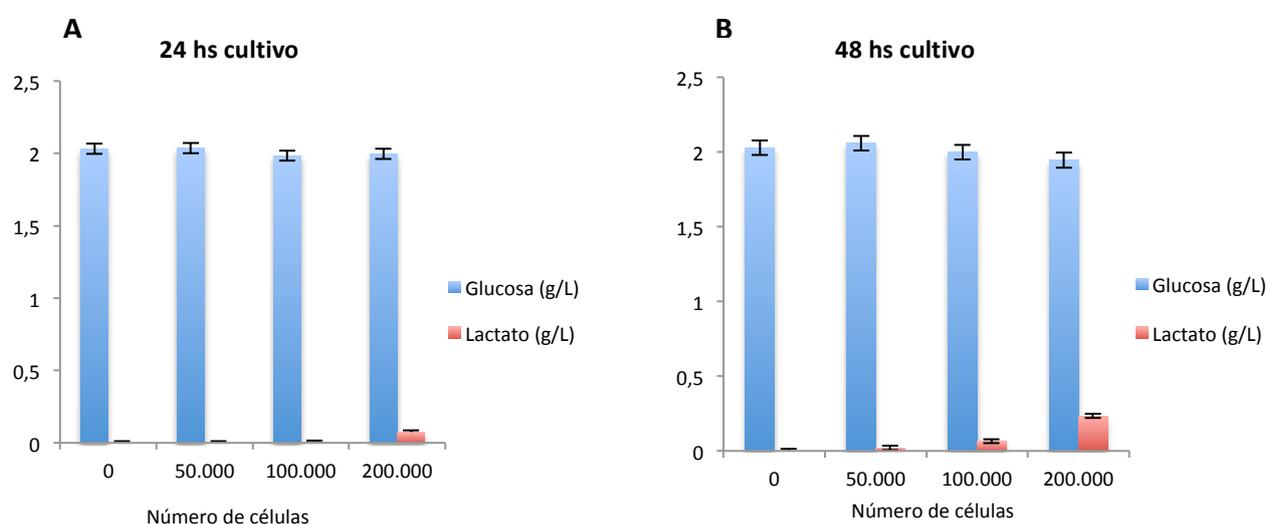


**Figura 3.26.** Células Vero 2-2 transducidas con el vector viral HSV1-PtpA-IRES-EGFP (Fig A) o con el vector control HSV1-IRES-EGFP (Fig B). Fotos tomadas con el microscopio de epifluorescencia Olympus IX81, aumento 40X, utilizando el software Micro manager. Se contabilizaron los focos fluorescentes presentes en todos los campos de cada pozo de la placa de cultivo para cada dilución del vector.

### 3.5.1.2. Optimización del número de macrófagos y medio de cultivo a ser utilizado para la medición de niveles de glucosa y lactato

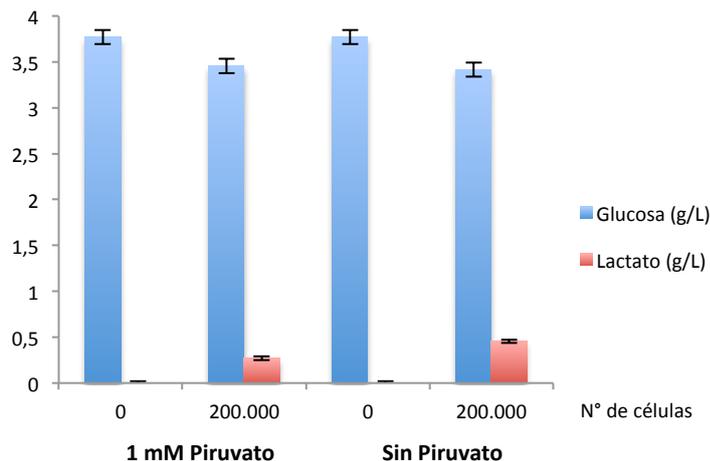
En primer lugar, antes de realizar la infección, fue necesario optimizar las condiciones de cultivo de los macrófagos derivados de la línea celular THP-1 para asegurarnos que los niveles de glucosa y lactato en el sobrenadante fueran detectados por el método de medición disponible. Para ello, evaluamos cómo estos niveles variaban en función del número de células/pozo, el medio de cultivo y el tiempo de incubación.

En el primer experimento determinamos los niveles de glucosa y lactato utilizando diferente número de células/pozo (50, 100 y 200 x10<sup>3</sup>) tiempo de cultivo (24 y 48 hs). Se cultivaron las células en medio RPMI a 2 g/L de glucosa, suplementado con piruvato 1 mM, y 10% SBF. A las 24 hs no se observaron cambios en los niveles de glucosa del medio independientemente del número de células utilizado y sólo se detectó lactato cuando se utilizaron 200 mil células/pozo (Figura 3.27-A). A las 48hs de cultivo se detectó un leve consumo de la glucosa del medio que se tradujo en un leve aumento del nivel de lactato, notorio al utilizar 200 mil células (Figura 3.27-B). Este experimento nos permitió definir que para poder detectar el lactato producido se necesitaban incubar las células por 48hs y sembrar por lo menos 200 mil células por pozo (en un volumen final de 0.6 mL de medio de cultivo). No se evaluaron tiempos mayores de cultivo debido a que los ensayos posteriores de transducción viral se realizarán con un tiempo de incubación de 48hs (información obtenida de Mabel Berois, Virología FCIEN).



**Figura 3.27.** Optimización del cultivo de macrófagos THP-1 para la medición de cambios en los niveles de glucosa y lactato durante su cultivo. Se cultivaron 50, 100 y 200 x 10<sup>3</sup> células/pozo en medio RPMI suplementado con 1 mM piruvato y 10% SBF durante 24 hs (A) y 48 hs (B). Al tiempo final se colectaron los sobrenadantes de cultivo y se determinaron los niveles de glucosa y lactato utilizando el equipo Bioprofile Basic 2 (Nova Medical). Los valores obtenidos representan el promedio de dos réplicas experimentales. El valor indicado como 0 en el eje x del gráfico, representa la concentración inicial de glucosa o lactato del medio utilizado, en ausencia de células.

Buscando incrementar los niveles de lactato detectados se evaluó el efecto de aumentar la glucosa (4 g/L) y eliminar el piruvato en el medio utilizado. Al comparar el % de glucosa consumida utilizando 2 g/L (3.0%) o 4 g/L (8.5%) observamos que el aumento al utilizar 4 g/L es de tan solo de un 5.5%. Por otro lado, la Figura 3.28 muestra que la eliminación del piruvato no causó un aumento en el incremento del consumo de glucosa, pero sí permitió detectar un claro aumento en el nivel de lactato (del orden del 50%).



**Figura 3.28.** Determinación de niveles de glucosa y lactato en sobrenadantes de cultivo de macrófagos THP-1, en medio RPMI en presencia o ausencia de 1 mM de piruvato luego de 48 hs de cultivo, mediante el equipo Bioprofile Basic 2 de Nova Medical. Los valores obtenidos representan el promedio de dos réplicas experimentales.

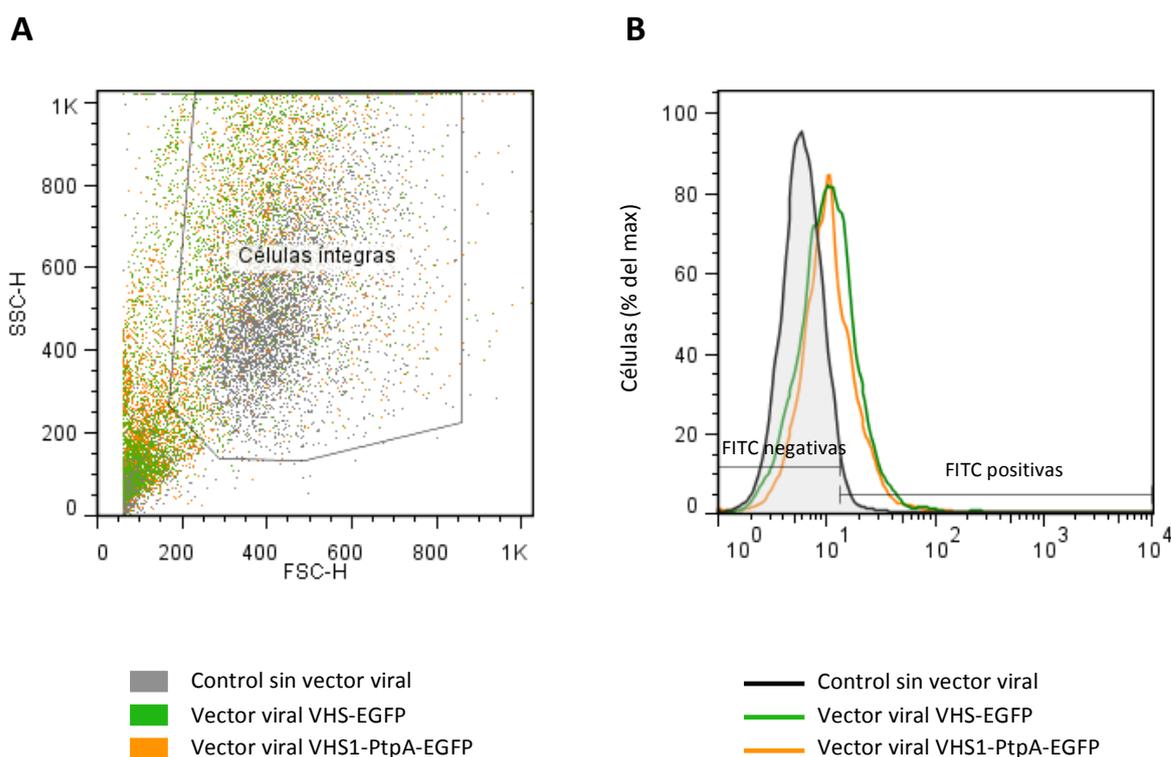
En base a los resultados obtenidos definimos las condiciones de cultivo a utilizar en los ensayos de transducción con el vector viral: cultivo de 200 mil células por pozo en un volumen de 0,6 mL de medio RPMI conteniendo 4 g/L de glucosa y 10% de SBF sin agregado de piruvato, durante 48 hs. En función de este dato se definió también el número de vectores virales a preparar para poder utilizar una relación de partículas virales:macrófagos de al menos 1:1, durante los ensayos de transducción.

### 3.5.1.3. Transducción del vector viral en los macrófagos humanos

En el contexto de esta tesis, de acuerdo al tiempo y recursos disponibles, sólo se logró realizar un experimento de transducción de macrófagos humanos para evaluar los efectos de la expresión de PtpA en la célula sobre parámetros asociados al metabolismo e inflamación de macrófagos. El diseño experimental utilizado involucró la transducción con los vectores VHS1-PtpA-EGFP y con su correspondiente control VHS1-EGFP. Además, se incubaron en paralelo macrófagos con medio de cultivo (control) y con diferentes concentraciones de LPS, con el objeto de comparar los resultados con los de un modelo de activación conocido. Para realizar la transducción se utilizaron 250 mil partículas de vector viral por 170 mil macrófagos THP-1; se utilizó este número de células para alcanzar una multiplicidad de infección mayor a 1 (1.4) que mejora la eficiencia de la transducción. Luego de 48 horas de cultivo, se recuperaron las células para determinar la eficiencia de la transducción por citometría de flujo y en los sobrenadantes la concentración de glucosa, lactato y de las citoquinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-6.

### 3.5.1.3.1 Evaluación de la transducción mediante citometría de flujo

En primer lugar se examinaron las células en un microscopio de inversión, observándose que en los cultivos control y activados con LPS las células estaban en muy buen estado y presentaban una forma de huso. En los cultivos transducidos con el vector viral, se observó un aspecto diferente, las células estaban más redondeadas, y observamos un material particulado en el fondo del pozo, sin embargo las células estaban bien adheridas. A continuación se recogió el sobrenadante, se despegaron las células y se analizaron por citometría de flujo. Esto implicó el tratamiento de los macrófagos con soluciones para despegar las células de la placa. Este paso fue complicado ya que las células estaban muy adheridas y luego de realizar varias incubaciones de 5 min con Accutase, sin poder removerlas, se retiró el mismo y se agregó tripsina para despegarlas. Se necesitaron alrededor de 30 minutos para lograr su remoción de la placa. Una vez despegadas las células, se analizaron en el citómetro FACSCalibur. Los diagramas de SSC-H vs FSC-H (Figura 3.29 A) permitieron evaluar en forma aproximada el % de células íntegras obtenido en cada caso.



**Figura 3.29. Diagramas obtenidos por citometría de flujo mostrando las distintas poblaciones celulares obtenidas.** A) Diagrama incluyendo la población de macrófagos sin vector viral, macrófagos 48hs post transducción con el vector viral VHS1-GFP y macrófagos 48 hs post transducción con el vector viral VHS1-PtpA- EGFP. B) Histograma con la distribución de poblaciones celulares en función de la fluorescencia de FITC, para las células control sin vector, células infectadas con el vector viral VHS1-EGFP y células infectadas con el vector viral VHS1-PtpA- EGFP.

El mayor % de células íntegras (89.8 %) se observó en el experimento control en el cuál las células no fueron tratadas con el vector viral. En los experimentos en los cuales las células fueron transducidas con los vectores virales HSV1-IRES-EGFP o HSV1-PtpA-IRES-EGFP se observó una disminución importante en el porcentaje de células íntegras, siendo mayor para las células transducidas con el vector que expresa la PtpA (42.5% para los macrófagos transducidos con el vector HSV1-IRES-EGFP y 38.6% para los macrófagos transducidas con el vector HSV1-PtpA-IRES-EGFP). Si bien estos datos sugieren que la transfección con el vector viral provocó un alto porcentaje de muerte, creemos que estas variaciones puede estar asociadas también a la manipulación de las células, las cuales como describimos arriba fueron despegadas con dificultad, lo cual no es característico de las células muertas. Creemos que es factible que la activación celular, producto de la transducción con el vector viral podría provocar cambios en las proteínas de adhesión celular que aumenten su adhesividad, explicando la mayor dificultad para recuperarlas. De todas formas aún no podemos descartar un posible efecto tóxico debido a la transducción y/o expresión de la fosfatasa, por lo cual serán necesarios estudios adicionales donde se determine la viabilidad celular sin necesidad de su recuperación, por ejemplo se utilizarán marcadores de viabilidad tales como el yoduro de propidio. Por lo tanto el estudio que hemos realizado hasta el momento no nos permitió conocer en qué medida la transducción provocó muerte celular.

Para determinar el % de macrófagos transducidos con el vector viral se midió la fluorescencia debida a la expresión de la EGFP en las células, se adquirieron 5.000 eventos dentro de la región de las células vivas. La Figura 3.29-B muestra el histograma de distribución de las poblaciones celulares (en %) en función de la intensidad de la fluorescencia ( $FI_{FITC}$ ). En el mismo se observa que las células transducidas con el vector HSV1-IRES-EGFP y con el vector HSV1-PtpA-IRES-EGFP muestran un corrimiento en la  $FI_{FITC}$  respecto al observado para las células control no transducidas. El % de transducción fue similar para la células transducidas con los vectores HSV1-IRES-EGFP y HSV1-PtpA-IRES-EGFP (29.4% y 26.9%, respectivamente); estos porcentajes se estimaron considerando como células positivas para la transducción sólo aquellas cuya  $FI_{FITC}$  fue mayor que la correspondiente al valor máximo mostrado por el 95% de las células del control. El porcentaje de transducción en general se cuantifica mediante el análisis de las células positivas para la EGFP, por citometría de flujo. Sin embargo debemos tener en cuenta que en la construcción del vector utilizado, la EGFP se coexpresa con la PtpA a través de un elemento IRES, para facilitar el monitoreo de la eficiencia de transferencia del gen. Sin embargo, a pesar que esta aproximación permite controlar las eficiencias de transfección, lleva a una subestimación de la expresión del gen, ya que los genes que se expresan a continuación del elemento IRES a menudo se expresan más debilmente que el gen próximo al promotor (Mizuguchi et al. 2000). Por lo tanto es posible, que el % de transducción con el vector que porta la PtpA esté siendo subestimado.

Teniendo en cuenta entonces que el gen de la PtpA se encuentra antes del gen de la EGFP y la transcripción de ambos genera un único ARNm, es de esperar que la expresión de la EGFP nos indique indirectamente que la PtpA se expresó. Con el objetivo de confirmarlo realizamos una extracción de proteínas de las células transducidas, cuantificando las mismas y evaluando en dichos extractos la actividad fosfatasa total a tiempo final para una misma concentración de proteína. En dichos extractos obtenidos a partir de células transducidas con el vector HSV1-IRES-EGFP y HSV1-PtpA-IRES-EGFP no detectamos diferencias en el nivel de actividad fosfatasa total. Esta información es limitada ya que la actividad detectada representa a la actividad del total de fosfatasas presentes en la muestra y no mide específicamente la actividad de la ptpA. Además no se descarta que no podamos ver diferencias debido al bajo nivel de transducción obtenido en estos primeros ensayos que podrían enmascarar un posible aumento debido a una sobre-expresión de la PtpA. Para la detección de la proteína PtpA en extractos celulares, estamos preparando anticuerpos específicos en llama (colaboración con el Dr. Gualberto González, Cátedra de Inmunología, Facultad de Química y Ciencias). Estos anticuerpos nos permitirán analizar por *western blot* la expresión de la PtpA en las células transducidas.

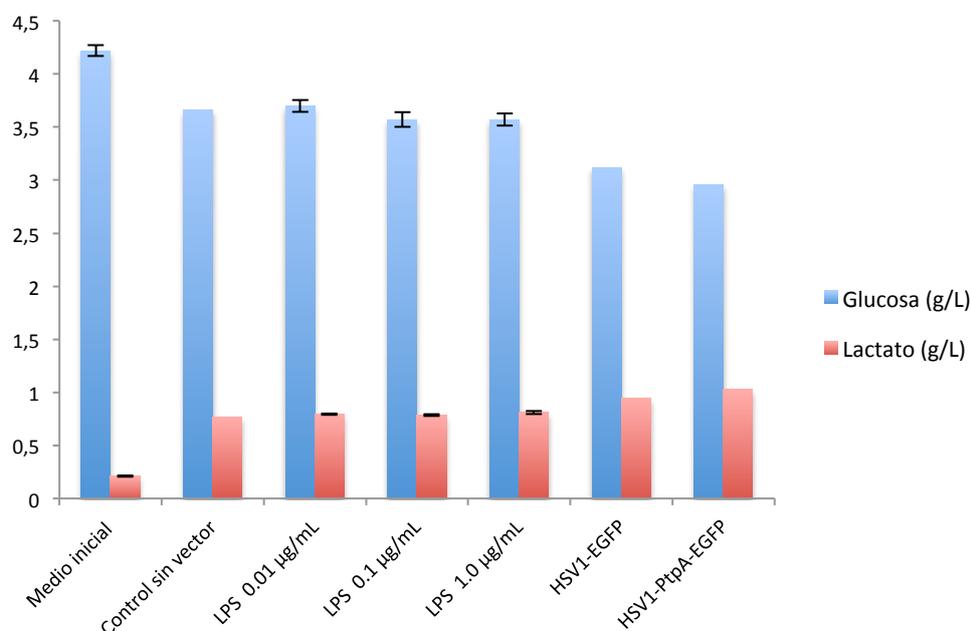
#### **3.5.1.3.2. Dosificación de lactato y glucosa en sobrenadantes de cultivo de macrófagos**

Aun considerando que el porcentaje de transducción obtenido no fue lo suficientemente alto decidimos evaluar los niveles de glucosa y lactato en los sobrenadantes obtenidos.

En primer lugar es importante aclarar que el experimento estaba diseñando de tal manera que todas las condiciones de estudio (transducción con los vectores virales y controles) fueron realizados por duplicado, lo cual nos permitía evaluar mínimamente el error intra-experimento. Lamentablemente, debido a un contratiempo perdí gran parte del volumen de los sobrenadantes de los pozos correspondientes a las condiciones de transducción y control. Esto impidió realizar mediciones de los pozos duplicados; siendo necesario preparar pooles a partir de los sobrenadantes remanentes para disponer del volumen necesario para una única determinación. Por lo cual los resultados que se presentan a continuación son descriptivos, ayudarán al diseño de experimentos que los corroboren, pero no permiten obtener conclusiones.

En la Figura 3.30 se muestran los niveles de glucosa y lactato en los sobrenadantes de cultivo de las células estimuladas por la transducción de los vectores virales o por la adición de LPS en comparación con las células control. Cuando se compara con los niveles presentes en el medio de cultivo de partida (equivale al tiempo 0), se observa que el cultivo de los macrófagos por 48 hs provocó un descenso en el nivel de glucosa del medio y un aumento en el nivel de lactato.

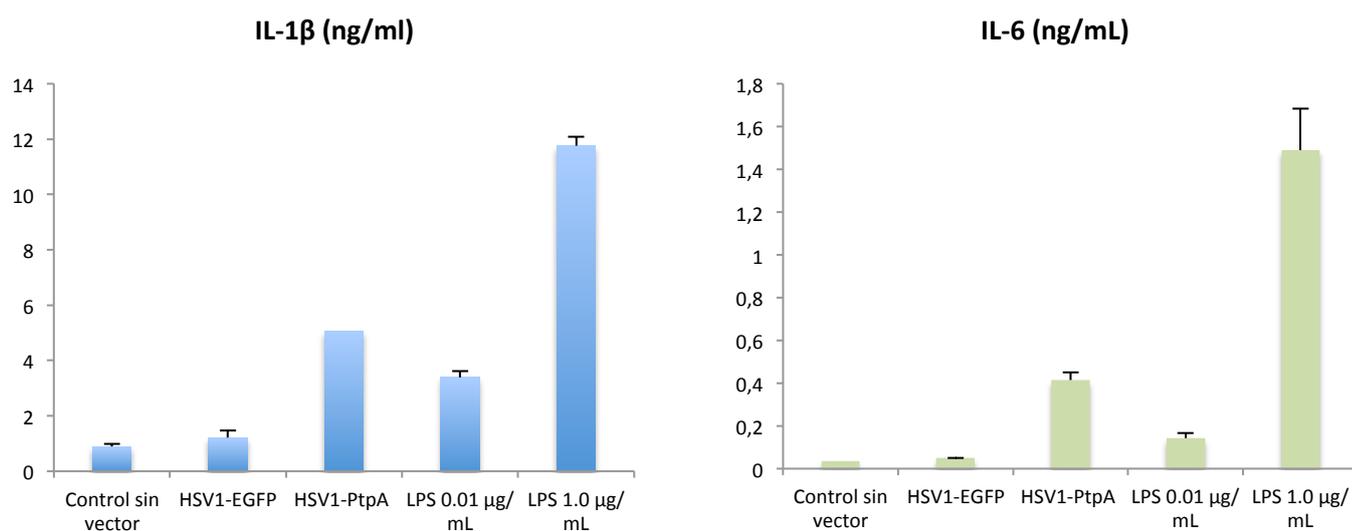
Estas variaciones fueron similares a las observadas por la estimulación con LPS a todas las dosis utilizadas. Por otro lado, en estas condiciones los niveles de glucosa y lactato medidos en los sobrenadantes de cultivo de células transducidas con el vector viral control (vector HSV1-EGFP) y transducidas con la PtpA (vector HSV1-PtpA-EGFP) revelan un aumento en el consumo de glucosa y generación de lactato, respecto a los controles descritos arriba. Sin embargo no contamos con suficiente número de datos que nos permitan verificar esta tendencia mediante un tratamiento estadístico. Asimismo, se observó que el consumo de glucosa y la generación de lactato parecerían ser levemente mayores en las células transducidas con el vector viral HSV1-PtpA-EGFP, que en aquellas células transducidas con el vector control HSV1-EGFP. Nuevamente, la significancia estadística no pudo ser analizada debido a que se tuvo que trabajar con un pool de los sobrenadantes, perdiéndose los duplicados analíticos del experimento, sumado a que además, no se pudo repetir todo el ensayo.



**Figura 3.30.** Evaluación del efecto de la expresión de PtpA en macrófagos sobre el consumo de glucosa y la producción de lactato. Se determinaron los niveles de glucosa y lactato en el sobrenadante luego de 48 hs de cultivo de las células tratadas con los estímulos que se indican. En el caso de los cultivos control sin vector, transducido con el vector HSV1-EGFP, y transducido con el vector HSV1-PtpA-EGFP, los resultados corresponden al valor obtenido para los pools preparados a partir de los sobrenadantes correspondientes a dos pozos experimentales. En el caso de la estimulación con LPS, los resultados se expresan como la media y el desvío estándar de pozos duplicados.

### 3.5.1.3.2. Determinación de niveles de IL-1 $\beta$ e IL-6 en sobrenadantes de cultivo de macrófagos

En la Figura 3.31 se muestran los niveles de IL-1 $\beta$  e IL-6 en los sobrenadantes de cultivo de las células estimuladas por la transducción de los vectores virales o por la adición de LPS en comparación con las células control. Como era esperado, la estimulación con LPS causó un aumento significativo e importante en el nivel de ambas interleuquinas, lo que demuestra la validez de este control positivo. La estimulación con 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS desencadenó un aumento de 4 veces el nivel de IL-1 $\beta$  observado en el sobrenadante del cultivo control, mientras que la estimulación con 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS causó un aumento de 13 veces. En el caso de IL-6, la estimulación con 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS desencadenó un aumento de 4 veces en el nivel de IL-6 observado en el sobrenadante del cultivo control, y la estimulación con 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS causó un aumento de 43 veces.



**Figura 3.31.** Evaluación del efecto de la expresión de PtpA en macrófagos sobre la producción de IL-1 $\beta$  e IL-6 en sobrenadantes de cultivo de macrófagos. Se determinaron los niveles de IL-1 $\beta$  e IL-6 en el sobrenadante luego de 48 hs de cultivo de las células tratadas con los estímulos que se indican. En el caso de los cultivos control sin vector, transducido con el vector HSV1-EGFP, y transducido con el vector HSV1-PtpA-EGFP, los resultados corresponden al valor obtenido para dos diluciones de los pools preparados a partir de los sobrenadantes correspondientes a dos pozos experimentales. En el caso de la estimulación con LPS, los resultados se expresan como la media y el desvío estándar de pozos duplicados, sembrados en distintas diluciones.

Por otro lado, los niveles de IL-1 $\beta$  e IL-6 en los sobrenadante del cultivo sin transducir fueron similares a los observados en las células transducidas con el vector control HSV1-EGFP.

En contraste, cuando se comparan los niveles de IL-1 $\beta$  e IL-6 en los sobrenadante del cultivo se observa que la transducción con HSV1-PtpA-EGFP indujo un aumento de 4 veces y 9 veces respectivamente, respecto a la transducción con el vector control HSV1-EGFP.

No es claro aún el significado de este resultado, pero en todo caso el mismo sugiere que PtpA estimula la producción de ciertas interleuquinas. Claramente necesitamos realizar nuevos estudios, que serán propuestos en la discusión, y además se abren nuevas interrogantes como la pregunta de cómo se relaciona este efecto de acumulación de IL con los candidatos a sustrato identificados y la vías en las que éstos participan, en especial con el validado en este estudio la TFP(ECHA-ECHB), clave en la beta oxidación de ácidos grasos.

***En resumen, más allá de que los datos obtenidos en esta sección aún no nos permiten sacar una conclusión final, los mismos sugieren que el modelo de transducción viral utilizado puede ser de utilidad para explorar las hipótesis aún abiertas en este trabajo.***

## CAPÍTULO 4

### DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS

---

Este trabajo de tesis buscó avanzar en la comprensión del papel que cumplen las fosfatasa PtpA y PtpB en la adaptación de *Mtb* a su célula hospedera, abordando principalmente la identificación y validación de nuevos sustratos de la fosfatasa PtpA de *Mtb*, como forma de orientar el análisis de las propiedades celulares que podría modular en los macrófagos. En este sentido logramos un avance sustancial identificando cuatro nuevos potenciales sustratos de la PtpA y validando *in vitro* a la TFP (ECHA/ECHB) como posible sustrato fisiológico de dicha fosfatasa. Además, a partir de la identificación de estos potenciales sustratos proponemos un nuevo escenario vinculando a la PtpA con la regulación de circuitos celulares asociados al control del metabolismo del macrófago, y desarrollamos un modelo celular que confiamos sea útil para encarar su estudio. Por otro lado, como producto de este trabajo generamos mutantes de PtpB, que son una herramienta útil para investigar acerca de los sustratos y las vías de señalización que esta fosfatasa podría modular en los macrófagos. En esta sección discutiremos estos resultados desde los aspectos metodológicos que tuvimos que abordar hasta las eventuales repercusiones que la información generada tiene sobre el conocimiento actual de las propiedades bioquímicas y biológicas de PtpA.

#### 4.1. Mejoras introducidas en la estrategia global de ST

Desde un punto de vista metodológico, debemos destacar que en la presente tesis se adicionaron etapas previas a la estrategia de ST que resultaron extremadamente útiles y permitieron con éxito el aislamiento de cuatro nuevos potenciales sustratos fisiológicos de PtpA de *Mtb*. La identificación de estos candidatos y la validación *in vitro* de uno de ellos como sustrato se publicó recientemente en la revista Scientific Reports (Margenat et al. 2015) (Sección Anexos).

La etapa inicial de caracterización estructural y funcional del mutante PtpA-D126A fue esencial, la misma debe ser incluida con la finalidad de corroborar que el mutante no ha sufrido cambios sustanciales que invaliden su utilización en los ensayos de ST. Si analizamos la literatura podemos observar que realizar este tipo de caracterización previa es una excepción más que una regla. Una de estas excepciones, es el estudio que demuestra que la estructura cristalina del mutante PTP1B C215S (humana) presenta los residuos del motivo C[X]<sub>5</sub>R[S/T] del sitio activo en una conformación muy diferente a la observada en la estructura de la enzima salvaje (Scapin et al. 2001). En nuestro trabajo se evaluó la integridad estructural del mutante PtpA-D126A mediante diferentes estrategias analíticas disponibles en Uruguay, y se compararon los

resultados con aquellos obtenidos con la proteína salvaje. Pudimos demostrar así que la proteína mutante es un monómero al igual que la proteína salvaje y no parece haber sufrido grandes cambios estructurales. Estos resultados se integraron a los obtenidos previamente en Brasil por un miembro de nuestro grupo, que demostraron la prevalencia de la estructura secundaria en el mutante PtpA-D126A, determinada por CD (Purificação 2008). Con respecto a la funcionalidad del mutante PtpA-D126A, podemos destacar que mostró las características esperadas y recomendadas para ser usado en la estrategia de ST (Flint et al. 1997) (Blanchetot et al. 2005); no presentó cambios sustanciales en el valor de  $K_m$  respecto a PtpA-wt, pero disminuyó considerablemente su  $k_{cat}$ . Esto sugiere que la fosfatasa mutante será capaz de retener los sustratos más tiempo en el sitio activo que la proteína salvaje, aumentando la posibilidad de éxito del método de ST con ella. En conclusión, consideramos que el mutante PtpA-D126A obtenido en esta tesis es una herramienta adecuada para el aislamiento de nuevos sustratos.

Sería interesante contar con la estructura cristalográfica de la PtpA-D126A para completar aún más su caracterización. Nuestro grupo ha realizado intentos de cristalizar la PtpA-D126A, sin éxito aún (en colaboración con el Servicio de Cristalografía del IPMon). Es posible que la razón por la cual no se haya podido cristalizar se deba a la oxidación gradual de las Cys a lo largo del proceso de purificación, ya que observamos que el número de Cys reducidas dosificadas experimentalmente siempre fue menor al esperado, aún en condiciones desnaturalizantes y en muestras previamente tratadas con DTT. Esta oxidación de las Cys, posiblemente a formas irreversibles como el ácido sulfónico, podría generar una variedad de especies moleculares en la muestra que dificulte la cristalización de la misma. De hecho podemos constatar en la base de datos PDB que la estructura de muchas de las PTPs resueltas corresponde a la del mutante totalmente inactivo C/S. Por lo tanto, una alternativa será producir el doble mutante PtpA D126A/C11S, el cual al igual que los mutantes puntuales D126A y C11S, es considerado útil para la estrategia de ST (Blanchetot et al. 2005). Nuestro grupo ya cuenta con los mutante simples PtpA-D126A y PtpA-C11S, por lo cual sería posible obtener el doble mutante en el futuro cercano. Otra mutación que podría considerarse útil es el cambio en la glutamina (Q) altamente conservada del sitio activo (que participa en la estabilización de la molécula de agua involucrada en la regeneración de la enzima). Contar con otros mutantes de PtpA, nos permitirá utilizarlos en nuevos ensayos de ST que permitan corroborar el aislamiento de los sustratos identificados en este trabajo, y eventualmente, aislar otros que no hayan sido retenidos por el mutante D126A. Esta última posibilidad debe ser considerada ya que el uso de dobles mutantes ha rendido resultados interesantes en el caso de otras fosfatasas; por ejemplo, durante la búsqueda de los sustratos de PTP1B el doble mutante D181A-Q262A permitió identificar sustratos, probablemente menos abundantes en la muestra, que no fueron capturados utilizando el mutante D181A (Xie et al. 2002).

En segundo lugar, en los ensayos de ST realizados en la presente tesis el mutante PtpA-D126A se inmovilizó covalentemente a una matriz NHS-Sefarosa, en la cual los grupos remanentes de la matriz fueron bloqueados químicamente de manera de convertirlos en grupos poco reactivos. Este cambio es original, ya que tal como se describe en una de las dos revisiones sobre la estrategia de ST (Blanchetot et al. 2005) generalmente se utiliza la fosfatasa inmovilizada no covalentemente a través de diferentes *tags* (GST-tag o His-tag). El objetivo del cambio de la estrategia fue obtener la fosfatasa inmovilizada de forma que favorezca el aislamiento de interactores específicos y minimice el aislamiento de interactores inespecíficos. Claro que fue necesario demostrar previamente que este proceso de inmovilización no alteró la funcionalidad de la PtpA-D126A, lo cual fue logrado evaluando la actividad de la fosfatasa inmovilizada. El presente trabajo nos permitió demostrar así que el uso de la PtpA-D126A inmovilizada covalentemente a NHS-Sefarosa resulta ventajoso al uso de la PtpA-D126A inmovilizada no covalentemente a Ni-Sefarosa. En efecto, al utilizar la PtpA-D126A-NHS-Sefarosa en los ensayos de ST, el perfil de proteínas aisladas y analizadas en un gel SDS-PAGE fue completamente diferente al del extracto de proteínas de macrófago, y al observado al utilizar la matriz control sin fosfatasa inmovilizada, sugiriendo el enriquecimiento en ciertas proteínas presentes en el extracto. En cambio, en estudios previos de nuestro grupo dónde se utilizó la PtpA-Ni-Sefarosa estos perfiles fueron extremadamente similares a los del extracto de proteínas de macrófago, no lográndose identificar claramente las bandas del gel que podrían contener potenciales candidatos a sustrato (Purificação 2008). Otra ventaja de la inmovilización covalente de la PtpA-D126A, es que nos permitió utilizar condiciones de lavado y elución exigentes (definidas en los estudios de SPR) que no afectan la unión de la fosfatasa a la matriz, pero que contribuyeron a reducir el aislamiento de interactores inespecíficos y proteínas abundantes que se asocian a la Sefarosa (Trinkle-Mulcahy et al. 2008). Por lo tanto, la inmovilización de la enzima sobre NHS-Sefarosa es una modificación que consideramos relevante y que nunca había sido descrita en los ensayos de ST reportados hasta ahora.

Además, en este trabajo confirmamos que otro factor importante para el éxito del ST fue el uso de extractos de proteínas enriquecidos en P-Tyr proteínas, obtenidos gracias a la inhibición de las PTPs endógenas del macrófago utilizando  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  y IAA. En ausencia de este tipo de tratamiento se ha reportado que el nivel de P-Tyr en los extractos celulares proteicos es indetectable (Buist et al. 2000). Nuestros resultados demostraron la importancia de adicionar el tratamiento con IAA además de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , ya que de esta forma se aumenta en un 25% el nivel de P-Tyr detectado en los extractos de proteínas de macrófago, respecto al detectado al utilizar sólo  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ . Además, el uso de ambos inhibidores parece esencial, ya que demostramos que al utilizar sólo el inhibidor  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , en los ensayos de ST se identifican un número menor de los potenciales sustratos, con muy pocos péptidos y por lo tanto con un *score* mucho menor.

Por último, la caracterización de la interacción entre la PtpA-D126A y los extractos proteicos de macrófagos por SPR, y la información extraída de estos ensayos es la primera vez que se reporta en la literatura. Esta etapa fue de suma utilidad antes de la realización de los ensayos de ST principalmente por dos razones. Primero, los análisis por SPR nos permitieron detectar que existe interacción entre componentes del extracto de macrófagos y la fosfatasa, y que dicha interacción involucra el sitio activo de la enzima. Segundo, mediante los ensayos de SPR detectamos que la interacción es estable a pulsos de alta concentración salina pero no a pulsos de pH ácido, lo cual nos permitió seleccionar, tal como ya mencionamos arriba, condiciones más estrictas durante las etapas de lavado y elución del ensayo de ST, reduciendo así interacciones inespecíficas.

Las modificaciones introducidas en la estrategia general de ST, deben ser consideradas en ensayos futuros con los nuevos mutantes de PtpA, así como en la búsqueda de sustratos de otras fosfatasas. Este trabajo ha motivado por ejemplo que nuestro grupo avance en la búsqueda de sustratos del factor de virulencia de otro patógeno intracelular, la fosfatasa de tirosina del virus Orf. Como perspectiva tenemos programado escribir una revisión metodológica sobre la estrategia de ST que incluya todas las consideraciones discutidas en la presente tesis.

## **4.2. Sustratos de PtpA: hacia la elucidación del papel de esta fosfatasa en la biología de *Mtb***

Como resultado de esta estrategia optimizada de ST, se identificaron por espectrometría de masa cuatro nuevos potenciales sustratos fisiológicos de la PtpA de *Mtb*: las proteínas humanas ECHA (TFP subunidad alfa), SQRD, ATPA y PFK. Es importante recordar que los mismos se identificaron con un score elevado, sistemáticamente en todas las réplicas biológicas de los ensayos de ST realizados, e independientemente de la estrategia de elución utilizada, y del análisis por espectrometría de masa utilizado (MALDI-TOF-MS y nano-LC-MS). Resultó sorprendente que utilizando este método optimizado no se detectaran los sustratos de PtpA previamente reportados (Bach et al. 2008) (Poirier et al. 2014). Por tanto, en primer lugar discutimos acerca de este contraste para luego profundizar en los candidatos identificados en este trabajo.

### **4.2.1. Sustratos de PtpA ya reportados**

Al inicio y transcurso de la parte experimental de la tesis, sólo habían sido reportados dos sustratos eucariotas de PtpA, la proteína VPS33B y la GSK3 $\alpha$  (Bach et al. 2008)(Poirier et al.

2014). Como se detalló en la introducción, la proteína VPS33B juega un rol clave en la regulación del tráfico de membranas y la vía endocítica, y se postula que la desfosforilación de la misma por parte de PtpA favorecería la inhibición de la acidificación del fagosoma y la maduración del mismo. La proteína GSK3 $\alpha$  es una quinasa de serina/treonina que actúa como reguladora de numerosas vías de señalización, incluyendo la apoptosis. Se sugiere que la desfosforilación de la misma por parte de PtpA inactiva la quinasa, inhibiendo la apoptosis durante las etapas tempranas de la infección.

Las proteínas VPS33B y GSK3 $\alpha$  no fueron capturados en nuestros ensayos de ST. Sin embargo, las diferencias en estos resultados deben analizarse cuidadosamente debido a las diferencias metodológicas sustanciales existentes entre estos trabajos y el nuestro. En primer lugar, el sustrato VPS33B fue aislado mediante la estrategia de ST utilizando el mismo mutante PtpA D126A que nosotros (Bach et al. 2008). Sin embargo el mismo no fue ni purificado de la misma manera, ni caracterizado estructuralmente. Además el resultado de su caracterización funcional no concuerda con lo esperado para el cambio D/A introducido. Si analizamos en detalle la metodología, podemos ver que el mutante PtpA-D126A utilizado en dicho ST fue purificado sólo por cromatografía de afinidad, no habiéndose realizado una etapa posterior de purificación por cromatografía de exclusión molecular como en nuestro trabajo. Además, los autores reportan que dicho mutante es completamente inactivo, resultado no esperado teniendo en cuenta la caracterización del mutante D/A en otras PTPs, incluyendo la PtpA de *Mtb* (Madhurantakam et al. 2008). De hecho, el mutante PtpA-D126A purificado por nuestro grupo no presentó una  $k_{cat}$  nula sino que fue 40 veces menor que la de la PtpA-wt (evaluada con *p*NPP como sustrato), y esta relación es similar a la reportada para este mismo mutante en un estudio cinético detallado (Madhurantakam et al. 2008). Además, el diseño experimental utilizado en nuestro trabajo implicó el uso de condiciones de lavado y elución en los ensayos de ST que fueron más rigurosas, por lo cual se pueden haber perdido componentes que estuvieran interaccionando con menor afinidad con la PtpA. Sin embargo, analizamos cuáles proteínas fueron identificadas por espectrometría en los lavados y no detectamos a éstas proteínas. Asimismo, la estrategia de ST utilizada en nuestro trabajo no fue la misma que la empleada por Bach *et al.* En este caso incubaron la PtpA-D126A con el extracto de macrófagos y luego incubaron la mezcla con una matriz de afinidad (Ni-NTA) para purificar los complejos a través del His-tag presente en la fosfatasa. Como discutimos anteriormente, en este tipo de matriz los grupos remanentes que no se unen a la fosfatasas, pueden unir interactores inespecíficos, dificultando el aislamiento de proteínas menos abundantes que sean reales candidatos. Sumado a esto, lo que realmente dificulta aún más la comparación es que en el artículo de Bach *et al* no se presenta ninguna tabla conteniendo las proteínas identificadas por espectrometría de masa, por lo cual desconocemos que otras proteínas fueron identificadas en dicho ensayo además de la proteína reportada como sustrato, VPS33B.

Con respecto a la proteína GSK3 $\alpha$ , la misma fue identificada como sustrato de PtpA utilizando una aproximación experimental completamente diferente a la del ST. Los autores utilizaron una estrategia proteómica denominada *kinome analysis* para identificar proteínas que participan en las vías de señalización del macrófago y cuya fosforilación es modificada por la PtpA de *Mtb* (Poirier et al. 2014) En dicho estudio, compararon el estado de fosforilación de una serie de quinasas de macrófago, que se sabe son importantes en la señalización celular. Este análisis lo realizaron en macrófagos no infectados, infectados con *Mtb* y en macrófagos infectados con  $\Delta$ PtpA *Mtb*. Mediante este método, observaron que la PtpA afecta el patrón de fosforilación de una serie de proteínas señalizadoras, entre ellas la quinasa GSK3  $\alpha$ .

Por lo tanto, el hecho que VPS33B y GSK3 $\alpha$  no hayan sido capturados en nuestros ensayos de ST parecería ser una consecuencia de las diferentes aproximaciones experimentales utilizadas y por lo tanto no invalida el potencial de las moléculas identificadas en nuestros ensayos de ST como sustratos de PtpA. Además, como ya mencionamos, las fosfatasa, al igual que las quinasas, son capaces de utilizar múltiples sustratos.

Recientemente, Wang et al (Wang et al. 2015) reportaron a la quinasa Jnk y la MAPK p38 como nuevos sustratos de la PtpA. Sugieren que la desfosforilación de estas quinasas suprimiría la respuesta inmune innata. Con el objetivo de encontrar blancos de PtpA en la célula hospedero, los autores analizaron la capacidad de PtpA de modular vías de señalización del sistema inmune innato del hospedero, como la vía NF- $\kappa$ B y la vía de las MAPK quinasas. Observaron que la expresión transitoria de PtpA en células hepáticas humanas HEK293T disminuye la fosforilación de Jnk y p38, inhibiendo estas vías. Analizaron luego la expresión de citoquinas inflamatorias en macrófagos infectados con la cepa BCG $\Delta$ PtpA o con una cepa de *M. smegmatis* que sobreexpresa PtpA de *Mtb*, y observaron que PtpA es capaz de disminuir la expresión de varias moléculas inmunomoduladoras, entre ellas TNF, IL-1 $\beta$  y IL-12, promoviendo la sobrevivencia intracelular de la micobacteria. Los autores reportaron que *in vitro*, PtpA presenta muy poca actividad fosfatasa sobre los sustratos fosforilados p-Jnk y p-p38, sugiriendo la existencia de un factor adicional en el hospedero necesario para la actividad fosfatasa. Mediante ensayos de doble híbrido identificaron que la PtpA interacciona de forma no covalente con la ubiquitina del hospedero a través de una región de PtpA que no representa un dominio conocido de unión a ubiquitina. Ensayos *in vitro* demostraron que esta interacción con la ubiquitina aumenta la actividad de la PtpA utilizando como sustrato a Jnk y p38 (evidencias por *western blot*), así como con el sustrato artificial pNPP. Asimismo, también reportan que la actividad de PtpA frente al sustrato ya reportado VPS33B también aumenta en presencia de ubiquitina. En este artículo la aproximación experimental es totalmente diferente a la nuestra, ya que los autores no intentan capturar sustratos de la PtpA, sino que analizan el efecto de la sobreexpresión de la fosfatasa en las células, para identificar posibles sustratos.

Como podemos ver, el número de nuevos sustratos de PtpA se incrementa y avanza también el conocimiento de cómo la actividad de esta fosfatasa es regulada. Estudios *in vitro* previos ya habían demostrado que la fosforilación en la Tyr128 y la Tyr129, aumentan la actividad de la fosfatasa, sugiriéndose a la PtkA bacteriana como responsable de esta fosforilación (Zhou et al. 2015). Cabe señalar que la PtpA producida en esta tesis en la bacteria *E. coli* no solo es activa sino que además se obtiene fosforilada en tirosina como lo pudimos verificar en los diferentes WB con el anticuerpo anti-P-Tyr. Además, se ha descrito recientemente que *in vitro* la fosforilación en Thr45 de PtpA, por las Ser/Thr quinasas como la PknA, aumenta la actividad de la enzima (Zhou et al. 2015). Además, se ha visto que la S-nitrosilación de la PtpA en la cisteína no catalítica Cys53 disminuye la estabilidad y actividad de la proteína (Matiollo et al. 2013). Se ha postulado también que las PTPs regulan su actividad mediante la oxidación reversible de las Cys catalítica por compuestos tales como el peróxido de hidrógeno y el peroxinitrito. En el caso de la PtpA y la PtpB se ha sugerido que esto protegería a la enzima del ambiente oxidante generado durante la infección (Groen et al. 2005)(Ostman et al. 2011). Nuestro grupo ha evaluado este aspecto (Labandera 2012) determinando las constantes de velocidad de las reacciones entre la PtpA y la PtpB y estos agentes oxidantes, pero los valores obtenidos ( $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) son tres órdenes de magnitud menor que los reportados para otras PTPs (Mallozzi et al. 1997), por lo cual parece difícil que estas fosfatasas de *Mtb* sean blanco celular de estas moléculas.

#### **4.2.2. TFP humana como sustrato de la PtpA de *Mtb***

La TFP (ECHA/ECHB) humana resulta un candidato interesante como potencial sustrato fisiológico de la PtpA de *Mtb* ya que juega un rol clave en la beta-oxidación de los ácidos grasos, catalizando tres de las cuatro reacciones de esta vía. Se conoce bien que los productos de la beta-oxidación de los ácidos grasos alimentan directamente e indirectamente la cadena respiratoria para la producción de ATP por fosforilación oxidativa. Como ya hemos mencionado en los resultados de esta tesis las subunidades de este complejo enzimático son sintetizadas en el citosol de la célula y posteriormente son translocadas a la mitocondria, donde cumplen su función (Eaton et al. 2000); recordemos que la mayoría de las proteínas mitocondriales son sintetizadas en ribosomas libres del citosol para luego ser importadas hacia la mitocondria). Estos antecedentes nos permiten considerar que la PtpA de *Mtb*, la cual ha sido localizada en el citosol del macrófago (Bach et al. 2008), podría encontrarse con la/las subunidades de la TFP en su tránsito a la mitocondria. Por otro lado, como ya hemos resaltado, la subunidad ECHA de la TFP es una de las proteínas que se ha observado dejan de detectarse en la mitocondria de macrófagos infectados con la cepa virulenta de *Mtb* H37Rv, pero no en aquellos infectados con la cepa avirulenta *Mtb* H37Ra (Jamwal et al. 2013). Todo esto sugiere que la disminución de la ECHA en la mitocondria podría causar una disminución drástica en la actividad de la beta-oxidación y como consecuencia afectar la producción de ATP, colocando a disposición de la

bacteria los ácidos grasos no oxidados por esta vía metabólica. Esto es relevante ya que existen evidencias que indican que los lípidos del hospedero constituyen la fuente primaria de nutrientes para *Mtb* durante la infección (Daniel et al. 2011). Hasta ahora no existen evidencias acerca de cuál es el factor bacteriano responsable de la disminución de los niveles de ECHA en la mitocondria, por lo cual la posibilidad que PtpA participe en este efecto es sumamente interesante; la desfosforilación de TFP(ECHA/ECHB) por la PtpA, podría alterar su localización final a través de la interacción con por ejemplo chaperonas capaces de dirigirla al proteasoma para su degradación, o reclutándola en algún otro compartimento celular. Lo que apoya esta hipótesis es que hemos demostrado *in vitro* que la TFP interacciona con la PtpA y es sustrato de la misma. Además, los estudios con  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  sugieren que la interacción involucra al sitio activo de PtpA, y el valor de la constante de afinidad de dicha interacción ( $5\mu\text{M}$ ), a pesar de ser preliminar, es del orden del reportado para otras fosfatasa y sus sustratos (Czikora et al. 2011).

Por otro lado, la escasa cantidad de TFP obtenida al purificarla a partir de los extractos de macrófagos nos permitió realizar un número limitado de ensayos de actividad fosfatasa. Por lo cual sería interesante en el futuro disponer de una mayor cantidad de proteína que posibilite determinar los parámetros cinéticos de PtpA, utilizando TFP como sustrato o sus subunidades por separado. Para seguir la actividad fosfatasa contamos con un kit comercial que nos permite dosificar el Pi liberado, producto de la desfosforilación enzimática (Echelon, *Malachite Green*). Asimismo, disponer de una mayor cantidad de proteína nos permitirá realizar nuevos ensayos de interacción por SPR para determinar con mayor exactitud las constantes de interacción. En estos ensayos, proponemos inmovilizar la PtpA a la superficie del chip y no la TFP como hemos realizado hasta ahora. Esto permitirá contar con una superficie estable y fácilmente regenerable, tal como ya lo hemos demostrado ocurre cuando la PtpA es inmovilizada. En la literatura no existen evidencias de la regulación de la actividad de la TFP por fosforilación/desfosforilación, sin embargo en ambas subunidades de la TFP humana se han detectado Tyr fosforiladas, anotadas en la base de datos PhosphoSitePlus (Hornbeck et al. 2012). Nuestro grupo inició un análisis *in silico* de acoplamiento molecular, entre la estructura cristalográfica de la PtpA y ECHA humana previamente modelizada, que sugiere que la fosfatasa interacciona de manera preferencial con una Tyr de la ECHA aún no reportada como fosforilada (Tyr 271). Esto podrá ser validado una vez obtenida una mayor cantidad de proteína, para la cual deberemos demostrar previamente que se encuentra fosforilada en Tyr.

Resta aún por demostrar si *in vivo* la TFP (ECHA/ECHB) es sustrato de PtpA, y si fuera así que efecto tiene la desfosforilación sobre la localización subcelular y/o la actividad de la TFP. Una vez realizado esto podríamos asegurar si PtpA juega un rol relevante en la inhibición del catabolismo lipídico. Para abordar este estudio podríamos utilizar el modelo celular desarrollado en este trabajo, aunque previamente es necesario optimizarlo para lograr un mayor porcentaje de células transducidas que expresen la fosfatasa. En estas células o en

fracciones mitocondriales y citosólicas de las mismas podríamos evaluar la presencia o ausencia de la PtpA y de la TFP, y el estado de fosforilación de esta última. Para evaluar la fosforilación será necesario contar con anticuerpos específicos contra la PtpA e idealmente contra la TFP sin fosforilar y fosforilada. Como ya se comentó, la producción en llama del anticuerpo contra PtpA está en curso en colaboración con el Dr. Gualberto González. Comercialmente por ahora existen sólo anticuerpos contra la forma no fosforilada de la TFP humana. Dichos anticuerpos se podrán utilizar en un modelo celular eucariota que exprese la PtpA-wt o mutantes como los producidos en esta tesis (PtpA-D126A o PtpA-C11S). Por otro lado nuestro grupo ha avanzado en el análisis de las hipótesis planteadas evaluando la interacción entre la PtpA y la TFP (ECHA) en un contexto celular, a través de la estrategia de doble híbrido en levadura (Tesina de Licenciatura en Bioquímica de Vivian Irving, en redacción). Los resultados de la interacción entre la ECHA y la PtpA son promisorios aunque aún preliminares. Esta metodología será utilizada a lo largo del año también con los otros potenciales sustratos de PtpA.

#### **4.2.3. SQRD, ATPA y PFK como potenciales sustratos de PtpA**

Estos tres potenciales sustratos aún no los hemos validado *in vitro* por lo cual queda mucho trabajo por delante. Sin embargo podemos discutir algunas de las características que los hacen relevantes y las perspectivas de estudio con ellos. Recordemos que al igual que las subunidades de la TFP, la SQRD y la ATPA son sintetizadas a partir de genes nucleares en el citosol y luego translocadas a la mitocondria dónde cumplen su función. Así, de la misma manera que lo discutido para la TFP, estos antecedentes nos permiten postular que la PtpA podría desfosforilarlos en el citosol, afectando sus funciones. En cambio, la PFK es sintetizada y actúa exclusivamente en el citosol. ¿Qué funciones tienen estas proteínas y cómo la desfosforilación podría afectarlas? A continuación discutimos estos puntos, en base a la información disponible que, como veremos, es limitada.

La SQRD es el segundo candidato a sustrato identificado con alto *score* por espectrometría de masa. Como hemos descrito ya en los resultados, esta enzima cataliza la oxidación del sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) proveniente del metabolismo de aminoácidos que contienen azufre, y los electrones provenientes de dicha oxidación entran en la cadena respiratoria contribuyendo con la síntesis de ATP (Goubert et al. 2007). Además, los niveles de H<sub>2</sub>S deben mantenerse debajo de los niveles tóxicos, que de otra forma inhiben la cadena respiratoria a través de la inhibición de la citocromo oxidasa del complejo IV, interrumpiendo así la producción de ATP mitocondrial (Cooper & Brown 2008). Por otro lado, la actividad de la SQRD se ha visto también asociada con las vías antimicrobianas del macrófago, observándose que en macrófagos inflamatorios la acumulación de H<sub>2</sub>S contribuye en disminuir los efectos antimicrobianos del peroxinitrito, como resultado de su reacción con H<sub>2</sub>S (Filipovic et al. 2012). Interesantemente, se ha reportado que la SQRD en mamíferos se expresa en varios tejidos, incluyendo el pulmón

(Ackermann et al. 2014). Asimismo, se ha observado que los monocitos y macrófagos presentan una mayor capacidad de oxidación del H<sub>2</sub>S dependiente de SQRD con respecto a otros tipos celulares que no pertenecen al sistema inmune (Lagoutte et al. 2010). Por otro lado, al igual que la ECHA, la SQRD deja de ser detectada específicamente en la mitocondria de macrófagos infectados con la cepa virulenta de *Mtb* (Jamwal et al. 2013) lo que sugiere que su ausencia en la mitocondria podría aumentar el H<sub>2</sub>S con la consecuente disminución de la actividad mitocondrial y de NO· que favorecería la sobrevivencia de la bacteria. No existe aún en la literatura información acerca de si la fosforilación/desfosforilación modula la actividad/localización de la SQRD ni acerca de su rol en la interacción con otros patógenos, pero han sido reportados tres sitios de P-Tyr en la SQRD humana, en la base de datos PhosphoSitePlus (Hornbeck et al. 2012). Por lo tanto sería de interés evaluar si PtpA está relacionada con la eventual disminución de los niveles de SQRD mitocondriales en los macrófagos infectados con *Mtb*. Se podrá abordar en el futuro los ensayos de validación *in vitro* de este candidato ya que existen actualmente anticuerpos contra dicha proteína humana.

La ATPA es un componente clave del dominio catalítico F1 de la ATP sintasa, que cataliza la etapa final de producción de energía en la mitocondria (Jonckheere et al. 2012). Como describimos en resultados se han reportado varias modificaciones post-traduccionales para algunas de las subunidades de este complejo enzimático, incluyendo fosforilación en Tyr en la subunidad gamma (Di Pancrazio et al. 2006), lo que abre la posibilidad de que exista una regulación a través de este tipo de modificación para el cual aún no se conoce su efecto (Kane & Van Eyk 2009). Por otro lado, como describimos anteriormente, al igual que la ECHA, la ATPA deja de detectarse específicamente en la mitocondria de macrófagos infectados con la cepa virulenta de *Mtb* (Jamwal et al. 2013), lo que seguramente afecte la producción de ATP. Esto reforzaría la idea que en los macrófagos infectados el ATP no está siendo producido principalmente por fosforilación oxidativa en la mitocondria del macrófago, lo cual podría favorecer a la bacteria debido a la disminución en la generación de especies reactivas del oxígeno. En este marco, surge la interrogante si el ATP producido por la glucólisis puede compensar esta pérdida energética mediante una activación de las enzimas claves de esta vía. Esta posible compensación podría explicar el hecho que Jamwal *et al.* observaron aumentados los niveles de ATP total en los macrófagos infectados con la cepa virulenta de *Mtb* respecto a la cepa avirulenta.

La PFK fue la única proteína identificada como potencial sustrato de PtpA cuya función no es mitocondrial. Para su validación logramos purificar la PFK humana de macrófagos, pero nos llamó la atención que no pudimos detectarla fosforilada en Tyr (utilizando un anticuerpo anti P-Tyr o por MS). No podemos descartar que la proporción de P-Y-PFK en la muestra sea baja y/o lábil. Tampoco podemos descartar que la PFK aislada en los ensayos de ST derive de su asociación a otro de los candidatos identificados, no siendo un interactor directo de la PtpA. La validación de este candidato presenta limitaciones porque requiere evaluar en un modelo

celular el efecto de la expresión de la PtpA-wt o del mutante completamente inactivo PtpA-C11S sobre el nivel de fosforilación en Tyr de la PFK y no existen Ac contra la forma P-Tyr de la PFK. Más allá de que aún no sabemos si PFK es sustrato *in vitro* de PtpA, resulta interesante pensar en cuales podrían ser las consecuencias de la desfosforilación por PtpA. Hemos comentado ya que la PFK es la enzima clave en la regulación de la glucólisis en mamíferos, y que resulta activada por fosforilación en Tyr, estimulando por tanto la glucólisis. Además, es la única proteína de los candidatos identificados que se ha detectado fosforilada en Tyr (en particular, en la PFK de músculo esquelético de ratón (Coelho & Sola-Penna 2013). Esta fosforilación en Tyr se piensa sería introducida por una quinasa de la vía Jak/STAT estimulada por serotonina, y tendría como efecto la redistribución intracelular de la enzima mediante la interacción de esta con los filamentos de actina (Coelho et al. 2007), (Coelho & Sola-Penna 2013). En el mismo sentido, en los eritrocitos se observó que la insulina activa la PFK humana (Zancan & Sola-Penna 2005). Curiosamente, el lactato se ha postulado que a altas concentraciones es capaz de disminuir la actividad de la PFK en todos los tejidos de ratón evaluados (hígado, riñón, tejido muscular esquelético y cardíaco) (Leite et al. 2011). Estos autores sugieren al lactato como un metabolito relevante en la regulación de la actividad de la vía glucolítica, y presentan evidencias de que el mismo actuaría como antagonista del activador alostérico de la PFK, la fructosa-2,6-bisfosfato (molécula estimuladora de la glucólisis cuyos niveles aumentan por acción de la insulina). En todos estos trabajos descritos, el sitio específico de fosforilación en la PFK aún no se conoce, ni tampoco cual es la fosfatasa implicada en la modulación de la respuesta. Considerando todos estos antecedentes, y suponiendo que la PFK sea validada como sustrato, podríamos especular que *Mtb* durante la infección inyecta la PtpA dentro del macrófago como un efector bacteriano que le permita controlar el nivel de actividad de la vía glucolítica del macrófago, y de esta manera la disponibilidad de glucosa para su metabolismo.

#### **4.2.4. La mitocondria, blanco de patógenos intracelulares**

Los candidatos a sustratos de PtpA identificados nos hicieron pensar en el papel de la mitocondria como blanco de *Mtb*. Esta idea no es nueva cuando pensamos en la interacción patógeno-hospedero, pero es poca la información acerca de efectores de patógenos, y en particular de *Mtb*, que tengan como blanco proteínas mitocondriales.

Desde hace tiempo se sabe que la mitocondria representa un blanco recurrente para patógenos intracelulares ya que juega un rol esencial en el metabolismo energético, la respuesta oxidativa y la inducción de las vías de muerte celular en infecciones (Green & Kroemer 2004) (Arnoult et al. 2009). A nivel del metabolismo existen evidencias de inhibición de la beta-oxidación en infecciones por virus (Seo & Cresswell 2013) (Kao et al. 2015) (Amako et al. 2015). Esta inhibición por un lado aumentaría la disponibilidad de los ácidos grasos del hospedero para la síntesis de componentes lipídicos del virus, necesarios por ejemplo para la

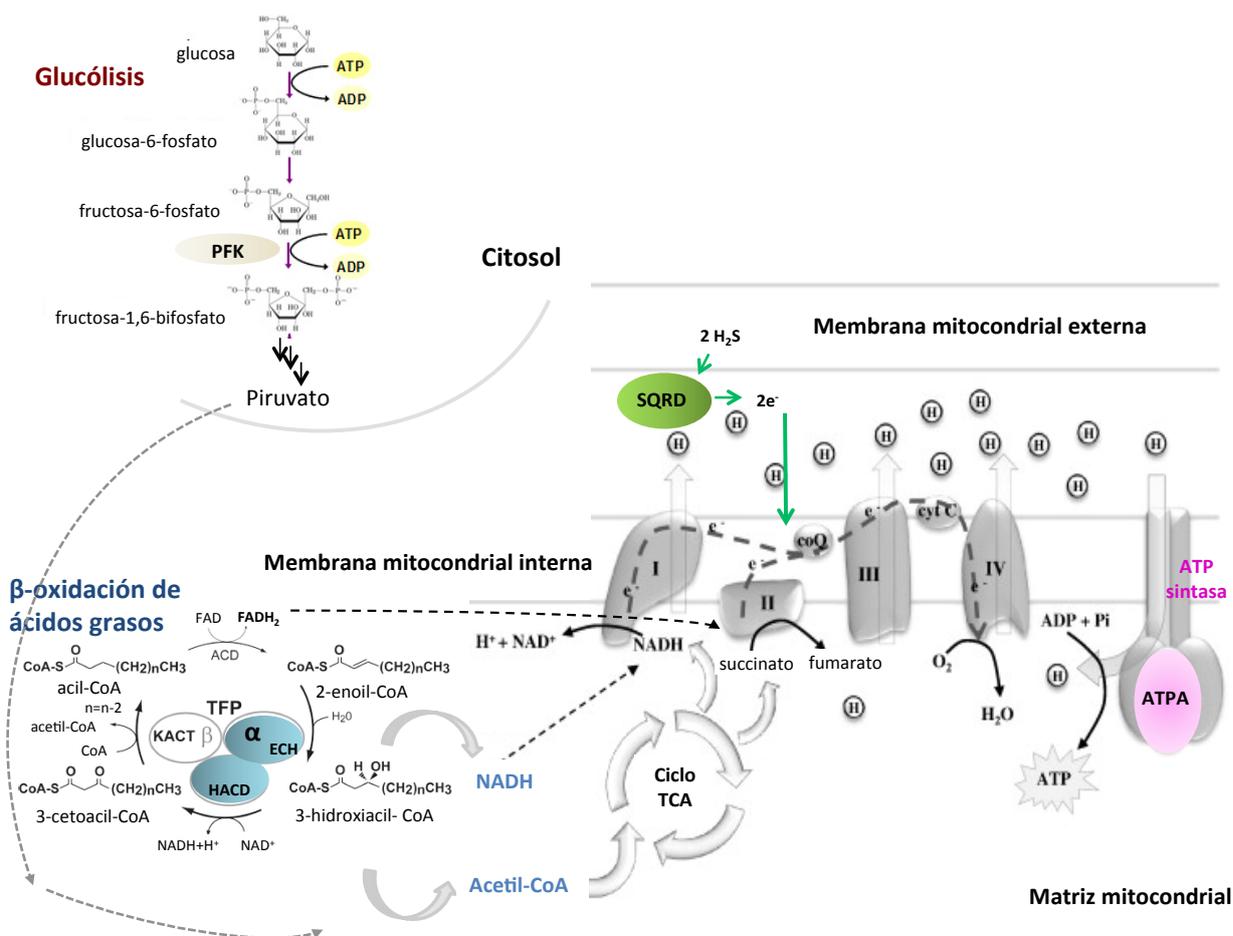
formación de la envoltura del virión. Por otro lado, se ha observado que la acumulación de lípidos en la célula puede inducir estrés oxidativo con la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-6 y TNF $\alpha$ ), pero los mecanismos responsables y la repercusión que tendría sobre la replicación y/o diseminación del virus no se han elucidado aún. Varias proteínas secretadas por patógenos (i.e. *Salmonella*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *H.pylori*, *Neisseria* spp) son transferidas a la célula y dirigidas hacia la mitocondria regulando la apoptosis celular (Boya et al. 2001; Kozjak-Pavlovic et al. 2008).

En el caso de la infección con *Mycobacterium*, se ha descrito que la actividad mitocondrial se altera durante la infección mediante un proceso que aparentemente sería dependiente de la virulencia de la cepa (Abarca-Rojano et al. 2003) (Chen et al. 2006). La infección de macrófagos humanos con la cepa virulenta H37Rv, pero no con la avirulenta H37Ra, induce una disminución en el potencial transmembrana mitocondrial, resultando en la degradación de la mitocondria y necrosis de la célula (Chen et al. 2006). Por otro lado, un estudio bioinformático de la secuencia genómica de *Mtb* (Moreno-Altamirano et al. 2012) mostró que al menos 19 proteínas en un total de 4246, son proteínas posiblemente importadas por la mitocondria dado que poseen una secuencia similar a la de los péptidos que dirigen específicamente el tránsito de las proteínas eucariotas a dicho organelo. De esta lista validaron experimentalmente sólo dos proteínas, la PE\_PGRS33 y el factor de virulencia p27. Como hemos descrito en los resultados, la fosfatasa PtpA no posee en su secuencia un péptido señal que la dirija a la mitocondria, por lo cual no se menciona en el trabajo de Moreno-Altamirano *et al.* Esto no descarta la posibilidad de que interfiera con funciones mitocondriales si, como ya se mencionó, interfiere con proteínas mitocondriales durante su tránsito desde el citosol a dicho organelo.

### **4.3. Avances para el estudio de la modulación del fenotipo de macrófagos por PtpA**

El hecho que la PtpA se localice en el citosol del macrófago, sea una de las dos únicas fosfatasas presentes en *Mtb*, sumado a que la fosforilación/desfosforilación constituye un mecanismo clave en el encendido y apagado de vías de señalización intracelular, hacen de por sí interesante el estudio de cómo PtpA puede afectar el fenotipo del macrófago. Creemos que este trabajo de tesis ha aportado hacia cómo abordar este estudio. El hecho que la TFP se comporte *in vitro* como un sustrato de PtpA, y que otras tres proteínas asociadas al metabolismo -SQRD, ATPA y PFK- son potenciales interactores de PtpA, le da relevancia a posibles efectos de PtpA sobre el metabolismo energético del macrófago (Figura 4.1). Si ocurren en un contexto celular las interacciones de PtpA con estos candidatos, eventos de desfosforilación de estas proteínas podrían interferir con su localización mitocondrial y/o su actividad, afectando por tanto dicho metabolismo. Además, es lógico suponer que un eventual efecto de PtpA a nivel metabólico comprometería otras capacidades funcionales de la célula.

¿Qué sabemos del metabolismo del macrófago en el contexto de la infección por *Mtb*? Se propone que durante la infección ocurre una transición “*switch*” desde un metabolismo en donde el ATP es producido fundamentalmente por fosforilación oxidativa hacia un metabolismo donde los niveles de ATP son asegurados gracias a la activación de la vía glucolítica. Esta transición viene ligada a la necesidad de regenerar el poder reductor mediante la conversión del piruvato en lactato, aún en condiciones de aerobiosis (fenómeno descrito como efecto Warburg).



**Figura 4.1.** Vías metabólicas en las cuales están implicados los potenciales sustratos de PtpA.

La fosfofructoquinasa (PFK) cataliza la conversión de fructosa 6-fosfato a fructosa 1,6-bisfosfato, etapa de control más importante durante la glicólisis. La proteína trifuncional (TFP) cataliza 3 de las 4 etapas de la beta-oxidación de ácidos grasos: la subunidad α posee dos dominios, uno con actividad 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (HACD) y otro con actividad enoil-CoA-hidratasa (ECH), y la subunidad β posee actividad 3-cetoacil-CoA tiolasa (KACT). La sulfuro quinona oxidoreductasa (SQRD) cataliza la oxidación del H<sub>2</sub>S, y los electrones producidos son transferidos a la cadena respiratoria. La subunidad α de la ATP (ATPA) cataliza la etapa final de producción de energía en la mitocondria.

Esta hipótesis se ve apoyada por los recientes estudios metabolómicos realizados en un modelo de infección con *Mtb* en cobayo y ratón donde demuestran que en todos los tejidos infectados (sean granulomatosos o no) hay acumulación de lactato (Shin et al. 2011) (Somashekar et al. 2011) (Somashekar et al. 2012). Por tanto, parecería interesante analizar si PtpA repercute en este *swicht* metabólico. Varias posibilidades podrían plantearse, incluyendo que un descenso más aumentado de la actividad mitocondrial forzaría aún más el uso de la glucólisis en aerobiosis.

Para analizar los efectos de PtpA sobre el fenotipo del macrófago, particularmente sobre su metabolismo, nos planteamos introducir la actividad de PtpA-wt en los macrófagos utilizando un vector viral, y medir el nivel de glucosa y lactato en los sobrenadantes de cultivo, como indicadores de posibles cambios en el metabolismo energético. Esto implicó el ajuste de un modelo experimental en el cual no teníamos experiencia y que de acuerdo a la literatura y experiencia previa en nuestro laboratorio no es sencillo. En general los macrófagos son células muy difíciles de transfectar con los procedimientos que habitualmente funcionan en otros tipos celulares. Por eso, en colaboración con la Dra. M. Berois, utilizamos un vector viral HSV-1 amplicón para la transducción de macrófagos THP-1, apostando a que la infección por un virus portador de PtpA-wt sea una vía más eficiente para la expresión de esta proteína en el macrófago. El uso de vectores virales está reportado que permite obtener altos niveles de transfección aunque los rangos reportados son muy variables (entre un 30 -70% usando lentivirus (Miller & Blystone 2015)). No encontramos reportes del uso del vector viral tipo amplicón usado en la presente tesis para transducir macrófagos, por lo cual nuestro trabajo es original y valioso en este sentido. El porcentaje de transducción que obtuvimos fue cercano al 30%, que si bien no es el deseable, seguramente pueda ser optimizado ya que en el marco de esta tesis sólo realizamos un experimento y no se pudo abordar la optimización. Para aumentar el porcentaje de células transducidas lo más inmediato sería aumentar la multiplicidad de infección, es decir la relación entre el vector y las células de macrófago. En nuestro caso utilizamos una multiplicidad de 1.4, pero de acuerdo a los protocolos utilizados con otros tipos celulares sería posible trabajar a valores de 5 a 10 (Stripecke et al. 2000). Esto requiere la producción de un gran número de partículas virales lo cual no sólo es costoso sino que además requiere probablemente la optimización de los protocolos de preparación, ya que nos llamó la atención el bajo rendimiento que obtuvimos. Otro punto que se debe considerar en la optimización de la transducción es el efecto tóxico sobre las células, tanto el asociado a la transducción con el vector viral *per se*, como a la expresión de la fosfatasa. Para ello es fundamental medir la viabilidad celular. En nuestro estudio, debido a la reducida cantidad de partículas virales, no fue posible un diseño experimental que nos permitiera examinar muchos parámetros en las células, ya que sólo contamos con muy pocas células por pozo y apenas un duplicado de cada condición. Pensamos evaluar la viabilidad por citometría de flujo sobre las células recuperadas, pero esto no fue posible debido a que la transducción indujo una muy fuerte adherencia al plástico provocando daños importantes durante el procedimiento para

despegarlas. Así, en función de la experiencia ganada con este ensayo resultará más sencillo y confiable medir la viabilidad celular en futuros ensayos de transducción sobre las células adheridas utilizando colorantes vitales, yoduro de propidio y/o sondas fluorescentes comerciales. Por otro lado, se intentó medir la actividad fosfatasa en los extractos de las células transducidas, como medida del éxito de la expresión de PtpA en los macrófagos. Sin embargo, esta medida no fue útil ya que no vimos diferencias entre las células transducidas con y sin PtpA a pesar del 30% de transducción obtenida. Creemos que esto se debe no sólo al bajo porcentaje de transducción de las células, sino al hecho que el ensayo de actividad fosfatasa utilizado determina la actividad de todas las fosfatasas y no específicamente la de las PTPs.

Apuntando a avanzar en los posibles efectos de PtpA sobre el fenotipo del macrófago, en las condiciones de transducción alcanzadas evaluamos el efecto de PtpA sobre los niveles de glucosa, lactato, y la secreción de las interleuquinas IL-1 $\beta$  e IL-6. En estos ensayos el diseño experimental -con sólo una réplica por condición - y los datos obtenidos no permitieron realizar un análisis estadístico, por lo cual la discusión de estos resultados se basa en tendencias que deben necesariamente ser verificadas experimentalmente. Como se describió en los resultados no se registraron cambios notorios en los niveles de glucosa y lactato, aunque se observó una mínima tendencia hacia una mayor producción de lactato en las células transducidas con PtpA respecto a las controles (vector sin PtpA). El hecho de que tampoco observamos diferencias en los niveles de estos metabolitos cuando estimulamos las células con LPS, un estímulo proinflamatorio que asociaríamos a un cambio hacia la glucólisis aeróbica, utilizado en concentraciones de dos órdenes de magnitud de diferencia, sugiere que la medición de estos metabolitos en el sobrenadante del cultivo celular, y en las condiciones utilizadas, podría no tener suficiente sensibilidad para nuestros propósitos. Por tanto, es necesario mejorar el diseño experimental para el análisis del eventual efecto de PtpA sobre el metabolismo energético del macrófago. Como alternativa nos planteamos evaluar otros parámetros. Por ejemplo, sería interesante determinar el consumo de oxígeno dependiente de distintos nutrientes como glucosa y ácidos grasos, utilizando un equipo OROBOROS y/o utilizando un Seahorse XFe Analyzer (en colaboración con la Dra. Celia Quijano). El objetivo de estos estudios, será determinar posibles transiciones en el metabolismo energético, determinado cuál de las vías celulares es principalmente la responsable de la síntesis de ATP. Para ello proponemos medir el consumo de oxígeno y la concentración de ATP intracelular en ausencia y presencia de inhibidores de las distintas vías: 2-desoxiglucosa, inhibidor de la hexoquinasa, el primer paso de la glucólisis (Wu et al. 2007); y etomoxir, inhibidor de la carnitin-palmitoil transferasa, que impide la entrada de los ácidos grasos a la mitocondria dónde ocurre la beta-oxidación (Spurway et al. 1997). En estos experimentos será posible controlar específicamente en células el consumo de oxígeno mitocondrial, por ejemplo, luego de frenar la síntesis de ATP mitocondrial mediante el agregado de inhibidores de diferentes complejos de la cadena

respiratoria (antimicina A, oligomicina) o agentes desacoplantes como el carbonil cianida p-trifluorometoxi-fenilhidrazona).

En contraste con el análisis metabólico, fue notorio que la expresión de PtpA provocó un aumento en la respuesta de citoquinas inflamatorias, determinada en función de los niveles de IL-1 $\beta$  e IL-6, efecto que como ya se mencionó debe verificarse. Resulta necesario reproducir estos resultados, pero además sería importante determinar si este aumento se debe a la actividad de la PtpA, para lo cual proponemos realizar en paralelo ensayos de transducción con vectores virales que permitan la expresión de PtpA o del mutante inactivo PtpA-C11S. El eventual aumento inducido por PtpA de los niveles de estas citoquinas contradice lo reportado por Wang *et al.* (Wang et al. 2015); en este trabajo se observó una disminución en los niveles de citoquinas proinflamatorias TNF e IL-1 $\beta$  al infectar macrófagos humanos con una cepa de *M. smegmatis* que sobreexpresa la PtpA de *Mtb*. Sin embargo este contraste podría deberse al uso de dos modelos diferentes, es decir los efectos sobre el macrófago podrían diferir cuando se expresa la PtpA en el contexto de una infección viral versus la infección por la bacteria *M. smegmatis*. Especulando acerca de este resultado y en base a lo anteriormente discutido, podemos sugerir que si la PtpA interfiere con la actividad de la TFP y afecta el metabolismo de los lípidos, se acumularían ácidos grasos en el citosol. Esta acumulación, si existiera en las condiciones de nuestro ensayo, podría inducir un aumento en la producción de interleuquinas en el macrófago (según se ha observado en otros modelos, (Kao et al. 2015)). En contraste, cuando ocurre que PtpA está presente por la infección con *M. smegmatis*, la bacteria consume estos ácidos grasos (con fines energéticos y/o biosintéticos) evitando el aumento en el nivel de citoquinas. De acuerdo con lo anterior, como perspectiva, sería interesante estudiar el rol de PtpA en el contexto de la infección por *Mtb* (a través de colaboraciones internacionales) y examinar qué vías de señalización celular mediadas por PtpA podrían resultar alteradas, incluyendo aquellas asociadas al metabolismo lipídico, así como también a la producción de citoquinas y mediadores inflamatorios tóxicos para la bacteria (por ejemplo especies reactivas del oxígeno y nitrógeno y péptidos antimicrobianos).

En conclusión en esta tesis logramos avanzar en el conocimiento de un nuevo papel de la PtpA de *Mtb* en el metabolismo del macrófago, que abre la posibilidad de explorar un número importante de hipótesis aún abiertas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abarca-Rojano, E. et al., 2003. Mycobacterium tuberculosis Virulence Correlates with Mitochondrial Cytochrome c Release in Infected Macrophages. *Scandinavian Journal of Immunology*, 58(4), pp.419–427.
- Ackermann, M. et al., 2014. The vertebrate homologue of sulfide-quinone reductase in mammalian mitochondria. *Cell and Tissue Research*, pp.779–792.
- Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O., 2006. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*, 124(4), pp.783–801.
- Alonso, A. et al., 2004. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*, 117(6), pp.699–711.
- Amako, Y. et al., 2015. Hepatitis C virus attenuates mitochondrial lipid  $\beta$ -oxidation by downregulating mitochondrial trifunctional-protein expression. *Journal of virology*, 89(8), pp.4092–101.
- Arnoult, D. et al., 2009. The role of mitochondria in cellular defense against microbial infection. *Seminars in Immunology*, 21(4), pp.223–232.
- Asensio, J.G. et al., 2006. The virulence-associated two-component PhoP-PhoR system controls the biosynthesis of polyketide-derived lipids in Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Biological Chemistry*, 281(3), pp.1313–1316.
- Avadhani, N.G., 2011. Targeting of the same proteins to multiple subcellular destinations: Mechanisms and physiological implications. *FEBS Journal*, 278(22), p.4217.
- Axelrod, S. et al., 2008. Delay of phagosome maturation by a mycobacterial lipid is reversed by nitric oxide. *Cellular Microbiology*, 10(7), pp.1530–1545.
- Bach, H. et al., 2006. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis PtpA is an endogenous tyrosine phosphatase secreted during infection. *Infection and Immunity*, 74(12), pp.6540–6546.
- Bach, H. et al., 2008. Mycobacterium tuberculosis Virulence Is Mediated by PtpA Dephosphorylation of Human Vacuolar Protein Sorting 33B. *Cell Host and Microbe*, 3(5), pp.316–322.
- Bach, H., Wong, D. & Av-Gay, Y., 2009. Mycobacterium tuberculosis PtkA is a novel protein tyrosine kinase whose substrate is PtpA. *The Biochemical journal*, 420(2), pp.155–60.
- Baena, A. & Porcelli, S.A., 2009. Evasion and subversion of antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis. *Tissue Antigens*, 74(3), pp.189–204.
- Bambacioni, F. et al., 2001. Lentiviral vectors show dramatically increased efficiency of transduction of human leukemic cell lines. *Haematologica*, 86(October), pp.1095–1096.
- Beke-Somfai, T., Lincoln, P. & Nordén, B., 2013. Rate of hydrolysis in ATP synthase is fine-tuned by  $\alpha$ -subunit motif controlling active site conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(6), pp.2117–22.
- Beresford, N. et al., 2007. MptpB, a virulence factor from Mycobacterium tuberculosis, exhibits triple-specificity phosphatase activity. *The Biochemical journal*, 406(1), pp.13–8.
- Beresford, N.J. et al., 2010. A new family of phosphoinositide phosphatases in microorganisms: identification and biochemical analysis. *BMC genomics*, 11, p.457.
- Beresford, N.J. et al., 2009. Inhibition of MptpB phosphatase from Mycobacterium tuberculosis impairs mycobacterial survival in macrophages. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 63(5), pp.928–36.
- Black, D.S. et al., 2000. The Yersinia tyrosine phosphatase YopH targets a novel adhesion-regulated signalling complex in macrophages. *Cellular Microbiology*, 2(5), pp.401–414.
- Black, D.S. & Bliska, J.B., 1997. Identification of p130Cas as a substrate of Yersinia YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions. *The EMBO journal*, 16(10), pp.2730–44.
- Blanchetot, C. et al., 2005. Substrate-trapping techniques in the identification of cellular PTP targets. *Methods*, 35(1), pp.44–53.
- Bliska, J. & Black, D., 1995. Inhibition of the Fc receptor  $\gamma$ -mediated oxidative burst in macrophages by the Yersinia pseudotuberculosis tyrosinephosphatase. *Infect. Immun*, 63(2), pp.681–85.
- Bogdan, C., 2001. Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends in cell biology*, 11(2), pp.66–75.

- Boon, C. & Dick, T., 2002. Mycobacterium bovis BCG Response Regulator Essential for Hypoxic Dormancy. *J. Bacteriol*, 184(24), pp.6760–6767.
- Boya, P., Roques, B. & Kroemer, G., 2001. Viral and bacterial proteins regulating apoptosis at the mitochondrial level. *EMBO Journal*, 20(16), pp.4325–4331.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, pp.248–254.
- Brito, J.A. et al., 2009. Structural and functional insights into sulfide:quinone oxidoreductase. *Biochemistry*, 48(24), pp.5613–5622.
- Brossier, F. et al., 2015. Molecular analysis of the *embCAB* locus and *embR* gene involved in resistance to ethambutol in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(8), pp.4800–4808.
- Brune, B. & Lapetina, E.G., 1995. Protein thiol modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a target for nitric oxide signaling. *Genet Eng (N Y)*, 17, pp.149–164.
- Buchanan, S.K. & Walker, J.E., 1996. Large-scale chromatographic purification of F1Fo-ATPase and complex I from bovine heart mitochondria. , 349, pp.343–349.
- Buist, a et al., 2000. Identification of p130cas as an in vivo substrate of receptor protein-tyrosine phosphatase alpha. *The Journal of biological chemistry*, 275(27), pp.20754–61.
- Cai, G.Z. et al., 1997. Regulation of rabbit muscle phosphofructokinase by phosphorylation. *Biophysical Chemistry*, 64(1-3), pp.199–209.
- Cappelli, G. et al., 2006. Profiling of Mycobacterium tuberculosis gene expression during human macrophage infection: Upregulation of the alternative sigma factor G, a group of transcriptional regulators, and proteins with unknown function. *Research in Microbiology*, 157(5), pp.445–455.
- Chacinska, A. et al., 2009. Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms. *Cell*, 138(4), pp.628–644.
- Chan, J. et al., 1989. Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(7), pp.2453–2457.
- Chatterjee, A. et al., 2015. Biochemical and functional characterizations of tyrosine phosphatases from pathogenic and nonpathogenic mycobacteria: indication of phenyl cyclopropyl methyl-/phenyl butenyl azoles as tyrosine phosphatase inhibitors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(18), pp.7539–7548.
- Chauhan, P. et al., 2013. Secretory phosphatases deficient mutant of Mycobacterium tuberculosis imparts protection at the primary site of infection in guinea pigs. *PLoS one*, 8(10), p.e77930.
- Chen, M., Gan, H. & Remold, H.G., 2006. A Mechanism of Virulence: Virulent Mycobacterium tuberculosis Strain H37Rv, but Not Attenuated H37Ra, Causes Significant Mitochondrial Inner Membrane Disruption in Macrophages Leading to Necrosis. *The Journal of Immunology*, 176(6), pp.3707–3716.
- Cherney, M.M. et al., 2012. Structure-activity characterization of sulfide:quinone oxidoreductase variants. *Journal of Structural Biology*, 178(3), pp.319–328.
- Chiaradia, L.D. et al., 2012. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of chalcone derivatives as potent inhibitors of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatases (PtpA and PtpB). *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(1), pp.390–402.
- Chiaradia, L.D. et al., 2008. Synthetic chalcones as efficient inhibitors of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase PtpA. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 18(23), pp.6227–6230.
- Claros, M.G. & Vincens, P., 1996. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *European journal of biochemistry / FEBS*, 241(3), pp.779–786.
- Coelho, W.S., Costa, K.C. & Sola-Penna, M., 2007. Serotonin stimulates mouse skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase through tyrosine-phosphorylation of the enzyme altering its intracellular localization. *Molecular Genetics and Metabolism*, 92(4), pp.364–370.
- Coelho, W.S. & Sola-Penna, M., 2013. Serotonin regulates 6-phosphofructo-1-kinase activity in a PLC-PKC-CaMK II- and Janus kinase-dependent signaling pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 372(1-2), pp.211–220.
- Cole, S.T. et al., 1998. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome

- sequence. *Nature*, 393(6685), pp.537–544.
- Colombo, M.I., Gutierrez, M.G. & Romano, P.S., 2006. The two faces of autophagy: Coxiella and Mycobacterium. *Autophagy*, 2(3), pp.162–164.
- Cooper, A.M., 2009. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annu Rev Immunol*, 27, pp.393–422.
- Cooper, C.E. & Brown, G.C., 2008. The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: Chemical mechanism and physiological significance. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 40(5), pp.533–539.
- Court, N. et al., 2010. Partial redundancy of the pattern recognition receptors, scavenger receptors, and C-type lectins for the long-term control of Mycobacterium tuberculosis infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(12), pp.7057–70.
- Cowley, S. et al., 2004. The Mycobacterium tuberculosis protein serine/threonine kinase PknG is linked to cellular glutamate/glutamine levels and is important for growth in vivo. *Molecular Microbiology*, 52(6), pp.1691–1702.
- Cowley, S.C., Babakaiff, R. & Av-Gay, Y., 2002. Expression and localization of the Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase PtpA. *Res. Microbiol.*, 153, pp.233–241.
- Crack, J.C. et al., 2013. Mechanism of [4Fe-4S](Cys)<sub>4</sub> cluster nitrosylation is conserved among NO-responsive regulators. *Journal of Biological Chemistry*, 288(16), pp.11492–11502.
- Czikora, I. et al., 2011. Characterization of the effect of TIMAP phosphorylation on its interaction with protein phosphatase 1. *Biochimie*, 93(7), pp.1139–45.
- Daniel, J. et al., 2011. Mycobacterium tuberculosis Uses Host Triacylglycerol to Accumulate Lipid Droplets and Acquires a Dormancy-Like Phenotype in Lipid-Loaded Macrophages. *PLoS Pathogens*, 7(6), p.e1002093.
- Deghmane, A.-E. et al., 2007. Lipoamide dehydrogenase mediates retention of coronin-1 on BCG vacuoles, leading to arrest in phagosome maturation. *Journal of cell science*, 120, pp.2796–2806.
- Dephoure, N. et al., 2013. Mapping and analysis of phosphorylation sites: a quick guide for cell biologists. *Molecular biology of the cell*, 24(5), pp.535–42.
- Dhanjal, J.K. et al., 2014. Structural insights into mode of actions of novel natural Mycobacterium protein tyrosine phosphatase B inhibitors. *BMC genomics*, 15 Suppl 1(Suppl 1), p.S3.
- Diefenbach, R. & Fraefel, C., 2014. *Herpes Simplex Virus: Methods and Protocols*,
- Domenech, P., Reed, M.B. & Iii, C.E.B., 2005. Contribution of the Mycobacterium tuberculosis MmpL Protein Family to Virulence and Drug Resistance *Infection and Immunity*, 73(6), pp.3492–3501.
- Drapier, J.C. & Hibbs, J.B., 1996. Aconitases: a class of metalloproteins highly sensitive to nitric oxide synthesis. *Methods in enzymology*, 269(1994), pp.26–36.
- Dubnau, E. et al., 2002. Mycobacterium tuberculosis genes induced during infection of human macrophages. *Infect Immun*, 70(6), pp.2787–95.
- Dussurget, O. et al., 2001. Role of Mycobacterium tuberculosis Copper-Zinc Superoxide Dismutase. *Infection and Immunity*, 69(1), pp.529–533. Available at: <http://iai.asm.org/cgi/content/abstract/69/1/529>.
- Eaton, S. et al., 2000. The mitochondrial trifunctional protein: centre of a beta-oxidation metabolon? *Biochem Soc Trans*, 28(2), pp.177–182.
- Ehrt, S., 2001. Reprogramming of the Macrophage Transcriptome in Response to Interferon-gamma and Mycobacterium tuberculosis: Signaling Roles of Nitric Oxide Synthase-2 and Phagocyte Oxidase. *Journal of Experimental Medicine*, 194(8), pp.1123–1140.
- van den Ent, F. & Löwe, J., 2006. RF cloning: a restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 67(1), pp.67–74.
- Evans, P.R. et al., 1981. Phosphofructokinase: Structure and Control. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 293(1063), pp.53–62.
- Fedotcheva, N.I., Sokolov, A.P. & Kondrashova, M.N., 2006. Nonezymatic formation of succinate in mitochondria under oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 41(1), pp.56–64.
- Fenhalls, G. et al., 2002. In situ detection of Mycobacterium tuberculosis transcripts in human lung granulomas reveals differential gene expression in necrotic lesions. *Infection and Immunity*, 70(11), pp.6330–6338.

- Filipovic, M.R. et al., 2012. Biochemical insight into physiological effects of H<sub>2</sub>S: reaction with peroxyxynitrite and formation of a new nitric oxide donor, sulfinyl nitrite. *The Biochemical journal*, 441(2), pp.609–21.
- Flint, a J. et al., 1997. Development of “substrate-trapping” mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(5), pp.1680–1685.
- Fontán, P.A. et al., 2008. *Mycobacterium tuberculosis* Sigma Factor E Regulon Modulates the Host Inflammatory Response. *The Journal of Infectious Diseases*, 198(6), pp.877–885.
- Fould, B. et al., 2010. Structural and functional characterization of the recombinant human mitochondrial trifunctional protein. *Biochemistry*, 49(39), pp.8608–8617.
- Fratti, R.A. et al., 2003. Mycobacterium tuberculosis glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(9), pp.5437–5442.
- Garton, A.J., Flint, A.J. & Tonks, N.K., 1996. Identification of p130cas as a Substrate for the Cytosolic Protein Tyrosine Phosphatase PTP-PEST. *Mol Cell Biol*, 16(11), pp.6408–6418.
- Goubern, M. et al., 2007. Sulfide, the first inorganic substrate for human cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21(8), pp.1699–706.
- Grace, P.S. & Ernst, J.D., 2016. Suboptimal Antigen Presentation Contributes to Virulence of Mycobacterium tuberculosis In Vivo. *The Journal of Immunology*, 196, pp.357–64.
- Graham, J.E. & Clark-Curtiss, J.E., 1999. Identification of Mycobacterium tuberculosis RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(20), pp.11554–9.
- Grassetti, D.R. & Murray, J.F., 1967. Determination of sulfhydryl groups with 2,2'- or 4,4'-dithiodipyridine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 119, pp.41–49.
- Green, D.R. & Kroemer, G., 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 305(5684), pp.626–629.
- Green, J. & Paget, M.S., 2004. Bacterial redox sensors. *Nature reviews. Microbiology*, 2(12), pp.954–966.
- Groen, A. et al., 2005. Differential oxidation of protein-tyrosine phosphatases. *The Journal of biological chemistry*, 280(11), pp.10298–304.
- Grundner, C. et al., 2007. Structural basis for selective inhibition of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase PtpB. *Structure*, 15(4), pp.499–509.
- Grundner, C., Cox, J.S. & Alber, T., 2008. Protein tyrosine phosphatase PtpA is not required for Mycobacterium tuberculosis growth in mice. *FEMS Microbiology Letters*, 287(2), pp.181–184.
- Grundner, C., Ng, H.-L. & Alber, T., 2005. Mycobacterium tuberculosis Protein Tyrosine Phosphatase PtpB Structure Reveals a Diverged Fold and a Buried Active Site. *Structure*, 13(11), pp.1625–1634.
- Harding, C. V & Boom, W.H., 2010. Regulation of antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis: a role for Toll-like receptors. *Nature reviews. Microbiology*, 8(4), pp.296–307.
- Harrahy, J.J. et al., 1997. Identification of a new phosphorylation site in cardiac muscle phosphofructokinase. *Biochemical and biophysical research communications*, 234(234), pp.582–587.
- Hellman, U., Jolles, P. & Jornvall, H., 2000. Sample preparation by SDS/PAGE and in-gel digestion. In *Proteomics in functional genomics. Protein Structure analysis*. pp. 43–54.
- Hestvik, A.L.K., Hmama, Z. & Av-Gay, Y., 2005. Mycobacterial manipulation of the host cell. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(5), pp.1041–1050.
- Hinchey, J. et al., 2007. Enhanced priming of adaptive immunity by a proapoptotic mutant of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Clinical Investigation*, 117(8), pp.2279–2288.
- Hmama, Z. et al., 2015. Immuno-evasion and immunosuppression of the macrophage by Mycobacterium tuberculosis. *Immunological Reviews*, 264(1), pp.220–232.
- Hobiger, K. & Friedrich, T., 2015. Voltage sensitive phosphatases: Emerging kinship to protein tyrosine phosphatases from structure-function research. *Frontiers in Pharmacology*, 6(JAN), pp.1–19.
- Hornbeck, P. V et al., 2012. PhosphoSitePlus: a comprehensive resource for investigating the structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse. *Nucleic acids*

- research, 40(Database issue), pp.D261–70.
- Hossain, M.M. & Norazmi, M.N., 2013. Pattern Recognition Receptors and Cytokines in Infection-The Double-Edged Sword? *Biomed Res Int*, 2013, p.179174.
- Houben, D. et al., 2012. ESX-1-mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria. *Cellular Microbiology*, 14(8), pp.1287–1298.
- Hsu, P.P. & Sabatini, D.M., 2008. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*, 134(5), pp.703–707.
- Humphreys, D., Hume, P.J. & Koronakis, V., 2009. The Salmonella Effector SptP Dephosphorylates Host AAA+ ATPase VCP to Promote Development of its Intracellular Replicative Niche. *Cell Host and Microbe*, 5(3), pp.225–233.
- Huynh, K.K., Joshi, S.A. & Brown, E.J., 2011. A delicate dance: Host response to mycobacteria. *Current Opinion in Immunology*, 23(4), pp.464–472.
- Jackson, M.R., Melideo, S.L. & Jorns, M.S., 2012. Human sulfide:Quinone oxidoreductase catalyzes the first step in hydrogen sulfide metabolism and produces a sulfane sulfur metabolite. *Biochemistry*, 51(34), pp.6804–6815.
- Jackson, M.R., Melideo, S.L. & Jorns, M.S., 2015. Role of human sulfide: Quinone oxidoreductase in H<sub>2</sub>S metabolism. *Methods in Enzymology*, 554, pp.255–270.
- Jamwal, S. et al., 2013. Characterizing virulence-specific perturbations in the mitochondrial function of macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis. *Scientific reports*, 3, p.1328.
- Jayakumar, D., Jacobs, W.R. & Narayanan, S., 2008. Protein kinase E of Mycobacterium tuberculosis has a role in the nitric oxide stress response and apoptosis in a human macrophage model of infection. *Cellular Microbiology*, 10(2), pp.365–374.
- Jonckheere, A.I., Smeitink, J.A.M. & Rodenburg, R.J.T., 2012. Mitochondrial ATP synthase: Architecture, function and pathology. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 35(2), pp.211–225.
- Kane, L.A. & Van Eyk, J.E., 2009. Post-translational modifications of ATP synthase in the heart: Biology and function. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 41(2), pp.145–150.
- Kang, P.B. et al., 2005. The human macrophage mannose receptor directs Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *The Journal of experimental medicine*, 202(7), pp.987–99.
- Kaniga, K. et al., 1996. A secreted protein tyrosine phosphatase with modular effector domains in the bacterial pathogen Salmonella typhimurium. *Molecular microbiology*, 21(3), pp.633–641.
- Kao, Y.T. et al., 2015. Japanese Encephalitis Virus Nonstructural Protein NS5 Interacts with Mitochondrial Trifunctional Protein and Impairs Fatty Acid ??-Oxidation. *PLoS Pathogens*, 11(3), pp.1–26.
- Karlsson, R. et al., 2006. Analyzing a kinetic titration series using affinity biosensors. *Analytical Biochemistry*, 349(1), pp.136–147.
- Kloos, M. et al., 2015. Crystal structure of human platelet phosphofructokinase-1 locked in an activated conformation. *The Biochemical journal*, 469(3), pp.421–32.
- Koul, A. et al., 2000. Cloning and Characterization of Secretory Tyrosine Phosphatases of Mycobacterium tuberculosis Cloning and Characterization of Secretory Tyrosine Phosphatases of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of bacteriology*, 182(19), pp.5425–5432.
- Koul, A. et al., 2004. Interplay between mycobacteria and host signalling pathways. *Nature Reviews Microbiology*, 2(3), pp.189–202.
- Kozjak-Pavlovic, V., Ross, K. & Rudel, T., 2008. Import of bacterial pathogenicity factors into mitochondria. *Current Opinion in Microbiology*, 11(1), pp.9–14.
- Krithika, R. et al., 2006. A genetic locus required for iron acquisition in Mycobacterium tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(7), pp.2069–74.
- Kruh, N.A. et al., 2010. Portrait of a pathogen: The Mycobacterium tuberculosis proteome In vivo. *PLoS ONE*, 5(11).
- Kumar, A. et al., 2007. Mycobacterium tuberculosis DosS is a redox sensor and DosT is a hypoxia sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(28), pp.11568–73.
- Kusebauch, U. et al., 2014. Mycobacterium tuberculosis supports protein tyrosine phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(25), pp.9265–70.

- Kusumawati, A. et al., 1999. Transfection of myelomonocytic cell lines: cellular response to a lipid-based reagent and electroporation. *Anal Biochem*, 269(1), pp.219–221.
- Labandera, A.-M., 2012. *Estudio de las únicas fosfatasa de proteínas en tirosina de Mycobacterium tuberculosis, PtpA y PtpB: sensibilidad de PtpB frente a diferentes agentes oxidantes y caracterización de la interacción entre el mutante PtpA D126A con extractos proteicos de mac.* Facultad de Ciencias.Universidad de la República.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680–5.
- Lagoutte, E. et al., 2010. Biochimica et Biophysica Acta Oxidation of hydrogen sul fi de remains a priority in mammalian cells and causes reverse electron transfer in colonocytes. , 1797, pp.1500–1511.
- Lamichhane, G., Tyagi, S. & Bishai, W.R., 2005. Designer Arrays for De ned Mutant Analysis To Detect Genes Essential for Survival of. *Society*, 73(4), pp.2533–2540.
- LaMontagne, K.R. et al., 1998. Protein Tyrosine Phosphatase 1B Antagonizes Signalling by Oncoprotein Tyrosine Kinase p210 bcr-abl in Vivo. *Molecular and Cellular Biology*, 18(5), pp.2965–2975.
- Leistikow, R.L. et al., 2010. The Mycobacterium tuberculosis DosR regulon assists in metabolic homeostasis and enables rapid recovery from nonrespiring dormancy. *Journal of Bacteriology*, 192(6), pp.1662–1670.
- Leite, T.C. et al., 2011. Lactate downregulates the glycolytic enzymes hexokinase and phosphofructokinase in diverse tissues from mice. *FEBS Letters*, 585(1), pp.92–98.
- Li, L., Bhatia, M. & Moore, P.K., 2006. Hydrogen sulphide - A novel mediator of inflammation? *Current Opinion in Pharmacology*, 6(2), pp.125–129.
- Lin, S.L., Le, T.X. & Cowen, D.S., 2003. SptP, a Salmonella typhimurium type III-secreted protein, inhibits the mitogen-activated protein kinase pathway by inhibiting Raf activation. *Cellular Microbiology*, 5(4), pp.267–275.
- Lisa, M.N. et al., 2015. Molecular Basis of the Activity and the Regulation of the Eukaryotic-like S/T Protein Kinase PknG from Mycobacterium tuberculosis. *Structure*, pp.1–10.
- Madhurantakam, C. et al., 2005. Crystal Structure of Low-Molecular-Weight Protein Tyrosine Phosphatase from Mycobacterium tuberculosis at 1 . 9-Å Resolution Crystal Structure of Low-Molecular-Weight Protein Tyrosine Phosphatase from Mycobacterium tuberculosis at 1.9A resolution. *Journal of Bacteriology*, 187(6), pp.2175–2181.
- Madhurantakam, C., Chavali, V.R.M. & Das, A.K., 2008. Analyzing the catalytic mechanism of MPtpA: a low molecular weight protein tyrosine phosphatase from Mycobacterium tuberculosis through site-directed mutagenesis. *Proteins*, 71, pp.706–714.
- Mallozzi, C., Di Stasi, A.M. & Minetti, M., 1997. Peroxynitrite modulates tyrosine-dependent signal transduction pathway of human erythrocyte band 3. *FASEB J*, 11(14), pp.1281–1290.
- Mandel, M. & Higa, A., 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of molecular biology*, 53(1), pp.159–62.
- Manganelli, R., 2014. Sigma Factors : Key Molecules in Mycobacterium tuberculosis Physiology and Virulence. *Microbiology Spectrum*, (9), pp.1–23.
- Manganelli, R. et al., 2004. Sigma factors and global gene regulation in Mycobacterium tuberculosis. *Journal of bacteriology*, 186(4), pp.895–902.
- Manganelli, R. et al., 2001. The Mycobacterium tuberculosis ECF sigma factor s E : role in global gene expression and survival in. , 41(70), pp.423–437.
- Mann, F.M. et al., 2009. Characterization and inhibition of a class II diterpene cyclase from Mycobacterium tuberculosis. Implications for tuberculosis. *Journal of Biological Chemistry*, 284(35), pp.23574–23579.
- Mann, M. et al., 2002. Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends in biotechnology*, 20(6), pp.261–8.
- Margenat, M. et al., 2015. New potential eukaryotic substrates of the mycobacterial protein tyrosine phosphatase PtpA: hints of a bacterial modulation of macrophage bioenergetics state. *Scientific reports*, 5, p.8819.
- Mascarello, A. et al., 2010. Inhibition of Mycobacterium tuberculosis tyrosine phosphatase PtpA by synthetic chalcones: kinetics, molecular modeling, toxicity and effect on growth. *Bioorganic & medicinal chemistry*,

18(11), pp.3783–9.

- Matiollo, C. et al., 2013. S-nitrosylation of Mycobacterium tuberculosis tyrosine phosphatase A (PtpA) induces its structural instability. *Biochimica et biophysica acta*, 1834(1), pp.191–6.
- McKinney, J.D. et al., 2000. Persistence of Mycobacterium tuberculosis in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature*, 406(6797), pp.735–738.
- Mellacheruvu, D. et al., 2013. The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification-mass spectrometry data. *Nature methods*, 10(8), pp.730–6.
- Miller, M.R. & Blystone, S.D., 2015. Reliable and inexpensive expression of large, tagged, exogenous proteins in murine bone marrow-derived macrophages using a second generation lentiviral system. *Journal of Biological Methods*, 2(3), p.23.
- Mizuguchi, H. et al., 2000. IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 1(4), pp.376–82.
- Moorhead, G.B.G. et al., 2009. Evolution of protein phosphatases in plants and animals. *Biochemical Journal*, 417(2), pp.401–409.
- Moreno-Altamirano, M.M.B. et al., 2012. Bioinformatic identification of Mycobacterium tuberculosis proteins likely to target host cell mitochondria: virulence factors? *Microbial informatics and experimentation*, 2(1), p.9.
- Mukhopadhyay, S., Nair, S. & Ghosh, S., 2012. Pathogenesis in tuberculosis: Transcriptomic approaches to unraveling virulence mechanisms and finding new drug targets. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), pp.463–485.
- Muñoz-Elías, E.J. & McKinney, J.D., 2005. Mycobacterium tuberculosis isocitrate lyases 1 and 2 are jointly required for in vivo growth and virulence. *Nature medicine*, 11(6), pp.638–44.
- Najarro, P., Traktman, P. & Lewis, J.A., 2001. Vaccinia virus blocks gamma interferon signal transduction: viral VH1 phosphatase reverses Stat1 activation. *Journal of virology*, 75(7), pp.3185–96.
- Narayan, A. et al., 2007. Serine threonine protein kinases of mycobacterial genus: phylogeny to function. *Physiological genomics*, 29, pp.66–75.
- Nau, G.J. et al., 2002. Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(3), pp.1503–8.
- Nigou, J. et al., 2001. Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166(12), pp.7477–7485.
- O’Hare, H.M. et al., 2008. Regulation of glutamate metabolism by protein kinases in mycobacteria. *Molecular Microbiology*, 70(6), pp.1408–1423.
- Olson, B.J.S.C. & Markwell, J., 2007. Assays for determination of protein concentration. *Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.]*, Chapter 3, p.Unit 3.4.
- Ostman, A. et al., 2011. Regulation of protein tyrosine phosphatases by reversible oxidation. *Journal of biochemistry*, 150(4), pp.345–56.
- Di Pancrazio, F. et al., 2006. Differential steady-state tyrosine phosphorylation of two oligomeric forms of mitochondrial FOF1ATP synthase: A structural proteomic analysis. *Proteomics*, 6(3), pp.921–926.
- Pannifer, a D. et al., 1998. Visualization of the cysteinyl-phosphate intermediate of a protein-tyrosine phosphatase by x-ray crystallography. *The Journal of biological chemistry*, 273(17), pp.10454–62.
- Papavinasasundaram, K.G. et al., 2005. Deletion of the Mycobacterium tuberculosis pknH Gene Confers a Higher Bacillary Load during the Chronic Phase of Infection in BALB / c Mice Deletion of the Mycobacterium tuberculosis pknH Gene Confers a Higher Bacillary Load during the Chronic Phase of In. *Society*, 187(16), pp.5751–5760.
- Park, H. et al., 2003. Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of Mycobacterium tuberculosis. *Molecular microbiology*, 48(3), pp.833–43.
- Piddington, D.L. et al., 2001. Cu , Zn Superoxide Dismutase of Mycobacterium tuberculosis Contributes to Survival in Activated Macrophages That Are Generating an Oxidative Burst Cu , Zn Superoxide Dismutase of

- Mycobacterium tuberculosis Contributes to Survival in Activated Macrophages. *Infection and Immunity*, 69(8), pp.4980–4987.
- Poirier, V., Bach, H. & Av-Gay, Y., 2014. *Mycobacterium tuberculosis* Promotes Anti-apoptotic Activity of the Macrophage by PtpA Protein-dependent Dephosphorylation of Host GSK3 $\alpha$ . *Journal of Biological Chemistry*, 289(42), pp.29376–29385.
- Porath, J., 1992. Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expression and Purification*, 3(4), pp.263–281.
- Purificação, M., 2008. *Identificação de potenciais substratos de PtpA, tirosina-fosfatase de Mycobacterium tuberculosis*.
- Quesniaux, V. et al., 2004. Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes and Infection*, 6(10), pp.946–959.
- Riobó, N. a et al., 2001. Nitric oxide inhibits mitochondrial NADH:ubiquinone reductase activity through peroxynitrite formation. *The Biochemical journal*, 359(Pt 1), pp.139–145.
- Robinson, N. et al., 2007. A mycobacterial gene involved in synthesis of an outer cell envelope lipid is a key factor in prevention of phagosome maturation. *Infection and Immunity*, 75(2), pp.581–591.
- Rodrigue, S. et al., 2006. The Sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(6), pp.926–941.
- Rohde, K.H., Abramovitch, R.B. & Russell, D.G., 2007. *Mycobacterium tuberculosis* Invasion of Macrophages: Linking Bacterial Gene Expression to Environmental Cues. *Cell Host and Microbe*, 2(5), pp.352–364.
- Romagnoli, A. et al., 2012. ESX-1 dependent impairment of autophagic flux by *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells. *Autophagy*, 8(9), pp.1357–1370.
- Russell, D.G., 2011. *Mycobacterium tuberculosis* and the intimate discourse of a chronic infection. *Immunological Reviews*, 240(1), pp.252–268.
- Russell, D.G., 2001. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, 2(8), pp.569–577.
- Sadek, M.I. et al., 1998. Chemokines induced by infection of mononuclear phagocytes with mycobacteria and present in lung alveoli during active pulmonary tuberculosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 19(3), pp.513–521.
- Saeki, Y. et al., 2001. Improved helper virus-free packaging system for HSV amplicon vectors using an ICP27-deleted, oversized HSV-1 DNA in a bacterial artificial chromosome. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*.
- Saraav, I., Singh, S. & Sharma, S., 2014. Outcome of *Mycobacterium tuberculosis* and Toll-like receptor interaction: immune response or immune evasion? *Immunology and cell biology*, 92(9), pp.1–6.
- Sardi, F. et al., 2013. Determination of acidity and nucleophilicity in thiols by reaction with monobromobimane and fluorescence detection. *Analytical Biochemistry*, 435(1), pp.74–82.
- Sassetti, C.M., Boyd, D.H. & Rubin, E.J., 2003. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Molecular Microbiology*, 48, pp.77–84.
- Scapin, G. et al., 2001. The structure of apo protein-tyrosine phosphatase 1B C215S mutant: more than just an S --> O change. *Protein Sci*, 10(8), pp.1596–1605. Available at: <http://dx.doi.org/10.1110/ps.11001>.
- Scherr, N. et al., 2009. Survival of pathogenic mycobacteria in macrophages is mediated through autophosphorylation of protein kinase G. *Journal of Bacteriology*, 191(14), pp.4546–4554.
- Schlesinger, L.S., 1993. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 150(7), pp.2920–2930.
- Schnappinger, D. et al., 2003. Transcriptional adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages: Insights into the phagosomal environment. *The Journal of experimental medicine*, 198(5), pp.693–704.
- Schnappinger, D. et al., 2003. Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment. *The Journal of experimental medicine*, 198(5), pp.693–704.
- Schnappinger, D., Schoolnik, G.K. & Ehrt, S., 2006. Expression profiling of host pathogen interactions: how

- Mycobacterium tuberculosis and the macrophage adapt to one another. *Microbes and Infection*, 8(4), pp.1132–1140.
- Schöneberg, T. et al., 2013. Structure and allosteric regulation of eukaryotic 6-phosphofructokinases. *Biological Chemistry*, 394(8), pp.977–993.
- Scopes, R.K., 1994. *Protein purification : principles and practice*, Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/cbf.290020117>.
- Seo, J.-Y. & Cresswell, P., 2013. Viperin regulates cellular lipid metabolism during human cytomegalovirus infection. *PLoS pathogens*, 9(8), p.e1003497.
- Sherman, D.R. et al., 2001. Regulation of the Mycobacterium tuberculosis hypoxic response gene encoding alpha-crystallin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(13), pp.7534–9.
- Shi, L., Potts, M. & Kennelly, P.J., 1998. The serine, threonine, and/or tyrosine-specific protein kinases and protein phosphatases of prokaryotic organisms: a family portrait. *FEMS Microbiology Reviews*, 22(4), pp.229–253.
- Shi, R., Itagaki, N. & Sugawara, I., 2007. Overview of anti-tuberculosis (TB) drugs and their resistance mechanisms. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 7(11), pp.1177–85.
- Shin, J.-H. et al., 2011. 1 H NMR-based Metabolomic Profiling in Mice Infected with Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Proteome Research*, 10(5), pp.2238–2247.
- Silva, A.P.G. & Taberner, L., 2010. New strategies in fighting TB: targeting Mycobacterium tuberculosis-secreted phosphatases MptpA & MptpB. *Future medicinal chemistry*, 2(8), pp.1325–37.
- Singh, A. et al., 2007. Mycobacterium tuberculosis WhiB3 responds to O<sub>2</sub> and nitric oxide via its [4Fe-4S] cluster and is essential for nutrient starvation survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(28), pp.11562–11567.
- Singh, R. et al., 2003. Disruption of mptpB impairs the ability of Mycobacterium tuberculosis to survive in guinea pigs. *Molecular Microbiology*, 50, pp.751–762.
- Somashekar, B.S. et al., 2011. Metabolic profiling of lung granuloma in Mycobacterium tuberculosis infected guinea pigs: Ex vivo 1H magic angle spinning NMR studies. *Journal of Proteome Research*, 10(9), pp.4186–4195.
- Somashekar, B.S. et al., 2012. Metabolomic signatures in guinea pigs infected with epidemic-associated W-Beijing strains of mycobacterium tuberculosis. *Journal of Proteome Research*, 11(10), pp.4873–4884.
- Spagnolo, L. et al., 2004. Unique features of the sodC-encoded superoxide dismutase from Mycobacterium tuberculosis, a fully functional copper-containing enzyme lacking zinc in the active site. *Journal of Biological Chemistry*, 279(32), pp.33447–33455.
- Spurway, T.D. et al., 1997. The flux control coefficient of carnitine palmitoyltransferase I on palmitate beta-oxidation in rat hepatocyte cultures. *Biochem J*, 323 ( Pt 1), pp.119–122.
- Stripecke, R. et al., 2000. Lentiviral vectors for efficient delivery of CD80 and granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor in human acute lymphoblastic leukemia and acute myeloid leukemia cells to induce antileukemic immune responses. *Blood*, 96(4), pp.1317–26.
- Sullivan, J.T. et al., 2012. The Mycobacterium tuberculosis SecA2 System Subverts Phagosome Maturation To Promote Growth in Macrophages. *Infection and Immunity*, 80(3), pp.996–1006.
- Sun, J. et al., 2013. Mycobacterium tuberculosis Nucleoside Diphosphate Kinase Inactivates Small GTPases Leading to Evasion of Innate Immunity. *PLoS Pathogens*, 9(7), pp.1–14.
- Suzuki, H. et al., 1990. Structure and regulation of rat long-chain acyl-CoA synthetase. *The Journal of biological chemistry*, 265(15), pp.8681–8685.
- Tan, S. & Russell, D.G., 2015. Trans-species communication in the Mycobacterium tuberculosis-infected macrophage. *Immunological Reviews*, 264(1), pp.233–248.
- The UniProt Consortium, 2013. Update on activities at the Universal Protein Resource (UniProt) in 2013. *Nucleic acids research*, 41(Database issue), pp.D43–7.
- Tiganis, T. & Bennett, A.M., 2007. Protein tyrosine phosphatase function: the substrate perspective. *Biochemical Journal*, 402(1), pp.1–15.

- Trinkle-Mulcahy, L. et al., 2008. Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes. *Journal of Cell Biology*, 183(2), pp.223–239.
- Van Veen, H.W., 1997. Phosphate transport in prokaryotes: Molecules, mediators and mechanisms. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 72(4), pp.299–315.
- Velmurugan, K. et al., 2007. Mycobacterium tuberculosis nuoG Is a virulence gene that inhibits apoptosis of infected host cells. *PLoS Pathogens*, 3(7), pp.0972–0980.
- Vergne, I. et al., 2004. CELL BIOLOGY OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS PHAGOSOME. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20(1), pp.367–394.
- Vergne, I. et al., 2005. Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable Mycobacterium tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(11), pp.4033–4038.
- Vergne, I., Chua, J. & Deretic, V., 2003a. Mycobacterium tuberculosis Phagosome Maturation Arrest: Selective Targeting of PI3P-Dependent Membrane Trafficking. *Traffic*, 4(9), pp.600–606.
- Vergne, I., Chua, J. & Deretic, V., 2003b. Tuberculosis Toxin Blocking Phagosome Maturation Inhibits a Novel Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-PI3K hVPS34 Cascade. *The Journal of Experimental Medicine J. Exp. Med*, 08653700(4), pp.653–659. Available at: <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20030527>.
- Vincent, C. et al., 1999. Cells of Escherichia coli contain a protein-tyrosine kinase, Wzc, and a phosphotyrosine-protein phosphatase, Wzb. *Journal of bacteriology*, 181(11), pp.3472–7.
- Voskuil, M.I. et al., 2003. Inhibition of respiration by nitric oxide induces a Mycobacterium tuberculosis dormancy program. *The Journal of experimental medicine*, 198(5), pp.705–713.
- Voskuil, M.I., Visconti, K.C. & Schoolnik, G.K., 2004. Mycobacterium tuberculosis gene expression during adaptation to stationary phase and low-oxygen dormancy. *Tuberculosis*, 84(3-4), pp.218–227.
- Voss, J.J. De et al., 1999. Iron Acquisition and Metabolism by Mycobacteria. *Journal of Bacteriology*, 181(15), pp.4443–4451.
- Waddell, S.J. & Butcher, P.D., 2007. Microarray Analysis of Whole Genome Expression of Intracellular Mycobacterium tuberculosis. *Current Molecular Medical*, 7(3), pp.287–296.
- Walburger, A., 2004. Protein Kinase G from Pathogenic Mycobacteria Promotes Survival Within Macrophages. *Science*, 304(5678), pp.1800–1804.
- Walters, S.B. et al., 2006. The Mycobacterium tuberculosis PhoPR two-component system regulates genes essential for virulence and complex lipid biosynthesis. *Molecular Microbiology*, 60(2), pp.312–330.
- Wang, J. et al., 2015. Mycobacterium tuberculosis suppresses innate immunity by coopting the host ubiquitin system. *Nature immunology*, 16(3), pp.237–45.
- Wang, J.P. et al., 2003. Gene expression profiling detects patterns of human macrophage responses following Mycobacterium tuberculosis infection. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 39(2), pp.163–172.
- Wang, S. et al., 2000. Crystal Structures of a Low-Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase from Saccharomyces cerevisiae and Its Complex with the Substrate p-Nitrophenyl Phosphate<sup>†</sup>, ‡. *Biochemistry*, 39(8), pp.1903–1914.
- Webb, B.A. et al., 2016. Structures of human phosphofructokinase-1 and atomic basis of cancer-associated mutations. , 523(7558), pp.111–114.
- van der Wel, N. et al., 2007. M. tuberculosis and M. leprae Translocate from the Phagolysosome to the Cytosol in Myeloid Cells. *Cell*, 129(7), pp.1287–1298.
- Who, 2014. Global tuberculosis report 2014. *Who*, p.171.
- Wong, D. et al., 2011. Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H<sup>+</sup>-ATPase to inhibit phagosome acidification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(48), pp.19371–19376.
- Wong, D., Chao, J.D. & Av-Gay, Y., 2013. Mycobacterium tuberculosis-secreted phosphatases: from pathogenesis to targets for TB drug development. *Trends in Microbiology*, 21(2), pp.100–109.
- Wong, K.W. & Jacobs, W.R., 2011. Critical role for NLRP3 in necrotic death triggered by Mycobacterium tuberculosis. *Cellular Microbiology*, 13(July), pp.1371–1384.
- Wu, L. & Zhang, Z.Y., 1996. Probing the function of Asp128 in the lower molecular weight protein-tyrosine

- phosphatase-catalyzed reaction. A pre-steady-state and steady-state kinetic investigation. *Biochemistry*, 35(17), pp.5426–34.
- Wu, M. et al., 2007. Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *American journal of physiology. Cell physiology*, 292(1), pp.C125–36.
- Xie, L., Zhang, Y. & Zhang, Z., 2002. Design and Characterization of an Improved Protein Tyrosine Phosphatase Substrate-Trapping Mutant. *Biochemistry*, 41, pp.4032–4039.
- Zancan, P. & Sola-Penna, M., 2005. Regulation of human erythrocyte metabolism by insulin: Cellular distribution of 6-phosphofructo-1-kinase and its implication for red blood cell function. *Molecular Genetics and Metabolism*, 86(3), pp.401–411.
- Zhang, M. et al., 1998. Crystal structure of a human low molecular weight phosphotyrosyl phosphatase. Implications for substrate specificity. *The Journal of biological chemistry*, 273(34), pp.21714–21720.
- Zhang, M. et al., 1997. Crystal structure of bovine low molecular weight phosphotyrosyl phosphatase complexed with the transition state analog vanadate. *Biochemistry*, 36(1), pp.15–23.
- Zhou, B. et al., 2010. Targeting mycobacterium protein tyrosine phosphatase B for antituberculosis agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(10), pp.4573–4578.
- Zhou, P. et al., 2015. Phosphorylation control of protein tyrosine phosphatase A activity in Mycobacterium tuberculosis. *FEBS Letters*, 589(3), pp.326–331.
- Zhu, L. et al., 2015. Cellular metabolism and macrophage functional polarization. *International reviews of immunology*, 34(1), pp.82–100..

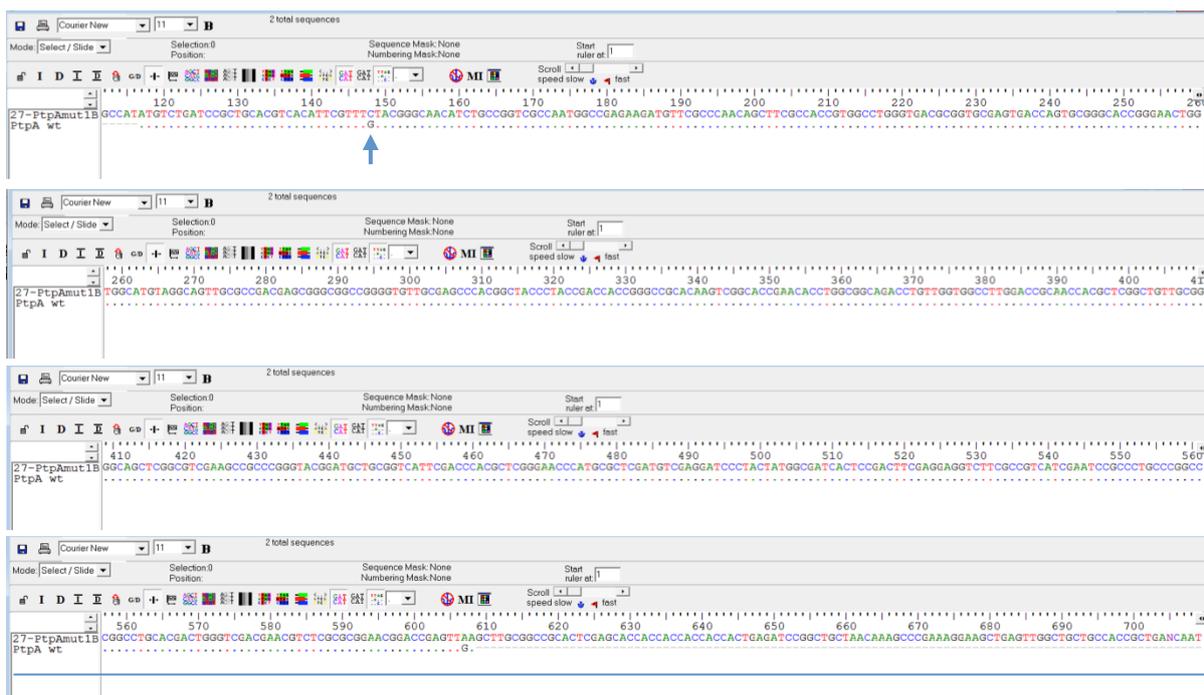
# ANEXOS

## Anexo 1. Obtención de los mutantes PtpA-C11S y PtpB-C160S

### A1.1. Análisis de la secuencia de la PtpA donde se introdujo la mutación C11S

La secuenciación confirmó la presencia de la mutación Cys11Ser (cambio de TGT a TCT) obtenida por mutagénesis sitio dirigida utilizando como molde el gen salvaje de PtpA clonado en el vector pET 28a(+). En dicho análisis confirmamos además la ausencia de otras mutaciones en la secuencia de PtpA.

Por lo tanto contamos con el mutante inactivo PtpA-C11S clonado en el vector pET 28a(+).



**Figura A1.1.** Comparación de la secuencia del gen de la PtpA-wt y la de uno de los clones que tienen la mutación deseada (cambio de TGT a TCT) obtenido por mutagénesis sitio dirigida. Se indica con una flecha el residuo mutado.

## A1.2. Análisis de la secuencia del gen de la PtpB donde se introdujo la mutación C160S

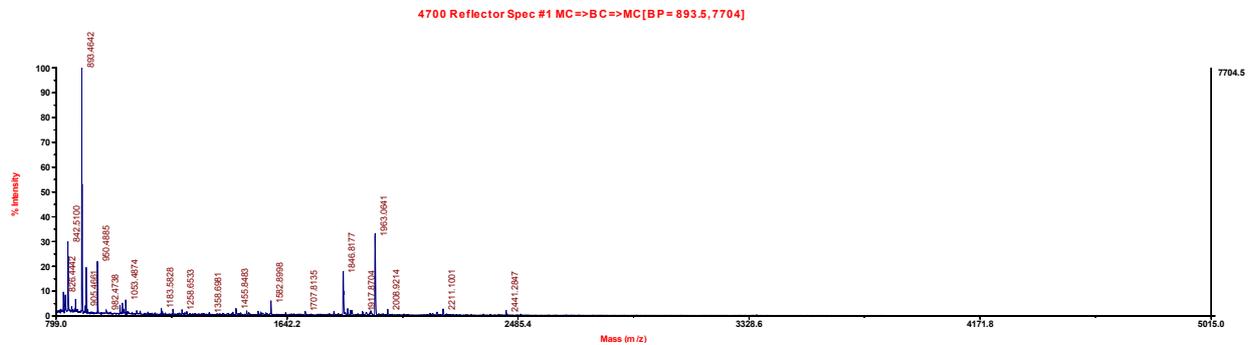
La secuenciación confirmó la presencia de la mutación Cys160Ser (cambio de TGC a AGC), obtenida por mutagénesis sitio dirigida utilizando como molde el gen salvaje de PtpB clonado en el vector pET 28a(+). En dicho análisis confirmamos además la ausencia de otras mutaciones en la secuencia de PtpB. Por lo tanto contamos con el mutante inactivo PtpB-C160S clonado en el vector pET 28a(+).



**Figura A1.2.** Comparación de la secuencia del gen de PtpB-wt y la de uno de los clones que tienen la mutación deseada (cambio de TGC a AGC) obtenido por mutagénesis sitio dirigida. Se indica con una flecha el residuo mutado. El análisis se realizó en toda la secuencia pero se muestra sólo la región que muestra el cambio deseado introducido.

## Anexo 2. Confirmación de la identidad de PtpA de *Mtb* por MALDI-TOF-MS

Espectro de masa obtenido en modo reflector positivo de la digestión trípica de la PtpA purificada:



### Parámetros de la búsqueda:

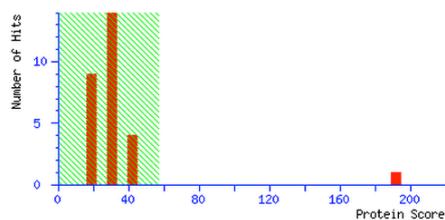
Type of search : Sequence Query  
Enzyme : Trypsin  
Variable modifications : Carbamidomethyl (C), Oxidation (M), Phospho (Y)  
Mass values : Monoisotopic  
Protein Mass : Unrestricted  
Peptide Mass Tolerance :  $\pm 0.08$  Da  
Fragment Mass Tolerance :  $\pm 0.3$  Da  
Max Missed Cleavages : 1  
Instrument type : MALDI-TOF-TOF  
Number of queries : 60

Utilizando datos de MS y MS/MS, se obtuvo el siguiente resultado:

Database : NCBI nr 20130210 (23074978 sequences; 7923532702 residues)  
Timestamp : 15 Feb 2013 at 19:21:27 GMT  
Protein hits : [gi|115609371](#) Phosphotyrosine protein phosphatase PtpA (protein-tyrosine-phosphatase) (PTPase) (LMW phosphatase) [Mycobact  
[gi|407800400](#) ATP-dependent DNA helicase RecG [Oceaniovalibus guishaninsula JLT2003]  
[gi|345853015](#) hypothetical protein SZN\_24453 [Streptomyces zinciresistens K42]  
[gi|359420606](#) putative ABC transporter ATP-binding protein [Gordonia araii NBRC 100433]  
[gi|431798438](#) hypothetical protein Echvi\_3094 [Echinicola vietnamensis DSM 17526]  
[gi|148554963](#) TetR family transcriptional regulator [Sphingomonas wittichii RW1]  
[gi|319935068](#) O-acetylhomoserine/O-acetylserine sulfhydrylase [Coprobacillus sp. 29\_1]  
[gi|381395006](#) ATP-dependent helicase Lhr and Lhr-like helicase [Glaciecola punicea DSM 14233 = ACAM 611]

### 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  $> 57$  indicate identity or extensive homology ( $p < 0.05$ ).  
Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



## Análisis por Mascot

### Resultado de la búsqueda:

Proteína identificada con mayor score: Phosphotyrosine protein phosphatase PtpA (protein-tyrosine-phosphatase) (PTPase) (LMW phosphatase) [Mycobacterium tuberculosis H37Rv];gi|15609371

Base de datos: NCBI nr

Score: 244

Expect: 9.2e-18

Masa nativa (M<sub>r</sub>): 17881

pl teórico: 6.03

Número de péptidos analizados: 9

Número de secuencias analizadas : 7

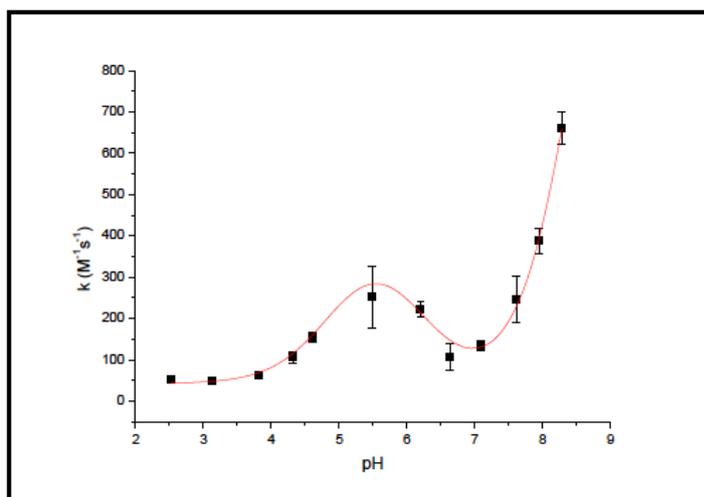
Porcentaje de cobertura de secuencia: 45%

### Péptidos identificados en la secuencia de PtpA de *Mtb*, señalados en rojo:

1 MSDPLHVTFV CTGNICR**SPM AEKMFAQQLR** HRGLGDAVRV **TSAGTGNWHV**  
51 **GSCADER**AAG VLR**AHGYPTD HRAAQVGTEH LAADLLVALD RNHARLLRQL**  
101 **GVEAAR**VRML RSFDPRSGTH ALDVEDPYYG DHSDFEEVFA VIESALPGLH  
151 DWVDERLARN GPS

Query Start	End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	M	Score	Peptide
<a href="#">34</a>	18 - 30	1536.7722	1535.7649	1535.7588	0.0061	1		R.SPMAEKMFAQQLR.H
<a href="#">36</a>	18 - 30	1552.7937	1551.7864	1551.7537	0.0327	1		R.SPMAEKMFAQQLR.H + Oxidation (M)
<a href="#">4</a>	24 - 30	893.4642	892.4569	892.4589	-0.0020	0	32	K.MFAQQLR.H
<a href="#">6</a>	24 - 30	909.4585	908.4512	908.4538	-0.0026	0		K.MFAQQLR.H + Oxidation (M)
<a href="#">43</a>	40 - 57	1846.8177	1845.8104	1845.8064	0.0040	0	48	R.VTSAGTGNWHVHGSCADER.A
<a href="#">14</a>	64 - 72	1053.4874	1052.4801	1052.4788	0.0013	0		R.AHGYPTDHR.A
<a href="#">53</a>	73 - 91	1963.0641	1962.0568	1962.0534	0.0034	0	112	R.AAQVGTEH LAADLLVALDR.N
<a href="#">59</a>	73 - 95	2441.2847	2440.2774	2440.2935	-0.0160	1		R.AAQVGTEH LAADLLVALDRNHAR.L
<a href="#">20</a>	96 - 106	1225.7324	1224.7251	1224.7302	-0.0051	1		R.LLRQLGVEAAR.V

### Anexo 3. Determinación del pKa de las cisteínas de PtpA y PtpA-D126A

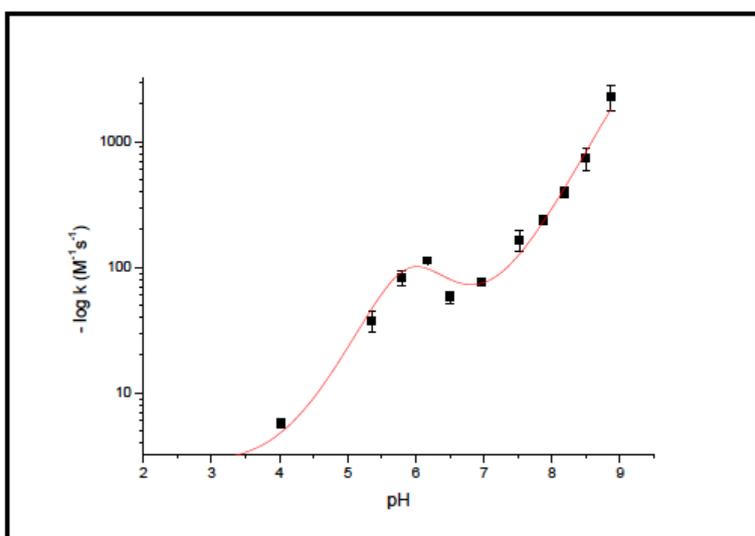


**Figura A3.1.** Gráfico de constantes de velocidad de reacción con mBBR en función del pH para PtpA-wt. Con la ecuación de la curva con la cual se ajustaron los datos experimentales se determinaron los valores de pKa de las Cys, correspondientes a los puntos de inflexión en la curva.

La ecuación utilizada para ajustar los datos experimentales fue la siguiente:

$$y = \frac{a_1}{1 + \frac{K_{a1}}{[H^+]} + \frac{K_{a1}K_{a2}}{[H^+]^2} + \frac{K_{a1}K_{a2}K_{a3}}{[H^+]^3}} + \frac{a_2}{\frac{[H^+]}{K_{a1}} + 1 + \frac{K_{a2}}{[H^+]} + \frac{K_{a2}K_{a3}}{[H^+]^2}} + \frac{a_3}{\frac{[H^+]^2}{K_{a1}K_{a2}} + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + 1 + \frac{K_{a3}}{[H^+]}} + \frac{a_4}{\frac{[H^+]^3}{K_{a1}K_{a2}K_{a3}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a2}K_{a3}} + \frac{[H^+]}{K_{a3}} + 1}$$

Donde y representa la constante de velocidad aparente y  $a_1, a_2, a_3$  y  $a_4$  son las velocidades de reacción independientes del pH, de las cuatro especies involucradas en los tres equilibrios de ionización descritos por  $pK_{a1}, pK_{a2}$  y  $pK_{a3}$ .



**Figura A3.2.** Gráfico de constantes de velocidad de reacción con mBBR en función del pH para PtpA-D126A. Con la ecuación de la curva con la cual se ajustaron los datos experimentales se determinaron los valores de pKa de las Cys, correspondientes a los puntos de inflexión en la curva.

Los datos se ajustaron con la misma ecuación utilizada para la PtpA-wt.

## Anexo 4. Detalle de la identificación por Nano-LC-MS/MS de los posibles sustratos de PtpA

ECHA_HUMAN Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial													
Score	Mass	Matched ions	Peptide sequences	Dupes	m/z obs	M exp	M calc	Delta	Miss	Pept score	Rank	U	Peptide
2426	82947	63	23	1	418.47	834.92	833.44	1.48	0	44	1	U	R.GQQQVFK.G
					435.15	868.29	867.44	0.84	0	43	1	U	K.HVAEDLGK.V
				1	470.62	939.23	939.47	-0.24	0	51	1	U	K.FGELVMTK.E + Oxidation (M)
				1	521.38	1040.75	1039.53	1.22	0	60	1	U	R.FVDLYGAQK.I
				3	559.74	1117.46	1117.60	-0.13	0	79	1	U	K.DTSASAVAVGLK.Q
				2	602.23	1202.45	1202.60	-0.15	0	65	1	U	K.GFYIQEYQEVK.R
				1	660.15	1318.28	1317.72	0.56	0	75	1	U	K.MQLLEIITTEK.T
				1	668.06	1334.11	1333.72	0.40	0	81	1	U	K.MQLLEIITTEK.T + Oxidation (M)
				1	696.66	1391.30	1391.69	-0.40	0	73	1	U	K.VIGMHYFSPVDK.M
				1	705.52	1409.03	1407.69	1.34	0	72	1	U	K.VIGMHYFSPVDK.M + Oxidation (M)
				1	761.52	1521.03	1520.74	0.29	0	106	1	U	K.DLNSDMSILASLK.L
					781.64	1561.27	1560.78	0.49	0	98	1	U	K.MVGVPALDMMLTGR.S
				1	789.42	1576.83	1576.78	0.05	0	67	1	U	K.MVGVPALDMMLTGR.S + Oxidation (M)
				1	789.58	1577.14	1576.78	0.37	0	90	1	U	K.MVGVPALDMMLTGR.S + Oxidation (M)
					789.62	1577.23	1576.79	0.44	0	117	1	U	R.FGGGNPELLTQMVSQK.G
				1	797.57	1593.13	1592.77	0.36	0	115	1	U	K.MVGVPALDMMLTGR.S + 2 Oxidation (M)
				1	797.59	1593.16	1592.79	0.37	0	112	1	U	R.FGGGNPELLTQMVSQK.G + Oxidation (M)
					814.10	1626.19	1625.85	0.33	0	91	1	U	R.TIEYLEEVAITFAK.G
				1	816.07	1630.13	1629.83	0.30	0	107	1	U	K.TLQEVTLQSQAQR.I
				1	544.52	1630.55	1629.83	0.72	0	83	1	U	K.TLQEVTLQSQAQR.I
				1	840.63	1679.26	1678.85	0.41	0	109	1	U	K.ADMVIEAVFEDLSLK.H
					848.58	1695.15	1694.84	0.31	0	90	1	U	K.ADMVIEAVFEDLSLK.H + Oxidation (M)
					566.14	1695.41	1694.84	0.57	0	48	1	U	K.ADMVIEAVFEDLSLK.H + Oxidation (M)
				1	922.05	1842.085	1841.81	0.28	0	120	1	U	K.TGIEQGS DAGYLCESQK.F + Carbamidomethyl (C)
				1	1004.18	2006.35	2006.11	0.24	0	131	1	U	K.TVLGTPEVLLGALPGAGGT QR.L
					669.93	2006.77	2006.12	0.66	0	48	1	U	K.TVLGTPEVLLGALPGAGGT QR.L
				1	674.64	2020.90	2020.11	0.79	0	93	1	U	K.HLAILGAGLMGAGIAQVSVD K.G
				1	679.78	2036.31	2036.11	0.20	0	91	1	U	K.HLAILGAGLMGAGIAQVSVD K.G + Oxidation (M)
				1	1031.60	2061.19	2060.97	0.22	0	109	1	U	R.DSIFSNLTGQLDYQGFKA
					759.15	2274.42	2273.21	1.21	0	61	1	U	K.MGLVDQLVEPLGPKPPE ER.T
				1	807.60	2419.77	2419.11	0.66	0	50	1	U	K.ELHSEFSEVMNEIWASDQI R.S
					812.84	2435.51	2435.11	0.40	0	41	1	U	K.ELHSEFSEVMNEIWASDQI R.S + Oxidation (M)
				1	903.15	2706.43	2706.38	0.04	0	48	1	U	K.STKPIVAAINGSCLGGGLEVAISCQYR.I
					922.12	2763.34	2763.27	0.07	1	41	1	U	K.TGIEQGS DAGYLCESQKFG ELVMTK.E + Carbamidomethyl (C); Oxidation (M)
				1	946.29	2835.85	2835.49	0.36	1	120	1	U	K.KLDSLTTSGFPVGAATLVD EVGVDVAK.H

SQRD_HUMAN Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial													
Score	Mass	Matched ions	Peptide sequences										
705	49929	28	10	Dupes	m/z obs	M exp	M calc	Delta	Miss	Pept score	Rank	U	Peptide
				1	549.27	1096.53	1096.58	-0.05	0	56	1	U	R.VILAEFDYK.A
				3	655.32	1308.62	1307.62	1.00	0	60	1	U	K.IMYLSEAYFR.K + Oxidation (M)
				9	672.57	1343.13	1342.72	0.41	0	86	1	U	K.TAAAVAAQSGILDR.T
				2	724.65	1447.29	1447.73	-0.44	0	76	1	U	K.YADALQEIIQER.N
				2	755.05	1508.08	1507.72	0.36	0	71	1	U	K.AEPLTFPFDQSK.E
					789.28	1576.54	1575.83	0.71	1	60	1	U	K.KYADALQEIIQER.N
					883.64	1765.26	1764.78	0.48	0	69	1	U	K.YDGYTSCPLVTGYNR.V + Carbamidomethyl (C)
					947.74	1893.47	1892.87	0.59	1	66	1	U	K.KYDGYTSCPLVTGYNR.V + Carbamidomethyl (C)
					655.32	1962.93	1962.93	0.00	1	42	1	U	K.CAGAPQKIMYLSEAYFR.K + Oxidation (M)
				1	1009.68	2017.34	2017.01	0.34	0	125	1	U	R.NHYEVLVLGGSGGITMAR.M + Oxidation (M)

ATPA_HUMAN ATP synthase subunit $\alpha$ , mitochondrial													
Score	Mass	Matched ions	Peptide sequences										
531	59714	16	7	Dupes	m/z obs	M exp	M calc	Delta	Miss	Pept score	Rank	U	Peptide
					395.45	788.89	788.41	0.47	0	57	1	U	R.VGSAAQTR.A
					500.42	998.82	999.57	-0.75	0	46	1	U	R.VLSIGDGIAR.V
				1	586.36	1170.71	1170.62	0.08	0	75	1	U	R.VVDALGNAIDGK.G
				1	644.54	1287.06	1286.69	0.37	0	67	1	U	K.HALIIYDLSK.Q
					659.21	1316.41	1315.73	0.68	0	89	1	U	K.TSIAIDIINQK.R
				2	788.64	1575.27	1574.78	0.49	0	120	1	U	R.ILGADTSVDLEETGR.V
				5	812.80	1623.59	1623.88	-0.29	0	87	1	U	R.TGAIVDVPVGEELGR.V

**K6PP\_HUMAN 6-phosphofructokinase, platelet type**

Score	Mass	Matched ions	Peptide sequences										
922	85542	47	15	Dupes	m/z obs	M exp	M calc	Delta	Miss	Pept score	Rank	U	Peptide
					427.91	853.81	853.44	0.37	0	41	1	U	R.MGIYVGAK.V + Oxidation (M)
					463.22	924.43	924.49	-0.07	0	43	1	U	K.LPDDQIPK.T
				4	511.87	1021.72	1021.60	0.11	0	69	1	U	R.VTILGHVQR.G
					529.55	1057.09	1057.56	-0.46	0	45	1	U	K.FLEHLSGAGK.A
					1058.50	1057.50	1057.56	-0.06	0	61	1	U	K.FLEHLSGAGK.A
					530.63	1059.25	1059.51	-0.26	1	48	1	U	K.KQTDFEHR.I
				1	534.35	1066.68	1066.55	0.13	0	50	1	U	R.TFVLEVMGR.H + Oxidation (M)
				1	557.87	1113.72	1113.55	0.17	0	50	1	U	R.SFAGNLNTYK.R
					396.29	1185.86	1185.65	0.21	1	41	1	U	R.KFLEHLSGAGK.A
				1	629.57	1257.12	1256.71	0.40	0	44	1	U	R.NVIFQPVAELK.K
				5	635.47	1268.93	1268.61	0.32	0	59	1	U	K.YLEEIATQMR.T + Oxidation (M)
				4	697.38	1392.74	1392.72	0.01	0	91	1	U	K.ELVVTQLGYDTR.V
				7	706.52	1411.02	1411.69	-0.67	0	72	1	U	R.DLQSNVEHLTEK.M
				1	732.51	1463.00	1462.68	0.32	0	83	1	U	R.MLAIYDGFDFGFAK.G + Oxidation (M)
				1	601.48	1801.41	1802.89	-1.48	0	64	1	U	K.AIGVLTSGGDAQGM NAAVR.A + Oxidation (M)
				3	902.63	1803.25	1802.89	0.36	0	102	1	U	K.AIGVLTSGGDAQGM NAAVR.A + Oxidation (M)
				2	914.21	1826.40	1825.85	0.54	0	80	1	U	K.NVLGHMQGGGAPS PFDR.N + Oxidation (M)

## Anexo 5. Identificación de potenciales sustratos eucariotas de PtpA de *Mtb* en un extracto de macrófagos preparado sin IAA

**Tabla A5.1.** Proteínas identificadas por Nano-LC-MS en un experimento de ST con PtpA-D126A, en el cual se utilizó un extracto de proteínas de macrófago donde la fosforilación en tirosina se preservó únicamente mediante el agregado de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , sin el tratamiento con IAA.

Código	Score	Masa (Da)	Matches	Secuencias peptídicas	emPAI	Nombre de la proteína
EFTS_HUMAN <sup>(a)</sup>	645	35368	14	5	0,83	Elongation factor Ts, mitocondrial
GLCM_HUMAN <sup>(b)</sup>	416	59678	12	7	0,44	Glucosylceramidase
SSBP_HUMAN <sup>(b)</sup>	589	17249	10	5	1,76	Single-stranded DNA-binding protein, mitocondrial
<b>SQRD_HUMAN</b>	266	49929	8	5	0,43	Sulfide:quinone oxidoreductase, mitocondrial
ECHA_HUMAN <sup>(a)</sup>	62	82947	1	1	0,04	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitocondrial

- (a) La proteína EFTS integra la familia de factores de elongación, que está reportada como una de las familias de proteínas que son detectadas frecuentemente en los estudios de espectrometría de masa (definidas como proteínas que son detectadas 3 veces más que el promedio).
- (b) Las proteínas GLCM y SSBP humanas también se identificaron en dos réplicas biológicas de ensayos de ST con PtpA-D126A utilizando extracto de macrófagos donde se preservó la fosforilación con  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  y IAA.

## Anexo 6. Análisis de la fracción obtenida mediante inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-TFP(ECHA/ECHB) a partir de extractos de macrófagos

El análisis se llevó a cabo mediante espectrometría de masa nano LC/MS, utilizando los siguientes parámetros :

<b>Type of search</b>	:	MS/MS Ion Search
<b>Enzyme</b>	:	Trypsin
<b>Fixed modifications</b>	:	Carbamidomethyl (C)
<b>Variable modifications</b>	:	Oxidation (M)
<b>Mass values</b>	:	Monoisotopic
<b>Protein mass</b>	:	Unrestricted
<b>Peptide mass tolerance</b>	:	± 1.5 Da
<b>Fragment mass tolerance</b>	:	± 1 Da
<b>Max missed cleavages</b>	:	1
<b>Instrument type</b>	:	ESI-TRAP
<b>Number of queries</b>	:	5.661

Significance threshold  $p < 0.05$

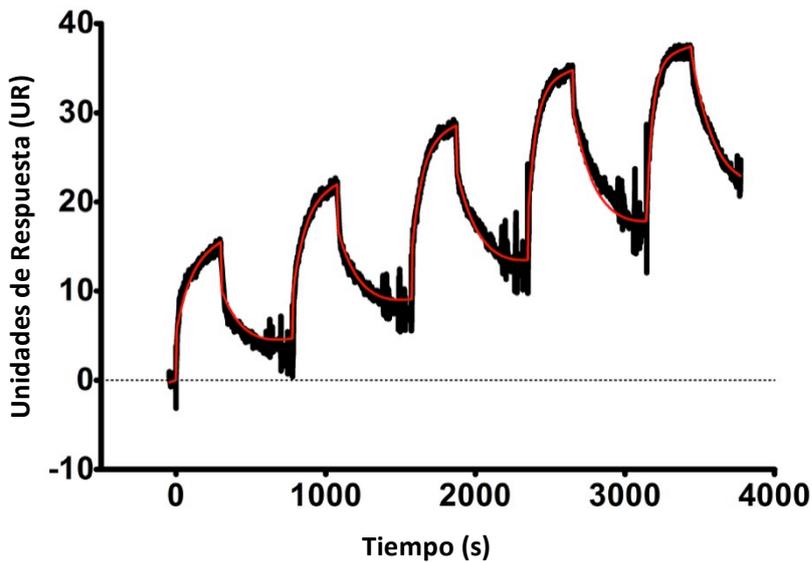
Ions score or expect cut-off: 35

**Tabla A6.1.** Proteínas identificadas por nano LC-MS en la fracción inmunopurificada con el anticuerpo anti-TFP (ECHA/ECHB).

Código proteína	score	Masa (kDa)	matches	Sec. Peptidicas	emPAI <sup>(a)</sup>	Proteína identificada
ECHA_HUMAN	790	83688	26 (26)	12 (12)	0,76	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial
RO52_HUMAN	599	55162	28 (28)	9 (9)	0,92	E3 ubiquitin-protein ligase (TRIM21)
ECHB_HUMAN	480	51547	14 (14)	6 (6)	0,52	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial
DHB4_HUMAN	478	80092	9 (9)	5 (5)	0,25	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2
RS18_HUMAN	318	17708	8 (8)	4 (4)	1,2	40S ribosomal protein S18
RS29_HUMAN	86	6900	5 (5)	2 (2)	1,59	40S ribosomal protein S29
IL10_HUMAN	49	20845	3 (3)	2 (2)	0,4	Interleukin-10 OS=Homo sapiens

<sup>(a)</sup> El valor emPAI es un parámetro que es utilizado como una estimación de la abundancia de la proteína en la muestra.

## Anexo 7. Determinación de la constante de interacción entre PtpA-D126A y la TFP (ECHA/ECHB), mediante el método *Kinetic Titration*



**Figura A7.1.** Experimento de *Kinetic titration* realizado con la proteína TFP inmovilizada a un sensor chip (360 UR). Inyecciones de PtpA-D126A a una concentración de 3.15, 4.72, 7.09, 10.63, 15.94  $\mu\text{M}$  en buffer de corrida (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 50 mM, EDTA 5 mM, Tween 20 0.005 % y 1 mM DTT), a 25°C, durante 5 min y con un flujo de 40  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Se realizaron períodos de asociación de 5 min y disociación de 8 min antes de la siguiente inyección. Todas las titulaciones fueron doble referenciadas (se restaron las curvas correspondientes a las inyecciones con tampón de corrida realizadas durante los mismos intervalos de tiempos y la señal sobre la superficie control). La curva de color negro corresponde a los datos obtenidos luego de la doble referenciación y la curva de color rojo representa el ajuste al modelo de interacción 1:1 usando la modalidad de *Kinetic Titration*. Únicamente se logró un ajuste adecuado cuando asumimos que existe una deriva en la línea de base, lo cual no se observa en esta figura pero sí se observa en los datos crudos sin editar.

**Tabla A7.1.** Parámetros cinéticos obtenidos mediante el modelo *kinetic titration*

Parámetro cinético	global	local
ka	$1.18 \cdot 10^3$	
kd	$5.99 \cdot 10^{-3}$	
KD	$5.09 \cdot 10^{-6}$	
Rmax	23.6	
kt		$2.00 \cdot 10^8$
RI1		5.34
RI2		5.15
RI3		4.86
RI4		4.53
RI5		0.919
Drift	$5.41 \cdot 10^{-3}$	
Chi2	0.87	

ka: constante de asociación

Kd: constante de disociación

KD: constante de afinidad

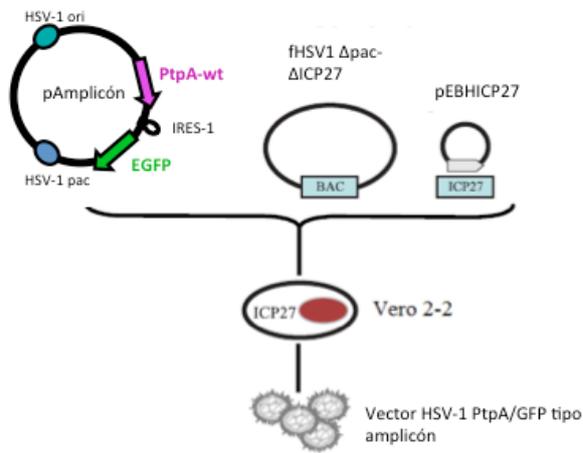
Rmax: valor max de UR (unidades de respuesta)

Kt: constante cinética para el transporte de masa, que se refiere a lo rápido que acceden las moléculas de analito a la proteína inmovilizada. Idealmente es un valor muy alto, donde las moléculas de analito que pasan lejos de la superficie acceden a la proteína inmovilizada con la misma facilidad que las moléculas que pasan mas cerca. La limitación por transporte de masa es un efecto artefactual que se disminuye aumentando el flujo.

RI1 a RI5 son saltos artefactuales que se dan en las inyecciones debido a cambios en el índice de refracción de la muestra. Si se da una subida al inicio de la inyección se debe dar una bajada de igual magnitud al final de la misma. Son parámetros que se ajustan en forma local, es decir cada uno corresponde a una inyección.

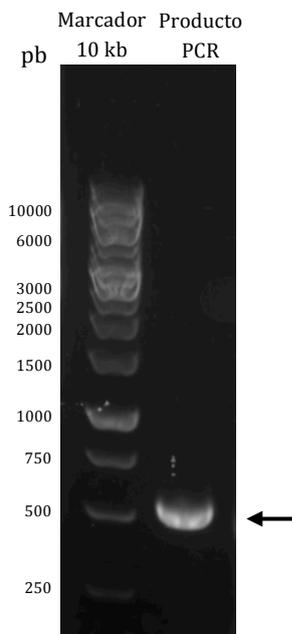
Drift: es la deriva observada en la línea de base

## Anexo 8. Obtención del vector viral HSV-1 amplicón

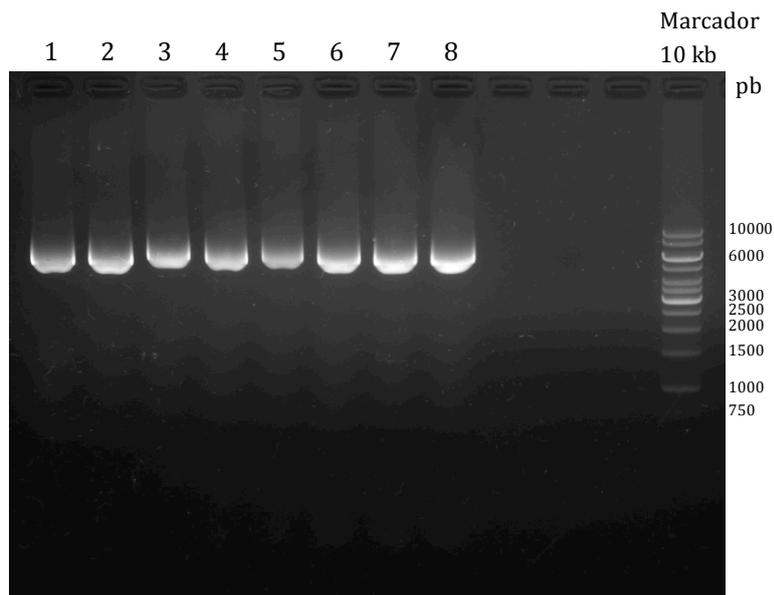


**Figura A8.1.** Estrategia de producción del vector viral HSV-1 tipo amplicón conteniendo el gen de la PtpA.

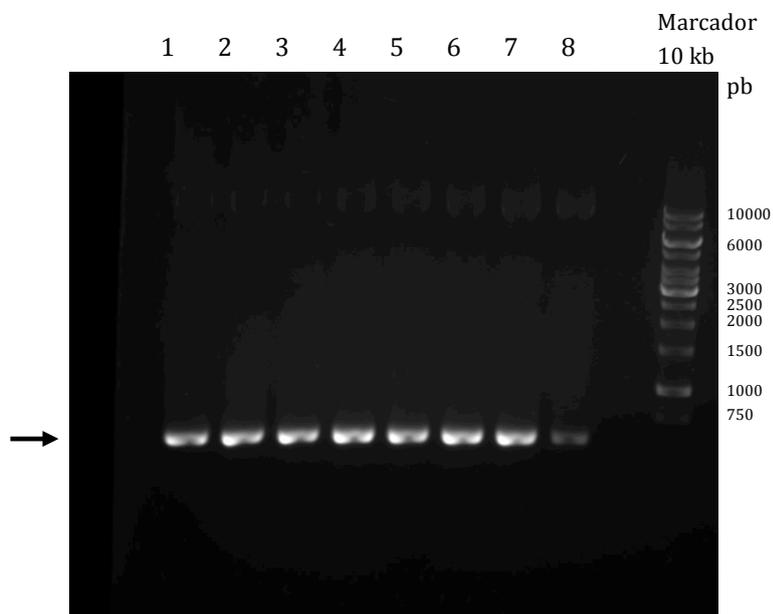
### A8.1. Producción del plásmido amplicón pHSV1-IRES-PtpA-wt



**Figura A8.1** Producto de PCR correspondiente al megaprimero conteniendo el gen de la PtpA wt, obtenido en la primera reacción de amplificación de la metodología *Rf cloning*. Debido a las dificultades en la segunda etapa de PCR dicho producto se digirió con HindIII para clonar el gen de PtpA wt en el plásmido pHSV1-IRES-EGFP por el método clásico basado en el uso de enzimas de restricción.



**Figura A8.2.** Separación por electroforesis en gel de agarosa del ADN plasmídico purificado a partir de colonias resultantes de la transformación de células *E.coli* DH5 $\alpha$  con el producto de ligación entre el gen de la PtpA wt y el plásmido pHSV1- IRES-EGFP, ambos digeridos previamente con la enzima HindIII. Se sembraron 2  $\mu$ l del ADN plasmídico obtenido a partir de 8 colonias (numeradas del 1 al 8) en un gel al 1% de agarosa.



**Figura A8.3.** Separación por electroforesis en gel de agarosa de las muestras obtenidas luego de la amplificación por PCR del gen PtpA-wt, utilizando como molde el ADN plasmídico aislado de las colonias transformantes seleccionadas (numeradas del 1 al 8). Se sembraron 5  $\mu$ l de cada producto de la reacción de PCR en un gel al 1% de agarosa. En todas las muestras analizadas se obtuvo un fragmento de las pb esperadas (500 pb).

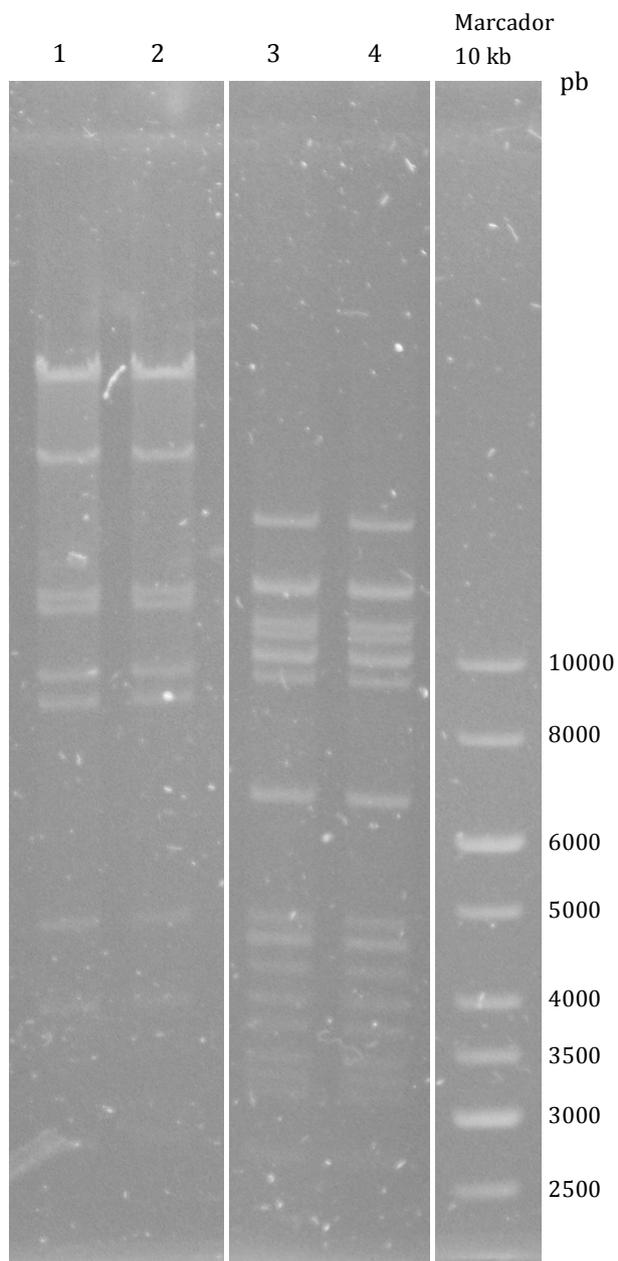
## A8.2. Análisis de la secuencia del ADN plasmídico pHSV1-PtpA-IRES-EGFP

En dicho análisis confirmamos la ausencia de mutaciones en la secuencia de PtpA y su correcta inserción en el plásmido de clonado.

The screenshot displays a sequence alignment software window with the following details:

- Menu Bar:** File, Edit, Sequence, Alignment, View, Accessory, Application, RNA, World Wide Web, Options, Window, Help.
- Toolbar:** Includes icons for file operations, sequence editing, and alignment.
- Main Window:** Shows two sequences: "PtpA wt" and "pHSV-PtpA Rev". The alignment is displayed in four segments:
  - Segment 1 (130-280):** PtpA wt: TGGCCTTCCCGCAGGAGGAACCTCCTCGTACGATAAGCTTGC...; pHSV-PtpA Rev: TGGCCTTCCCGCAGGAGGAACCTCCTCGTACGATAAGCTTGC...
  - Segment 2 (280-430):** PtpA wt: GGTGCGAGTGACACAGTGC...; pHSV-PtpA Rev: GGTGCGAGTGACACAGTGC...
  - Segment 3 (430-580):** PtpA wt: GCGTTGGACCGCAACACGCTCGGCTGTGCGGAGCTCGGCTCGAAGCCCGGGTACGATGCTGCGGTTCATTCEAACCCAGCTCGGGAACCCATGCGCTCGATGTCAGGATCCCTACTATGGCGATCACTCCGACTTCGAGGAGTCTTCGC...; pHSV-PtpA Rev: GCGTTGGACCGCAACACGCTCGGCTGTGCGGAGCTCGGCTCGAAGCCCGGGTACGATGCTGCGGTTCATTCEAACCCAGCTCGGGAACCCATGCGCTCGATGTCAGGATCCCTACTATGGCGATCACTCCGACTTCGAGGAGTCTTCGC...
  - Segment 4 (580-720):** PtpA wt: TCGAGGAGTCTTCGCGCTCATCGAATCCGCGCTCGCCGCTGCACGACTGGGTGACGACGCTCTCGCGGGAACGGAACCGAGTTGA...; pHSV-PtpA Rev: TCGAGGAGTCTTCGCGCTCATCGAATCCGCGCTCGCCGCTGCACGACTGGGTGACGACGCTCTCGCGGGAACGGAACCGAGTTGA...

### A8.3. Obtención del Bócmido fHSV1- $\Delta$ pac- $\Delta$ ICP27



**Figura A8.4.** Perfil electroforético del bócmido fHSV1- $\Delta$ pac- $\Delta$ ICP27 digerido con enzimas de restricción Hind III (carriles 1 y 2), o KpnI (carriles 3 y 4). Las muestras obtenidas luego de la digestión con las enzimas de restricción se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % (La confirmación de la identidad del bócmido fue realizada por el estudiante de Maestría Darío Porley).



## OPEN

## SUBJECT AREAS:

PROTEIN-PROTEIN  
INTERACTION  
NETWORKS

MECHANISMS OF DISEASE

Received  
26 September 2014Accepted  
27 January 2015Published  
6 March 2015Correspondence and  
requests for materials  
should be addressed to  
A.V. (avillarino@fcien.  
edu.uy)\* Current address:  
Department of  
Biological Sciences,  
University of Calgary,  
Calgary, AB, T2N  
1N4, Canada.

# New potential eukaryotic substrates of the mycobacterial protein tyrosine phosphatase PtpA: hints of a bacterial modulation of macrophage bioenergetics state

Mariana Margenat<sup>1</sup>, Anne-Marie Labandera<sup>1\*</sup>, Magdalena Gil<sup>2</sup>, Federico Carrion<sup>5</sup>, Marcela Purificação<sup>4</sup>, Guilherme Razzera<sup>4</sup>, María Magdalena Portela<sup>1,2,3</sup>, Gonzalo Obal<sup>5</sup>, Hernán Terenzi<sup>4</sup>, Otto Pritsch<sup>5</sup>, Rosario Durán<sup>2</sup>, Ana María Ferreira<sup>6</sup> & Andrea Villarino<sup>1</sup><sup>1</sup>Sección Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, CP 11400, Montevideo, Uruguay, <sup>2</sup>Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, Institut Pasteur de Montevideo, CP 11400, Uruguay, <sup>3</sup>Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, CP 11600, Montevideo, Uruguay, <sup>4</sup>Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, CEP 88040-900, Florianópolis, Brazil, <sup>5</sup>Unidad de Biofísica de Proteínas, Institut Pasteur de Montevideo, CP 11400, Montevideo, Uruguay, <sup>6</sup>Cátedra de Inmunología, Facultad de Ciencias-Facultad de Química, Universidad de la República, CP 11600, Montevideo, Uruguay.

The bacterial protein tyrosine phosphatase PtpA is a key virulence factor released by *Mycobacterium tuberculosis* in the cytosol of infected macrophages. So far only two unrelated macrophage components (VPS33B, GSK3 $\alpha$ ) have been identified as PtpA substrates. As tyrosine phosphatases are capable of using multiple substrates, we developed an improved methodology to pull down novel PtpA substrates from an enriched P-Y macrophage extract using the mutant PtpA D126A. This methodology reduced non-specific protein interactions allowing the identification of four novel putative PtpA substrates by MALDI-TOF-MS and nano LC-MS: three mitochondrial proteins - the trifunctional enzyme (TFP), the ATP synthase, and the sulfide quinone oxidoreductase - and the cytosolic 6-phosphofructokinase. All these proteins play a relevant role in cell energy metabolism. Using surface plasmon resonance, PtpA was found to bind immunopurified human TFP through its catalytic site since TFP-PtpA association was inhibited by a specific phosphatase inhibitor. Moreover, PtpA wt was capable of dephosphorylating immunopurified human TFP *in vitro* supporting that TFP may be a bona fide PtpA substrate. Overall, these results suggest a novel scenario where PtpA-mediated dephosphorylation may affect pathways involved in cell energy metabolism, particularly the beta oxidation of fatty acids through modulation of TFP activity and/or cell distribution.

**M**ycobacterium tuberculosis (*Mtb*) is the causal agent of tuberculosis (TB) an infectious disease responsible for over 1.7 million human deaths every year (www.who.int). The incidence of new cases of TB has increased mainly due to the emergence of multi-drug resistant strains and the co-infection with HIV<sup>1</sup>. An important pre-requisite for the rapid development of new clinically relevant drugs is the understanding, at the molecular level, of host-bacteria interactions responsible for pathogenesis. *Mtb* is capable of subverting the host immune response, surviving and replicating within host macrophages<sup>2</sup>. However, the discovery of cytosolic mycobacteria challenged the paradigm that *Mtb* exclusively localizes within the phagosome of host cells<sup>3</sup>. Moreover, *Mtb* cytosolic translocation, mediated by the early secreted antigenic target 6kDa (ESAT-6) and its secretion system called ESX-1, correlates with pathogenicity<sup>3</sup>. These observations suggest that *Mtb* targets and modulates the activity of macrophage cytoplasmic components involved in cell signaling pathways associated with vital cellular processes, including inflammatory, metabolic and survival responses. Among other bacterial factors, *Mtb* protein tyrosine phosphatases (PTPs) may be implicated in these modulatory effects and are considered potential drug targets for anti-tuberculosis therapy<sup>4</sup>.



*Mtb* has two PTPs, PtpA and PtpB, which are delivered into the macrophage during infection acting as key virulence factors<sup>5–8</sup>. PtpA and PtpB lack protein export signal sequences but both have been detected in the culture filtrates of *Mtb* grown *in vitro*<sup>9,10</sup>. Recent studies suggested that the SecA2 and ESX/type VII export systems are possible candidates responsible for PtpA export<sup>4,11</sup>. In addition, PtpA has been detected into the infected host macrophage cytoplasm by immuno-electron microscopy and Western blot analysis of the cytosolic fractions, and by the expression of neutralizing single-chain anti-PtpA antibodies<sup>7</sup>. The *Mtb PtpA*-deletion mutant strain showed reduced survival of the mycobacteria in infected human THP-1 derived macrophages, and expression of PtpA-neutralizing antibodies and inhibitors simulated this effect<sup>7,8</sup>. Recently, Chauhan *et al.* generated an *Mtb* mutant (*MtbΔmms*) by disrupting three virulence genes encoding PtpA, PtpB and the acid phosphatase, SapM<sup>12</sup>. This mutant displayed a significantly reduced ability to infect and grow inside human THP-1 macrophages. Moreover, no bacilli were recovered in spleens and lungs of guinea pigs 10 weeks following inoculation with *MtbΔmms*, suggesting an important role of these phosphatases in the colonization of these organs<sup>12</sup>.

PtpA is a member of the low-molecular-weight PTP (LMW-PTP) family, which does not require metal ions for catalysis<sup>13</sup>. PtpA shows 37% of sequence identity and high structural similarity to its human orthologue HCPTPB. Surprisingly, the human genome encodes for 107 PTPs but only one belongs to the PtpA family which originates four protein isoforms by alternative splicing of a single transcript<sup>14</sup>. Two eukaryotic cytoplasmic proteins were reported as *Mtb* PtpA substrates: VPS33B (Vacuolar Protein Sorting 33B) which is part of the protein complex C required for membrane trafficking and fusion<sup>7</sup>, and the GSK3 $\alpha$  (Glycogen Synthase Kinase 3,  $\alpha$  subunit)<sup>15</sup>. Dephosphorylation of these macrophage components would act as a bacterial mechanism to adapt to macrophage defense response<sup>7,16</sup>. On one hand, dephosphorylation of VPS33B by PtpA seems to exclude host vacuolar-H<sup>+</sup>-ATPase leading to inhibition of phagosome acidification and maturation<sup>7,16</sup>. Secondly, GSK3 $\alpha$  dephosphorylation by PtpA would promote an anti-apoptotic pathway, favoring pathogen survival within host macrophage. As tyrosine phosphatases are capable of utilizing multiple protein substrates, thereby providing versatility in phospho-relay signaling networks, the search for specific phosphatase targets is still open and presents an experimental challenge.

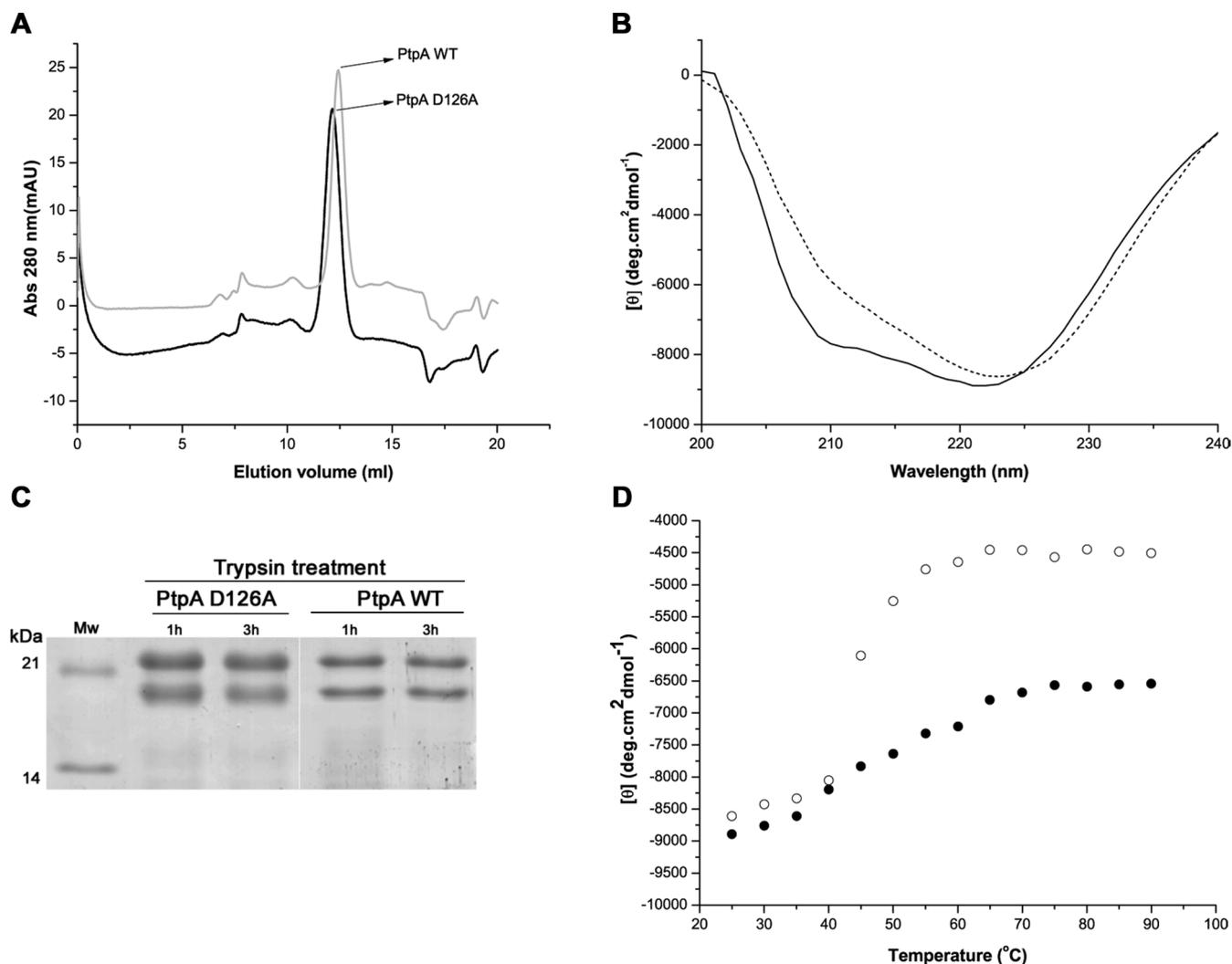
The most commonly used biochemical tool for identifying potential PTP substrates is based on the generation of phosphatase mutants (substrate trapping mutants) that retain the ability to bind substrates but are either unable or severely impaired in carrying out substrate dephosphorylation, allowing the isolation of the PTP-substrate complex<sup>17–19</sup>. One of the most common mutants is produced by the substitution of the conserved catalytic aspartate, which assists the E-P formation and hydrolysis, by an alanine residue (D/A mutant). In the *Mtb* PtpA, the conserved catalytic aspartate is the Asp 126, which is not considered crucial in defining substrate specificity<sup>20</sup>. As reported in a kinetic study, the *Mtb* PtpA D126A mutant is characterized by a reduced activity (lower  $k_{cat}$ ) compared to the wt, without substantial  $K_m$  modification<sup>21</sup>, as also observed for the corresponding mutants of other PTPs<sup>17,22</sup>. This methodology has been successfully used in the identification of substrates of eukaryotic PTPs<sup>18,19</sup> but only a few substrates of bacterial PTPs<sup>7,23</sup>. The success of this methodology depends on the use of strict conditions during association and washes steps in order to avoid capturing unspecific and abundant proteins. Furthermore, it is often assumed that substrate-trapping mutants retain the structural and substrate binding properties of wt PTPs. However, significant differences may occur, leading to erroneous interpretation and thus invalidating the strategy<sup>24</sup>. Thus, validation of candidate substrates identified using substrate trapping is indispensable.

In this work, we attempted to improve the substrate trapping methodology to obtain novel *Mtb* PtpA substrates. For this aim, we firstly verified the structural and biochemical properties of the PtpA D126A mutant to ensure its adequacy for substrate trapping. Then, we prepared an extract of human macrophage-like THP-1 cells preserving phospho-tyrosine (P-Y) modifications and studied by SPR how PtpA interacted with potential substrates present in this extract. This allowed us to choose stringent experimental conditions to apply during substrate trapping steps to reduce non-specific interactions. Using this improved methodology, we successfully isolated and identified four new putative eukaryotic *Mtb* PtpA substrates. Three are proteins synthesized in the cytosol and then translocated to the mitochondria: (i) the  $\alpha$  subunit (ECHA) of the trifunctional enzyme (TFP), an essential enzyme of the fatty acid  $\beta$  oxidation pathway; (ii) the ATP synthase  $\alpha$  subunit (ATPA); (iii) the sulfide quinone oxidoreductase (SQRD). The fourth protein is the 6-phosphofructokinase (K6PP) a key regulatory enzyme of the glycolysis which localizes in the cytoplasm. We advanced in the validation of one of these candidates, showing *in vitro* that the TFP is a bona fide substrate of PtpA.

## Results

**Structural and functional properties of PtpA D126A substrate trapping mutant.** To achieve an adequate substrate trapping tool, the mutation introduced into PtpA should not generate substantial structural changes that could impair its functionality. Thus, in this study we generated the PtpA D126A mutant by site-directed mutagenesis and determined its structural and functional properties to assess its suitability for substrate trapping assays. We found that PtpA D126A behaved similarly to the PtpA wt through the whole expression and purification procedure, suggesting that this mutation did not significantly alter the enzyme structure (Supplementary Fig. 1). As found for the wt enzyme, the bulk of PtpA D126A was detected in the soluble fraction following overnight induction at 15°C. Interestingly, the yield of the purified protein, estimated from three biological replicates, was higher for the mutant than for the PtpA wt ( $8.8 \pm 3.13$  and  $4.6 \pm 0.24$  mg of protein per liter of bacterial culture, respectively). This difference may be associated with their respective different level in phosphatase activity (see below). In fact, expressing a full active PTP in an organism that already possesses a tyrosine kinase/phosphatase system, as *E. coli*<sup>25</sup>, may cause a cell phosphorylation unbalance and affect the production of the recombinant protein. With regard to the molecular mass, PtpA D126A and PtpA wt were studied by analytical SEC to determine their physical state in aqueous solution. Both phosphatases were eluted in a single major peak with an apparent molecular weight corresponding to the monomeric state (Fig. 1A).

In addition, circular dichroism studies (CD) were undertaken, to assess if the introduced mutation altered PtpA D126A secondary structure<sup>26,27</sup>. As shown in Figure 1B, the CD profiles of the wt and PtpA D126A mutant are basically equal, resulting in 34%  $\alpha$ -helical structure, 19%  $\beta$ -strands and 47% random coils for the mutant, and in 37%  $\alpha$ -helices, 11%  $\beta$ -strands and 52% random coils for the wt. These results are in agreement with the wt crystal structure (PDB ID: 1U2P)<sup>20</sup>. Nonetheless, PtpA D126A had a slightly reduced CD intensity in the 208 nm negative peak compared to the wt, suggesting that there is a small rearrangement in the protein conformation of this mutant. This slight change did not affect the trypsin digestion pattern of PtpA, as the same SDS-PAGE profile was observed after trypsin digestion for 1 to 3 hours (Fig. 1C). In thermal denaturation experiments the wt and mutant PtpA showed a similar profile between 25°C and 40°C, but at higher temperatures a loss of secondary structure was observed for the mutant protein indicating that the Asp 126 molecular contacts contribute to the thermal stability of PtpA wt (Fig. 1D).

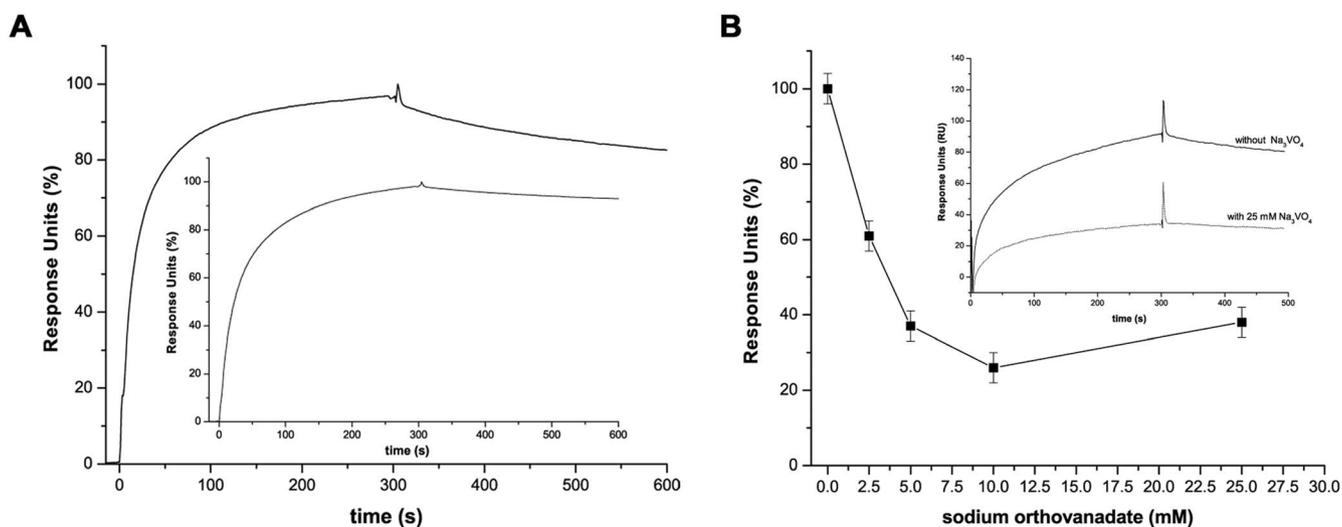


**Figure 1 | Structural characterization of PtpA D126A.** (A) Analysis by size exclusion chromatography of the affinity purified PtpA D126A. The analytical Superdex 75 10/300 GL column was calibrated ( $y = 4154.9 e^{-3.275x}$ ) using SEC molecular weight markers (SIGMA). The elution volume ( $V_e$ ) of native PtpA D126A and PtpA wt was 12.16 ml and 12.43 ml, corresponding to 21 kDa and 19 kDa, respectively (theoretical Mw 19.9 kDa). (B) CD spectra of PtpA wt (continuous line) in comparison with that of the mutant D126A (dashed line). These spectra represent the average of five scans performed with PtpA wt and PtpA D126A. (C) SDS-PAGE (15% gel) analysis of the trypsin-treated PtpA D126A and PtpA wt, showing the non cleaved form ( $\sim 20$  kDa) and the cleaved form of about 18 kDa; Mw, molecular weight marker. (D) Thermal denaturation curves for PtpA wt ( $\bullet$ ) and mutant PtpA D126A ( $\circ$ ).

The kinetic properties of the PtpA D126A mutant were then examined using *p*NPP, a conventional artificial substrate of phosphatases. An optimal D/A substrate trapping mutant is expected to have a similar  $K_m$  but a decreased value of  $k_{cat}$  when compared to the wt enzyme<sup>21,22</sup>. In our case this rule was fulfilled as three independent batches of purified PtpA wt and PtpA D126A presented similar values of  $K_m$  ( $7.4 \pm 3.1$  mM and  $5.3 \pm 2.3$  mM, respectively) while the  $k_{cat}$  for the PtpA D126A ( $0.04 \text{ sec}^{-1}$ ) was 40-fold lower than that observed for the PtpA wt ( $1.58 \text{ sec}^{-1}$ ) (Supplementary Fig. 2A). These enzymatic properties reproduced data previously reported for PtpA D126A: a similar  $K_m$  value and a marked decrease in  $k_{cat}$  (36-fold)<sup>21</sup>. Furthermore, the obtained  $K_m$  values of our mutant were comparable to those reported for other PTPs, particularly the PtpA homologue in *Streptomyces coelicolor* A3(2)<sup>28</sup>. In contrast, Bach *et al* found that the D126A mutation caused a total loss of PtpA phosphatase activity, and not a partial loss of function as is expected for this mutant, but still it allowed identifying VPS33B as a putative PtpA substrate<sup>7</sup>. Differences with our results could be due to distinct experimental procedures used to express and/or to purify this mutant. Overall, we obtained a good yield of mycobacterial PtpA

D126A mutant that exhibited structural and functional features to act as a useful substrate-trapping mutant for isolating eukaryotic substrates of *Mtb* PtpA.

**Study by SPR of PtpA D126A interactions with macrophage protein components.** PtpA D126A was covalently immobilized on a CM5 sensor chip to assess by SPR its ability to bind specifically to macrophage components. For that purpose we prepared a macrophage extract using orthovanadate ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) and iodoacetic acid (IAA) to preserve P-Y modifications in proteins. Short-time association-dissociation sensorgrams are shown in Fig. 2A. A significant response was detected during the association phase followed by a slow dissociation, suggesting that the extract contains molecules capable of interacting with PtpA D126A. Since these sensorgrams are comparable to those obtained for PtpA wt (inset Fig. 2A), the PtpA D126A mutant seems to be useful to capture potential PtpA substrates present in this macrophage extract. When two successive short pulses of 1.0 M NaCl were injected, the dissociation rate and signal remained similar to that observed with the running buffer demonstrating that the inter-

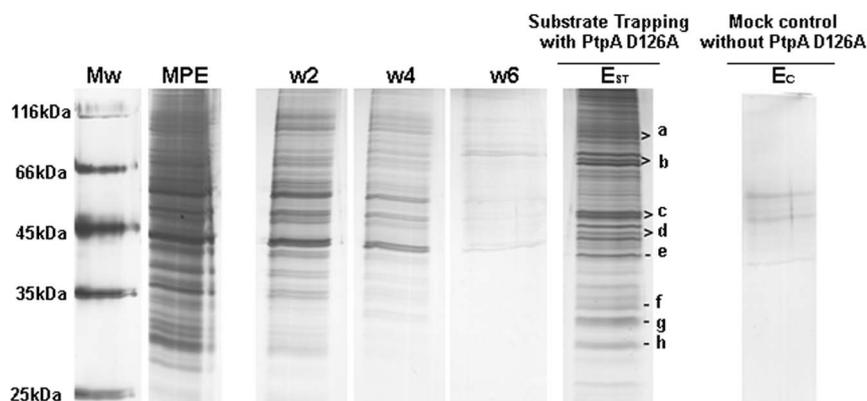


**Figure 2 | Analysis by SPR of protein-protein interaction.** (A) Real time association-dissociation sensorgrams of the macrophage extract with immobilized PtpA D126A. Values are expressed as percentage with 100% corresponding to 90 RU. Inset: association-dissociation sensorgrams corresponding to the interaction of macrophage extract with immobilized PtpA wt. (B) Effect of Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> on the association of macrophage components to PtpA D126A. Results are shown as the maximal association response units (RU, expressed as the percentage relative to the response measured without inhibitor) achieved at increasing concentrations of the inhibitor Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. Accordingly, a 100% response corresponds to the maximal RU obtained by injection of the macrophage extract without inhibitor. Inset: association-dissociation sensorgrams of macrophage extract mixed with 25 mM sodium Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. These sensorgrams are representative of the results obtained in more than three analytical replicates and two biological replicates performed with different batches of purified PtpA and macrophage extracts.

action was resistant to a high ionic strength (Supplementary Fig. 3A). This is in agreement with data showing that several hydrophobic residues in the PtpA active site play a key role in the definition of PtpA substrate specificity<sup>24</sup>. In contrast, pulses of 10 mM glycine pH 2.0 caused a blunt drop of the signal to the baseline, indicating the disruption of putative PtpA D126A complexes at low pH (Supplementary Fig. 3B). The response level was not affected after 4 cycles of regeneration with glycine pH 2.0 (Supplementary Fig. 3C). Furthermore, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, a competitive inhibitor of tyrosine phosphatases, was utilized to analyze whether the active site was involved in the interactions between PtpA D126A and macrophage components. When the inhibitor was mixed with the macrophage extract before injection, a dose dependent decrease in the total response units (RU) was observed (Fig. 2B). This result suggests that the macrophage extract contained components which were capable of binding to PtpA mutant through the active site. Alternatively, PtpA complexes with macrophage components were allowed to form and then pulses of the inhibitor (25 mM) were applied. In this case Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> was unable to promote protein components dissociation of PtpA D126A suggesting that the interaction of the PtpA mutant with macrophage components was of higher affinity than with the Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. Overall, SPR analysis resulted in a useful tool to define adequate experimental conditions to isolate proteins specifically bound to PtpA D126A during the substrate trapping assay. High salt concentration seems to be a good choice for washing steps to reduce non-specific binding, while low pH would be useful for eluting the proteins bound to PtpA D126A with high affinity.

**Substrate trapping assay.** On the basis of SPR studies we designed a substrate trapping assay to pull down novel PtpA substrates from the macrophage extract in which P-Y modifications were preserved. The mutant enzyme was covalently immobilized to an NHS-activated sepharose matrix through the same chemistry used in SPR experiments. As a control we verified that the phosphatase activity was not altered after immobilization (Supplementary Fig. 2C). The binding of PtpA D126A is expected to be uni or bi-punctual since PtpA has only one Lys in addition to the N-terminal group

(Supplementary Fig. 2D). The remaining active groups of the matrix were blocked with ethanolamine, an indispensable step to minimize unspecific protein binding. This constitutes an advantage with respect to the His-tag affinity matrix, used in some cases in substrate trapping experiments. The immobilized PtpA D126A was then incubated with the macrophage extract and subsequently washed with high ionic strength solutions (0.5 M and 1 M NaCl) in order to reduce unspecific protein interactions. The putative PtpA D126A partners were firstly recovered by elution with Laemmli sample buffer. Figure 3 shows the SDS-PAGE analysis of the wash and elution samples obtained in PtpA D126A substrate trapping assays. Following six washes of the matrix, almost no protein was detected by silver staining of the gels (lane w<sub>6</sub>). After elution, a band pattern (E<sub>ST</sub> lane) visibly different from that observed for the input macrophage extract (lane MPE) and washes (w<sub>2</sub>-w<sub>6</sub> lanes), was observed. This suggests that potential partners of PtpA D126A were enriched during the substrate trapping assay. In mock substrate trapping experiments, where the macrophage extracts were loaded on a matrix without immobilized PtpA D126A, only few bands were detected in the elution step (lane Ec). All the E<sub>ST</sub> and Ec lanes were cut and analyzed by MALDI-TOF MS. Using the PtpA D126A immobilized matrix for substrate trapping, a total of eleven proteins were identified from eight gel pieces of the lane E<sub>ST</sub> (lettered a-h in Fig. 3), while no proteins were identified in the remaining pieces of the gel. The identified proteins are shown in Table 1. In the mock control experiments (Fig. 3, lane Ec) we could not identify any protein by MALDI-TOF MS. However, by using a more sensitive MS approach (nano-LC MS) four of the eleven proteins were identified in the mock control experiments as well (HS90, TBB5, TBA1C, ACTB, Supplementary Table 1). Although we cannot exclude the possibility that some of these four proteins have been specifically enriched during substrate trapping, they were excluded for further analysis as they also bind to the PtpA D126A-free matrix. Moreover, these proteins have been previously found to unspecifically bind to different matrices<sup>29,30</sup>. Taken together these results show that various macrophage components linked to cell energy metabolism were captured using a substrate trapping with PtpA D126A under stringent conditions, including five



**Figure 3** | SDS-PAGE analysis of the samples obtained in PtpA D126A substrate trapping assays. Mw, molecular weight marker; MPE, macrophage extract; W2, second wash (with running buffer); W4, fourth wash (with 0.5 M NaCl); W6, sixth wash (with 1.0 M NaCl). E<sub>ST</sub> represents a pool of the four elutions after the substrate trapping with PtpA D126A, and E<sub>C</sub> a pool of the four elutions after the mock substrate trapping experiment (matrix without immobilized PtpA D126A). These gels are representative of two biological replicates of substrate trapping experiments performed with different batches of purified PtpA and macrophage extracts.

mitochondrial (ECHA, ATPA, SQRD, MPCP and CY1) and two cytoplasmic proteins (K6PP and HSPB1) (Table 1).

As an alternative approach, proteins associated to PtpA D126A during substrate trapping were eluted by lowering the pH to 2.5. As expected, elution in this condition led to the recovery of minor amounts of proteins than when using Laemmli sample buffer, reason why no bands were detected in gels stained with silver nitrate. Thus, these samples were digested with trypsin and the resulting peptides were identified by nano-LC MS analysis. Due to the increased sensitivity of this approach, the total number of proteins identified was greater but included the proteins identified by MALDI-TOF MS after elution with Laemmli sample buffer (Table 1), as well as other subunits of some of these proteins (ECHB, ATPB, ATPO, ATP5H, Supplementary Table 2).

Independently of the experimental approach used for elution and protein identification, from a total of five biological replicates of substrate trapping (including different batches of purified PtpA D126A and macrophage extracts) only four macrophage proteins were systematically identified and thus considered as PtpA putative substrates: ECHA, SQRD, ATPA and K6PP (Table 2). These proteins were identified with the best scores (from 531 to 2422) and 154 peptide spectrum matches corresponding to 69 different peptide sequences (Supplementary Table 3). On the other hand, these candidates were isolated from macrophage extracts where P-Y modifications were preserved by reversible and irreversible inactivation of PTPs with Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and IAA, respectively. It is known that in the absence of Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> the level of P-Y in protein cell extracts is undetectable<sup>31</sup>. However, the use of IAA seems to be of significant help, since we found that the level of P-Y in extracts from Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and IAA treated-macrophages was approximately 29% higher than that detected when the P-Y was preserved only with Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (Supplementary Fig. 4A). Accordingly, when substrate trapping assay was performed with a macrophage extract prepared without IAA, only two of the four candidates were isolated, and identified with a much lower score (ECHA, score 62 and SQRD score 266). This indicates the relevance of the irreversible inhibition of the endogenous PTPs for isolation of P-Y substrates.

As described above PtpA D126A was barely active (see Supplementary Fig. 2), so it is possible that after substrate trapping the isolated proteins were not totally dephosphorylated. In agreement, the analysis by Western blot using an anti P-Y antibody demonstrated the presence of P-Y residues in the proteins recovered by substrate trapping assay (Supplementary Fig. 4B). However, no P-Y containing peptides were detected by MS analysis. A number of factors usually complicate phosphopeptide identification in complex

mixtures using nHPLC-MS/MS approach. During MS/MS analysis the release of phosphate group is the main fragmentation at the expense of peptide bond cleavage, resulting in reduced-quality MS/MS spectra and lower-confidence in spectral matching for phosphopeptides<sup>32,33</sup>. As shown in Table 3, all the identified PtpA putative substrates contain Tyr residues in the overall sequence and some of them are noted as phosphorylated in the online resource PhosphoSitePlus<sup>34</sup>.

**PtpA interacts with and dephosphorylates the TFP (ECHA/ECHB) *in vitro*.** Using immobilized PtpA D126A we isolated the two subunits of the TFP protein (ECHA/ECHB) as putative substrates of PtpA during substrate trapping experiments. To confirm this protein-protein interaction by a contra-experiment, the purified TFP was covalently immobilized on a SPR sensor chip to assess by SPR its ability to bind specifically to PtpA. The association-dissociation sensorgrams shown in Fig. 4A confirmed that PtpA D126A was capable of interacting with TFP and also with PtpA wt (Supplementary Fig. 5). Furthermore, when the competitive inhibitor Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> was mixed with the phosphatase before injection, a dose dependent decrease in the total response units was observed (Fig. 4A) suggesting that TFP-PtpA interaction involved the phosphatase active site.

To examine the possibility that phosphorylated TFP (ECHA/ECHAB) acts as a substrate of PtpA, we tested the ability of PtpA wt to dephosphorylate it. Firstly, TFP was purified by immunoprecipitation using a TFP (ECHA/ECHB) antibody (Fig. 4B) and the presence of P-Y was demonstrated by Western blot using an anti-P-Y antibody (Fig. 4C). Equal amounts of the immunoprecipitated TFP were electro-transferred to a membrane and then incubated with recombinant PtpA wt or buffer as a control. The P-Y signal was then evaluated with anti-P-Y antibody. In comparison with controls, a gradual reduction in the phosphorylation levels of both alpha and beta subunit of TFP was observed after incubation with PtpA wt (Fig. 4C). Altogether, these data indicate that, at least *in vitro*, TFP is a bona fide substrate of PtpA.

## Discussion

This work describes an original methodological approach to improve the substrate trapping assay as a tool to capture potential substrates of phosphatases. This approach is mainly based on the analysis by SPR of the interaction between the enzyme and the extract used as a source of potential substrates, which allows selecting stringent conditions for washing and elution steps, thus reducing unspecific protein interactions. In particular, this methodology was applied to the



Table 1 | Proteins identified by MALDI-TOF-MS in gel bands of PtpA D126A substrate trapping assays

Band Name <sup>a</sup>	Protein name	Protein accession	Mass (Da)	Mascot score <sup>b</sup>	No. of matched sequences <sup>b</sup>	No. of peptide sequences <sup>b</sup>	Sequence coverage <sup>b</sup> (%)	Peptide sequences confirmed by MS/MS
<b>a</b>	Heat shock protein HSP-90 beta	HS90_HUMAN <sup>f</sup>	83242	134	8	7	13	<b>IDIIPNPQER</b> <b>GVVDSIDLPLNISR</b>
<b>b</b>	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	ECHA_HUMAN	82947	127	21	16	28	<b>TLQEVTLQSQEAQR</b> <b>TVLGTPEVLLGALPGA</b> <b>GGTQR</b>
<b>c</b>	δ-phosphofructokinase, platelet type	K6PP_HUMAN	85542	118	24	19	31	<b>YLEEIAIQMR</b> <b>AIGVLTSGGDAQGMN</b> <b>AAVR</b>
	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATPA_HUMAN	59714	128	10	9	26	<b>EAYPGDVFYLHSR</b> <b>TGAIVDVPVGEELLGR</b> <b>EVAFAQFGSDIDAATQ</b> <b>QLLSR</b>
	Tubulin beta-5 chain <sup>c</sup>	TBB5_HUMAN <sup>f</sup>	49640	261	26	21	61	<b>FPGQLNADLR</b> <b>AILVDLEPGTMDSVR</b> <b>ISEQFTAMFR</b> <b>AVFVDLEPTVIDEVR</b>
<b>d</b>	Tubulin alpha-1C chain <sup>d</sup>	TBA1C_HUMAN <sup>f</sup>	49863	163	18	16	47	
	Sulfide quinone oxidoreductase, mitochondrial	SQRD_HUMAN	49929	188	22	19	49	<b>IMYLSEAYFR</b> <b>IMYLSEAYFR + Oxid(M)</b>
<b>e</b>	Actin, cytoplasmic <sup>e</sup>	ACTB_HUMAN <sup>f</sup>	41710	82	4	4	15	<b>YADALQEIQER GYWGGPFLR</b>
<b>f</b>	Phosphate carrier protein, mitochondrial	MPCP_HUMAN	39933	76	7	6	18	<b>SYELPDGGQVITIGNER</b> <b>IQTQPGYANTLR</b>
<b>g</b>	Cytochrome C1, mitochondrial	CY1_HUMAN	35399	77	3	2	9	<b>AAANNALPPDLSYIVR +</b> <b>Deamidated NQ</b>
<b>h</b>	Heat Shock protein beta 1	HSPB1_HUMAN	22768	167	5	5	29	<b>LFDQAFGLPR</b> <b>LATQSNIEITIPVTFESR</b>

<sup>a</sup>Band name corresponds to the gel pieces indicated in the SDS-PAGE shown in Fig. 3.

<sup>b</sup>For each protein the value of score, number of matched and peptide sequences indicated is the best value obtained from two biological replicates.

<sup>c</sup>TBB3\_HUMAN, TBB2A\_HUMAN and TBB4B\_HUMAN were also identified with the same set of peptides.

<sup>d</sup>TBA1A\_HUMAN, TBA1B\_HUMAN were also identified with the same set of peptides.

<sup>e</sup>ACTG\_HUMAN was also identified with the same set of peptides.

<sup>f</sup>Proteins identified in mock substrate trapping using the more sensitive approach of Nano LC-MS.



Table 2 | Proteins identified as putative PtpA partners

Biological process <sup>a</sup>	Protein accession	Protein name	Mascot score <sup>b</sup>	Mass (Da)	No. of matched ions <sup>b</sup>	No. of peptide sequences <sup>b</sup>
Lipid metabolism, fatty acid beta-oxidation	ECHA_HUMAN	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	2422	82947	63	23
Sulfide oxidation, using sulfide: quinone oxidoreductase	SQRD_HUMAN	Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial	705	49929	28	10
Respiratory electron transport chain	ATPA_HUMAN	ATP synthase subunit $\alpha$ , mitochondrial	531	59714	16	7
Glycolysis	K6PP_HUMAN	6-phosphofructokinase, platelet type	922	85542	47	15

<sup>a</sup> Only the main biological processes with traceable author statement are shown, from UniProt (<http://www.uniprot.org>) database (released on January 2014)<sup>58</sup>.

<sup>b</sup> The value of score, number of matched ions and peptide sequences is the best value obtained.

identification of novel substrates of *Mtb* PtpA in human macrophages. For that purpose, we employed the *Mtb* PtpA D126A mutant and extracts of human THP-1 macrophages were P-Y modifications were preserved. The *Mtb* PtpA D126A mutant was expressed, purified and characterized, verifying that it mostly retained the biochemical structural properties of PtpA wt while exhibited enzymatic properties suitable to act as a substrate trapping enzyme. The preservation of P-Y modifications in macrophage proteins was assured by using reversible and irreversible phosphatase inhibitors during macrophage extract preparation. As a result of this improved methodology we identified, as novel potential physiological substrates of *Mtb* PtpA, four macrophage proteins, all linked to cell energy metabolism: TFP (ECHA/ECHB), SQRD, ATPA and K6PP.

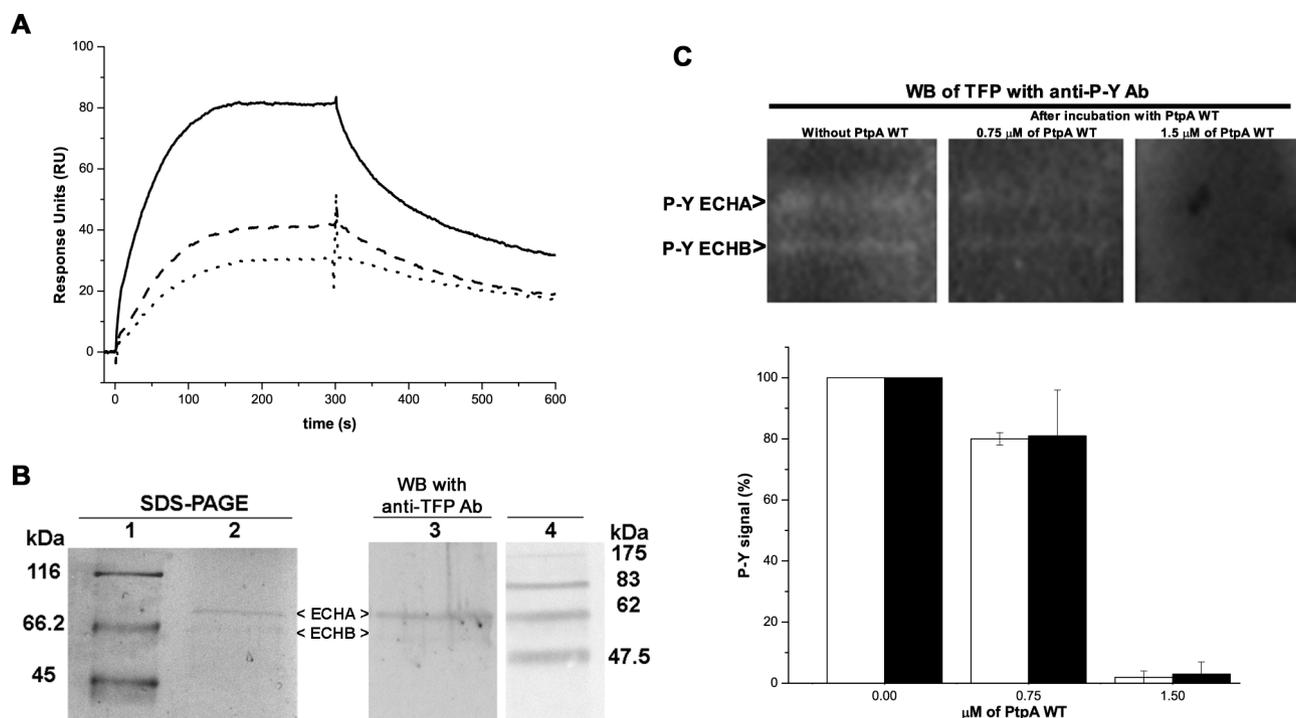
VPS33B and the GSK-3, previously identified as substrates of PtpA<sup>7</sup>, were not captured in our substrate trapping assay. This contrasting result should be carefully analyzed because of substantial technical differences between these studies and our work. The

VPS33B was isolated by substrate trapping using a PtpA carrying the same D/A mutation but exhibiting no phosphatase activity, a non-desired feature for a D/A substrate trapping mutant. In contrast, in our hands, the purified PtpA D126A showed a similar  $K_m$  and a lower (40-fold)  $k_{cat}$  than the PtpA wt, which reproduces the functional features reported in a kinetic study of this PtpA mutant<sup>21</sup>. Furthermore, the experimental design used in this work made more rigorous the conditions used during the substrate trapping assay, so that we may have lost components exhibiting lower affinity for PtpA. With respect to GSK-3, it was found to act as a PtpA substrate using a completely different approach where authors performed a Kinome analysis of pre-selected eukaryotic kinases<sup>15</sup>. Thus, the fact that VPS33B and GSK-3 were not captured in our substrate trapping assay is likely a consequence of different experimental approaches and does not invalidate the potential of the molecules identified in this work as PtpA substrates. Moreover, one of them, the TFP, was successfully validated by *in vitro* experiments.

Table 3 | Residues of Tyr and P-Y in the potential PtpA substrates

Protein accession	Protein name	Targeting signal <sup>a</sup>	Tyr in the targeting signal	Tyr in the human overall sequence
ECHA_HUMAN	Trifunctional enzyme subunit alfa	>sp P40939 1-35 MVACRAI-GILSRFSAFRILRS-RGYICRNFTGSSALL	Y24	Y24, Y43, Y158, Y239, Y271, Y283, Y298, Y320, Y343, Y435, Y499, Y546, Y637, Y639, <b>Y724</b> , Y736, Y740, Y762
SQRD_HUMAN	Sulfide quinone oxidoreductase	>sp Q9Y6N5 1-66 MVPLVAVV-SGPRAQLFAC-LLRLGTQQVG-PLQLHTGASH-AARNHYEVLV-LGGGSGGITM-AARMKRK	Y44	Y44, Y82, Y138, Y140, <b>Y151</b> , Y170, Y210, Y215, Y242, <b>Y259</b> , Y289, Y228, Y373, Y376, Y385, Y395, <b>Y415</b> , Y426, Y434
ATPA_HUMAN	ATP synthase subunit $\alpha$	>sp P25705 1-43 MLSVRVAAA-VVRALPRR-AGLVSARNAL-GSSFIAARNF-HASNTHL	N	<b>Y243</b> , <b>Y246</b> , Y271, Y287, Y291, <b>Y299</b> , Y311, Y321, <b>Y337</b> , <b>Y343</b> , Y380, Y401, <b>Y440</b> , Y476, Y489, Y495
K6PP_HUMAN	6-phosphofructokinase platelet type	NA	NA	Y52, Y58, Y61, Y56, Y162, Y164, Y223, Y298, Y394, <b>Y447</b> , <b>Y487</b> , Y512, <b>Y586</b> , Y589, Y604, <b>Y645</b> , <b>Y651</b> , <b>Y654</b> , Y764, Y768

<sup>a</sup>Extracted from the online resource UniProt<sup>58</sup> or predicted with MitoProt II<sup>59</sup>. In bold, tyrosine residues noted up to now as phosphorylated in the online resource PhosphoSitePlus (<http://www.phosphosite.org>)<sup>64</sup>. N: None tyrosine in the mitochondrial targeting signal. NA: Not Apply.



**Figure 4 | PtpA interacts with and dephosphorylates the TFP (ECHA/ECHB) *in vitro*.** (A) Real time association-dissociation sensorgrams of PtpA D126A with immobilized TFP, in absence (continuous line) and in presence of 2.5 mM (dashed line) and 5 mM (dotted line) of  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ . PtpA D126A was injected at 5  $\mu\text{M}$ , diluted in running buffer at 25°C, during 5 minutes and a flow rate of 30  $\mu\text{l}/\text{min}$ . These sensorgrams are representative of the results obtained in two analytical replicates and two biological replicates performed with different batches of TFP and PtpA D126A. (B) Immunodetection of the TFP (ECHA and ECHB subunits). Left, SDS-PAGE stained with Colloidal Coomassie with MW (lane 1) and the TFP enriched fraction (lane 2). Right, Western blot with the anti TFP (ECHA/ECHB) antibody on the same TFP enriched fraction (lane 3), and the MW (lane 4). Immunodetection of P-Y signal in the TFP (ECHA/ECHB) after incubation with 0, 0.75 and 1.5  $\mu\text{M}$  of PtpA wt. The bands were quantified using the GBOX ChemiSystem tool (SynGene), using the raw volume as index of the signal. The P-Y signal obtained after incubation of the TFP with PtpA wt at 0.75 and 1.5  $\mu\text{M}$  was normalized to the signal obtained with PtpA wt at 0  $\mu\text{M}$  (considered as 100%). Error bars represent inter-experimental variability detected in two experiments using two different batches of immunoprecipitated TFP. In the online resource PhosphoSitePlus ECHA is noted as phosphorylated in Y724 and ECHB in Y336, Y342 and Y357<sup>34</sup>.

TFP, ATPA and SQRD, identified as potential *Mtb* PtpA substrates, are proteins synthesized on cytosolic ribosomes and then translocated to the mitochondria<sup>35,36</sup>. Interestingly, specific and marked changes in mitochondrial ultrastructure and function have been recently described in THP-1 macrophages infected with the virulent *Mtb* H37Rv strain<sup>37</sup>. Although the molecular events associated with these alterations have not been elucidated yet, significant changes in the mitochondrial proteome were found. Among others, ECHA, ATPA and SQRD were specifically and strongly modulated (more than 10-fold decrease) by the virulent *Mtb* H37Rv, and, moreover, were no longer detected in the mitochondria<sup>37</sup>. Since PtpA has been localized in the cytosol of *Mtb* infected macrophages<sup>10</sup>, it cannot be ruled out that it may dephosphorylate these proteins altering their activity and/or translocation to the mitochondria. In any case, this hypothesis requires previous validation of ECHA, ATPA and SQRD as PtpA substrates. As a first step in this direction, we demonstrated that TFP (ECHA/ECHB) is a bona fide substrate of PtpA *in vitro* (Fig. 4). TFP plays a key role in  $\beta$ -oxidation of long chain fatty acids, a pathway that provides electrons to the mitochondrial respiratory chain for ATP synthesis<sup>38</sup>. Thus, an eventual TFP mitochondrial deficiency in infected macrophages<sup>37</sup> suggests that *Mtb* drives macrophage catabolism favoring glycolysis over  $\beta$ -oxidation of long chain fatty acids. This metabolic change may play a role in bacterial survival since the host cellular lipids constitute the primary nutrient source for intracellular *Mtb*<sup>39</sup>. The effect of PtpA on TFP activity and cell distribution needs to be further studied.

The observation that macrophages infected by the virulent *Mtb* H37Rv, but not by the avirulent *Mtb* H37Ra strain, exhibited a pro-

nounced increase in the ATP to ADP ratio<sup>37</sup>, renders the ATPA subunit, a key component of the ATP synthase catalytic core domain F1, an interesting target for further studies<sup>40,41</sup>. It is worth to mention that ATP synthase subunits have been reported as targets of several viral proteins acting as pro-viral factors regulating virus replication, transmission and propagation in the host<sup>42,43</sup>. The SQRD also represents an interesting candidate as PtpA substrate since this enzyme participates in cell metabolic and microbicidal pathways in cells<sup>44–47</sup>. This enzyme catalyzes the oxidation of sulfide species (released from the metabolism of sulfur-containing amino acids) to elemental sulfur. The electrons from sulfide oxidation are transferred to the mitochondrial respiratory chain for energy production<sup>45</sup>. Moreover, sulfide oxidation by SQRD contributes to keep sulfide concentration below toxic levels, otherwise sulfide inhibits the cytochrome oxidase (mitochondrial complex IV) interrupting the respiratory chain<sup>46</sup>. On the other hand, in inflammatory macrophages sulfide accumulation likely contributes to down-regulate anti-microbial and pro-apoptotic effects of nitric oxide, as a result of the reaction of sulfide with peroxynitrite<sup>47</sup>. Thus, modulation of SQRD activity and/or cell distribution by *Mtb* may influence both energy metabolism and nitric oxide-dependent microbicidal effects of macrophages.

Finally, since *in vitro* and *in vivo* studies indicate that *Mtb* infection drives strong metabolic changes in macrophages at the level of glucose consumption<sup>48</sup> it is worth to study whether PtpA is capable of dephosphorylating the cytoplasmic 6-phosphofructokinase (K6P) which constitutes the most important control step in the mammalian glycolytic pathway<sup>49,50</sup>. Indeed, K6P regulates the rate of glycolysis in response to cell energy requirements and is likely



linked to the mitochondrial ATP synthesis. Phosphorylation of K6P, which seems to occur mainly in its C-terminal regulatory domain<sup>50</sup>, is involved in the equilibrium between oligomeric forms of the enzyme, in the affinity to substrates and allosteric ligands, in the modulation of the interactions with other proteins, and in its intracellular distribution<sup>50–53</sup>.

All together, in this work we identified novel components linked to macrophage bioenergetics, particularly TFP, which may be subjected to *Mtb* modulation through PtpA dephosphorylation. Whether *Mtb* PtpA-mediated dephosphorylation of these potential targets affects their activity, cell distribution and/or the metabolic pathways of energy production in macrophages requires further analysis.

## Methods

### Production of recombinant PtpA wt and PtpA D126A and kinetic characterization.

The coding sequence of PtpA was amplified by PCR from cosmid MTCY427, using appropriate primers with NdeI and HindIII restriction sites. Digested PCR products were ligated with phage T4 DNA ligase (Biolabs) in a pET28 expression vector. The construct expressing the single PtpA mutant D126A was obtained by site-directed mutagenesis using the Quikchange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene) and the construct verified by DNA sequencing. Transformed *E. coli* BL21 (DE) cells were grown at 15°C in LB medium with 50 µg ml<sup>-1</sup> kanamycin and protein synthesis induced with 0.5 mM IPTG. The recombinant proteins were purified to homogeneity by metal-affinity (Cu-column) and size exclusion chromatography (SEC). The phosphatase activity was measured using the artificial substrate p-nitrophenyl phosphate (pNPP) at 410 nm<sup>9</sup> and expressed as µM of pNP min<sup>-1</sup> ( $\epsilon = 7.976 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). The kinetic constants  $K_m$  and  $V_{max}$  were calculated using the best fit curve to the Michaelis-Menten equation<sup>54</sup>. For more details see legends of Supplementary Fig 1 and 2.

**Circular Dichroism.** Experiments were performed with 25 µM of PtpA D126A or PtpA wt in 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4), 20 mM NaCl. Circular dichroism (CD) spectra were recorded using a JASCO J-715 spectropolarimeter equipped with a thermoelectric sample temperature controller (Peltier system). Data were recorded from 300 to 200 nm at 25°C using a quartz cell with a path length of 10 mm. A total of 5 accumulations were taken for each spectrum with a speed of 50 nm/min, with a resolution of 0.2 nm, responses of 1 s and bandwidth of 1.0 nm. Following background subtraction, all the CD data were converted from CD signal (mdeg) into mean residue ellipticity (deg.cm<sup>2</sup>.dmol<sup>-1</sup>). The secondary structure quantifications were performed with K2d software<sup>27</sup>. Thermal stability of PtpA wt and PtpA D126A was studied by CD spectroscopy. The ellipticity at 222 nm was measured from 25°C to 90°C with an increase step interval of 5°C and a 5 min equilibration at each temperature. Also, renaturation experiments (from 90°C to 25°C) were carried out to ensure reversibility. The change in ellipticity at 222 nm was plotted against the temperature to evaluate thermal stability.

**Preparation of extracts of THP-1 derived macrophages.** THP-1 human monocyte-like cells (ATCC TIB-202) were cultured in RPMI 1640 supplemented with 2 mM L-glutamine, 1.5 g/l sodium bicarbonate, 1% sodium pyruvate, 10 mM Hepes pH 7.0, 10% heat-inactivated FCS and maintained at  $0.2-1 \times 10^6$  cells per ml at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. When the cultures reached  $1 \times 10^6$  cells/ml, cells were stimulated and differentiated to macrophages with 50 ng/ml phorbol myristate acetate for 48 hours. To preserve P-Y in proteins, the endogenous PTPs were inactivated treating cells with sodium orthovanadate (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) and iodoacetic acid (IAA)<sup>17,55</sup>. Briefly, cells were incubated for 20 min with 100 µM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, washed with PBS and lysed with lysis buffer (25 mM Hepes pH 7.4, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 1 mM benzamide, 1 µg/ml trypsin inhibitor, 1 mM PMSF) using a manual homogenizer. Afterwards, a final concentration of 5 mM IAA was added, left on ice for 30 min, and the unreacted IAA inactivated with 10 mM of DTT for 15 min. Lysates were centrifuged at 15,000 × g for 25 min and cleared extracts filtered (0.22 µm) and stored at -80°C.

**Surface plasmon resonance assays.** Experiments were done on a Biacore 3000 GE Healthcare instrument. PtpA D126A was immobilized using standard amine-coupling procedures (Amine Coupling Kit, GE Healthcare) on CM5 sensorchips (GE Healthcare). Ligands immobilization was carried in running buffer 10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% P20 and 1 mM DTT. After surface activation with 0.05 M NHS (N-hydroxysuccinimide) and 0.2 M EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide) PtpA D126A and PtpA wt were diluted in 10 mM sodium acetate pH 4.5 and injected onto two different sensor chip flow cells at a flow rate of 5 µl/min to reach a final density of 1600 and 400 RU, respectively. Remaining sites were blocked with 1.0 M ethanolamine pH 8.5. Another flow cell was activated and blocked in the same way with no ligand injections and used as reference surface. Sensorchip was washed with 1.0 M NaCl and stabilized with running buffer before sample injections. Injections of macrophage extracts (1.2 µg in protein) were performed in running buffer at 25°C and a flow rate of 10 µl/min unless otherwise stated. Interactions were evaluated by the analysis of the association/dissociation sensorgrams, and their stability was assessed by the injection of two 30

second pulses of 1 M NaCl and by the injection of two 40 second pulses of 10 mM glycine pH 2.0. SPR experiments carried out to study the interaction between TFP (ECHA/ECHB) and the phosphatases (PtpAwt and PtpA D126A) were done in the same way by immobilizing TFP on a CM5 sensorchip to a final density of 360 RU (at flow rate 50 µl/min) and remaining sites blocked using the same procedure. Running buffer used in these experiments was 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.005% P20 and 1 mM DTT and phosphatases injected at flow rate 20 µl/min unless otherwise stated. The effect of incubating with increasing concentrations of Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (2.5–25 mM) was also evaluated. All data processing was carried out using the BIAevaluation 4.1 software (GE Healthcare).

**Substrate trapping using immobilized PtpA D126A.** Purified PtpA D126A was covalently coupled to NHS-activated sepharose (GE Healthcare) following instructions provided by the manufacturer. Briefly, the matrix (100 µl) was washed with cold 1 mM HCl, and immediately 300 µg of PtpA D126A diluted in coupling buffer (0.2 M NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 M NaCl pH 8.3) were added and incubated 16 hs at 4°C. Unreacted groups of the matrix were blocked overnight at 4°C with 0.5 M ethanolamine pH 8.3, 0.5 M NaCl. Then, the matrix was washed with 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 and 0.1 M acetate buffer pH 4.5, 0.5 M NaCl. In parallel, as a control for unspecific binding in pull-down assays the same amount of matrix was incubated in coupling buffer without PtpA D126A, and then blocked with ethanolamine following the same protocol, and this control was defined as the mock substrate trapping (see Supplementary Fig. 2). For each substrate trapping assay, 100 µl of the matrix with or without immobilized PtpA D126A was incubated with 5 mg of macrophage extract diluted to 0.17 mg/ml in SPR running buffer containing 1 mM benzamide, 1 mM PMSF, 1 µg/ml SBTI during 1 h at 4°C with gentle end-over-end agitation. The matrix was collected by low-speed centrifugation (1,000 × g) and then washed twice and sequentially with 100 µl of running buffer and running buffer containing 0.5 M and 1.0 M NaCl at 4°C. The retained proteins were eluted using one of the two approaches described below. In the first case, 50 µl of Laemmli sample buffer were added to the matrix and then boiled for 5 min. All washes and elutions were analyzed by SDS-PAGE followed by silver staining. This approach was performed on two biological replicates. The lanes corresponding to the eluted proteins were cut in 2 mm bands and each gel piece was analyzed by MALDI-TOF MS. In the second approach, to reproduce the elution conditions of the SPR assays, proteins were eluted with successive additions of 50 µl of 10 mM glycine pH 2.5 followed by an immediate neutralization with 2 µl of 1 M Tris-HCl pH 7.5, and stored at -20°C until analysis by Nano-LC-MS/MS. This approach was performed on three biological replicates. Each biological replicate was performed using a different batch of the macrophage extract and purified PtpA D126A.

**Mass spectrometry.** For MALDI-TOF MS analysis proteins were in-gel digested with trypsin (sequence grade, Promega) as previously described<sup>56</sup>. Peptides were extracted from gels using aqueous 60% acetonitrile (ACN) containing 0.1% TFA and concentrated by vacuum drying. Prior to MS analysis, samples were desalted using C18 reverse phase micro-columns (Omix®Tips, Varian) and eluted directly onto the MALDI sample plate with matrix solution  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 60% ACN containing 0.1% TFA. Mass spectra of peptides mixtures were acquired in a 4800 MALDI TOF/TOF instrument (ABi Sciex) in positive reflector mode and were externally calibrated using a mixture of peptide standards (Applied Biosystems). Collision-induced dissociation MS/MS spectra of selected peptides ions were acquired. Proteins were identified with measured *m/z* values in MS and MS/MS acquisition modes and using the MASCOT search engine (Matrix Science, <http://www.matrixscience.com>) in the Sequence Query search mode. The following search parameters were used for searching the NCBI database (NCBI nr 20130721): taxonomy *Homo sapiens*; protein mass was unrestricted; monoisotopic mass tolerance, 0.05 Da; fragment mass tolerance, 0.3 Da; partial methionine oxidation, cysteine carbamidomethylation and tyrosine phosphorylation as variable modifications; and one missed tryptic cleavage allowed. Significant protein scores ( $p < 0.05$ ) and at least one peptide ion significant score ( $p < 0.05$ ) per protein were used as criteria for positive identification.

For nano-LC-MS-analysis, proteins in bands were in-gel digested as described above. In the case of liquid samples (50 µl), proteins were digested with sequencing-grade trypsin (0.25 µg, 12 h at 37°C), desalted, dried by vacuum and resuspended in 20 µl of 0.1% formic acid (v/v) in water. Samples were injected into a nano-HPLC system (Proxeon easynLC, Thermo Scientific) fitted with a reverse-phase column (easy C18 column, 3 µm; 75 µm ID × 10 cm; Proxeon, Thermo Scientific) and peptides were separated with a linear gradient of acetonitrile 0.1% formic acid (0–60% in 60 min) at a flow rate of 400 nL/min. Online MS detection/analysis was carried out in the LTQ Velos nano-ESI-linear ion trap instrument (Thermo Scientific) in a data-dependent mode (full scan followed by MS/MS of the top 5 peaks in each segment, using an exclusion dynamic list). Proteins were identified by searching the SwissProt database (November 2012), taxonomy *Homo sapiens*, using the following parameters in the MS/MS ion search mode of Mascot search engine: peptide tolerance 1.5 Da, MS/MS tolerance 0.8 Da, and cysteine carbamidomethylation, methionine oxidation and tyrosine phosphorylation as the allowed variable modifications. The significance limit for protein identification was set at  $p < 0.01$  and an ion cut off  $> 40$ . Only proteins identified with two or more peptides were considered positively identified. The list of potential PtpA partners was elaborated by manually removal of all the proteins identified in mock control experiments. Only proteins identified in all substrate trapping (five biological replicates), independently of the approach of protein elution and MS analysis, were considered as potential substrate.



**In vitro dephosphorylation of ECHA with purified PtpA wt.** The TFP (ECHA/ECHB) was obtained from macrophage extracts by immunoprecipitation with anti-TFP MAb. Briefly, the anti-TFP MAb (8  $\mu$ g, ab110302, MitoSciences) was firstly covalently cross-linked to anti-mouse IgG Ab on the beads (100  $\mu$ l, 11201D, Life technologies) using BS3 (Sigma). Then, beads were washed and incubated with 500  $\mu$ g of macrophage extract, washed and bound proteins eluted with citrate pH 2.6 ( $2 \times 100 \mu$ l) and neutralized immediately. Samples were resolved by SDS-PAGE and either stained with colloidal Coomassie or transferred to nitrocellulose during 1 h at 100 V. Nitrocellulose was blocked for 16 h at 4°C, washed twice with TBS-T and subsequently incubated with anti-TFP MAb at 2  $\mu$ g/ml at RT. After washing, membranes were incubated (1 h at RT) with anti-mouse Ab conjugated with alkaline phosphatase (1/30000, Sigma-Aldrich A3562). The reaction was developed with a NBT/BCIP solution (Sigma). The presence of the TFP was confirmed by mass spectrometry. To examine if phosphorylated TFP is a suitable substrate for PtpA, we used the protocol described by Najjarro et al<sup>57</sup>. Equal amounts of the purified TFP were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, blocked and incubated (30°C for 1 h) with purified PtpA wt (at final concentrations of 0.75 and 1.5  $\mu$ M) or the phosphate buffer as a control. Afterward, membranes were washed in TBS-T and probed for P-Y levels with anti-P Tyr Ab (Invitrogen #136600) at 0.6  $\mu$ g/ml. Blots were then incubated with horseradish peroxidase (HRP)-linked anti-mouse (Sigma-Aldrich A4416, 1:10000) secondary antibody for 1 h at RT. After four washes with TBS-T, one wash with TBS, the reaction was developed with Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific). Immunoreactive bands were visualized using the GBOX ChemiSystem tool (SynGene).

- Glaziou, P., Falzon, D., Floyd, K. & Raviglione, M. Global epidemiology of tuberculosis. *Semin Respir Crit Care Med.* **34**, 3–16 (2013).
- Koul, A., Herget, T., Klebl, B. & Ullrich, A. Interplay between mycobacteria and host signalling pathways. *Nat Rev Microbiol.* **2**, 189–202 (2004).
- Houben, D. et al. ESX-1-mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria. *Cell Microbiol.* **14**, 1287–98 (2012).
- Wong, D., Chao, J. D. & Av-Gay, Y. *Mycobacterium tuberculosis* secreted phosphatases: from pathogenesis to targets for TB drug development. *Trends Microbiol.* **21**, 100–9 (2013).
- Singh, R. et al. Disruption of mptpB impairs the ability of *Mycobacterium tuberculosis* to survive in guinea pigs. *Mol Microbiol.* **50**, 751–62 (2003).
- Beresford, N. J. et al. Inhibition of MptpB phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis* impairs mycobacterial survival in macrophages. *J Antimicrob Chemother.* **63**, 928–36 (2009).
- Bach, H., Papavinasundaram, K. G., Wong, D., Hmama, Z. & Av-Gay, Y. *Mycobacterium tuberculosis* virulence is mediated by PtpA dephosphorylation of human vacuolar protein sorting 33B. *Cell Host Microbe* **15**, 316–22 (2008).
- Mascarello, A. et al. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* tyrosine phosphatase PtpA by synthetic chalcones: kinetics, molecular modeling, toxicity and effect on growth. *Bioorg Med Chem.* **18**, 3783–89 (2010).
- Koul, A. et al. Cloning and characterization of secretory tyrosine phosphatases of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol.* **182**, 5425–32 (2000).
- Cowley, S. C., Babakaiff, R. & Av-Gay, Y. Expression and localization of the *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase PtpA. *Res Microbiol.* **153**, 233–41 (2002).
- Sullivan, J. T., Young, E. F., McCann, J. R. & Braunstein, M. The *Mycobacterium tuberculosis* SecA2 system subverts phagosomal maturation to promote growth in macrophages. *Infect Immun.* **80**, 996–1006 (2012).
- Chauhan, P. et al. Secretory phosphatases deficient mutant of *Mycobacterium tuberculosis* imparts protection at the primary site of infection in guinea pigs. *PLoS ONE* **8**, e77930 (2013).
- Denu, J. M., Stuckey, J. A., Saper, M. A. & Dixon, J. E. Form and function in protein dephosphorylation. *Cell* **87**, 361–4 (1996).
- Alonso, A. et al. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* **117**, 699–711 (2004).
- Poirier, V., Bach, H. & Av-Gay, Y. *Mycobacterium tuberculosis* promotes anti-apoptotic activity of the macrophage by PtpA protein-dependent dephosphorylation of Host GSK3 $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* **289**, 29376–85 (2014).
- Wong, D., Chao, J. D. & Av-Gay, Y. *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H<sup>+</sup>-ATPase to inhibit phagosomal acidification. *PNAS* **108**, 19371–76 (2012).
- Flint, A. J., Tiganis, T., Barford, D. & Tonks, N. K., Development of “substrate-trapping” mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1680–85 (1997).
- Blanchetot, C., Chagnon, M., Dube, N., Halle, M. & Tremblay, M. L. Substrate-trapping techniques in the identification of cellular PTP targets. *Methods* **35**, 44–53 (2005).
- Tiganis, T. & Bennett, A. Protein tyrosine phosphatase function: the substrate perspective. *Biochem J.* **402**, 1–15 (2007).
- Madhurantakam, C. et al. Crystal structure of low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis* at 1.9-Å resolution. *J Bacteriol.* **187**, 2175–81 (2005).
- Madhurantakam, C., Chavali, V. R. & Das, A. K. Analyzing the catalytic mechanism of MPtpA: a low molecular weight protein tyrosine phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis* through site-directed mutagenesis. *Proteins* **71**, 706–714 (2008).
- Wu, L. & Zhang, Z. Y. Probing the function of Asp128 in the lower molecular weight protein-tyrosine phosphatase-catalyzed reaction. A pre-steady-state and steady-state kinetic investigation. *Biochemistry* **35**, 5426–34 (1996).
- Black, D. & Bliska, J. Identification of p130Cas as a substrate of *Yersinia* YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions. *The EMBO J.* **16**, 2730–44 (1997).
- Scapin, G., Patel, S., Patel, V., Kennedy, B. & Asante-Appiah, E. The structure of apo protein-tyrosine phosphatase 1B C215S mutant: More than just an S - O change. *Protein Sci.* **10**, 1596–1605 (2001).
- Vincent, C. et al. Cells of *Escherichia coli* contain a protein tyrosine kinase, Wzc, and a phosphotyrosine-protein phosphatase, Wzb. *J Bacteriol.* **181**, 3472–77 (1999).
- Lehnerer, M., et al. Influence of mutation of the amino-terminal signal anchor sequence of cytochrome P450 2B4 on the enzyme structure and electron transfer processes. *J Biochem.* **124**, 396–403 (1998).
- Andrade, M. A., Chacón, P., Merelo, J. J. & Morán, F. Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism using an unsupervised learning neural network. *Protein Eng.* **6**, 383–90 (1993).
- Li, Y. & Strohl, W. R. Cloning, purification, and properties of a phosphotyrosine protein phosphatase from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol.* **178**, 136–42 (1996).
- Mellacheruvu, D. et al. The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification-mass spectrometry data. *Nat. Methods.* **10**, 730–36 (2013).
- Trinkle-Mulcahy, L. et al. Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes. *J Cell Biol.* **183**, 223–39 (2008).
- Buist, A., Blanchetot, C., Tertoolen, L. G., den Hertog, J. Identification of p130Cas as an in vivo substrate of receptor protein-tyrosine phosphatase alpha. *J Biol Chem.* **275**, 20754–61 (2000).
- Mann, M. et al. Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends Biotechnol.* **20**, 261–8 (2002).
- Dephoure, N., Gould, K. L., Gygi, S. P. & Kellogg, D. R. Mapping and analysis of phosphorylation sites: a quick guide for cell biologists. *Mol Biol Cell.* **24**, 535–42 (2013).
- Hornbeck, P. V. et al. PhosphoSitePlus: a comprehensive resource for investigating the structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse. *Nucleic Acids Res.* **40**, D261–70 (2012).
- Chacinska, A., Koehler, C. M., Milenkovic, D., Lithgow, T. & Pfanner, N. Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* **138**, 629–44 (2009).
- Avadhani, N. G. Targeting of the same proteins to multiple subcellular destinations: mechanisms and physiological implications. *FEBS J.* **278**, 4217 (2011).
- Jamwal, S. et al. Characterizing virulence-specific perturbations in the mitochondrial function of macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci. Rep.* **3**, 1328; doi: 10.1038/srep01328 (2013).
- Eaton, S. et al. The mitochondrial trifunctional protein: centre of a beta-oxidation metabolon. *Biochem Soc Trans.* **28**, 177–182 (2000).
- Daniel, J., Maamar, H., Deb, C., Sirakova, T. D. & Kolattukudy, P. E. *Mycobacterium tuberculosis* uses host triacylglycerol to accumulate lipid droplets and acquires a dormancy-like phenotype in lipid-loaded macrophages. *PLoS pathogens* **7**, e1002093 (2011).
- Jonckheere, A. I., Smeitink, J. A. M. & Rodenburg, R. J. T. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J Inheret Metab Dis.* **35**, 211–25 (2012).
- Beke-Somfai, T., Lincoln, P. & Nordén, B. Rate of hydrolysis in ATP synthase is fine-tuned by  $\alpha$ -subunit motif controlling active site conformation. *PNAS* **110**, 2117–22 (2013).
- Zhan, W., Wang, X., Chi, Y. & Tang, X. The VP37-binding protein F1ATP synthase  $\beta$  subunit involved in WSSV infection in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* **34**, 228–35 (2013).
- Zheng, S. Q., Li, Y. X., Zhang, Y., Li, X. & Tang, H. MiR-101 regulates HSV-1 replication by targeting ATP5B. *Antiviral Res.* **89**, 219–26 (2011).
- Brito, J. A. et al. Structural and functional insights into sulfide: quinone oxidoreductase. *Biochemistry* **48**, 5613–22 (2009).
- Goubern, M., Andriamihaja, M., Nübel, T., Blachier, F. & Bouillaud, F. Sulfide, the first inorganic substrate for human cells. *FASEB J.* **21**, 1699–1706 (2007).
- Cooper, C. E. & Brown, G. C. The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance. *J Bioenerg Biomembr.* **40**, 533–9 (2008).
- Filipovic, M. R. et al. Biochemical insight into physiological effects of H<sub>2</sub>S: reaction with peroxynitrite and formation of a new nitric oxide donor, sulfinyl nitrite. *Biochem J.* **15**, 609–21 (2012).
- Eisenreich, W., Heesemann, J., Rudel, T. & Goebel, W. Metabolic host responses to infection by intracellular bacterial pathogens. *Front Cell Infect Microbiol.* **9**, 3–24 (2013).
- Evans, P. R., Farrants, G. W. & Hudson, P. J. Phosphofructokinase: structure and control. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **293**, 53–62 (1981).



50. Schöneberg, T., Kloos, M., Brüser, A., Kirchberger, J. & Sträter, N. Structure and allosteric regulation of eukaryotic 6-phosphofructokinases. *Biol Chem.* **394**, 977–93 (2013).
51. Cai, G. Z., Callaci, T. P., Luther, M. A. & Lee, J. C. Regulation of rabbit muscle phosphofructokinase by phosphorylation. *Biophys Chem.* **64**, 199–209 (1997).
52. Harrahy, J. J., Malencik, D. A., Zhao, Z., Hisaw, F. L. & Anderson, S. R. Identification of a new phosphorylation site in cardiac muscle phosphofructokinase. *Biochem Biophys Res Commun.* **234**, 582–7 (1997).
53. Coelho, W. S., Costa, K. C. & Sola-Penna, M. Serotonin stimulates mouse skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase through tyrosine-phosphorylation of the enzyme altering its intracellular localization. *Mol Genet Metab.* **92**, 364–70(2007).
54. Tommasini, R., Endrenyi, L., Taylor, P. A., Mahuran, D. J. & Lowden, J. A. A statistical comparison of parameter estimation for the Michaelis-Menten kinetics of human placental hexosaminidase. *Can. J Biochem Cell Biol.* **63**, 225–30 (1985).
55. Garton, A. J., Flint, A. J. & Tonks, N. K. Identification of p130(cas) as a substrate for the cytosolic protein tyrosine phosphatase PTP-PEST. *Mol Cell Biol.* **16**, 6408–18 (1996).
56. Hellman U. Sample preparation by SDS-PAGE and in-gel digestion. In Proteomics in functional genomics [Jollès P, Jörnvall H (eds)] [43–54] Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag, 2000.
57. Najarro, P., Traktman, P. & Lewis, J. A. Vaccinia virus blocks gamma interferon signal transduction: viral VH1 phosphatase reverses Stat1 activation. *J Virol.* **75**, 3185–96 (2001).
58. The UniProt Consortium. Update on activities at the Universal Protein Resource (UniProt) in 2013. *Nucleic Acids Res.* **41**, D43–7 (2013).
59. Claros, M. G. & Vincens, P. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem.* **241**, 779–86 (1996).

## Acknowledgments

We thank P.M. Alzari from the Institut Pasteur of Paris for the cosmid MTCY427. A. Lima from the Institut Pasteur of Montevideo (UByPA) for her help with mass spectrometry experiments during the optimization of the first substrate trapping assay. L. Rodríguez and M. Maidana from the Faculty of Sciences for assistance in purifying PtpA and PtpA D126A. We thank the Institute of Medical Biochemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941–590, Brazil, for the use of the JASCO J-715 spectropolarimeter for CD assays. We acknowledge Dr. F.M. Rossi for critical reading of the manuscript. This project was supported by the grant FCE\_2631 from the ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación) of Uruguay.

## Author contributions

M.M., A.-M. L. and M.P. performed the experiments and analyzed the data. M.M., M.G., M.M.P. and R.D. analyzed the MS data. G.R. and H.T. analyzed the CD data. F.C., G.O. and O.P. analyzed the SPR data. M.M., R.D., A.M.F. and A.V. wrote the paper.

## Additional information

**Supplementary information** accompanies this paper at <http://www.nature.com/scientificreports>

**Competing financial interests:** The authors declare no competing financial interests.

**How to cite this article:** Margenat, M. *et al.* New potential eukaryotic substrates of the mycobacterial protein tyrosine phosphatase PtpA: hints of a bacterial modulation of macrophage bioenergetics state. *Sci. Rep.* **5**, 8819; DOI:10.1038/srep08819 (2015).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder in order to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>