



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

CLONACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA
PROTEÍNA FOSFATASA PP2C DE
Leishmania major

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

Q.F.B. ALMA REYNA ESCALONA MONTAÑO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA MAGDALENA AGUIRRE GARCÍA

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE, 2007



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.

Agradezco al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas la oportunidad de permitirme realizar mis estudios de Maestría.

El trabajo fue apoyado por CONACYT con el proyecto 45052-M y por DGAPA con los proyectos IN210602 e IN221606.

Durante los estudios de maestría se me otorgó una beca por CONACYT con número de registro 189788.

Agradezco de manera muy especial a mi comité tutorial: Dra. María Magdalena Aguirre García, Dr. Ruy Pérez Montfort y Dra. Gloria Soldevila Melgarejo.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunoparasitología del Departamento de Medicina Experimental, UNAM y con la colaboración del Laboratorio de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Sinodales:

Dra. María Magdalena Aguirre García
Dr. Ruy Pérez Montfort
Dra. Gloria Soldevila Melgarejo
Dra. Patricia Talamás Rohana
Dr. Guillermo Mendoza Hernández

AGRADECIMIENTOS

- Dra. María Magdalena Aguirre por ser mi guía en el camino de la investigación, por compartir conmigo su experiencia, conocimientos y por todo el apoyo incondicional, la confianza y las palabras de aliento en los momentos oportunos los cuales me hacen mantenerme firme y seguir adelante.
- Dr. Ruy Pérez Montfort por permitirme realizar parte del trabajo experimental en el laboratorio de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.
- Comité tutorial Dra, Gloria Soldevila Melgarejo, Ruy Pérez Montfort y María Magdalena Aguirre García por sus comentarios realizados en cada tutorial y por dedicar tiempo a la lectura y corrección de esta tesis.
- Nallely Cabrera por su apoyo técnico para la elaboración de este proyecto.
- Dra. Ingeborg Becker Fauser por permitirme ser parte de su equipo de trabajo.
- Dra. Laila Gutiérrez Kobeh por la revisión de la escritura de la tesis.
- M en C. Adriana Ruiz Remigio, Dra. Miriam Berzunza Cruz, Biol. Augusto Canto González y la M en C. Rocely Cervantes Sarabia por su apoyo técnico.
- Dra. Norma Salaiza Suazo por los ensayos de microscopía de fluorescencia.
- Marco Gudiño Zayas por la asesoría en la digitalización de las imágenes.
- Susana Saldaña Castañeda por su apoyo como auxiliar de laboratorio.
- A las secretarías Lucía Álvarez Trejo y Rosa Delgado por su apoyo.

DEDICATORIAS

- ✓ A Dios por permitirme concluir con una más de mis metas.

- ✓ A mis padres por el apoyo incondicional y la confianza que me han brindado. Los quiero mucho.

- ✓ A mis hermanos Juan Pablo, Silvia Elena, Juan Carlos y Luis Fernando por su cariño y momentos de alegría y enojos que hemos compartido juntos.

- ✓ A mis pequeñitos: Yahel Tonatiuh, Sergio Ituriel, Itzia Melanie por la luz que le han dado a mi vida.

- ✓ A la Familia Alanis Escalona por motivarme a seguir adelante.

- ✓ A mis abuelas por el cariño y apoyo.

- ✓ A las personas que han dejado de existir físicamente pero siempre estarán en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

A Adriana Ruiz, Iraís Villaseñor, Edith Fernández, Catalina Gayosso, Patricia Tovar, Rocely Cervantes, Cristina Cañeda, Ingrid García, Rocio Cabrera, Verónica Avilés, Minerva Mata, Lilia García, Beatriz Aguilar y Fabiola Chávez. Chicas les agradezco infinitamente el apoyo incondicional que siempre me han mostrado, por aconsejarme y enseñarme a ver las cosas de manera diferente y me ha quedado claro que puedo contar con ustedes en cualquier momento.

De manera muy especial a Adriana Ruiz e Iraís Villaseñor por su ayuda en la etapa final de este trabajo pues junto conmigo vivieron el estrés al cual estuve sometida. Sin su ayuda hubiera sido imposible terminar con este trabajo.

Lina Jiménez, Félix Flores, Susana Delgado, Paula Alanis, Adriana Rodríguez, Olga Montaña. Gracias por estar al pendiente de mi existencia.

Amigos: Raúl Vidal, Didier Cruz, Arturo Wilkins, Juan Espejel, Jesús Argueta, Daniel Pardavé, Germán Sánchez. Niños gracias por todos sus comentarios, por su ayuda que ha contribuido a que sea mejor persona, espero tener por siempre su amistad.

Amigas del laboratorio 201 Ote. del Instituto de Fisiología Celular, UNAM: Nallely Cabrera, Itzel García, Marilut Torres y Shendel González. Gracias por toda su ayuda, tips, compañía, consejos y palabras de aliento en los momentos difíciles que les tocó vivir junto a mí, por estar al pendiente de lo que pudiera necesitar, por hacer ligeras esas tardes en el laboratorio, por formar parte de esta historia que aún no ha terminado y por lo que aún falta. Mil gracias.

ÍNDICE

	Pág.
ÍNDICE	I
Lista de figuras	V
Lista de tablas	VII
Abreviaturas	VIII
Resumen	X
Abstract	XI
I. INTRODUCCIÓN	
1.1 Vías de señalización del macrófago moduladas por el parásito <i>Leishmania</i>	1
1.2 Fosforilación-desfosforilación.....	2
1.3 Proteínas tirosina fosfatasas (PTPs).....	3
1.4 Clasificación de las PTPs.....	4
1.5 Proteínas serina-treonina fosfatasas (PS/TP).....	4
1.6 PTPs y PS/TP en microorganismos infecciosos.....	5
1.6.1 Virus.....	5
1.6.2 Bacterias.....	6
1.6.2.1 <i>Yersinia</i>	6
1.6.2.2 <i>Bacillus subtilis</i>	6
1.6.2.3 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
1.6.2.4 <i>Prevotella intermedia</i>	7
1.6.2.5 <i>Streptomyces coelicolor</i>	7
1.6.3 Parásitos.....	7
1.6.3.1 <i>Ascaris suum</i>	7
1.6.3.2 <i>Entamoeba histolytica</i>	8
1.6.3.3 <i>Trypanosoma brucei</i> y <i>T. cruzi</i>	8
1.6.3.4 <i>Toxoplasma gondii</i>	9
1.6.3.5 <i>Leishmania</i>	9
II. JUSTIFICACIÓN	11
III. HIPÓTESIS	13

IV. OBJETIVOS

4.1	Objetivo general	13
4.2	Objetivos específicos	13

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1	Cultivo de promastigotes de <i>Leishmania major</i>	14
5.2	Clonación de la proteína fosfatasa PP2C de <i>L. major</i>	14
5.2.1	Extracción y purificación de ADN de <i>L. major</i>	14
5.2.2	Diseño de oligonucleótidos a partir del genoma de <i>L. major</i>	15
5.2.3	Optimización de las condiciones de amplificación del gen mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	16
5.2.4	Electroforesis de ADN en geles de agarosa	18
5.2.5	Purificación de ADN obtenido de los geles de agarosa	19
5.2.6	Establecimiento de las condiciones de PCR para el inserto con sitios de restricción	19
5.2.7	Purificación del plásmido	21
5.2.8	Digestiones	22
5.2.8.1	Purificación del ADN plasmídico por "Cleanup"	23
5.2.9	Ligaciones	23
5.2.9.1	Preparación de las células competentes	24
5.3	Expresión de la proteína PP2C de <i>L. major</i>	25
5.3.1	Condiciones de inducción	26
5.3.2	Sobreexpresión de las enzimas PP2C con y sin His-Tag	26
5.3.3	Obtención del extracto total y la fracción soluble de la PP2C	26
5.3.4	Purificación de la enzima PP2C mediante cromatografía de afinidad	27
5.3.5	Cuantificación de proteínas por el método de ácido bicinonínico	28
5.3.6	Geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes	28
5.4	Seguimiento de la actividad enzimática de la fosfatasa PP2C de <i>L. major</i>	29
5.4.1	Determinación de la actividad enzimática de fosfatasa	29
5.4.2	Determinación del pH óptimo de fosfatasa de la PP2C de <i>L. major</i>	29
5.4.3	Efecto de cationes divalentes sobre la actividad de fosfatasa de la PP2C de <i>L. major</i>	29

5.4.4	Efecto de inhibidores específicos sobre la actividad de fosfatasa de la PP2C de <i>L. major</i>	29
5.4.5	Determinación de la actividad de PTP y PS/TP de la PP2C de <i>L. major</i>	30
5.4.6	Determinación del pH óptimo de la actividad PS/TP de la PP2C de <i>L. major</i>	30
5.5	Ensayos de Western blot utilizando anticuerpos anti PTP para la identificación de la PP2C de <i>L. major</i>	30
5.6	Generación de anticuerpos policlonales para la PP2C de <i>L. major</i>	31
5.7	Localización de la PP2C en promastigotes de <i>L. major</i> por inmunofluorescencia.....	32

VI. RESULTADOS

6.1	Establecimiento de las condiciones óptimas de PCR.....	33
6.2	Purificación del ADN a partir de los fragmentos de agarosa.....	33
6.3	Condiciones para la clonación del gen de la PP2C de <i>L. major</i>	36
6.3.1	Establecimiento de las condiciones de PCR para el inserto con sitios de restricción.....	36
6.3.2	Digestiones y ligaciones.....	36
6.3.3	Liberación del inserto.....	36
6.3.4	Secuenciación y alineamiento del ADN de las clonas positivas.....	36
6.3.5	Expresión de la proteína PP2C y condiciones de inducción.....	37
6.3.6	Detección de His-Tag en la proteína PP2C de <i>L. major</i>	37
6.4	Purificación de la proteína PP2C de <i>L. major</i> mediante cromatografía de afinidad.....	43
6.5	Caracterización bioquímica de la PP2C recombinante de <i>L. major</i>	43
6.6	Determinación de la actividad de fosfatasa.....	43
6.7	Determinación de la actividad de fosfatasa en presencia de cationes.....	43
6.8	Determinación del pH óptimo de la actividad de fosfatasa.....	44
6.9	Efecto de inhibidores específicos sobre la actividad de fosfatasa.....	44
6.10	Especificidad de sustratos fosforilados en tirosina y serina treonina.....	44
6.11	Determinación del pH óptimo de la actividad de PS/TP.....	44
6.12	Efecto de inhibidores específicos sobre la actividad de PS/TP.....	45
6.13	Identificación de la PP2C mediante anticuerpos que reconocen PTPs.....	45

6.14	Identificación de la PP2C en el parásito.....	45
VII.	DISCUSIÓN	52
VIII.	CONCLUSIÓN	60
IX.	PERSPECTIVAS	61
X.	REFERENCIAS	62

Lista de figuras	Pág.
Figura 1. Secuencia de nucleótidos de ADN del cromosoma 25.0750 de <i>L. major</i>	15
Figura 2. Mapa del vector de expresión pET 23b de Novagen	21
Figura 3. Sistema de expresión pET <i>E. coli</i> BL21De3pLysS.....	25
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 0.9 %. Productos amplificados por PCR del gen de la PP2C de <i>L. major</i> a una concentración de 1.5 mM de MgCl ₂	34
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 0.9 %. Productos amplificados por PCR del gen de la PP2C de <i>L. major</i> a una concentración de 3 mM de MgCl ₂	34
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 0.9 %. Producto amplificado por PCR del gen de la PP2C de <i>L. major</i> a una concentración de 1.5 mM de MgCl ₂	35
Figura 7. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de la PP2C de <i>L. major</i>	35
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 0.9 %. Productos amplificados por PCR del gen para la PP2C de <i>L. major</i> a 1.5 mM de MgCl ₂ con sitios de restricción	38
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 %. Productos amplificados por PCR del gen para la PP2C de <i>L. major</i> con sitios de restricción NdeI y HindIII con y sin His-Tag.....	38
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1 %.....	39
Figura 11. Análisis del ADN sin digerir (1) y digerido (2).....	39
Figura 12. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de la PP2C.....	40
Figura 13. Análisis electroforético de la inducción de la PP2C de <i>L. major</i> con His-Tag, la concentración de IPTG utilizada fue 0.4 mM	41
Figura 14. Análisis electroforético de la inducción de la PP2C de <i>L. major</i> sin His-Tag, la concentración de IPTG utilizada fue 0.4 mM	41
Figura 15. Análisis electroforético en geles de poliacrilamida al 12.5% que muestra el corrimiento de la proteína solubilizada.....	42

Resumen

Leishmania es un parásito intracelular que puede activar varias moléculas inhibitorias de las cascadas de señalización en el macrófago. Una de estas moléculas es la PTP SHP-1 que se expresa en células hematopoyéticas, se ha reportado que la infección de macrófagos con *Leishmania* induce esta fosfatasa. Por otro lado, se ha demostrado la presencia de una proteína tirosina fosfatasa (PTP) en extractos de promastigotes de *Leishmania major*. Es de nuestro interés estudiar la participación de estas proteínas fosfatasas en la infección del macrófago por lo que el objetivo de esta tesis fue clonar y purificar la PP2C de *L. major*.

Mediante el diseño de oligonucleótidos específicos se clonó un gen que codifica para una PP2C de *L. major*. El ADN amplificado por PCR se secuenció y mediante un análisis de alineamiento se determinó que se trataba del gen para la PP2C de *L. major* (Lmj PP2C). Se establecieron las condiciones de inducción y se realizó la sobreexpresión de la enzima, ésta se purificó por cromatografía de afinidad y se eluyó con un gradiente de imidazol (5-500 mM). Las fracciones se analizaron en geles en condiciones desnaturalizantes y se tiñeron con azul de Coomassie. Se demostró que la proteína recombinante PP2C de *L. major* tiene un PM de 44.9 kDa y se presentó a partir de la fracción 26. Al realizar la caracterización bioquímica de la proteína recombinante se encontró actividad enzimática de fosfatasa en presencia de dos cationes divalentes (Mg^{2+} y Mn^{2+}). El pH óptimo fue de 8.5 y presentó mayor afinidad por el sustrato treonina con respecto a tirosina y se inhibió con inhibidores clásicos de PTPs y no por ácido okadáico.

Además, se demostró que la PP2C se expresa en promastigotes de *L. major* y mediante microscopía de fluorescencia se observó que se encuentra concentrada en el saco flagelar. De acuerdo a las características que presentó la enzima y a los criterios utilizados para caracterizar las serina treonina fosfatasas de eucariontes, se demostró que la PP2C de *L. major* es similar a la PP2C de mamíferos.

Abstract

Leishmania is an intracellular parasite that can modulate signaling pathway in its host cell. Recent studies suggest that PTPs play a role in the pathogenesis of *Leishmania* through activation of the PTPs of the host cells by the parasite.

We reported previously the presence of a membrane-bound PTP in *Leishmania major* promastigotes. Therefore, the principal goal of this work was the cloning, purification and characterization of a protein phosphatase 2C .

The gene was cloned and amplified by PCR using specific oligonucleotides and the recombinant protein was purified by affinity chromatography. The peak in the elution profile that showed maximal protein concentration was analyzed by SDS-PAGE and revealed a protein of 44.9 kDa that had PP2C activity. This activity was dependent of divalent cations (Mg^{+2} and Mn^{+2}) and was optimal at a pH of 8.5 when phosphothreonine was used as substrate. Also, PP2C activity was not affected by PTPs specific inhibitors.

This protein was used to generate polyclonal antibodies that recognized the 44.9 kDa molecule. These antibodies were used for the immunodetection in *Leishmania major* promastigotes. The results obtained by immunofluorescence showed that the enzyme is localized in the flagellar pocket of promastigotes. The genetic analysis of this protein showed high homology with a protein phosphatase PP2C from mammalian origin.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Vías de señalización del macrófago moduladas por el parásito *Leishmania*

Leishmania es un parásito intracelular obligado que infecta a las células del sistema fagocítico mononuclear. Entre estas células se encuentran los monocitos, macrófagos y células dendríticas que son blanco de diversos microorganismos patogénicos que requieren un ambiente intracelular en el cual se puedan replicar. Los macrófagos que participan en la inmunidad innata, tienen la capacidad de fagocitar partículas extrañas y por su actividad microbicida participan también en la respuesta inmune adquirida en el procesamiento y presentación de antígenos. La activación del macrófago para incrementar su actividad microbicida es un requerimiento importante en la eliminación completa de estos patógenos intracelulares ⁽¹⁾.

Una pregunta importante relacionada a la infección de macrófagos por *Leishmania* y otros organismos patogénicos es la resistencia de éstos a las propiedades microbicidas de dichas células. Una de las formas de resistencia es la afectación de las vías de señalización requeridas para la activación celular. En macrófagos infectados con *Leishmania donovani* se demostró una inhibición en la vía de señalización del interferón gama (IFN γ), la cual es una de las citocinas más importantes en la activación. En esta vía de señalización del tipo JAK/STAT participan dos tirosina cinasas citoplásmicas que son miembros de la familia JAK. El estímulo de las células con IFN γ induce la fosforilación y activación de JAK1 y JAK2 y estas proteínas activadas catalizan la fosforilación de STAT. STAT fosforilado forma dímeros que se translocan al núcleo donde se unen a la secuencia de activación en el gen inducible por IFN γ ⁽²⁾.

En la activación de la vía de señalización JAK/STAT se ha reportado que existen ligandos específicos involucrados en la dimerización del receptor, así como también en la unión de JAKs a dominios proximales del receptor de membrana. Recientemente se ha sugerido que esas interacciones pueden ser inhibidas por la infección con *Leishmania*. Un mecanismo alternativo para explicar la disminución de la activación de la vía JAK/STAT es la participación de PTPs de la célula hospedera. Un candidato es la proteína fosfatasa (PTP1C,

SHP-1) expresada en macrófagos y en otras células mieloides que regula negativamente la señalización dependiente de JAK⁽³⁾.

La participación de *Leishmania* en otra vía de señalización también ha sido reportada. En la vía de las MAP cinasas se observó que las células infectadas con el parásito y estimuladas con PMA mostraron una disminución en la fosforilación de las MAP cinasas p42 y p44. Estos resultados sugieren que la infección con el parásito específicamente afecta la fosforilación en tirosina de las MAP cinasas. Además se encontró que la expresión de c-FOS en respuesta a PMA y la expresión de iNOS en respuesta a IFN γ disminuyó notablemente por la infección con *Leishmania*⁽⁴⁾.

En otros estudios recientes se ha sugerido que la proteína tirosina fosfatasa SHP-1 del macrófago juega un papel importante en la patogénesis de la infección con *Leishmania*⁽⁵⁾.

Los antecedentes antes mencionados demuestran que *Leishmania* tiene la capacidad de modificar los niveles de fosforilación de proteínas celulares que pueden ser necesarias para la activación de la célula y favorecer su supervivencia en el ambiente hostil dentro del macrófago. Los eventos de señalización descritos requieren de la participación de dos principales clases de enzimas, proteínas cinasas (PKs) y proteínas fosfatasa (PPs), las cuales participan en eventos de fosforilación y desfosforilación en la célula.

1.2 Fosforilación-desfosforilación

La fosforilación-desfosforilación de proteínas es uno de los mecanismos más importantes en la regulación de una variedad de eventos intracelulares en eucariontes. Esta fosforilación ocurre principalmente en residuos de tirosina, serina, treonina e histidina y está controlada por la acción de PKs y PPs. Las primeras catalizan la adición de un grupo fosforilo al residuo del aminoácido específico. Los niveles de fosforilación están regulados por PPs que son estructural y funcionalmente diversas. Las PPs están representadas por tres familias de genes distintos: una de ellas está representada por las proteínas tirosina fosfatasa (PTPs) y dos por la familia de fosfoproteínas fosfatasa (PPPs) y las fosfoproteínas fosfatasa dependiente de metales (PPM). Las PTPs son enzimas que participan en la desfosforilación de residuos de tirosina, mientras que las proteínas tirosina cinasas (PTKs) llevan a cabo la fosforilación

de residuos tirosina. El balance apropiado de la actividad de PTKs y PTPs participa en diversos procesos fisiológicos tales como: metabolismo, comunicación celular, transcripción de genes y respuesta inmune ⁽⁶⁾.

Dentro de la familia PPP se encuentran las proteínas serina/treonina fosfatasa. Estas enzimas desfosforilan residuos serina y/o treonina y las más abundantes en eucariontes son: PP1, PP2A y PP2B. En la familia PPM la enzima representativa es la PP2C ⁽⁷⁾.

1.3 Proteínas tirosina fosfatasa (PTPs)

Estudios recientes sugieren que las PTPs pueden estar involucradas en la patogénesis de la infección intracelular. Estas enzimas se caracterizan por la presencia de un dominio catalítico conservado estructuralmente de aproximadamente 280 residuos dentro del cual se encuentra el motivo con la secuencia (H/V) CX₅ R (S/T) que está altamente conservada. Mediante estudios de cristalografía de las PTP1B y PTPs de *Yersinia* se han definido diferentes características estructurales que se muestran en la Tabla 1 ⁽⁸⁾.

Tabla1. Características estructurales del dominio catalítico de las PTP1B y PTPs de *Yersinia*

	PTP1B (Placenta humana)	PTPs de <i>Yersinia</i> (Bacteria <i>Yersinia</i>)
Número de residuos del dominio catalítico	1-321	163-468
Estructura del dominio catalítico	8 alfa hélices, 12 cadenas beta plegada y un dominio catalítico	20% de identidad con la PTP1B, 5 alfa hélices y 8 cadenas beta
Sitio activo formado por	Existe un surco sobre la superficie molecular y está contenida en β 3, β 12, β 4, β 1,	β 2, β 8, β 3, β 7

1.4 Clasificación de las PTPs

La familia de las PTPs se divide en cuatro subfamilias:

- a) PTPs clásicas específicas de tirosina
- b) Fosfatasas de especificidad dual (DSPs)
- c) Fosfatasas Cdc25
- d) PTPs de bajo peso molecular (LMW)

Las PTPs clásicas fueron descubiertas originalmente por su capacidad de desfosforilar proteínas que tienen residuos de tirosina fosforilados. De acuerdo a su localización subcelular las PTPs específicas de tirosina pueden ser de tipo receptor o intracelulares.

Las proteínas fosfatasas de especificidad dual (DSPs) se distinguen por su habilidad para hidrolizar el fosfato en residuos de serina, treonina y tirosina; uno de los prototipos de esta familia son las PTPs del virus vaccinia (VH1) ⁽⁹⁾.

1.5 Proteínas serina treonina fosfatasas (PS/TP)

Las PS/TP (PP1, PP2A y PP2B) de la familia PPP junto con la PP2C de la familia PPM muestran la mayor actividad enzimática *in vivo*. Las PP1, PP2A y PP2B tienen un dominio catalítico común de 280 residuos y se distinguen por presentar subunidades reguladoras asociadas y formar una variedad de holoenzimas. La PP1 está involucrada en el control de múltiples funciones celulares tales como metabolismo del glucógeno, contracción muscular, progresión del ciclo celular y actividad neuronal. La PP2A participa en procesos tales como metabolismo, señalización celular, ciclo celular y control de la actividad de telomerasa. La PP2B se caracteriza por la dependencia de Ca^{+2} para su actividad enzimática. El dominio catalítico se encuentra en la porción amino terminal de la subunidad A y presenta una región reguladora en la región carboxilo terminal. Además, la PP2B juega un papel importante en la señalización de Ca^{+2} en células T activadas. El incremento de este catión en células T estimuladas por el reconocimiento del antígeno activa a la PP2B y desfosforila la subunidad citosólica del factor de transcripción NFAT. Esta desfosforilación permite que NFAT se transloque al núcleo y junto con otros factores de transcripción inducen la expresión del gen para la interleucina 2 (IL-2) ⁽¹⁰⁾.

Las PP1 y PP2A se inhiben específicamente por una variedad de toxinas naturales tales como ácido okadáico y microcisteína. Estos inhibidores tienen poco efecto sobre la PP2B ⁽¹¹⁾.

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas fosfatasas de la familia PPM no muestran similitud con las fosfatasas encontradas en la familia PPP. Sin embargo, la estructura tridimensional de esas dos familias es muy similar. En la familia PPM, la proteína representativa es la PP2C. Esta proteína en mamíferos presenta un dominio catalítico amino terminal con seis α -hélices y once hojas β , las cuales son comunes en todos los miembros de la familia de PP2Cs. Presentan también un dominio carboxilo terminal formado por 90 residuos de aminoácidos, el cual consta de tres α -hélices. Las PP2Cs se clasifican como enzimas del grupo I o grupo II. Esta clasificación se basa en la secuencia consenso RXXME/QD para el grupo I o KXXNED para el grupo II presentes en el motivo 1. Esta enzima requiere de Mg^{+2} y Mn^{+2} para su actividad enzimática y ha sido implicada en la regulación de diversos procesos celulares, entre los que se encuentran las vías activadas por estrés en plantas como por ejemplo en *Arabidopsis* ^(10, 12, 13).

Debido al papel tan importante que tienen estas fosfatasas en la regulación de diferentes procesos celulares se ha demostrado que juegan un papel relevante en la patogenicidad de diferentes microorganismos.

1.6 PTPs y PS/TP en microorganismos infecciosos

La actividad de PTP y PS/TP ha sido reportada como factor de virulencia en varios microorganismos infecciosos tales como virus, bacterias y parásitos.

1.6.1 Virus

El virus vaccinia (VH1) codifica una pequeña PTP de 20 kDa que es producida en la última etapa de la infección. Esta enzima desfosforila específicamente una proteína viral requerida para la formación de la cápside. VH1 es el prototipo de la familia de DSPs que puede desfosforilar sustratos que contienen fosfoserina/fosfotreonina ⁽¹⁴⁾.

1.6.2 Bacterias

Se ha descrito la presencia de fosfatasa de tirosina y de serina/treonina en diferentes especies de bacterias.

1.6.2.1 *Yersinia*

Dentro del género *Yersinia* se encuentran tres especies que son *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica* y *Yersinia pseudotuberculosis*, agentes causales de una variedad de enfermedades entéricas y septicemia ⁽¹⁵⁾. Se ha demostrado que *Yersinia* tiene la capacidad de neutralizar a los macrófagos mediante la secreción de componentes virulentos llamados “Yops” (YopH, YopE, YopJ/P, YopkA/YopO, YopT y YopM). La YopH también conocida como Yop 2b o Yop 51 es una PTP que fue identificada como un factor de virulencia esencial debido a que inhibe la fagocitosis del macrófago ⁽¹⁶⁾. Se ha reportado que la inhibición de la fagocitosis por la PTP de *Yersinia* es por la desfosforilación de proteínas específicas tales como P¹³⁰ cas y P¹²⁵ FAK que participan en la despolimerización de fibras de actina ⁽¹⁷⁾.

1.6.2.2 *Bacillus subtilis*

Se ha demostrado que esta bacteria presenta cinco genes que codifican para PP2C. Uno de ellos, denominado SpoII E, regula la esporulación, ya que promueve la desfosforilación de un factor de transcripción SPOII ⁽¹⁸⁾.

1.6.2.3 *Mycobacterium tuberculosis*

En *Mycobacterium tuberculosis* la PP2C denominada PstP juega un papel en la regulación de la división celular debido a que desfosforila serina treonina cinasas PKnA y PKnB ⁽¹⁹⁾. Se han clonado y caracterizado dos proteínas (MptpA) con actividad de PTP, las cuales se expresaron como proteínas de fusión glutatión-S-transferasa en *Escherichia coli* y se purificaron por cromatografía de afinidad. Estas proteínas desfosforilan los residuos fosforilados en tirosina de la proteína básica de mielina (MBP). La actividad de la enzima fue inhibida por ortovanadato de sodio, pero no por ácido okadáico y mutaciones en la cisteína 11 y 160 del sitio catalítico de Mptp A y de Mptp B ocasionaron la pérdida de esta actividad. Por otro lado, se determinó el papel de la cisteína 11 presente en el dominio catalítico de Mptp A. Esto se logró por

el cambio de la cisteína 11 por una serina con lo que se obtuvo la proteína mutante GST-Mptp AC11S que se expresó, se purificó y se analizó su actividad enzimática. La proteína mutante no fue activa, lo que sugirió que la cisteína 11 es crucial para la actividad enzimática⁽²⁰⁾.

1.6.2.4 *Prevotella intermedia*

En esta bacteria se purificó y se caracterizó una proteína fosfatasa denominada PiACP con actividad de PTP. Esta proteína está codificada por un gen formado por 792 pb, es un monómero con un peso molecular de 30 kDa y presentó actividad a pH alcalino. La enzima desfosforiló péptidos fosforilados en tirosina, no requirió cationes divalentes para la actividad y fue sensible a ortovanadato, un inhibidor característico de la actividad de PTPs y resistente al ácido okadáico un inhibidor de PS/TP⁽²¹⁾.

1.6.2.5 *Streptomyces coelicolor*

En este microorganismo se aisló y caracterizó un gen (PtpA) que codifica para una proteína que contiene una secuencia idéntica a las PTPs ácidas de procariontes y mamíferos. Esta proteína se expresó como una proteína de fusión, la cual catalizó la hidrólisis del pNPP y la desfosforilación de residuos de fosfotirosina (pY), pero no fosfoserina ni fosfotreonina. El pH óptimo para la hidrólisis del pNPP y de pY por la PtpA fue de 6 y 6.5 respectivamente y se inhibió por iodoacetato y vanadato de sodio (inhibidores de PTPs)⁽²²⁾.

1.6.3 Parásitos

En parásitos existen reportes de la caracterización bioquímica de estas fosfatasas así como también de la identificación del dominio catalítico mediante la utilización de anticuerpos que reconocen el dominio catalítico de estas proteínas.

1.6.3.1 *Ascaris suum*

Ascaris suum presenta dos proteínas tirosina fosfatasas que fueron parcialmente purificadas. Estas son la PTPA-1 con un peso molecular de 50 a 55 kDa y la PTPA-2 de 180 kDa. Ambas proteínas presentan una reacción cruzada con el anticuerpo monoclonal dirigido contra la PTP-1B de placenta

humana. Mediante ensayos inmunohistoquímicos se determinó la presencia de la enzima en la lámina muscular del parásito ⁽²³⁾.

1.6.3.2 *Entamoeba histolytica*

En trofozoitos de *Entamoeba histolytica* se purificó una proteína fosfatasa unida a membrana con actividad de PTP. Esta enzima desfosforila específicamente la O-fosfo L-tirosina (P-Tyr) a un pH de 5 y presenta baja afinidad a sustratos como O-fosfo L-serina, O-fosfo L-treonina y ATP. Esta enzima se inhibió por compuestos como molibdato de amonio y tungstato de sodio, reportados como inhibidores específicos de PTP y trifluoperazina, inhibidor de la actividad de PS/TP. El anticuerpo monoclonal anti PTPasa 1B de placenta humana presentó una reacción cruzada con una molécula de 55 kDa presente en la fracción solubilizada de *E. histolytica*. En ensayos funcionales con células HeLa se observó una desintegración completa del citoesqueleto de actina de estas células después de 8 h de interacción con la PTP amibiana. Estos resultados sugieren que la PTP amibiana puede alterar los procesos de transducción de señales involucrados en el rearrreglo del citoesqueleto de actina ⁽²⁴⁾.

Por otro lado, ya se conoce que en *E. histolytica* existen dos genes que codifican para las PTPs, denominados EhPTPA y EhPTPB los cuales fueron clonados. La proteína EhPTPA fue expresada como producto de fusión con glutatión-S-transferasa (GST::EhPTPA), la cual hidrolizó el sustrato *p-NPP* y se inhibió por inhibidores clásicos como el ortovanadato y molibdato. Adicionalmente desfosforiló una proteína de alrededor de 130 kDa que contiene residuos fosfotirosina y está presente en un lisado celular de trofozoitos ⁽²⁵⁾.

1.6.3.3 *Trypanosoma brucei* y *T. cruzi*

En el parásito *Trypanosoma brucei* se demostró la presencia de actividad de tirosina fosfatasa en fracciones solubles y particuladas mediante la desfosforilación del péptido Tyr-(p) Ratyde. Por ensayos de Western blot se identificó una molécula con un anticuerpo monoclonal α PTP de alrededor de 55 kDa en extractos de parásitos (forma sanguínea y procíclico). La actividad de la enzima se inhibió con el vanadato de sodio. Sin embargo, no hubo

evidencia directa de que la banda de 55 kDa detectada correspondiera a la actividad de PTP observada ⁽²⁶⁾.

En *T. cruzi* se caracterizó una PTP asociada a membranas y con actividad de PTP, la cual está ausente en el estado procíclico. La reconstitución de proteínas de membrana demostró que tres polipéptidos de 148, 115 y 72 kDa presentaron actividad de PTP que fue inhibida por vanadato de sodio ⁽²⁷⁾.

En estudios realizados con *T. brucei* se purificó y clonó una proteína fosfatasa de membrana que presentó una secuencia homóloga con otras fosfatasas. Las características cinéticas de la enzima, especificidad de sustrato y propiedades moduladoras fueron similares a las de otras proteínas fosfatasas reportadas. La presencia de fosfatasa ácida de *T. brucei* varía en las diferentes fases del ciclo de vida ya que se expresó en la fase de tripomastigote y no en la fase procíclica del parásito ⁽²⁸⁾.

Mediante el estudio de un gen que participa en el ciclo celular se demostró que la proteína tirosina fosfatasa de *T. brucei* (*Tb* PTP1) está implicada en la diferenciación celular pues su inhibición por ARN de interferencia ocasionó que el parásito se transformara en procíclico ⁽²⁹⁾.

1.6.3.4 *Toxoplasma gondii*

En este parásito se demostró la presencia de la proteína fosfatasa 2C (PP2C) que se secreta durante la invasión y se determinó que interactúa con una proteína de unión a actina en la célula hospedera ⁽³⁰⁾.

1.6.3.5 *Leishmania*

El primer reporte de PTPs en la familia Trypanosomatidae se realizó en *Leishmania donovani*, este estudio demostró que hay actividad de PTP en extractos crudos y en fracciones purificadas por cromatografía. Por otro lado, se observó un incremento en la actividad de fosfatasa ácida y una disminución de la actividad de PTP a lo largo del tiempo de cultivo. En este parásito no se demostró la presencia de la proteína mediante Western blot ⁽³¹⁾.

Nuestro grupo de investigación reportó la presencia de una PTP asociada a membrana de promastigotes de *L. major*, la cual presentó diferencias en la expresión de la proteína, en la actividad enzimática y en la localización ultraestructural entre ambas fases de crecimiento del parásito (procíclica y

metacíclica). De manera muy interesante en la fase metacíclica, que es la fase infectiva, se observó que la enzima está presente en la membrana del parásito y en la fase procíclica, en el citosol. Esto probablemente sea indicativo de que la presencia de esta fosfatasa esté relacionada con la adaptación del parásito al ambiente hostil en la célula hospedera ⁽³²⁾. Por otra parte, también se analizó la actividad enzimática de fosfatasa en promastigotes vivos de *L. mexicana* y se encontró que estos parásitos desfosforilaron el *p-NPP*, este hallazgo es indicativo de que la enzima presente en la membrana del parásito posee su sitio catalítico hacia el exterior.

Para conocer la función de las PTPs sobre la célula hospedera se estudió su participación en la infección de macrófagos por promastigotes de *L. mexicana*. Los promastigotes se incubaron con inhibidores de PTPs (vanadato y pervanadato), lo que inhibió la actividad de fosfatasa en relación a un control sin inhibidor. Los promastigotes con la PTP inhibida y promastigotes normales como control se utilizaron para infectar macrófagos derivados de médula ósea de ratón y de la línea celular J774 A.1. Los resultados mostraron una inhibición de la infección por *Leishmania* en un 40 % en la condición donde se utilizaron los inhibidores de PTP que actuaron sobre las enzimas del parásito y del macrófago. Este resultado sugiere la participación de PTPs de promastigotes de *L. mexicana* en la infección de macrófagos murinos ⁽³³⁾.

Otro grupo de investigadores realizaron la expresión heteróloga de la PTP 1B de humano en *L. donovani* y mostraron que esta enzima regula la diferenciación a amastigote e induce la expresión de proteínas específicas e incrementa la virulencia en ratones BALB/c. Esto representa una evidencia sobre el papel que juegan las PTPs en la supervivencia del amastigote en el hospedero mamífero ⁽³⁴⁾.

En *L. chagasi* se clonó una proteína fosfatasa PP2C cuya actividad enzimática fue dependiente de Mg^{+2} y resistente al ácido okadáico, además esta proteína estimuló una respuesta de células T de pacientes infectados con *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. chagasi* ⁽³⁵⁾.

II. JUSTIFICACIÓN

Se han realizado varios estudios de moléculas presentes en el parásito *Leishmania* que están asociadas a diferentes funciones. Este es el caso de la enzima aciltransferasa fosfatasa dihidroacetona que es una enzima glicosomal que al inhibirse causa alteraciones durante la división celular del parásito y ocasiona pérdida de la virulencia ⁽³⁶⁾. Otra enzima importante relacionada con el metabolismo del parásito es la llamada fructosa 1,6 bifosfatasa la cual se expresa constitutivamente en ambas fases del crecimiento. Se observó que parásitos mutantes en esta enzima fueron incapaces de crecer en ausencia de hexosa y los amastigotes no se replicaron dentro del fagolisosoma ⁽³⁷⁾. Se describió también una enzima que reduce a los antimoniales pentavalentes (fármacos clásicos para el tratamiento de la leishmaniasis) inhibiendo su efecto. Esta enzima es susceptible a inhibidores clásicos de PTPs como el ortovanadato de sodio y mediante mutagénesis dirigida, se observó que la cisteína presente en su dominio catalítico es importante para la catálisis ⁽³⁸⁾. Los estudios anteriores demuestran la importancia de las proteínas fosfatasas presentes en el parásito, pero hasta la fecha se desconoce que proteínas del parásito son las responsables de bloquear los mecanismos funcionales de su célula hospedera (macrófago). Una de las estrategias que presenta el parásito *Leishmania* es su capacidad para modular los mecanismos de transducción de señales de la célula hospedera y se han descrito varias moléculas que pueden participar en la modulación de las vías de señalización en el macrófago. Dentro de estas moléculas se encuentra las proteínas fosfatasas, sin embargo, se sabe que estas moléculas pueden ser inducidas en el macrófago posteriormente a la infección con *Leishmania* y tienen un papel importante en el establecimiento de la leishmaniasis ⁽⁵⁾. Recientemente, nuestro grupo de investigación reportó la presencia de una PTP en la fase procíclica y metacíclica del parásito *L. major*. En este estudio se encuentran diferencias en la expresión, la actividad enzimática y la localización ultraestructural de la PTP. De manera interesante se observó que en la fase metacíclica (que es la fase infectiva del parásito) la enzima se encontró asociada a membranas del parásito. Durante el proceso de metaciclogénesis el parásito necesita equiparse de proteínas que le puedan ayudar para poder adaptarse y enfrentar los mecanismos efectores de su célula hospedera ⁽³²⁾. Hasta el momento

existen reportes en otros microorganismos que demuestran la participación de las PTPs como moléculas importantes en la diferenciación del parásito ⁽³⁴⁾. No se conoce la participación de las proteínas fosfatasas y en especial la PP2C de *L. major* en el parásito mismo y en el proceso de infección al macrófago. Por lo que el objetivo de este trabajo fue clonar, purificar y caracterizar la proteína fosfatasa PP2C de *L. major*.

III. HIPÓTESIS

Leishmania major expresa una proteína fosfatasa de tipo PP2C que pudiera tener relevancia en la regulación del parásito.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general: Clonar, purificar y caracterizar la proteína fosfatasa PP2C de promastigotes de *Leishmania major* y demostrar su expresión.

4.2 Objetivos específicos:

- 4.2.1 Clonar y purificar la proteína fosfatasa PP2C recombinante de promastigotes de *L. major* mediante cromatografía de afinidad.
- 4.2.2 Caracterizar a la proteína fosfatasa PP2C de *L. major*.
 - 4.2.2.1 Analizar el efecto de iones divalentes ($MgCl_2$, $MnCl_2$, $CaCl_2$, $ZnCl_2$) sobre la actividad de fosfatasa.
 - 4.2.2.2 Determinar el pH óptimo de la actividad de fosfatasa.
 - 4.2.2.3 Analizar el efecto de inhibidores específicos de PTPs y PS/TP.
 - 4.2.2.4 Analizar la especificidad de sustrato.
 - 4.2.2.6 Analizar por electroforesis la PP2C purificada de *L. major*.
 - 4.2.2.8 Identificar por Western blot el dominio de la PTP con anticuerpos específicos anti-PTPs.
 - 4.2.2.9 Localizar la PP2C en promastigotes de *L. major*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cultivo de promastigotes de *Leishmania major*

La cepa MHOM/SV/7315-ASKH de *L. major* se cultivó en medio RPMI 1640 (Gibco) con 10 % de suero fetal bovino (Gibco) descomplementado por calor a 56 °C. Se cultivaron 5×10^5 parásitos por mL en un volumen total de 30 mL en condiciones de esterilidad. La fase de crecimiento de los parásitos se determinó por la prueba de aglutinación con lectina de cacahuete PNA (Sigma). Para esto se utilizaron 2×10^8 parásitos que se lavaron con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS 0.15 M) 1X y posteriormente se resuspendieron en 900 μ L de la misma solución, después se agregó PNA a una concentración de 100 μ g/mL, se incubaron durante 30 min y se centrifugaron a 800 rpm por 3 min. Los parásitos aglutinados correspondieron a la fase procíclica y los no aglutinados correspondieron a la fase metacíclica. Se obtuvieron un 80 % de parásitos metacíclicos. Los parásitos se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 min a 4 °C. Se lavaron con PBS 1X y se contaron en una cámara de Neubauer. La pastilla se congeló a -70 °C.

5.2 Clonación de la proteína fosfatasa PP2C de *L. major*

5.2.1 Extracción y purificación de ADN de *L. major*

La pastilla de parásitos (500×10^6) se lavó dos veces con PBS 1X y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min. La pastilla se resuspendió en 1 mL de Trizol (Invitrogen), se agitó durante 15 seg y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente se adicionaron 200 μ L de cloroformo (Baker) por cada mL de Trizol, se homogenizó por 45 seg y se centrifugó a 13500 por 15 min a 4°C. Se tomó la interfase (que es la fase más roja) y se retiró de la fase transparente. A continuación, se agregaron 400 μ L de etanol absoluto (Merck) por cada mL de Trizol, se mezcló por inversión y se dejó reposar 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a por 5 min a 4 °C, se decantó y se agregó 1 mL de citrato de sodio 0.1 M en etanol al 10 %. Posteriormente se agitó 30 min a temperatura ambiente. Nuevamente se centrifugó a las condiciones antes mencionadas. Se decantó y

resuspendió en 1 mL de etanol al 75 % por mL de trizol. Se agitó 20 min a temperatura ambiente. La pastilla se secó al vacío y se resuspendió en 30 µL de agua destilada estéril, después se calentó a 60 °C por 15 min y el ADN se almacenó a -20 °C hasta su uso.

5.2.2 Diseño de oligonucleótidos a partir del genoma de *L. major*

A partir del genoma de *L. major* reportado <http://www.genedb.org.genedb> se seleccionó un gen que se encuentra en el cromosoma 25 que codifica para una PP2C con una longitud de 1221 pb, masa molecular de 44.9 kDa y un punto isoeléctrico pH 4.5 (Figura 1).

```
ATGGGCATTCCACTTCCGAAGCCGGT GATGACGCAGCTCCAGGA GC
GTTACGGAAACACCATCTTTTCGCTGCGGTTCCA ACTGTGTGAATGGG
TACCGCGAGACCATGGAG GATGCCCA TCTGACGTACCTGACGGATA
GCTGGGGTTTTCTTCGGCGTCTTCGACGGCCATGTGA TGACCAGTGTT
CGCAGTACCT CGAGAGGG CATGGCGC AGCGCC ATT GAGAAGGAAT
CGA TCCCCAT GACGGATGAGC GGATGAAGGAGCTGGCACTGCAGA
TCGACC AGGAGTGGATGGACTC GGGCCG CG AGGGCGGCAGCACGG
GCACC TTCTTTG TGGCTCTCAAGGAGGGC AACAAGGTGCACCTGCA
GGTTG GTAACGTCGGTG ACTCGCGTGTGGTG GCCTGCATCGATGGT
GTGTGCGTCCCTCTGACGGAGGACCACAAGC CAAATAATGAAGGGG
AGCGCCAGCG CATTGAGAACTGCGCGGGTTCGTGTGGAGAACAACCG
CGTCGATGGC AGCCTGGCCGTCAGTCGGG CTTTCGGCGACCCGCGAG
TACAAGCTAGGCAGTGGTAGTCAGCTGGA GCAGAAGGTGATCGCCT
TAGCAGATGTCCAGCACAAAGGATCTCACCTTCAACTCGAACGACTTT
GTGCTGCTGTGCTGCGACGGCGTCTTTGAGGGCAACTTCCCGAACGA
GGAGGTGGTG GCCTACGTGAAGCAGCAGCTGGAGACCTGCAACGAC
CTCGCCGAGG TGGCCGGGAGTGTGTGCGAGGAGGCGATCGAGCGCG
GCAGCCGTGA CAACATCTCCTGC ATGATCGTGCAGT TTAAGGACGG
CAGCGACTACGCTGCTGCCCGCACACCACCGTTGTGCCCGGCCGT
TTAGCGCACCGCGCAACAGCGGCTTCCGTAAGGCGTACGAGTCCATG
GCAGACAAAGGCAACACCACCGTGGGCGCCCTCCTA GAAAAAGCGCT
ACACA CC CTCAAGGCCG CGAGGCCCTCA CGCCGGAAGA AACGGA
AGAGCTGAGCCAGTTTGA GAACGGCCCCGAGGCGAAGCTCACAGGC
GCCGAGCGT CAGAAGTGGTT CTCGAACT ACTTCCAGAAGCTCTGCG
AGGCGGCGTTCGAACGGGCCAAGTGACCAGATGGAGCGCCTGCAGTC
GCTGCAGCAGCAGGCCGGCATTCCGCT CTCTATCCTGCTGTCTTGA
TGGGTGAGC AGACGCAGTGA
```

Figura 1. Secuencia de nucleótidos de ADN del cromosoma 25.0750 de *L. major*.

Para obtener el gen se diseñaron dos oligonucleótidos a partir de la secuencia ya reportada. La longitud de los oligonucleótidos diseñados fue de 16 y 19 nucleótidos respectivamente ya que es un tamaño adecuado para una hibridación específica en ADN genómico.

diferentes temperaturas de alineamiento que fueron: 40, 40.2, 43.1, 45.4, 48, 50.7, 53.5, 56, 58.1, 59.8 y 60.6 °C (Tabla 2).

Tabla 2. Condiciones utilizadas para obtener el producto de PCR del gen de la PP2C de *L. major*.

Condiciones en una reacción de 100 µL	Concentración final	Volumen (µL)
ADN genómico de <i>L. major</i>	100 ng	1
Oligonucleótido sentido	200 ng	2
Oligonucleótido anti- sentido	200 ng	2
dNTP´s	0.2 mM	1
Amortiguador sin magnesio 10X	1X	10
MgCl₂	1.5 y 3 mM	3
Enzima TAQ polimerasa (Invitrogen)	1 U	0.5
H₂O cbp 100		80.5

Los ciclos de amplificación del gen se realizaron utilizando el programa que se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones para la amplificación del gen de la PP2C de *L. major*.

Condiciones	Temperatura °C	Tiempo
Desnaturalización	94	5 min
Desnaturalización	94	30 seg
Alineamiento	50.7	1 min
Extensión	72	48 seg
Extensión final	72	10 min
Temperatura final	4	
40 ciclos		

5.2.4 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

El método de electroforesis de ADN en geles de agarosa se basa en la capacidad de las macromoléculas cargadas para desplazarse en un campo eléctrico con una velocidad directamente proporcional a su carga e inversamente proporcional a su tamaño. A pH alcalino las moléculas de ADN poseen una carga negativa uniforme por unidad de masa, lo que hace que su movilidad sea hacia el polo positivo y que esté determinada por el tamaño de las moléculas (número de pares de bases)⁽³⁹⁾. De manera particular la separación de los fragmentos de ADN se realiza por electroforesis en gel de agarosa o en gel de poliacrilamida. En ambos casos se prepara con distintas concentraciones en función del tamaño de los fragmentos que se quiera separar⁽⁴⁰⁾.

El ADN purificado, las digestiones y el producto amplificado por PCR del gen de Lmj PP2C se corrieron en geles al 0.9 % y 1 % (p/v) preparados en un amortiguador TBE 1X (Tris-boratos 100 mM, EDTA 2 mM, pH 8). A la muestra se le adicionó un amortiguador que contiene 80 % de formamida desionizada, Tris-boratos 50 mM, EDTA 1 mM, xilencianol 0.1 % (p/v) y azul de bromofenol 0.1% (p/v). El marcador de tamaño molecular que se utilizó fue ϕ X 174 RF DNA/Hae III Fragments (Invitrogen). El corrimiento electroforético se realizó a 100 V durante 35

min. Posteriormente los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron las bandas de ADN con un transiluminador de luz ultravioleta (UV).

5.2.5 Purificación de ADN obtenido de los geles de agarosa

Una vez obtenidos los productos de PCR, los fragmentos de tamaño esperado (1221 pb) fueron purificados con el Kit de extracción en gel (Qiagen) que permite la recuperación del ADN a partir de geles de agarosa. El fundamento del método se basa en la adsorción del ADN a la membrana silica en presencia de una concentración alta en sales; los contaminantes pasan a través de la columna y son eliminados mediante lavados. Posteriormente, el ADN puro se eluyó con un amortiguador de TRIZMA o agua.

El fragmento de ADN correspondiente a la reacción de amplificación se cortó del gel de agarosa, se le adicionó tres veces el volumen de amortiguador por 100 mg de gel, se incubó a 50 °C por 10 min (hasta que el gel se disolvió completamente) y se mezcló cada 2 min durante la incubación. Posteriormente se verificó que el color de la mezcla fuera amarillo (similar al amortiguador) y si el color de la mezcla era anaranjado o violeta se le adicionaban 10 µL de una solución 3 M de acetato de sodio a pH 5 y se mezclaban, con lo que el color de la mezcla debería retornar a amarillo. Se adicionó la muestra a las columnas MinElute y se centrifugó por 1 min. El sobrenadante se desechó y la columna se pasó a otro tubo. Después se adicionaron 500 µL de amortiguador a la columna y se centrifugó por 1 min. Se lavó mediante la adición de 750 µL de amortiguador PE (Qiagen) y se centrifugó por 1 min. La columna se colocó en un tubo limpio de 1.5 mL y el ADN se eluyó con 10 µL de amortiguador EB (Tris-HCl, 10 mM, pH 8.5).

5.2.6 Establecimiento de las condiciones de PCR para el inserto con sitios de restricción

Con la finalidad de realizar una clonación direccional se introdujeron sitios de corte de enzimas de restricción (Tabla 4).

Tabla 4. Secuencia de oligonucleótidos para amplificar el gen de la PP2C de *L. major*. Subrayados se muestran los sitios de restricción NdeI y *Hind*III.

Oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido	Sitio de restricción
Oligo FW Lmj 25 C/ NdeI No. 5147	5'GGGAATTCC <u>CATATGGGCATTCC</u> 3'	NdeI
Oligo Rv Hind III Lmj 25 sin his No. 5148	5' CCCA <u>AAGCTT</u> CTACTGCGTCTG 3'	Hind III
Oligo Rv Hind III Lmj 25 con Tag de histidina No. 5149	5' CCCA <u>AAGCTT</u> CTGCGTCTGCT3'	Hind III

De la misma manera que en el amplificado arriba mencionado se buscaron las condiciones óptimas de amplificado del inserto con sitios de restricción para las enzimas NdeI y *Hind*III (Tabla 5), se utilizaron las mismas temperaturas de alineamiento previamente descritas (Tabla 3).

Tabla 5. Condiciones de amplificación con sitios de restricción.

Condiciones	Concentración final	Volumen (µL)
ADN <i>L. major</i>	200 ng	2
Oligonucleótido sentido con NdeI	200 ng	4
Oligonucleótido anti-sentido con <i>Hind</i>III y sin His-Tag	200 ng	4
dNTP's	0.2 mM	2
Amortiguador sin magnesio	1X	20
MgCl₂	1.5 mM	6
Enzima Taq polimerasa (Invitrogen)	1.0 U	1.0
Agua		161

El producto de PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa, la banda de peso esperado se purificó y se utilizó para clonarla en el plásmido de expresión pET 23b (Novagen) (Figura 2). El sistema de expresión pET ha sido desarrollado para la clonación y expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. Los genes de interés son clonados en el vector pET 23b y posteriormente se transforman en la cepa BL21/DE3 pLysS.

I

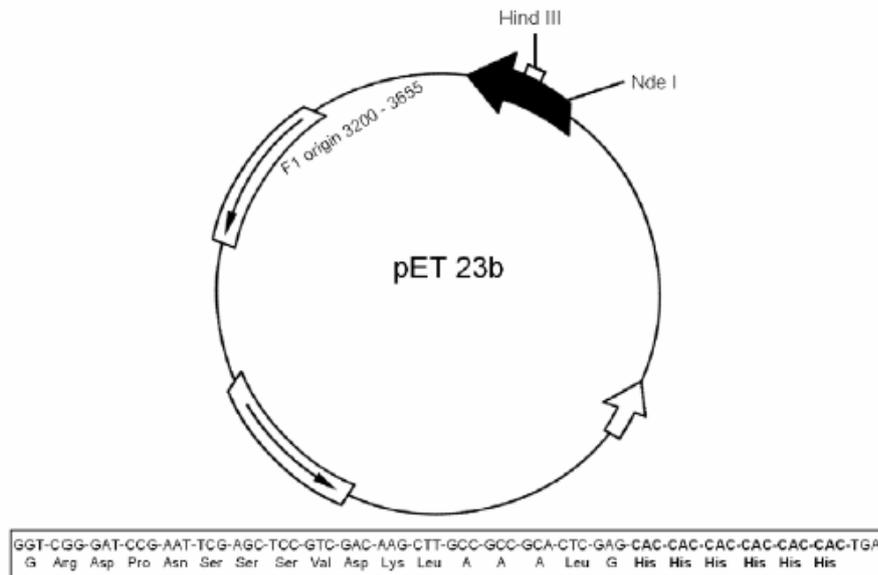


Figura 2. Mapa del vector de expresión pET 23b de Novagen. En el recuadro se muestra la zona de clonación del gen de interés. En este caso los sitios de restricción utilizados fueron para NdeI y HindIII.

5.2.7 Purificación del plásmido

Las bacterias con el plásmido se cultivaron se cultivó en un volumen de 50 mL de medio Luria Bertani (LB). Al siguiente día se centrifugaron a 3000 rpm por 20 min. El plásmido se purificó con el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). El fundamento de este método se basa en la lisis alcalina de células bacterianas, seguida de la adsorción del ADN en una membrana de sílice en presencia de altas concentraciones de sales, los contaminantes pasaron a través de la columna y

fueron eliminados mediante lavados, posteriormente el ADN puro se eluyó con un amortiguador. El procedimiento que se realizó consistió de los pasos siguientes: la pastilla se resuspendió en 250 μ L de amortiguador P1 y se transfirió a un tubo. Posteriormente se adicionaron 250 μ L de amortiguador P2 (hidróxido de sodio) y se mezcló el tubo 4 a 6 veces por inversión. Se adicionaron 350 μ L de amortiguador N3 y se mezcló nuevamente; posteriormente se centrifugó por 10 min a 13000 rpm. El sobrenadante obtenido se aplicó a la columna para la purificación de ADN y se centrifugó por 30 a 60 seg. En un paso opcional se lavó la columna adicionando 500 μ L de amortiguador PB y se centrifugó por 30 a 60 seg. Se descartó el sobrenadante y se centrifugó para remover el amortiguador de lavado adicional. Después se pasó la columna a un tubo limpio de 1.5 mL para eluir el ADN con 50 μ L de amortiguador EB o agua, posteriormente se centrifugó por 1 min.

5.2.8 Digestiones

Se hicieron las digestiones del pET 23b, del inserto Lmj PP2C con y sin His-Tag utilizando la siguiente mezcla de reacción (Tabla 6).

Tabla 6. Condiciones que se utilizaron para las digestiones del inserto Lmj PP2C con y sin His-Tag y del vector pET 23b.

	pET 23b (μL)	Inserto Lmj PP2C con y sin His-Tag (μL)
Muestra	4	6
Ndel	1	1
<i>HindIII</i>	1	1
Buffer	1	1
H₂O	3	3

El fragmento de ADN y el plásmido pET 23b se digirieron con las enzimas de restricción Ndel y *HindIII* (New England Biolabs) mediante 5 ciclos de 15 seg con intervalos de 2 min en un horno de microondas (Samsung, 2250 Mhz). Las

digestiones fueron analizadas mediante geles de agarosa. Posteriormente se realizó la desfosforilación con fosfatasa alcalina de camarón (Alkaline Phosphatase Shrimp, ROCHE) para desfosforilar los extremos generados y evitar su religación, con la finalidad de aumentar su eficiencia de clonación. Una vez realizada la mezcla de reacción se incubó a 37 °C por 30 min. Para inactivar la fosfatasa se incubó a 65 °C por 15 min.

5.2.8.1 Purificación del ADN plasmídico por “Cleanup”

Al ADN plasmídico se le adicionaron 300 µL de amortiguador ERC (hidroclorhidro de guanidina e isopropanol) y se mezcló. El volumen máximo de reacción que se procesó por cada columna MinElute fue de 100 µL. Se verificó que el color de la mezcla fuera amarillo (similar al amortiguador ERC sin la reacción enzimática) y para la unión del ADN, se agregó la muestra a la columna de MinElute y se centrifugó 1 min. El sobrenadante obtenido se descartó y posteriormente se adicionaron 750 µL de amortiguador PE y se centrifugó 1 min. El ADN se eluyó con 10 µL de amortiguador.

5.2.9 Ligaciones

Las digestiones analizadas mediante electroforesis en geles de agarosa se purificaron y se usaron para la reacción de ligación, la cual se llevó a cabo por la incubación del plásmido digerido y desfosforilado y el inserto digerido en una relación 1:3 (plásmido:inserto) en presencia de la T4 ADN Ligasa (4 U/µl) (Invitrogen) a 16 °C durante toda la noche en el equipo PTC-100 (Programable Thermal Controller). La enzima T4 ligasa une un extremo 3' con otro 5' utilizando ATP.

Los productos de la reacción de ligación se usaron para transformar células competentes de alta replicación de *E. coli* Top 10. Esto se llevó a cabo en la siguiente forma: para cada ligación se utilizaron 75 µL de células previamente descongeladas. Se dejó en hielo 30 min y se dio un choque térmico a 42 °C por 1 min (lo que permitió el cierre de los poros y evitó la pérdida del plásmido). Después se colocó 2 min en hielo y posteriormente se agregó medio (LB) recién

preparado y se incubó a 37 °C durante 1 h en agitación. Transcurrido el tiempo se centrifugó y la pastilla se resuspendió en un volumen muy pequeño de medio, se plaquearon cajas con LB con 100 µg/mL de ampicilina para obtener colonias con células transformantes. De las colonias transformadas se hicieron pequeños parches en cajas LB y se les extrajo ADN utilizando el Kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen (ver sección 5.2.7).

Este ADN se utilizó para realizar ensayos de restricción con enzimas NdeI y *Hind*III, verificando de esta manera que efectivamente las colonias contenían el gen de interés. Las clonas positivas se utilizaron para la extracción y secuenciación del ADN (en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM) y de esta forma confirmar que el gen Lmj PP2C estaba completo y no presentaba ninguna mutación. Las células competentes se prepararon de acuerdo al procedimiento que a continuación se describe.

5.2.9.1 Preparación de las células competentes

Las células competentes DH5α se cultivaron en 100 mL de medio LB sin antibiótico durante toda la noche a 37 °C en agitación. De este cultivo se tomó 1 mL que se depositó en 200 mL de medio de cultivo LB y se colocó en agitación de 2 a 3 h a 37 °C. Posteriormente se determinó la absorbancia a 550 nm donde el valor obtenido se encontró en un rango de 0.5 a 0.6. Las células se centrifugaron a 2500 rpm 10 min a temperatura ambiente y la pastilla se resuspendió en 40 mL de amortiguador frío formado por CH₃COOK 30 mM, MnCl₂ 50 mM, RbCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol al 12 % (v/v) a pH final de 5.8, esto por cada 100 mL de cultivo y se incubó en hielo durante 2 h. Posteriormente las células se centrifugaron a 2500 rpm a 4 °C. La pastilla se resuspendió en 4 mL de amortiguador formado por MOPS 10 mM a pH 7, CaCl₂ 75 mM, RbCl 10 mM, glicerol al 12 % (v/v) por cada 100 mL de medio de cultivo y se dejó en hielo durante 1 h.

5.3 Expresión de la proteína PP2C de *L. major*

El ADN en el que se confirmó la ausencia de errores en la secuencia se utilizó para transformar células de *E. coli* BL21De3pLysS. Las células se sembraron en cajas con medio LB con 100 µg/mL de ampicilina y se establecieron las diferentes condiciones de inducción. Estas células presentan características que son compatibles con el sistema de expresión pET. La cepa BL21De3pLysS contiene una copia cromosómica del gen de la T7 ARN polimerasa insertado en el gen del *lacZ* que es controlado por el promotor *lac*. Este gen se encuentra bajo el control del promotor LacUV45, que a su vez es inducido por Isopropil-B-D-tiogalactopiranosido (IPTG). Esta cepa contiene además el plásmido pLys que codifica para la lisozima del fago T7 que inhibe a la T7 ARN polimerasa. Esto permite controlar la expresión del gen clonado en pET 23b. El sistema de sobreexpresión empleado se muestra en la Figura 3.

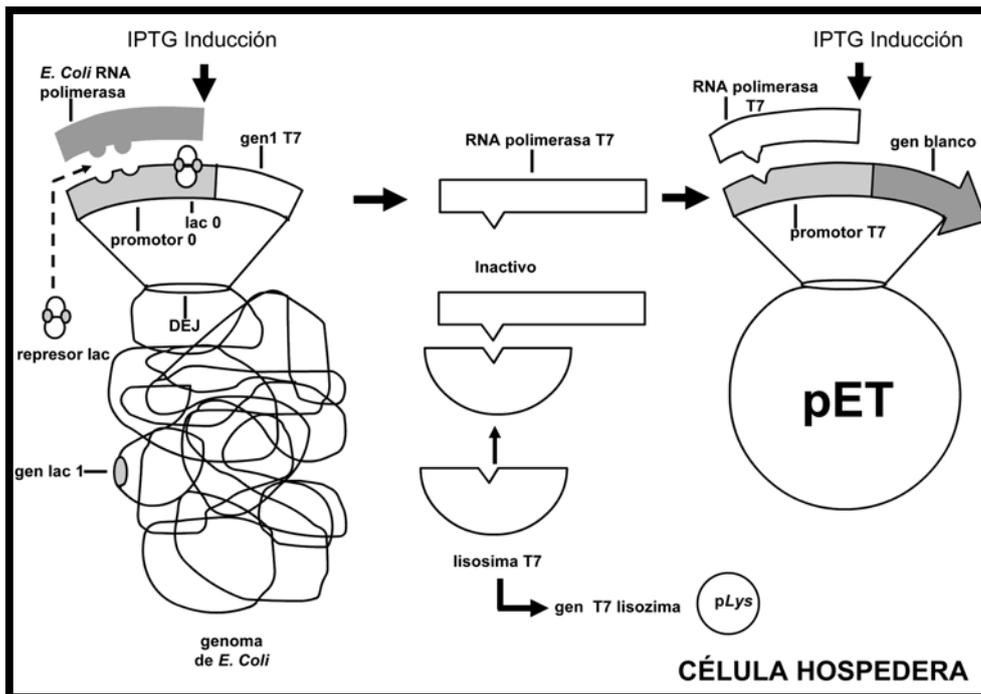


Figura 3. Sistema de expresión pET en *E. coli* BL21De3pLysS.

5.3.1 Condiciones de inducción

Una vez que las cepas de expresión fueron clonadas, se colocó un precultivo de *E. coli* en un volumen de 50 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL). Este cultivo contenía el plásmido con el gen para la Lmj PP2C con y sin His-Tag. Se incubó a 37 °C toda la noche y al día siguiente se centrifugó a 3000 rpm por 20 min. La pastilla celular se resuspendió en medio nuevo para eliminar las β-lactamasas que pudieran inactivar la ampicilina y con esto disminuir la selectividad del cultivo. Se inoculó en una $A_{600\text{ nm}} = 0.1$ y se incubó a 37 °C hasta alcanzar una $A_{600\text{ nm}} = 0.8-1$. Esto permite tener un cultivo en la fase logarítmica de crecimiento para lograr una mayor inducción. Se realizaron condiciones de inducción con IPTG a 0.4 mM, con temperaturas de 21, 30 y 37 °C en tiempos de 3 h y toda la noche. Estos ensayos se analizaron en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

5.3.2 Sobreexpresión de las enzimas PP2C con y sin His-Tag

Se prepararon precultivos de *E. coli* BL21De3pLysS con los genes de la PP2C con y sin His-Tag en medio LB con ampicilina (100 µg/ mL). Se incubaron a 37 °C toda la noche en agitación constante, al día siguiente se centrifugaron y la pastilla de células se resuspendió en medio LB fresco con ampicilina. Posteriormente se inocularon cultivos de 200 mL y se inició el crecimiento $A_{600\text{ nm}} = 0.1$. La incubación a 37 °C fue constante hasta alcanzar una $A_{600\text{ nm}} = 1$. Se indujeron los cultivos adicionando IPTG a 0.4 mM y la inducción se llevó a cabo a 37 °C por 3 h para el caso de la PP2C con His-Tag y a 30 °C toda la noche para la PP2C sin His-Tag con agitación constante.

5.3.3 Obtención del extracto total y la fracción soluble de la PP2C

Un cultivo de 200 mL de medio LB con las bacterias inducidas durante 3 h se centrifugó a 3000 rpm por 20 min a temperatura ambiente y la pastilla se resuspendió en 8 mL de amortiguador A (Tris/HCl 50 mM pH 8 NaCl 300 mM, leupeptina 100 µM, aprotinina 2 µg/ mL y benzamidina a 15 µg/mL e imidazol 5 mM) y para la PP2C sin His-Tag es similar solo que cambia la concentración del

NaCl a 250 mM y sin imidazol. Las células se rompieron por sonicación en un sonicador (modelo VCX 650 Ultrasonic, Ultrasonics Inc.) en frío, con 10 ciclos de 40 seg con intervalos de 2 min entre cada ciclo. Un punto importante en este paso para evitar la desnaturalización de la enzima y por consiguiente la pérdida de su actividad enzimática, fue por un lado mantener una temperatura de 4 °C y por otro la formación de burbujas que generan tensión superficial.

El extracto obtenido se ultracentrifugó a 43000 rpm por 20 min a 4 °C (rotor 60 Ti en una centrifuga Beckman XL-90). Al sobrenadante y la pastilla obtenidos se les determinó la concentración de proteína por el método de Bradford (Protein Assay Bio-Rad), el reactivo contiene azul de Coomassie y se une primariamente a residuos de aminoácidos aromáticos y básicos especialmente a la arginina, formando un complejo colorido el cual se mide a 595 nm. Se realizó una curva patrón con albúmina sérica bovina (BSA) para interpolar los resultados obtenidos.

5.3.4 Purificación de la enzima PP2C mediante cromatografía de afinidad

La purificación de la enzima se realizó mediante la utilización de una cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (Bio-Rad). En esta técnica se utiliza una resina acoplada a níquel. El fundamento consiste en utilizar un ligando quelante como es el ácido iminodiacético (IDA) en el cual la amina terciaria y las cadenas laterales del ácido carboxilo está cargado con Ni^{2+} lo cual trae como resultado la alta selectividad de proteínas con residuos de histidina las cuales van a ser retenidas sobre el soporte cromatográfico.

El extracto obtenido por sonicación se centrifugó a 45000 rpm por 30 min y el sobrenadante se filtró en un poro de 45 μm (Millipore) y se agregó a la columna de afinidad previamente lavada con agua desionizada y equilibrada con un amortiguador de unión (Tris-HCl 50 mM a pH 8, NaCl 300 mM e imidazol 5 mM) tres veces su volumen, se dejó interaccionar 1 h en agitación y posteriormente el material no unido se lavó con amortiguador de lavado tres veces su volumen y se eluyó con un gradiente de imidazol de 5 a 500 mM. El proceso de purificación se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A todos los eluidos se les determinó proteína por el método de Bradford y a los que la

contenían se les agregó amortiguador de muestra (SDS 3.6 % (P/V), Tris/HCl 0.15 M a pH 6.8, glicerol 25.5 % (V/V), β -mercaptoetanol 10 % y azul de bromofenol 0.1 %). Los geles se corrieron a 70 V por 30 min o bien a 120 V por 1.5 h y se tiñeron con azul de Coomassie por 1 min en el horno de microondas y luego se destiñeron con agua por 2 ciclos de 10 min cada uno.

5.3.5 Cuantificación de proteínas por el método de ácido bicinconínico

Las proteínas presentes en el sobrenadante y en la pastilla se cuantificaron por el método del ácido bicinconínico (BCA, Protein Assay Reagent Kit de Pierce). Este método combina la reducción de Cu^{2+} a Cu^{1+} por acción del enlace peptídico en medio alcalino (reacción de Biuret) con la detección colorimétrica del catión Cu^{1+} usando ácido bicinconínico. El producto del color morado de esta reacción se forma por el complejo de dos moléculas de BCA con un ión cuproso. El complejo soluble que se formó presenta absorbancia a 562 nm. La cuantificación se realizó interpolando los valores problema en una curva patrón de BSA.

5.3.6 Geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

La calidad de la expresión de las enzimas bajo las condiciones establecidas con las diferentes enzimas (Lmj PP2C con y sin His-Tag) se determinó por electroforesis en geles de poliacrilamida. Se corrieron muestras bacterianas que fueron ajustadas a la densidad óptica y se disolvieron en 10 μL del amortiguador de muestra. Los geles se corrieron a 80 V por 20 min, posteriormente se aumentó el voltaje a 120 V por 1 h y se tiñeron con azul de Coomassie por 1 min y se destiñeron en agua.

Para confirmar la presencia de las colas de histidina en la proteína Lmj PP2C se realizó un Western blot y las muestras que se corrieron fueron el extracto de bacterias inducidas y no inducidas, el sobrenadante y la pastilla. Se corrió el gel (en las condiciones mencionadas en la sección 5.3.6) y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, posteriormente ésta se incubó con el anticuerpo primario monoclonal Anti-His₆-Peroxidasa (Roche) a una dilución 1:2000 toda la noche. Al día siguiente la membrana se reveló por quimioluminiscencia (Pierce).

5.4 Seguimiento de la actividad enzimática de la fosfatasa PP2C de *L. major*

5.4.1 Determinación de la actividad enzimática de fosfatasa

La actividad de fosfatasa se determinó en los diferentes eluidos obtenidos por cromatografía de afinidad. Se preparó 1 mL de la mezcla de reacción que está formada por una solución amortiguadora de Hepes 50 mM a pH 8, 10 μ L de *p*-NPP 1 M y 10 mM de MgCl₂. Posteriormente se incubó en baño maría a 37 °C durante 30 min y la reacción se detuvo por la adición de 200 μ L de NaOH 2N. El *p*-nitrofenol generado se analizó a 405 nm en el espectrofotómetro “Life Science UV/Vis DU[®] 530 de Beckman”.

5.4.2 Determinación del pH óptimo de fosfatasa de la PP2C de *L. major*

Con la finalidad de conocer el pH óptimo de fosfatasa de la PP2C purificada de *L. major*, se realizó el procedimiento mencionado en la sección 5.4.1, solo cambiaron los amortiguadores utilizados que fueron acetato de sodio a pH 5; MES a pH 5.5, 6 y 6.5; MOPS a pH 7 y 7.5; HEPES a pH 8; TRIS a pH 8.5 y 9 y CAPS a pH 10 y 11, todos a una concentración de 50 mM.

5.4.3 Efecto de cationes divalentes sobre la actividad de fosfatasa de la PP2C de *L. major*

Para la realización de la actividad enzimática, se utilizaron varios cationes (MgCl₂, MnCl₂, CaCl₂, ZnCl₂) a diferentes concentraciones (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 mM).

5.4.4 Efecto de inhibidores específicos sobre la actividad de fosfatasa de la PP2C de *L. major*

La actividad enzimática de fosfatasa se realizó con HEPES 50 mM a pH 8, MgCl₂ 10 mM y con inhibidores de la actividad de PTP (ortovanadato de sodio 200 μ M, molibdato de amonio 200 μ M y pervanadato de sodio a 50 μ M) e inhibidores para la PS/TP (caliculina 5 nM y ácido okadáico 1 μ M). Para verificar que los inhibidores fueran funcionales se analizó su efecto sobre la actividad enzimática de la PTP recombinante de *Yersinia enterocolitica* (Calbiochem).

5.4.5 Determinación de la actividad de PTP y PS/TP de la PP2C de *L. major*

Con la proteína purificada se analizó la actividad de PTP y PS/TP, utilizando en cada caso un Kit “Ser/Thr” o “Tyrosine Phosphatase Assay System” (Promega) que contiene péptidos específicos con un sitio de fosforilación, uno de ellos en tirosina (END (pY) INASL) y otro en treonina (RRA (pT) VA). Este sistema determina la cantidad de fosfato libre generado en la reacción por la acción de la enzima PTP. La actividad se analizó en un amortiguador HEPES 50 mM a pH 8 y se realizó una curva patrón utilizando un estándar de fosfatos 1 mM que fue diluido a diferentes concentraciones (500, 1000, 2000, 3000, 4000 picomoles). Se analizaron 0.7 µg de la proteína purificada y se incubaron con 5 µL de sustrato en un volumen total de reacción de 100 µL durante 15 min. La reacción fue finalizada por la adición de 50 µL de “Dye/additive”, posteriormente la absorbancia a 630 nm se registró en un lector para microplacas (EL 312e Microplate Bio-Tek Instruments) utilizando el programa KC4 v 2.7.

5.4.6 Determinación del pH óptimo de la actividad PS/TP de la PP2C de *L. major*

Para la determinación del pH óptimo de PS/TP se utilizaron los amortiguadores indicados en la sección 5.4.2 y se realizó el procedimiento de la sección 5.4.5 con una modificación en la metodología que fue utilizar fosfotreonina (RRA (pT) VA) como sustrato.

5.5 Ensayos de Western blot utilizando anticuerpos anti PTP para la identificación de la PP2C de *L. major*

Las proteínas separadas electroforéticamente se transfirieron a un papel de nitrocelulosa (Bio-Rad) y las membranas se bloquearon con 5 % de leche en TBST 1X (NaCl 150 mM, Tween 20 0.05 %, Tris-HCl 10 mM pH 7.4) durante 1 h a temperatura ambiente en agitación constante y posteriormente se lavó con TBST 1X cada 10 min durante 1h. Después la membrana se incubó con los anticuerpos específicos anti-PTP1B de placenta humana (Calbiochem) en una dilución 1:100, anti-Tyr Acp 115 de *Trypanosoma brucei*, 1:1000 y anti-SHP1 (Santa Cruz

Biotechnology) 1:1000 diluidos en TBST 1X durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente las membranas se lavaron cada 10 min durante 1 h con TBST 1X. Posteriormente se incubaron con los anticuerpos secundarios específicos para cabra anti ratón y cabra anti conejo conjugados a fosfatasa alcalina (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1:5000 durante 1 h a temperatura ambiente. Se retiró el anticuerpo, se lavó durante 1 h con TBST 1X cada 10 min y la membrana fue revelada utilizando el sustrato BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato) y NBT (cloruro de nitro-azul de tetrazolium) en un amortiguador AP (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM y MgCl₂ 5 mM).

5.6 Generación de anticuerpos policlonales para la PP2C de *Leishmania major*

Se utilizaron dos conejos hembras nueva Zelanda de 6 meses de edad a los que previamente se les sangró de la oreja para obtener suero preinmune. Cinco días después se les inoculó 200 µg de la proteína Lmj PP2C purificada de *L. major* vía intradérmica. Estos conejos recibieron cuatro estímulos en intervalos de 8 a 9 días, el primero fue con adyuvante completo de Freund's (Gibco), el segundo con adyuvante incompleto de Freund's (Gibco), el tercer y cuarto estímulos fueron sin adyuvante y el vehículo que se usó para resuspender la proteína Lmj PP2C fue PBS 1X estéril. Se dejó reposar a los conejos 8 días y nuevamente se realizó un sangrado de la oreja para obtener el suero inmune. Para verificar la presencia de anticuerpos contra la Lmj PP2C se realizaron dos determinaciones, una de ellas fue la prueba de inmunodifusión que consistió en incorporar la proteína Lmj PP2C purificada dentro de un pozo hecho en agar y en otro se colocó el suero inmune. Se incubó toda la noche y al día siguiente se revisó la prueba. Conforme el antígeno se difunde dentro del agar y si el suero presenta los anticuerpos contra la Lmj PP2C, se forma un precipitado. Por otro lado, se realizó la técnica de ELISA para cuantificar los anticuerpos producidos en los sueros inmunes, ésta consiste en fijar el antígeno de Lmj PP2C en placas de 96 pozos y después colocar los sueros de conejo donde se encuentran los anticuerpos que reconocen el antígeno fijado. Posteriormente, se agrega un

anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa que reconoce la unión del antígeno con el anticuerpo y finalmente se revela con el sustrato específico para la enzima. Una vez que se presenta la reacción se lee en un espectrofotómetro para obtener el título de los anticuerpos.

5.7 Localización de la PP2C en promastigotes de *L. major* por inmunofluorescencia

Los parásitos se lavaron con PBS 1X y la pastilla obtenida se resuspendió nuevamente en este amortiguador. Se tomó una alícuota y se resuspendió en un portaobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente. Se fijó 15 min en acetona fría y se secó a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó 30 min con el suero inmune (anti-PP2C) y el suero preinmune a una dilución 1:50 en PBS 1X. Después se lavó tres veces con PBS 1X y se incubó con el anticuerpo secundario cabra anti-conejo/isotiocianato de fluoresceína (FITC, Zymed) 1:50 diluido en PBS 1X. Se lavó con PBS 1X y se montó con medio para fluorescencia (DAKO). Posteriormente se observó al microscopio de epifluorescencia (Axio Image, M1 Zeiss).

VI. RESULTADOS

6.1 Establecimiento de las condiciones óptimas de PCR

Para aislar el gen de la Lmj PP2C se usaron dos oligonucleótidos diseñados con base en la secuencia ya reportada para *Leishmania major* Friedlin. En las Figuras 4 y 5 se muestran los productos de PCR amplificados con Mg₂Cl a 1.5 mM y 3 mM. En ambos amplificados se observó que en todas las temperaturas amplificó un producto de alrededor de 1221 pb siendo éste mayor a partir de 50.7 °C y hasta 59.8 °C con Mg₂Cl a 1.5 mM. Se seleccionó la concentración de 1.5 mM de MgCl₂ y la temperatura de 50.7 °C para poder purificar la banda.

6.2 Purificación del ADN a partir de los fragmentos de agarosa

En la Figura 6, se muestra el producto amplificado por las condiciones mencionadas en la sección 6.1. Posteriormente se cortó la banda y se realizó el proceso de purificación de ADN a partir del gel. Para verificar si el amplificado obtenido correspondía a lo esperado, el producto de PCR purificado se envió a secuenciar en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Con los datos proporcionados de la secuenciación se realizó el alineamiento de la secuencia con la que se encuentra reportada en el genoma de *L. major*. En la Figura 7 se observó que en la secuencia de oligonucleótidos de la parte intermedia no hubo lectura por lo que se diseñó un par de oligonucleótidos internos, se amplificó por PCR esa región y se envió a secuenciar. El resultado mostró que la secuencia fue la misma para los oligonucleótidos de la PP2C de *L. major* Friedlin (dato no mostrado).

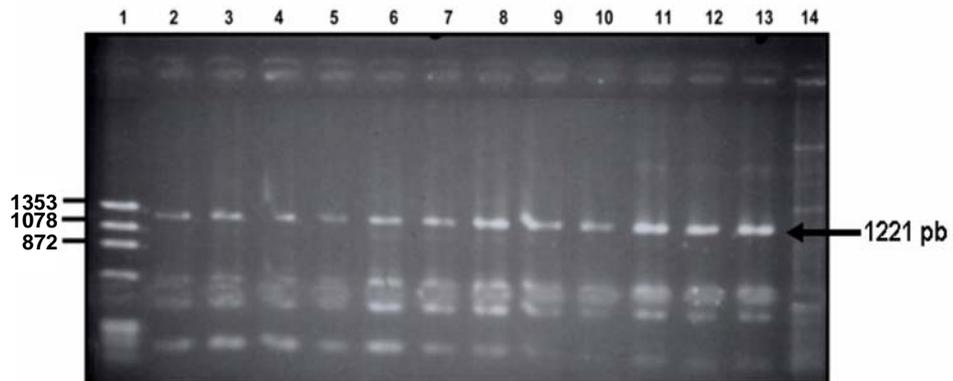


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 0.9 %. Productos amplificados por PCR del gen de la PP2C de *L. major* a una concentración de 1.5 mM de $MgCl_2$. Carril 1) marcador de tamaño molecular (MTM); carriles 2-13) diferentes temperaturas de alineamiento: 40, 40.2, 43.1, 45.4, 48, 50.7, 53.5, 56, 58.1, 59.8 y 60.6 °C y carril 14) H_2O como control.

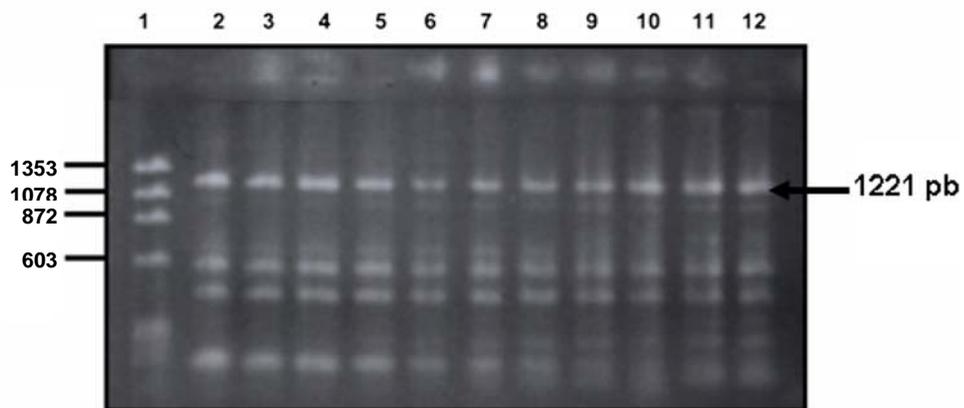


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 0.9 %. Productos amplificados por PCR del gen de la PP2C de *L. major* a una concentración de 3 mM de $MgCl_2$. Carril 1) MTM; carriles 2-12) diferentes temperaturas de alineamiento: 40, 40.2, 43.1, 45.4, 48, 50.7, 53.5, 56, 58.1, 59.8 y 60.6 °C.

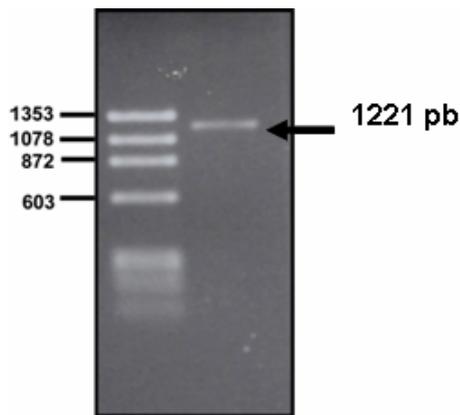


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 0.9 %. Producto amplificado por PCR del gen de la PP2C de *L. major* a una concentración de 1.5 mM de MgCl₂.

```

Seq1 ATGGGCATTCCACTTCCGAAGCCGGTGATGACGCAGCTCCAGGAGCGTTACGGAAACACC Seq1 GACGGCGTCTTTGAGGGCAACTTCCCGAACGAGGAGGTGGTGGCCTACGTGAAGCAGCAG
Seq2 -----TGATGACGCAGCTCCAGGAGCGTTACGGAAACACC Seq2 -----TCCTTGAGGGCAACTTCCCGAACGAGGAGGTGGTGGC-TACGTGAAGCAGCAG
*****
Seq1 ATCTTTTCGCTGCGGTTCCAACGTGTGAATGGGTACCGCGAGACCATGGAGGATGCCCAT Seq1 CTGGAGACCTGCAACGACCTCGCCGAGGTGGCCGGGAGTGTGTGCGAGGAGGCGATCGAG
Seq2 ATCTTTTCGCTGCGGTTCCAACGTGTGAATGGGTACCGCGAGACCATGGAGGATGCCCAT Seq2 CTGGAGACCTGCAACGACCTCGCCGAGGTGGCCGGGAGTGTGTGCGAGGAGGCGATCGAG
*****
Seq1 CTGACGTACCTGACGGATAGCTGGGGTTCTTCGGCGTCTTCGACGGCCATGTGAATGAC Seq1 CGCGGCAGCCGTGACAACATCTCCTGCATGATCGTGCAGTTAAGGACGGCAGCGACTAC
Seq2 CTGACGTACCTGACGGATAGCTGGGGTTCTTCGGCGTCTTCGACGGCCATGTGAATGAC Seq2 CGCGGCAGCCGTGACAACATCTCCTGCATGATCGTGCAGTTAAGGACGGCAGCGACTAC
*****
Seq1 CAGTGTTCGCAGTACCTCGAGAGGGCATGGCGCAGCGCCATTGAGAAGGAATCGATCCCC Seq1 GCTGCTGCCCGGCACACCACCGTTGTGCCCGGGCCGTTTAGCGCACCGGCAACAGCGGC
Seq2 CAGTGTTCGCAGTACCTCGAGAGGGCATGGCGCAGCGCCATTGAGAAGGAATCGATCCCC Seq2 GCTGCTGCCCGGCACACCACCGTTGTGCCCGGGCCGTTTAGCGCACCGGCAACAGCGGC
*****
Seq1 ATGACGGATGAGCGGATGAAGGAGCTGGCACTGCAGATCGACAGGAGTGGATGGACTCG Seq1 TTCCGTAAGGCGTACGAGTCCATGGCAGACAAAGGCAACACCACCGTGGGCGCCCTCCTA
Seq2 ATGACGGATGAGCGGATGAAGGAGCTGGCACTGCAGATCGACAGGAGTGGATGGACTCG Seq2 TTCCGTAAGGCGTACGAGTCCATGGCAGACAAAGGCAACACCACCGTGGGCGCCCTCCTA
*****
Seq1 GGCCGCGAGGGCGGCAGCACGGGCACCTTCTTTGTGGCTCTCAAGGAGGGCAACAAGGTG Seq1 GAAAAGCGCTACGACACCCTCAAGGCCGCCGAGGCCCTCACGCCGAAGAAACGGGAAGAG
Seq2 GGCCGCGAGGGCGGCAGCACGGGCACCTTCTTTGTGGCTCTCAAGGAGGGCAACAAGGTG Seq2 GAAAAGCGCTACGACACCCTCAAGGCCGCCGAGGCCCTCACGCCGAAGAAACGGGAAGAG
*****
Seq1 CACCTGCAGGTTGGTAACGTGCGTGACTCGCGTGTGGTGGCCTGCATCGATGGTGTGTGC Seq1 CTGAGCCAGTTTGAAGAACGGCCCGAGGCGAAGCTCACAGGCGCCGAGCGTCAGAAGTGG
Seq2 CACCTGCAGGTTGGTAACGTGCGTGACTCGCGTGTGGTGGCCTGCATCGATGGTGTGTGC Seq2 CTGAGCCAGTTTGAAGAACGGCCCGAGGCGAAGCTCACAGGCGCCGAGCGTCAGAAGTGG
*****
Seq1 GTCCCTCTGACGGAGGACCACAAGCCAAATAATGAAGGGGAGCGCCAGCGCATTGAGAAC Seq1 TTCTCGAACTACTTCCAGAAGCTCTGCGAGGCGGCGTCAAGCGGCCAAGTGACCAGATG
Seq2 GTCCCTCTGACGGAGGACCACAAGCCAAATAATGAAGGGGAGCGCCAGCGCATTGAGAAC Seq2 TTCTCGAACTACTTCCAGAAGCTCTGCGAGGCGGCGTCAAGCGGCCAAGTGACCAGATG
*****
Seq1 TGC GCGGGTTCGTGTGGAGAACAACCGCGTCGATGGCAGCCTGGCCGTCAGTCGGGCTTTC Seq1 GAGCGCCTGCAGTCGCTGCGAGCAGCAGGCCGATTCGGCTCTCTATCCTGCTGCTCTTG
Seq2 TGC GCGGGTTCGTGTGGAGAACAACCGCGTCGATGG-AGCCTGGCCGTCAGCGGGCTTTC Seq2 GAGCGCCTGCAGTCGCTGCGAGCAGCAGGCCGCA-----
*****
Seq1 GCGCACCGGAGTACAAGCTAGGCAGTGGTAGTCAGCTGGAGCAGAAGGTGATCGCCTTA Seq1 ATGGGTGAGCAGACGCAAGTGA
Seq2 G----- Seq2 -----
*
Seq1 GCAGATGTCCAGCACAAGGATCTCACCTTCAACTCGAACGACTTTGTGCTGCTGTGCTGC Seq2 -----
Seq2 -----

```

Figura 7. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de la PP2C de *L. major*. La secuencia de nucleótidos de 1221 pb codifica para 406 aminoácidos.

6.3 Condiciones para la clonación del gen de la PP2C de *L. major*

6.3.1 Establecimiento de las condiciones de PCR para el inserto con sitios de restricción

Se analizaron las condiciones óptimas de amplificación del inserto con sitios de restricción para las enzimas NdeI y HindIII. Para esto se realizó un gradiente de temperatura de 40 a 60.6 °C. En la Figura 8 se muestra el gel de este amplificado en donde se observó que en todas las temperaturas se amplificó el gen.

De este ensayo se eligió la temperatura de 50.7 °C para amplificar ambas condiciones (PP2C con His-Tag y PP2C sin His-Tag) (Figura 9).

6.3.2 Digestiones y ligaciones

En la Figura 10 se muestra el ADN de la PP2C con y sin His-Tag, además de las proporciones del plásmido e inserto que se utilizaron en la reacción de ligación descrita en la sección 5.2.9 (Figura 10 A, 10 B y 10 C). Un día después de la ligación se hizo la transformación en células competentes de *E. coli* DH5 α para comprobar la presencia del inserto en las diferentes clonas obtenidas después de la transformación de los productos de ligación. Los ADNs plasmídicos se sometieron a un análisis con las enzimas de restricción NdeI y HindIII.

6.3.3 Liberación del inserto

La Figura 11 muestra el producto de digestión obtenido por las enzimas de restricción NdeI y HindIII de las clonas transformantes. Las clonas que presentaron el inserto de 1221 pb que corresponde al tamaño del gen de Lmj PP2C fueron las que se seleccionaron para secuenciar el ADN.

6.3.4 Secuenciación y alineamiento del ADN de las clonas positiva

El ADN de las clonas positivas se purificó y se envió a secuenciar en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Una vez que se obtuvo la secuencia, se realizó el alineamiento utilizando como molde la secuencia del gen ya reportado. La Figura 12 muestra el alineamiento para ambos genes Lmj PP2C con y sin His-Tag, donde se observó que el gen

que se clonó correspondió al gen Lmj PP2C ya reportado para *L. major* cepa Friedlin.

6.3.5 Expresión de la proteína PP2C y condiciones de inducción

Una vez que se confirmó la secuencia correcta del gen para la Lmj PP2C se procedió a la determinación de las condiciones de sobreexpresión de la enzima. Se analizaron diferentes condiciones de temperatura y tiempo de inducción a una concentración de 0.4 mM de IPTG, estas condiciones se analizaron en geles de poliacrilamida (Figuras 13 y 14). Se observó que la inducción de la expresión de la PP2C de *L. major* con His-Tag, inició desde las 3 h a 21 °C, encontrando la mayor expresión a 37 °C, la cual disminuyó cuando el cultivo inducido se dejó toda la noche a esa temperatura (Figura 13). En el caso de la PP2C de *L. major* sin His-Tag. (Figura 14), la inducción de la proteína se inició a partir de las 3 h a 21 °C y permaneció toda la noche a 37 °C. Para asegurar la purificación de la proteína PP2C de *L. major* con His-Tag, se eligió la condición de 37 °C durante 3 h. Posteriormente se analizó en que fracción se encontraba la proteína y se observó que la proteína sin His-Tag se encontró en la fracción soluble (sobrenadante) mientras que la proteína con la His-Tag se presentó en la pastilla (Figura15).

6.3.6 Detección de His-Tag en la proteína PP2C de *L. major*

Con la finalidad de corroborar que la proteína presentaba His-Tag, se corrió en geles SDS-PAGE y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente se analizó con anticuerpos específicos que reconocen seis residuos de histidina consecutivos y se encontró que efectivamente, la proteína PP2C recombinante de *L. major* presentaba las colas de histidina (Figura 16).

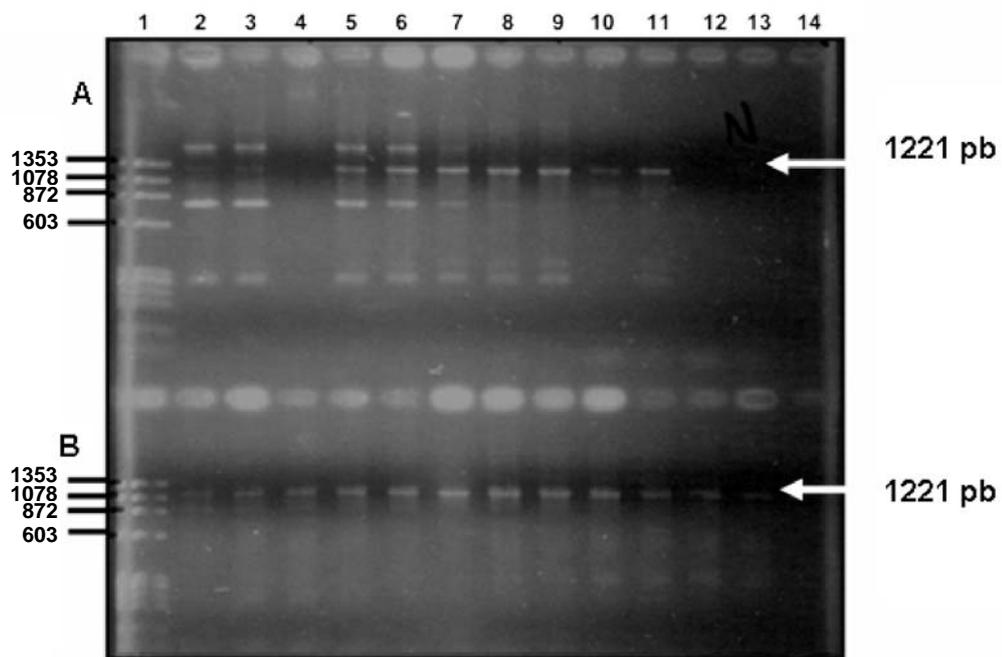


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 0.9 %. Productos amplificados por PCR del gen para la PP2C de *L. major* a 1.5 mM de $MgCl_2$ con sitios de restricción. Carril 1) MTM; carriles 2-12) diferentes temperaturas de alineamiento 40, 40.2, 43.1, 45.4, 48, 50.7, 53.5, 56, 58.1, 59.8 y 60.6 °C y carril 14) H_2O como control. A) PP2C de *L. major* con His-Tag y B) PP2C de *L. major* sin His-Tag.

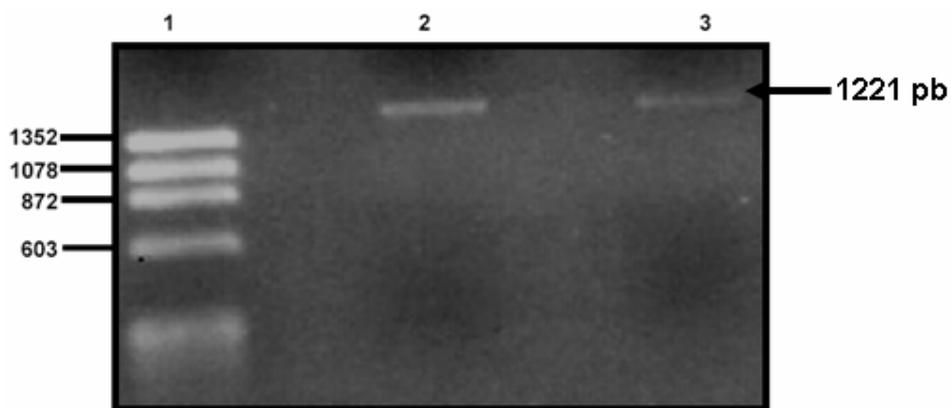


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 %. Productos amplificados por PCR del gen para la PP2C de *L. major* con sitio de restricción *NdeI* y *HindIII* con y sin His-Tag. Carril 1) MTM, carril 2) con His-Tag y carril 3) sin His-Tag.

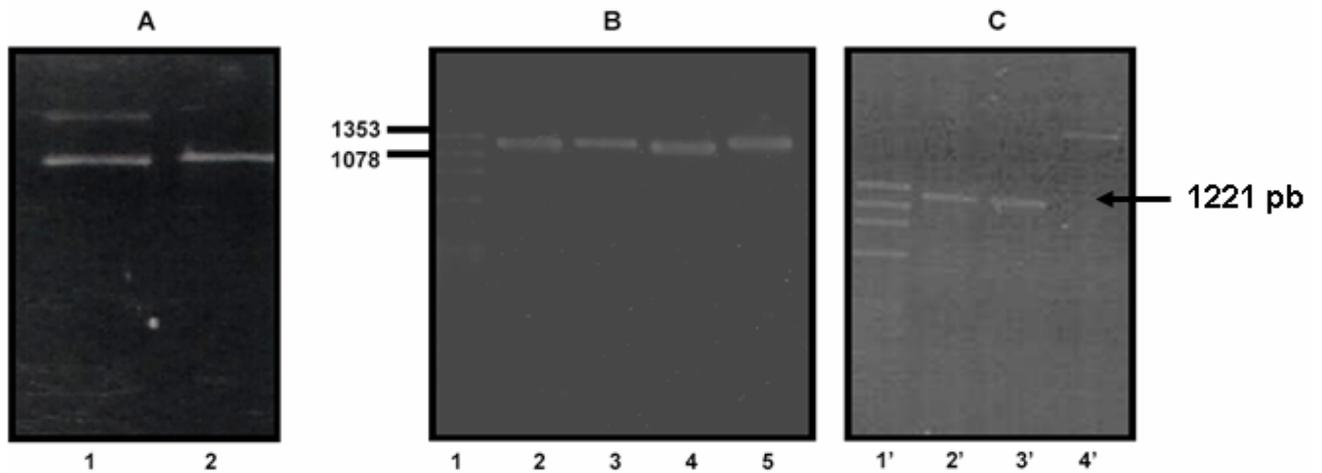


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1 %. A) Muestra el corrimiento de las digestiones con las enzimas de restricción NdeI y HindIII del plásmido pET 23b, 1) sin digerir y 2) digerido.

B) Digestiones del Inserto 1) MTM, 2) PP2C de *L. major* sin His-Tag y sin digerir, 3) PP2C de *L. major* sin His-Tag y digerido, 4) PP2C de *L. major* con His-Tag y sin digerir, 5) PP2C de *L. major* con His-Tag y digerido.

C) Proporciones del plásmido e inserto para las reacciones de ligación. 1) MPM, 2) PP2C de *L. major* sin His-Tag, digerido y purificado, 3) PP2C de *L. major* con His-Tag, digerido y purificado, 4) pET 23b digerido y purificado.

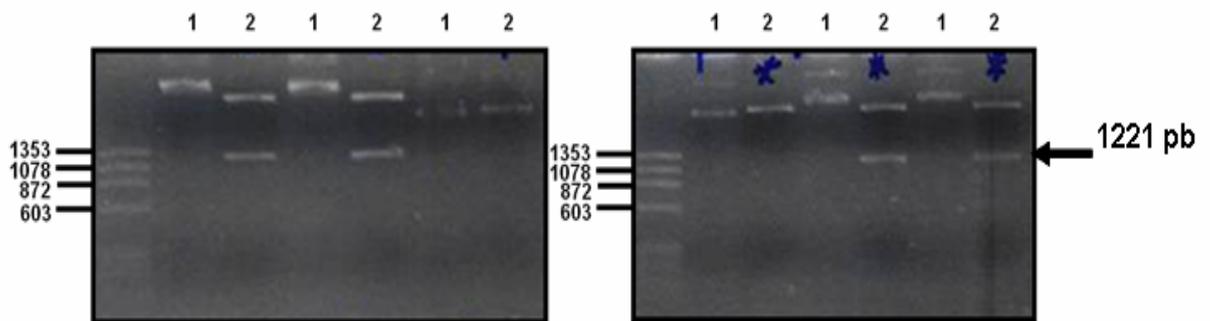


Figura 11. Análisis del ADN sin digerir (1) y digerido (2). El ADN de cada colonia se purificó y se digirió con NdeI y Hind III.

<p>A</p> <pre> origin ATGGGCATTCCACTTCCGAGCCGGTGTATGACGCAGCTCCAGGAGCGTTACGGAAACACC Promot ATGGGCATTCCACTTCCGAGCCGGTGTATGACGCAGCTCCAGGAGCGTTACGGAAACACC origin ATCTTTCGCTGCGGTTCCTCACTGTGTGAATGGGTACCCGAGACCATGGAGGATGCCCAT Promot ATCTTTCGCTGCGGTTCCTCACTGTGTGAATGGGTACCCGAGACCATGGAGGATGCCCAT origin CTGACGTACCTGACGGATAGCTGGGGTTCTTCGCGCTCTTCGACGSCCATGTGAATGAC Promot CTGACGTACCTGACGGATAGCTGGGGTTCTTCGCGCTCTTCGACGSCCATGTGAATGAC origin CAGTGTTCGCACTACCTCGAGAGGGCATGSCGCAAGCCATTGAGAAGGAATCGATCCCC Promot CAGTGTTCGCACTACCTCGAGAGGGCATGSCGCAAGCCATTGAGAAGGAATCGATCCCC origin ATGACGGATGAGCGGATGAGAGACTTGGCACTGCAGATCGACCAGGAGTGGATGGACTCG Promot ATGACGGATGAGCGGATGAGAGACTTGGCACTGCAGATCGACCAGGAGTGGATGGACTCG </pre>	<p>B</p> <pre> Origin ATGGGCATTCCACTTCCGAGCCGGTGTATGACGCAGCTCCAGGAGCGTTACGGAAACACC promot ATGGGCATTCCACTTCCGAGCCGGTGTATGACGCAGCTCCAGGAGCGTTACGGAAACACC origin ATCTTTCGCTGCGGTTCCTCACTGTGTGAATGGGTACCCGAGACCATGGAGGATGCCCAT promot ATCTTTCGCTGCGGTTCCTCACTGTGTGAATGGGTACCCGAGACCATGGAGGATGCCCAT origin CTGACGTACCTGACGGATAGCTGGGGTTCTTCGCGCTCTTCGACGSCCATGTGAATGAC promot CTGACGTACCTGACGGATAGCTGGGGTTCTTCGCGCTCTTCGACGSCCATGTGAATGAC origin CAGTGTTCGCACTACCTCGAGAGGGCATGSCGCAAGCCATTGAGAAGGAATCGATCCCC promot CAGTGTTCGCACTACCTCGAGAGGGCATGSCGCAAGCCATTGAGAAGGAATCGATCCCC origin ATGACGGATGAGCGGATGAGAGACTTGGCACTGCAGATCGACCAGGAGTGGATGGACTCG promot ATGACGGATGAGCGGATGAGAGACTTGGCACTGCAGATCGACCAGGAGTGGATGGACTCG </pre>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Figura 12. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de la PP2C. Sin y con His-Tag.

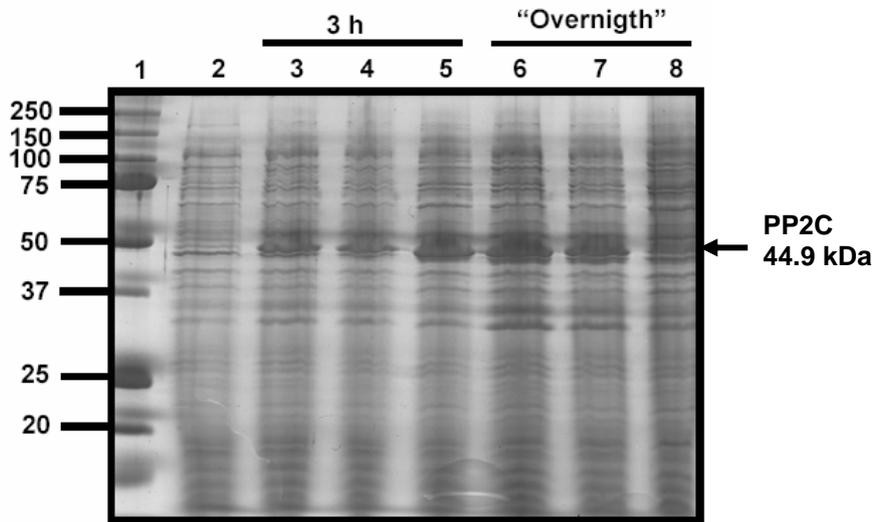


Figura 13. Análisis electroforético de la inducción de la PP2C de *L. major* con His-Tag, la concentración de IPTG utilizada fue de 0.4 mM. 1) MPM; 2) células sin inducir; 3, 4, 5) células inducidas a 21, 30 y 37 °C por 3 h y 6, 7, 8) células inducidas a 21, 30 y 37 °C toda la noche.

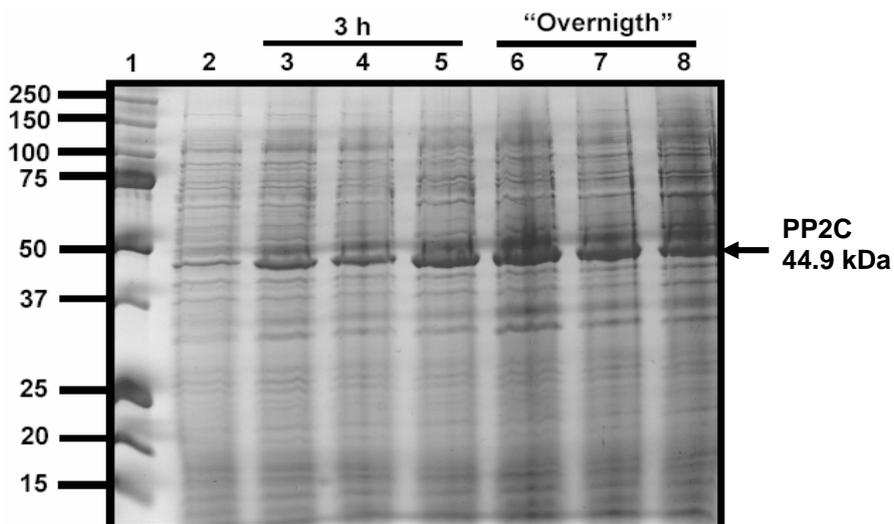


Figura 14. Análisis electroforético de la inducción de la PP2C de *L. major* sin His-Tag, la concentración de IPTG utilizada fue de 0.4 mM. 1) MPM; 2) células sin inducir; 3, 4, 5) células inducidas a 21, 30 y 37 °C por 3 h y 6, 7, 8) células inducidas a 21, 30 y 37 °C toda la noche.

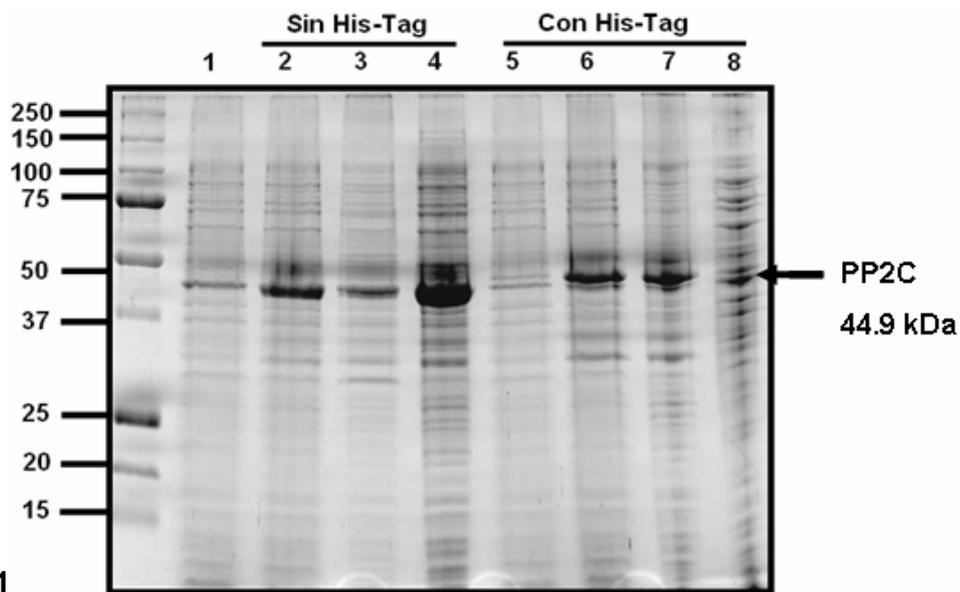


Figura 1

muestra el corrimiento de la proteína solubilizada. Células sin His-Tag 1) células sin inducir, 2) células inducidas, 3) pastilla, 4) sobrenadante. Células con His-Tag 5) células sin inducir, 6) células inducidas, 7) pastilla, 8) sobrenadante.

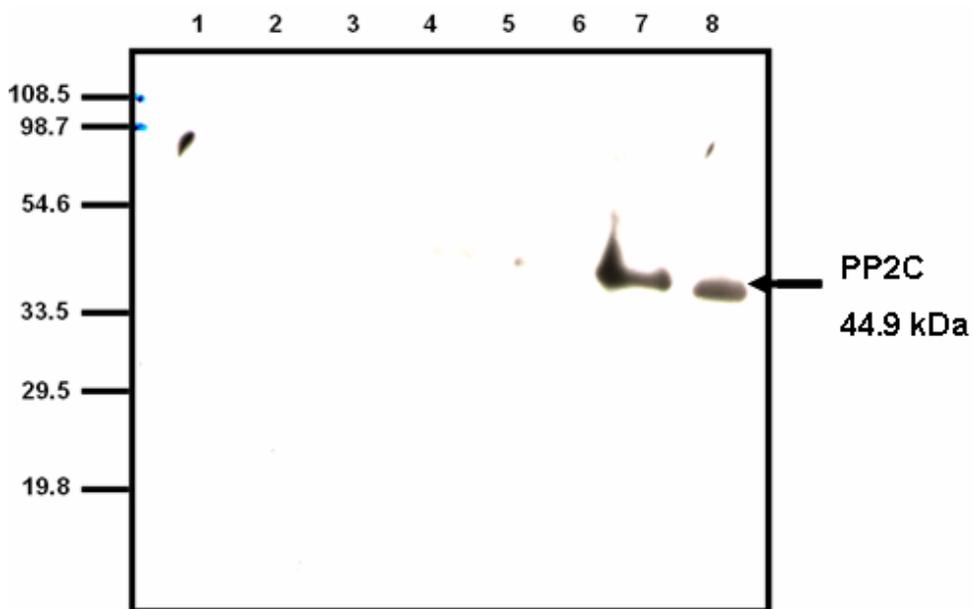


Figura 16. Detección de His-Tag mediante Western blot en las diferentes condiciones de inducción y fracciones bacterianas. Células sin His-Tag 1) células sin inducir, 2) células inducidas, 3) pastilla, 4) sobrenadante. Células con His-Tag 5) células sin inducir, 6) células inducidas, 7) pastilla, 8) sobrenadante.

6.4 Purificación de la proteína PP2C de *L. major* mediante cromatografía de afinidad

Una vez confirmada la presencia de His-Tag se procedió a la purificación de la proteína PP2C de *L. major* mediante cromatografía de afinidad la cual contiene una resina acoplada a níquel y mediante un gradiente de imidazol se eluyó la proteína de interés. En la Figura 17 se muestra las proteínas que se obtienen durante el proceso de purificación y se observó que la proteína se comienza a eluir a partir de la fracción 26.

6.5 Caracterización bioquímica de la PP2C recombinante de *L. major*

6.6 Determinación de la actividad de fosfatasa

En la Figura 18 se muestra la actividad enzimática de la PP2C a diferentes concentraciones de $MgCl_2$ la cual se determinó utilizando *p*-NPP que es un sustrato general para analizar la actividad de fosfatasa. Una de las características distinguibles de las PP2C es su requerimiento de cationes como Mn^{2+} o Mg^{2+} para su actividad enzimática debido a que estos cationes incrementan la afinidad por el fosfato. Se observó que en todas las concentraciones analizadas la proteína presentó actividad enzimática de fosfatasa, siendo 6 mM la concentración donde existió un ligero aumento de la actividad, manteniéndose relativamente constante a una concentración creciente de $MgCl_2$ hasta 20 mM.

6.7 Determinación de la actividad de fosfatasa en presencia de cationes

Se analizó también el efecto de la concentración de $MnCl_2$ en la actividad enzimática y se observó que conforme se aumentó la concentración del catión se presentó un precipitado que interfirió con la lectura en el espectrofotómetro, debido a este fenómeno se utilizó la concentración más baja de Mg^{2+} y Mn^{2+} para analizar la participación de estos en la actividad enzimática de la PP2C (Figura 19). El ensayo demostró que la enzima es cinco veces más activa en presencia de $MnCl_2$ en comparación con $MgCl_2$. Se analizó también la participación de otros cationes como el cloruro de calcio ($CaCl_2$) y el cloruro de zinc ($ZnCl_2$), los cuales no tuvieron ningún efecto sobre la actividad de fosfatasa.

6.8 Determinación del pH óptimo de la actividad de fosfatasa

Para determinar el pH óptimo de reacción se utilizaron diferentes amortiguadores tales como acetato de sodio, MES, MOPS, HEPES, TRIS y CAPS todos a una concentración de 50 mM y con un rango de pH de 5 a 11. Los resultados obtenidos demostraron que la proteína PP2C de *L. major* presentó actividad enzimática de fosfatasa en el rango de pH 5 a 9.5 y su máxima actividad se observó a pH 8.5 (Figura 20).

6.9 Efecto de inhibidores específicos sobre la actividad de fosfatasa

Para continuar con la caracterización de la proteína PP2C de *L. major* se utilizaron inhibidores de la actividad enzimática de PTP tales como ortovanadato de sodio 200 μ M, molibdato de amonio 200 μ M y pervanadato de sodio 50 μ M y de PS/TP tales como caliculina 5 nM y ácido okadáico 1 μ M. Se conoce que el ácido okadáico inhibe la actividad enzimática a concentraciones nanomolares y que la enzima PP2C es resistente al ácido okadáico. El resultado mostró que la enzima fue inhibida ligeramente por inhibidores de PTP y PS/TP. Se utilizó como control la PTP de *Yersinia* y se verificó que los inhibidores de PTP fueran funcionales. Se observó claramente que esta enzima fue inhibida fuertemente con inhibidores de PTPs y no por inhibidores PS/TP (Figura 21).

6.10 Especificidad de sustratos fosforilados en tirosina y serina treonina

Se analizó la especificidad de la PP2C de *L. major* por el sustrato, para ello se utilizaron dos péptidos sintéticos RRA(pT)VA como fosfotreonina y END(pY) INASL como fosfotirosina. El resultado mostró que la enzima tiene mayor afinidad por el sustrato fosfotreonina en comparación con el fosfotirosina como se muestra en la Figura 22.

6.11 Determinación del pH óptimo de la actividad de PS/TP

En la Figura 23 se muestra la determinación del pH óptimo utilizando los amortiguadores mencionados en la sección 6.8 y el sustrato RRA(pT)VA. Se observó que la enzima tiene una actividad máxima a pH 7 y que perdió su actividad a pH 10.5.

6.12 Efecto de los inhibidores específicos sobre la actividad de PS/TP

Para analizar la actividad enzimática de PS/TP de la PP2C de *L. major* mediante el uso de inhibidores específicos se utilizó el sustrato RRA(pT)VA (Figura 24) y se observó que la actividad no disminuyó en presencia de ácido okadáico, compuesto químico para el cual las PP2C son resistentes. Sin embargo, hubo inhibición en presencia de trifluoperazina que se conoce que es un inhibidor de la actividad de PS/TP.

6.13 Identificación de la PP2C mediante anticuerpos que reconocen PTPs

La identificación de la enzima se realizó utilizando anticuerpos que reconocen el dominio catalítico de la PTP de eucariontes superiores como lo es el anti-PTP 1B de placenta humana (Figura 25, 2). El anticuerpo policlonal denominado Tyr ACP 115 que reconoce la PTP de *Trypanosoma cruzi* (Figura 25, 3) y también un anticuerpo que reconoce a una proteína fosfatasa SHP-1 (Figura 25, 4). Todos los anticuerpos presentaron una reacción cruzada con la PP2C recombinante de *L. major*.

6.14 Identificación de la PP2C en el parásito

Para conocer la localización de la enzima en el promastigote de *L. major* se realizó una microscopía de fluorescencia, utilizando los anticuerpos que se generaron en el conejo anti-PP2C, donde se observó que la proteína se encuentra concentrada en el saco flagelar (Figura 26), mientras que con el suero preinmune no se observó ninguna señal.

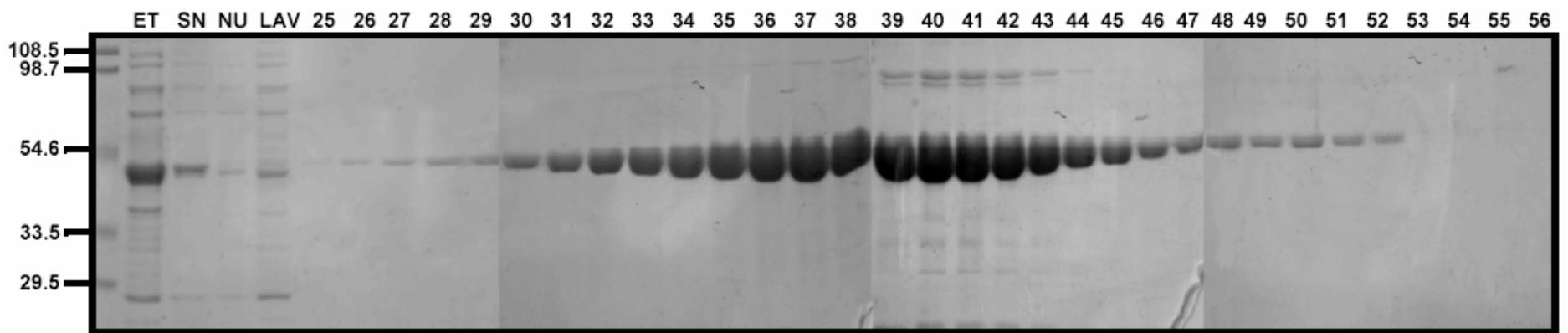


Figura 17. Análisis electroforético del proceso de purificación de la proteína PP2C en geles SDS-PAGE al 10%. Extracto total (ET), Sobrenadante (SN), Pellet (P), No unido (NU), Lavados. (LAV), 25-56 (Fracciones).

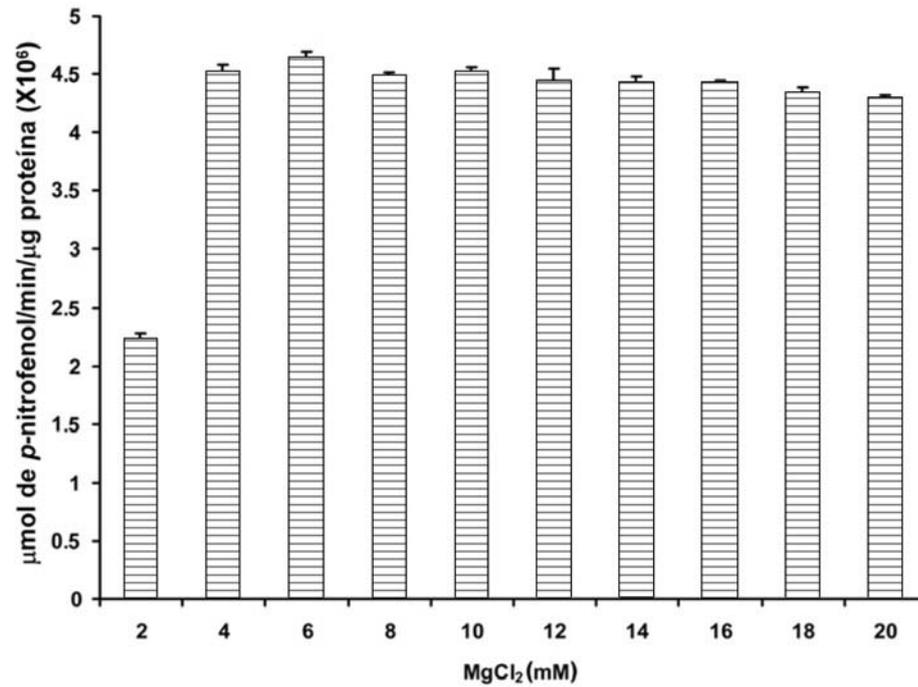


Figura 18. Efecto de diferentes concentraciones de MgCl₂ en la actividad de la PP2C de *L. major*.

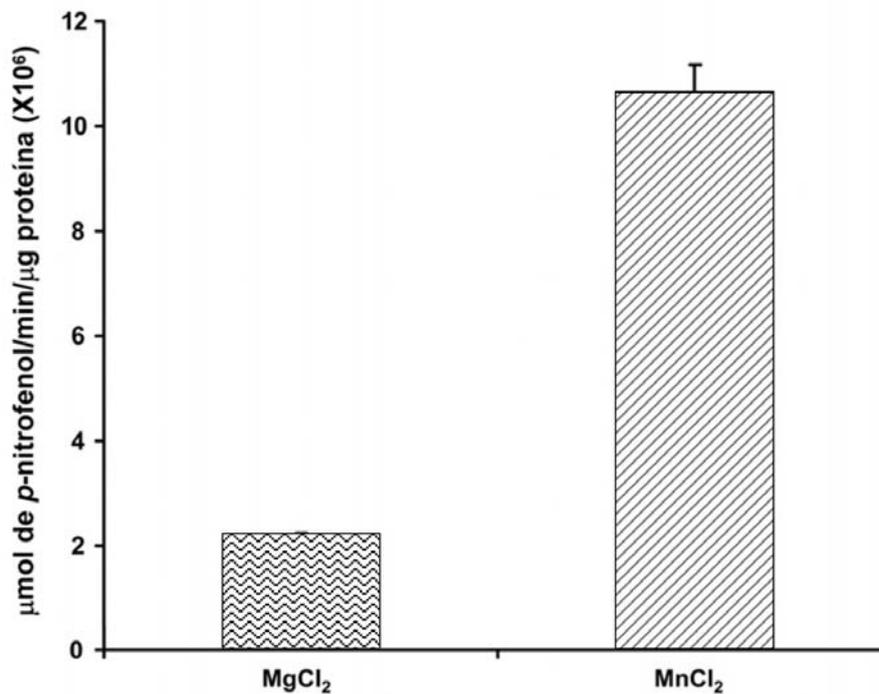


Figura 19. Efecto de cationes divalentes a 2 mM sobre la actividad de fosfatasa PP2C de *L. major*.

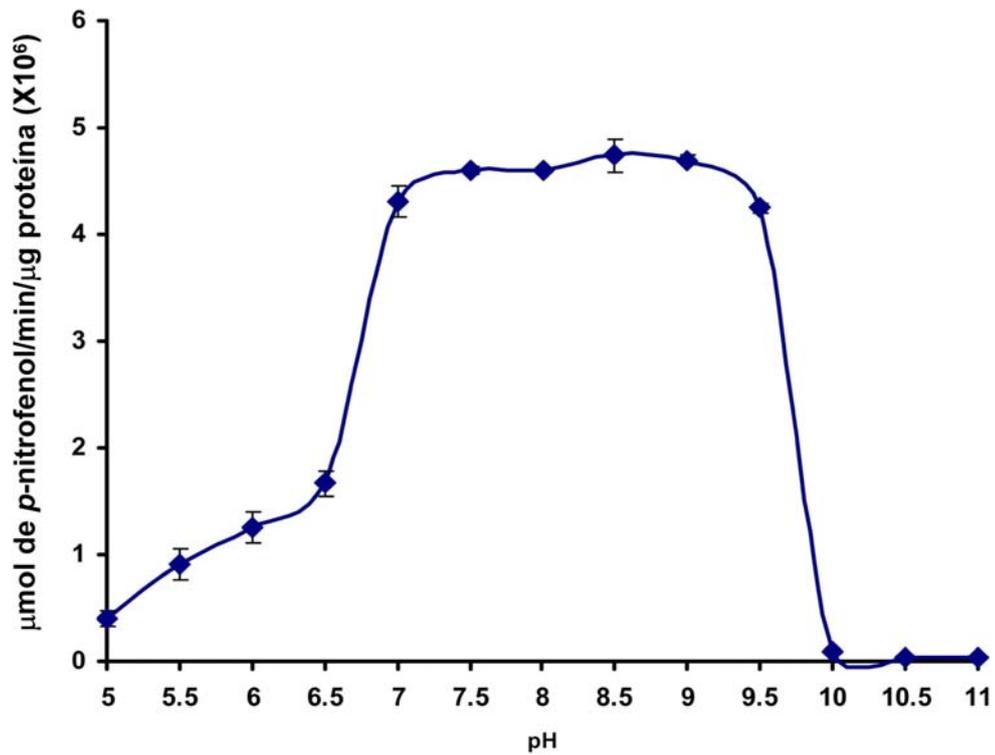


Figura 20. Determinación del pH óptimo de la fosfatasa PP2C de *L. major*.

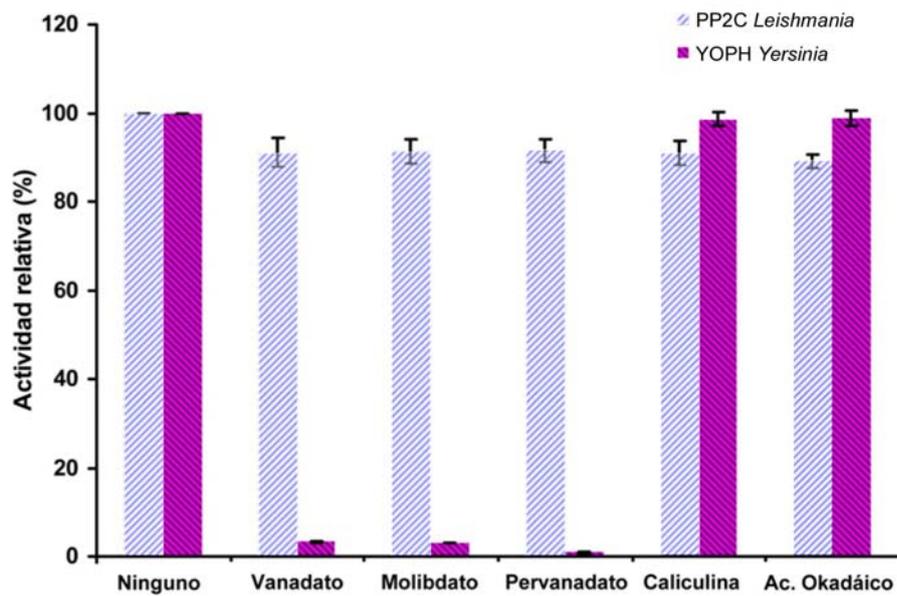


Figura 21. Efecto de inhibidores específicos de PTP y PS/TP sobre la actividad de PP2C de *L. major* y de *Yersinia*.

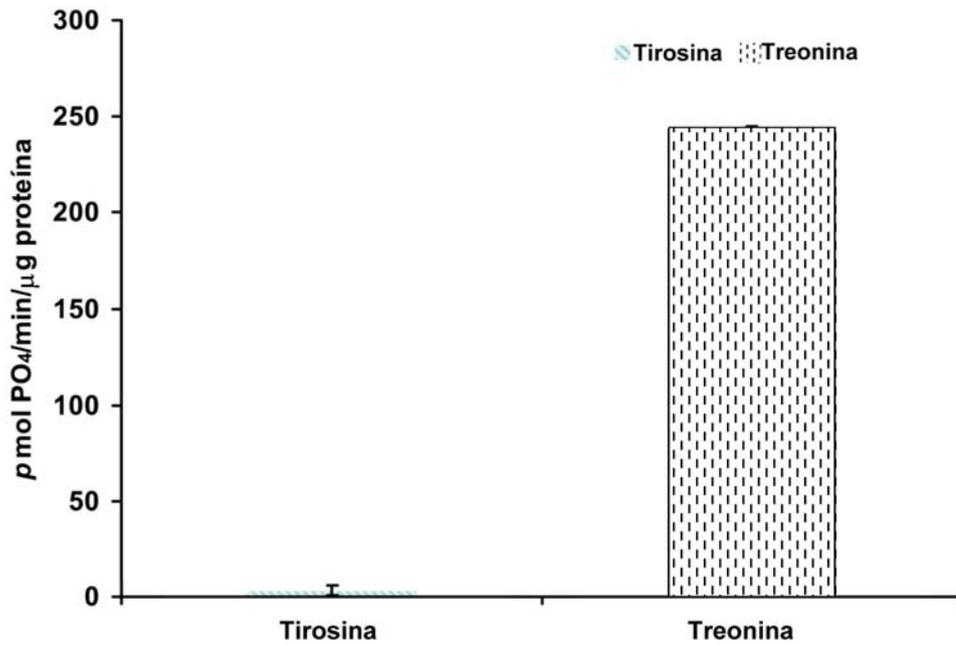


Figura 22. Análisis de la especificidad de sustrato utilizando 2 péptidos sintéticos RRA(pT) VA como fosfotreonina y END(pY) INASL como fosfotirosina.

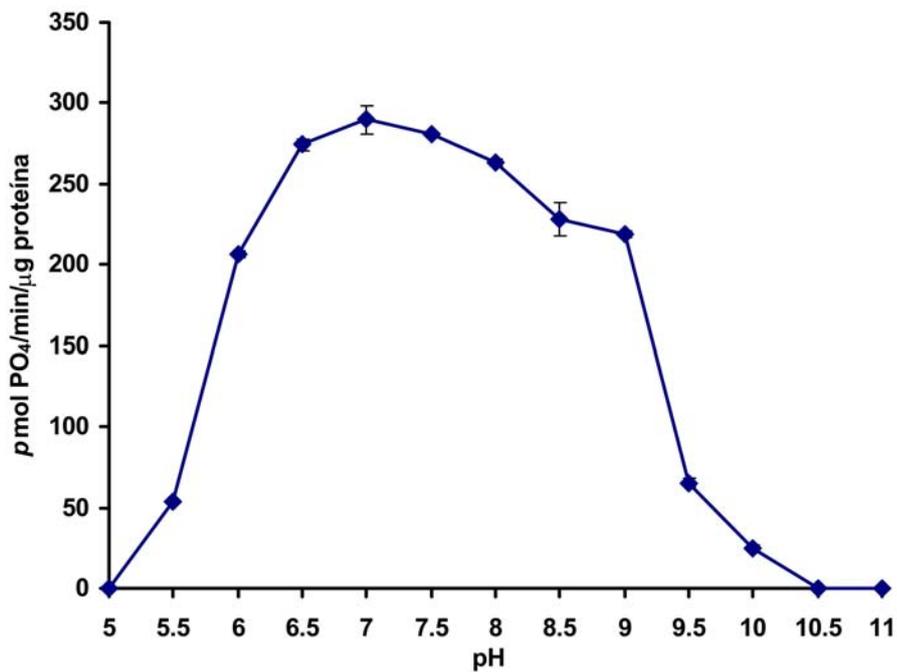


Figura 23. Determinación del pH para la actividad de la PP2C utilizando como sustrato RRA(pT)VA.

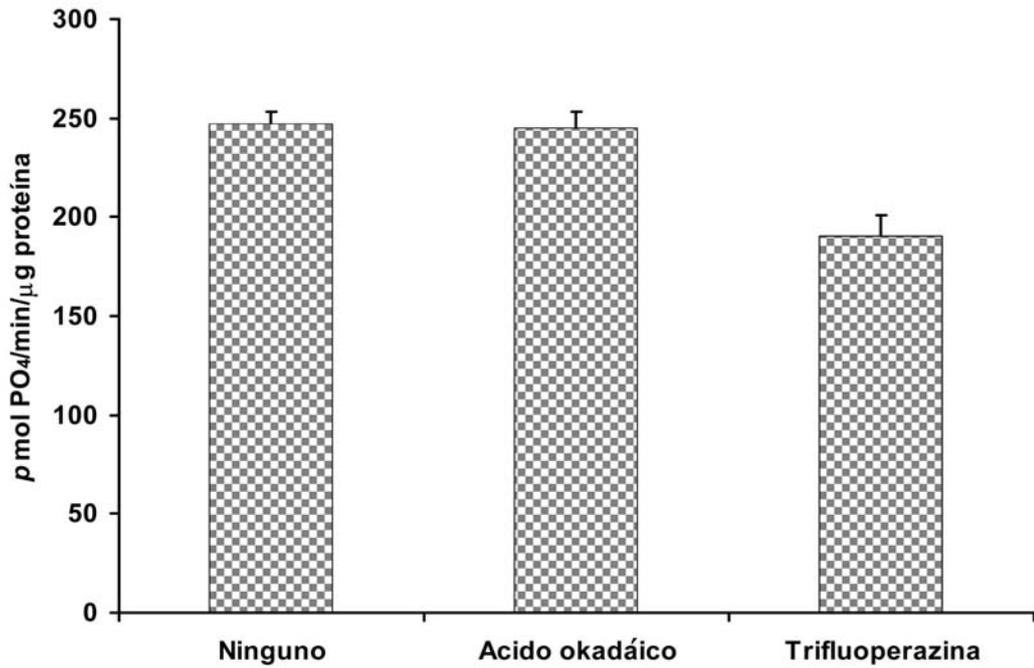


Figura 24. Efecto de inhibidores específicos de PS/TP sobre la actividad de PP2C de *L. major*.

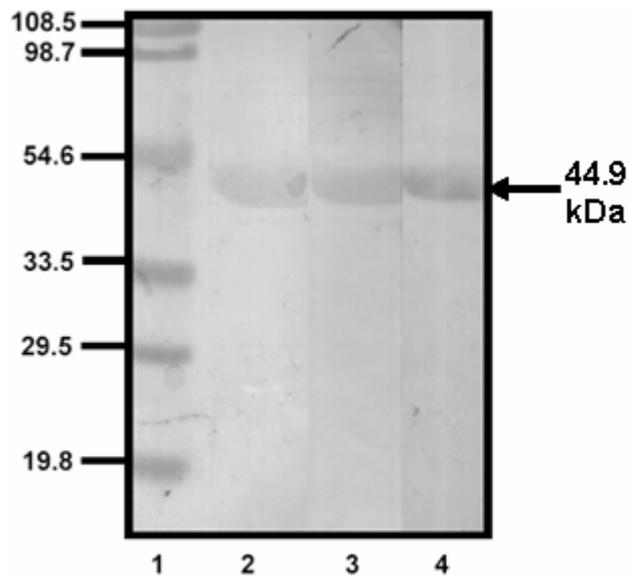


Figura 25. Western blot de la proteína PP2C de *Leishmania major* utilizando anticuerpos que reconocen la PTP1B de placenta humana (2), SHP1 (3) la PTP de *Trypanosoma brucei* (4).

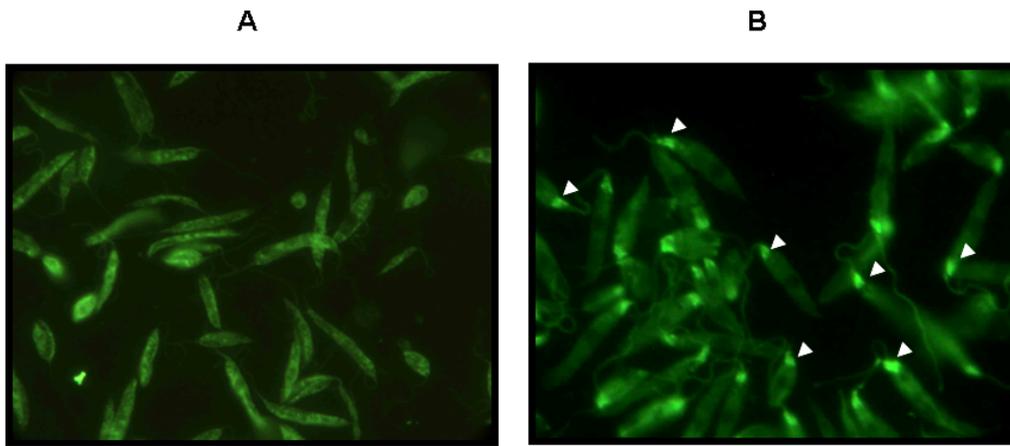


Figura 26. Localización de la PP2C en promastigotes de *Leishmania major*
A) suero preinmune, B) suero anti-PP2C de *Leishmania*.

VII. DISCUSIÓN

Las proteínas fosfatasas y en particular las PTPs de varios microorganismos patogénicos tales como *Yersinia sp*⁽¹⁷⁾ y *Helicobacter pylori*⁽⁴¹⁾ son consideradas como factores de virulencia por inhibir diversas funciones esenciales en su célula hospedera. La PTP de *Yersinia* denominada YopH despolimeriza el citoesqueleto de actina e inhibe la fagocitosis.

En parásitos la participación de estas fosfatasas y en particular de la PP2C han sido poco estudiadas, lo que se ha reportado de esta proteína es su caracterización enzimática como en el caso de *Leishmania chagasi*⁽³⁵⁾ y *Plasmodium falciparum*⁽⁴²⁾, hasta el momento no existen reportes donde se demuestre la participación de estas proteínas fosfatasas PP2C en la señalización de la célula hospedera.

Debido a las dificultades que se presentaron en la purificación a partir de extractos crudos del parásito *Leishmania major*, se decidió utilizar la clonación como estrategia experimental ya que en la actualidad es una herramienta de la biología molecular utilizada para la obtención de proteínas que resultan difíciles de purificar por métodos tradicionales. Una gran variedad de proteínas de diferentes microorganismos han sido clonadas, este es el caso de bacterias como *Mycobacterium tuberculosis*, *Prevotella intermedia* y *Streptomyces coelicolor*⁽²⁰⁻²²⁾ y en el caso de los parásitos en *L. chagasi*, *Entamoeba histolytica*, *Trypanosoma brucei* y *P. falciparum*^(25, 28, 35, 43).

En el caso de *L. major* de la cepa Friedlin la secuencia del genoma está formada por 32.8 mega bases y presenta 86 genes para fosfatasas, 6 para fosfatasas de especificidad dual, 6 para PTPs, 40 para otras fosfatasas y 34 de ellos para PS/TP, dentro de este grupo existen 8 para PP2C⁽⁵⁷⁾.

La proteína fosfatasa PP2C pertenece a uno de los cuatro grupos de proteínas fosfatasas específicas de serina-treonina en mamíferos. La PP2C es una proteína monomérica de 42 kDa que muestra una amplia especificidad de sustratos y es dependiente de cationes divalentes principalmente Mg^{2+} y Mn^{2+} . Se han descrito tres isoenzimas en mamíferos que son las PP2C α , β y γ . La PP2C está conformada por dos dominios, un dominio catalítico amino terminal (1-290 residuos de aminoácidos) con seis alfa hélices, once hojas β y un dominio carboxilo terminal (90 residuos de aminoácidos) con tres alfa hélices.

Esta arquitectura proteica es común para todos los miembros de la familia PP2C⁽¹²⁾.

En levaduras se presentan cuatro homólogos tipo PP2C que son PTC1, PTC2, PTC3 y YBR 125c que desfosforilan más a residuos serina⁽⁴⁴⁾. El dominio catalítico de la familia PPMs es de 290 residuos de aminoácidos. Este dominio puede ser subdividido en 11 dominios incluyendo 8 que son absolutamente conservados en todos los miembros de esta familia⁽¹²⁾, de los cuales sólo 6 dominios están presentes en la PP2C de *L. major* (Figura 27). El análisis de la secuencia reveló la presencia del motivo RXXMED que está denotado en la Figura 27 por ▼ y de acuerdo a la clasificación mencionada en la sección 1.5 la PP2C de *L. major* pertenece al grupo I. Los residuos más importantes son los aspárticos que se encuentran subrayados en rojo y los de arginina en azul, éstos son necesarios para la actividad catalítica y unión al grupo fosfato. Se ha estudiado la presencia de estos aminoácidos en PP2C de otros microorganismos y se concluye que si no están presentes no hay actividad enzimática (Figura 27).

```

1  M G I P L F K P V M T Q L Q E R Y G N T 20
  ATGGGCATTCCACTTCCGAGCCGGTGTATGACGGCACTCCAGGAGCGTTACGGAAACACC
                                     CX-R I
61  I F R C G S M C V N G Y R E T M E D A H 40
  ATCTTTCCGCTGCCGTTCCAMCTGTGTGATGGCTACCCGGACACCATGCGAGGATGCCCAT

                                     II
121 L T Y L T D S W G F F F G V F D G H V H D 60
  CTGACGTACCTGACCGATAGCTGGGGTTTCTTCCGCGCTCTTCGACCGCCATGTGATGAC

181 Q C S Q Y L E R A W R S A I E K E S I P 80
  CAGTGTTCGCACTACCTCGAGAGGGCATGGCCGACGCCATTGAGAGGATCGATCCCC

241 M T D E R M K E L A L Q I D Q E W M D S 100
  ATGACGGATGACGGATGAAAGGAGCTGSCACTGCAATCCACCAGGATGCGATGCACTCG
                                     III
301 G R E G G S T G T F F V A I K E G E E V 120
  GCGCCGAGGGCCGGCAGCACGGCCACTTCTTGTGGCTCTCAAGGAGGGCAACAGGGTG

361 H L Q V T G N V G D S R V V A C I D G V C 140
  CACCTGCAGSTGGTAAGCTGCGTGCCTGCGCTGTGGTGGCTGCATCGATGGTGTGTC
                                     IV
421 V P L T E D H K P N N E G E R Q R I E N 160
  GTCCCTCTGACGGAGGACACAAAGCCAAATATGAGAGGGAGCCGCCAGCCATTGAGAC

481 C A G R V E N N R V D G S L A V S R A F 180
  TCGCCGGGTCCGTGTGGAGAACACCCGCTCCATGSCAGCCCTGGCCGTCACTCCGGCTTC
541 E D R E Y K L G S G S Q L E Q K V I A L 200
  GCGGACCGCGATCAAGCTAGGCTGGTGTAGTCACTGGAGCAGAGGTGATCCGCTTA
                                     V
601 A D V Q H E D L T F F S N D F V L L C C 220
  GCMATGTCCAGCACAGGATCTCAGCTTCAACTCGAAGGACTTTGTGCTGCTGTGCTGC

661 D G V F E G N F P N E E V V A Y V K Q Q 240
  GACGGCTCTTTGAGGGCACTTCCCGAACGAGGAGGTGGTGGCCCTACTGAGGACAGAG
                                     VI
721 L E T C E D L A E V A G S V C E E A I E 260
  CTGCAAGCTTGCACCGACTCGCCCGAGTGGCCCGGACTGTGTGCCAGGAGCCGATCCAG
                                     VII
781 R G S R D N I S C M I V Q F K D G S D Y 280
  CGCGGCAGCCGTGCAACATCTCCTGCAATGATCSTGCASTTTAAGAGCCAGCCACTAC

841 A A A P H T T V V P G P F S A P R N S G 300
  GCTGCTCCCGCCACACCACCGTGTGCCCCGGCCGTTAGCCACCGCCACACAGCCGC

901 F R K A Y E S M A D E G N T T V G A L L 320
  TTCCGTAGGCGTACCGAGTCCATGGCAGCAAAAGCCAAACCCACCGTGGCCGCCCTCTA

961 E K R Y D T L K A A E A L T P E E T E E 340
  GAAAAGCGCTACGACACCCCTCAAGGCCCGCCGAGCCCTCACCCCGAGGAACCGAAGAG

1021 L S Q F E N G P E A K L T G A E R Q K W 360
  CTGAGCCAGTTTGMAGACCGCCCCGAGGCCAGCTCACCGCCCGGAGCGTCCAGAGTGG

1081 F S N Y F Q K L C E A A S N G P S D Q M 380
  TTCTCGAAGTACTTCCAGAGCTCTGCCAGCGCCGCTCGAAGCGGCCAAGTGACCAAGTG

1141 E R L Q S L Q Q Q A G I P L S I L L S L 400
  GAGCCCGCTGCACTGCTGCAGCAGCAGCCCGCAATCCGCTCTCTATCCTGCTGTCTCTG

1162 M G E Q T Q 406
  ATGGGTGAGCCAGCCAGTCA-----

```

Figura 27. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la PP2C de *Leishmania major*. Los nucleótidos están enumerados del lado izquierdo y los aminoácidos del derecho.

Debido al reporte que existe para el motivo catalítico de *L. chagasi*, se buscó el mismo motivo en el genoma de *L. major* de la cepa Friedlin encontrando en el cromosoma 25 el gen que codifica para la PP2C, también se encontró en ese mismo gen un motivo con el sitio catalítico de PTPs (Figura 27). La presencia de varios motivos en una misma secuencia de aminoácidos de una proteína no es nuevo, ya que se ha demostrado en bacterias como es el caso de *M. tuberculosis* que el gen *mstp* codifica para la PP2C y presenta dos dominios de cinasas (pKnA y pKnB) y uno de fosfatasa lo cual sugiere un posible papel regulatorio en la división celular de la micobacteria ⁽¹⁹⁾.

El primer paso para la clonación fue la obtención de ADN genómico de promastigotes de *L. major*, ésto se realizó a través de la aplicación de la técnica de Trizol debido a que es una de las más comúnmente usadas para el aislamiento y concentración del ADN.

Para determinar si el gen codifica una proteína PP2C funcional, se amplificó y se clonó en un vector de expresión pET 23b. Posteriormente se transformó en *E. coli* BL21De3pLysS con el plásmido pET 23b-PP2C_{His}. La colocación de His-Tag en el extremo carboxilo terminal permitió la purificación de la proteína por cromatografía de afinidad pues es una estrategia que ha sido ampliamente utilizada en la purificación de proteínas ^(12, 47, 48, 51).

Para confirmar que la proteína corresponde al tipo PP2C se realizó un análisis de Western blot utilizando un anticuerpo monoclonal anti-His₆-peroxidasa el cual identifica proteínas recombinantes marcadas con histidina. El anticuerpo reconoció a las histidinas presentes en el extremo carboxilo terminal (Figura 16).

Con la finalidad de obtener a la proteína en el sobrenadante fue solubilizada mediante el incremento de la concentración de NaCl (500 mM) presente en el amortiguador de lisis. Una vez solubilizada la proteína se prosiguió al proceso de purificación utilizando una cromatografía de afinidad. Las proteínas que se obtuvieron en el proceso de purificación se muestran en la Figura 17. Se observó que a partir de la fracción 26 se presentó la proteína de interés siendo mayor su concentración en la fracción 39, con un peso molecular cerca de 44.9 kDa, el peso molecular reportado para otras PP2C oscila entre 27 y 50 kDa ^(18, 35). Se ha observado que otras proteínas que presentan His-Tag tienen un peso de 48 kDa, mientras que las proteínas que no presentan His-Tag tienen un peso de 44 kDa.

Para la caracterización bioquímica de la enzima recombinante se analizó la actividad enzimática de fosfatasa utilizando como sustrato *p*-NPP. Diferentes estudios han demostrado que las PP2C requieren cationes divalentes para su actividad como es el Mg^{2+} y Mn^{2+} , por lo tanto se utilizaron diferentes concentraciones de Mg^{2+} (2 a 20 mM) que han sido reportadas en otras enzimas purificadas ^(18, 35). Se observó que la hidrólisis del sustrato se presentó en las concentraciones arriba mencionadas y la actividad máxima se obtuvo a una concentración de 6 mM de Mg^{2+} (Figura 18). Se probaron los cationes de Mg^{2+} y Mn^{2+} para analizar si la actividad de fosfatasa se mantenía utilizando la misma concentración (2 mM) en ambos y se observó que presentó cinco veces más actividad enzimática en presencia de Mn^{2+} con respecto a Mg^{2+} (Figura 19). Esta preferencia de Mn^{2+} sobre Mg^{2+} en la actividad enzimática utilizando *p*-NPP como sustrato es similar a la que se presenta en las PP2C de *Streptococcus agalactiae* y *Pseudomonas aeruginosa* ^(45, 46).

En los ensayos realizados para determinar la concentración óptima de Mg^{2+} se observó que en todas las concentraciones analizadas se mantuvo la actividad enzimática., debido a esto, se decidió trabajar con la concentración que se presenta de manera fisiológica en la célula que es de 1 a 10 mM ^(47 y 48). Probablemente las variaciones intracelulares en la concentración de Mg^{2+} pueden ser uno de los mecanismos usados *in vivo* para regular la actividad de la enzima.

La actividad de fosfatasa de la PP2C de *L. major* no fue detectada en presencia de $CaCl_2$ y $ZnCl_2$ (dato no mostrado), el mismo fenómeno ha sido observado en la PP2C de mamíferos en presencia de Ca^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} , probablemente se deba a que estos cationes inhiben competitivamente el sitio de unión al Mg^{2+} ⁽⁴⁹⁾.

Los residuos de ácido aspártico son altamente conservados y están presentes en el sitio catalítico, estos residuos en la PP2C de mamíferos se encuentran en las siguientes posiciones: 38, 60, 239 y 282 y están presentes en los motivos I, II, III y XI junto con un ácido glutámico en la posición 37 y una glicina en la posición 61 los cuales forman un centro para la unión de un ión metal bivalente. Las moléculas de agua se unen al metal y realizan un ataque nucleofílico al átomo de fósforo por un mecanismo de sustitución nucleofílica tipo 2 (S_N2) ⁽¹²⁾.

La mayoría de las enzimas ejercen su función a un pH determinado, por lo tanto, para conocer el pH óptimo de fosfatasa y de PS/TP de la PP2C de *L. major* se utilizó un rango de pH 5 a 11. Se observó que la enzima tuvo mayor actividad de fosfatasa a pH 8.5 utilizando como sustrato *p*-NPP mientras que para PS/TP fue a pH 7 (Figuras 20 y 23) y fue inactiva a pH 10.5. Este efecto de pH alcalino también fue observado en la caracterización de otras PP2C de microorganismo tales como *Myxococcus xanthus*, Pcc 6803 de *Synechocystis* y *Salmonella enterica* serovar Typhi ^(50, 52) y parásitos como la PP2C de *Leishmania chagasi* que presentó su actividad máxima a pH 7 a 8.5 utilizando como sustrato caseína marcada con fósforo 32 (³²P). Para continuar con la caracterización de la enzima se utilizaron compuestos químicos que inhiben la actividad de PTPs a concentraciones micromolares y han sido utilizados para la caracterización de proteínas como PTPs o PS/TP de diferentes microorganismo como *Ascaris suum*, *E. histolytica*, *T. cruzi*, *L. donovani* y *L. major* ^(23, 24, 27, 31, 32). En este ensayo se incluyó una enzima recombinante de *Yersinia*, la cual está bien caracterizada como PTP, esto se realizó para demostrar la funcionalidad de los inhibidores de PTPs utilizados (Figura 21). Se observó que los inhibidores de PTPs inhibieron de 95 a 96.6 % la actividad de la PTP de *Yersinia* (dato no mostrado), este porcentaje de inhibición ha sido observado en PTPs de otros microorganismos como *E. histolytica* ⁽²⁵⁾ y *Cryptosporidium parvum* ⁽⁵³⁾ mientras que la PP2C de *L. major* fue inhibida de 8.4 a 8.5 % por estos compuestos químicos y no se presentó una inhibición del 100 %, probablemente esto se atribuye a que la proteína presenta dos motivos (PTP y PS/TP) en los que solo se inhibió el motivo de PTP pues el motivo de PS/TP no fue bloqueado por esos inhibidores que son oxianiones que pueden inhibir a la PTP por el simple mimetismo de la geometría tetraédrica del ión fosfato ⁽⁵⁴⁾. El cristal del complejo PTP con el inhibidor tungstato reveló las interacciones entre la enzima y el motivo fosforil del sustrato. Se observó el efecto contrario en la PTP de *Yersinia* cuando se utilizaron los inhibidores de PS/TP pues se presentó una ligera inhibición de la actividad, este resultado era esperado ya que la enzima de *Yersinia* no es una PS/TP.

Siguiendo con la caracterización de la PP2C se utilizaron inhibidores clásicos de la actividad de serina treonina fosfatasa como fue el ácido okadáico que puede diferenciar a las enzimas serina treonina fosfatasas independientes

de cationes. Se realizó un estudio en una línea celular resistente al ácido okadáico y se observó que una mutación puntual de Cys 269 en PP2AC con un residuo de glicina estaba presente y esto hacía que la actividad de la enzima pudiera ser de 2 a 4 veces más resistente al ácido okadáico en estas células. De este estudio surgió que la cisteína es parte del motivo que es variable entre PP1C y PP2A y se llegó a la conclusión de que el “loop L7” de estas fosfatasas puede formar parte de un dominio de unión al ácido okadáico y que es diferente la composición de aminoácidos de PP1 y PP2 en esta región lo que explica en parte la diferente sensibilidad de estas fosfatasas.⁽¹²⁾ Los resultados de inhibición con el ácido okadáico de la actividad de serina fosfatasa de la PP2C de *L. major* revelaron la inhibición del 1 % de la actividad enzimática. Este resultado era esperado debido a que estas fosfatasas son resistentes al ácido okadáico ⁽¹¹⁾ y hasta el momento no existe un inhibidor específico comercial para la PP2C que se pudiera utilizar para realizar una mejor caracterización enzimática. En el caso de la trifluoperazina (un inhibidor de PS/TP) se presentó una inhibición del 23 % (Dato no mostrado), este efecto de inhibición probablemente fue dependiente de la concentración de la trifluoperazina, pues se observó que en una fosfatasa dependiente de calcio y calmodulina de *L. donovani* la enzima no fue totalmente inhibida cuando se utilizó la trifluoperazina a una concentración de 100 μ M, sin embargo la inhibición completa se observó cuando se incremento la concentración del inhibidor ⁽⁵⁵⁾.

Posteriormente se realizó un ensayo de actividad enzimática en el que se utilizaron los péptidos sintéticos RRA(pT)VA que presenta una treonina fosforilada y DADE(pY)INASL que presenta una tirosina fosforilada. Este ensayo demostró que la PP2C de *L. major* manifiesta una preferencia para fosfotreonina sobre tirosina como se muestra en la Figura 22. Una preferencia similar para fosfotreonina ha sido reportada para la PpH1 PP2C de *Myxococcus xantus* y PCC 6803 PphA de *Synechocystis* ⁽⁵⁰⁻⁵¹⁾. Se encontró también que la PP2C de *L. major* desfosforiló el péptido sintético fosfotirosina, este hallazgo ya había sido reportado para la Prpz (PP2C) de *Salmonella enterica typhi*, éste dato indica que la enzima tiene una actividad dual *in vitro*⁽⁵²⁾. La PP2C de *Mycobacterium tuberculosis* mostró poca actividad con residuos fosfotreonina ⁽¹⁹⁾, esta habilidad para desfosforilar residuos *in vitro* ha sido observada para otras serina treonina fosfatasas de la familia PPM.

La identificación de la proteína se inició mediante la utilización de anticuerpos que reconocen el dominio catalítico de PTPs (Figura 25). Estos anticuerpos se han utilizado en la identificación del dominio catalítico de PTP de *L. major*⁽³²⁾ en fracciones solubilizadas con detergentes así como en la PTP purificada de *Entamoeba histolytica*⁽²⁴⁾. Como se observa en la Figura 25 la PP2C de *L. major* presentó reacción cruzada con los tres anticuerpos utilizados, estos datos concuerdan con lo esperado ya que la PP2C de *L. major* presenta el motivo CX₅R característico de PTPs.

Hasta el momento no existen anticuerpos comerciales anti-PP2C que nos permitan identificar la proteína purificada por lo que se generaron anticuerpos policlonales. Mediante Western blot se demostró que estos fueron capaces de reconocer una proteína de 44.9 kDa (dato no mostrado). Estos anticuerpos generados se utilizaron para identificar la proteína PP2C en promastigotes de *L. major* mediante microscopía de fluorescencia. Los resultados obtenidos mostraron que la enzima se encuentra concentrada en el saco flagelar de promastigotes de *L. major* (Figura 26). Está demostrado que el parásito posee un sistema de secreción muy especializado que se encuentra ubicado alrededor del saco flagelar⁽⁵⁶⁾. Hasta el momento, desconocemos si la PP2C es secretada por *Leishmania*, lo que si se sabe es que *Leishmania* secreta proteínas fosfatasa al medio de cultivo. Resulta muy interesante la localización subcelular de la PP2C en el parásito ya que esto implica que el parásito esté preparando una acumulación de proteínas para su secreción y una función relacionada a la sobrevivencia del parásito en la célula hospedera.

La presencia de cinasas y fosfatasa en diferentes microorganismos patógenos sugiere que estas moléculas de señalización tengan una relevancia específica en los eventos relacionados a la supervivencia y/o patogénesis, sin embargo, el significado de los eventos de fosforilación-desfosforilación mediados por cinasas y fosfatasa en parásitos ha sido poco estudiado, por lo que el estudio de estas enzimas dará un paso importante para comprender la regulación de las cascadas de señalización involucradas en la interacción hospedero-parásito.

VIII. CONCLUSIÓN

Los resultados del presente trabajo nos permiten concluir que la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *Leishmania major* presenta 7 dominios de los 11 característicos de las PP2C. Además, como se presentó mayor actividad enzimática con Mn^{+2} en comparación a Mg^{+2} , nos indica que la PP2C de *L. major* tiene características bioquímicas similares a la PP2C de mamíferos. Por otro lado, se observó que la proteína se expresa en el saco flagelar de los promastigotes metacíclicos (fase infectiva).

Este es el primer estudio que se realiza en la clonación y purificación de la PP2C en promastigotes de *L. major*, hasta el momento desconocemos la función que esta enzima pudiera tener en este protozooario y dentro de su célula hospedera, pero probablemente el parásito esté preparándose con diferentes moléculas que le permitan sobrevivir dentro del ambiente hostil al que se va a enfrentar debido a su naturaleza intracelular.

IX. PERSPECTIVAS

- Determinar las constantes cinéticas de la PP2C.
- Analizar el efecto que ejerce la PP2C en eventos de activación del macrófago:
 - 1.- la fosforilación de proteínas de macrófagos previamente activados,
 - 2.- el estallido oxidativo de macrófagos y
 - 3.- la expresión de ARNm para la iNOS y producción de óxido nítrico.
- Silenciar la expresión de la PP2C mediante la utilización de ARNi y determinar la participación de esta proteína en el crecimiento del parásito y en la infección de los macrófagos.

X. REFERENCIAS

- 1.- Nandan, D. and Reiner, E. N. (2005). *Leishmania donovani* engages in regulatory interference by targeting macrophage protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Clinical Immunology* 114, 266-277.
- 2.- Bhardwaj, N., Rosas, E. L., Lafuse, P. W., Satoskar, R. A. (2005). *Leishmania* inhibits STAT1-mediated IFN γ signaling in macrophages: increases tyrosine phosphorylation of dominant negative STAT1 β by *Leishmania mexicana*. *International Journal for Parasitology* 35, 75-82.
- 3.- Blanchette, J., Racette, N., Faure, R., Siminovitch, K. and Olivier, M. (1999). *Leishmania*-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN- γ -triggered JAK2 activation. *European Journal of Immunology* 29, 3737-3744.
- 4.- Nandan, D., Lo, R. and Reiner, N. (1999). Activation of phosphotyrosine phosphatase activity attenuates mitogen-activated protein kinase signaling and inhibits c-fos and nitric oxide synthase expression in macrophages infected with *Leishmania donovani*. *Infection and Immunity* 67, 4055- 4063.
- 5.- Forget, G., Siminovitch, K. A., Brochu, S., Rivest, S., Radzioch, D. and Olivier M. (2001). Role of host phosphotyrosine phosphatase SHP-1 in the development of murine leishmaniasis. *European Journal Immunology* 31, 3185-3196.
- 6.- Tonks, K. N. (2006). Protein tyrosine phosphatases: from genes to function to disease. *Molecular Cell Biology* 7, 833-846.
- 7.- Bradford, D. (1996). Molecular mechanism of the serine/threonine phosphatase. *Trends in Biochemical Science*. 407-412.
- 8.- Zhang, Y. Z. (1997). Structure, mechanism, and specificity of protein tyrosine phosphatase. *Current Topics in Cellular Regulation* 3, 21-63.
- 9.- Zhang, Y. Z. (2003). Chemical and mechanistic approaches to the study of protein tyrosine phosphatase. *Acc. Chem. Res.* 36: 385-392.
- 10.- Bradford, D., Das, A. K and Egloff, M. P. (1998). The structure and mechanism of protein phosphatase: Insight into catalysis and regulation. *Annual Reviews Biophys Biomol. Structure* 27, 133-64.
- 11.- Dawson, J. F and Holmes, C.F.B. (1999). Molecular mechanisms underlying inhibition of protein phosphatases by marine toxins. *Bioscience* 4, 646-658.
- 12.- Das. A. K., Helps, N. R., Cohen, P. T. W. and Bradford, D. (1996). Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.9 Å resolution. *The EMBO Journal* 15 (24), 6798-6809.

- 13.- Farkas, L. D. V., Miskei, M., Szabados, L and Koncz, C. (2007) *Arabidopsis* PPP family of serine/threonine phosphatases. *Trends in Plant Science* 30, 1-8.
- 14.- Ninfa, E., Dixon, G. J. (1994). Protein tyrosine phosphatase in disease processes. *Trends in Cell Biology* 4, 427-430.
- 15.- Guan, K. and Dixon, J. E. (1990). Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. *Science* 249, 553-556.
- 16.- Rosqvist, R. B. and I, W. W, H. (1988). Inhibition of phagocytosis in *Yersinia pseudotuberculosis*: a virulent plasmid-encoded ability involving the yop 2b protein. *Infection and Immunity* 56, 2139-2141.
- 17.- Bliska, J. B. and Black, D. S. (1995). Inhibition of the Fc receptor-mediated oxidative burst in macrophages by the *Yersinia pseudotuberculosis* tyrosine phosphatase. *Infection and Immunity* 63, 681-685.
- 18.- Obuchowski, M., Madec, E., Delattre, D., Boel, G., Iwanicki, A., Foulger, D. and Seror, S. J. (2000). Characterization of PrpC from *Bacillus subtilis*, a member of the PPM phosphatase family. *Journal of Bacteriology*. 5634-5638.
- 19.- Chopra, P., Singh, Bhuminder., Singh, R., Vohra, R., Koul, A., Meena, L. S., Koduri, H., Ghildiyal, M., Deol P., Das, T. K., Tyagi, A. K. and Singh Y. (2003). Phosphoprotein phosphatase of *Mycobacterium tuberculosis* dephosphorylates serine-threonine kinases PknA and PknB. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 311, 112-120.
- 20.- Koul, A., Choidas, A., Treder, M., Tyagi, A. K., Drlica, K., Singh, Y. and Ullrich, A. (2000). Cloning and characterization of secretory tyrosine phosphatase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology* 182, 5425-5432.
- 21.- Chen, X., Ansai, T., Awano, S., Iida, T., Barik, S. and Takehara, T. (1999). Isolation, cloning and expression of an acid phosphatase containing phosphotyrosil phosphatase activity from *Prevotella intermedia*. *Journal of Bacteriology* 181, 7101-7114.
- 22.- Li, Y. and Strohl, W. R. (1996). Cloning, purification and properties of a phosphotyrosine protein phosphatase from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology* 178, 136-142.
- 23.- Schmid, B., Wimmer, M., Tag, C., Hoffmann, R. and Hofer, H. W. (1996). Protein phosphotyrosine phosphatases in *Ascaris suum* muscle. *Molecular and Biochemical Parasitology* 77, 183-192.
- 24.- Aguirre-García, M. M., Anaya-Ruiz, M. and Talamás-Rohana, P. (2003). Membrane-bound acid phosphatase (MAP) from *Entamoeba histolytica* has phosphotyrosine phosphatase activity and disrupts the actin cytoskeleton of host cells. *Parasitology* 126, 195-202.

- 25.- Herrera-Rodríguez, S. E., Baylón-Pacheco, L., Talamás-Rohana, P. and Rosales-Encina, J. L. (2006). Cloning and partial characterization of *Entamoeba histolytica* PTPases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342, 1014-1021.
- 26.- Bakalara, N., Seyfang, A., Baltz, T. and Davis, CH. (1995). *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*: life cycle-regulated protein tyrosine phosphatase activity. *Experimental Parasitology* 81, 302-312.
- 27.- Furuya, T., Zhong, I., Meyer-Fernandes, J. R., Hong-Gang I. M. (1998). Ecto-protein tyrosine phosphatase activity in *Trypanosoma cruzi* infective stages. *Molecular and Biochemical Parasitology* 92, 339-348.
- 28.- Bakalara, N., Santarelli, X., Davis, CH., and Baltz, T. (2000). Purification, cloning, and characterization of an acid ectoprotein phosphatase differentially expressed in the infectious bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 8863-8871.
- 29.- Szoor, B., Wilson, J., MCElhinney, H., Taberner, L. and Matthews, R. K. (2006). Protein tyrosine phosphatase Tb PTP1: a molecular switch controlling life cycle differentiation in *trypanosomes*. *The Journal of Cell Biology*. 1-11.
- 30.- Gilbert, L. A., Ravindran, S., Turetzky, J. M., Boothroyd, J. C. and Bradley, P. J. (2007). *Toxoplasma gondii* targets a protein phosphatase 2C to the nuclei of infected host cells. *Eukaryotic Cell* 6(1), 73-83.
- 31.- Cool, D.E. and Blum, J.J. (1993). Protein tyrosine phosphatase activity in *Leishmania donovani*. *Molecular and Cellular Biochemistry* 127/128, 143-149.
- 32.- Aguirre-García, M. M., Escalona-Montaño, A. R., Bakalara, N., Pérez-Torres, A., Gutiérrez-Kobeh, L. and Becker, I. (2006). *Leishmania major*: detection of membrane-bound protein tyrosine phosphatase. *Parasitology* 132, 641-649.
- 33.- Gómez-Sandoval J.N. (2007). Participación de las proteínas tirosina fosfatasas (PTPasas) en la infección de macrófagos por *Leishmania mexicana*. Tesis profesional (Biología). Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma del Estado de México. 64 pp.
- 34.- Nacimiento, M., Abourjeily, N., Ghosh, A., Zhang, W. and Matlashewski, G. (2003). Heterologous expression of a mammalian protein tyrosine phosphatase gene in *Leishmania*: effect on differentiation. *Molecular Microbiology* 50, 1517-1526.
- 35.- Burns, M. J., Parsons, Marilyn., Rosman, D. E. and Reed, S. G. (1993). Molecular cloning and characterization of a 42 kDa protein phosphatase of *Leishmania chagasi*. *The Journal of Biological Chemistry* 268(23), 17155-17161.

- 36.- Zufferey, R. and Manoun, B. C. (2006). *Leishmania major* expresses a single dihydroxyacetone phosphate acyltransferase localized in the glycosome, important for rapid growth and survival at high cell density and essential for virulence. *The Journal of Biological Chemistry* 281 (12), 7952-7259.
- 37.- Naderer, T., Ellis, A. M., Sernee, F. M., Souza, D., Curtis, J., Handman, E. M., Mc, C., J. M. (2006). Virulence of *Leishmania major* in macrophages and mice requires the gluconeogenic enzyme fructose-1,6-biphosphate. *PNAS* 14(103), 2-5507.
- 38.- Hiranmoy, Z. Y. and Mukhopadhyay, R. (2006). Bifunctional role of the leishmania antimoniate reductase Lm ACR2 as a protein tyrosine phosphatase. *Molecular and Biochemical Parasitology* 148(2), 161-8.
- 39.- Davis, I., Kueh, M., Battery, J. Basic Methods in Molecular Biology 2^a edición. Appleton δ Lange , Norwalk, Connecticut 1994.
- 40.- Upcroft, P., Upcroft, J. A. (1993). Comparasion of properties of agarose for electrophoresis of ADN. *J Chromatography* 618, 79-93.
- 41.- Selbach, M., Moese, S., Hurwitz, R., Hauck, C.R., Meyer. T.F and Backert, S. (2003).The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. *EMBO J* 22, 515-528.
- 42.- Mamoun, B, C., Sullivan. D. J., Banerjee, R and Goldberg, D.E. (1998). Identification and characterization of an unusual double serine/treonine protein phosphatase 2C in the Malaria parasite *Plamodium falciparum*. *The Journal of Biological Chemistry* 273,11241-11247.
- 43.- Lindental, C. and Klinkert, Mo-Q. (2002). Identification and biochemical characterisation of a protein phosphatase 5 homologue from *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 120, 257-268.
- 44.- Maeda, T., Tsai, A.Y.M., Saito H. (1993). Mutations in a protein tyrosine phosphatase gene (PTP2) and a protein serine/treonine phosphatase gene (PTC1) cause a synthetic growth defect in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol* 13, 5408-5417.
- 45.- Rajagopal, I., Clancy, A. and Rubens, C. E. (2003). A eukaryotic type serine/ threonine kinase and phosphatase in *Streptococcus agalactiae* reversibly phosphorylate an inorganic pyrophosphatase and effect growth, cell segregation, and virulence. *Journal Biological Chemistry* 278, 14429-14441.
- 46.- Mukhopadhyay, S., Kapatral, V., Xu, W. and Chakrabarty, A. M. (1999). Characterization of a hank´s type serine/ threonine kinase and serine/ threonine phosphoprotein phosphatase in *Pseudomonas aeuroginosa*. *Journal of Bacteriology* 181(21), 6615-6622.

- 47.- Finney, L. A. and Halloran, T.V. (2003). Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptor. *Science* 300, 931-936.
- 48.- Kehres, D. G and Maguire, M. E. (2003). Emerging themes in manganese transport, biochemistry and pathogenesis in bacteria. *FEMS Microbiology Rev* 27, 263-290.
- 49.- Tong, Y., Quirion, R. and Shen, S-H. (1998). Cloning and characterization of a novel mammalian PP2C isozyme. *The Journal of Biological Chemistry* 52, 35282-35290.
- 50.- Treuner-Lange, A., Ward, M. J. and Zusman, D. R. (2001). Pph1 from *Myxococcus xanthus* is a protein phosphatase involved in vegetative grow and development. *Molecular Microbiology* 40, 126-140.
- 51.- Rupper, U., Irmeler, A., Kloft, N. and Forchhammer, K. (2002). The novel protein phosphatase PphA from *synechocystis* PCC 6803 control dephosphorylation of the signalling protein PII. *Molecular Microbiology* 44, 855-864.
- 52.- Lai, S. and Moual, H. (2005) Prp Z, a *Salmonella enterica* serovar *Typhi* serine/threonine protein phosphatase 2C with dual substrate specificity. *Microbiology* 151, 1159-1167.
- 53.- Aguirre-García, M. M and Okhuysen, P.C. (2007). *Cryptosporidium parvum*: identification and characterization of an acid phosphatase. *Parasitology Research* 101 (1), 85-89.
- 54.- Stuckey, J. A., Schubert, H. L., Fauman, E., Zhang, Z-Y., Dixon, J. E., and Saper, M. A. (1994). Crystal structure of *Yersinia* protein tyrosine phosphatase at 2.5 Å and the complex with tungstate. *Nature* 370, 571-575.
- 55.- Banerjee, D., Sarkar, D and Bhaduri, A. (1999). Ca⁺² and calmodulin-dependent protein phosphatase from *Leishmania donovani*. *Parasitology* 118, 567-573.
- 56.- McConville, M. J., Mullin, K. A., Ilgoutz, S. C. and Teasdale. (2002). Secretory pathway of trypanosomatid parasites. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 122-154.
- 57.- Ivens, A. P., Peacock, C-W E., Murphy, L. A.G., Berriman, M. S.E., Rajandream, M.A and cols. (2005). The Genome of Kinetoplastid *Leishmania major*. *Science* 309, 436-441.