



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Campo 1



**“PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA PROTEÍNA
FOSFATASA PP2C DE *Leishmania mexicana*”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

Q.F.B. MARIANA ZUÑIGA FABIAN

ASESORA DE TESIS: DRA. MARÍA MAGDALENA AGUIRRE GARCÍA

Cuautitlan Edo. de Méx.

Marzo, 2014

I



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.

Apoyo a la tesis por CONACYT con el proyecto 152433 y por DGAPA-PAPIIT con el proyecto IN218412.

Durante la realización del trabajo de tesis se me otorgó una beca por CONACYT con número de registro 169712.

Agradezco de manera muy especial a mi asesora de tesis: Dra. María Magdalena Aguirre García.

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:

M. en C. Juan Pablo Martínez Labat

MVZ. Gabriela Fuentes Cervantes

Dra. María Magdalena Aguirre García

MVZ. Angel Germán Martínez Sosa

QFB. Raquel Tapia Romero

AGRADECIMIENTOS

- Dra. María Magdalena Aguirre García por haber compartido conmigo sus conocimientos y orientarme a cada paso, así como por apoyarme en todo momento. Le agradezco la confianza y la motivación para seguir adelante, aun en los momentos más difíciles. Por los comentarios realizados y por dedicar tiempo a la lectura y corrección de esta tesis.
- M en C. Alma Reyna Escalona Montaña, por su asesoría técnica y por el apoyo brindado día a día; por la paciencia al compartir conmigo sus conocimientos y tomarse el tiempo de revisar y corregir mi tesis. Gracias por brindarme tu amistad y ser mi guía hasta el final.
- M en C. Adriana Ruiz Remigio, M en C. Rocely Cervantes Sarabia, M en C. Jesús Argueta Donahue, M en C. Jenny Nancy y M en C Araceli Rojas por su apoyo técnico.
- A mis amigas y amigos gracias por estar a mi lado y echarme porras todos los días para que terminara este proyecto y meta profesional.
- A todos mis compañeros del laboratorio de Inmunoparasitología por las pláticas, consejos, risas y compañía; gracias por impulsarme en los momentos de frustración.
- 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.
- Dr. Ruy Pérez Monfort por permitirme realizar parte de este trabajo en su laboratorio ubicado en el Instituto de Fisiología Celular.

DEDICATORIAS

- ❖ A mi familia por apoyarme en todo momento y permitirme compartir hasta hoy la más importante de mis metas.
- ❖ A mis hermanos Iliana Zuñiga Fabian y Juan Alberto Zuñiga Fabian por quererme tanto y hacer mi vida más interesante con enojos, risas, llanto y por dejarme disfrutar de su compañía.
- ❖ A mi sobrina Samantha por ser la alegría de mis días, por ayudarme a sobreponerme de los malos ratos y porque a sus escasos años me enseña a valorar cada segundo de vida, te quiero mucho mi niña.
- ❖ A mi abuelita Teodora Farías Santiago y mis tíos María Teresa Fabian Farias y Francisco Fabian Farias, por apoyarme, cuidarme y preocuparse por mí, gracias por quererme tanto
- ❖ A mis papás por darme la vida, por el apoyo brindado y por hacerme la persona fuerte que soy el día de hoy.
- ❖ A mis primos Adrian Romero Fabian y Ariadna Estefanía Romero Fabian, por escucharme, aconsejarme, estar a mi lado siempre y por quererme como una hermana saben que son correspondidos.
- ❖ A mi abuelito Carlos Fabian Susano que a pesar de no estar físicamente siempre estará en mi corazón.

ÍNDICE

	Pag.
I. INTRODUCCIÓN1
1.1. Proteínas fosfatasas1
1.1.1. Proteínas fosfatasas de tirosina (PTP)1
1.1.2. Inhibidores específicos de PTPs3
1.1.3. Proteínas fosfatasas de serina treonina (PS/TP)3
1.1.4. Proteínas fosfatasas PP2C4
1.1.5. Inhibidores específicos de PS/TP5
1.1.6. Inhibidor específico de la proteína fosfatasa PP2C (Sanguinarina)6
1.1.7. Proteínas fosfatasas PP2C en plantas6
1.1.8. Proteínas fosfatasas PP2C en hongos y levaduras7
1.1.9. Proteínas fosfatasas PP2C en bacterias8
1.1.10. Proteínas fosfatasas PP2C en parásitos9
1.2 <i>Leishmania spp.</i>11
1.2.1. Moléculas relacionadas con la virulencia de <i>Leishmania spp.</i>12
1.2.3. Leishmaniasis13
1.2.3.1. Leishmaniasis cutánea14
1.2.4. Infección15
II. JUSTIFICACIÓN17
III. HIPOTÉISIS17

IV. OBJETIVOS17
V. MATERIALES Y MÉTODOS19
5.1 Sobreexpresión de la proteína PP2C recombinante con His-Tag de <i>L. mexicana</i> en dos cepas de bacterias de <i>Escherichia coli</i> , como son BL21 y Codon Plus.19
5.1.1 Purificación del plásmido19
5.1.2 Transformación de las células competentes19
5.1.3 Condiciones de inducción de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de <i>L. mexicana</i>20
5.2 Purificación de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de <i>L. mexicana</i> con His-Tag.21
5.2.1 Obtención del extracto total y la fracción soluble de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de <i>L. mexicana</i>21
5.2.2 Purificación de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de <i>L. mexicana</i> mediante cromatografía de afinidad.22
5.2.3 Cuantificación de proteína por el método de Bradford22
5.3 Determinación de la actividad enzimática de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de <i>L. mexicana</i>23
5.3.1 Determinación del efecto de la concentración de proteína en la actividad de fosfatasa de la PP2C recombinante de <i>L. mexicana</i>24
5.3.2 Efecto de cationes divalentes en la actividad de fosfatasa de la PP2C recombinante de <i>L. mexicana</i>24
5.3.3 Determinación del pH óptimo de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de <i>L. mexicana</i>24

5.3.4 Efecto de inhibidores específicos de PTP y PS/TP sobre la actividad de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de <i>L. mexicana</i>24
5.4.1 Esquema de inmunización de la PP2C recombinante de <i>L. mexicana</i> en conejos.25
5.4.2 Identificación y titulación de anticuerpos anti-PP2C de <i>L. mexicana</i> por ELISA26
5.5 Análisis de la purificación de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de <i>L. mexicana</i> en geles SDS-PAGE27
5.6 Análisis de Western blot para la identificación de las histidinas presentes en la PP2C recombinante de <i>L. mexicana</i>27
5.7 Identificación de proteínas fosfatasas PP2C en extractos de promastigotes y amastigotes de <i>Leishmania</i> usando los anticuerpos generados anti PP2C de <i>L. mexicana</i>28
VI. RESULTADOS30
6.1 Determinación de las condiciones de sobreexpresión y análisis en geles SDS-PAGE de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de <i>L. mexicana</i> en dos cepas de bacterias de <i>Escherichia coli</i> , como son BL21 y Codon Plus.30
6.2 Análisis de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de <i>L. mexicana</i> mediante geles SDS-PAGE e identificación por Western blot usando un anticuerpo anti-histidina.31
6.3 Análisis en geles SDS-PAGE y Western blot del proceso de purificación de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de <i>L. mexicana</i>32
6.4. Determinación de la actividad enzimática de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de <i>L. mexicana</i> purificada.34

6.4.1 Efecto de cationes divalentes sobre la actividad enzimática de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de <i>L. mexicana</i>35
6.4.2 Determinación del pH óptimo para la actividad enzimática de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de <i>L. mexicana</i>36
6.4.3 Efecto de inhibidores específicos de PTP y PS/TP sobre la actividad enzimática de fosfatasa de la PP2C recombinante de <i>L.mexicana</i>37
6.4.4 Especificidad de sustratos fosforilados en tirosina y treonina por la proteína fosfatasa PP2C recombinante de <i>L. mexicana</i>39
6.5 Generación, identificación y titulación de anticuerpos anti-PP2C de <i>L. mexicana</i> por ELISA40
6.6 Identificación de proteínas fosfatasas PP2C en lisados de promastigotes y amastigotes de <i>L. mexicana</i>41
6.7 Identificación de proteínas fosfatasas PP2C en lisados de promastigotes de parásitos de diferentes especies y cepas de <i>Leishmania</i>42
VII. DISCUSIÓN43
VIII. CONCLUSIÓN50
IX. PERSPECTIVAS50
X. BIBLIOGRAFÍAS51

Lista de figuras	Pag.
Figura 1. Mecanismo de regulación de la fosforilación y desfosforilación entre proteínas cinasas y proteínas fosfatasa.1
Figura 2. Clasificación de PTPs.2
Figura 3. Estructura cristalina de la PP2C humana.5
Figura 4. Estructura química de la sanguinarina6
Figura 5. Ultraestructura electrónica de un amastigote de <i>Leishmania spp.</i>11
Figura 6. Ultraestructura electrónica de un promastigote de <i>Leishmania spp.</i>12
Figura 7. Pacientes con LCL y LCD15
Figura 8. Sobreexpresión de la proteína fosfatasa PP2C de <i>L. mexicana</i>30
Figura 9. Gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie y Western blot anti-histidina de la proteína fosfatasa PP2C de <i>L. mexicana</i> en las fracciones obtenidas de la lisis de bacterias de la cepa Codon Plus31
Figura 10. Perfil de purificación de la proteínas fosfatasa PP2C de <i>L. mexicana</i>33
Figura 11. Actividad enzimática de diferentes concentraciones de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de <i>L. mexicana</i>34
Figura 12. Efecto de cationes divalentes como $MnCl_2$, $MgCl_2$ y $CaCl_2$ en la actividad de fosfatasa de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de <i>L. mexicana</i>35
Figura 13. Determinación del pH óptimo para la actividad enzimática de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de <i>L. mexicana</i>36

Figura 14. Efecto de inhibidores específicos de PTP y PS/TP sobre la actividad enzimática de la PP2C recombinante de <i>L. mexicana</i>38
Figura 15. Especificidad de sustratos fosforilados en tirosina y treonina de la PP2C recombinante de <i>L. mexicana</i>39
Figura 16. Cuantificación de anticuerpos policlonales anti-PP2C de <i>L. mexicana</i>40
Figura 17. Western blot de la PP2C en extractos de parásitos de <i>L. mexicana</i>41
Figura 18. Western Blot anti-PP2C en extractos de promastigotes de distintas cepas de parásitos del género <i>Leishmania</i>42
Figura 19. Estructuras químicas de la histidina y el imidazol.45
Figura 20. Secuencia teórica de aminoácidos de la PP2C de <i>L. mexicana</i>49

Lista de tablas

Pag.

Tabla 1. Serina/treonina fosfatasas PPP y PPM en parásitos y el hombre (modificado de Mikhail, 2008)10
Tabla 2. Correlación de las especies de <i>Leishmania</i> más frecuentes con su distribución geográfica y tropismo.13
Tabla 3. Porcentaje de actividad remanente de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de <i>L. mexicana</i> en presencia de inhibidores de PTP y PS/TP.38
Tabla 4. Características bioquímicas diferenciales entre la PP2C de <i>L. mexicana</i> y la PP2C de <i>L. major</i> (Escalona, 2007).48

Abreviaturas

ADP	Adenosin difosfato
ATP	Adenosin trifosfato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BSA	Albúmina de sérica bovina
Ca ²⁺	Calcio
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CAPS	3-(Ciclohexilamino)-2-hidroxi-1-propanosulfónico ácido
DSPs	Fosfatasa de especificidad dual
EDTA	Ácido etilen diamino tetraacético
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
gP63	Glicoproteína 63
HCl	Ácido clorhídrico
HEPES	Ácido hydroxietil piperazinatanosulfónico
IFN _γ	Interferón gama
IPTG	Isopropil-β-D tiogalactopiranosido
kDa	Kilodaltones
LB	Luria Bertani
LCD	Leishmaniasis Cutánea Difusa
LCL	Leishmaniasis Cutánea Localizada
LMW	Proteína tirosina fosfatasa de bajo peso molecular
LPG	Lipofosfoglicano
MAP	Proteína activada por mitógenos
μg	Microgramos
MES	2-(N-morfolino) etanosulfónico ácido
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
μL	Microlitros
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MnCl ₂	Cloruro de manganeso
N	Normal
NaF	Fluoruro de sodio
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
pH	Potencial de hidrógeno
Pi	Fosfato
PKn	Proteína serina treonina cinasa
PKs	Proteínas cinasas
p-NPP	p-nitrofenil fosfato
PPM	Fosfoproteína fosfatasa monomérica

PPP	Fosfoproteína fosfatasa
PPs	Proteínas fosfatasa
PS/TP	Proteínas serina treonina fosfatasa
PTKs	Proteínas tirosina cinasa
PTPs	Proteínas tirosina fosfatasa
PVDF	Difluoruro de polivinilo
rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante
Ser	Serina
SOB	Medio súper óptimo
TGF- β	Factor de crecimiento transformante- β
Thr	Treonina
Tyr	Tirosina
V	Volts
WB	Western blot

Resumen

La Leishmaniasis es una enfermedad causada por diferentes especies de protozoarios intracelulares obligados del género *Leishmania spp.* Este parásito

infecta a las células del sistema fagocítico-mononuclear como son los macrófagos y células dendríticas. En México el principal agente causal de Leishmaniasis cutánea es *L. mexicana*, la cual provoca leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y leishmaniasis cutánea difusa (LCD).

Se han descrito varias moléculas que se encuentran en el parásito que ayudan a la invasión de las células del sistema fagocítico-mononuclear, y en la evasión de la respuesta promovida en las células inmunes; por lo que son cruciales para el desarrollo de la infección. Dentro de estas moléculas se ha encontrado que el parásito expresa proteínas fosfatasa, por ejemplo en *L. major* se encontró una proteína fosfatasa PP2C que se encuentra expresada en el flagelo y bolsa flagelar del promastigote.

En este trabajo se sobreexpreso, purifico y caracterizo una proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana*. Se encontraron las condiciones de sobreexpresión de la PP2C en la cepa bacteriana Codon Plus de *E. coli* con una inducción con IPTG e incubaciones de toda la noche a 20°C. Ésta enzima 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 desnaturizantes y se tiñeron con azul de Coomassie. Se demostró que la proteína recombinante PP2C de *L. mexicana* tiene un PM de 45 kDa y se presentó a partir del eluido 18 al 37. 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 8.0 y presentó mayor afinidad por el sustrato treonina con respecto a tirosina y se inhibió en presencia de sanguinarina y no con ácido okadáico.

Mediante un Western blot se demostró que la PP2C se expresa en promastigotes de *L. mexicana* y no así en amastigotes; de igual forma se observó que esta enzima es expresada por promastigotes de diferentes cepas y especies de parásitos del género *Leishmania*. 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. mexicana* es similar a la PP2C de mamíferos.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Proteínas fosfatasas

El proceso de fosforilación y desfosforilación de proteínas reguladoras es un mecanismo importante de modulación de las vías de señalización; este mecanismo se realiza por medio de las proteínas fosfatasas, las cuales catalizan la hidrólisis de un enlace éster fosfórico. Las fosfatasas han sido clasificadas en base a su especificidad de sustrato en proteínas fosfatasas de tirosina (PTP) y proteínas fosfatasas de serina/treonina (PS/TP), existiendo también fosfatasas de especificidad dual (González, 2000).

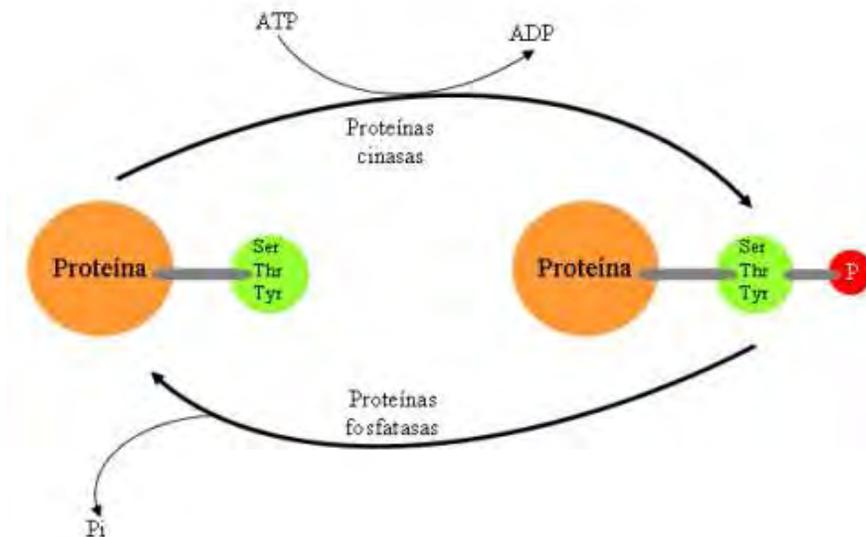


Figura 1. Mecanismo de regulación de la fosforilación y desfosforilación entre proteínas cinasas y proteínas fosfatasas (<http://www.solociencia.com/quimica/proteinas-fosfatasas-origen-vegetal-proteinas-fosfatasas.htm>)

1.1.1. Proteínas fosfatasas de tirosina (PTP)

Las PTP, desfosforilan proteínas con residuos en tirosina y participan en diversos procesos celulares como son: la regulación de la proliferación, diferenciación, migración y transcripción de genes. Estas enzimas consisten en más de 500 proteínas estructuralmente diversas que tienen en común el dominio catalítico de PTP de 250 aminoácidos muy conservado, pero que presentan una variación

considerable en sus segmentos no catalíticos. (Gonzalez, 2000). Las PTPs se pueden agrupar basándose en la secuencia de aminoácidos de sus dominios catalíticos en cuatro familias independientes, tal y como se muestra en la figura 2; cada uno con un rango de especificidades de sustrato. La familia más amplia es la de Clase I que incluye las PTPs clásicas y las de especificidad dual (DSPs). Las PTPs de Clase II basadas en cisteína son las PTPasas de bajo peso molecular (LMW). Las PTPs de Clase III basadas en cisteína, tienen especificidad tanto para tirosina como para treonina. Por último la cuarta familia de las PTPs utilizan un mecanismo catalítico diferente con un ácido aspártico clave y desfosforilan tanto tirosina como serina (Alonso, 2004).

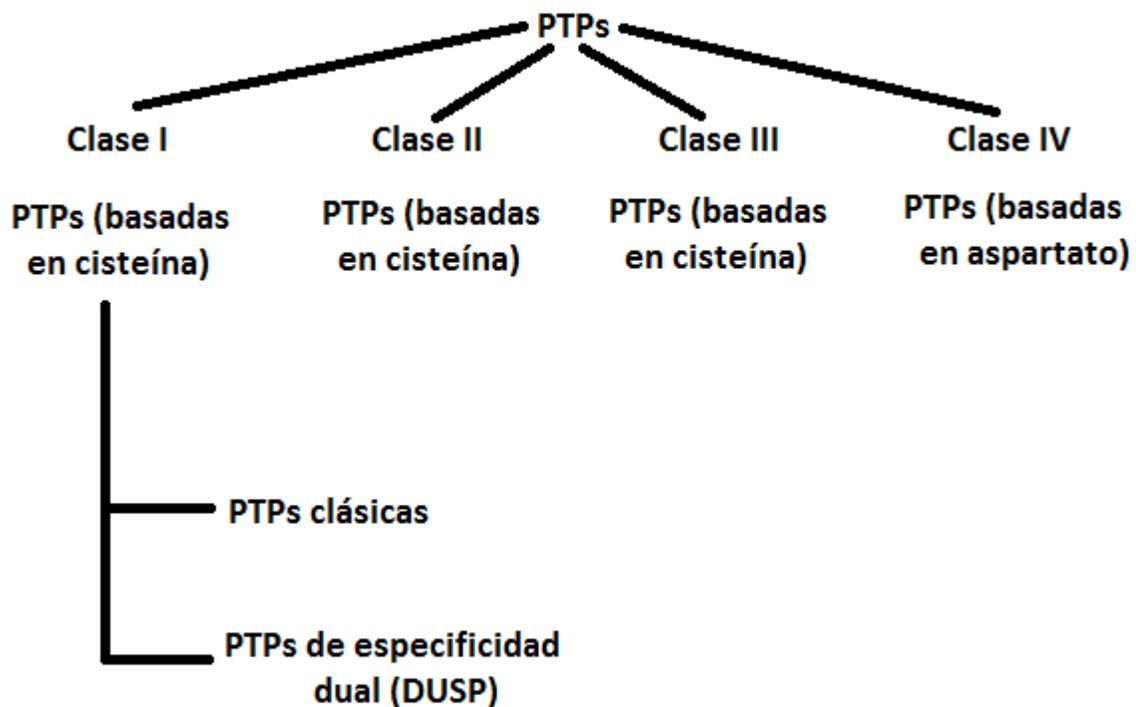


Figura 2. Clasificación de PTPs.

Se han identificado, hasta la fecha, más de 100 proteínas con actividad de tirosina fosfatasa, y la secuenciación del genoma humano predice la existencia de más de 500 PTPs (Brion, 2010).

1.1.2. Inhibidores específicos de PTPs

Un inhibidor de amplio espectro de las PTPs es el ortovanadato de sodio, el cual cuenta con una estructura análoga al grupo fosfato, por lo cual se une al sitio catalítico de la enzima y esta pierde su actividad catalítica (Huyer, 1997). Otro de los inhibidores clásicos de PTP que actúa como inhibidor competitivo es el pervanadato de sodio (Huyer, 1997); mientras que el molibdato de amonio inhibe a este tipo de fosfatasas en forma no competitiva, al igual que el tungstato de sodio.

1.1.3. Proteínas fosfatasas de serina treonina (PS/TP)

Las PS/TP son un grupo de enzimas que remueven grupos fosfato de proteínas con residuos en serina o treonina. Este grupo de enzimas en su mayoría funcionan en complejos hetero-oligoméricos con gran diversidad de subunidades regulatorias. Esta característica le otorga a estas enzimas especificidad de sustrato y de localización subcelular.

En las fosfatasas de serina/treonina, el análisis bioquímico ha permitido agruparlas en: proteínas fosfatasas de tipo 1 (PP1), 2A (PP2A), 2B (PP2B, también conocida como calcineurina) y 2C (PP2C). Los tipos PP1, PP2A y PP2B poseen alta homología en sus dominios catalíticos, pero diferente especificidad de sustrato e interacción con moléculas reguladoras. La fosfatasa de tipo PP2C no posee relación con las anteriores.

Las fosfatasas PP1 están codificadas por 3 genes altamente relacionados en los seres humanos (PP1 α , PP1 β / δ y PP1 γ), estas fosfatasas cuentan con diversas localizaciones subcelulares pero de forma importante en el núcleo; se encuentra presente durante todo el ciclo celular teniendo una importante función en la condensación de la cromatina dentro de la célula (Moorhead, 2007). También controlan funciones tales como el metabolismo del glucógeno (Brady, 2001), la progresión del ciclo celular (Berndt, 1999) y diversas actividades neuronales (Morfini, 2004), entre otras. Además, PP1 cataliza la desfosforilación de muchas proteínas fosforiladas por PKA (Bridges, 2006).

Las proteínas PP2A están formadas por al menos 15 subunidades regulatorias y está involucrada en procesos tales como el ciclo celular (Trinkle, 2006), la condensación de la cromatina y el control de la actividad de telomerasa (Chen, 2004), entre otros. Los mamíferos tienen dos genes que codifican para PP2A (PPP2C α y PPP2C β), estas fosfatasa se encuentran mayormente en el núcleo de la célula (Moorhead, 2007).

La fosfatasa PP2B se caracteriza por su dependencia de Ca²⁺ y juega un rol crucial en la señalización a través de Ca²⁺ en células T activadas (Jain, 1993). Es también llamada calcineurina debido a su dependencia de calcio para su actividad enzimática, esta fosfatasa es un dímero que consta de una subunidad catalítica A y una subunidad independiente B; así mismo se ha visto que tienen un papel importante en la activación y función transcripcional de proteínas que participan en la respuesta inmune (Moorhead, 2007).

Las PP2C poseen un requerimiento absoluto de cationes como Mg²⁺ o Mn²⁺ para tener actividad enzimática y junto con las isoformas PP1, PP2A, PP2B son las responsables de la mayoría de la actividad de fosfatasa de serina/treonina en reacciones *in vivo* (Brion, 2010).

1.1.4. Proteínas fosfatasas PP2C

Las proteínas fosfatasas PP2C representan una gran familia de proteínas altamente conservadas, con 18 distintos genes en el genoma humano que dan lugar a por lo menos 22 diferentes isoformas. A diferencia de la familia de proteínas fosfatasas de serina/treonina PPP, las PP2C son insensibles a la inhibición por ácido okadáico que es un inhibidor específico de PS/TP (Rodríguez, 1998), pero inhibidas de forma específica por la sanguinarina (Aburai, 2010).

Las PP2C son un grupo de proteínas monoméricas que oscilan entre los 40 y 50 kDa. La PP2C de humano es la más estudiada y es una proteína de 42 kDa que cuenta con una secuencia altamente conservada, esta PP2C muestra una amplia especificidad de sustrato y es dependiente de cationes divalentes principalmente Mg²⁺ y Mn²⁺ para su actividad enzimática. 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 plegadas y un dominio carboxilo terminal (90 residuos de aminoácidos) con tres alfa hélices; en el sitio catalítico se encuentran cuatro ácidos aspárticos que son de suma importancia para su actividad enzimática. Esta arquitectura proteica se puede observar en la figura 3, y es común para todos los miembros de la familia PP2C (Das, 1996).

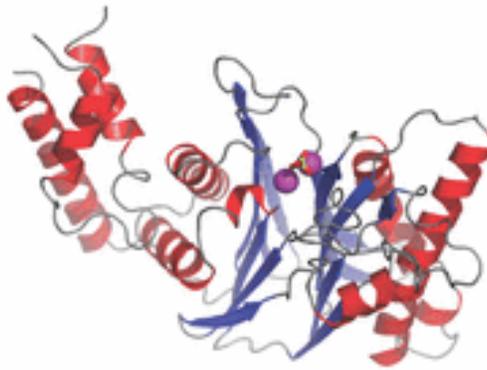


Figura 3. Estructura cristalina de la PP2C humana. Las hélices son de color rojo y las cadenas beta-plegadas son de color azul, los dos iones de sitio activo Mn^{2+} se muestran como esferas púrpura.

La función principal de la proteína fosfatasa PP2C es la señalización para la regulación del estrés celular, y juega un papel de suma importancia en la diferenciación, crecimiento, estrés y la apoptosis de la célula en el humano. Las diferentes isoformas de la PP2C, muestran distintas funciones, patrones de expresión y localización subcelular (Moorhead, 2007).

1.1.5. Inhibidores específicos de PS/TP

El ácido okadaico es un inhibidor muy potente de las proteínas fosfatasas, especialmente de la proteína fosfatasa 1 y de la proteína fosfatasa 2A, aunque no de la proteína fosfatasa 2B. De igual forma la caliculina es un inhibidor de PS/TP, principalmente PP1, este compuesto no inhibe PTP y es más efectivo que el ácido okadaico (González, 2000).

1.1.6. Inhibidor específico de la proteína fosfatasa PP2C (Sanguinarina)

La sanguinarina (13-metil [1,3] benzodioxolo [5,6-c]-1,3-dioxolo [4,5] fenantridinio) es un alcaloide derivado principalmente de la raíz de *Sanguinarina canadensis* y otras especies de *Fumaria*. Es un alcaloide benzofenantridina y es un homólogo estructural de la queleritrina. Se ha demostrado que posee propiedades antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatorias y anti-tumorales (Chaturvedi, 1997).

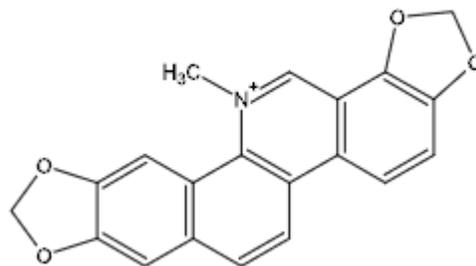


Figura 4. Estructura química de la sanguinarina (Adhami, 2004)

En estudios recientes han demostrado que este compuesto a concentraciones micromolares inhibe el crecimiento de células de carcinoma A431; por medio de la inducción de la apoptosis. En otro estudio, se demostró que la sanguinarina provoca una muerte de tipo apoptótica en la línea inmortal de queratinocitos humanos HaCaT a través de modulaciones en la vía mitocondrial y la familia de proteínas Bcl – 2 (Adhami, 2003). Además se ha demostrado que es un inhibidor competitivo de proteínas fosfatasa PP2C (Aburai, 2010).

1.1.7. Proteínas fosfatasa PP2C en plantas

En *Arabidopsis thaliana* se ha visto que existen 5 genes que codifican para PP2C y que cuentan con un sitio catalítico homólogo a la PP2C de mamífero. De igual forma se ha descrito una PP2C en *Medicago sativa* (alfalfa) la cual tiene una secuencia similar a la PP2C de humano llamada MP2C (Rodríguez, 1998).

1.1.8. Proteínas fosfatasa PP2C en hongos y levaduras

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se encuentran varios genes que codifican para proteínas fosfatasa PP2C; existen más de 5 isoformas de esta proteína denominadas PTC1 a 5 y todas comparten un dominio catalítico de PP2C muy conservado. Varias de estas isoformas fueron asociadas con la vía de señalización para la regulación negativa de la osmolaridad de glicerol, inducible después de estrés osmótico, mediante la desfosforilación e inactivación de la MAPK Hog1 que es la proteína encargada de cerrar el canal de glicerol de la célula (Ariño, 2011).

En *Schizosaccharomyces pombe* se aisló un gen que codifica una proteína de 40 kDa que comparte 35% de identidad con la PTC1 de *S. cerevisiae*. De igual forma se mostró que tiene una actividad de fosfatasa dependiente de Mg^{2+} , el gen para esta proteína fue nombrado Ptc1. Posteriormente se dieron a conocer otros dos genes que codifican para PP2C; Ptc2 y Ptc3, las proteínas resultantes de estos junto con la de PTC1 tienen el 90% de actividad de PP2C en la célula de *S. pombe* (Wu, 2009).

En *Candida albicans* se encontraron seis secuencias denominadas CaPTC1, CaPTC2/3, CaPTC4, CaPTC5, CaPTC6 y CaPTC7, recientemente se añadió a la lista el CaPTC8. La primera PP2C caracterizada fue la CaPTC7 demostrándose que tiene características bioquímicas clásicas de las proteínas fosfatasa PP2C como la dependencia de iones Mg^{2+} y Mn^{2+} *in vitro*, que su actividad es inhibida por fluoruro de sodio (NaF) y es insensible a la inhibición por ácido okadaico. La región N-terminal de la proteína contiene un dominio transmembrana y una señal de potencial mitocondrial que justifica su presencia en este organelo (Ariño, 2011).

Así mismo se han encontrado homólogos de CaPtc7 en *S. cerevisiae* y *S. pombe*. Se cree que esta proteína tiene importancia en la regulación de la morfogénesis de este organismo, sin embargo si el CaPtc7 no se expresa no se ve afectado el desarrollo vegetativo filamentoso en *C. albicans* (Jiang, 2001).

El gen *CaPtc1* codifica para una proteína fosfatasa que comparte 52 % de identidad con la PTC1 de *S. cerevisiae*, se ha observado que poblaciones mutantes nulos a esta proteína muestran mayor sensibilidad a antifúngicos derivados de equinocandina, caspofungina y micafungina. De igual forma al suprimir el gen para la *CaPTC1* se reduce significativamente la virulencia de este patógeno oportunista (Jiang, 2001).

El gen *CaPtc4* da como producto una proteína fosfatasa PP2C típica con su dominio catalítico conservado que tiene actividad hacia péptidos sintéticos fosforilados en residuos de treonina; y mediante una fluorescencia se demostró que esta proteína está presente en la mitocondria. Así mismo el mutante homocigoto *CaPtc4* muestra mayor sensibilidad a medicamentos como fluconazol y ketoconazol (Jiang, 2001).

Por otro lado en *Fusarium graminearum* se identificó una secuencia homóloga al *Ptc1* de *S.cerevisiae* gen llamado *FgPtc1* y la proteína muestra actividad de proteína fosfatasa PP2C frente a un fosfopéptido sintético. La supresión de *FgPTC1* atenúa la virulencia de *F. graminearum* en el trigo. Mientras que en *Aspergillus nidulans* se encontraron 28 genes con identidad para el sitio catalítico de PP2C, y se demostró que todas las mutantes resultantes son viables (Jiang, 2010).

1.1.9. Proteínas fosfatasas PP2C en bacterias

Se ha demostrado que *Bacillus subtilis* presenta cinco genes que codifican para PP2C. Uno de ellos, denominado Spoll E, regula la esporulación, ya que promueve la desfosforilación de un factor de transcripción Spoll, que es un fago específico de *B. subtilis* (Obuchowski, 2000).

En *Salmonella entérica* serovar *typhi* se han encontrado polipéptidos que codifican con homología para proteínas fosfatasas PP2C (Sio, 2005). De igual modo en los genomas de *Streptomyces coelicolor* y *Streptomyces avermitilis* se encontró que contienen 49 y 48 genes respectivamente que codifican para proteínas fosfatasas

PP2C y *Synechocystis* contiene 8 genes que codifican para proteínas fosfatasa PP2C.

En *Mycobacterium tuberculosis* la proteína fosfatasa PP2C denominada PSTP juega un papel en la regulación de la división celular debido a que desfosforila serina treonina cinasas PKnA y PKnB (Chopra, 2003). De igual forma se ha observado que la estructura de la PSTP tiene un pliegue conservado y estructuralmente invariante en el centro donde se unen los iones Mn^{2+} el cual forma el núcleo de las enzimas PP2C (Pullen, 2004).

1.1.10. Proteínas fosfatasa PP2C en parásitos

Se ha observado que existen al menos 10 fosfatasa de serina/ treonina de la familia de las PPM que se han detectado en *Plasmodium falciparum* y *Cryptococcus parvum*, cuatro en *Babesia bovis* y *Theileria parva* y dos en *Toxoplasma gondii*. En parásitos como *Entamoeba histolytica* y *Trichomona vaginalis* existen 33 y 19 PPM respectivamente (Mikhail, 2008).

En *P. falciparum* se ha encontrado una PP2C que tiene como sustrato el factor de elongación y transducción 1 (PfEF1) y esto a su vez tiene acción en la transcripción y traducción de señales dentro de la célula hospedera (Mamoun, 2001).

Mientras que en *T. gondii* se sabe que hay una proteína fosfatasa PP2C que es secretada por las roptrias del parásito y que va dirigida al núcleo de la célula hospedera, además la inhibición de la síntesis de esta fosfatasa afecta el crecimiento del parásito por lo que no tiene la misma capacidad infectiva. Esta proteína fosfatasa PP2C juega un papel importante en el control de actina del parásito (Gilbert, 2007).

Tabla 1. Serina/treonina fosfatasa PPP y PPM en parásitos y el hombre (modificado de Mikhail, 2008)

	PPP total	PP1	PP2A PP4,6	PP2B	PP5	PP7	PPM total
<i>H. sapiens</i>	13	3	4	3	1	2	16
<i>P. falciparum</i>	11	1	3	1	1	1	10
<i>T. parva</i>	7	1	2	-	1	1	4
<i>B. bovis</i>	7	1	2	-	1	1	4
<i>T. gondii</i>	2	1	-	1	-	-	2
<i>C. parvum</i>	8	1	2	1	1	-	10
<i>T. brucei</i>	41	8	3	2	1	2	13
<i>T. cruzi</i>	42	7	4	2	1	2	14
<i>E. histolytica</i>	81	-	-	-	-	-	33
<i>G. lamblia</i>	15	1	2	-	1	-	6
<i>T. vaginalis</i>	169	-	-	-	-	-	19
<i>E. cuniculi</i>	5	1	1	-	-	1	-
<i>L. major</i>	30	8	2	2	1	1	15

En *Leishmania chagasi* se exhibe una PP2C dependiente de Mg^{2+} para su actividad de fosfatasa y no es inhibida por ácido okadáico, el cual es un inhibidor específico de proteínas fosfatasa de serina/treonina (Burns, 1993). Esta PP2C de *L. chagasi* se expresa en promastigotes y amastigotes; además esta proteína estimuló una respuesta de células T de pacientes infectados con *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. chagasi* (Burns, 1993).

En el promastigote de *Leishmania major* hay una proteína fosfatasa PP2C que se expresa principalmente en el bolsillo flagelar y flagelo de este parásito (Escalona, 2007).

1.2 *Leishmania spp.*

La *Leishmania* es un parásito intracelular obligado que infecta las células del sistema fagocítico-mononuclear como son los monocitos, macrófagos y células dendríticas. Este parásito presenta dos fases morfológicas y sus características son las siguientes:

Los amastigotes son parásitos ovalados o redondeados que miden de 2 a 5 μm de longitud, poseen un vestigio de flagelo contenido en la bolsa flagelar y se localizan dentro de los macrófagos de los hospederos vertebrados. Los amastigotes, tienen un citoplasma y un núcleo grande con cariosoma central y a un lado se encuentra una estructura en forma de barra que se denomina cinetoplasto, como se observa en la ultraestructura mostrada en la figura 5.

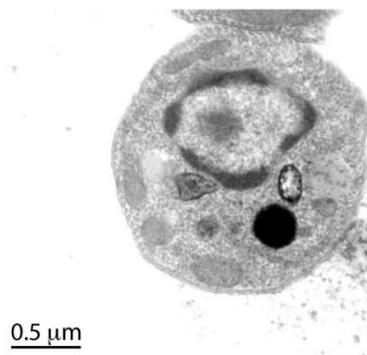


Figura 5. Ultraestructura electrónica de un amastigote de *Leishmania spp.* (Foto tomada en el laboratorio de bioquímica del CINVESTAV)

Los promastigotes se encuentran en el hospedero invertebrado y es la forma que inocular al vertebrado. Son parásitos alargados que miden entre 10 y 15 μm de longitud. Se observa que tienen un núcleo en la parte media del cuerpo. Cerca del extremo anterior de este parásito está el cinetoplasto, que puede ser terminal o subterminal, y de donde sale un flagelo que le confiere movimiento. Este flagelo es casi de igual tamaño que el cuerpo como se observa en la figura 6. El promastigote metacíclico es la forma infectiva.



Figura 6. Ultraestructura electrónica de un promastigote de *Leishmania spp.* (Foto tomada en el laboratorio de bioquímica del CINVESTAV)

1.2.1. Moléculas relacionadas con la virulencia de *Leishmania spp.*

Se han descrito varias moléculas que principalmente se encuentran en la superficie del parásito. En los promastigotes se han descrito glicoproteínas de superficie en las que la manosa es el componente más abundante, dentro de estas moléculas se encuentra:

- Glicofosfatidil inositol
- Glicosil fosfolípidos
- Lipofosfoglicano (LPG)
- Fosfoglicanos
- Proteofosfoglicanos
- Glicoproteína GP63

Todas estas moléculas por su ubicación en el parásito ayudan a la invasión de las células del sistema fagocítico-mononuclear, y en la evasión de la respuesta promovida en las células inmunes; por lo que son cruciales para el desarrollo de la infección (Rodríguez, 2003).

Las moléculas ubicadas en la superficie del parásito y denominadas determinantes invasivos/evasivos, son cruciales para la infección pero no producen patología en el huésped. Las más extensivamente estudiadas relacionadas con la virulencia en

Leishmania spp han sido la GP63 y LPG. La GP63 ayuda a los promastigotes contra la lisis por complemento, también ayuda junto con la LPG al enlazamiento de los parásitos al macrófago y su entrada a la célula. Ambas proteínas pueden ser importantes para la sobrevivencia del parásito dentro del fagolisosoma (Rodríguez, 2003).

1.2.3. Leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad endémica en 88 países de los cinco continentes (como se muestra en la tabla 2), dentro de los cuales se encuentra México (Jheman, 2008). Para el caso particular de la República Mexicana, la leishmaniasis cutánea (LC) es endémica en Campeche, Chiapas, Coahuila, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Tamaulipas, Quintana Roo, Tabasco, Veracruz, Yucatán y recientemente Sinaloa. (Salazar-Mejía, 2010).

Tabla 2. Correlación de las especies de *Leishmania* más frecuentes con su distribución geográfica y tropismo.

<i>Especie</i>	<i>Geografía</i>	<i>Tropismo</i>
<i>L. donovani</i>	Viejo Mundo	Visceral y cutáneo
<i>L. infantum</i>	Viejo Mundo	Visceral y cutáneo
<i>L. chagasi</i>	Nuevo Mundo	Visceral y cutáneo
<i>L. tropica</i>	Viejo Mundo	Cutáneo
<i>L. major</i>	Viejo Mundo	Cutáneo
<i>L. aethiopica</i>	Viejo Mundo	Cutáneo y mucoso
<i>L. mexicana</i>	Nuevo Mundo	Cutáneo
<i>L. amazonensis</i>	Nuevo Mundo	Cutáneo
<i>L. braziliensis</i>	Nuevo Mundo	Cutáneo
<i>L. panamensis</i> ^a	Nuevo Mundo	Cutáneo y mucoso
<i>L. guyanensis</i> ^a	Nuevo Mundo	Cutáneo y mucoso
<i>L. peruviana</i> ^a	Nuevo Mundo	Cutáneo

La Leishmaniasis es una enfermedad causada por diferentes especies de protozoarios intracelulares obligados del género *Leishmania*. En México es transmitida cuando una hembra hematófaga de dípteros del género *Lutzomyia*, en el nuevo continente, pica a un hospedero mamífero, e infecta por medio de la saliva con promastigotes metacíclicos. Esta enfermedad es clasificada en tres formas clínicas principales: la cutánea, la mucocutánea y la visceral.

En México el principal agente causal de leishmaniasis es *Leishmania mexicana*, la cual provoca leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y leishmaniasis cutánea difusa (LCD).

1.2.3.1. Leishmaniasis cutánea

Leishmania mexicana puede causar un amplio espectro de enfermedades clínicas, que van desde una úlcera cutánea localizada en el sitio de la infección, que es característico de los pacientes con leishmaniasis cutánea localizada, a la difusión de una enfermedad, donde parasitados intensamente se forman nódulos de macrófagos que se propagan por la piel y en última instancia invadir la mucosa nasal y orofaríngea (Fernández, 2012).

Es bien sabido que tras un periodo de incubación previo se desarrolla la LCL que se manifiesta con una lesión nodular en el sitio de inoculación, con formación de una costra que puede desprenderse, exponiendo una úlcera que se cura gradualmente y deja una cicatriz ligeramente hundida con pigmento alterado. Algunas lesiones pueden perdurar como nódulos o placas; son comunes los nódulos secundarios en el borde de la lesión. Otros signos o síntomas son lesiones múltiples primarias o satélites, adenopatías regionales, dolor, prurito e infecciones bacterianas secundarias.

La LCD se caracteriza por una infección diseminada de curso recurrente o crónico, con engrosamiento cutáneo en forma de placas, pápulas y/o nódulos, principalmente en la cara y las extremidades; las lesiones son asintomáticas y no se ulceran. Es importante indicar que la gravedad de las manifestaciones clínicas depende del parásito y de las condiciones inmunológicas del hospedero.

Considerando que los pacientes con LCL tienen una respuesta inmune celular asociada con citocinas activadoras de macrófagos tales como IFN- γ e IL-2, los pacientes de LCD carecen de una respuesta inmune celular eficaz, permitiendo una incontrolada replicación de los parásitos dentro de los macrófagos y otras células fagocíticas. Poco se sabe acerca de los factores que intervienen en la modulación de la evolución de la enfermedad. Una respuesta inflamatoria excesiva

puede conducir a un aumento de la infiltración de neutrófilos, que ha sido asociado con progresión de la enfermedad (Fernández, 2012)

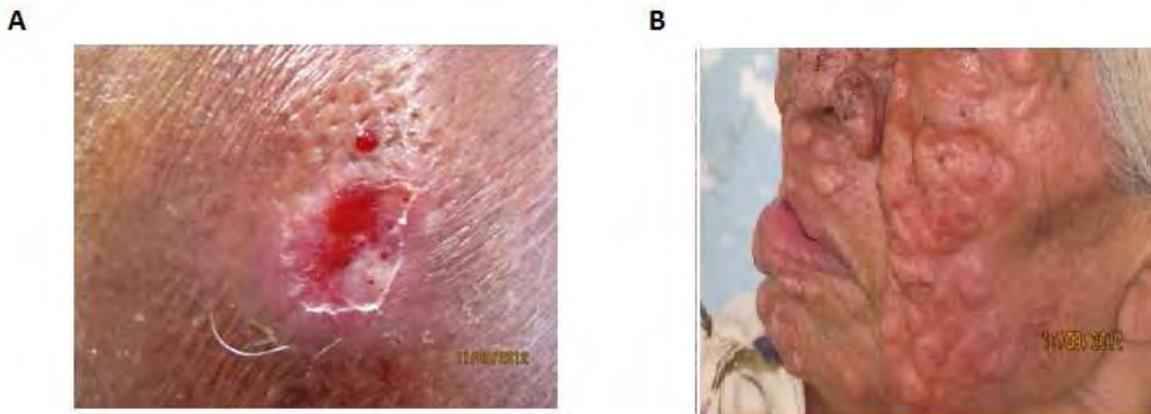


Figura 7. Panel A se observa una lesión característica de LCL. Panel B se observan lesiones características de LCD; provocadas por *L. mexicana* (Donación del laboratorio de inmunoparasitología de la UNAM)

1.2.4. Infección

La infección comienza cuando una mosca flebótomo; *Lutzomia* en el caso particular del continente americano, pica a un hospedero mamífero para alimentarse inoculando promastigotes metacíclicos de *Leishmania* por medio de su saliva, en la piel (inoculación intradérmica). Estos parásitos son fagocitados por células como macrófagos y células dentríticas que se encuentran en el tejido conectivo, en donde cambian de fase a amastigotes y se mantienen dentro dividiéndose por fisión binaria, hasta que salen de las células e infectan otras. Finalmente el vector pica a un mamífero infectado y el amastigote es tomado por el mosquito y cambia de fase a promastigote en el tracto digestivo del insecto, promoviendo el ciclo biológico de este parásito

En el hospedero mamífero *Leishmania* es un parásito intracelular obligado y se replica de forma segura en las células infectadas reclutadas para destruirlo. La incapacidad de los macrófagos para matar las células del parásito y activar el sistema inmune adaptativo es un producto de la capacidad del parásito para alterar varias vías de señalización claves en el hospedero. Muchas de estas alteraciones en la señalización se observan tempranamente en el curso de la

infección; estas alteraciones rápidas de las vías de señalización sirven por lo menos para dos funciones principales, en primer lugar para la inhibición en el macrófago de las vías y mecanismos que se desencadenan en la fagocitosis, y así la producción de moléculas como el óxido nítrico (NO) y en segundo lugar bloquea las funciones del macrófago que pueden conllevar a la apoptosis o muerte celular. (Olivier, 2011)

Por ejemplo, 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 de estas células. 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 se transloca al núcleo donde se unen a la secuencia de activación en el gen inducible para IFN γ (Bhardwaj, 2005).

En el caso de la vía de las MAP cinasas se observó que las células infectadas con el parásito 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 iNOS en respuesta a IFN γ disminuyó notablemente por la infección con *Leishmania* (Nandan, 1999)

II. JUSTIFICACIÓN

El principal agente causal de leishmaniasis cutánea en México es *L. mexicana*, un parásito que cuenta con la 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.

Por esta razón y tomando en cuenta los antecedentes es importante identificar y estudiar una proteína fosfatasa PP2C de *Leishmania mexicana*; ya que se ha demostrado que las proteínas fosfatasas son de gran importancia en la patogenicidad y virulencia de otros microorganismos.

III. HIPOTÉISIS

Leishmania mexicana expresa una proteína fosfatasa PP2C, que tiene características bioquímicas semejantes a la PP2C de células eucariontes.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Purificar y realizar la caracterización bioquímica de una proteína fosfatasa PP2C de *Leishmania mexicana*.

Objetivos particulares:

- 1.-Expresar y purificar la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *Leishmania mexicana*, mediante cromatografía de afinidad.
- 2.-Determinar el pH óptimo para la actividad de la proteína fosfatasa PP2C recombinante *Leishmania mexicana*.
- 3.- Analizar la actividad de fosfatasa de la PP2C recombinante en presencia de cationes divalentes, como $MgCl_2$, $MnCl_2$ y $CaCl_2$

4.-Analizar la actividad específica de treonina y tirosina, de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *Leishmania mexicana*, mediante la utilización de peptidos específicos.

5.-Analizar el efecto de inhibidores específicos en la actividad de fosfatasa de la PP2C recombinante de *Leishmania mexicana*.

6.-Obtener anticuerpos policlonales, contra la PP2C recombinante de *Leishmania mexicana*.

7.- Realizar ensayos de Western blot con el anticuerpo policlonal anti-PP2C en lisados de promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

La proteína fue clonada en el plásmido PET 23B; el gen que codifica para la PP2C LMXM_25_0750; se encuentra localizado en el cromosoma 25. Los datos teóricos bioquímicos de la proteína son un peso molecular de 44.5 kDa y un punto isoeléctrico de 4.5.

5.1 Sobreexpresión de la proteína PP2C recombinante con His-Tag de *L. mexicana* en dos cepas de bacterias de *Escherichia coli*, como son BL21 y Codon Plus.

5.1.1 Purificación del plásmido

Se inoculó un precultivo de bacterias de la cepa BL21 en medio Luria Bertani (LB) con ampicilina en una concentración de 100 µg/mL, simultáneamente se realizó un precultivo de la cepa Codon Plus en medio LB con ampicilina y cloranfenicol en concentraciones de 100 µg/mL y 34 µg/mL respectivamente; y se dejaron toda la noche en agitación constante a 37°C.

Al día siguiente los cultivos se centrifugaron a 6000 rpm por 15 minutos a 4°C. Posteriormente se realizó la purificación de DNA (ácido desoxirribonucleico) del plásmido PET23B siguiendo las indicaciones del fabricante. Se cuantificó la cantidad de DNA obtenido en la purificación en el nanodrop.

5.1.2 Transformación de las células competentes

Posteriormente se colocaron las bacterias de las cepas BL21 y Codon Plus en una solución que contenía potasio, cloro y magnesio (KCM) para abrir poros en la membrana y permitir la entrada del plásmido y se les agregó 0.5 µg de DNA plásmidico, se dejó reposar 15 minutos en hielo, todo en condiciones de esterilidad. Después de este tiempo se aplicó a las células bacterianas un choque térmico a 42°C por 40 segundos para cerrar los poros y se dejaron 5 minutos en hielo.

Se colocó medio caldo súper óptimo (SOB) hasta 80 % la capacidad del tubo donde se encontraban las bacterias y se dejaron en agitación una hora a 37°C; posteriormente se tomó un inóculo para un precultivo de cada cepa y se incubaron a 37°C toda la noche en medio LB en las condiciones mencionadas en la sección 5.1.1.

5.1.3 Condiciones de inducción de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana*

De los precultivos incubados toda la noche se tomó un inóculo para colocarlo en medio nuevo LB adicionado con los antibióticos respectivos para cada cepa, y se incubaron a 37°C en agitación constante durante 2 horas, posteriormente se monitoreó la densidad bacteriana en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm y los cultivos se utilizaron hasta obtener una densidad óptica de 0.8 nm. Se tomó una alícuota de cada cultivo sin inducir para posteriores comparaciones, al cultivo restante de cada cepa se le adicionó un inductor que fue el isopropil-B-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración de 1 mM para inducir en las bacterias la producción de la proteína de interés, y se dividieron en tres alícuotas iguales; todo en condiciones de esterilidad.

Posteriormente se incubaron cada una de las alícuotas, de cada cepa a diferentes temperaturas que fueron 20, 30 y 37°C, toda la noche. Al día siguiente se centrifugaron los 6 cultivos durante 15 minutos a 6000 rpm a 4°C junto a los cultivos sin inducir, se desechó el medio de cultivo de cada centrifugado y las pastillas (P) se resuspendieron en 5 mL de amortiguador de lisis (PBS 50 mM, NaCl 1.5 M, Imidazol 5 mM a pH 7.8, PMSF 0.2 mM). Las bacterias resuspendidas se sonicaron: 5 ciclos de 30 segundos a 4°C dando 1 minuto de descanso entre cada ciclo (se debe observar una solución incolora que indica la lisis completa); este es el extracto total (ET).

De los ET se tomaron 1.3 mL y se centrifugaron durante 10 minutos a 13000 rpm a 4°C y se separaron los sobrenadantes (SN) y las pastillas (P); a los SN se les agregó 300 µL de resina acoplada a níquel y se colocaron en agitación durante 1

hora a 4°C. Finalizado el tiempo de incubación se centrifugaron a 13000 rpm a 4°C por 1 min y se realizaron dos lavados con 1 mL de amortiguador de lisis, y un tercer lavado con 200 µL de un segundo amortiguador (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 500 mM a un pH de 7.8); el SN obtenido se utiliza para determinar las condiciones óptimas de expresión. Por último se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con 10 µg de proteína, para determinar las condiciones óptimas de expresión.

5.2 Purificación de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana* con His-Tag

5.2.1 Obtención del extracto total y la fracción soluble de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana*

Se colocó un precultivo en medio LB con ampicilina y cloranfenicol en concentraciones de 100 µg/mL y 34 µg/mL respectivamente de *Escherichia coli* cepa Codon Plus a 37°C en agitación toda la noche; al día siguiente del cultivo se tomó un inóculo para realizar un nuevo cultivo a las condiciones ya mencionadas en nuevo medio LB con los antibióticos antes mencionados y se puso en agitación constante a 37°C hasta llegar a una densidad óptica de 0.8 nm; en este punto se indujo la producción de la proteína fosfatasa PP2C de *L. mexicana* con la adición de IPTG a una concentración de 1 mM y se incubó a 20°C toda la noche, al día siguiente se centrifugaron alícuotas de 50 mL de cultivo a 3000 rpm por 30 min a 4°C y las pastillas se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Se resuspendieron las 6 pastillas, en 30 mL de amortiguador de unión (Imidazol 5 mM, NaCl 300 mM, Tris 50 mM a pH de 7.8 aprotinina 2 µg/mL, leupeptin 2 µg/mL y benzamidina 100 mM). Las bacterias resuspendidas se lisaron por sonicación utilizando las siguientes condiciones 30 % de amplitud, 50 ciclos de 1 minuto con descansos de 1.5 minutos entre ciclos a una temperatura de 4°C. De este proceso se tomó una alícuota de ET; posteriormente se centrifugó a 13000 rpm 1 hora a 4°C y se obtuvo el SN y la P. La P se resuspendió en 30 mL de amortiguador de

unión. Al final se analizaron las fracciones en geles SDS-PAGE y Western blot, utilizando 20 µg de proteína.

5.2.2 Purificación de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana* mediante cromatografía de afinidad

Del SN obtenido se cuantificó proteína por el método de Bradford y se pasó por una cromatografía de afinidad la cual se encuentra acoplada a níquel; la columna fue previamente lavada con 3 veces su volumen y equilibrada con amortiguador de unión.

El SN se colocó en la columna y se dejó interaccionar con la resina acoplada a níquel toda la noche, al día siguiente se obtuvo lentamente la fracción no unida (NU) y posteriormente se realizaron dos lavados de 25mL con amortiguador de unión, guardando una alícuota de cada lavado y del material NU.

Posteriormente la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana* se eluyó mediante la formación de un gradiente de imidazol que consistió en la mezcla de 25mL de amortiguador de unión y 25 mL de amortiguador de elución (imidazol 500 mM, NaCl 300 mM y Tris 50 mM). Se recolectaron 50 eluidos de 1 mL cada uno, a cada uno de ellos se les cuantifico proteína por el método de Bradford y los eluidos a los que fue posible cuantificar proteína fueron analizados en geles SDS-PAGE y se almacenaron hasta su uso a 4°C.

Nota: la proteína es catalíticamente activa hasta 15 días después de la purificación y es importante que no sea congelada y se conserve a 4°C.

5.2.3 Cuantificación de proteína por el método de Bradford

La cuantificación de proteínas por el método de Bradford está basado en el cambio de absorbancia de 465 nm a 595 nm de una solución ácida de Azul de Coomassie Brillante contenida en el reactivo que lleva el mismo nombre. El colorante azul de Coomassie se une a residuos de aminoácidos principalmente básicos y aromáticos, especialmente arginina.

Se realizó una curva patrón, de una solución de albúmina sérica bovina (BSA), con concentraciones de 0 a 15 µg. La curva se realizó por duplicado al igual que las muestras, de las muestras se colocaron diferentes volúmenes y se les adicionó el volumen restante de amortiguador de unión para llegar a 160 µL y se les adicionó 40 µL de reactivo de Bradford. Se leyó antes de una hora en el espectrofotómetro a 595 nm utilizando el software KC4, el cálculo se realizó utilizando el promedio de los resultados de cada muestra y el resultado fue el que se utilizó para los demás experimentos.

5.3 Determinación de la actividad enzimática de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana*

Esta determinación se realizó en varios de los eluidos obtenidos por cromatografía de afinidad, se preparó una mezcla con 25 µg de PP2C recombinante de *L. mexicana*, 10 mM de un sustrato general de fosfatasa como es el *p*-nitrofenil fosfato (*p*-NPP) y 10 mM de MnCl₂ y solución amortiguadora de HEPES 50mM pH=8.0; teniendo un volumen final de 100 µL; de la misma forma se colocó un blanco en cual contiene todos los reactivos menos la PP2C de *L. mexicana*. Posteriormente se incubo a 37°C por 60 minutos y la reacción se detuvo con 20 µL de NaOH 2N. El *p*-nitrofenol generado se lee a 405 nm en un espectrofotómetro.

Para continuar con la caracterización de esta proteína PP2C se analizó la actividad específica de fosfatasa con péptidos fosforilados en tirosina y treonina, en donde lo que se cuantificó es la cantidad de fosfatos liberados en la reacción enzimática. Para esto primero se montó una curva de fosfato libre, que va de 0 a 2000 pmol de fosfato.

Posteriormente se corrieron las muestras de tres purificaciones con las siguientes condiciones de reacción: 1.2 µg de proteína, amortiguador HEPES 50 mM pH=8.0, MnCl₂ 2 mM, 100 µM de sustrato (tirosina o treonina) y 50 µL de Molibdato Dye el cual se agregó 15 min después de iniciada la reacción; al final se debe tener un volumen de 100 µL y se leyó a 650nm en un espectrofotómetro.

5.3.1 Determinación del efecto de la concentración de proteína en la actividad de fosfatasa de la PP2C recombinante de *L. mexicana*.

Se realizó una curva de concentración de proteína (0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9 y 1.2 µg) con 10 mM de *p*-NPP en presencia de 10 mM de MnCl₂ y MgCl₂, para determinar la concentración óptima de proteína a utilizar en la actividad enzimática.

5.3.2 Efecto de cationes divalentes en la actividad de fosfatasa de la PP2C recombinante de *L. mexicana*

En la actividad de fosfatasa de la PP2C recombinante de *L. mexicana* se utilizaron diversos cationes divalentes como fueron MgCl₂, MnCl₂ y CaCl₂ a diferentes concentraciones (0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 mM) con *p*-NPP como sustrato siguiendo el procedimiento de la sección 5.3.1. En este caso el blanco carece de la muestra; y todo se corrió por duplicado.

5.3.3 Determinación del pH óptimo de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana*

Para conocer el pH óptimo de actividad de fosfatasa de la PP2C recombinante de *L. mexicana* purificada por cromatografía de afinidad, se realizó el procedimiento mencionado en el apartado 5.3. con *p*-NPP y 2 mM de MnCl₂, cambiando los amortiguadores que fueron acetato de sodio pH 4.5, 5.0 y 5.5; MES pH 6.0 y 6.5; HEPES pH 7.0, 7.5 y 8.0; TRIS pH 8.5 y 9.0; y CAPS pH 10.0, 10.5 y 11.0. Todos los amortiguadores fueron preparados a una concentración 50 mM. Se debe montar un blanco para cada condición y correr todo por duplicado.

5.3.4 Efecto de inhibidores específicos de PTP y PS/TP sobre la actividad de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana*

La actividad enzimática de fosfatasa se realizó con HEPES 50 mM a pH 8, MnCl₂ 2 mM y con inhibidores de la actividad de PTP (ortovanadato de sodio y molibdato de amonio a 200 µM, tungstato de sodio a 100 µM y pervanadato de sodio a 50 µM), inhibidores para la PS/TP (caliculina a 5 nM y ácido okadáico a 1 µM) y el inhibidor específico de PP2C (sanguinarina 20 µM).

Con las mismas condiciones de reacción que las mencionadas en el apartado 5.3. con sustratos específicos fosforilados en tirosina y treonina se analizó la acción de inhibidores reportados como específicos para PTP y PS/TP. Los inhibidores utilizados fueron ortovanadato de sodio 200 μM y sanguinarina 20 μM .5.4 Generación de anticuerpos policlonales contra la PP2C recombinante de *L. mexicana*.

5.4.1 Esquema de inmunización de la PP2C recombinante de *L. mexicana* en conejos

El procedimiento se realizó por duplicado por lo que fueron empleados dos conejos hembras de la cepa Nueva Zelanda de entre 2.5 y 2.8 Kg de peso, estos se sangraron antes de inmunizarlos para obtener suero el cual fue llamado preinmune. Se realizó una mezcla de los eluidos obtenidos de 4 purificaciones y se concentró diez veces su volumen, este concentrado fue el que se utilizó para la inmunización.

La primera y segunda inmunización de realizaron con 135 μg de proteína en un volumen de 150 μL , este volumen fue dividido en dos fracciones iguales de 75 μL y se les colocó un volumen igual de adyuvante de Freud incompleto a cada fracción. Posteriormente se les administró a los conejos la proteína con el adyuvante por dos vías; subcutánea e intramuscular, para cada conejo.

La tercera y cuarta inmunización fueron con 135 μg de proteína, llevados a 200 μL con PBS dividido este volumen en dos alícuotas iguales, administradas una por vía subcutánea y otra vía intramuscular, a cada uno de los conejos. Cada una de las inmunizaciones fue hecha con 7 días de diferencia entre una y otra. Al finalizar este tiempo y pasados 3 días se sacrificó a los animales por punción cardíaca y la sangre obtenida fue separada y con el suero se realizó la cuantificación de los anticuerpos mediante ELISA; posteriormente el suero se congeló a -20°C (López, 2008).

5.4.2 Identificación y titulación de anticuerpos anti-PP2C de *L.mexicana* por ELISA

Primero se fijó la PP2C recombinante de *L. mexicana*; diluida en PBS 1X para obtener una concentración de 0.6 µg en 100 µL; agregando 100 µL con una concentración de 0.6 µg del antígeno antes mencionado en cada pozo a utilizar, posteriormente se cubre la placa de la luz en una cámara húmeda y se incuba a temperatura ambiente durante 1 h o a 4°C toda la noche.

Pasado este tiempo se desechó el antígeno que no se fijó y se agregó 200 µL de solución bloqueadora (100 mL de una solución 0.1 N de hidróxido de sodio en ebullición se le agregaron 5 g de caseína, con PBS 1X llevar a un volumen de 1000 mL, ajustar a pH 7.4) por pozo y se dejó durante 1 hr a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se desechó la solución bloqueadora y se colocó por pozo 100 µL de anticuerpo primario (sueros extraídos de conejo inmune) en una dilución 1:100, 1:500, 1:1000, 1:5000, 1:10000, 1:20000, 1:30000, 1:40000, 1:50000 y 1:100000; las diluciones se hacen en solución bloqueadora, además de los sueros a analizar se corrió un control, negativo (suero preinmune) y blanco, por triplicado al igual que las muestras. Se incuban por 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Se lavó la placa 4 veces con solución de lavado (100 µL de Tween 80 por cada litro de PBS 1X pH = 7.2-7.4), enseguida se colocaron 100 µL de anticuerpo secundario (AL31 Biotin-xx Goat anti-rabbit, diluido 1:4000 en solución bloqueadora) y se incubó 30 min en cámara húmeda, pasado el tiempo se lavó la placa de nuevo 4 veces con solución de lavado.

Se colocó posteriormente 100 µL de estreptavidina acoplada a una fosfatasa alcalina (estreptavidina en solución bloqueadora en dilución 1:2000), incubando 30 min, en cámara húmeda y oscuridad. Pasado el tiempo se lavó 8 veces con solución de lavado y se le agregó 100 µL de solución reveladora (sustrato de fosfatasa alcalina 28.2 mg en 2600 µL de amortiguador sustrato) y se leyó las placas a una densidad óptica de 405 nm a diferentes tiempos (5, 10 y 15 min).

5.5 Análisis de la purificación de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana* en geles SDS-PAGE

A las muestras obtenidas de las pruebas de inducción, del fraccionamiento y en el proceso de purificación 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 %) y se utilizaron para realizar un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10 % para verificar la presencia de la PP2C de *L. mexicana* purificada en los eluidos. Los geles se corrieron a 80 V por 20 min y posteriormente se aumentó el voltaje a 120 V por 1 hora y se tiñeron con azul de Coomassie.

5.6 Análisis de Western blot para la identificación de las histidinas presentes en la PP2C recombinante de *L. mexicana*

Para verificar que la proteína purificada PP2C de *L. mexicana* presentaba las colas de histidina se realizó un Western blot utilizando las muestras obtenidas en el fraccionamiento de las células bacterianas que fueron ET, SN y P y los eluidos obtenidos en el proceso de purificación de la proteína fosfatasa PP2C de *L. mexicana* que contenían concentración de proteína, así mismo se colocaron el material NU y los lavados.

El gel se equilibró 10 min en amortiguador de transferencia a temperatura ambiente, posteriormente se transfirió a una membrana de nitrocelulosa en condiciones de semiseco a 20 V por 30 min.; la membrana se bloqueó con 5 % de leche en TBST 1X (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM y Tween 0.005 %), enseguida la membrana se lavó con TBST 1X por una hora a temperatura ambiente en agitación constante. La membrana se incubó con el anticuerpo α -histidina en una dilución 1:5000 toda la noche y al día siguiente se reveló por quimioluminiscencia.

5.7 Identificación de proteínas fosfatasa PP2C en extractos de promastigotes y amastigotes de *Leishmania* usando los anticuerpos generados anti PP2C de *L. mexicana*

Se realizó Western blot con muestras de ET y SN de lisados de promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* colocando 5 µg de proteína. Así mismo se realizó Western blot de concentraciones crecientes de proteína (10, 20, 40, 60, 80, 100 µg) de ET de un lisado de amastigotes secretados y no secretados de *L. mexicana*; y otro con 5 µg de ET de lisados de promastigotes de *Leishmania* de distintas cepas (*Leishmania mexicana* 68, *Leishmania mexicana* Solis (11), *Leishmania mexicana* Solis (30), *Leishmania mexicana venezolensis*, *Leishmania mexicana amazonensis*, *Leishmania braziliensis braziliensis*, *Leishmania braziliensis panamensis*, *Leishmania donovani* y *Leishmania major*). Como control positivo se colocó 1 µg de proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana*.

La transferencia se realizó en semiseco y las condiciones fueron 60 min. a 20 V en una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF) de baja fluorescencia previamente activada en metanol por 3 min; la membrana se bloqueó con solución bloqueadora para Odyssey, transcurrido el tiempo de bloqueo la membrana se incubó con el anticuerpo policlonal anti PP2C de *L. mexicana* en una dilución 1:1000 en solución bloqueadora tween 20 al 0.1%, a 4°C en agitación constante.

Al día siguiente se retiró el anticuerpo primario de la membrana, posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X. Finalizado el proceso se realizó una segunda incubación con anticuerpo secundario anti-rabbit en una dilución 1:10000 en solución bloqueadora tween 20 0.1 % y se incubó 1 hora en agitación constante a temperatura ambiente cubierto de la luz.

Se realizó otro procedimiento para incubar la misma membrana con otro anticuerpo primario. La membrana se bloqueó con solución bloqueadora para Odyssey en agitación toda la noche a 4°C. Al día siguiente la membrana se lavó con PBS 1X en agitación constante, posteriormente se incubó con el anticuerpo

primario anti-tubulina a una dilución 1:10000 en solución bloqueadora a la cual se le adicionó 0.1 % de tween 20 por 2 horas. Terminando el proceso de incubación la membrana se lavó 2 veces con PBS 1X cada 5 minutos y se incubó con anticuerpo secundario anti-mouse en una dilución 1:10000 en solución bloqueadora con 0.1 % de tween 20 por 1 hora cubierto de la luz en agitación constante. Finalmente la membrana se lavó 5 veces cada 5 minutos en agitación constante con PBS 1X y se leyó en el Odyssey a 700 y 800 nm.

VI. RESULTADOS

6.1 Determinación de las condiciones de sobreexpresión y análisis en geles SDS-PAGE de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana* en dos cepas de bacterias de *Escherichia coli*, como son BL21 y Codon Plus.

Para encontrar las condiciones óptimas de inducción de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana* se analizó la sobreexpresión de la proteína en dos cepas bacterianas de *E. coli* como son BL21 y Codon Plus, a tres diferentes temperaturas 20, 30 y 37 °C. En la figura 8 panel A se muestra el perfil de proteínas de los lisados de la cepa BL21, en donde se observan diferentes proteínas sobreexpresadas pero ninguna en el peso molecular esperado para la PP2C de *L. mexicana*. En el panel B, se puede observar en el perfil de proteínas de la cepa Codon Plus, la sobreexpresión de una proteína de 47 kDa que corresponde a la proteína PP2C, donde la temperatura de 20°C fue la óptima para la inducción de la proteína recombinante.

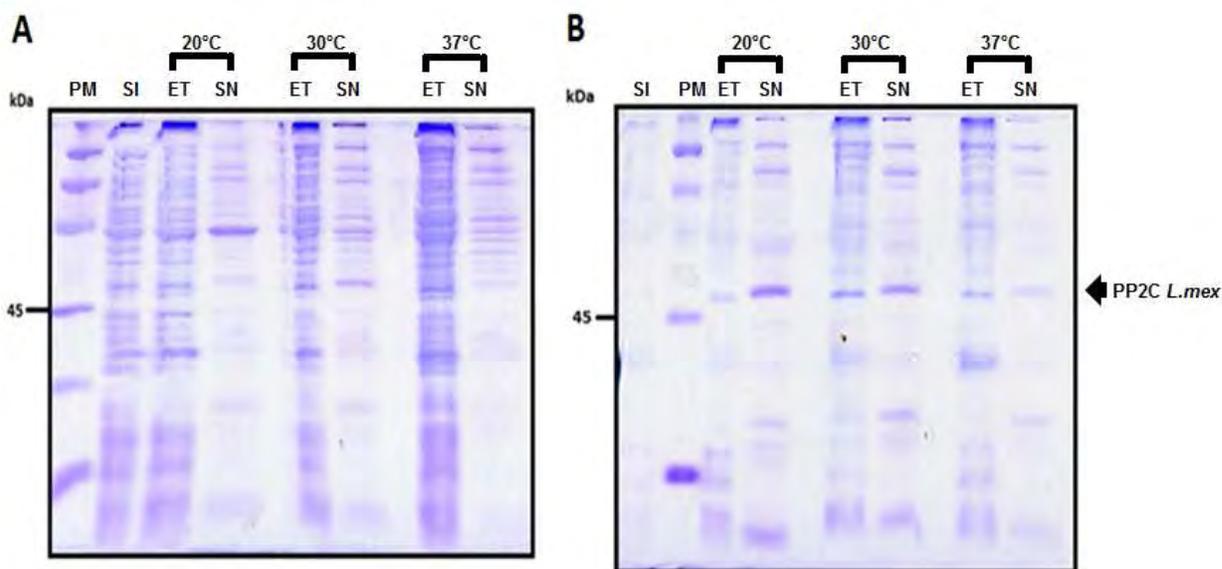


Figura 8. Determinación en geles SDS-PAGE de las condiciones de sobreexpresión con IPTG de la proteína fosfatasa PP2C de *L. mexicana* en dos distintas cepas de *Escherichia coli* a tres distintas temperaturas. **Panel A**, se observa la expresión en la cepa bacteriana BL21; **Panel B**, se observa la expresión en la cepa bacteriana Codon Plus; SI = ET de bacterias sin inducir, PM = Marcador de peso molecular, ET = extracto total, SN = sobrenadante.

6.2 Análisis de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana* mediante geles SDS-PAGE e identificación por Western blot usando un anticuerpo anti-histidina.

Se realizó el fraccionamiento de la cepa bacteriana Codon Plus, la cual fue inducida con IPTG e incubada a 20°C. De este fraccionamiento se obtuvieron ET, SN y P, las cuales se analizaron en un gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. En la figura 9 panel A, se observan varias proteínas presentes en las fracciones ET, SN y P. En el ET y SN se observa el enriquecimiento de una proteína con un peso molecular aproximado de 47 kDa el cual corresponde al peso molecular esperado para la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana*. Para identificar si la proteína sobreexpresada presenta la secuencia de 6 histidinas en su extremo carboxilo terminal, se realizó un Western Blot y se utilizaron anticuerpos anti-histidina, lo cual nos permitió corroborar que la proteína sobreexpresada en el ET, SN y P, es la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana* (panel B).

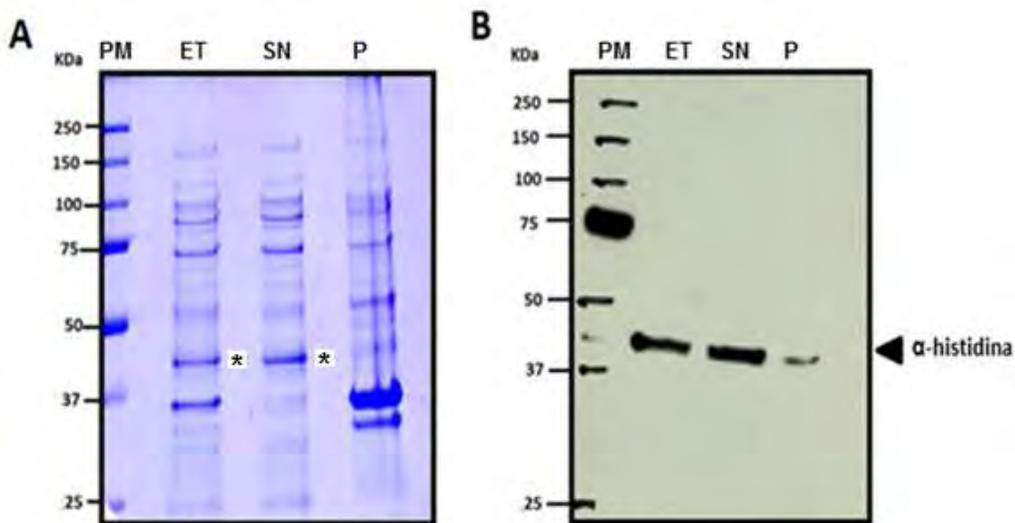


Figura 9. **Panel A**, análisis en gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de la proteína fosfatasa PP2C de *L. mexicana* en las fracciones obtenidas de la lisis de células bacterianas de la cepa Codon Plus inducidas a las condiciones óptimas (20°C toda la noche). **Panel B**, Western Blot α -histidina del fraccionamiento de las células bacterianas Codon Plus inducidas con IPTG a 20°C PM = Marcador de peso molecular, ET = Extracto total, SN = Sobrenadante y P = Pastilla.

6.3 Análisis en geles SDS-PAGE y Western blot del proceso de purificación de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana*.

Se analizaron los diferentes eluidos obtenidos del proceso de purificación por cromatografía de afinidad de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana*. En la figura 10 panel A se muestra el perfil electroforético de las muestras obtenidas del fraccionamiento de la cepa Codon Plus (ET, SN y P), así como el material no unido (NU), los lavados de la columna (L) y los diferentes eluidos (18-37) obtenidos durante el proceso de purificación. En las muestras de ET, SN y P, se observa el enriquecimiento de una proteína de peso molecular de 47 kDa, la cual también está presente en los eluidos y este peso molecular corresponde al esperado para la proteína PP2C recombinante de *L. mexicana*. En el panel B se muestra el concentración de proteína del perfil de elución de la proteína fosfatasa PP2C de *L. mexicana*. En el panel C y D, se observa la tinción con azul de Coomassie del eluido 22 y la identificación por Western blot de la PP2C recombinante de *L. mexicana*, utilizando los anticuerpos anti-histidina.

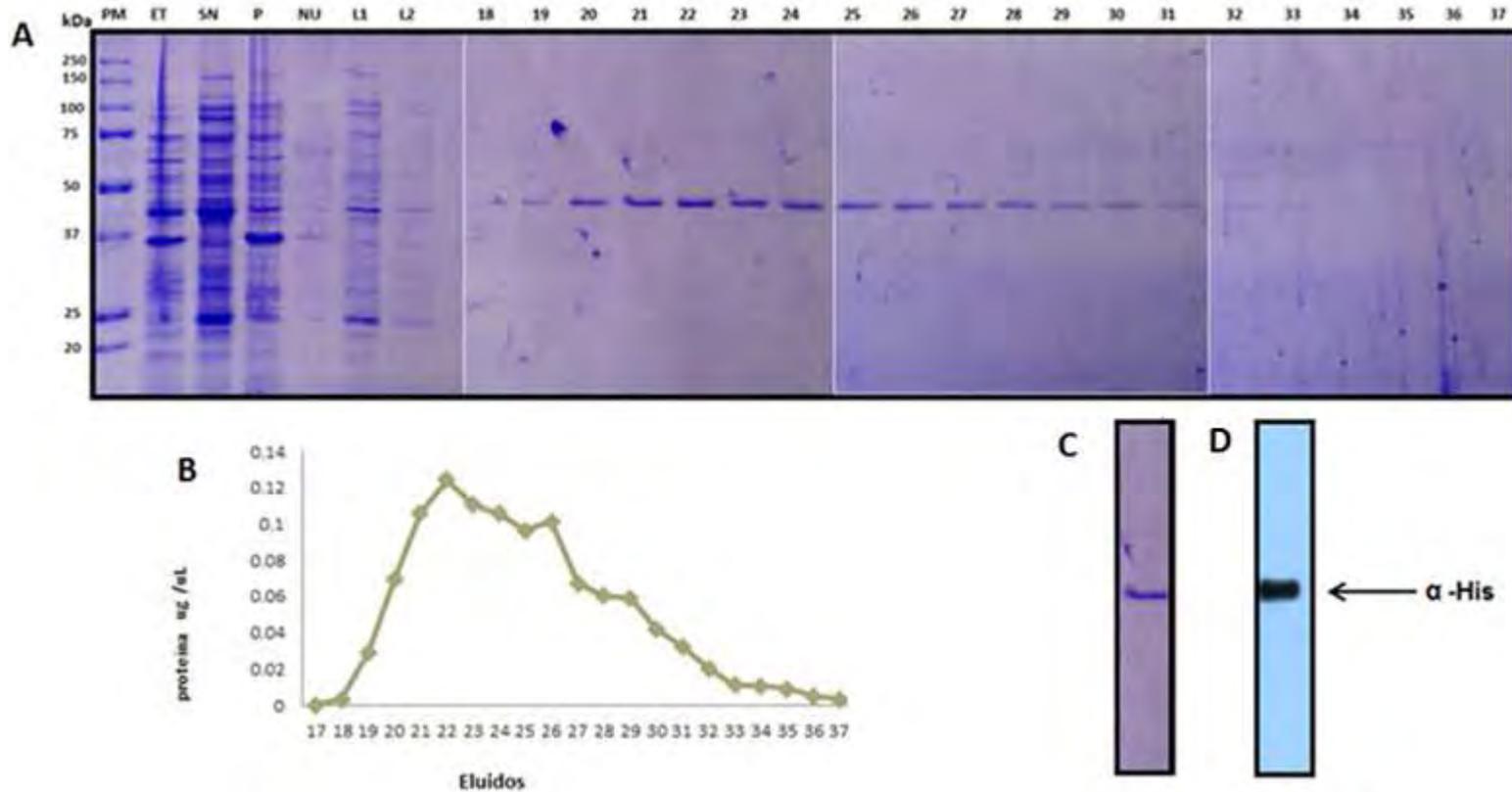


Figura 10. **Panel A.** Análisis en geles SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie del proceso de purificación por cromatografía de afinidad de la proteína fosfatasa PP2C de *L. mexicana*, peso molecular (PM), extracto total (ET), sobrenadante(SN), pastilla (P), material no unido (NU), lavado 1 (L1), lavado 2 (L2), eluidos del 18 al 37 obtenidos de la purificación de la proteína fosfatasa PP2C de *L. mexicana*. **Panel B.** Gráfica de la concentración de proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de los eluidos de la purificación de la proteína fosfatasa PP2C de *L. mexicana*. **Panel C.** Análisis en gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie, de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana* en un eluido. **Panel D.** Identificación por Western blot α -histidina dela proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana* en el eluido22.

6.4. Determinación de la actividad enzimática de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana* purificada.

En la figura 11, se muestra la actividad enzimática de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana* en presencia de dos cationes como son Mg^{2+} y Mn^{2+} a una concentración de 10 mM. Este análisis nos permitió conocer que esta enzima es activa solo en presencia de los dos cationes probados. Sin embargo se observa que la enzima es 10 veces más activa en presencia de Mn^{2+} en comparación con la actividad en presencia de Mg^{2+} . También se probaron diferentes concentraciones de la proteína fosfatasa PP2C de *L. mexicana* y se encontró que la concentración de proteína óptima con ambos cationes fue de 1.2 μg .

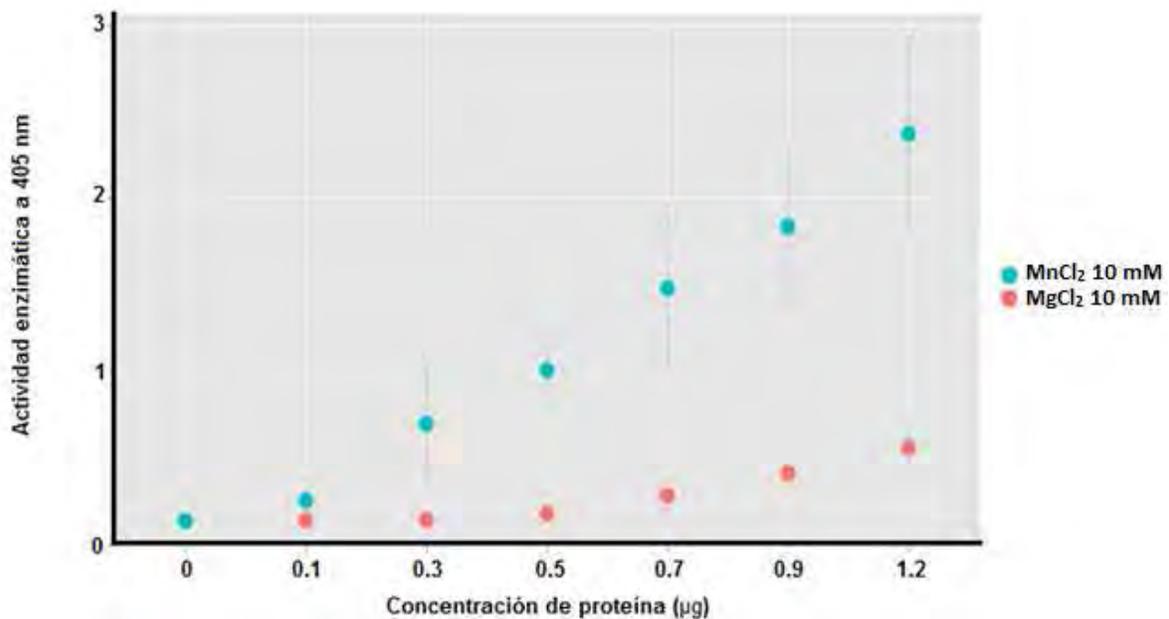


Figura 11. Actividad enzimática de diferentes concentraciones de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana* en presencia de $MnCl_2$ y $MgCl_2$ a 10 mM.

6.4.1 Efecto de cationes divalentes sobre la actividad enzimática de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana*.

Se analizó el efecto de 3 cationes divalentes como son: $MgCl_2$, $MnCl_2$ y $CaCl_2$ a diferentes concentraciones, utilizando 1.2 μg de proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana*. En la figura 12 se muestra que la enzima es activa con $MgCl_2$ y $MnCl_2$, y no así con $CaCl_2$. La concentración óptima de $MnCl_2$ fue de 2 mM donde se observó la mayor actividad de la proteína fosfatasa PP2C; mientras que la concentración óptima de $MgCl_2$ fue 18 mM. Se analizó también el efecto de $CaCl_2$, catión con el cual no se observó efecto sobre la actividad de fosfatasa de esta proteína a ninguna de las concentraciones probadas.

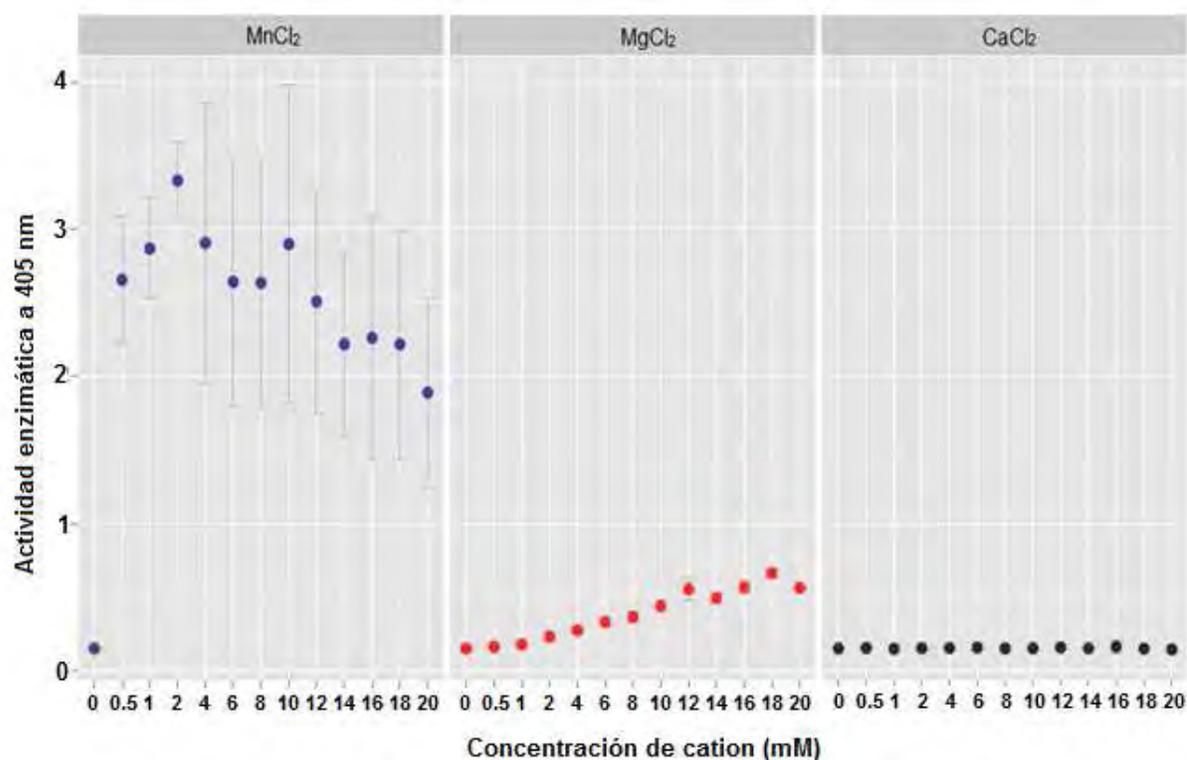


Figura 12. Efecto de cationes divalentes como $MnCl_2$, $MgCl_2$ y $CaCl_2$ a diferentes concentraciones de 0.5 a 20 mM, en la actividad de fosfatasa de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana*.

6.4.2 Determinación del pH óptimo para la actividad enzimática de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana*.

Para determinar el pH óptimo de la actividad enzimática de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana*, se utilizaron diferentes amortiguadores tales como acetato de sodio, MES, HEPES, TRIS y CAPS a 50 mM; abarcando un rango de pH de 4.5 a 11. En la figura 13 se muestra que la proteína fosfatasa PP2C presenta actividad enzimática en un rango de pH de 5 a 9, mostrando su máxima actividad a un pH de 8.0.

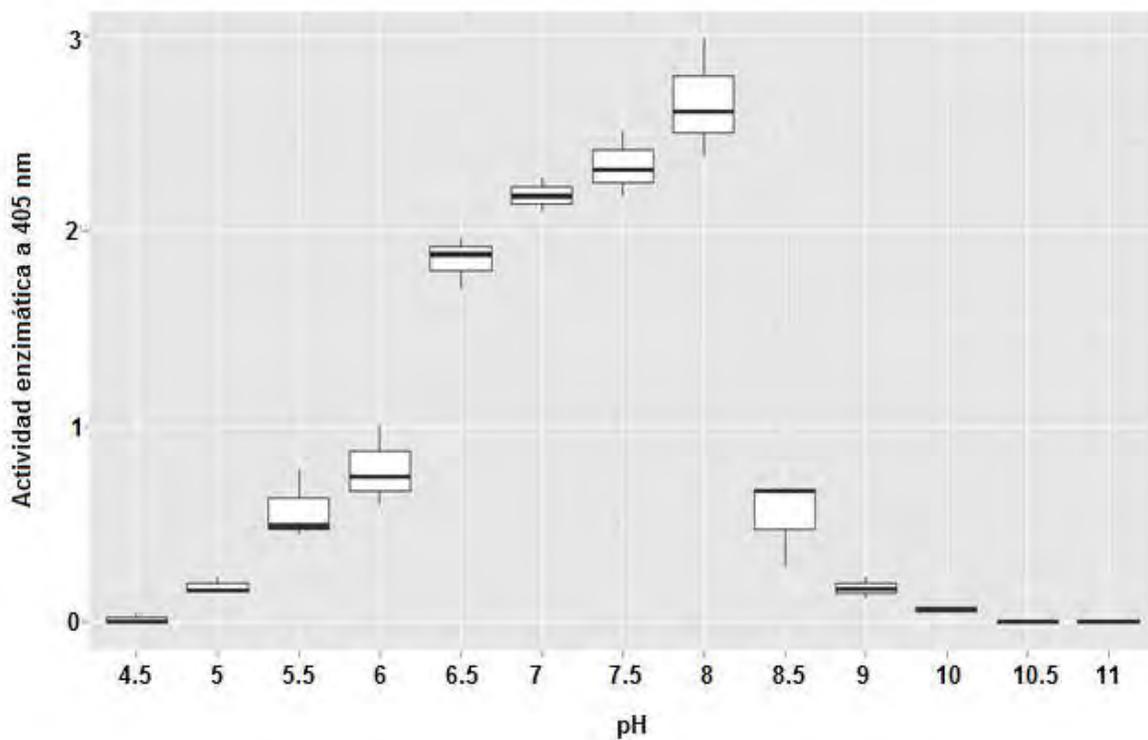


Figura 13. Determinación del pH óptimo para la actividad enzimática de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana*

6.4.3 Efecto de inhibidores específicos de PTP y PS/TP sobre la actividad enzimática de fosfatasa de la PP2C recombinante de *L.mexicana*.

Siguiendo con la caracterización de la PP2C de *L. mexicana* se usaron inhibidores específicos de la actividad enzimática de las PTPs como son: Ortovanadato de sodio 200 μM , Molibdato de amonio 200 μM , Tungstato de sodio 100 μM y Pervanadato de sodio 50 μM ; e inhibidores específicos de PS/TP como son: Caliculina 5 nM y Ácido okadáico 1 μM , así como Sanguinarina 20 μM (inhibidor específico de PP2C). La actividad de la PP2C recombinante de *L. mexicana* fue inhibida por Ortovanadato de sodio en un 9 %, Molibdato de amonio 72%, Tungstato de sodio 15 %, Pervanadato de sodio 12 %, Caliculina 18 %, Ácido okadaico 14 % y Sanguinarina 81 %; como se muestra en la figura 14.

En la tabla 2, se muestra el porcentaje de la actividad remanente de la PP2C de *L. mexicana* en presencia de los inhibidores ya mencionados, donde observamos una actividad remanente del 91 % en presencia de Ortovanadato de sodio, 28 % con Molibdato de amonio, 85 % con Tungstato de sodio, 88 % con Pervanadato de sodio, 82 % con Caliculina, 86 % con Ácido okadaico y 19 % con Sanguinarina. Lo cual nos confirma su comportamiento enzimático como una proteína fosfatasa PP2C, al ser inhibida preferentemente por la sanguinarina. Se utilizó una PTP de *Entamoeba histolytica* HM1IMSS como control para comprobar que los inhibidores de PTP fueran funcionales (dato no mostrado).

Tabla 3. Porcentaje de actividad remanente de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana* en presencia de inhibidores de PTP y PS/TP.

Inhibidor	% Actividad remanente
Sin inhibidor	100
Inhibidores de PTP	
Ortovanadato 200 μ M	91 \pm 6.5
Molibdato 200 μ M	28 \pm 5
Tungstato 100 μ M	85 \pm 1.4
Pervanadato 50 μ M	86 \pm 6.8
Inhibidores de PS/TP	
Caliculina 5 nM	82 \pm 15.3
Ac. Okadaico 1 μ M	86 \pm 14
Sanguinarina 20 μ M	19 \pm 5.4

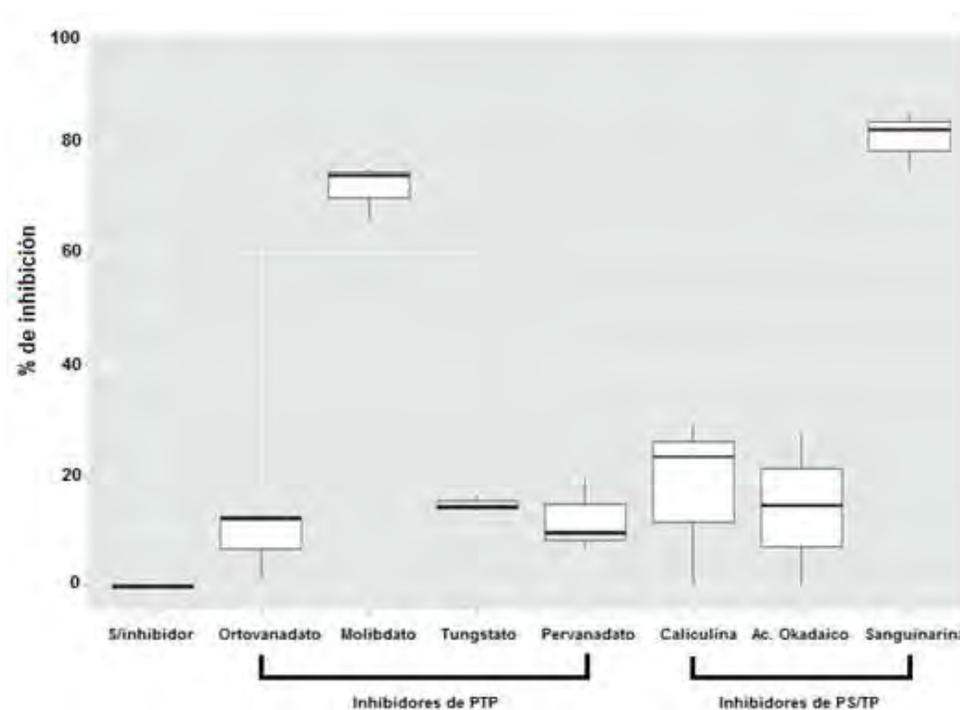


Figura 14. Análisis del efecto de inhibidores específicos de PTP y PS/TP sobre la actividad enzimática de la PP2C recombinante de *L. mexicana*

6.4.4 Especificidad de sustratos fosforilados en tirosina y treonina por la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana*.

Se analizó la especificidad de sustratos de la fosfatasa PP2C de *L. mexicana*. Así como el efecto en la actividad de fosfatasa en presencia del inhibidor ortovanadato de sodio y la sanguinarina. En la figura 15 panel A, se observa que la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana* desfosforila en mayor cantidad el péptido fosforilado en treonina con respecto al fosforilado en tirosina. En el panel B se aprecia que el ortovanadato de sodio a una concentración de 200 μM inhibió la actividad de la proteína PP2C cuando se utilizó el péptido fosforilado en tirosina como sustrato, mientras que no se observó inhibición en la actividad cuando el péptido fosforilado en treonina fue usado. Por el contrario la sanguinarina (panel C) a una concentración de 20 μM inhibió por completo la actividad de fosfatasa de la PP2C recombinante de *L. mexicana* con los dos péptidos fosforilados analizados.

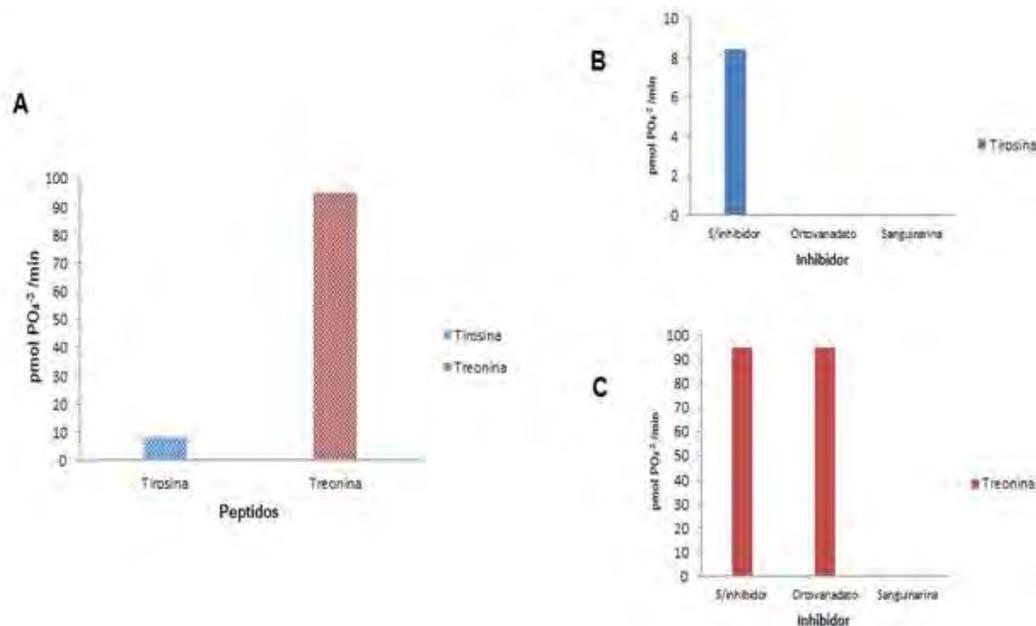


Figura 15. **Panel A**, análisis de la especificidad de sustratos fosforilados en tirosina y treonina de la PP2C recombinante de *L. mexicana*. **Panel B**, efecto de los inhibidores ortovanadato de sodio y sanguinarina en la actividad específica de PTP de la PP2C recombinante de *L. mexicana*. **Panel C**, efecto de los inhibidores ortovanadato de sodio y sanguinarina en la actividad específica de treonina de la PP2C recombinante de *L. mexicana*.

6.5 Generación, identificación y titulación de anticuerpos anti-PP2C de *L. mexicana* por ELISA

Se generaron anticuerpos policlonales contra la PP2C recombinante de *L. mexicana*. Se inmunizaron conejos y se obtuvo el suero policlonal con la finalidad de utilizarlos como herramienta para identificar la proteína PP2C en lisados de parásitos *Leishmania spp.* Se utilizó la técnica de ELISA para conocer la titulación de los anticuerpos anti-PP2C de *L. mexicana* en el suero de los conejos inmunizados con la proteína, encontrándose un mayor título de anticuerpos en el conejo A en comparación con el conejo B, siendo el título 1:10000 para el suero del conejo A y 1:5000 para el suero del conejo B (figura 16).

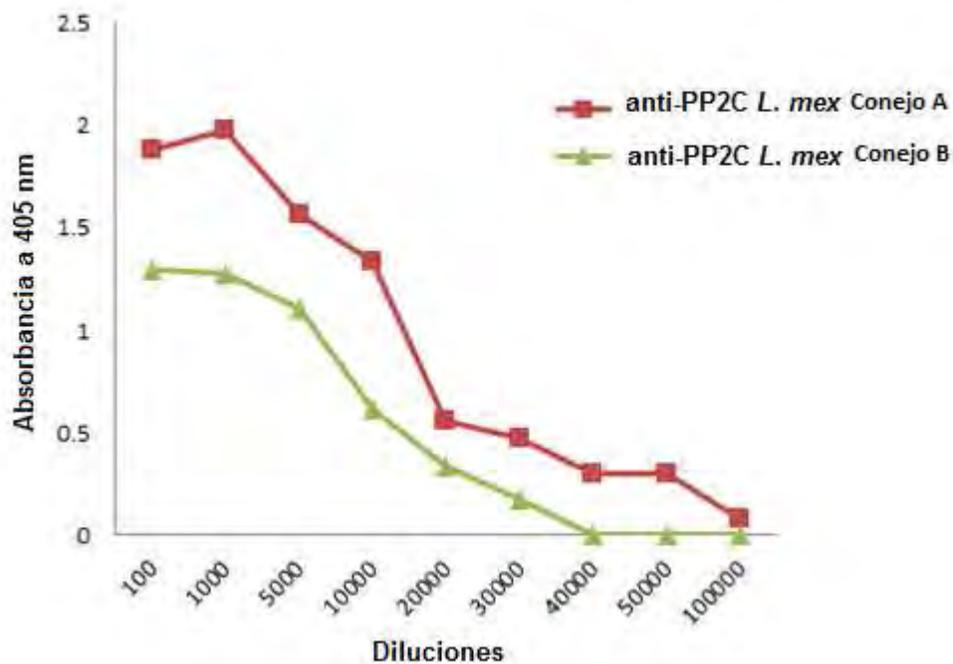


Figura 16. Evaluación de sueros policlonales anti-PP2C de *L. mexicana* por la técnica de ELISA de los sueros obtenidos de la inmunización de los conejos A y B.

6.6 Identificación de proteínas fosfatasa PP2C en lisados de promastigotes y amastigotes de *L. mexicana*.

Los anticuerpos generados contra la PP2C de *L. mexicana*, se probaron en lisados de promastigotes y amastigotes de parásitos de *L. mexicana*. Como se observa en la figura 17 panel A, en el ET y SN de promastigotes se identificó una proteína fosfatasa PP2C de *L. mexicana* en un peso molecular aproximado de 45 kDa que corresponde al peso molecular teórico reportado para una PP2C en lisados de estos parásitos. Así mismo en el ET y SN de amastigotes no fue identificada ninguna proteína, por lo cual se realizó un Western blot a diferentes concentraciones de proteína de ET de amastigotes (panel B) donde no se identificó la PP2C de *L. mexicana* de 45 kDa, a ninguna de las concentraciones de proteína analizadas.

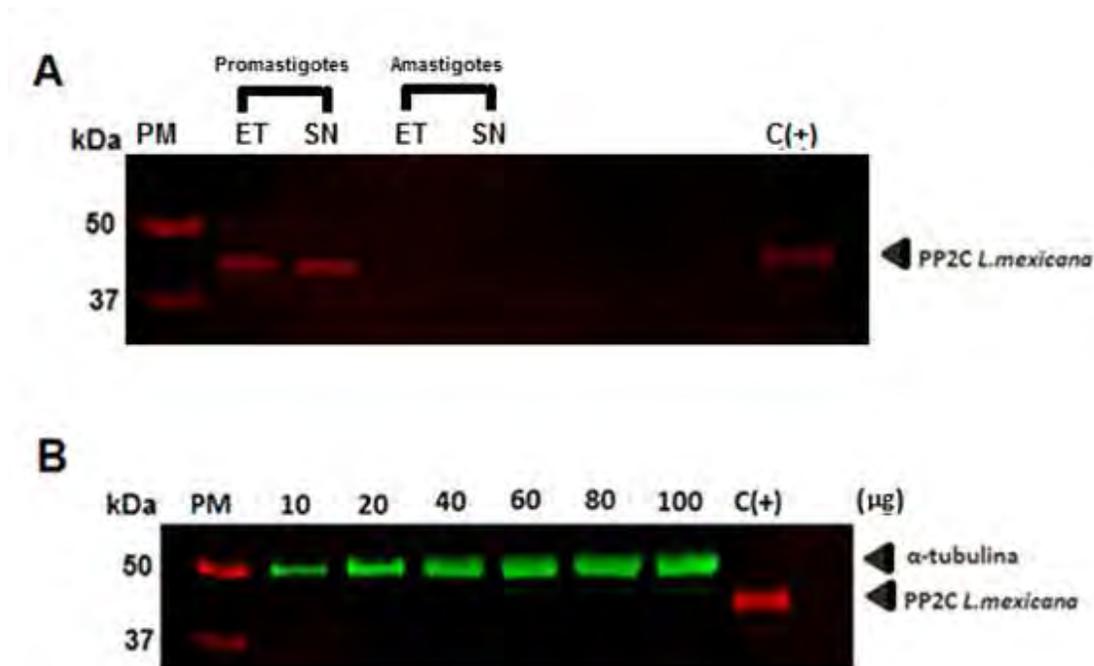


Figura 17. **Panel A**, identificación mediante Western blot de la PP2C en extractos de parásitos de *L. mexicana*. **Panel B**, identificación en Western blot de la PP2C de *L. mexicana* a concentraciones crecientes de proteína de lisados de amastigotes. PM = Marcador de peso molecular, ET = extracto total, SN = sobrenadante, C (+) = control positivo PP2C recombinante de *L. mexicana*, 10-100 = concentraciones de proteína en μ g de un ET de amastigotes, α -tubulina = control de carga.

6.7 Identificación de proteínas fosfatasa PP2C en lisados de promastigotes de parásitos de diferentes especies y cepas de *Leishmania*.

Se realizó un Western blot con el ET de promastigotes de diferentes especies y cepas de parásitos del género *Leishmania*. En la figura 18 se observa la identificación de una fosfatasa PP2C en un peso molecular aproximado de 45 kDa en los extractos analizados de promastigotes de: *Leishmania mexicana* 68 (carril 2), *Leishmania mexicana Solis* (11) (carril 3), *Leishmania mexicana Solis* (30) (carril 4), *Leishmania mexicana venezuelensis* (carril 5), *Leishmania mexicana amazonensis* (carril 6), *Leishmania donovani* (carril 9), *Leishmania major* (carril 10). Sin embargo en las cepas como *L. braziliensis braziliensis* y *L. braziliensis panamensis* se observa más de una PP2C (carriles 7 y 8), las cuales se encuentran en el peso molecular similar y mayor al peso molecular de la PP2C de *L. mexicana* (carril 11).

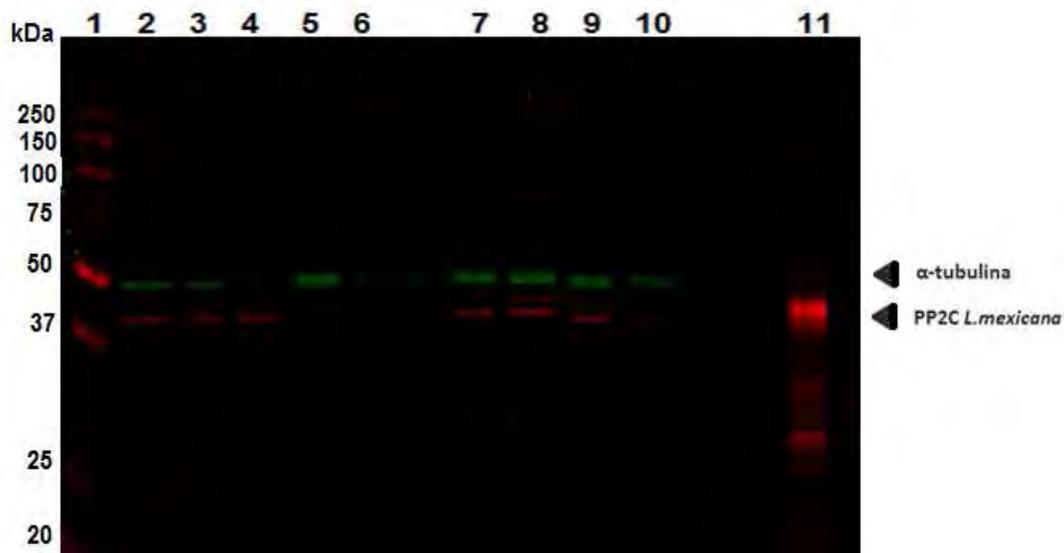


Figura 18. Identificación de las proteínas fosfatasa PP2C mediante Western Blot anti-PP2C en extractos de promastigotes de distintas cepas de parásitos del género *Leishmania*. **Carril 1**, marcador de peso molecular, **Carril 2** *Leishmania mexicana* 68, **Carril 3** *Leishmania mexicana Solis* (11), **Carril 4** *Leishmania mexicana Solis* (30), **Carril 5** *Leishmania mexicana venezuelensis*, **Carril 6** *Leishmania mexicana amazonensis*, **Carril 7** *Leishmania braziliensis braziliensis*, **Carril 8** *Leishmania braziliensis panamensis*, **Carril 9** *Leishmania donovani*, **Carril 10** *Leishmania major*, **Carril 11** proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana*. α -*tubulina* = control de carga

VII. DISCUSIÓN

Diversas proteínas han sido clonadas utilizando la maquinaria de cepas bacterianas de *E. coli*, por ejemplo en la cepa DH5 α se clonaron las cinasas HprK y PrpC de *Mycoplasma pneumoniae* (Halbedel, 2006). Las cepas BL21 de *E. coli* son una excelente opción de sobreexpresión de proteínas ya que son bacterias con poca cantidad de proteasas lo que disminuye el riesgo de degradación de la proteína de interés; razón por la cual se han clonado con éxito diversas proteínas tal es el caso de la nucleasa P4 de *L. infantum* que fue clonada en la cepa BL21 de *E. coli* (Farajnia, 2011) de igual forma, la cepa BL21De3pLysS de *E. coli* fue una buena opción de sobreexpresión para la PP2C de *L. major* (Escalona, 2007).

La proteína fosfatasa PP2C de *L. mexicana* estudiada en este trabajo fue clonada usando como vector el PET23B y se probó en dos cepas bacterianas de *E. coli*, como es la cepa BL21De3pLysS en la cual no se observó expresión de la proteína de interés a ninguna de las condiciones probadas, sin embargo; en la cepa BL21De3CodonPlus RIL se mostró la expresión óptima de la PP2C con una inducción con IPTG a 20°C y con incubación durante toda la noche.

La razón por la se observó expresión de la proteína fosfatasa PP2C en la cepa Codon Plus con respecto a la BL21 se debe a que la producción eficaz de proteínas recombinantes en *E. coli* con frecuencia se limita por la rareza de ciertos tRNAs que son abundantes en los organismos de los que las proteínas son derivadas; forzando la expresión y agotando el conjunto de tRNAs raros y parando la traducción. Las cepas BL21Codon Plus están diseñadas para contener copias adicionales de los genes que codifican los tRNA que con mayor frecuencia limitan la traducción de proteínas heterólogas en *E. coli*. (BL21-CodonPlus® Competent Cells Instruction Manual).

La proteína fosfatasa PP2C de *L. mexicana* clonada tiene dentro de su secuencia una cola de histidinas que posteriormente ayudó a su identificación; ya que una vez encontradas las condiciones óptimas de sobreexpresión de esta proteína se efectuó el análisis del fraccionamiento de las células bacterianas mediante un Western blot con anticuerpos α -histidina; observándose que la proteína está presente en las fracciones: extracto total y sobrenadante, y no así en la pastilla; demostrándonos que la proteína fosfatasa PP2C de *L. mexicana* no se encuentra en cuerpos de inclusión.

Para poder separar a la proteína PP2C recombinante de *L. mexicana* de las proteínas constitutivas de la bacteria se utilizó el método de cromatografía de afinidad por metales inmovilizados, usando una resina acoplada a níquel; debido a que la proteína de interés fue marcada con 6 histidinas en su extremo carboxilo terminal, su purificación se realizó cuando las histidinas se unieron al níquel, y así posterior a esta unión; al utilizar un gradiente de imidazol, compuesto que cuenta con mayor afinidad por el níquel, se desplazó a la proteína fosfatasa PP2C unida permitiendo obtenerla en los eluidos.

Este método de purificación es sumamente utilizado ya que además de garantizar que la proteína de interés tenga un buen rendimiento en el proceso, esta se obtiene completamente pura, así mismo es un método práctico y fácil de realizar y como ya se observó en diversos trabajos las proteínas obtenidas son catalíticamente activas; por ejemplo, este método también fue utilizado para el aislamiento de la proteína fosfatasa PP2C de *L. major* (Escalona, 2007); y en *Salmonella entérica* serovar *thyphi* fue clonada una PP2C llamada PrpZHis con una cola de 6 histidinas en su extremo carbono terminal y fue purificada de igual forma por cromatografía de afinidad con una columna acoplada a níquel (Sio, 2005) y ambas al ser purificadas mostraron actividad de fosfatasa.

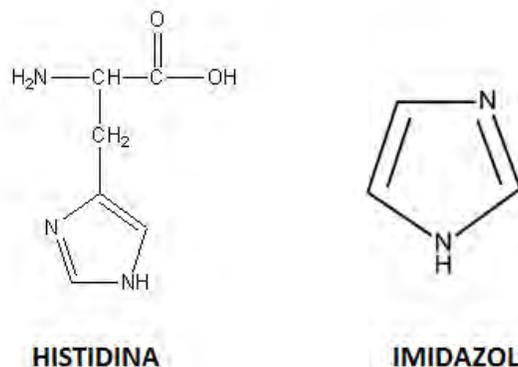


Figura 19. Estructuras químicas de la histidina y el imidazol. Se observa la similitud de la estructura, razón por la cual el imidazol compite con la histidina por los electrones del ión metálico en la columna cromatográfica.

Para comprobar que la proteína purificada es activa y corresponde a una proteína fosfatasa PP2C se analizó su actividad enzimática en presencia de los cationes $MnCl_2$ y $MgCl_2$, así como en presencia de $CaCl_2$ catión reportado como necesario para la actividad de la proteína fosfatasa PP2B, también conocida como calcineurina (Jain, 1993) y *p*-NPP como sustrato. Como resultado de esta determinación se observa que en presencia de $CaCl_2$ no hay hidrólisis del sustrato, mientras que con $MnCl_2$ y $MgCl_2$ se observó actividad de fosfatasa, siendo 2 mM de $MnCl_2$ y 18 mM de $MgCl_2$ las concentraciones óptimas para la actividad de esta enzima. La proteína fosfatasa PP2C de *L. mexicana* es 10 veces más activa con manganeso que con magnesio; razón por la cual se decidió trabajar con $MnCl_2$ en las demás caracterizaciones.

Este resultado observado en presencia de los tres cationes analizados es el esperado ya que como se había mencionado las proteínas fosfatasas PP2C necesitan de cationes divalentes como magnesio y manganeso para ser activas, propiedad que también fue observada en las proteínas fosfatasas PP2C clonadas de *L. chagasi* y *L. major* teniendo esta última una mayor actividad en presencia de $MnCl_2$ comparada con su actividad en presencia de $MgCl_2$ (Burns, 1993) (Escalona, 2007). La preferencia del catión $MnCl_2$ en comparación con el $MgCl_2$ para la actividad enzimática de la proteína fosfatasa PP2C recombinante *L.*

mexicana, es similar a la que se presenta en las proteínas fosfatasa PP2C de *Streptococcus agalactiae* y *Pseudomonas aeruginosa* (Rajagopal, 2003) (Mukhopadhyay, 1999).

Las enzimas tienen condiciones óptimas para su actividad es por eso que se realizó una curva de pH. La proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana* mostró actividad enzimática de fosfatasa a partir de pH 5.0 y hasta pH 9.0, observándose el pico máximo de actividad a pH de 8.0; este comportamiento es muy similar al observado para la proteína fosfatasa PP2C de *L. major* que muestra un pico máximo de actividad en un pH de 8.5 (Escalona, 2007) y al de la enzima PP2C de *Leishmania chagasi* que presentó su actividad máxima de pH 7 a 8.5 esta última proteína fue analizada utilizando como sustrato caseína marcada con fósforo 32 (^{32}P) (Burns, 1993). Otras proteínas fosfatasa PP2C que han mostrado actividad a pH alcalino son la PP2C de *Myxococcus xanthus* y la Pcc 6803 de *Synechocystis* y *Salmonella enterica* serovar *Typhi* (Lange, 2001) (Lai, 2005).

Al analizar la acción de inhibidores específicos de PTP y PS/TP, se observó que del grupo de inhibidores de PTPs solo el Molibdato de amonio en una concentración de 200 μM inhibió la actividad enzimática de la PP2C recombinante de *L. mexicana*; mientras que fue insensible a la inhibición por ortovanadato de sodio, pervanadato de sodio y tungstato de sodio. El ácido okadaico reportado como inhibidor de PS/TP como la PP1 y la PP2A (Chambers, 1992) no inhibió la actividad enzimática de la PP2C de *L. mexicana*, comportamiento observado también hacia el inhibidor caliculina. Sin embargo, la sanguinarina inhibió en más de un 80 % la actividad de esta fosfatasa resultado esperado ya que este compuesto ha sido reportado como inhibidor específico de las PP2C (Aburai, 2010). Este comportamiento también ha sido observado en la PP2C de *L. major* que es insensible al ácido okadaico y sensible a la inhibición por sanguinarina en concentraciones micromolares (Escalona, 2007).

La proteína fosfatasa PP2C de *L. mexicana* es una proteína fosfatasa que desfosforila preferentemente treonina ya que al ser probada su actividad específica con péptidos fosforilados, registro mayor actividad con el péptido fosforilado en treonina en comparación con el péptido fosforilado en tirosina.

Por otro lado se ha reportado que las proteínas fosfatasas PP2C cuentan con residuos de ácido aspártico que son altamente conservados y están presentes en el sitio catalítico, junto con un ácido glutámico y una glicina; los cuales forman un centro para la unión de un ión metal divalente. 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 (Das, 1996).

La proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana* mostró actividad enzimática por lo que debe contar con estos aminoácidos necesarios para tener función de fosfatasa. De igual forma dentro de su secuencia teórica cuenta con el motivo CX5R propio de las proteínas fosfatasas de tirosina, lo que podría explicar la actividad de esta fosfatasa hacia el péptido fosforilado en tirosina. Esto es corroborado ya que el molibdato de amonio inhibe más del 70 % la actividad de fosfatasa de la PP2C.

A pesar de que la proteína fosfatasa PP2C de *L. mexicana* muestra una similitud del 96% con respecto a la PP2C de *L. major*, se han encontrado diferencias en sus características bioquímicas; como son diferente pH óptimo, siendo el pH 8.5 el óptimo para la PP2C de *L. major* y pH 8.0 el óptimo para la PP2C de *L. mexicana*. La concentración y tipo de catión divalente es diferente, siendo las condiciones óptimas para la PP2C de *L. mexicana* 2 mM de $MnCl_2$ y para la PP2C de *L. major* 6 mM de $MgCl_2$. Estas características se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Características bioquímicas de la PP2C recombinante de *L. mexicana* y *L. major* (Escalona, 2007).

Característica	PP2C <i>L. major</i>	PP2C <i>L. mexicana</i>
Cepa bacteriana utilizada para la sobreexpresión	BL21	Codon Plus
Concentración de proteína utilizada para la actividad enzimática (µg)	0.7	1.2
Preferencia de cationes	MgCl ₂ (6 mM)	MnCl ₂ (2 mM)
pH óptimo	8.5	8.0
Actividad de PTP (motivo CX5R activo)	NO	SI
Inhibición por sanguinarina	SI	SI

Siguiendo un esquema de inmunización utilizado para la PP2C de *L. major* (Escalona, 2007) se generaron sueros policlonales contra la proteína fosfatasa PP2C de *L. mexicana*, para utilizarlos en la identificación de esta proteína en lisados de promastigotes y amastigotes de *L. mexicana*. Ya generados y cuantificados los sueros policlonales se realizaron Western blot para la identificación de la proteína fosfatasa PP2C de *L. mexicana* en lisados de parásitos de *L. mexicana*, pudiendo determinar que la proteína se encuentra en promastigotes y no así en amastigotes. Este resultado se debe a que se ha demostrado que los amastigotes solo expresan la proteína fosfatasa PP2C después de estar varias horas en condiciones de estrés y los amastigotes utilizados no fueron expuestos a estas condiciones de escasez de nutrientes.

Con estos anticuerpos se identificaron proteínas fosfatasas PP2C en lisados de promastigotes de distintas cepas y especies de *Leishmania* como: *Leishmania mexicana* 68, *Leishmania mexicana Solis* (11), *Leishmania mexicana Solis* (30), *Leishmania mexicana venezuelensis*, *Leishmania mexicana amazonensis*, *Leishmania braziliensis braziliensis*, *Leishmania braziliensis panamensis*, *Leishmania donovani* y *Leishmania major*, donde se observó que todas las cepas probadas utilizadas cuentan con proteínas fosfatasas con epitopos y pesos

moleculares semejantes a los de la proteína fosfatasa PP2C de *L. mexicana* estudiada; lo cual es de gran importancia ya que esta molécula podría ser utilizada para el diagnóstico de *Leishmania*, aunque no así como diagnóstico diferencial entre especies de este parásito.

El resultado observado en los lisados de promastigotes de las distintas cepas de *Leishmania* es el esperado ya que también se han clonado y estudiado este tipo de fosfatasas PP2C en *L. chagasi*, *L. major* y *L. infantum* (Burns, 1993) (Escalona, 2007) (Farajnia, 2011); y los resultados de la comparación de la secuencia del gen 25 de los genomas de *L. mexicana* y *L. major* dan como resultado proteínas con 96% de homología, lo cual explica que los anticuerpos generados reconocen esta proteína de *L. major* con un peso molecular de 44.5 kDa.

```

M G I P L P K P V M T Q L Q E R Y G N P I F R C G S
N C V N G Y R E T M E D A H L T Y L T D S W G F F G
V F D G H V N D Q C S Q Y L E R A W R S A I E K E S
I P M T D E R M K E L A L Q I D Q E W M D S G R E G
G S T G T F F V A L K E G N K V H L Q V G N V G D S
R V V A C I D G M C V P L T E D H K P N N E G E R Q
R I E N C A G R V E N N R V D G S L A V S R A F G D
R E Y K L G S G S Q L E Q K V I A L A D I Q H K D F
T F N S D D F V L L C C D G V F E G N F P N E E V V
A Y V K Q Q L E T C N D L A E V A G R V C E E A I E
R G S R D N I S C M I V Q F K D G S D Y A A E P H T
T V V P G P F S A P R N S G F R K A Y E S M A D K G
N T T V G A L L E K R Y D T L K A A D A L T P E E T
E E L S Q F E N G P E A K L T G I E R Q R W F S N Y
F Q K L C E A A S N G P S D Q M E R L Q S L Q Q Q A
G I P L S I L L S L M G E Q T Q

```

Figura 20. Secuencia teórica de aminoácidos de la PP2C de *L. mexicana*. Donde se muestra de color rojo los cuatro ácidos aspárticos necesarios para la actividad de la enzima y de color verde el motivo CX5R (sitio activo de PTP).

VIII. CONCLUSIÓN

La proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana* cuenta con las características bioquímicas típicas de las fosfatasas PP2C:

- Tiene un peso molecular de 47 kDa
- Actividad enzimática en pH alcalino, siendo el pH óptimo 8.0.
- Requerimiento de cationes divalentes como Mg^{+2} y Mn^{+2} para ser catalíticamente activas.
- Es 10 veces más activa en presencia de Mn^{+2} que en presencia de Mg^{+2} .
- Es insensible a la inhibición por ácido okadaico y por inhibidores clásicos de PTP; sin embargo, es inhibida por la sanguinarina en concentraciones micromolares
- Los anticuerpos α -PP2C de *L. mexicana* generados en este trabajo reconocen PP2C en extractos de promastigotes de distintas cepas de *Leishmania* en pesos moleculares a los esperados para este tipo de proteínas que oscilan entre 40 a 50 kDa.

IX. PERSPECTIVAS

- Localización de la proteína fosfatasa PP2C en promastigotes y amastigotes de *L. mexicana*.
- Determinar la función de la proteína fosfatasa PP2C en el parásito.
- Inocular la proteína fosfatasa PP2C de *L. mexicana* en ratones y observar si se tiene un efecto protector contra la infección.
- Obtener el anticuerpo monoclonal de la proteína fosfatasa PP2C de *L. mexicana*; y determinar si pueden ser utilizados en una prueba diagnóstica de *Leishmania spp.*

X. BIBLIOGRAFÍAS

1. (2009) Leishmaniosis: cutánea y visceral, The Center for Food Security and Public Health. Recuperado de <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/leishmaniasis.pdf>
2. Aburai, N. Yoshida, M. Ohnishi, M, and Kimura, K. (2010). Sanguinarine as a potent and specific inhibitor of protein phosphatase 2C *in vitro* and induces apoptosis via phosphorylation of p38 in HL60 cells. *74(3)* 548-552.
3. Adhami, V. Aziz, M. Mukhtar, H. Reagan, S. and Ahmad, N. (2003). Activation of prodeath Bcl-2 family proteins and mitochondrial apoptosis pathway by sanguinarine in immortalized human HaCaT keratinocytes. *Clin Cancer Res.* 9, 3176 –82.
4. Alonso, A. Sasin, J. Bottini, N. Friedberg, I. Friedberg, I. Osterman, A. Godzik, A. Hunter, T. Dixon, J. and Mustelin, T. (2004). Protein Tyrosine Phosphatases in the Human Genome. *117(6)* 699-711.
5. Ariño, J. Casamayor, A. and González, A. (2011) Type 2C Protein Phosphatases in Fungi, *American Society for Microbiology*, 10 (1). 21-23.
6. Barford, D. (1996) Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases *Trends Biochem Sci*, 21 (11), 407-412.
7. Berndt, N. (1999) Protein dephosphorylation and the intracellular control of the cell number. *Front Biosci*, 4, 22-42.
8. 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.
9. BL21-CodonPlus® Competent Cells Instruction Manual Catalog #230240, #230245, #230250, #230255, #230265, #230275 and 230280 Revision #085008.
10. Bork, P. Brown, N.P. Hegyi, H. and Schultz, J. (1996) The protein phosphatase 2C (PP2C) superfamily: Detection of bacterial homologues. *Protein Sci.* 5, 1421-1425.

11. Brady, M.J and Saltiel, A.R. (2001) The role of protein phosphatase-1 in insulin action. *Recent Prog Horm Res*, 56, 157-173.
12. Bridges, D. MacDonald, J.A. Wadzinski, B. and Moorhead, G.B. (2006) Identification and characterization of D-AKAP1 as a major adipocyte PKA and PP1 binding protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 346 (1). 351-357.
13. Brion, L. (2010) Regulación hormonal y papel funcional de la map quinasa fosfatasa-1 (MKP-1) en células esteroidogénicas, *Universidad de Buenos Aires Facultad de Ciencias Exactas y Naturales*.
14. Bryson KJ, Millington OR, Mokgethi T, McGachy HA, and Brombacher F. (2010) BALB/c Mice Deficient in CD4+ T Cell IL-4Ra Expression Control *Leishmania mexicana* Load although Female but Not Male Mice Develop a Healer Phenotype. *PLoS Negl Trop Dis* 5(1): e930.
15. 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*. *J Biol Chem*, 268, 17155–17161.
16. Chaturvedi, M.M. Kumar, A. Darnay, B.G. Chainy, G.B. Agarwal, S. and Aggarwal, B. (1997). Sanguinarine (pseudochelerythrine) is a potent inhibitor of NF- κ B activation, I κ B α phosphorylation, and degradation. *J Biol Chem*. 27, 30129–34.
17. Chen, W. Possemato, R. Campbell, K.T. Plattner, C.A. Pallas, D.C. and Hahn, W.C. (2004). Identification of specific PP2A complexes involved in human cell transformation. *Cancer Cell*, 5 (2). 127-136.
18. 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.
19. Cohen, P.T. (2002) Protein phosphatase 1-targeted in many directions. *J Cell Sci*, 115 (2), 241-256.

20. 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.
21. Escalona A.R. (2007) Tesis de maestría en Ciencias Biológicas: Clonación y purificación de la proteína fosfatasa PP2C de *Leishmania major*. *Facultad de Medicina UNAM*.
22. Farajnia, S. Rahbarnia, L. Malekii, B. Hossein, M. Abdoli, S. Beh-pajooh, A. Saeedi, N. and Montazer, S. (2011). Molecular Cloning and Characterization of P4 Nuclease from *Leishmania infantum*. *Enzyme Research* 970-983
23. Fernández, E. Rangel C, Espinosa V, Carrillo K, Salaiza N. and Becker, I. (2012) Disease Severity in Patients Infected with *Leishmania mexicana* Relates to IL-1 β . *PLoS Negl Trop Dis* 6(5): e1533. doi:10.1371/journal.pntd.0001533
24. Fernández, E. Rangel, C. Espinosa, V. Carrillo, K. Salaiza, N. Carrada, G. March, S. and Becker, I. (2012). Disease Severity in Patients Infected with *Leishmania mexicana* Relates to IL-1 β . *PLoS Negl Trop Dis* 6(5), e1533.
25. 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. *The Journal of Biological Chemistry* 282(1), 73-83.
26. Halbedel, S. Busse, J. Schmidl, S.R. and Stülke, J. (2006). Regulatory Protein Phosphorylation in *Mycoplasma pneumoniae* a PP2C-type phosphatase serves to dephosphorylate Hpr(ser-P). *JBC Papers in Press* 281(36) 26253–26259
27. Jain, J. McCaffrey, P.G. Miner, Z. Kerppola, T.K. Lambert, J. Verdine, G. Curran, T. and Rao, A. (1993) The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature*, 365 (6444), 352-355.

28. Zetina, J. (2008) Leishmaniosis cutánea en el estado de Quintana Roo, México. *Dermatología Rev Mex*, 52 (1), 3-9. Recuperado de www.actualizacionmedica.com.mx
29. Jiang, L. Whiteway, M. and Shen, S.H. (2001). A novel type 2C protein phosphatase from the human fungal pathogen *Candida albicans*. *FEBS Lett.* 509 142–144.
30. Jiang, L. Yang, J. Fan, F. Zhang, D. and Wang, X. (2010). The type 2C protein phosphatase FgPtc1p of the plant fungal pathogen *Fusarium graminearum* is involved in lithium toxicity and virulence. *Mol. Plant Pathol.* 11, 277–282.
31. 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.
32. 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.
33. López, M.R. (2008) *E. hystolityca*: estudio *in vitro* de los mecanismos moleculares de su virulencia. *UNAM Facultad de Medicina*
34. Mamoun, C.B. and Goldberg, D.E. (2001). *Plasmodium* protein phosphatase 2C dephosphorylates translation elongation factor 1beta and inhibits its PKC-mediated nucleotide exchange activity *in vitro*. *The Journal of Biological Chemistry* 39 (4), 973-81.
35. Mikhail, A.K. and Andreeva, A.V. (2008) Protein Ser/Thr phosphatases of parasitic protozoa, *Molecular & Biochemical Parasitology.* 161, 81-90.
36. Moorhead, G.B. Trinkle-Mulcahy, L. and Ulke-Lemée, A. (2007). Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nature Publishing Group* 8 234-244.
37. Morfini, G. Szebenyi, G. Brown, H. Pant, H.C. Pigino, G. DeBoer, S. Beffert, U. and Brady, S. (2004) A novel CDK5-dependent pathway for regulating GSK3 activity and kinesin-driven motility in neurons. *Embo J*, 23 (11). 2235-2245.

38. 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 aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 181(21), 6615-6622.
39. 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.
40. 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.
41. Pullen, K.E. Leung, H.L. Sung, P.Y. Good, M.C. and Smith, S.M. (2004). An Alternate Conformation and a Third Metal in PstP/Ppp, the *M. tuberculosis* PP2C-Family Ser/Thr Protein Phosphatase. *Cell Press* 12(11), 1947-1954.
42. Rajagopal, L. 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.
43. Rocha, M.R. (2005) Utilidad de una etiqueta de poli-histidina para la purificación de una hormona del crecimiento bovino recombinante. *Universidad Autónoma de Nuevo León*. 10-14.
44. Rodríguez, N. (2003) Factores de virulencia en *Leishmania* y su relación con el desarrollo de la Leishmaniasis. *Dermatología venezolana*. 41 (3), 3-9.
45. Rodriguez, P. (1998) Protein phosphatase 2C (PP2C) function in higher plants. *Plant Molecular Biology*, 38, 919–927.
46. Lai, S.M. and Moulal, H.L. (2005). PrpZ, a *Salmonella enterica* serovar *Typhi* serine/threonine protein phosphatase 2C with dual substrate specificity. *Microbiology*, 151, 1159–1167.

47. Streuli, M. (1996) Protein tyrosine phosphatases in signaling. *Curr Opin Cell Biol*, 8 (2), 182-188.
48. Trinkle-Mulcahy, and L. Lamond, A. (2006) Mitotic phosphatases: no longer silent partners. *Curr Opin Cell Biol*, 18 (6), 623-631.
49. Virshup, D.M. and Shenolikar, S. (2009) From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. *Mol Cell* .33 (5), 537-545.
50. Fan, J. Wu, M. Jiang, L. and Shen, S.H. (2009). A serine/threonine protein phosphatase-like protein, CaPTC8, from *Candida albicans* defines a new PPM subfamily. *Gene*. 430 64–76.
51. Chambers, T.C. Zheng, B. and Kuo, J.F. (1992) Regulation by phorbol ester and protein kinase C inhibitors, and by a protein phosphatase inhibitor (okadaic acid), of P-glycoprotein phosphorylation and relationship to drug accumulation in multidrug-resistant human KB cells. *Mol Pharmacol* 41 1008-1015.