

71



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"CLONACION Y CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE UNA FOSFATASA DE TIROSINA DE Phaseolus vulgaris (PvPTP)."

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A
A U R O R A G A M E Z R E Y E S

DIRECTOR DE TESIS:

DR. FEDERICO E. SANCHEZ RODRIGUEZ



2002

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunico a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Clonación y caracterización bioquímica de una fosfatasa de tirosina de Phaseolus vulgaris (PvPTP)." realizado por Aurora Gamez Reyes

con número de cuenta 09421370-4, quien cubrió los créditos de la carrera de biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario Dr. Federico E. Sánchez Rodríguez.

Propietario M en C. M. Carmen Quinto Hernández.

Propietario Dr. Victor Váldes López.

Suplente Dr. Miguel Lara Flores.

Suplente Dr. Alejandro Alagon Cano.

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

Consejo Departamental de Biología

Dra. Patricia Ramos Morales.
Coordinadora del departamento de biología.



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

A Leonardo

A la UNAM por mi educación media superior y superior.

A Federico Sánchez por dos años de sueños, libertad y realidades.

A Carmen Quinto, Alejandra Covarrubias, Patricia León, Mario Rocha, Marco Villanueva y Federico Sánchez por abrir el Taller "Biología molecular y celular de la interacción planta microorganismos y planta medio ambiente" de la facultad de ciencias, UNAM.

A mis Papas Beatriz y Eduardo, por apoyarme en dos de las aventuras más divertidas y demandantes que he emprendido: la biología y mi tesis de licenciatura.

A mi hermano Fernando por su ternura y apoyo, además de darme mis dosis de realidad cuando la he necesitado.

A mi familia en La Paz; Abuelos Beatriz y José Luis, porque siempre han estado ahí cuando los he necesitado, además de su apoyo incondicional y tranquilidad. A mi Familia en México.

A Efraín Cruz, por sus enseñanzas.

A Carlos Galván por compartir una larga amistad, consejos y hacer mas divertida la estancia en el laboratorio. Además de todo el apoyo para la realización de este trabajo. Pero sobre todo por enseñarme que los experimentos pequeños y sencillos son los que dan mas información.

A Luis Carlos Rodríguez por empezar el proyecto y por su amistad.

A Rodolfo López Gómez por escucharme, apoyarme y enseñarme lo poco o mucho que sé de biología molecular.

A Natividad Ramírez por su amistad, comprensión y por no dejarnos solos en la última parte de esta investigación.

A Georgina Estrada y Cesar de los Santos por su amistad, apoyo y por formar un frente común en el proyecto.

A Juan Olivares, Ignacio Islas, Patricia Rueda, Juan Carlos Raya, Olivia Santana, Noreide Nava, Luz María Martínez, Jorge L. Folch, por la ayuda técnica en este trabajo.

A María G. Negrete "Malú" y a "Don Pepe", por su amistad y por que sin ellos el laboratorio sería un caos.

A Armando Luis por su amistad incondicional y por ser el primero en darme un trabajo de biólogo.

A Michael, Gabriel, Roberto Carlos y Erick, gracias por su amistad.

A Genaro "Gena" Sánchez, por que por el siempre llegué a todas mis prácticas de campo.

A Guadalupe Andraca, Miriam Bojorge, Karina Tuz, Georgina Robles, Fred Vergara y Katia Robles por su amistad incondicional y por hacer las practicas de campo como un verdadero equipo.

A Iván Martínez, Jersón Sánchez y Maricarmen Betanzo, por su amistad incondicional y perdonar esta larga ausencia.

A Karla Pulido, Eduardo Granados, Erwin Martí, Juan Carlos Guajardo, Jorge "el diente", Chang, Irene y los que llegaron, por hacerme parte de un proyecto tan ambicioso como lo fue el refugio científico.

A Sonia Cuellar, por su amistad, apoyo y por las pláticas con café para gente chiquita, pero sobre todo por ubicarme en la realidad de las cosas.

A Odette Avendaño, Marina Battaglia, Francisco Zarate, Katerina Lira, Jacobo Zúñiga, Juan "Balazo" Saenz, Josué "compañerito", Yuriditzi Pascacio, Aidé Martínez, Carlos Rosas, Alejandra Hernández, Larissa Ventura, Yadira Olvera, Carlos Alberto, Sergio Zavala, Ángel Alcantar, Maribel Benítez, Alejandro Zacapanzi, David Gurrítierrez y Edgar Beltrán por hacer muy divertida e interesante mi estancia en Cuernavaca, Morelos.

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
<i>Clasificación de las PTPs</i>	5
<i>Fosfatasas Duales (DSPTPs)</i>	6
<i>Fosfatasas clásicas tipo receptor (RLPTP)</i>	8
<i>Fosfatasas clásicas tipo no transmembranal o citoplasmáticas (nMPTP)</i>	9
<i>Mecanismo de reacción</i>	12
<i>Mecanismos moleculares de regulación</i>	14
<i>Metilación</i>	15
<i>Fosforilación</i>	16
<i>Oxidación</i>	17
<i>Inhibición</i>	18
<i>PTPs en plantas</i>	18
OBJETIVOS	20
MATERIALES Y METODOS	21
<i>Amplificación por PCR del fragmento PvPTP</i>	21
<i>Electroforesis de ADN en geles de agarosa</i>	22
<i>Purificación de ADN de geles de agarosa</i>	22
<i>Clonación en un vector de expresión</i>	23
<i>Transformación de células electrocompetentes</i>	25
<i>Hibridación en colonia</i>	26
<i>Extracción de ADN de plásmidos y secuenciación</i>	27
<i>Análisis de identidad de la secuencia PvPTP</i>	29
<i>Diseño 3D de la proteína PvPTP</i>	29
<i>Preparación de extractos proteicos en condiciones naturalizantes</i>	30
<i>Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad</i>	30
<i>Cuantificación de proteínas</i>	31
<i>Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes</i>	32

<i>Generación de anticuerpos policlonales de ratón</i>	33
<i>Electrotransferencia e inmunolocalización tipo Western blot</i>	34
<i>Preparación de material biológico</i>	35
<i>Obtención y cuantificación de proteínas de tejidos de frijol</i>	36
<i>Actividades de fosfatasa con la clona PvPTP</i>	37
<i>Ensayos de fosforilación in vitro</i>	37
RESULTADOS	41
<i>Amplificación por PCR del fragmento PvPTP</i>	41
<i>Clonación del cADN de PvPTP en un vector de expresión</i>	44
<i>Obtención y alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las PTPs</i>	46
<i>Actividad de fosfatasa de la clona PvPTP</i>	49
<i>Inducción y purificación de la proteína recombinante PvPTP</i>	51
<i>Generación de anticuerpos policlonales contra la proteína PvPTP</i>	53
<i>Detección de las PTP's en nódulos de frijol</i>	55
<i>Inhibición de la actividad de fosfatasa</i>	56
<i>Análisis de posibles sitios de fosforilación</i>	57
<i>Ensayos de fosforilación in vitro</i>	61
DISCUSIÓN	66
CONCLUSIONES	70
BIBLIOGRAFÍA	71

INTRODUCCIÓN

Los organismos en general, están bajo muchos estímulos ambientales; estos cambios químicos y fisiológicos son detectados simultáneamente por las células circundantes. La información obtenida de ese estímulo, pasa de célula a célula gracias a la comunicación intracelular que esta dada por vías de señalización y transducción de señales; un ejemplo sería, las relaciones específicas que se dan entre leguminosas y bacterias simbióticas de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* que culmina con la formación de nódulos fijadores de nitrógeno (Brewin, 1991 y Mylona *et al*, 1995).

En las vías de transducción, las señales extracelulares regulan respuestas como la síntesis de proteínas, lípidos o carbohidratos, así como, la proliferación, la diferenciación o la muerte celular. En estos procesos participan numerosas proteínas que son moduladas por diversos mecanismos post-traduccionales tales como: fosforilación, metilación, oxidación y proteólisis. De éstos, el mejor estudiado es la fosforilación, que se mantiene en equilibrio dinámico por la acción de dos clases de enzimas: las cinasas, que son proteínas que transfieren grupos fosfatos a otras proteínas, a partir de moléculas energéticas como el ATP; y, las fosfatasas que son aquellas que hidrolizan los enlaces monoéster liberando de las proteínas el fosfato unido (Barford *et al*, 1998). La fosforilación de proteínas ocurre en diferentes residuos. En sistemas eucarióticos este proceso ocurre en tres residuos: Serina/Treonina (Yaffe y Elia, 2001) y/o Tirosina (Cohen, 1992; Hubbard y Till, 2000).

Comparativamente, las características estructurales y funcionales de las cinasas se conocen mucho más a detalle, ya sea en animales o plantas (Daum *et al*, 1998). En cambio, las fosfatasas, han sido menos estudiadas en plantas. No obstante, en animales se han logrado tanto la clonación e identificación de genes nuevos que codifican para fosfatasas, como el conocimiento de su posible estructura.

En eucariontes se han identificado al menos 2000 genes que codifican para cinasas, y únicamente 1000 genes que codifican para fosfatasas. Las características estructurales y

funcionales de las cinasas se conocen con mucho más detalle que las fosfatasa y esto se debe tal vez a que las primeras sean más abundantes (Hubbard y Till, 2000).

Las cinasas son clasificadas en dos principales grupos: 1) Cinasas de serina/treonina y, 2) cinasas de tirosina (Alberts *et al.*, 1994; Barford *et al.*, 1998; Hubbard y Till, 2000). De la misma manera, existen dos grandes grupos de fosfatasa: 1) aquellas que quitan el grupo fosfato de residuos de serina/treonina, que lo constituyen las fosfoproteínas fosfatasa (ppasas), generalmente citosólicas y, 2) aquellas que defosforilan residuos de tirosina (PTPs, protein tyrosine phosphatases), que pueden ser citosólicas o transmembranales. (Guan *et al.*, 1990; Chernoff *et al.*, 1990; Barford *et al.*, 1994; Stucky *et al.*, 1994; Hubbard y Till, 2000; Barford *et al.*, 1998).

La fosforilación defosforilación en residuos de tirosina, es un mecanismo de control celular en eucariontes. Este mecanismo controla diversos procesos celulares tales como el metabolismo, la locomoción, la diferenciación, el crecimiento y la proliferación celular (Barford *et al.*, 1998). Las enzimas que se encargan de este tipo de regulación son las cinasas (PTKs, protein tyrosine kinases) y las fosfatasa de tirosina (PTPs); los procesos de estas dos enzimas están finamente reguladas por diversos procesos de señalización intracelular y extracelular (Hubbard y Till, 2000; Barford *et al.*, 1998).

Después de casi 30 años de investigación, se conoce un sin número de miembros de la superfamilia de las PTPs, en su mayoría en modelos animales (Hubbard y Till, 2000; Barford *et al.*, 1998); estas proteínas están caracterizadas molecular y bioquímicamente, ya que se sabe el papel que ocupan en los diversos pasos de las rutas de señalización, y además de cómo son reguladas (Barford *et al.*, 1998; Ibarra-Sánchez *et al.*, 2000; Tartaglia *et al.*, 2001; Dadke *et al.*, 2001). En cambio, en plantas este tipo de proteínas empiezan a ser caracterizadas. En la actualidad son cinco las secuencias proteicas que están reportadas; de las cuales, dos están caracterizadas a nivel molecular. Una en *Arabidopsis thaliana* (AtPTP1) (Xu *et al.*, 1998) y la otra *Pisum sativum* (PsPTP) (Fordham-Skelton *et al.*, 1999); la AtPTP, está subclonada en un vector de expresión bacteriano, comprobando que esta

secuencia codifica para una proteína fosfatasa cuyo comportamiento es parecido a una fosfatasa específica de tirosina.

Con ayuda de la tecnología de ADN recombinante, se ha logrado la clonación e identificación de genes nuevos que codifican para fosfatasas (Chiarugi *et al*, 2000) y la deducción precisa de su estructura por el análisis de difracción de rayos X (Stuckey *et al*, 1994; Bardford *et al*, 1994). El empleo de técnicas bioquímicas complementa la caracterización de las proteínas; pero, con el análisis computacional o *in silico*, se proporciona un sin fin de herramientas, en las que se incluyen búsqueda y comparación de secuencias en diferentes bases de datos obtenidas de casi 82 genomas. También, se pueden deducir las propiedades bioquímicas de una secuencia proteica, con la determinación de las modificaciones post-traduccionales, motivos y dominios específicos. Además, del diseño de la estructura tridimensional de la molécula, se puede proporcionar un amplio panorama de los papeles que ocupa y cómo está regulada.

La integración de diferentes disciplinas y herramientas, tales como la bioinformática, la biología molecular, la bioquímica, la genética, y el análisis estructural, hace que el investigador tenga un acercamiento más real con lo que está pasando en el sistema que estudia y el papel que ocupa. El análisis computacional permite caracterizar de un modo más amplio a proteínas que no estaban descritas completamente ya sea en animales o en plantas, como es el caso de PvPTP, una fosfatasa específica de tirosina de frijol.

En el presente trabajo se describe una fosfatasa específica de tirosina soluble de *Phaseolus vulgaris* que presenta características determinantes dentro de la familia de las fosfatasas de tirosina; cuya actividad de fosfatasa, está regulada por fosforilación en diferentes residuos.

ANTECEDENTES.

El éxito de la supervivencia de los organismos está dado por la capacidad que tienen al responder a los estímulos que se generan en su entorno. Ante esta comunicación cotidiana, en la célula se tiene que tener un lenguaje químico y físico muy bien estructurado para que el resto de las células -en el caso de un organismo eucariota- sepan que es lo que está pasando intracelularmente y extracelularmente en todo el organismo (Alberts *et al.*, 1994, Fiaschi *et al.*, 2001).

Este lenguaje fisicoquímico, está dado por la transducción de señales. Este proceso ocurre por una amplia gama de proteínas estructurales y solubles como cinasas, fosfatasa, receptores de membranas, ATPasas, GTPasas, proteínas G, fosfoinosítidos, etc. (Alberts *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 2000; Uemory *et al.*, 1999); las cuales, dependiendo de su función se clasifican en grandes familias. Todas estas proteínas están reguladas entre sí para mantener una homeostasis adecuada en la célula y en el organismo (Alberts *et al.*, 1994; Akira *et al.*, 2001).

Uno de los ejemplos relativamente bien estudiados, son las relaciones específicas que se dan entre leguminosas y bacterias simbióticas de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* que culmina con la formación de nódulos fijadores de nitrógeno (Brewin, 1991 y Mylona *et al.*, 1995). La interacción temprana de estas bacterias con su hospedero, se determina por los genes *nod*; estos genes establecen un diálogo de señales químicas con la planta y son activados por compuestos de naturaleza flavonoide exudados por las raíces de la planta. Los genes *nod* a su vez producen lipo-quitos oligosacáridos (factores Nod) que son moléculas señal con actividad morfogénica (Spaink, 1992). Los factores *Nod*, inducen una serie de cambios involucrados en la morfogénesis del nódulo; Downie (1994), ha demostrado que los factores Nod inducen divisiones celulares en el cortex de la raíz y que en algunos casos se convierten en primordios o meristemas del nódulo; por su parte Ehrhardt *et al.* (1992) y el grupo de Felle (1995), demostraron que los factores Nod son capaces de inducir la depolarización del potencial de membrana de los pelos radiculares de una forma específica. Además, estos factores inducen la transcripción

de genes de nodulinas tempranas (ENOD5 y ENOD12) las cuales están relacionados con los procesos de infección (Journet *et al.*, 1994) y las nodulinas tardías (ENOD14 y ENOD16), que son proteínas que se expresan después de los 12 días de infección.

Para que una estructura celular tan especializada como un nódulo se desarrolle, se requiere de muchos eventos de señalización y procesos de diferenciación en ambos simbioses (planta y bacteria), además de que estos mecanismos tienen que estar perfectamente regulados tanto espacial como temporalmente. (Leuroge, 1994). Muchas proteínas que intervienen en diversos procesos celulares son reguladas por modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, oxidación, metilación, etc. (Alberts *et al.*, 1994; Hunter, 1995).

CLASIFICACIÓN DE LAS PTPs

Las fosfatasa de tirosina están conformadas por tres grandes familias: las clásicas PTPs específicas de tipo receptor (RLPTPs), o las no transmembranales (nMPTPs); y por último, las PTPs tipo dual (DSPTPs) (Figura 1). Todos los miembros de la familia de las fosfatasas contienen un único motivo catalítico común HCxxGxxR, el cual responde a la actividad de fosfatasa donde H es una Histidina, C es una Cisteína o cistenil, x es cualquier aminoácido, G es una Guanina y R es una arginina (Barford *et al.*, 1994; Cohen, 1992; Tonks, 2001). El grupo cistenil es el primero en atacar el grupo fosfato de la fosfotirosina (PY) y el encargado de formar un intermediario para la posterior desfosforilación de la proteína sustrato (Barford *et al.*, 1994; Cohen, 1992, Tonks y Neel, 2001). Las PTPs tienen también un par de secuencias presentadoras que intervienen en el reconocimiento de la tirosina de la proteína sustrato, estas secuencias son la WPD y la KNRY; estas secuencias están conservadas para todas las PTPs (Barford *et al.*, 1994; Cohen, 1992, Tonks y Neel, 2001).

conformado por las subunidades A, B y C de 60, 55 y 36 KDa respectivamente, y alternativamente puede asociarse a otras subunidades de 35 y 70KDa. por otro lado, la PP2B también llamada calcineurina, forma heterodímeros que constan de la subunidad catalítica A o calcineurina A (CnA) de 60 KDa que une calmodulina y de la subunidad reguladora de 19KDa que une calcio (CnB) (Shenolikar, 1994).

La posibilidad de combinación de diferentes o varias subunidades reguladoras de las DSPTPs da lugar a distintas fosfatasas, con mayor o menor especificidad por sus sustratos, además de conferirles una localización subcelular específica. Por ejemplo, se ha observado que la actividad y alta especificidad que tiene la PP2A por sus sustratos, depende en gran medida de la concentración de dichas subunidades en la célula, y es particularmente la tercera subunidad, la B, la responsable de la unión a la membrana plasmática, y, por tanto, de su relocalización subcelular (Shenolikar, 1994).

Otros ejemplos de fosfatasas duales incluyen MAP cinasas fosfatasas (MKP's), la familia de la fosfatasa cdc25 y miembros de VH1 de *Vaccinia virus* (Figura. 1). Las MKPs de-fosforilan particularmente miembros de la familia de las MAP cinasas (MAPK'S). Las diferentes isoformas de cdc25 defosforilan cinasas ciclinas-dependientes (Cdk's), esto estimula a la actividad de Cdk. En el caso de VHR, defosforila a muchas proteínas de *Vaccinia virions*, incluyendo la proteína transmembranal A14 y la proteína soluble DNA-binding protein (Denu y Dixon, 1998; Barford, 1994; Cohen, 1992, Tonks, 2001).

Un caso especial en fosfatas duales es la proteína PTEN (Figura 1), esta proteína es el producto de un gen supresor tumoral localizado en el cromosoma humano 10q23 (Maehama *et al*, 2001). Esta fosfatasa defosforila la posición del 3^{er} fosfato de fosfatidilinositol (PI3P). PTEN, representa un papel muy importante en la regulación celular puesto que está involucrada en procesos de crecimiento celular y apoptosis; cualquier mutación en esta proteína ocasiona el desarrollo de tumorigénesis en cualquier tejido humano (Barford, 1994; Cohen, 1992, Tonks, 2001, Maehama *et al*, 2001).

Tabla. 1 Características generales de la estructura, requerimientos iónicos, inhibidores, localización celular y función de fosfatasa.

Tipo de fosfatasa	Substrato	Inhibidores	Iones	Subunidad catalítica	Localización celular	Función
PP1	Subunidad β de la cinasa fosforilasa	Inhibidor-1 Inhibidor-2	Mn ²⁺ Zn ²⁺	37KDa Isoformas: α , β , γ y δ	Núcleo Citosol	Control de la dinámica de microtúbulos. Metabolismo del glucógeno. ¿Histonas?
PP2A	Subunidad α de la cinasa fosforilasa	Ácido Okadaico	No requiere	37KDa Isoformas 0, 1, 2 y S _M	Núcleo Citosol Mitocondria	Regula la longitud de los microtúbulos Inactiva a la PKC α . Efecto negativo en la transición G2 a M.
PP2B	Subunidad α de la cinasa fosforilasa. Subunidad reguladora de PKA II	Ciclosporina Ciclofilina Antagonistas de la CaM Calcineurina	Ca ²⁺ Mg ²⁺ Mn ²⁺ Ni ²⁺	Monómero de 60-61 KDa Isoformas α y β	Citosol Núcleo Membrana plasmática Sinaptosomas	Activación de las células T. Regula la activación de la ATPasa Na ⁺ /K ⁺ y canales de K ⁺ . Plasticidad sináptica.
PP2C	Cascina PK-CaM Cadena ligera de la miosina	No hay inhibidores específicos	Mg ²⁺ Mn ²⁺	Monómero 43-45KDa Isoformas 1 y 2; a y b	Citosol	Regulación de la función neuronal. Regulación de la gluconeogénesis.
PTP1B	Receptor de insulina	Ortovanadato de sodio Tungestato	No requiere	35 KDa clases I a VI	Membrana plasmática Citosol	Activación de células T.
PTP2B	MAPK Hog-1	Ortovanadato de sodio	No requiere	Un dominio catalítico clases I a VIII	Citosol	Gastrulación. Ovogénesis. Control de ciclo celular. Transformación. Apoptosis.

Fosfatasa clásicas tipo receptor (RLPTP).

La estructura de las RLPTP se conoce más a detalle que las DSPTPs. Su clasificación depende de la estructura de la proteína (Figura. 1): Existen cinco subgrupos de las RLPTPs (Barford, 1994; Cohen, 1992; Tonks, 2001). El grupo 1, se caracteriza porque

sus miembros tienen un dominio extracelular muy largo; el grupo 2, está formado por LAR (Leukocyte common antigen-related), DLAR (*Drosophila*-LAR), DPTP (*Drosophila*-PTP), PTP μ . R-PTPI se distingue porque tienen uno de tres dominios similares a las inmunoglobulinas en el extremo amino y adyacentes a secuencias repetidas de fibronectina (Mourton, 2001). El grupo 3, está formado por PTP β , DTPTP 99A, DPTP 10D, DPTP 4E y RPTP β que tienen una sola región de fibronectina. Los miembros del grupo 4, se identifican con dominio extracelular pequeño, tal es el caso de RPTP α y HPTP ϵ (Liang, 2000, Tanuma, 2000). Finalmente el grupo 5, tienen un dominio homólogo al sitio activo de las proteínas que unen zinc (Barford, 1994; Cohen, 1992, Tonks, 2001).

Algunas características estructurales de estas proteínas las hace sumamente interesantes, por ejemplo, todos los miembros de la clase de RLPTPs, presentan un dominio que atraviesa la membrana plasmática y dos dominios de fosfatasa en el citoplasma, uno seguido del otro (Barford, 1994; Cohen, 1992, Tonks, 2001).

Este tipo de proteínas intervienen en diferentes procesos celulares, por ejemplo PTP κ y PTP μ participan en el reconocimiento celular, contacto celular, migración neuronal, inhibición de contacto celular y crecimiento celular (Tonks y Nell, 2001; Nam *et al.*, 1999).

Fosfatasas clásicas tipo no transmembranal o citoplasmáticas (nMPTP).

Las estructuras de las nMPTP están bien determinadas; de una forma general los miembros de este grupo sólo tienen un dominio de fosfatasa (Tabla 1), por ejemplo, PTP1B, DTPTP10D, DPTP4E y HPTP β (Tonks y Nell, 2001; Barford, 1994; Cohen, 1992; Chernoff, 1990).

Existen nMPTPs, con dominios SH-2, estos dominios son determinantes en la transmisión de señales intra-celulares ya que por medio de ellos las fosfatasas pueden asociarse físicamente a proteínas que están fosforiladas en residuos de tirosina, como por ejemplo algunos receptores de factores de crecimiento (Barford, 1994). Por otra parte, la

el desarrollo (Shen *et al.*, 1991). La delección del gen correspondiente provoca severos defectos en la gastrulación de ratones, así como deformaciones de la cola e inhibición de la inducción del mesodermo en embriones de *Xenopus*. Además, la presencia de dominios SH-2 en la estructura de las nMPTPs se ha conservado a través de la evolución ya que está presente en la estructura de PTPs de insectos (*Drosophila*), anfibios (*Xenopus*), nemátodos (*Caenorhabditis elegans*) y de mamíferos, poniendo en manifiesto la importancia que tiene el dominio para la función de las mismas (Shen *et al.*, 1991, Gutch *et al.*, 1998).

Otras nMPTPs, como la PTPH, se distingue porque tiene en el extremo amino regiones homólogas al dominio característico de proteínas que forman parte de la superfamilia llamada banda 4.1. Estos dominios le confieren la capacidad de interacción con otras proteínas, además de dirigir las hacia la interfase entre la membrana y el citoesqueleto (Zang *et al.*, 1997). Otra PTP citosólica es la PTP4, cuyo papel es la regulación de canales de KCl en eritrocitos (Wei, 2000) ó PTP que interviene en la fosforilación de villina, proteína que se encarga de la organización del citoesqueleto (Zhai, 2001).

La cristalización y el análisis por difracción de rayos X de PTP1B a 2.8Å (Bardford, 1994), y de la PTP de *Yersinia* a 2.5 Å (Stukey, 1994), ha permitido conocer la estructura de estas proteínas al nivel molecular y atómico. Estos estudios han revelado que la PTP1B (Figura. 2), consta de un solo dominio formado por ocho α -hélices y doce hojas β -plegadas. El sitio catalítico de PTP1B, se localiza dentro de un surco sobre la superficie de la proteína y que el sitio de unión del fosfato se encuentra en el residuo de cisteína 215, muy cerca de la doceava hoja β (β -12) y de la cuarta α -hélice (α -4) en el amino terminal; ó en el residuo de histidina 214 localizada en el asa 15 entre la β -12 y la α -4 en el extremo carboxilo de la hoja α paralela en la PTP de *Yersinia*.

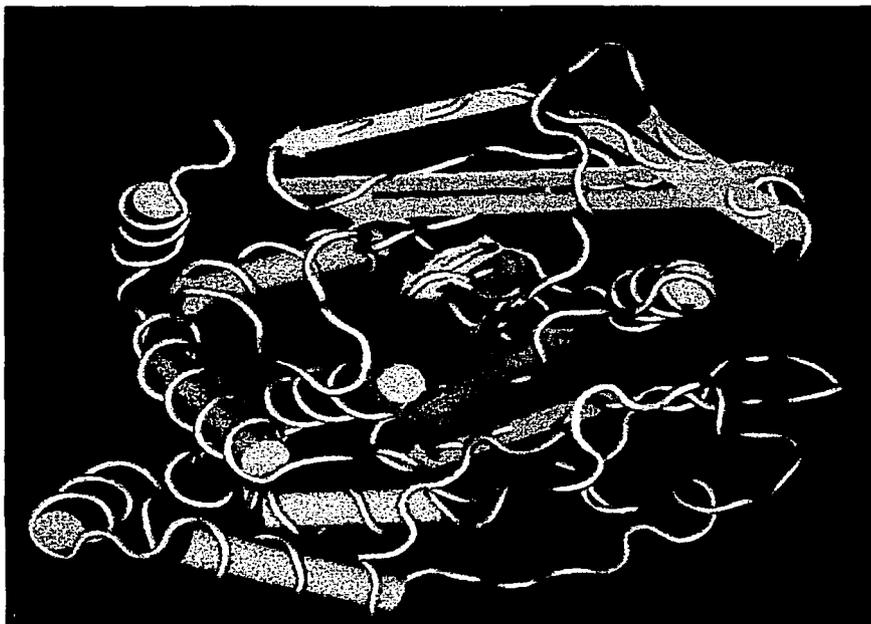


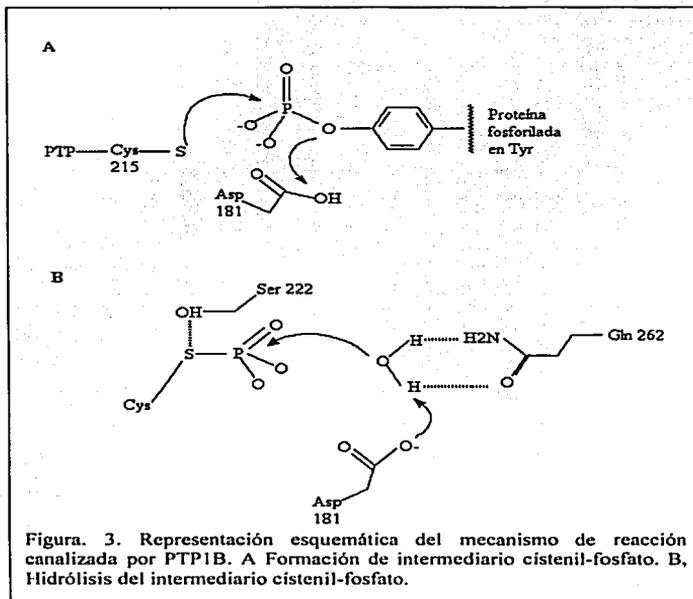
Figura 2. Estructura 3D de PTP1B. La banda azul indica el sitio catalítico (HCxxGxxR) y las amarillas las secuencias presentadoras (KNRY y WPD) (Barford, 1994).

PTP1B, es una de las fosfatasa citosólicas más estudiadas, el papel de esta fosfatasa es sumamente importante, puesto que interviene en reconocimiento y activación del transporte de glucosa, la baja expresión o inhibición de esta fosfatasa causa desórdenes de degradación de glucosa, por ejemplo, la diabetes I o II. (Venable, 2000).

Mecanismo de reacción.

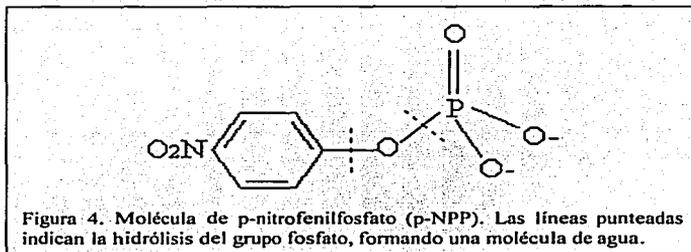
La reacción química que llevan a cabo las fosfatasa consiste en la hidrólisis de monoésteres de fosfato sobre aminoácidos específicos: serina/treonina y tirosina (Jhonson, 1996). El proceso es termodinámicamente favorable con un $\Delta G < -9 \text{ kJ mol}^{-1}$, determinado a pH 7.0 a 25°C (Barford, 1994; Cohen, 1992, Tonks, 2001). La hidrólisis entre el monoéster de fosfato en presencia de agua o de otros nucleófilos da como resultado la transferencia del grupo fosforilo (PO_3^-) lo que forma parte de un mecanismo limitante, efectuado en un solo paso en las DSPTPs y en dos pasos en el caso de las PTPs específicas (Barford, 1994; Cohen, 1992, Tonks, 2001). Durante la catálisis de las PTPs el PO_3^- del sustrato es transferido al residuo de cisteína (Cys) del sitio activo de la enzima formando un complejo intermediario trifosfato-enzima unido covalentemente. En un segundo paso, es hidrolizado por agua formándose un complejo fosfoenzima (Figura 3), ahora unido de manera no covalente. La disociación del fósforo inorgánico de la enzima completa el ciclo catalítico (Barford, 1994; Cohen, 1992, Tonks, 2001).

El papel del sitio catalítico, en especial el residuo cistenil (Cys) es de suma importancia; así como el aspártico de la secuencia WPD o presentadora. Cualquier mutación en estos residuos causa la inactivación parcial o total de la actividad de fosfatasa (Tartaglia, 2001).



Mé debate el análisis de difracción y de estructura de las fosfatasas LAR, VAR y PTP1B se ha determinado que el mecanismo de reacción descrito anteriormente es común para las PTPs, (Barford, 1994; Cohen, 1992, Tonks, 2001), que involucra la formación de una fosfoenzima intermediaria (Figura 3). En contraste, en el mecanismo de reacción de DSPTPs, no se forma el intermediario fosforilado durante la catálisis (Cohen, 1992, Tonks, 2001).

Para la investigación de este mecanismo se ha utilizado un compuesto genérico como sustrato, este es: p-nitrofenilfosfato (p-NPP). Este compuesto (Figura. 3) consta de un anillo nitrilo con un grupo fosfato, la hidrólisis el grupo fosfato da una reacción colorimétrica que puede ser medida en un espectrofotómetro a 405nm de absorbancia.



Mecanismos moleculares de regulación.

A diferencia de las cinasas, las enzimas que defosforilan proteínas son reguladas por diversos mecanismos (Barford, 1994; Cohen, 1992, Tonks, 2001). La mayoría de las DSPTPs son moduladas por su asociación con diversas subunidades reguladoras; otras son blanco de modificaciones postraduccionales. Algunas DSPTPs, requieren para activarse de policionones como la protamina, las histonas, la polilisina y las poliaminas; otras moléculas como el AMP, el ADP, glucosa 1-P y fructuosa 1-P pueden inhibir su actividad, y algunos péptidos pequeños de 8KDa derivados de la subunidad reguladora de la PP1 actúan como desinhibidores (Cohen, 1992).

Un caso especial de regulación *in vivo*, al menos reportado para el caso para PP2B, es su inhibición por la unión de complejos formados entre las inmunofilinas endógenas y drogas como la ciclosporina y la rapamicina. L. K. Dixon y su grupo de investigadores, observaron que en células infectadas por virus, la inhibición de la calcineurina, al formar estos complejos, es la responsable de la protección de la célula huésped en contra de los virus. Lo que sucede es que la proteína viral llamada A238L forma un complejo con la calcineurina A previniendo así la activación de NFAT y la consecuente transcripción de genes de citocinas inmunomoduladoras-dependientes del factor de transcripción, que se producen cuando existe una infección y se daña a la célula huésped (Miskin, 1998).

Existen casos, en donde la actividad de las enzimas que defosforilan residuos de serina/treonina depende de su localización en la célula, es decir, de su proximidad al sustrato. Un estudio realizado en el sistema nervioso muestra que la PP1 y PP2A, en sus formas citosolicas, son más activas que aquellas que se encuentran asociadas a la membrana plasmática. La baja actividad enzimática de estas fosfatasa se atribuye a la presencia cercana de otras proteínas que las regulan negativamente ya que actúan como inhibidores endógenos, es por ello que en determinados casos un sitio celular específicos es sinónimo de una forma activa de la fosfatasa, y en otros de una forma inactiva (Klumpp, 1998).

Por otra parte, las PTPs han sido poco estudiadas, pero en general son reguladas por fosforilación o por oxidación de un residuo de cisteína del dominio catalítico y cuya consecuencia es la inhibición de la actividad. Por lo que se ha sugerido, que el estado redox de la célula también participa en la regulación e inhibición de esta clase de fosfatasa (Barford, 1998).

Metilación

Esta forma de modificación postraducciona que se lleva a cabo por una carboximetiltransferasa sobre algunas DSPTPs tiene un papel relevante en la regulación de la actividad de algunas de estas fosfatasa. La PP2A es metilada en el carboxilo terminal de la subunidad catalítica, específicamente en el residuo leucina 309 y su efecto es el de activar a la enzima, por lo que se ha sugerido que esta modificación postraducciona tiene una función reguladora. Curiosamente, la secuencia Thr-Pro-Asp-Tyr-Phe-Leu es el sitio de metilación de la PP2A se conserva desde las levaduras hasta el hombre, lo que apoya la idea de que la metilación tiene relevancia fisiológica. Mas aún, se ha observado que la metilación de la PP2A depende de señales extracelulares (Bradford, 1998).

Fosforilación.

La fosforilación es una modificación postraduccional que ocurre en numerosas proteínas, incluyendo a las fosfatasa. A la fecha, existen un gran número de estudios que evidencian que esta forma de modificación de las DSPTPs y PTPs (Tabla. 2) es el principal mecanismo de regulación. Dependiendo de la fosfatasa en particular, la fosforilación provoca la activación o la inhibición de la misma (Rosado, 2001). Por ejemplo, la PP1 es fosforilada y activada por tres cinasas de residuos de serina/treonina: la PKA, la caseína II cinasa y la cdc2 que participa en la progresión del ciclo celular y, además, en residuos de tirosina por la cinasa v-abl. Por su parte la PP2A es fosforilada, exclusivamente en la tirosina 307 de la subunidad catalítica, por las cinasas p60^{v-Src}, p56^{Lck}, por el receptor del factor de crecimiento epidérmico y por el receptor de insulina. La fosforilación de la PP2A provoca su desactivación de forma transitoria, lo que permite la amplificación de la señal; mientras que se reactiva por defosforilación. La PP2A también es fosforilada en residuos de treonina por PKC α , hecho que se relaciona con su reactivación. (Cohen, 1992; Weaver, 1996; Shenolikar, 1994; Echwald, 2000).

CD45 es fosforilada *in vitro* en residuos de serina y treonina e *in vivo* en residuos de tirosina por la cinasa-3 de la glucógeno sintetasa. PTP1B es fosforilada en residuos de serina durante la mitosis o en tirosina y serina durante la interacción del receptor de insulina (Tabla 2). En la diabetes tipo 2, este tipo de regulación es sumamente importante, puesto que si PTP1B no es fosforilada, baja la actividad de la fosfatasa, disminuyendo asimismo la velocidad de la insulina, a su vez la ruta encargada de la degradación de glucosa, acumulándose en la célula (Dadke, 2001; Echwald, 2002, Sarmiento, 2000).

Tabla. 2 Resumen de fosfatasa reguladas por fosforilación, cinasas que participan y efecto sobre su actividad.

Fosfatasa	Reguladas por fosforilación	Efecto	Cinasas que las fosforilan
PP1	Sí, en Tyr Sí, en Ser/Thr	Inhibe Activa	P60 ^{csrc} PKA y Cinsa II de caseína
PP2A	Sí, en Tyr Sí, en Thr <i>in vitro</i>	Inhibe	P60 ^{csrc} , p54 ^{Lck} , R-EGF y R-1
PP2B	No determinado	----	-----
PP2C	No determinado	----	-----
PTP Transmembranal(CD45)	Sí, en Ser/Thr <i>in vitro</i> Sí, en Tyr <i>in vitro e in vivo</i>	No determinado Disminuye actividad	Cinasa II de caseína PKC y Cinsa-3 de la glucógeno sintetasa
PTP Citosólica PTP1B (PTP1C)	Sí, en Tyr Sí, en Ser Sí, en Tyr	Activa Activa Inhibe	MAPK --- MAPK

Oxidación.

Como se mencionó anteriormente, las PTPs también son reguladas por oxidación, esta modificación es reversible gracias a la presencia de moléculas reductoras. Actualmente, se refuerza la idea de que la oxidación de las PTPs puede tratarse de una forma de control muy importante de la respuesta mitogénica. Esta basado en que algunos sistemas celulares se ha observado que la inhibición de dichas enzimas va acompañada de la fosforilación de proteínas, de manera muy similar a la fosforilación que inducen diversos factores promotores de la proliferación celular (Bradford, 1994).

Inhibición.

Dentro de los inhibidores de origen natural, está n: el ácido okadaico, un ácido graso poliéter producido por dinoflagelados que se concentra en la esponja marina *Halichondra okadai* y cuya ingestión causa envenenamiento e incluso la muerte; la apomorfina de *Rollinia ulei*, bloquea la actividad de Cd45; los inmunosupresores, como la estevastelina, inhiben la actividad de PTP y VAR. Estos inhibidores depletan, la actividad de fosfatasa específicas de tirosina de tipo receptor y/o citosólicas. En el caso de fosfatasas duales, los inhibidores son los siguientes: el disidólido de la esponja marina *Disydea entheria* inhibe la familia de cdc25; la caliculina A, que se extrae de esponjas marinas; la microcistina producida por cianobacterias; la tautomicina proveniente de la bacteria *Streptomyces spp* y la ciclosporina A de *Tolypocladium inflatum*, entre otros. Este tipo de inhibidores mimetizan a la fosfotirosina y se unen con una alta afinidad a las PTPs (Fry, 1995; Levitzki, 1995).

PTPs en plantas.

El primer reporte de una fosfatasa específica de tirosina de tipo no receptor en plantas, fue la AtPTP1 de *Arabidopsis thaliana* (Xu *et al*, 1998). Esta fosfatasa presenta una gran similitud a otras fosfatasas ya reportadas, ya que presenta el sitio catalítico de fosfatasa (HCxxGxxR) entre los aminoácidos 263 a 271 y el sitio presentador (WPD) en los aminoácidos 90 a 104. La expresión y los cambios de abundancia en mRNA de AtPTP1 está dada por estrés, ya sea salino, hídrico o por frío (Xu *et al*, 1998). Sin embargo, no se ha detectado la proteína en la célula.

Fordham-Skelton A *et al*; 1999, reportan esta actividad en la fosfatasa GmPTP de *Glicine max*, pero reportan secuencias muy parecidas a fosfatasas en *Pisum sativum* PsPTP, y *Arabidopsis thaliana* AtPTP. Las secuencias de las tres fosfatasas anteriores coinciden con fosfatasas ya reportadas del tipo no receptor. La actividad de fosfatasa de GmPTP y AtPTP1 se inhibe en presencia de vanadato y ácido okadaico, ambos inhibidores de fosfatasas de tirosina, pero no en presencia de cantaridina, un inhibidor de fosfatasas

duales. Aunque los mARN son relativamente poco abundantes, la expresión de PsPTP se da diferencialmente durante el desarrollo embrionario de *Pisum sativum*, esto es la expresión máxima se da cuando las semillas solo tienen 8 días de edad y va declinando conforme la plántula va madurando (Fordham-Skelton A *et al*; 1999). Esta expresión no se restringe a embriones, si no que también se expresa en hojas, vainas, zarcillos y tallo (Fordham-Skelton A *et al*; 1999).

A pesar de que las fosfatasa específicas de tirosina en sistemas animales están bien caracterizadas, en plantas, la investigación de este tipo de fosfatasa, se encuentra incompleta, puesto que no se conoce la importancia fisiológica y el papel que ocupan en la planta (Forsberg, 2001, Kameyama, 2000, Kovtun, 1998). Además, la localización subcelular no ha sido establecida ya que no se ha podido inmunodetectar a la proteína.

En el presente trabajo se describe la presencia de un cADN que codifica para una fosfatasa específica de tirosina (PTP); que se obtuvo de un escrutinio de un banco de cADN de nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Negro jamapa. La secuencia de PvPTP, tiene una identidad muy alta con fosfatasa específicas de tirosina no transmembranales (nMPTP). La actividad de fosfatasa que presenta esta proteína es muy similar a la de PsPTP y AtPTP. Sin embargo, la actividad de fosfatasa de PvPTP esta regulada por fosforilación, lo que la hace la primera fosfatasa de tirosina en plantas con esta característica.

OBJETIVOS**Objetivo general.**

Clonar el cADN de una fosfatasa de tirosina de nódulos *P. vulgaris* en un vector de expresión, para la posterior purificación y caracterización bioquímica de la proteína recombinante.

Objetivos particulares.

- Clonar el gen de la fosfatasa en un vector de expresión.
- Purificar la proteína recombinante en una columna de afinidad.
- Caracterización bioquímica parcial.

MATERIALES Y MÉTODOS.**Amplificación por PCR del fragmento PvPTP.**

Los oligonucleótidos fueron diseñados en el programa OLIGO versión 4.0, fueron sintetizados por la unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología-UNAM, y son los siguientes:

OLIGONUCLEOTIDOS ESPECÍFICOS		
Nombre del oligo	Secuencia 5'-3'	Características
Oligo "upper" PTP23F	GAAGGCCTTCATGGACGGCAACCCACC	Cuenta con un sitio de restricción <i>Stu</i> I
Oligo "lower" PTP23RE	GTCCTAGAGCCTACTGCTGAGATACAAG	Cuenta con un sitio de restricción <i>Xba</i> I

Para la reacción de amplificación se usaron las concentraciones señaladas en la Tabla 3:

Componente	Cantidad	[final]
cADN de frijol	1 μ l	0.5 μ g
Amortiguador 10x KCl 10mM, (NH ₄) ₂ SO ₄ 10mM, Tris-HCl pH 8.8 20mM, MgSO ₄ , Triton X-100 0.1%	5 μ l	1x
dNTPs	1 μ l	200 μ M
Vent polimerasa (Biolabs, New England)	1 μ l	0.5U
PTP23F	1 μ l	2 μ M
PTP23RE	1 μ l	2 μ M
H ₂ O	40 μ l	-

Las condiciones de amplificación se estandarizaron al variar la temperatura de alineamiento entre 45-55°C. El programa que se utilizó se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Programa de amplificación			
	Temperatura °C	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización	95	1	50
Alineamiento	55	1	
Extensión	72	1.5	
Inactivación	72	5	

Electroforesis de ADN en geles de Agarosa.

Todos los geles de ADN se prepararon de acuerdo al protocolo reportado por Sambrook, *et al.*, 1989. Se utilizó un gel de agarosa (Tabla. 5) en amortiguador TAE1X (Tabla. 5). Las muestras se corrieron en el gel y se le añadió ¼ de volúmen de azul de bromofenol. El marcador de pesos moleculares que se utilizó en todos los ensayos de electroforesis en geles de agarosa, fue de 1Kb ADN "Ladder" o de 100pb (Gibco-BRL) a una concentración de 1µg/µl. Los geles se corrieron a 75 volts en cámaras horizontales de electroforesis.

Tabla. 5 Soluciones para el gel de agarosa
Gel de agarosa
Agarosa 1% (p/v)
TAE 1X
Bromuro de etidio 0.5µg/ml
TAE1X
Tris-acetato 0.04M
EDTA pH 8.0 1mM

Purificación de ADN de geles de agarosa.

Los productos de PCR se analizaron por tamaño mediante electroforesis en un gel de agarosa. En el gel se cargó la mitad de cada reacción de PCR (25µl) mezclando con 5µl de colorante azul de bromofenol. Los productos de PCR se observaron en un transiluminador de luz UV. Las bandas de interés que se detectaron en el gel, se cortaron y

se pesaron, colocándolas a cada una en un tubo Eppendorf diferente. El ADN se aisló y se purificó con el método Glass Select (5 Prime - 3 Prime, Inc.). Al tubo se le agregaron 2.5 volúmenes (p/v) de solución salina y se incubó a 50°C hasta que la agarosa quedó totalmente disuelta. Posteriormente se agregaron 5µl de matriz de sílice y esto incubó 20 min. a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12,000 xg durante 5 seg. y se descartó el sobrenadante. La pastilla se lavó 4 veces con etanol 70%, y posteriormente se dejó secar durante 10 min a temperatura ambiente y se resuspendió en 10 µl de agua desionizada. Finalmente, se incubó la reacción 5 min. a 50°C y se centrifugó 5 seg. a 12,000 xg recuperando la fase acuosa.

Clonación en un vector de expresión.

Con el objetivo de tener una proteína recombinante se utilizó un vector de expresión bacteriano. El plásmido que se utilizó fue el pProEx™ HTc (Life Technology), que es un vector de alta expresión en bacterias. Este vector genera una proteína recombinante que presenta una secuencia de 6 Histidinas en el extremo amino terminal que permite su posterior purificación por una cromatografía de afinidad.

Este plásmido (Figura. 5), cuenta con un marcador de resistencia para ampicilina (Ap) y con el promotor *Trc* (pTrc) que es inducible por IPTG; y el gen *lacI^q* que codifica para el fragmento activo de la enzima β-galactosidasa. Esta enzima permite la generación de colonias blancas y azules; el color de las colonias se debe a que el fragmento activo de la enzima β-galactosidasa utiliza como sustrato al galactósido (X-Gal) que está integrado al medio de cultivo y que genera un producto de color azul. Cuando se clona alguna secuencia, en el gen *lacI^q*, se interrumpe el marco de lectura y así la síntesis de la enzima β-galactosidasa. Como resultado de esta inserción, se obtienen colonias blancas que sugiere la integración en el plásmido del gen de interés.

durante toda la noche a 16°C; esta ligación se verificó en un gel de agarosa al 1.5% y se visualizó con luz UV.

**Tabla 7. Ligación de la construcción ProEx™
Htc::fragmento de PCR**

Componente	Cantidades	[final]
Producto de PCR	3µl	1.5µg
Vector pProEx™ Htc linearizado	1µl	1µg
Amortiguador 10x	1µl	1X
T4 Ligasa (Biolabs)	1µl	1U
H ₂ O	5.5µl	-
Volumen final	10µl	-

Transformación de células electrocompetentes.

Para la transformación de células competentes se utilizó la cepa DH5α, ya que es una cepa "proteasa-menos", además de ser recomendada por el fabricante del plásmido. Para hacer las células electro-competentes se creció una colonia en 5ml de medio LB/ap a 37°C durante toda la noche (Tabla. 8). Se añadieron 2 ml del cultivo a 1 lt de medio LB/ap y se incubó a 37°C. El cultivo se dejó crecer hasta una densidad óptica de 0.5 (Ab₆₀₀). Posteriormente, el cultivo se incubó en hielo durante 30 min. Después el cultivo se colocó en tubos de centrifugación estériles y fríos, centrifugándolos 10 min a 5,000 xg a 4°C. El sobrenadante se desechó y la pastilla se lavó con 500ml de agua desionizada a 4°C y después se centrifugó 10min a 5,000xg a 4°C. El sobrenadante se desechó y el botón se resuspendió en 20ml de agua desionizada a 4°C y 10% de glicerol. Posteriormente se centrifugo a 5,000 xg durante 10 min a 4°C, el botón se recuperó y se resuspendió en 3ml de agua desionizada a 4°C y 10% de glicerol. Después se hicieron alícuotas de 50µl en tubos Eppendorf con una concentración de 1-3 x 10¹⁰ cel/ml y se almacenaron a -70°C.

A continuación se tomó una alícuota de células competentes, se le añadió 1.0 ng de la construcción pProEx™ Htc::fragmento de PCR, se mezcló y se colocó en una celda de electroporación estéril y fría de 0.75 cm de ancho, aplicándole una corriente de 0.9 amperes. Posteriormente se añadió 1 ml de medio LB sin antibiótico, transfiriéndose a un

tubo Eppendorf estéril, el cual se incubó a temperatura ambiente durante media hora. Una vez transcurrido el tiempo, se incubó durante una hora a 37°C y posteriormente se tomaron 100 µl de células transformadas y se inocularon en cajas de Petri que contenían LB agar con IPTG/X-Gal/Ap (Tabla 8) y se incubaron a 37°C durante 12 horas.

β-D-Tiogalactopiranosido (IPTG)*	1µl/ml de medio LB
X-Gal*	1µl/ml de medio LB
Ampicilina (ap)*	1µl/ml de medio LB

IPTG	25 mg/ml
X-Gal	25 mg/ml de DMSO
Ampicilina (ap)	100 mg/ml de agua
Medio LB Agar** (Ausubel <i>et al.</i> 1989)	
Triptona al 1%	
Extracto de levadura al 0.5%	
NaCl al 1%	
Agar bacteriológico al 1.5%	

Hibridación en colonia.

Para verificar la presencia del fragmento PvPTP, las colonias blancas recién obtenidas se transfirieron con un palillo de madera a una membrana de "Hibond N" marcada con un sello indicando el número de colonias en su superficie la cual fue colocada sobre en una caja Petri con Medio LB Agar conteniendo además IPTG/X-Gal/Ap (Tabla 8). Esteo se incubó durante toda una noche a 37°C. A estas membranas se les realizó una "hibridación en colonia" (Sambrook *et al.* 1998). Para este procedimiento se colocaron las membranas sobre una película plástica (Ega-Pack), y se les añadió NaOH (hidróxido de sodio) 0.4N hasta cubrir las totalmente, durante 15min., después de los cuales se lavaron con etanol absoluto para quitar los restos celulares. Posteriormente, se lavaron con 250ml de amortiguador SSC2X durante 10min. Transcurrido el tiempo se lavaron con una

solución de prehibridación (solución 1, Tabla 9) incubando a 65°C durante 15min. Después se le agregó la sonda homóloga marcada previamente, utilizando el kit de "Random primer" (Biolabs) y se incubaron durante toda una noche a 65°C con agitación constante. Después del tiempo señalado, se retiró la sonda y los filtros se enjuagaron con la solución 1 durante (Tabla 9) 30min; posteriormente se lavarón con la solución 2 (Tabla 9) durante 15min. Para verificar la marca integrada en la membrana, se revisaron con un conador de ceteleo tipo gaiger tanto las orillas del filtro como el control de hibridización positivo. Las membranas ya lavadas se cubrieron con "Ega-Pack" y se expusieron a una pantalla para "Phospor-Imager" durante 24 hrs.

Tabla 9. Amortiguadores para la Hibridación en colonia.

Amortiguadores	Componentes	[Final]	Temperatura Ambiente
SSC2X	SDS Heparina	10% 1%	Temperatura ambiente
Solución 1	BSA EDTA NaHPO ₄ pH 7.2 SDS	0.5% 1mM 40mM 5.0%	65°C
Solución 2	EDTA NaHPO ₄ pH 7.2 SDS	1mM 40mM 1.0%	65°C

Extracción de ADN de plásmidos y secuenciación.

Los ADN de los plásmidos que se mandaron a secuenciar se obtuvieron por el método de "lisis alcalina"; las colonias positivas obteniéndose por el método de cultivo en colonia, se picaron con un palillo de madera y se transfirieron a tubos de ensayo que contenían 3ml de medio LB/ap los cuales se crecieron 12 horas a 37°C en agitación constante. Estos cultivos se centrifugaron a 6.000 xg durante 1min. Las pastillas obtenidas se resuspendieron en 1 ml de Get (Tabla 10), lo cual se centrifugó nuevamente a 6.000 xg durante 1min. Las pastillas se resuspendieron en 50µl de Get y 1.6U/µl de ARNasa H (Boheringer), se agregaron 450µl de amortiguador de lisis y se incubaron en hielo durante

10min. Posteriormente se adicionó por tubo 250 μ l de acetato de potasio pH 5.8 3M y se incubaron a -20°C durante 5 min. Esto se centrifugó a 21,000 xg durante 15 min a 10°C y se recuperaron los sobrenadantes a los que se le agregó un volúmen de etanol absoluto. Estos tubos se centrifugaron a 21,000 xg durante 5 min. Las pastillas se lavaron con etanol 70% y se volvieron a centrifugar durante 5min. a 21,000xg. El sobrenadante se decanto y las pastillas se dejaron secar a 65°C . durante 5min. las cuales una vez secas se resuspendieron en 50 μ l de agua desionizada estéril y se almacenaron a -20°C para su posterior análisis.

Amortiguador de rompimiento (Get)	
Glucosa	5mM
EDTA	10mM
Tris	25mM
Acetato de potasio	
Acetato de potasio	3M pH 5.8

La obtención de los plásmidos se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.2%. se colocaron 2 μ g de los plásmidos mezclados con 5 μ l del colorante de azul de bromofenol. la electroforesis se realizo a 75volts en una cámara horizontal y se visualizo con luz UV.

Debido a que el sitio de clonación del inserto estaba flanqueado por los sitios de corte de EcoRI y XbaI, los plásmido se digirieron con las enzimas EcoRI y XbaI (Tabla 11), para liberar el inserto. La digestión se verificó mediante electroforesis bajo las condiciones antes mencionadas. Los fragmentos que son del peso adecuado se les hizo una replicación de PCR con las condiciones ya estandarizadas.

Amotiguador 10x para EcoRI y XbaI	4 μ l
EcoRI	10U (1 μ l)
XbaI	10U (1 μ l)
Plásmido	2 μ g (5 μ l)
H ₂ O	13 1 μ l
Total	20 μ l

Mediante estos experimentos se seleccionaron las clonas que tenían la construcción ProEx Htc::fragmento de PCR, para posteriormente mandarlos a secuenciar en la unidad de secuenciación de ADN del IBT-UNAM, utilizando los oligonucleótidos adecuados del plásmido.

Análisis de identidad de la secuencia PvPTP.

La secuencia nucleotídica resultante PvPTP se comparó con las secuencias almacenadas en el banco de datos Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html) mediante los programas BLASTp, el cual traduce la secuencia de nucleótidos a la secuencia de aminoácidos.

La secuencia de aminoácidos de la proteína PvPTP fue sometida al programa PROSITE (Hofman *et al*, 1999) para identificar los posibles sitios de fosforilación a nivel de estructura primaria. Esto se realiza conforme a los péptidos ya identificados, que sirven como sustrato a una gran gama de cinasas reportadas y caracterizadas. Una vez determinados los sitios de fosforilación, la secuencia fue sometida al programa NEPHOS que identifica el perfil de probabilidad de los posibles sitios de fosforilación a nivel de estructura primaria,

Diseño 3D de la PvPTP

Para el diseño de la estructura tridimensional se utilizó la secuencia y la estructura 3D PTP1B (Bradford *et al*, 1994). Esta estructura, sirvió como molde para el diseño tridimensional de la PvPTP ya que es la única fosfatasa citosólica caracterizada a nivel de estructura con una identidad del 30% con nuestra proteína. Ambas secuencias se alinearon en el programa Cn3D (Hongue, 1997), y se diseñó una estructura tridimensional prediciendo su similitud e identidad.

Preparación de extractos proteicos en condiciones naturalizantes.

Para inducir la expresión de la proteína recombinante, se inoculó con una colonia, un cultivo conteniendo 10ml de medio LB líquido/ap, y se incubó en agitación constante a 37°C durante toda una noche. Después se transfirieron 5ml de ese cultivo a 100ml de medio LB líquido/ap y se incubó a 37°C hasta que éste tuviera una densidad óptica (OD_{600}) de 0.7. Cuando alcanzó esta densidad, se tomó una alícuota de 0.5 ml, la cual se centrifugó durante 5min a 6,000 xg. La pastilla se almacenó a -20°C. Paralelamente, al resto del cultivo se le agregó IPTG a una concentración 0.6mM final, y se incubó en agitación constante a 37°C durante 6 hrs. Cada hora se tomó una alícuota y se trató como se explicó anteriormente. Una vez transcurrido el tiempo, se centrifugó durante 20min a 4,000 xg a 4°C, se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en el amortiguador de rompimiento (Tabla 13) que contenía 1mM de PMFS y 0.1mg de lisozima de huevo. Esto se incubó en hielo durante media hora. Posteriormente las células fueron lisadas por sonicación a 300 watts durante 10min, con intervalos de descanso de un minuto, utilizando un sonicador Ultrasonic Processor, Modelo GE. Posteriormente, esta muestra sonicada se centrifugó a 10,000 xg a 4°C durante 20min. El sobrenadante se recuperó y se guardó una alícuota tratándola como se explicó anteriormente. La pastilla se resuspendió en amortiguador de rompimiento que contenía 6% de Tritón X-100 (Tabla 13), se sónico y centrifugó como se describió previamente.

Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad.

La matriz que se utilizó para purificar las proteínas recombinantes fue "Ni-NTA Superflow" (Quiagen, Inc.), la cual tiene afinidad por una secuencia continúa de 6 Histidinas. Se utilizó 1ml v/v de matriz. La purificación se realizó a través del equipo de cromatografía "Biologic Duo-Flow" (Chromatography system, Bio-Rad). Con esta herramienta se estructuró un protocolo (Tabla 12) utilizando el programa del sistema (Biologic Duo-Fluo 3.0). Las fracciones colectadas se almacenaron a 4°C.

# Paso	Flujo	Cantidad	Solución (Tabla13)
1	Isocrático 1ml/min	10ml	1
-	Standardizar 1 lámpara de UV	-	-
2	inyectar muestra 0.5ml/min	10ml	-
3	Isocrático 0.5ml/min	20ml	1
4	Isocrático 0.5ml/min	10ml	2
5	Isocrático 0.5ml/min	10ml	1
6	Gradiente lineal 0.5ml/min	30ml	1-3

Observaciones: Se recolectaron muestras de 1ml, durante toda la purificación.

Amortiguador de rompimiento (Solución 1)	
50 mM Amortiguador de fosfatos de sodio pH 8.0	
300mM NaCl	
Amortiguador de lavado (Solución 2)	
50 mM Amortiguador de fosfatos de sodio pH 8.0	
300mM NaCl	
10mM de Imidazol	
Amortiguador de elusión (Solución 3)	
50 mM Amortiguador de fosfatos de sodio pH 8.0	
300mM NaCl	
200mM de Imidazol	

Cuantificación de Proteínas.

La concentración de proteína de las muestras obtenidas se determinó a través del método descrito por Bradford (1976). Se realizó con una curva con diferentes concentraciones de BSA [0.5-1µg]. Estas se diluyeron en un volumen final de 0.8ml en una razón 1:3 (muestra:agua). A cada dilución se le agregó 0.2ml de reactivo de Bradford (BioRad), se mezclaron y se midieron en un espectrofotómetro (SmartSpec 3000™ de BioRad) a una λ 595nm. Se calculó estadísticamente la concentración de proteína en cada muestra.

Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes.

A las diferentes alícuotas almacenadas y las fracciones recolectadas durante la purificación de la proteína recombinante por la columna de níquel se les hizo una electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE al 12%) (Tabla 14).

Tabla 14. SDS-PAGE al 12%	
Gel separador de poliacrilamida.	
H ₂ O	3.3ml
Bis acrilamida 30%	4.0ml
1.5M Tris pH 8.8	2.5ml
10% SDS	0.1ml
10% APS	0.1ml
TEMED	0.004ml
Gel concentrador.	
H ₂ O	1.36ml
Bis acrilamida 30%	0.34ml
1.5M Tris pH 8.8	0.26ml
10% SDS	0.02ml
10% APS	0.02ml
TEMED	0.002ml

La solución de gel separador (Tabla 14) se vacía en la cámara de electroforesis, y se estratifica isopropanol para favorecer la polimerización, al crear una interfase entre el aire y el gel. El gel se deja polimerizar por 30min. Para el gel concentrador al 5.0% se mezclan los valores de la Tabla 14. Se escurre el isopropanol que cubre al gel separador, y se coloca el peine para formar los pozos, en seguida se vacía la solución concentradora y se deja polimerizar durante 30min. Las muestras se preparan al colocar en tubos Eppendorf la concentración deseada y el colorante de carga (Laemmli 2x, Tabla 15). Las muestras se incuban durante 5min a 95°C y se cargan en el gel, la cámara de electroforesis se llena con amortiguador de corrida (Tabla 15) y el gel se corrió a 20mA a temperatura ambiente durante una hora y media. Después de la electroforesis, se separa el gel de la cámara de electroforesis y se tiñe durante 1hr con la solución de tinción (Tabla 15) en agitación, y posteriormente el gel se sumerge en la solución de destinción (Tabla 15) durante 2hrs en agitación.

Tabla 15 Soluciones para la electroforesis de proteínas. Laemmli 2X
100mM Tris pH6.8 4% SDS 20% glicerol 10% 2-β-mercaptoetanol 2% azul de bromofenol
Amortiguador de corrida
25 mM Tris 250 mM Glicina 0.1% SDS
Solución de tinción
0.1% Azul de coomasie R250 50 % metanol:H ₂ O (1:1 v/v) 7% ácido acético glacial
Solución de destinción
50% metanol 10% ácido acético glacial

Generación de anticuerpos policlonales de ratón

Para obtener los anticuerpos policlonales se inmunizaron tres veces a ratones hembras de la línea Bal-BC, la primera inmunización se hizo con 50µg de proteína purificada que fue corrida en un gel preparativo de poliacrilamida-SDS al 10%, este gel se tiñó y destiñó como se explicó anteriormente. Posteriormente, la banda esperada se cortó y se colocó en un tubo Eppendorf añadiéndole 100µl de agua y 250µl de adyuvante completo Freud's (GIBCO, BRL) y se homogenizó hasta que se formó una pasta. Esta emulsión se inyectó de manera subcutánea a los ratones. La segunda y tercera inyección se hizo con 60µg de proteína purificada dándole el mismo tratamiento de electroforesis. Se cortó la banda y se colocó en un tubo Eppendorf, se le agregaron 100µl de agua y 100µl de adyuvante incompleto Freud's (GIBCO, BRL) se homogenizó y se inyectó a los ratones de manera subcutánea. Las inyecciones se hicieron con intervalos de tiempo de un mes, durando el procedimiento en total tres meses. Los ratones se desangraron por venoclisia inversa. Para obtener el suero sin restos celulares, la sangre se dejó 1hr a temperatura ambiente y 5hr a 4°C esperando que se coagulara, posteriormente se centrifugó 5 min a 6.000xg y se recuperó en sobrenadante, se alicuotó en muestras de 10µl y se almacenaron a -20°C.

Electrotransferencia e inmunolocalización tipo "Western blot"

Inicialmente fue necesario titular a los anticuerpos para determinar las diluciones adecuadas que permitan obtener la proporción óptima de la señal con respecto al fondo, es decir, evitar la aparición de señales inespecíficas en la membrana o falsos positivos durante la detección de la proteína recombinante y la nativa. Para la titulación del anticuerpo se corrió un gel preparativo con 60µg de proteína purificada y se transfirió a una membrana de celulosa, para hacer una inmunolocalización tipo "Western-blot".

Para la electrotransferencia en cámara semihúmeda, se colocaron en la cámara de transferencia un papel Watman de 0.5mm de grueso previamente humedecido con la solución de transferencia (Tabla 16), encima del papel Watman se colocó una membrana de nitrocelulosa humedecida con solución de transferencia (esta membrana tiene el tamaño del gel que se quiere transferir). Después, se colocó encima de la membrana el gel con las proteínas ya separadas; teniendo cuidado que no queden burbujas de aire entre el gel y la membrana, por último se colocó otro papel Watman humedecido en solución de transferencia y se terminó de armar la cámara. Se aplicó una corriente constante de 250 miliamperios por 3hrs. Después del tiempo transcurrido se desarmó la cámara, recuperando la membrana. La membrana se enjuagó 5min con TBST (Tabla 16) en agitación. Para señalar los marcadores de peso molecular, la membrana se colocó en la solución rojo Ponceau (Tabla 16) destiñendo la membrana con agua. Para la inmunodetección la membrana se colocó en la solución de bloqueo (Tabla 16) y se incubó 1hr a 4°C en agitación. Después del tiempo transcurrido se lavó 5min con TBST (Tabla 16). La membrana se colocó en la solución que contiene el anticuerpo primario (anti-ratón PvPTP ó α -PvPTP) y se dejó toda la noche a 4°C en agitación, al siguiente día se lava con TBST durante 10min tres veces. Luego se colocó la dilución el anticuerpo secundario (Goat Anti-mouse IgG AP, de Boehringer Mannheim) dejándolo en agitación 1hr a 4°C. Posteriormente se lavó con TBST durante 10min tres veces. Para revelar la membrana se utilizó la solución reveladora (500µl Sustrato NBT y 500µl Sustrato BCIP, Boehringer Mannheim) dejándola incubarse 5min.

Tabla 16. Soluciones para el Western blot	
Solución de transferencia	
39mM Glicina	
48mM Tris-base	
0.037% SDS	
20% Metanol	
TBST	
10mM Tris pH 8.0	
150mM NaCl	
0.05% Tween 20	
Solución de bloqueo	
3% de Leche entera en polvo baja en grasa en TBST	
Solución de Ponceau	
5% Rojo Ponceu	
5% Ácido acético glacial	
3% Metanol	

Preparación de material biológico.

Crecimiento de Rhizobium tropici Cepa CIAT 899.

Se tomó una colonia de la cepa CIAT 899 de *Rhizobium tropici*, y se inoculó en medio rico PY (Tabla 17), incubando a 30°C en agitación constante durante tres días.

Tabla 17. Medio PY.	
Peptona de caseína	0.5%
Extracto de levadura	0.3%
Cloruro de calcio	0.08%
Ácido nalidíxico	0.001%

Crecimiento de las plantas.

Las semillas de frijol, variedad "Negro Jamapa", se lavaron con agua corriente y se esterilizaron 10min con hipoclorito de sodio comercial diluido al 10%; se enjuagaron con agua estéril y se colocaron a germinar en charolas estériles sobre una cama de papel húmedo. Las charolas se taparon con papel aluminio y se incubaron a 25°C durante tres días.

Aparte, se llenaron macetas con vermiculita y se esterilizaron por autoclave. Una vez que las semillas germinaron, se colocaron cinco semillas por cada maceta. Las macetas se colocaron en el invernadero y a cada semilla germinada se le inocularon 2ml de medio con *Rhizobium tropici* Cepa CIAT 899 previamente preparado.

Las plantas se colocaron en el invernadero dejándolas hasta los 20 días. Las plantas se regaron alternadamente con agua y una solución nutritiva preparada al 1X, con la combinación de las soluciones de la Tabla 18. Las plantas se dejaron crecer y los nódulos se retiraron manualmente y se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C .

Solución A (100X)	CaCl ₂	100mM
Solución B (100X)	KH ₂ PO ₄	500Mm
Solución C (100X)	Na ₂ EDTA	5mM
	FeSO ₄ 7H ₂ O	5mM
Solución D (100X)	MgSO ₄ 7H ₂ O	25mM
	K ₂ SO ₄	25mM
Solución E (1000X)	MnSO ₄ H ₂ O	1mM
	H ₃ BO ₃	2mM
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.5mM
	CuSO ₄ 5H ₂ O	0.2mM
	CoCl ₂ 6H ₂ O	0.1mM
	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.1mM

Obtención y cuantificación de proteínas de tejidos de frijol.

Se utilizaron nódulos de diferentes días de crecimiento (10-17), los tejidos se maceraron en un mortero con N₂ líquido hasta obtener un polvo fino. El tejido macerado se puso en el amortiguador de rompimiento (Tabla 13), esta mezcla se agito rápidamente y se centrifugó a 10,000xg a 4°C durante 20min, se recuperó el sobrenadante y las proteínas obtenidas se cuantificaron por el método de Bradford y se realizó un ensayo tipo Western-Blot con el anticuerpo α -PTP.

Actividades de fosfatasa con la clona PvPPTP

Para ver la actividad de fosfatasa se utilizó como sustrato p-Nitrofenilfosfato (pNPP, p-Nitro Phenil Phosphato), este sustrato cuenta con un anillo fenólico que reconoce la enzima, la fosfatasa rompe ese enlace y el compuesto se reduce y da una reacción colorimétrica identificable a 405nm. Este experimento se llevó a cabo en todos los experimentos con 0.5µg de proteína colocada en un tubo Eppendorf. La solución de reacción lleva 1mM de DTT, 5mM de pNPP, 50mM de Tris pH 7.0 en una reacción final de 100µl. Cada reacción se realizó por triplicado y se midió a 405nm en el espectrofotómetro (EspectroSmart, 3000 Bio-Rad), durante 30min cada minuto, a temperatura ambiente.

Para verificar que la actividad de fosfatasa es exclusiva de tirosina, se hicieron experimentos de inhibición con fluoruro de sodio, inhibidor de fosfatasas duales; y, ortovanadato de sodio, que es un inhibidor de fosfatasas de tirosina, ATPasas, cinasas, etc. En la solución de reacción de p-NPP, se colocaron 5 µg de PvPPTP, agregándole diferentes concentraciones (0.05mM, 0.1mM y 1mM) de ortovanadato de sodio (Na_3OV_4) y diferentes concentraciones (0.05mM, 0.1mM y 1mM) de Fluoruro de sodio (NaF), incubándolas a 37°C durante 20 min.

Ensayos de fosforilación *in vitro*.

La PvPPTP se acopló a la resina de Ni-NTA como se explica en el siguiente diagrama. Las muestras 1-5 (Tabla 20), se equilibraron con el amortiguador BcN (Tabla 19) a 4°C durante 15 min, repitiendo el procedimiento cinco veces. Por otro lado, las muestras 6-14, se lavaron con el amortiguador BTK (Tabla 19) a 4°C durante 15 min, repitiendo el procedimiento cinco veces. Paralelamente, se realizó una extracción de proteínas totales de nódulos de 13 días de edad, en el amortiguador de cN y TK (Tabla 19) este extracto se incubó con la PvPPTP acoplada a la resina como se señala en la Tabla 20, durante una hora a 37°C en agitación constante, como se explica a continuación.

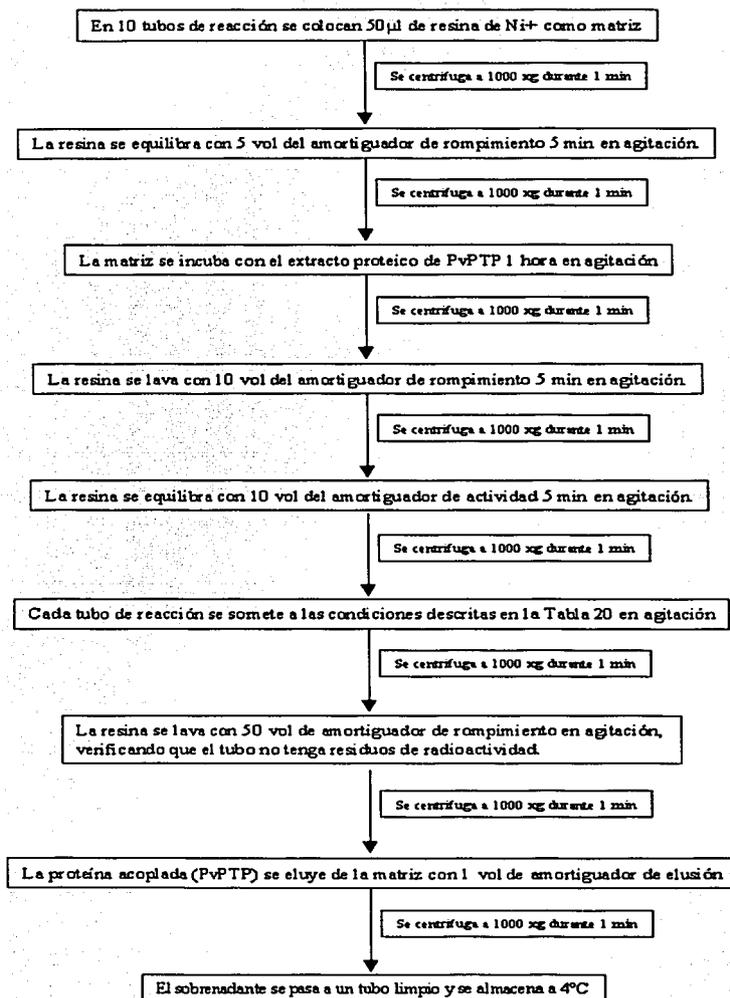


Tabla 19. Amortiguadores para los ensayos de fosforilación <i>in vitro</i>	
Amortiguador utilizado para medir actividad de cinasas dependientes de nucleótidos cíclicos (BcN)	
50mM Tris pH7.5 10mM MgCl ₂ 10mM NaF 2mM EGTA 2% de Tritón (Solo a la fracción insoluble)	
Amortiguador utilizado para medir actividad de cinasas de tirosina (BTK)	
20mM HEPES pH 7.5 10mM MnCl ₂ 10mM MgCl ₂ 0.5mM DTT 0.1% NP-40 2% de Tritón (Solo a la fracción insoluble)	

Tabla 20. Condiciones de reacción para la fosforilación <i>in vitro</i> de cada muestra.								
# muestra	Subunidad catalítica	Extracto total de nódulo	Amortiguador BcN	Amortiguador BTK	Marca ATP ³²	cAMP	cGMP	2% Triton
1	-	-	√	-	-	-	-	-
2	-	√	√	-	√	√	√	-
3	-	√	√	-	√	-	-	-
4	√	-	√	-	√	-	-	-
5	√	-	√	-	√	-	-	-
6	-	√	√	-	√	√	√	-
7	-	√	√	-	√	-	-	-
8	-	√	√	-	√	√	√	√
9	-	√	√	-	√	-	-	√
10	-	√	-	√	√	-	-	-
11	-	-	-	√	√	-	-	√
12	-	-	-	√	√	-	-	-
13	√	-	-	-	√	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-

* El sitio catalítico, es la subunidad catalítica de una cinasa dependiente de nucleótidos cíclicos de corazón de bovino (Sigma)

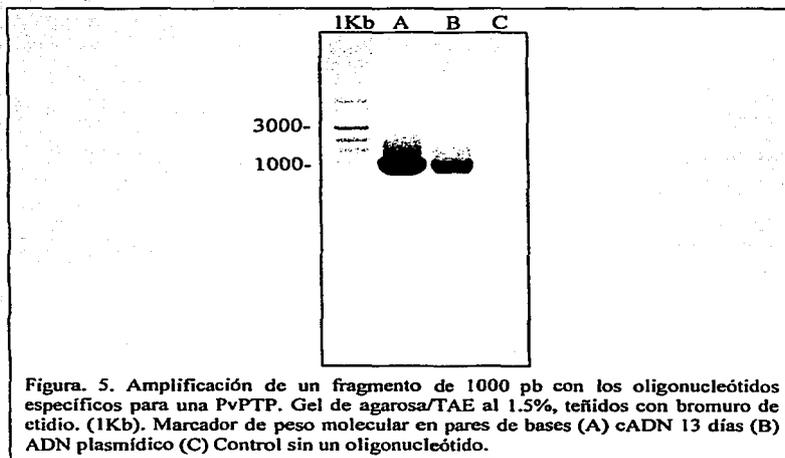
Después del tiempo transcurrido, cada matriz se lavó por separado con 50 volúmenes de buffer de rompimiento, verificando que el buffer no tenga residuos de radioactividad. Posteriormente se siguió con el protocolo de purificación de proteínas por cromatografía de afinidad, explicado anteriormente. Cada muestra, se cuantificó por el

método de Bradford, y se corrieron 10 μ g de cada muestra en un gel de acrilamida al 12%. posteriormente fue teñido, desteñido y secado en celofán, como se explico anteriormente. El gel de acrilamida ya seco, se puso a exponer durante toda la noche en una pantalla, después de trascurrido el tiempo se visualizó en el Phophor-Imager

Para verificar la actividad de fosfatasa de estas muestras. Cada muestra por separado fueron sometidas a pruebas con p-NPP, como se explico anteriormente en materiales y métodos.

RESULTADOS**Amplificación por PCR del fragmento PvPPTP.**

Los oligonucleótidos que se diseñaron son complementarios a ambas cadenas del cADN molde; además, de no ser complementarios entre sí, esto es para evitar la formación de estructuras multiméricas que pudieran generar artificios durante su amplificación con sitios de restricción. Estos oligonucleótidos amplifican un fragmento de ~1000pb. (Figura 5). Este fragmento se cortó del gel y posteriormente se purificó por el método de Glass Select (Materiales y Métodos).



El producto de la purificación se mandó a la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM. Se secuenció por el método Fluorescente de DNA Automatizado (Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing). En la Figura 6, se muestran las secuencias nucleotídica y proteica obtenidas, que constan de un marco de lectura abierto de 1002 bases que codifica para una proteína predicha de aproximadamente

333 aminoácidos. Como se observa, el fragmento marcado con una línea de color azul señala el sitio catalítico (HCxxGxxR) que va del aminoácido 263 al 272 y las líneas en amarillo muestran las secuencias presentadoras (WPD y KNRV) del aminoácido 86 al 90 y del 231 al 233 respectivamente; estas secuencias son exclusivas de miembros de la familia de las fosfatasas.

10	20	30	40	50	60	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
ATGGACGGCA	ACCCACCAC	CAC ^T TCC ^T CC ^T	TCCCGCATC	CTCCCGTGA	TTTCAATTTC	60
M D G N	P T T	T S S	S A S P	P V N	F N F	
TCCCCGATA	AGCCCTCCC	AATCACCCTC	ACTCGGGATC	AGGTCAGCCA	CTGCCGCCAA	120
S P F N	P S P	T L T L	T A D Q	V S H C	C C Q	
GCCCTCAACC	TTTGAAGGA	AAAAC ^T CCAC	GC ^T CC ^T CACA	CCATCATCG	GGAGTTCGCA	180
A L N L	L K E	K L H	A P H T	I T R	E F A	
CACTTGCAGG	CTAACAGAAT	AACCGCGAGT	GAGATGAGGA	GAAGATGCAC	CGTCGCCTTT	240
H L Q A	N R I	T P S	E M R R	R C T	V A L	
GACGCGTCA	ATTGAGCAA	AAACCGATAC	ACGGACGTTT	TGCCAATTGA	CAGTAACAGG	300
D A V N	L S K	N R Y	T D V L	P F D	S N R	
GTTGCTCTCA	AATCGAGTAC	AGATTATAGA	CCTGCAGCAC	AGGGGTATAT	CAATGCAAGC	360
V A L K	S S T	D Y R	P A A Q	G G Y 1	N A S	
TTGGTCTCGA	CCTCCCTCCC	TGGAAACGTG	TCACAGTTTG	TAGCCACACA	AGGTCCACTT	420
L V S T	S S P	G N V	S Q F V	A T Q	G P L	
CCACATACTT	ATGAAGATTT	CTGGGAGATG	A ^T TAT ^T CAAT	ATCACTGCC	TGCAATTATC	480
P H T Y	E D F	W E M	I I Q Y	H C P	A I I	
AJGCTTACAA	GGTGGTGGGA	TAAT ^T ATAAG	A ^T GGIAAAGT	GTGGAGATTA	TTTCAAGCG	540
M L T R	L V D	N Y K	M V K C	G D Y	F Q A	
GAGGACGGAC	CTAGAGAAGT	TGGTAATATT	TCTGTTATTG	GTAATGGGT	GAACACTACC	600
E D G P	R E V	G N I	S V I G	K W V	N T T	
GAAACTTCAT	TGGTCTGCG	CCITTTAGAG	GTGAACCATA	GAGAGCTAGA	AGATGCTCCA	660
E T S L	V L R	L L E	V N H R	E V E	D A P	
ATATCTGTJT	TGCATATCA	GTATCTGAG	TGGCCTGACC	AGGATPTCC	CAAAGATACA	720
I S V L	H I Q	Y P E	W P D H	G V P	K D T	
TTAGCTGTCG	GTGAATTTT	GAAAAAGATTA	TACCA ^T TTAC	CACCAAACTT	TGGTCCAATA	780
L A V R	E I L	K R L	Y H L P	P N L	G P I	
GTTGTTCACT	CGAGTGCAGG	TATTGGTAGA	ACTGGAACAT	ACTGCACAAT	TCACAACACA	840
V V H C	S A G	I G R	T G T Y	C C T I	H N T	
AITCAGAGAA	TACTTGCTGG	TGATATGTCT	GCTGTAGATA	TTGCTAACAC	AGTATCTGTG	900
I Q R I	L A G	D M S	A V D I	A N T V	V S V	
TTCAGGGCCC	AGCGTATTGG	AATGGTTCAG	ACCCAGGATC	AGTACATTTT	CTGCTATAAA	960
F R A Q	R I G	M V Q	T O D Q	Y I F	C Y K	
GCCATCATAG	ATGAACTGGA	AGACCTTGTA	TCTCAGCAGT	AG		1002
A I I D	E L E	D L V	S Q Q			

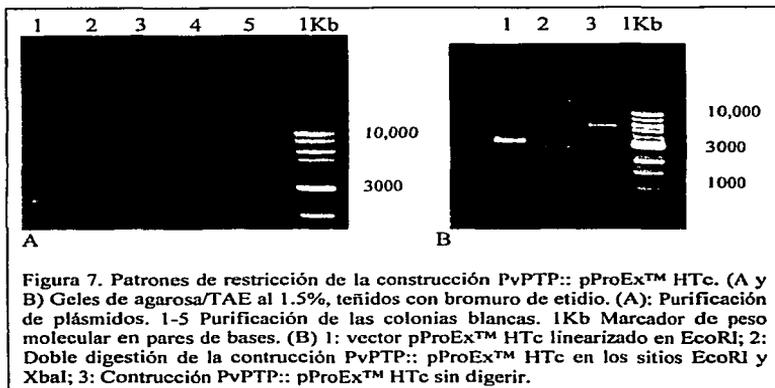
Figura. 6 Secuencia nucleotídica y proteica deducida, la secuencia nucleotídica corresponde a 1002pb, con un marco de lectura abierto que codifica para una proteína de 333 aminoácidos. Los fragmentos señalados con amarillo indican las secuencias presentadoras y la banda azul señala el sitio catalítico. En la secuencia se suprimieron los sitios de corte de endonucleasas presentes en los productos de PCR.

Clonación del cADN PvPTP en un vector de expresión

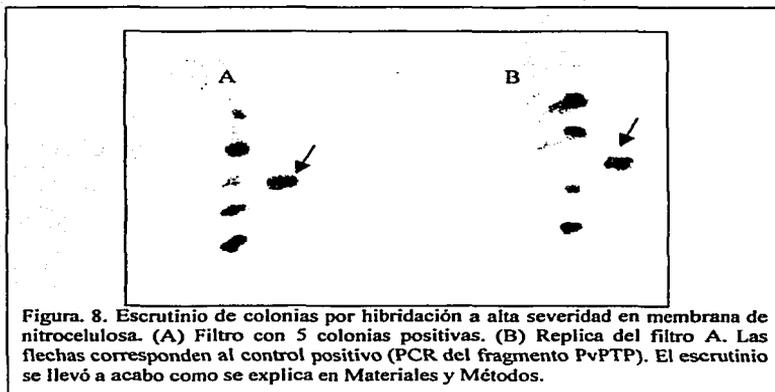
Con el objetivo de obtener evidencia de que este cADN codifica para una proteína funcional, el fragmento de PCR se purificó por el método de Glass Select y se ligó al vector de expresión bacteriano pProEx™ HTc (Materiales y Métodos). Con la construcción PvPTP:: pProEx™ HTc se transformaron células DH5 α electrocompetentes como se explica en Materiales y Métodos. Las colonias resultantes fueron 15 colonias blancas y 20 colonias azules; el color blanco nos indica la interrupción del gen *lacI^a* por el fragmento PvPTP que integramos al vector de expresión bacteriano.

La presencia del gen en las colonias blancas, se verificó por patrones de restricción de ADN plásmidico aislado. En la Figura 7A, se observan tres bandas de restricción; la primera se debe al ADN súper-enrollado bacteriano; la banda de ~6000pb pertenece a la construcción PvPTP:: pProEx™ HTc.

Para liberar el fragmento PvPTP de la construcción, se buscaron los sitios de restricción más próximos EcoRI y XbaI. La construcción fue digerida por estas enzimas de restricción como se explica en Materiales y Métodos. En la Figura 7B, se observa una banda de ~1000pb, que corresponde al fragmento PvPTP y otra banda de ~4700pb, que corresponde al vector linearizado.



A las colonias con la construcción PvPTP:: pProEx™ HTc verificadas por medio de la doble digestión por endonucleasas, se les realizó un escrutinio en colonia por hibridación a alta severidad, obteniendo cinco colonias positivas (Figura8). El ADN plasmídico de estas bacterias se mandó a secuenciar para verificar si el gen PvPTP quedó en fase con el marco de lectura abierto.



Esta secuencia revela que el sitio de termino está después de donde se termina el fragmento PvPTP, lo que significa que la proteína que se transcribe es más pesada de lo esperado; el peso calculado de la proteína para esta secuencia es de ~41KDa.

Obtención y alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las PTPs.

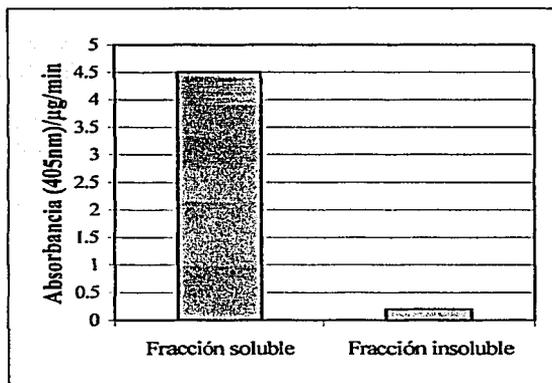
Con el objetivo de obtener un análisis de identidad de la proteína PvPTP se realizó una búsqueda tipo BLASTp con la secuencia de PCR traducida a aminoácidos dándonos así la proteína hipotética PvPTP. Esta secuencia se analizó en la base de datos no redundantes del GenBank CDS translations, PDB, SwissProt, PIR y PRF. La matriz de sustitución utilizada fue BLOSUM62 (Gap: Existencia 11, Extensión 1), el total de este análisis fueron 722 secuencias. El resultado de esta búsqueda se resume en la Tabla 21; en ella sólo se muestran aquellas secuencias que están completas y que presentan una identidad mayor a 30%.

Tabla. 21 Secuencias similares a la proteína PvPTP1.							
No. De acceso	Especie	Proteína	No.aa	E-Value	% identidad	% similitud	% Gap
CAA06975.1	<i>Glicine max</i>	Fosfatasa de tirosina 1 (GmPTP)	338	e-169	89%	93%	-
CAA06615.1	<i>Pisum sativum</i>	Fosfatasa de tirosina (PsPTP)	332	e-140	77%	86%	-
NP_177331.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Fosfatasa de tirosina (AtPTP1)	340	e-127	68 %	82%	0%
T51846	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Fosfatasa de tirosina (validada) (AtPTP2)	340	e-126	67%	81%	0%
XP_006789.4	<i>Homo sapiens</i>	Fosfatasa de tirosina, receptor tipo, B (HsPTPB)	1997	2e-36	35%	55%	11%
NP_033004.1	<i>Mus musculus</i>	Fosfatasa de tirosina, no-receptor tipo 20 (MmPTP20)	426	7e-37	32%	51%	8%

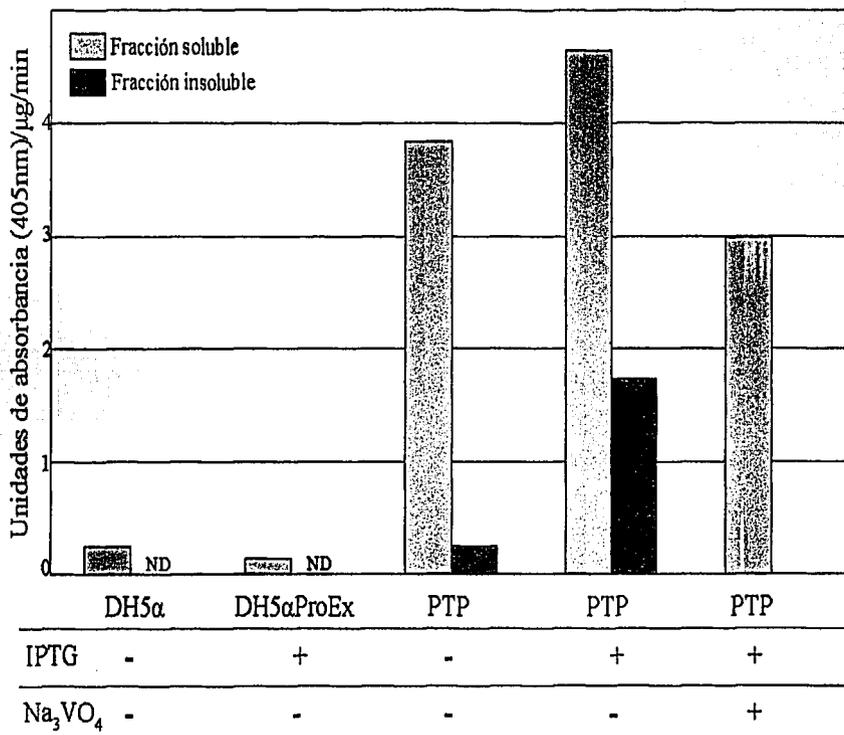
Con el objetivo de determinar la relación entre las secuencias de plantas se realizó una alineación múltiple mediante el programa CLUSTAL W versión 1.4. En la Figura 9 se muestra el resultado del alineamiento múltiple; el residuo que está marcado con azul es el sitio activo de la actividad de fosfatasa (HCxxGxxR) y los sitios presentadores (WPD y KNRV) que son los están señalados con amarillo. Como se observa en la Figura 9, existe una alta identidad entre las fosfatasas de tirosina, diferenciándose casi exclusivamente en los extremos amino y carboxilo. La identidad más alta la tienen las fosfatas de tirosina de *Glicine max* (GmPTP) con 89% y de *Pisum sativum* con 77%, con respecto a la fosfatasa de tirosina de *Phaseolus vulgaris* (PvPTP).

Actividad de fosfatasa de la clona PvPTP.

Con el objetivo de determinar la localización de la proteína recombinante y verificar la funcionalidad de ésta. Se hicieron extracciones proteicas con detergente y sin detergente en condiciones naturalizantes (Materiales y Métodos), separando por centrifugación fracciones citoplasmáticas y membranales. Estos extractos fueron sometidos a un ensayo de actividad de fosfatasa con p-nitrofenilfosfato (pNPP) como se explica en Materiales y Métodos, dando como resultado una actividad del 95% en la fracción soluble, con respecto a la actividad de ambas fracciones, como se muestra en la Gráfica 1. Esto nos indica que nuestra proteína PvPTP está en la fracción soluble de este extracto. Para verificar la funcionalidad de la PvPTP se realizó una prueba de inhibición con ortovanadato de sodio (Gráfica 2) a una concentración 0.1mM.



Gráfica 1. Actividad de fosfatasa con pNPP en diferentes fracciones celulares bacterianas.



Gráfica. 2. Inhibición y actividad de fosfatasa con p-NPP en diferentes fracciones celulares. El ortovanadato de sodio (Na₃VO₄) se usó a una concentración de 0.1mM. *E. coli* DH5α, cepa bacteriana sin la construcción PvPTP:: pProEx™ HTc; *E. coli* DH5αProEx, cepa bacteriana con el vector pProEx™ HTc; PTP, es la proteína PvPTP sin purificar ND, No determinado. Se usó una concentración de 40 µg de proteína total. La reacción se llevó a cabo durante 20 min, a 37°C.

Inducción y purificación de la proteína recombinante.

Inducción

Para verificar la expresión de la proteína de fusión de la construcción PvPTP::pProEx™ HTc, se realizó una curva de inducción con IPTG. Tomando una alícuota a diferentes tiempos de inducción analizándolos por electroforesis (Materiales y métodos), el gel de acrilamida correspondiente a la inducción y fracciones de purificación de la proteína PvPTP se observa en la figura 10. La expresión de la proteína recombinante es diferencial en cuanto al tiempo. Las bacterias que no fueron sometidas a inducción presentan un mínimo de expresión; después de una hora de inducción por IPTG, encontramos un 20% de la expresión de la proteína PvPTP con respecto al nivel máximo de expresión a cuatro horas que es del 90%. En datos no mostrados, se hicieron análisis de seis horas, sin embargo su expresión, sólo aumentaba un 10% con respecto a la concentración proteica total de las bacterias de 4hrs.

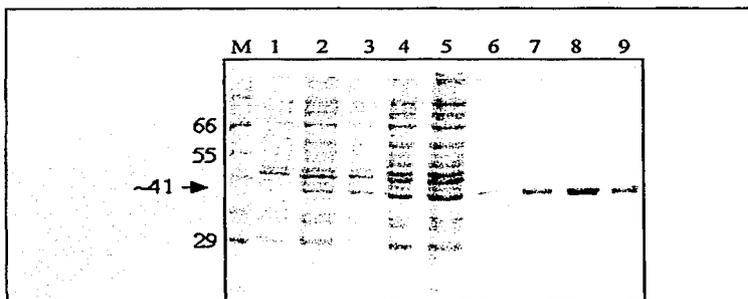
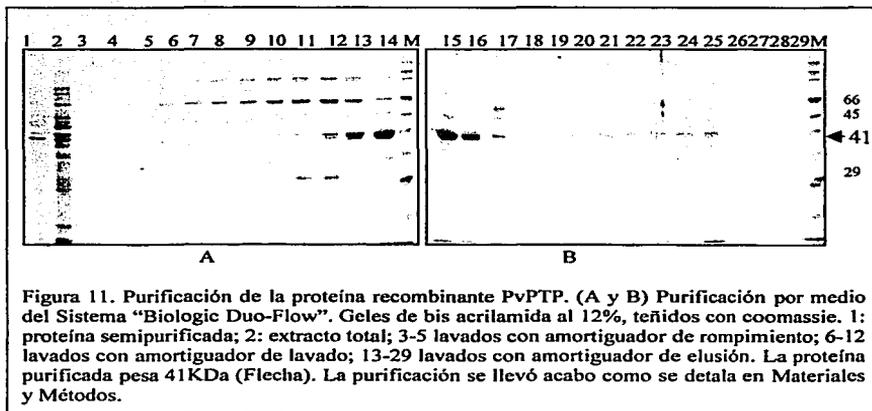


Figura. 10. Inducción y purificación de la proteína PvPTP. Gel de bis-acrilamida al 12%. Teñido con azul de coomassie. (M) Marcador de peso molecular en KDa; (1) Extracto total bacteriano sin inducir; (2) Extracto total bacteriano con 1 hora de inducción; (3) Extracto total bacteriano con 2 hrs. de inducción; (4) Extracto bacteriano total con 4 hrs. de inducción; (5) Extracto total bacteriano soluble con 4 hrs. de inducción; (6,7,8,9) Diferentes fracciones de purificación.

Purificación de la proteína PvPTP.

La proteína recombinante que se genera a partir del vector de expresión bacteriano pProEx™ HTc presenta una secuencia de 6 Histidinas en el amino terminal, esta secuencia permite la purificación de la proteína de fusión por una cromatografía de afinidad. La proteína PvPTP fue inducida en bacterias, y posteriormente la proteína fue purificada de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos.

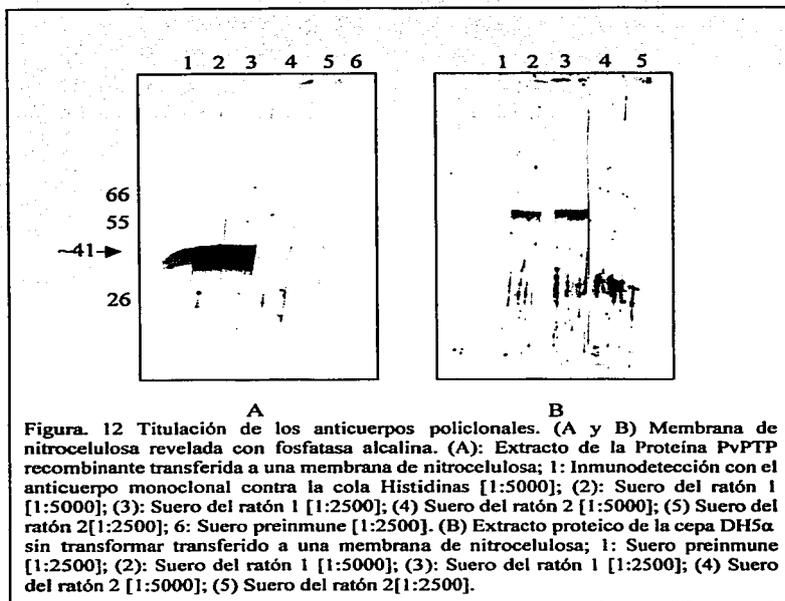
Las diferentes fracciones de purificación de la proteína recombinante PvPTP se sometieron a una electroforesis que se muestran en la figura 11. En las fracciones 6-12, se denota la liberación de la proteína PvPTP junto con proteínas que interaccionan inespecíficamente con la columna de afinidad, esto se debe a la concentración de Imidazol utilizada. La mayor cantidad de proteína PvPTP sale en las fracciones 13-16 junto con proteínas contaminantes, es debido quizá a que la concentración de Imidazol del amortiguador de lavado no fue la adecuada para quitar las interacciones inespecíficas. La proteína PvPTP pura sale en las fracciones 18-25, estas muestras se corrieron de nuevo en otro gel de acrilamida (Fig. 10) para verificar la cantidad de proteínas contaminantes. En las Figuras 10 y 11, observamos una proteína de 41 KDa, este peso es mayor al esperado (36 KDa), debido a que la proteína recombinante tiene una secuencia de 6 Histidinas en el amino y un fragmento del vector. Se hizo un ensayo tipo "Western-blot" (Fig. 13) con el objetivo de verificar que la proteína purificada reaccionara con el anticuerpo monoclonal que reconoce a la cola de 6 Histidinas. El resultado obtenido muestra una banda de 41KDa que coincide con la banda de la proteína purificada.



Generación de anticuerpos policlonales contra la proteína PvPTP

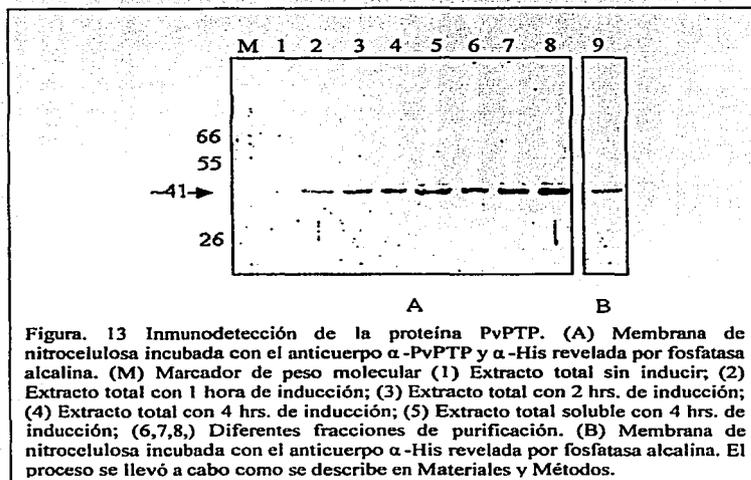
La proteína purificada se corrió en un gel de acrilamida al 10% y la banda de 41KDa correspondiente a la PvPTP, fue inyectada junto con un adyuvante a ratones Bal-BC para obtener anticuerpos contra la proteína PvPTP (Materiales y Métodos). Después de tres inmunizaciones los ratones fueron sacrificados obteniendo el suero sanguíneo, el cual se purificó de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos.

Para determinar la concentración adecuada de los anticuerpos a utilizar en ensayos posteriores, se realizó una electrotransferencia e inmunodetección de la proteína PvPTP utilizando el suero obtenido de los ratones. En la Figura12 podemos observar la titulación de los anticuerpos generados por el ratón 1 (R1) y el ratón 2 (R2) utilizando diferentes concentraciones de cada ratón.



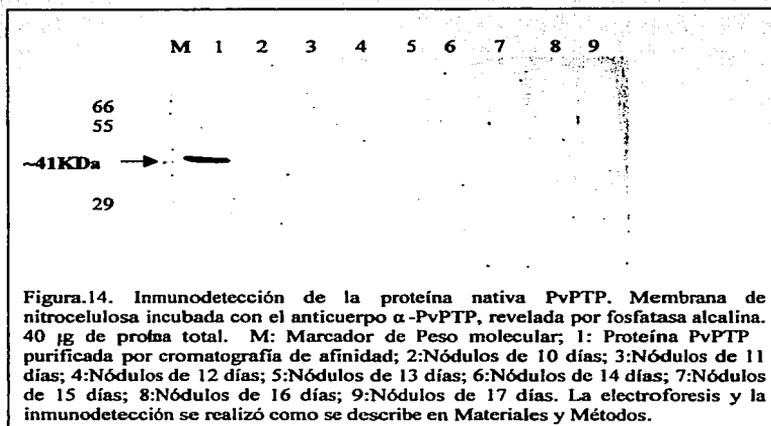
El suero obtenido del ratón 1 a una concentración de 1:2500 (Figura 12, panel A, carril 3), es suficiente para que los anticuerpos policlonales reconozcan específicamente a una banda de 41 KDa. Esta banda también es reconocida por los anticuerpos monoclonales que identifican la secuencia de 6 Histidinas (panel A, carril 1). Para verificar que la proteína cluída por la cromatografía de afinidad es reconocida por los anticuerpos policlonales generados (α -PvPTP), se realizó una electrotransferencia e inmunodetección como se explica en Materiales y Métodos. En la Figura 13 se muestra la inmunodetección con el suero probado α -PvPTP, que proviene del ratón 1. La banda que reconoce el suero coincide con la proteína de 41KDa que coincide con la proteína que se induce y se purifica

en la cromatografía. Esta banda también es reconocida por el anticuerpo α -His, lo que significa que la proteína purificada es reconocida por los anticuerpos generados.



Detección de las PTPs en nódulos de frijol.

Con el objetivo de detectar la PvPTP nativa en nódulos de frijol, se extrajeron proteínas totales de nódulo de diferentes días, estas muestras se corrieron en un gel desnaturalizante y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa como se explica en Materiales y Métodos. En la Figura 14, se muestra la inmunodetección de la fosfatasa nativa en extractos proteicos de nódulos de diferentes días de desarrollo; esta membrana se incubó con el anticuerpo. En la Figura 14, se muestra que el suero α -PvPTP sólo identifica a la proteína recombinante y no a la proteína nativa. Esto se debe probablemente, a que la proteína nativa tiene cantidades basales muy bajas o que la expresión de esta proteína sólo se induce bajo algún estímulo o estrés y no en condiciones óptimas como lo es cultivo en invernadero controlado.

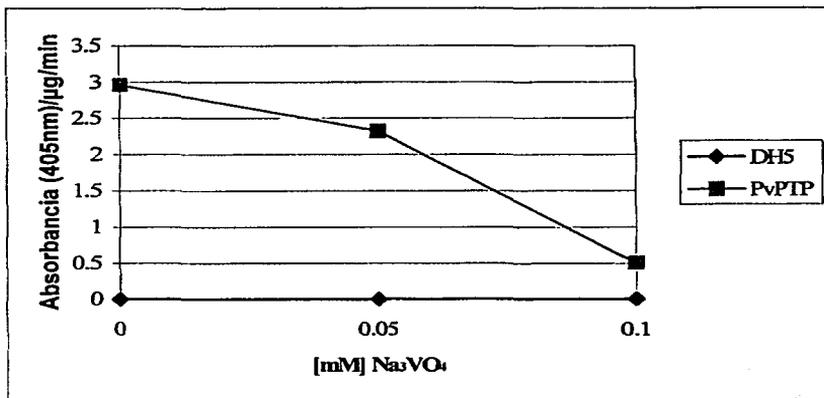


Inhibición de la actividad de fosfatasa.

En experimentos no mostrados se verificó la actividad de fosfatasa en presencia de Fluoruro de sodio (NaF); este compuesto es inhibidor de fosfatasas duales, es decir, inhibe fosfatasas que defosforilan proteínas en residuos de Serina/Treonina y Tirosina. Esta inhibición no ocurre en fosfatasas específicas de Tirosina. La proteína PvPTP, no se inhibe en presencia de este compuesto lo que confirma que la proteína es probablemente específica de tirosina.

Para verificar que la actividad de fosfatasa de PvPTP es específica de Tirosina (Y), se hicieron experimentos de inhibición con la proteína PvPTP purificada. La actividad de fosfatasa se realizó con el sustrato genérico p-NPP como se explica en Materiales y Métodos. En la Gráfica 3, se muestra la inhibición de la actividad de fosfatasa con diferentes concentraciones de ortovanadato de sodio (Na_3VO_4). La actividad basal del extracto bacteriano sin el vector de expresión es nula. En cambio la actividad de la proteína PvPTP se inhibe al 30% con una concentración de 0.05mM de Na_3VO_4 ; pero con 0.1mM

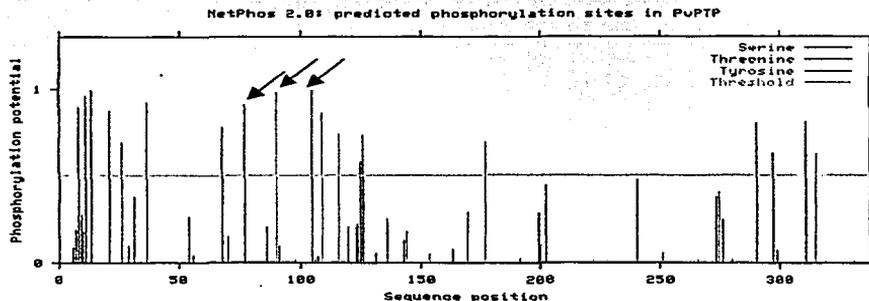
de Na_3VO_4 se inhibe hasta un 90%, lo que significa que la proteína PvPTP es específica de tirosina. En un experimento alterno a éste, se comprobó la pérdida total de la actividad de fosfatasa con 1mM de Na_3VO_4 .



Gráfica. 3 Inhibición de la actividad de fosfatasa con ortovanadato de sodio (Na_3VO_4).

Análisis de posibles sitios de fosforilación.

Con el objetivo de determinar los posibles sitios de fosforilación de la secuencia PvPTP, la secuencia fue sometida al programa NetPhos Versión 2.0.



Figural 5. Reporte de los posibles sitios de fosforilación de la secuencia PvPTP.

En la Figura 15, se muestra el reporte del programa NetPhos 2.0, en el que se observa que hay una alta posibilidad de que esta proteína sea fosforilada en residuos de tirosina (Y) los cuales están marcados en rojo; en residuos de Treonina (T) que están en verde y/o en residuos de Serina (S) que están en azul. Para verificar si estos sitios son reconocidos por cinasas ya reportadas, la secuencia PvPTP se sometió a un análisis en el programa PROSITE versión 17.7. los resultados se reportan en la Tabla 22.

No. De acceso	Cinasa	Secuencia que reconoce
PDOC00004 PS00004	Cinasa dependiente de nucleótidos cíclicos.	OCT
PDOC00005 PS00005	Cinasa tipo C (PKC)	SNR

En la Figura 16, se muestra un alineamiento de varias fosfatasa de tirosina. En amarillo se marca el sitio catalítico, en gris las secuencias presentadoras, en verde el posible sitio de fosforilación por cinasas dependientes de nucleótidos cíclicos, y en rosa el posible sitio de fosforilación por una PKC.

Para determinar si estos sitios están expuestos en la proteína, se diseñó una estructura tridimensional (3D) de la proteína PvPTP en el programa Cn3D versión 3.0 (Hongue, 1997); esta estructura se formó tomando como molde a la proteína PTP1B. Estas proteínas presentan una identidad del 31% entre sí. En la Figura 17, se presenta la proteína 3D generada con los posibles sitios de fosforilación en verde para el caso de cinasas dependientes de nucleótidos cíclicos y en rosa para una cinasa C. El sitio catalítico está marcado en azul y los presentadores en amarillo.



Figura 17. Estructura 3D de la proteína PvPTP. El sitio señalado en verde representa el posible sitio de fosforilación por cinasas dependientes de nucleótidos cíclicos; el sitio en rosa representa el posible sitio de fosforilación por una cinasa C. El segmento señalado en azul es el sitio catalítico y las bandas en amarillo son los sitios presentadoras. Estructura generada a partir de la estructura de PTP1B. Diseñada en el programa Cn3D versión 3.0 (Hongue, 1997).

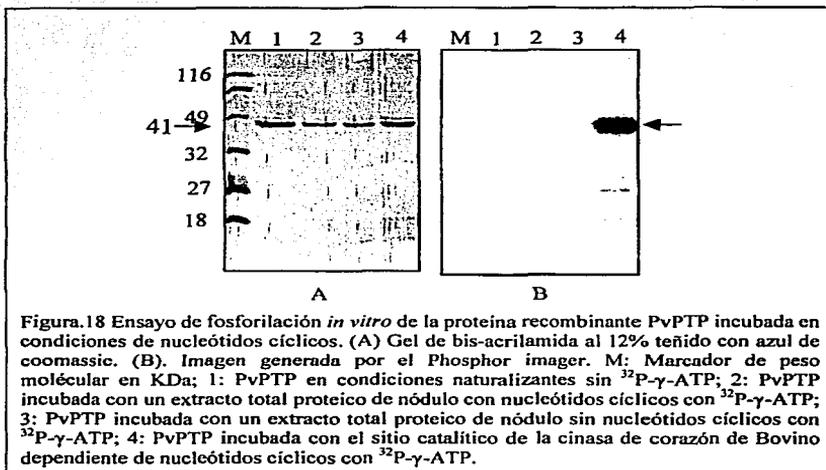
Como se observa en la Figura 17, los sitios posibles de fosforilación se encuentran expuestos, es decir, estas secuencias están en la superficie de la proteína y tienen una gran posibilidad de ser fosforiladas.

Ensayos de fosforilación *in vitro*.

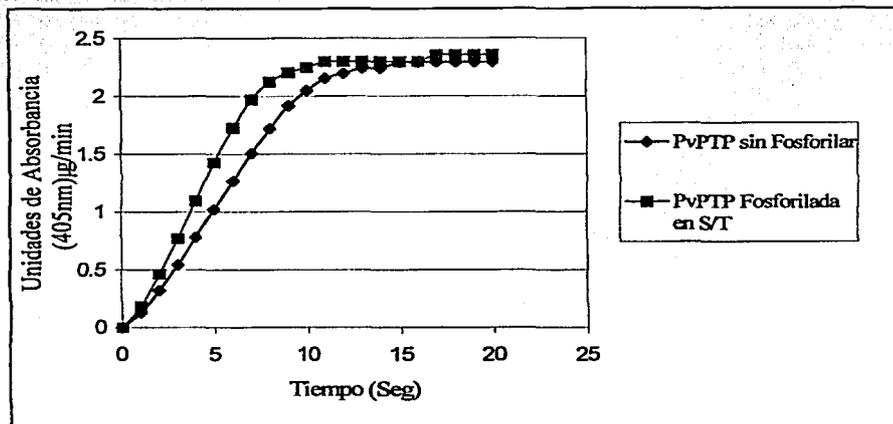
Para corroborar que la proteína PvPTP es capaz de ser fosforilada por cinasas de tirosina (TK) o por cinasas dependientes de nucleótidos cíclicos (cNK), se realizó un ensayo de fosforilación *in vitro* con ^{32}P - γ -ATP, como se explica en Materiales y Métodos la proteína se fosforiló bajo condiciones de actividad de TK y cNK.

Este proceso consiste, en que las cinasas nativas de un extracto proteico total de nódulo fosforilen a la proteína PvPTP y para determinar que la proteína PvPTP es fosforilada por cNK, se utilizó el sitio catalítico de una cinasa dependiente de nucleótidos cíclicos de corazón de Bovino; este sitio catalítico se encuentra activo constitutivamente y no requiere de sales o cualquier otro compuesto lo cual lo convierte en un buen control.

En la Figura 18B, se muestra una señal radioactiva, ésta banda corresponde a la proteína PvPTP que tienen integrado un fósforo marcado radioactivamente (^{32}P - γ -ATP); esta fosforilación se debe a que el sitio catalítico de la cinasa dependiente de nucleótidos cíclicos integrada a la reacción reconoció la secuencia RRCT y transfirió un fósforo marcado.



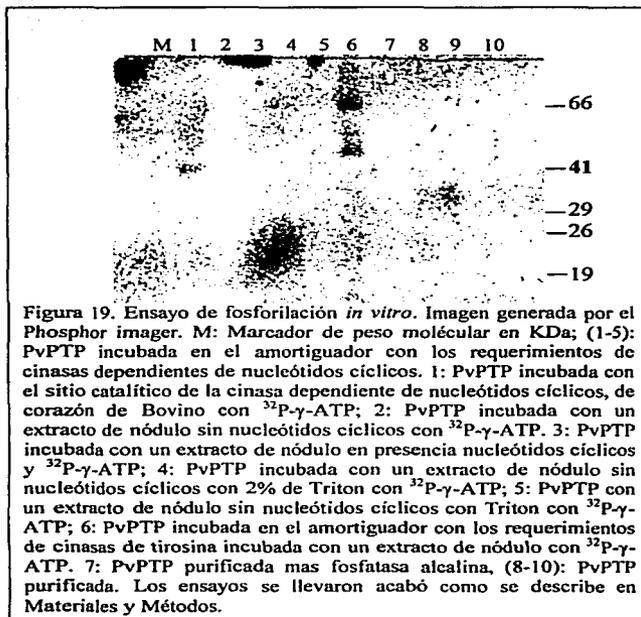
A la proteína PvPTP fosforilada y purificada se le realizaron pruebas de fosfatasa con el sustrato genérico p-NPP para observar si la fosforilación interviene en la capacidad de degradación del sustrato. En la Gráfica 4, se muestra que la actividad de la proteína PvPTP fosforilada aumenta hasta un 50% a comparación de la proteína PvPTP sin fosforilar.



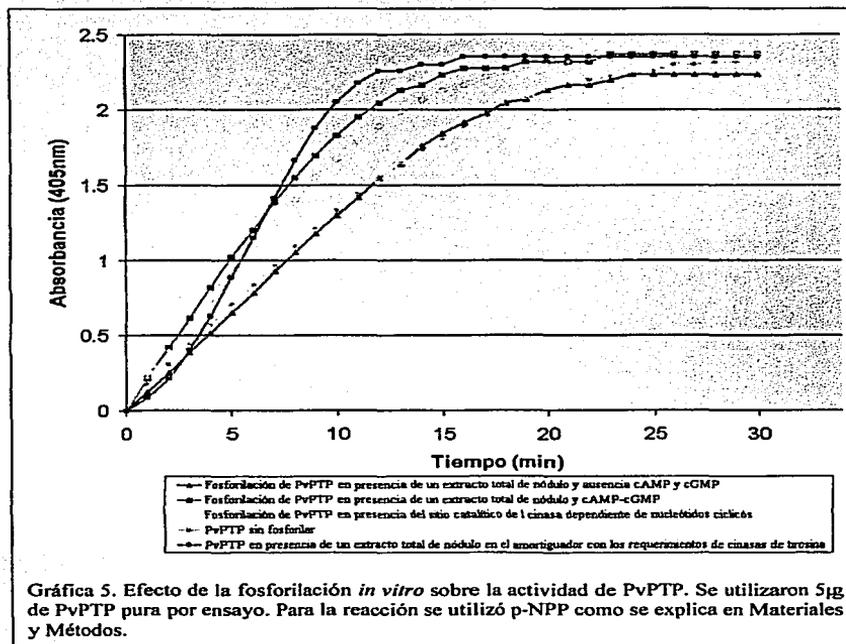
Gráfica. 4. Actividad de fosfatasa con p-NPP de la proteína PvPTP sin fosforilar y fosforilada por el sitio catalítico de la cinasa dependiente de nucleótidos cíclicos de corazón de Bovino. Los ensayos se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos.

Para verificar que la proteína PvPTP puede ser fosforilada en diferentes condiciones se realizaron varios ensayos de fosforilación *in vitro*, basándose en el reporte de Prosite 17.7. Los ensayos de fosforilación se hicieron bajo los requerimientos de cinasas dependientes de nucleótidos cíclicos (Figura 18) y cinasas de tirosina (Figura 19), incubando la PvPTP que esta acoplada a la resina de Níquel con un extracto proteico de nódulos de trece días. El ensayo se llevó a cabo como se reporta en Sambrooks *et al*, 1989.

A la proteína fosforilada y purificada, se le realizó un ensayo de actividad con p-NPP, para observar si la actividad de fosfatasa es diferencial en cuanto a la condición en la que la proteína PvPTP fue fosforilada. Como se muestra en la Gráfica 5, la actividad de fosfatasa aumenta cuando la proteína está fosforilada en diferentes condiciones, pero, la mayor actividad de fosfatasa se tiene cuando la proteína PvPTP está fosforilada en el amortiguador con los requerimientos de cinasas de tirosina.



En la figura 19 se observa la fosforilación de una banda única de la PvPTP purificada en el amortiguador con los requerimientos de cinasas dependientes de nucleótidos cíclicos. Cuando la PvPTP es purificada en el amortiguador en las condiciones de cinasas de tirosina, se observan dos bandas de mayor peso molecular, una de aproximadamente 66KDa y otra de 45KDa.



Las actividades de fosfatasa de la PvPTP purificada en diferentes condiciones de fosforilación se observan en la Gráfica 5.

DISCUSIÓN.

Las PTPs son proteínas cuyo papel es fundamental en diversos procesos celulares tales como el desarrollo, la mitosis, el crecimiento, etc. En modelos animales se han descrito diversos procesos en los que las PTPs desempeñan un papel fundamental, tales como la proliferación, la diferenciación o la muerte celular. La deficiencia de este tipo de proteínas causa un sin fin de enfermedades en sistemas eucarióticos, como el cáncer, la apoptosis celular, las mutaciones, las deficiencias fisiológicas, etc. (Bardfor *et al.*, 1998; Cohen, 1992; Hubbard y Till, 2000).

Las fosfatasa presentan una alta similitud entre sí, y esto se debe a que los sitios HCxxGxxR (sitio catalítico de cualquier fosfatasa), WPD y KNRY (sitios presentadores) están altamente conservados en animales (Cohen, 1992; Andersen *et al.*, 2001; Bradford *et al.*, 1994). Además, estos tres fragmentos tienen un papel crucial dentro de la actividad de fosfatasa (Bardford, 1994). Cualquier mutación en estas secuencias, causa que la actividad de fosfatasa disminuya o se pierda por completo (Barford *et al.*, 1994; Cohen, 1992; Tonks, 2001).

La interacción de la fosfatasa de tirosina con su sustrato, está dada principalmente por el grupo cistenil que se presenta en el sitio catalítico (Cistenil 783 en el caso de PvPTP). Esta interacción se ve complementada por la presencia de los sitios presentadores como el WPD (aminoácidos 231-233) y el KNRY (aminoácido 86-90), donde la presencia del cistenil en el primer caso y el aspártico, son determinantes para la capacidad de reconocer y apresar el sustrato para que este sea defosforilado. Tanto la posición, así como la orientación de las cadenas laterales de los aminoácidos que conforman los tres sitios de contacto, determinan la afinidad y la especificidad de los dominios (Barford, 1994; Cohen, 1992; Tonks, 2001). La conservación de estos tres residuos permite la sobreposición de esta secuencia con otras secuencias, y así observar la similitud que guarda con otras fosfatasas.

La utilización de técnicas en biología molecular nos permite aislar genes o fragmentos de ellos para su posterior análisis. La secuencia de la clona PvPTP fue aislada

de un banco de cADN de nódulos de frijol. Esta secuencia presenta un marco de lectura abierto de 1002pb, y codifica para una proteína de 333 aminoácidos.

Mediante el alineamiento de la secuencia PvPTP con otras secuencias reportadas previamente, se encontró que tiene una alta identidad con otras fosfatasa de tirosina de diversos organismos eucarióticos, de las cuales solo hay cuatro de plantas: con una identidad de 89% para la de *Glicine max* (GmPTP), con un 77% para la de *Pisum sativum* (PsPTP) y dos de *Arabidopsis thaliana* (AtPTP1 y AtPTP), con 68% y 67% respectivamente. Al igual que en animales, las secuencias proteicas en plantas guardan una similitud moderada, manteniendo conservados aquellos residuos que están involucrados en la interacción y en la actividad de fosfatasa.

Al realizar una búsqueda tipo Blastp para verificar la identidad con otras secuencias de eucariotes se encontraron 277 secuencias, que reconocieron a la secuencia de PvPTP; estas secuencias en su mayoría son fosfatasa de vertebrados (humano). Las proteínas más cercanamente relacionada con PvPTP fueron la de *Glicine max* con 89% de identidad y la de *Pisum sativum* con 77% de identidad.

El papel que desempeñan las PTPs en la célula vegetal está poco estudiado en comparación con células animales. Así por ejemplo, la expresión de PsPTP se observa diferencialmente durante el desarrollo embrionario de *Pisum sativum*. La expresión máxima se observa cuando las semillas solo tienen 8 días de edad y va declinando conforme la plántula va madurando ó, en caso de *Arabidopsis thaliana*, cuando se induce por estrés; sin embargo, aún no se ha determinado la presencia de la proteína y sobre todo la localización celular de la fosfatasa de ambos organismos.

Para determinar un posible papel de la proteína PvPTP en el proceso de nodulación, es necesario conocer el día en que se expresa mayoritariamente en tejidos de frijol y sobre todo si alguna característica ambiental es la que la hace expresarse; como por ejemplo, la interacción de *Rhizobium eli* con la planta o la gran cantidad de elicitors que intervienen en el reconocimiento de esto. También podría ser alguna clase de estrés osmótico o bien de

frio. También es necesario realizar un estudio sistemático para evaluar la expresión de esta proteína en condiciones de agobio biótico y abiótico pudiéndose determinar además su expresión espacio-temporal.

La actividad de fosfatasa de PvPTP es mucho más sensible a concentraciones bajas de inhibidores (0.05mM Na_3VO_4) que el reportado para otras fosfatasas (1mM Na_3VO_4 , para GmPTP) (Fordham-Skelton *et al.*, 1999).

El hecho de haber encontrado que la fosforilación de la PvPTP ocasiona un aumento de la actividad específica de la fosfatasa, hace aún más interesante su caracterización bioquímica. Cuando la fosforilación se realiza *in vitro*, cubriendo los requerimientos de cinasas de tirosina y/o cinasas dependientes de nucleótidos cíclicos, la actividad de fosfatasa de PvPTP cambia. Esta fosforilación permite que la degradación del sustrato sea mas rápido. La fosforilación de PvPTP podría localizarse en diferentes residuos. En el caso de cinasas de tirosina, la banda es mucho más pesada lo cual sugeriría que la banda pudiera no corresponder a la PvPTP. Pero esto sólo puede ser determinado, realizando una inmunolocalización con el anticuerpo policlonal contra esta proteína. Esta fosforilación podría deberse, a que cada tipo de fosforilación corresponde a una señalización específica, ya que dependiendo del estímulo que reciba podrían activar diferentes vías de señalización.

En el caso en donde la PvPTP es fosforilada por el sitio catalítico de cinasas dependientes de nucleótidos cíclicos, se observa un aumento en la rapidez de la actividad. Esto se confirma cuando la PvPTP es fosforilada en el amortiguador con los requerimientos para cinasas dependientes de nucleótidos cíclicos, obtenidas de un extracto total de nódulo. Aún así, la actividad de PvPTP es mayor cuando es fosforilada por cinasas nativas de nódulo, a comparación de cuando es fosforilada por el sitio catalítico. Esto podría deberse a que la PvPTP sirve mas como sustrato para las proteínas del nódulo que para el sitio catalítico comercial de bovino.

En base a las repeticiones de los experimentos de actividad de fosfatasa de PvPTP (cTK), PvPTP (cN) y PvPTP (sitio catalítico), incluso la fosfatasa sin fosforilar

determinamos que probablemente tienen la misma V_{max} , variando únicamente su K_m aparente. Esto corrobora que la fosforilación activa a la fosfatasa, haciéndola más activa por su sustrato.

La regulación de las PTPs es muy similar a la de MAPKs, las cuales requieren de diferentes estados de fosforilación Serina/treonina/tirosina para ser más o menos activas, lo cual sugiere que la PvPTP probablemente es fosforilada en diferentes condiciones, según la actividad que desempeñe en la célula. Para determinar las condiciones en las que está siendo fosforilada, es necesario utilizar varios extractos proteicos de diferentes partes de la planta.

Para conocer cuál es el aminoácido que se está fosforilando, se requiere la realización de una digestión ácida o por proteasas.

Este trabajo además de presentar por primera vez la caracterización de una fosfatasa de frijol, es el primer reporte en plantas de que estas enzimas pueden ser activadas por fosforilación por diversas cinasas y que esta fosforilación está dada probablemente *in vivo*, tanto por una cinasa dependiente de nucleótidos cíclicos, como por una cinasa de tirosina.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Conclusiones

- Se obtuvo un cADN que codifica para una fosfatasa de tirosina de *P. vulgaris* (PvPTP1) con una identidad del 89% con respecto a su ortólogo en *Arabidopsis* (PTPAT1).
- La proteína codificante es una fosfatasa de tirosina soluble, tipo específico.
- Esta fosfatasa es activada *in vitro* por fosforilación.
- La fosfatasa es activada probablemente *in vivo*, tanto por una cinasa dependiente de nucleótidos cíclicos, como por una cinasa de tirosina.

Bibliografía.

Akira S., Takeda K. y Kaisho T. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature*. 2(8):675-680.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K y Watson J. D. 1994. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publisher, New York-London.

Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Miller W. y Lipman D. J. 1997. Gapped BLAST y PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

Andersen J. N., Mortensen O. H., Peters G. H., Drake P. G., Iversen L. F., Olsen O. L., Jansen P. G., Andersen H. S., Tonks N. K. y Möller N. P. H. 2001. Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Mol cell Biol.* 21(21):7117-7136.

Ausubel F. M., Bert K., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A. y Struhl K. 1989. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York. Jhon Wiley and Sons.

Bardford D., Flint A. J. y Tonks N. K. 1994. Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci.* 91:1624-1627.

Barford D., Das A. K. y Egloff M. P. 1998. The structure and mechanism of protein phosphatases: Insights into catalysis and regulation. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 27:133-164.

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 22:248.

Brewin J. N. 1991. Development of legume root nodule. *Annu Rev Cell Biology.* 7:191-226.

Cohen P. 1992. Signal integration at the level protein kinases, protein phosphatases and their substrates. *Trends Biochem Sci.* 17:408-413.

Cheng H., Steinway M. L., Russell J. W. y Feldman E. 2000. GTPase and phosphatidylinositol 3-Kinase are critical for insulin-like Growth factor-I-mediated Schwann cell motility. *J Biol Chem.* 275(35):27197-27204.

Chernoff J., Shchivella A. R., Jost C. A., Erickson R. L. y Neell B. G. 1990. Cloning of cDNA for a mayor human protein tyrosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci.* 87:2735-2739.

Chiarugi P., Cirri P., Taddei L., Giannoni E., Camici G., Manao G., Raugi G. y Ramponi G. 2000. The low M_r protein-tyrosine is involved in Rho-mediated cytoskeleton rearrangement after integrin and platelet-derived growth factor stimulation. *J Biol Chem.* 275(7):4640-4646.

Dadke S., Kusari A. y Kusari J. 2001. Phosphorylation and activation of protein tyrosine phosphatase (PTP) 1B by insulin receptor. *Mol Cell Biochem.* 221:147-154.

Daum G., Levkau B., Chamberlain N. L., Wang Y. y Clowes A. W. 1998. The mitogen-activated protein kinase pathway contributes to vanadate toxicity in vascular smooth muscle cell. *Mol Cell Biochem.* 183:97-103.

Denu J. M. y Dixon J. E. 1998. Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Curr Op Chem Biol.* 2:633-641.

Desikan R., Clarke A., Atherfold P., Hancock J. T. y Neill S. J. 1999. Harpin induces mitogen-activated kinase activity during defence responses in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Planta.* 210:97-103.

Downie J. A. 1994. Signalling strategies for nodulation of legumes by rhizobia. *Trends Microbiol.* 2:318-324.

Echwald S. M., Bach H., Vestergaard H., Richelsen B., Kristensen K., Drisholm T., Borch-Johnsen K., Hansen T. y Pedersen O. 2002. Rapid publication: A P387L Variant in protein tyrosine phosphatase-1B (PTP-1B) is associated with type 2 diabetes and impaired Serine phosphorylation of PTP-1B in vitro. *Diabetes.* 51:1-6.

Ehrhardt D. W., Atkinson E. M. y Long S. R. 1992. Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science.* 256:998-1000.

Felle H. H., Kondorosi E., Kondorosi A. y Schultze M. 1995. Nod signal-induced plasma membrane potential changes in alfalfa root hairs are differentially sensitive to structural modifications of the lipochitoooligosaccharides. *Plant J.* 7(6):939-947.

Fiaschi T., Chiarugi P., Buricchi F., Giannoni E., Taddei M. L., Talini D., Cozzi G., Zecchi-Orlandini S., Raugi G. y Ramponi G. 2001. Low molecular weight protein-tyrosine phosphatase is involved in growth inhibition during cell differentiation. *J Biol Chem.* 276(52):49156-49163.

Fordham-Skelton A. P., Skipsey M., Eveans I. M., Edwards R. y Gatehouse J. A. 1999. Higher plant tyrosine-specific protein phosphatases (PTP's) contain novel amino-terminal domains: expression during embryogenesis. *Plant Mol Biol.* 39:593-605.

Forsberg J. y Allen J. F. 2001. Protein tyrosine phosphorylation in the transition to light state 2 of chloroplast thylakoids. *Photo Resech.* 68:71-79.

- Fry D. W. y Bridges A. J. 1995. Inhibitors of protein tyrosine kinases. *Curr Op Biotech.* 6:662-667.
- Guan J., Haun R. S., Jost C. A., Erickson R. L. y Neel B. G. 1990. Cloning of a cDNA for a major human protein tyrosine phosphatase. *Proct Natl Acad Sci.* 87:1501-1505
- Gutch M. J., Flint A. J., Keller A., Tonks N. K. y Hengartner M. O. 1998. The *Caenorhabditis elegans* Sh2 domain containing protein tyrosine phosphatase PTP-2 participates in signal transduction during oögenesis and vulval development. *Genes Dev.* 12:571-585.
- Hofman K., Bucher P., Falquet L. y Bairoch A. 1999. The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Res.* 27:215-219.
- Hongue C. W. V. 1997. Cn3D: a new generation of three-dimensional molecular structure viewer. *Trends Biochem Sci.* 22:314-316.
- Hubbard M. J. y Cohen P. 1998. The glycogen binding subunit of protein phosphatase 1G form rabbit skeletal muscle. *Eur J of Biochem.* 180:457-465.
- Hubbard S. R. y Till J. H. 2000. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem.* 69:373-398.
- Hunter H. 1995. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell.* 80:225-236.
- Ibarra Sánchez M. J., Simoncic P. D., Nestel F. R., Duplay P., Lapp W. y Tremblay M. 2000. The T-cell protein tyrosine phosphatase. *Sem Immu.* 12:379-386.
- Jhonson L. N., Noble M. E. M. y Owen D. J. 1996. Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell.* 85:149-158.
- Journet E. P., Pichon M., Dedie A., de Billy F., Truchet G. y Barker D. G. 1994. *Rhizobium meliloti* nod factors elicit cell-specific transcription of the ENOD 12 gene in transgenic alfalfa. *Plant J.* 6:241-249.
- Kameshita I. y Fujisawa H. 1996. Detection of protein kinase activities toward oligopeptides in sodium dodecyl-polyacrylamide gel. *Anal Biochem.* 237:198-208.
- Kameyama K., Kishi Y., Yoshimura M., Kansawa N., Sameshima M. y Tsuchia T. 2000. Tyrosine phosphorylation in plant bending. *Nature.* 407.
- Kelley L. A., MacCallum R. M. y Sternberg M. J. E. 2000. Enhanced Genome Annotation using Structural Profiles in the Program 3D-PSSM. *J. Mol. Biol.* 299(2):499-520.

- Klumpp S., Selke D., Fisher D., Baumann A., Muller F. y Thanis S. 1998. Protein phosphatase type-2 isozymes present in vertebrate retina: purification, characterization and localization in photoreceptors. *J Neurosci Res.* 51:328-338.
- Kovtun Y., Chiu W., Zeng W. y Sheen J. 1998. Suppression of auxin signal transduction by a Mapk cascade in higher plants. *Nature.* 395:716-720.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Leuroge P. 1994. Symbiotic host specificity between leguminous plant and rhizobia is determined by substituted and acylated glucosamine oligosaccharide signals. *Glycobiology.* 4(2):127-134.
- Levitzi A. y Gazit A. 1995. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science.* 267:1783-1788.
- Liang L., Lim k. L., Seow K. T., Ng C. H. y Pallen C. J. 2000. Calmodulin bind to and inhibits the activity of the membrane distal catalytic domain of receptor protein tyrosine phosphatase α . *J Biol Chem.* 275(39):30075-30081.
- Machama T., Taylor G. y Dixon. J. 2001. PTEN and myotubularin: novel phosphoinositide phosphatases. *Annu Rev Biochem.* 70:247-279.
- Medden T. L. Tatusov R. L. y Zhang J. 1996. Applications of network BLAST server. *Meth Enzimol* 266:131-141.
- Miskin J. E., Abrams C., Goatley L. C. y Dixon L. K. (1998) A viral mechanism for inhibition of the cellular phosphatase calcineurin. *Science* 281:562-565.
- Mourton T., Hellberg C. B., Burden-Gulley S. M., Hinman J., Rhee A. y Brady-Kalnay S. M. 2001. The PTP μ protein-tyrosine phosphatase binds and recruits the scaffolding protein RACK1 to Cell-Cell contacts. *J Biol Chem.* 276(18):14896-14901.
- Mylona P., Pawlowski K. y Bisseling T. 1995. Symbiotic nitrogen fixation. *The Plant Cell.* 7:869-885.
- Nam N. J., Poy F., Krueger N. X., Saito H. y Frederick C. A. 1999. Crystal structure of the tandem phosphatase domains of RPTP LAR. 97:449-457.
- Rosado J. A., Porras T., Conde M. y Sage S. 2001. Cyclic nucleotides modulated store-mediated calcium entry through the activation of protein-tyrosine phosphatases and altered actin polymerization in human platelets. *J Biol Chem.* 276(19):15666-15675.
- Sambrook J., Fritsh E. F. y Maniatis T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual 2th ed. Cold Spring Harbord Laboratory Press.

- Sarmiento M., Puius Y. A., Vetter S. W., Keng Y. F., Wu L., Zhao Y., Lawrence D., Almo S. y Zhang Z. 2000. Structural basis of plasticity in protein tyrosine phosphatase 1B Substrate Recognition. *Biochem.* 39:8171-8179.
- Shen S. H., Bastien L., Posner B. I. y Chretien P. (1991). A protein tyrosine phosphatase with sequence similarity to the SH2 domain of the protein tyrosine kinase. *Nature.* 352:736-739.
- Shenolikar S. 1994. Protein serine/threonine phosphatases-New avenues for cell regulation. *Annu Rev Cell Biol.* 10:55-86.
- Spaink H. P. 1992. Rhizobial lipo-oligosaccharides: answers and question. *Plant mol Biol.* 20:977-986.
- Stukey J. A., Schuber H. L., Fauman E. B., Zhang Z. G., Dixon J. E. y Saper M. A. 1994. Cristal structure of Yersinia protein tyrosine phosphatase at 25Å and the complex with tungstate. *Nature.* 370:571-575.
- Tanuma N., Nakurama K., Shima H. y Kikuchi K. 2000. Protein-tyrosine phosphatase PTPc C inhibits Jak-stat signaling and differentiation induced by interleukin-6 and leukemia inhibitory factor in leukemia cells. *J Biol Chem.* 275(36):28216-28221.
- Tartaglia M., Mehler E. L., Goldberg R., Zampino G., Brunner H. K., van der Burg I., Crosby A. H., Ion A., Steve J., Kalidas K., Patton M. A., Kucherlapati R. S. y Gelb B. D. 2001. Mutation in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nature genetics.* 772.
- Thompson J. D., Higgins D. G. y Gibson T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment throung sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* Submitted, June 1994.
- Tonks N. K. y Neel B. G. 2001. Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases. *Curr Op Cell Biol.* 13:182-195.
- Trojanek J., Ek P., Scoble J., Muszynska G. y Engström L. 1996. Phosphorylation of plant and identification of protein-tyrosine kinase activity in maize seedling. *Eur J Biochem.* 235:338-344.
- Umeyori H., Hayashi T., Inoue T., Nakanishi S., Mikishiba K y Yamamoto T. 1999. Involvement of protein tyrosine phosphatases in activation of the trimeric G protein Gq/11. *Oncogene.* 18(51):7399-7402.
- Vanable C. L., Frevert E. U., Kim Y. B., Fisher B., Kamatkar S., Nell B. G. y Kahn B. B. 2000. Overexpression of protein-tyrosine phosphatase-1B in adipocytes inhibits insulin-stimulated phosphoinositide 3-kinase activity without altering glucose transport or Akt/protein Kinase B Activation. *J Biol Chem.* 275(24):18318-18326.

Weaver Y. R. y Cossins A. R. 1996. Protein tyrosine phosphorylation and the regulation of KCl cotransport in trout erythrocytes. *Pfl Arch Eur J Physiol.* 432(4):727-734.

Wei Y., Bloom P., Gu R. y Wang W. 2000. Protein-tyrosine phosphatase reduces the number of apical small conductance K⁺ channels in the rat cortical collecting duct. *J Biol Chem.* 275(27):20502-20507.

Xu Q., Fu H. H., Gupta R. y Luan S. 1998. Molecular characterization of a Tyrosine-Specific protein phosphatase encoded by stress-responsive gene in *Arabidopsis*. *Plant cell.* 10:849-857.

Yaffe M. B. y Elia A. E. H. 2001. Phosphoserine/threonine-binding domains. *Curr Cell Biol.* 13:131-138.

Zang S-H., Roboyashi R., Graves P. R., Worms H. P. y Tonks N. K. 1997. Serine phosphorylation-dependent association of the band 4.1-related protein-tyrosine phosphatase PTPH1 with 14-3-3b protein. *J Biol Chem.* 272:27281-27287.

Zhai L., Zhao P., Penebra A., Guerreiro A. L y Khurana S. 2001. Tyrosine phosphorylation of villin regulates the organization of the actin cytoskeleton. *J Biol Chem.* 276(39):36163-36167.