



**UNIVERSIDAD CENTRAL
DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE *Trypanosoma equiperdum* QUE PRESENTAN HOMOLOGÍA CON LA SUBUNIDAD CATALÍTICA DE LA PROTEÍNA QUINASA DEPENDIENTE DE AMP CÍCLICO

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela por el bachiller Alejandro José Montilla Simoza como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

Tutor: Dr. José Bubis (USB)

Asesor Académico: Dra. Valentina Salas (UCV)

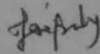
CARACAS, VENEZUELA

FEBRERO – 2018

Alejandro José Montilla Simoza

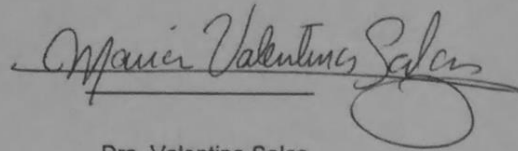
Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias y la Ilustre Universidad Central de Venezuela, damos fe que examinamos el Trabajo Especial de Grado del Bachiller Alejandro José Montilla Simoza, C.I. 20.427.543, titulado "Purificación de Proteínas de *Trypanosoma equiperdum* que Presenta Homología con la Subunidad Catalítica de la Proteína Quinasa Dependiente de AMP Cíclico", el cual es requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología, mención Biología Celular. Culminada la evaluación, consideramos que dicho trabajo cumple con los requerimientos exigidos en los reglamentos respectivos, por lo cual ha sido **APROBADO**, y calificado con la puntuación de **20 puntos**. Así mismo, proponemos que sea considerado para optar a **MENCIÓN HONORÍFICA** ante el Consejo de Escuela.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los 21 días del mes de febrero del año 2018.



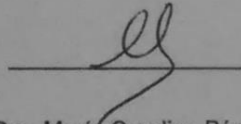
Dr. José Bubis

Tutor



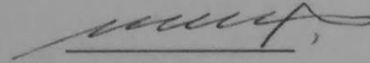
Dra. Valentina Salas

Asesor Académico



Dra. María Carolina Pérez

Jurado



Dra. Marta Mendoza

Jurado



Universidad Central de Venezuela
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología
Dirección

CONSTANCIA

El Consejo de la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, certifica que en su sesión del día 21/03/2018, acordó otorgar la **Mención Honorífica** al Trabajo Especial de Grado de el bachiller **Montilla S., Alejandro J.**, titular de la cédula de identidad No. 20.427.543 titulado: "**Purificación de una proteína de *Thypanosoma equiperdum* que presenta homología con la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico**" considerando la originalidad, independencia y creatividad en la elaboración del mismo, así como la sobresaliente calidad del trabajo escrito y la presentación oral.

Constancia que se expide a petición de la parte interesada a los veintitrés días del mes de marzo del año dos mil dieciocho.


Prof. Fernando González
Director (Encargado)



/br.-

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, el Dr. José Bubis, por su gran dedicación, por siempre estar dispuesto a enseñarme, orientarme, brindarme su apoyo y sus consejos, tanto en lo académico como en lo personal. No puedo estar más agradecido por darme la oportunidad de poder trabajar a su lado.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Química de Proteínas de la USB: Leo, Cristina, Pablo, Alberto y Carolina, gracias por su gran apoyo, enseñanzas, por tenderme una mano cuando más lo necesitaba.

A los demás profesores y miembros del Departamento de Biología Celular de la USB: Deisy Perdomo, Gladinex Pérez, Maritza Gonzatti, Liliana Casique, Antonieta Porco, Nelson Araujo, Carolina Pestana, Dorybell, Kruz, Leglys, Fabiola, Nay, Eliezer, Alita. Al equipo del Bioterio de la USB, el Sr. Luis y el Sr. José, por ayudarme con el manejo de los animales, aun cuando las condiciones no siempre fueran las mejores.

A mis padres, Libia y Leonardo, por su gran apoyo incondicional. Por siempre guiarme y aconsejarme. Cada día me dieron el ánimo, la fuerza y el cariño que me ayudo a seguir adelante. Este logro es para ustedes sin duda. Me han enseñado que siempre hay que trabajar duro para alcanzar las metas que uno se proponga, y que por más difícil sea el camino no hay que darse por vencido.

A todos mis grandes amigos de la Facultad de Ciencias de la UCV, por siempre animarme y soportar mis momentos de estrés, no podía haber alcanzado esta meta sin su apoyo: Luis, Norge, Génesis, Ivan, Jessi, Barby, Luz, Juan, José, Estefanía, Radha, Ina, Kay, Jeni, Rosa, Anita, Ella, Nani, Sol, Keily, Ivette, Sami y a todos los demás que no puedo mencionar aquí para no hacer más larga la lista.

A mí querida UCV. Que más de una vez ha demostrado ser la casa que vence las sombras. Frente a toda adversidad lograste darme una de las experiencias más maravillosa de mi vida. Junto a todos los profesores de la Facultad Ciencias de la UCV, gracias por toda la formación que me dieron, prometo aprovecharla al máximo y dejar el nombre de la UCV en alto.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Los tripanosomatídeos.....	3
1.1.1. Trypanosoma equiperdum.....	3
1.2. Las proteínas quinasas.....	5
1.2.1. La proteína quinasa dependiente de AMPc.....	7
2. ANTECEDENTES	14
2.1. Proteínas quinasas en tripanosomatídeos.....	14
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo general.....	21
3.2. Objetivos específicos.....	21
4. METODOLOGÍA	22
4.1. Transformación de bacterias <i>Escherichia coli</i> BL21 Star™ (DE3) con los vectores de expresión pRSETB-H ₆ R ^I β y el pRSETB-H ₆ R ^{II} α(R213K).....	22
4.1.1. Vectores de expresión.....	22
4.1.2. Preparación de células bacterianas <i>Escherichia coli</i> BL21 Star™ (DE3) competentes.....	23
4.1.3. Transformación de bacterias <i>Escherichia coli</i> BL21 Star™ (DE3) competentes.....	23
4.1.4. Aislamiento del ADN plasmídico de las colonias transformadas.....	24
4.1.5. Digestión con enzimas de restricción de los ADN plasmídicos.....	25

4.2.	Expresión de las subunidades recombinantes H ₆ R ^I β y H ₆ R ^{II} α(R213K) en <i>Escherichia coli</i> BL21 Star TM (DE3).....	26
4.3.	Purificación de las subunidades recombinantes H ₆ R ^I β y H ₆ R ^{II} α(R213K).....	27
4.4.	Expansión y purificación de <i>Trypanosoma equiperdum</i>	27
4.5.	Purificación de las proteínas de <i>Trypanosoma equiperdum</i> que presentan homología con las subunidad reguladora de la PKA de mamífero.....	29
4.6.	Determinación de la actividad quinasa mediante geles de agarosa de las proteínas de <i>Trypanosoma equiperdu</i> purificadas.....	30
4.7.	Procedimientos generales.....	31
4.7.1.	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).....	31
4.7.2.	Electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa e Inmunotinción o Western Blot.....	31
4.7.3.	Determinación de concentración de proteínas mediante técnica colorimétrica de Bradford.....	32
4.8.	Análisis bioinformático.....	33
5.	RESULTADOS	34
5.1.	Transformación de bacterias <i>Escherichia coli</i> BL21 Star TM (DE3) con los vectores de expresión pRSETB-H ₆ R ^I β y pRSETB- H ₆ R ^{II} α (R213k).....	34
5.2.	Expresión de <i>Escherichia coli</i> BL21 Star TM (DE3) de las subunidades recombinantes H ₆ R ^I β y H ₆ R ^{II} α(R213K).....	36
5.3.	Purificación de las subunidades recombinantes H ₆ R ^I β y H ₆ R ^{II} α(R213K).....	38
5.4.	Purificación de las proteínas de <i>Trypanosoma equiperdum</i> que presentan homología con las subunidades catalíticas de la PKA de mamífero.....	42

5.5. Determinación de la actividad quinasa en geles de agarosa de las proteínas purificadas de <i>Trypanosoma equiperdum</i> que presentan homología con las subunidades catalíticas de la PKA de mamífero.....	46
5.6. Análisis bioinformático.....	49
6. DISCUSIÓN.....	52
7. CONCLUSIONES.....	65
8. BIBLIOGRAFÍA.....	66
9. ANEXOS.....	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Cuantificación de proteínas totales de las eluciones obtenidas de la purificación de H ₆ R ^I β y H ₆ R ^{II} α(R213K).....	41
Tabla 2: Cuantificación del rendimiento de proteínas de <i>T. equiperdum</i> purificadas con la resina acoplada a Ni ²⁺ unida con H ₆ R ^I β y H ₆ R ^{II} α(R213K).....	46
Tabla 3: Análisis de identidad de las 3 isoforma de las proteínas homologas a la sub-C de la PKA de <i>T. evansi</i> y <i>T. brucei</i> y las 3 isoformas de la sub-C de la PKA de <i>H. sapiens</i>	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema del modelo del árbol evolutivo del subgénero <i>Trypanozoon</i>	4
Figura 2: Esquema del mecanismo de activación de la PKA.....	8
Figura 3: Modelos de la estructura de la subunidad catalítica de la PKA y la unión del ATP al sitio activo.....	9
Figura 4: Modelos de la organización de las subunidades regulatorias RII α y RI β de la PKA.....	11
Figura 5: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de PKAC1 (Q38DR5), PKAC2 (Q38DS1) y PKAC3 (Q388U5) con la subunidad Ca de <i>Mus musculus</i> (P05132).....	15
Figura 6: Alineamiento de secuencias de aminoácidos entre la subunidad R ^{II} de corazón de porcino y la proteína de <i>T. equiperdum</i> (aislado TeAp-N/D19) que presenta homología con las subunidades R de la PKA.	17
Figura 7: Ensayos quinasas de parásitos de <i>T. equiperdum</i> estresados metabólicamente.....	18
Figura 8: Esquema del mapa del vector de expresión pRSETB.....	22
Figura 9: Análisis electroforético de la evaluación de la integridad de los ADN plásmidicos aislados.....	34
Figura 10: Análisis electroforético de los productos de digestión de los ADN plásmidicos aislados con la enzima de restricción <i>Hind</i> III.....	35
Figura 11: Perfil proteico del ensayo de expresión a diferentes tiempos de las bacterias transformadas con pRSETB-H ₆ R ^I β	37

Figura 12: Perfil proteico del ensayo de expresión a diferentes tiempos de las bacterias transformadas con pRSETB-H ₆ R ^{II} α(R213K).....	37
Figura 13: Western blot de los perfiles proteicos del ensayo de expresión con IPTG a diferentes tiempos de las bacterias transformadas con pRSETBH ₆ R ^I β y pRSETBH ₆ R ^{II} α(R213K).....	38
Figura 14: Análisis del proceso de purificación de H ₆ R ^I β por medio de cromatografía de afinidad de metales inmovilizados con resina acoplada a iones níquel Ni ²⁺	40
Figura 15: Análisis del proceso de purificación de H ₆ R ^{II} α(R213K) por medio de cromatografía de afinidad de metales inmovilizados con resina acoplada a iones níquel Ni ²⁺	40
Figura 16: Ensayo para determinar la dimerización de la subunidad H ₆ R ^I β recombinante purificada.....	42
Figura 17: Análisis del proceso de purificación de las proteínas de la fracción soluble de <i>T. equiperdum</i> mediante cromatografía de afinidad.....	43
Figura 18: Análisis de Western blot para determinar la posible contaminación con la sub-R recombinante durante la purificación de las proteínas de la fracción soluble de <i>T. equiperdum</i>	44
Figura 19: Análisis de Western blot para la detección de proteínas homologas a la sub-C de la PKA de mamífero de la purificación de la fracción soluble de <i>T. equiperdum</i>	45
Figura 20: Estandarización del ensayo quinasas.....	47
Figura 21: Evaluación de la actividad quinasas de la purificación de las proteínas de <i>T. equiperdum</i> eluidas con la resina de Ni ²⁺ unida con H ₆ R ^{II} α(R213K).....	48

Figura 22: Evaluación de la actividad quinasa de la purificación de las proteínas de *T. equiperdum* eluidas con la resina de Ni²⁺ unida con H6RIβ(R213K)..... 48

Figura 23: Análisis de alineamiento múltiple entre de 3 isoformas de las proteínas homologas a la subunidad C de la PKA de *T. brucei* y las 3 isoformas de la sub-C de la PKA de *H. sapiens*.
..... 51

Figura 24: Alineamiento de la subunidad Cα de la PKA de mamífero con las tres isodormas de la proteína con homología a la PKA de mamífero de *T. brucei*.
..... 61

ABREVIATURAS

AMPc: Adenosin 3', 5' Monofosfato Cíclico

ATP: Trifosfato de Adenosina

BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato

BSA: Albumina de Suero Bovino

C: Catalítica

DEAE: Dietilaminoetil

IPTG: Isopropil- β -D-1 TioGalactoPiranósido

kDa: kiloDaltons

NBT. Azul de Nitrotetrazolio

Medio LB: Medio Luria-Bertani

PBSG: Solución Fosfato Salino con Glucosa

PBS: Solución Fosfato Salino (Phosphate Buffered Saline)

PHSR-PKA: Proteína homóloga a la subunidad reguladora de la PKA

PKA: Proteína Quinasa dependiente de AMPc (Protein Kinase dependent of AMPc)

PK: Proteína Quinasa (Protein Kinase)

R: Reguladora

SDS: Dodecil Sulfato de Sodio

SDS-PAGE: Geles de PoliAcrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio

TBS: Solución de Tris Salino

T. brucei: *Trypanosoma brucei*

T. equiperdum: *Trypanosoma equiperdum*

T. evansi: *Trypanosoma evansi*

RESUMEN

El *Trypanosoma equiperdum* es un parásito hemoflagelado que infecta a animales de la familia *Equidae* produciendo la durina, una enfermedad venérea que compromete la vida de los animales infectados y representa grandes pérdidas económicas para la industria ganadera. La fosforilación de proteínas es uno de los mecanismos más empleados en la integración de señales en células eucariotas, este proceso es llevado a cabo por las proteínas quinasas, dentro de las cuales se destaca la proteína quinasa dependiente de adenosín monofosfato cíclico o PKA. En el genoma del *T. equiperdum* se han encontrado genes que codifican para proteínas que presentan homología con la PKA de mamífero, encontrándose que estas quinasas homólogas son capaces de fosforilar a los sustratos específicos de la PKA. Adicionalmente, estudios previos han mostrado que el estrés nutricional causado por la ausencia de glucosa ocasiona un aumento de la actividad quinasa en estos parásitos.

En este trabajo especial de grado se purificaron parcialmente proteínas de *T. equiperdum* que presentan similitud tanto en sus características bioquímicas como en su función con la subunidad catalítica de la PKA de mamífero. Para ello se expresaron en bacterias y purificaron las subunidades reguladoras H₆R^β y H₆R^α(R213K) recombinantes de la PKA de mamífero, obteniendo rendimientos de 8,4mg y 6,6mg de proteína por litro de cultivo bacteriano. Estas subunidades reguladoras fueron enlazadas a resinas cromatográficas de iones inmobilizados de Ni²⁺, y a través de ellas se lograron formar complejos holoenzimáticos heterólogos con proteínas provenientes de la fracción soluble de parásitos *T. equiperdum* previamente estresados nutricionalmente al incubarlos en ausencia de glucosa. Las proteínas de *T. equiperdum* que interaccionaron con las subunidades H₆R^β y H₆R^α(R213K) lograron ser eluidas de la resina con 2mM de AMPc. La separación electroforética reveló que las proteínas purificadas presentaban masas moleculares aparentes de 37-39kDa y 55kDa, siendo esta última la que se encontró en mayor cantidad. Además, estas proteínas fueron reconocidas por anticuerpos dirigidos contra la subunidad catalítica de la PKA de mamífero.

Ensayos quinasa realizados sobre las fracciones aisladas revelaron la presencia de proteínas con actividad quinasa, ya que fueron capaces de fosforilar un sustrato específico de la PKA de mamífero.

Palabras clave: *Trypanosoma*, *Trypanosoma equiperdum*, Proteína quinasa dependiente de AMP cíclico, PKA.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Los tripanosomatídeos

Los tripanosomatídeos son parásitos unicelulares hemoflagelados que se encuentran clasificados taxonómicamente dentro de la familia Trypanosomatidae, la cual está incluida en el orden Kinetoplastida. Los kinetoplástidos se caracterizan por poseer dentro de su única mitocondria una red de moléculas de ADN circulares entrelazadas en forma de maxi y minicírculos, generando una estructura celular denominada kinetoplasto. En la familia Trypanosomatidae se encuentran varios parásitos de vida libre que infectan la sangre de sus hospedadores, y por lo general, son transmitidos de un hospedador a otro por medio de artrópodos vectores. Varias especies de tripanosomatídeos son agentes causantes de enfermedades tanto en humanos como en animales usados en la agricultura en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Entre estas especies de tripanosomatídeos se encuentran: *Trypanosoma brucei gambiense*, *T. brucei rhodesiense*, *Leishmania* spp, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma vivax* y *Trypanosoma equiperdum* (Callahan y col., 2002; Simpson y col., 2006; Lai y col., 2007; Desquesnes y col., 2013).

1.1.1. *Trypanosoma equiperdum*

El *T. equiperdum* perteneciente al subgénero *Trypanozoon*, es un parásito monomórfico que presenta una forma alargada y delgada, que bajo observación directa no se puede distinguir de las formas de tripomastigotes sanguíneos de otras especies de tripanosomatídeos de este subgénero, como son el caso del *T. evansi* y las tres subespecies del *T. brucei* (*T. brucei brucei*, *T. brucei rhodesiense* y *T. brucei gambiense*) (Brun y col., 1998).

Se ha sugerido que al igual que *T. evansi*, el *T. equiperdum* evolucionó a partir del *T. brucei*. Sin embargo, estas tres especies pueden ser diferenciadas entre sí a nivel molecular de acuerdo a la estructura de sus kinetoplastos. En el caso del *T. brucei*, se presenta una estructura concatenada completa de los maxi y

minicírculos que conforman al kinetoplasto; mientras que en el *T. evansi*, se presenta una ausencia total de los maxicírculos. En *T. equiperdum* hay una ausencia parcial de estos maxicírculos, hallándose fragmentos similares a los presentes en *T. brucei* (**figura 1**) (Lai y col., 2008; Jensen y col., 2008; Desquesnes y col., 2013; Carnes y col., 2015).

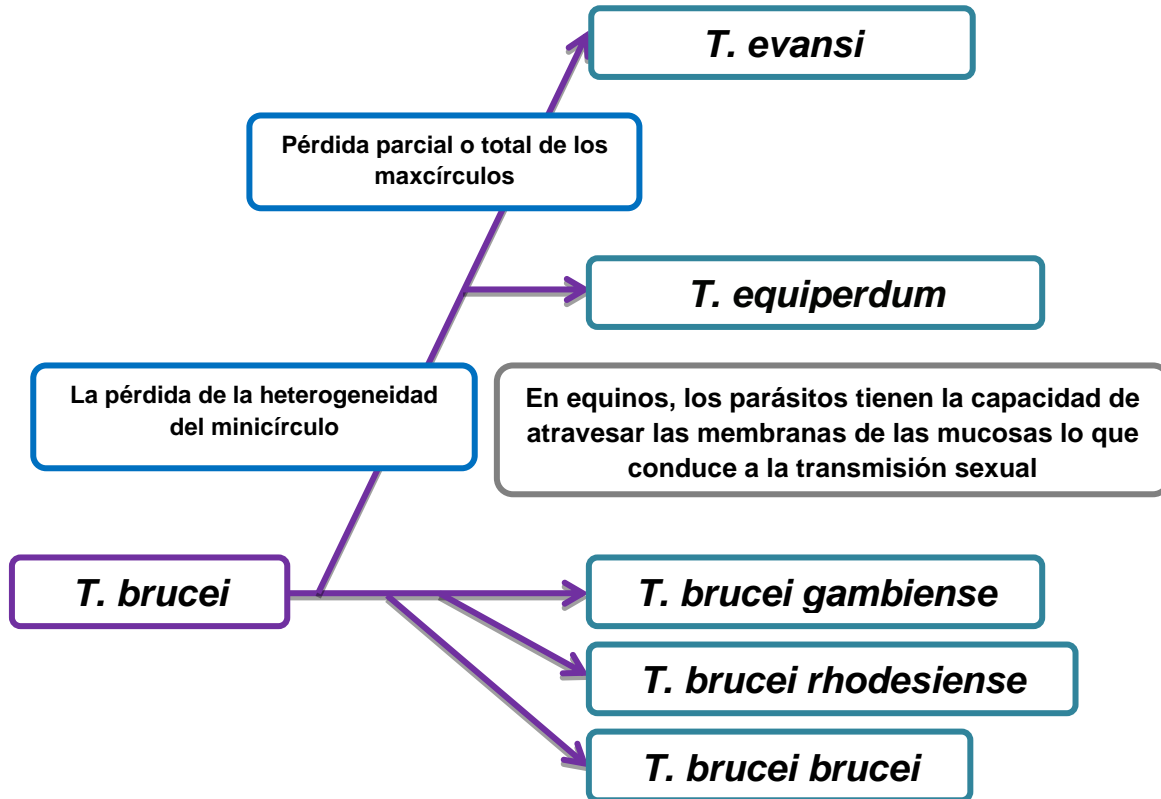


Figura 1. Esquema del modelo del árbol evolutivo del subgénero *Trypanozoon*.

En este esquema de modelo del árbol filogenético del subgénero *Trypanozoon* se muestra la relación evolutiva entre *T. equiperdum* y *T. evansi*, y cómo posiblemente evolucionaron a partir de *T. brucei* (tomada y modificada de Desquesnes y col., 2013).

T. equiperdum infecta a animales pertenecientes a la familia *Equidae* (caballos, asnos, etc.) y generalmente se encuentra en los tejidos de los animales infectados. A pesar de esto, se han logrado adaptar cepas que pueden ser mantenidas en roedores de experimentación de la misma forma como se ha conseguido para *T. evansi*. Para este parásito no se han descrito vectores de transmisión, siendo las infecciones reportadas producidas cuando los

tripanosomas que se encuentran localizados en las membranas de las mucosas y los fluidos seminales del animal infectado son transferidos al animal sano durante el coito. También se han reportado infecciones con *T. equiperdum* en crías, lo que sugiere que el parásito también puede ser transmitido a través de la lactancia o por el contacto directo a lesiones en las ubres (Brun y col., 1998; Giardina y col., 2003).

El *T. equiperdum* es el agente etiológico de la durina, una enfermedad contagiosa aguda o crónica de los équidos. Esta enfermedad se encuentra distribuida por África, Centro y Sur América, y Oriente Medio, y al igual que la surra causada por *T. evansi*, varía en su sintomatología, lo que hace que su diagnóstico sea difícil. Entre los síntomas producidos por la durina se destacan: anemia, inflamaciones, edemas localizados en los órganos genitales, placas cutáneas, fiebre, pérdida de peso, y finalmente la presencia de síntomas neurológicos (falta de coordinación, parálisis de las extremidades posteriores, parálisis facial) en las etapas finales de la enfermedad (Brun y col., 1998; Desquesnes y col., 2013, Gizaw y col., 2017; Hébert y col., 2017). Esta enfermedad puede causar la muerte del animal.

1.2. Las proteínas quinasas

En los tripanosomatídeos se presentan mecanismos de regulación de señales ante estímulos externos similares a los que se encuentran en las células de los organismos eucarióticos superiores. Uno de estos mecanismos es la fosforilación reversible de las proteínas, la cual es llevada a cabo por dos tipos de enzimas, las proteínas quinasas (PKs) y las proteínas fosfatasas (PPs). Las PKs son responsables de la actividad ATP:fosfotransferasa, es decir, la capacidad de transferir un grupo fosfato a una proteína blanco a partir del trifosfato de adenosina (ATP); mientras que la eliminación de estos fosfatos es llevada a cabo por las PPs (Su y col., 1995; Hunter, 1995).

Las PKs pertenecen a una súper familia de enzimas. Al catalizar la adición de grupos fosfato a las proteínas, generan que éstas sufran cambios conformacionales, los cuales conllevan al desencadenamiento de diversos procesos de señalización celular. Entre los procesos regulados a través de este mecanismo de modificación covalente reversible se encuentran numerosas rutas metabólicas, la replicación del ADN, la expresión génica, el transporte a través de membranas, la organización del citoesqueleto, la contracción muscular, el ciclo celular, la apoptosis, la diferenciación celular y la respuesta inmune. Esta fosforilación reversible de las proteínas representa el tipo más común de modificación post-traducciona l tanto en organismos eucarióticos como procarióticos (Pawson y Scott, 2005).

Las PKs son enzimas muy diversas que se presentan en una gran variedad de tamaños, estructuras, número de subunidades, localización subcelular, especificidad de sustratos y mecanismos de activación, sin embargo, a pesar de su gran diversidad poseen un núcleo catalítico altamente conservado. Estas enzimas catalizan la transferencia del γ -fosfato del ATP a los grupos hidroxilos de residuos de aminoácidos específicos en las proteínas; en eucariotas, estos son usualmente residuos de Ser, Thr y Tyr, clasificándose como proteínas Ser/Thr quinasas y proteínas Tyr quinasas respectivamente (Hanks y Hunter, 1995; Taylor y col., 1988; Hunter, 1995). La activación de las PKs puede llevarse a cabo mediante varios mecanismos, tales como la unión de moléculas efectoras, por fosforilación mediada por otras proteína quinasas o por autofosforilación, y por interacciones proteína-proteína o interacciones entre dos dominios diferentes de la misma proteína (Huse y Kuriyan, 2002; Taylor y Ghosh, 2006).

Se han reportado que alrededor de 518 genes que codifican para proteína quinasas dentro del genoma humano, lo que conforma el denominado quinoma, el cual representa aproximadamente el 2% del genoma humano. Además del quinoma humano se han descifrado los correspondientes a otras especies de mamíferos, invertebrados y eucariotas unicelulares, cuyos genomas han sido también secuenciados, encontrándose que el genes que codifican para proteínas

quinasas en las diferentes especies representa entre el 1,5 y el 2,5 % de su genoma (Hunter, 1995); Manning y col., 2002a, 2002b).

La gran mayoría de las PKs se agrupan dentro de la súperfamilia de la proteínas quinasas eucariotas (ePKs), en donde se pueden encontrar 8 grandes grupos (AGC, CAMK, CMGC, CK1, STE, TKL, TK y RGC) en base a las similitudes que presentan en la estructura primaria de sus dominios catalíticos, pero teniendo en cuenta también otros parámetros, como la similitud de secuencias en otros dominios distintos al catalítico o la función biológica desempeñada. Dentro de los 8 grupos presentes en las ePKs se destacan el grupo CAMK, en donde están las PKs cuya actividad está regulada por calcio y calmodulina; el grupo CMGC, donde se encuentran las PKs activadas por zimógenos y las PKs dependientes de ciclinas; y el grupo AGC, en el cual se encuentran las PKs dependientes de nucleótidos cíclicos y la proteína quinasa C (Manning y col., 2002a; Baharani y col., 2017).

1.2.1. La proteína quinasa dependiente de AMPc

Dentro del grupo AGC de la PKs se encuentra la proteína quinasa dependiente de adenosín monofosfato cíclico (AMPc), también conocida como proteína quinasa A o PKA, la cual fue descubierta en el año 1968, durante una investigación sobre la regulación de la glucógeno fosforilasa (Walsh y col., 1968).

La PKA es un tetrámero formado por un dímero de subunidades reguladoras (R) y dos subunidades catalíticas (C). Cuando hay un aumento de la concentración del AMPc por efecto de la activación de la adenilato ciclasa y en respuesta a una señal extracelular, existe una unión cooperativa entre las subunidades R y el AMPc que altera la afinidad que estas subunidades poseen por las subunidades C, ocasionando la disociación de la holoenzima en un dímero de subunidades R (R_2) con cuatro moléculas de AMPc unidas, y dos subunidades C monoméricas activas responsables de la actividad ATP:fosfotransferasa. Nuevamente cuando los niveles de AMPc disminuyen, la holoenzima se reconstituye provocando que las subunidades R inhiban la actividad de las

subunidades C (**figura 2**) (Taylor y col., 1988; Hanks y col., 1985; Hanks y Hunter, 1995).

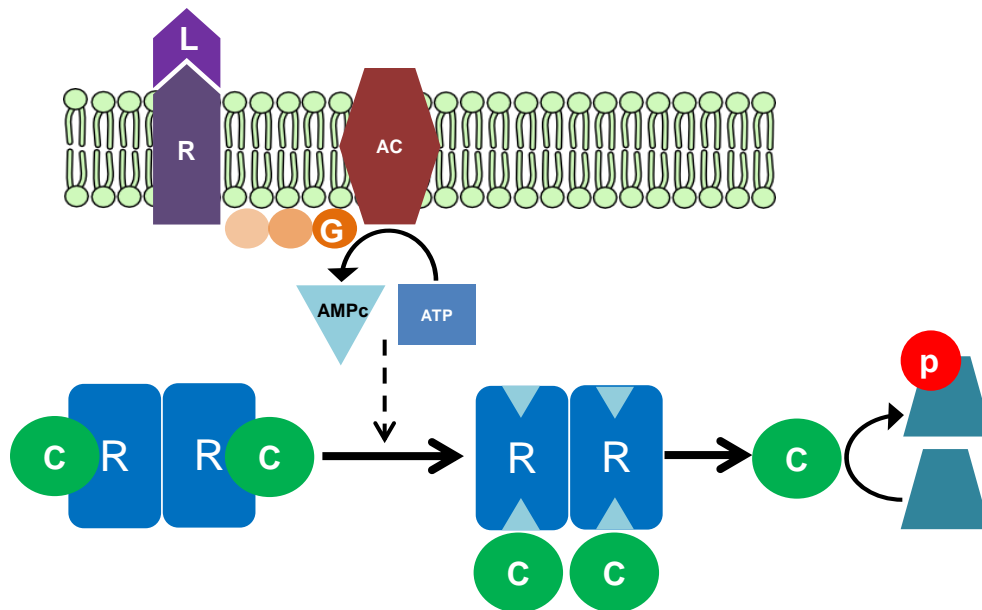


Figura 2. Esquema del mecanismo de activación de la PKA.

L, señal extracelular; R, receptor de membrana; G, proteína G; AC, adenilato ciclasa; R, subunidad reguladora; C, subunidad catalítica.

Las proteínas que pueden ser fosforiladas por la PKA presentan una gran diversidad estructural y funcional. Sin embargo, las subunidades C de la PKA pueden realizar su actividad quinasa al reconocer una secuencia consenso conformada por aminoácidos que actúan como determinantes de especificidad, la cual está presente en todas estas proteínas blanco. Esta secuencia consenso está conformada por: Arg-Arg-X-Ser/Thr-Ψ, donde X es un aminoácido pequeño y Ψ es un aminoácido hidrofóbico (Kemp y col., 1977; Taylor, 1987; Taylor y col., 1988; Kemp y Pearson, 1991; Hanks y Hunter, 1995).

La subunidad C de la PKA ha logrado ser purificada a partir de diferentes tejidos de mamífero, describiéndose como una proteína monomérica con un peso molecular de alrededor de 40kDa. En mamíferos se han identificado tres isoformas para la subunidad C (C α , C β y C γ) (Corbin y col., 1975; Anand, 2007). Por medio de ingeniería genética, también se han logrado expresar y purificar las

subunidades C de la PKA de mamífero en *Escherichia coli*, de forma catalíticamente activa (Slice y Taylor, 1989).

La subunidad C, una vez sintetizada, sufre diferentes modificaciones post-traduccionales. Algunas de estas modificaciones post-traduccionales, como la fosforilación, son fundamentales para que la enzima adquiera su conformación activa; en cambio, otras como la miristilación no se conoce todavía con exactitud cuál es su función, aunque se ha postulado que la miristilación puede mediar la unión de la subunidad C a membranas. Se han identificado cuatro sitios en donde la subunidad C es fosforilada: Ser10, Ser139, Thr197 y Ser338, encontrándose que la fosforilación de la Thr197 es una etapa esencial en la maduración de la subunidad C, siendo absolutamente necesaria para que la enzima sea catalíticamente activa (Toner-Webb y col., 1992; Yonemoto y col., 1993; Steinberg y col., 1993; Adams y col., 1995; Yonemoto y col., 1997; Struppe y col., 1998; Gesellchen y col., 2006)

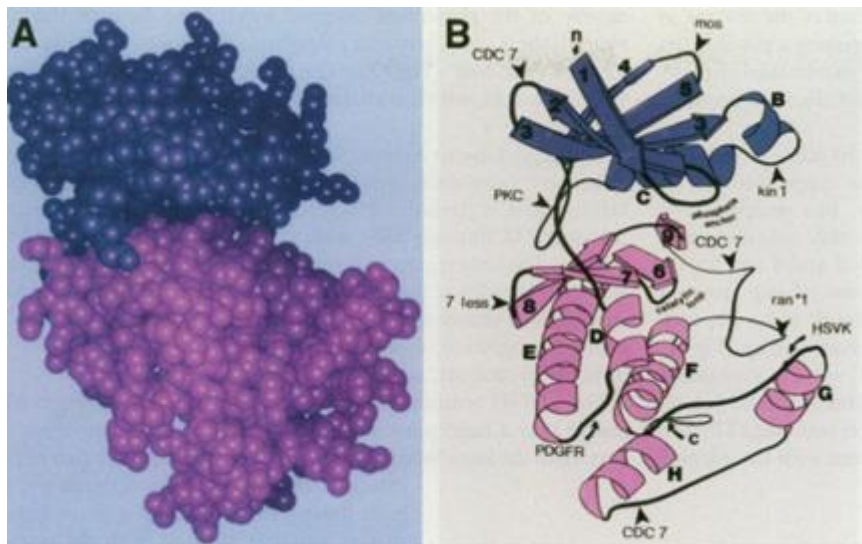


Figura 3. Estructura tridimensional de la subunidad catalítica de la PKA.

En estos modelos el lóbulo menor está resaltado en color azul, mientras que el lóbulo mayor junto con el núcleo catalítico está representado en color rosado. En el panel B se muestran las estructuras secundarias que componen a ambos lóbulos (tomado de Knighton y col., 1991).

Con la resolución de la estructura tridimensional de la subunidad C de la PKA mediante difracción de rayos X se logró determinar que la proteína está

conformada por dos lóbulos separados por una región bisagra la cual es ocupada por el sustrato. El lóbulo localizado en la región N-terminal es más pequeño y está involucrado en el proceso de unión de Mg^{2+} y ATP, mientras que el lóbulo C-terminal de mayor tamaño está asociado al reconocimiento del sustrato peptídico y la actividad catalítica (Taylor y col., 1988). La estructura tridimensional del lóbulo N-terminal está formado por cinco hojas β antiparalelas y una hélice α , mientras que el lóbulo C-terminal comprende a cuatro hélices α flanqueadas por 2 hélices α adicionales y dos hojas β antiparalelas cortas. **(figura 3)** (Zheng y col., 1993; Smith y col., 1999).

La principal función de la subunidad R es mantener la subunidad C en estado inactivo en ausencia de AMPc. Esta subunidad ha sido purificada a partir de numerosos tejidos de mamíferos, tratándose en la mayoría de los casos de una proteína dimérica formada por dos subunidades idénticas (Taylor y col., 1990), aunque también se han reportado holoenzimas formadas por heterodímeros de subunidades R (Tasken y col., 1993). Durante la purificación de la PKA a partir de diversos tejidos de mamífero empleando cromatografía de intercambio aniónico, se obtienen dos isoformas de la PKA, las cuales han sido denominadas I y II de acuerdo a su orden de elución de la columna (Corbin y col., 1975; Hofmann y col., 1975). Las holoenzimas tipo I y II se diferencian por sus subunidades R denominadas respectivamente subunidad R tipo I (RI) y subunidad R tipo II (RII). RI y RII presentan diferentes propiedades bioquímicas (Beebe y Corbin, 1986). Actualmente se sabe que en mamíferos existen cuatro tipos de subunidades R producto de cuatro genes diferentes; dos subunidades tipo I: RI α y RI β , y dos subunidades tipo II: RII α y RII β .

Aunque las isoformas de la subunidad R muestran ciertas diferencias estructurales y funcionales, todas ellas poseen una misma arquitectura global. Cada subunidad R monomérica está constituida por dos dominios de enlace al AMPc ubicados hacia el extremo C-terminal (sitio A y B); una región más pequeña conocida como secuencia inhibidora (IS) y que se encuentra localizada hacia el N-terminal, la cual interactúa con la subunidad C; y un dominio

denominado de dimerización/acoplamiento o D/D, en el extremo N-terminal (**figura 4**) (Taylor y col., 2005; Kim y col., 2006).

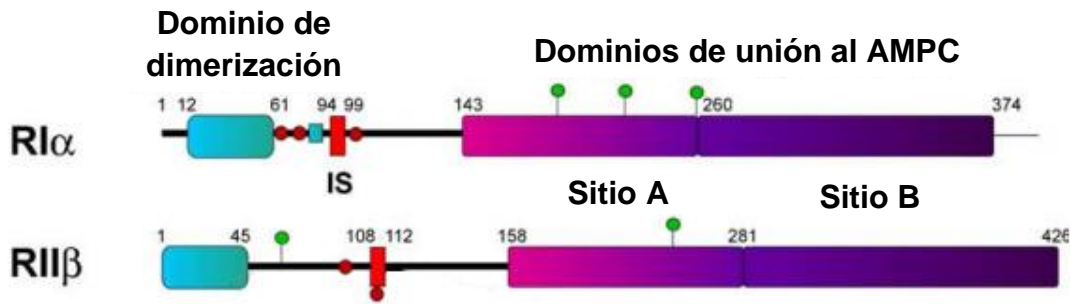


Figura 4. Modelos de la organización de las subunidades regulatorias RIα y RIIβ de la PKA.

En el modelo se muestra los sitios A y B de enlazamiento al AMPc en el extremo C-terminal. En el N-terminal se encuentra una región conocida como el dominio de dimerización/anclaje o D/D (dimerization/docking), el cual contiene la región responsable de la dimerización de las subunidades R y proporciona un sitio de acoplamiento para las proteínas de anclaje de las PKAs (AKAPs), además se encuentra la secuencia de inhibición (IS), la cual forma parte del sitio de reconocimiento para la subunidad C (tomado y modificado de Taylor y col., 2005).

En los estudios sobre los parámetros cinéticos de la interacción entre las subunidades C y R, se logró determinar la velocidad y el grado de reasociación de las subunidades R y C a diferentes concentraciones de la enzima y de AMPc, En estos estudios se dedujo que para que el AMPc pueda activar a la PKA primero este se tiene que unir a la holoenzima para formar un complejo R-C-AMPc, y posteriormente ocurre la disociación de las subunidades. Realizando los mismos experimentos con subunidades R que lograron ser renaturalizadas luego de su desnaturalización con urea, se observó que estas subunidades R mantenían todas sus propiedades y actividades, es decir, no se veía afectada su afinidad por la subunidad C y podían enlazarse AMPc (Builder y col., 1980).

Además de las distintas subunidades R, existe otra clase de inhibidores fisiológicos de la subunidad C de la PKA, los cuales son estables al calor y se conocen como PKIs (por “protein kinase inhibitors”, en inglés) (Walsh y col., 1971, 1990). Se han reportado tres productos génicos: PKIα, PKIβ1 y PKIβ2. Los PKIs

son proteínas pequeñas que se enlazan con alta especificidad y afinidad a la subunidad C, típicamente en el rango nanomolar o subnanomolar (Hofmann, 1980; Whitehouse y Walsh, 1983). Al igual que las subunidades R, los PKIs contienen la secuencia inhibidora consenso que se parece al péptido sustrato (secuencia: Arg-Arg-Asn-Ala-Ile, en la cual el residuo de Ala reemplaza al residuo de Ser o Thr que regularmente es fosforilado), y al enlazarse a la subunidad C, los PKIs ocupan el sitio de enlazamiento del péptido sustrato, produciendo así la inactivación de la proteína al prevenir el enlazamiento de otros sustratos. Por lo tanto, las subunidades R y los PKIs se comportan como inhibidores competitivos de los sustratos peptídicos.

Para el estudio de las proteínas quinasas se han hecho varios esfuerzos para desarrollar metodologías que permitan su fácil purificación, siendo las técnicas cromatográficas las más empleadas. También se han empleado técnicas de ADN recombinante para obtener proteínas quinasas mutantes que puedan ser expresadas en sistemas bacterianos, alterando sus parámetros cinéticos al realizar mutaciones puntuales y así poder determinar cuáles aminoácidos son esenciales para el funcionamiento de estas proteínas (Bubis y col., 1988).

Hemmer y col. (1997) lograron desarrollar una estrategia para la purificación de subunidades C recombinantes de la PKA de mamíferos, basado en la formación de la holoenzima con la subunidad R. Para ello, sobreexpresaron una subunidad R tipo II α etiquetada con 6 residuos de histidina (His) en su extremo N-terminal y que adicionalmente presentaba una mutación puntual de Arg a Lys en la posición 213 [H₆R^{II} α (R213K)]. La etiqueta de poli-His permitió que la subunidad H₆R^{II} α (R213K) recombinante fuera enlazada a una resina de iones Ni²⁺, mientras que la substitución R213K conllevó a una afinidad mayor por la subunidad C y una afinidad reducida por el AMPc. Al cromatografiar el extracto bacteriano conteniendo la subunidad C recombinante a través de la resina, lograron formar un complejo holoenzimático de forma estable, el cual no se disoció con los niveles de AMPc que normalmente existen en los extractos bacterianos. Finalmente lograron **obtener** a la subunidad C recombinante mediante su elución usando altas concentraciones de AMPc (Hemmer y col., 1997). Con el desarrollo de estas

metodologías es posible obtener grandes cantidades de proteínas con un alto grado de pureza para su posterior caracterización bioquímica; además, se pueden hacer estudios de interacciones proteína-proteína que pueden dar base para dilucidar proteínas importantes en ciertos procesos de señalización celular.

2. ANTECEDENTES

2.1. Proteínas quinasas en tripanosomatídeos

En los tripanosomatídeos se han hecho diversos estudios sobre los procesos de fosforilación y la importancia que tienen para el desarrollo de estos parásitos. Uno de estos estudios fue la comparación de los quinomas de tres diferentes especies de tripanosomatídeos (*Leishmania major*, *T. brucei* y *Trypanosoma cruzi*) contra diferentes quinomas de varios organismos eucarióticos (Parsons y col., 2005). Estos autores mostraron que los genes que codifican para PKs representan aproximadamente el 2% de los genomas de estos parásitos, resaltando nuevamente la importancia que posiblemente tienen los procesos de fosforilación y de desfosforilación de proteínas en los procesos fisiológicos de estos organismos. Además, estos autores revelaron la presencia de diferentes miembros de las ePKs en estos parásitos, logrando identificar tres genes que codifican para proteínas que presentan relación con la subunidad catalítica de la PKA de mamíferos (PKAC1, PKAC2, y PKAC3) (Parsons y col., 2005).

Análisis filogenéticos muestran que tanto *T. equiperdum* y *T. evansi* no son monofiléticos y por ello, pueden ser considerados como subespecies de *T. brucei*, por lo que debe existir una alta similitud entre los genomas, y por lo tanto en los quinomas de estas tres especies (Parsons y col., 2005; Desquesnes y col, 2013; Carnes y col., 2015). Un alineamiento de PKAC1, PKAC2, y PKAC3 y la subunidad C α de la PKA de *Mus musculus* muestra la alta homología que presentan las secuencias aminoacídicas de las proteínas de los parásitos con respecto a la de mamífero (**figura 5**).

En *T. brucei* se ha encontrado una proteína que presenta homología con la subunidad R tipo I de la PKA de mamíferos. Con ensayos de inmunoprecipitación de esta proteína homóloga se reveló que coprecipitaba con una proteína que presentaba las siguientes características: i) podía fosforilar sustratos de las PKAs de mamíferos, ii) era fuertemente inhibida por el PKI, y iii) era reconocida por un anticuerpo dirigido contra la subunidad C de la PKA de bovino. Tomando como base estos hallazgos, los autores concluyeron que la proteína coprecipitada posiblemente se trataba de la subunidad C de la PKA de *T. brucei* (Shalaby y col., 2001).

En el laboratorio de Bioquímica de Proteínas de la Universidad Simón Bolívar en conjunto con otros laboratorios que colaboraron con esta investigación, se logró identificar, clonar, expresar y purificar una proteína presente en el *T. equiperdum* (PHSR-PKA) que presenta homología con la subunidad R de la PKA de mamíferos (Bubis y col., 2018). Esta proteína presenta un tamaño de aproximadamente 57kDa, semejante al tamaño de los monómeros que conforman a la subunidad R de la PKA. Estudios de alineamiento de la PHSR-PKA (**figura 6**) muestran que la proteína del parásito presenta una secuencia de inhibición (IS) similar a la de las subunidades R de la PKA de otros eucariotas la cual está implicada en la interacción con la subunidad catalítica. En la subunidad RII de corazón de cochino, la región IS se encuentra entre los residuos 90 y 100 (**figura 6**). También se demostró que anticuerpos generados contra la subunidad RII de la PKA pueden reconocer a PHSR-PKA, y anticuerpos generados en ratón contra PHSR-PKA también lograron reconocer a la subunidad RII de la PKA (Calabokis y col., 2016).

Te	1	MSEKGTSLNLF LAACQKEGVKQPNTFLVEFFTKKPELSEVEEIDLSKNYI	50
Ss		-----	0
Te	51	GNRGILALLDVISELPCFRFLNCSNQKLYNTDLNEDSVRGNATIDRIVDV	100
Ss		-----	0
Te	101	FKSHPTANALDLSHNPISNYAGRRLLLLTQNNKRICRVELVDTRIDF---	147
Ss	1	-----MSHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQPDPDLVDFAVDYFTR	39
Te	148	--ELRSRI-----TQCEKN----TIAIWESQAQEKKEERAFGES	181
Ss	40	LREARSRASTPPAAPPSSGQLEPSSGLVTDIAIDSESEDED-----	82
Te	182	VTWVPTQTSADLTAIGGGRKRRTTVRGEIDPEKAKSYVAP--YFEKSED	229
Ss	83	-LDVPIPSRFD-----RRVSVAETYNPDEEEDTDPRIHPKTDQ	122
Te	230	ETALILKLLTYNVLFSFLDSRDLMTVAGAMWRVEFKQDDCIMEAGQTTCD	279
Ss	123	QRCLQEACKDILLFKNLDQEQLSQVLDMAMFERTVKVDEHVIDQGDDG-D	171
Te	280	KLYIIQDGKADII--KEGQ--KVYLKVEGTAVGELELMYQTPTVATKVC	325
Ss	172	NFYVIERGTYDILVTKDNQTRSVMGQYDNHGSFGELALMYNTPRAATI-VA	220
Te	326	TPELIAWALDRDTYRHLVMSAIRRRETYIQFLTNIPFLSGLDNYEKLQL	375
Ss	221	TSEGLWGLDRVTFRRIIIVKNNAKKRKMFESFIESVPLLSLEVSRMKI	270
Te	376	ADALSSDEFEPGDYIIRYGEEGEWLYIILEGSVDVV-----GRDDGN-	418
Ss	271	VDVIGEKIYKDGERRITQGEKADSFYIIESGEVSILIKSKTKANKDGGNQ	320
Te	419	EKHVWFEFGKGDHVGLEFLNNHANVADVAKTHVVTAKLNRHFEMCLGP	468
Ss	321	EVEIARCHKGQYFGELALVTNKPRAASAYAVGDVKCLVMDVQAFERLLGP	370
Te	469	VIDVLKRTSQQPNYEYYSKLTTLRAEGRK-----	499
Ss	371	CMDIMKR-----NISHYEEQL---VKMFGSSMDLIDPGQ	401

Figura 6. Alineamiento de secuencias de aminoácidos entre la subunidad R^{II} de corazón de porcino y la proteína de *T. equiperdum* (aislado TeAp-N/D19) que presenta homología con las subunidades R de la PKA.

Los residuos idénticos se muestran con una barra vertical (|), las sustituciones conservadas se muestran con un signo de puntuación de dos puntos (:), y sustituciones semiconservadas están marcadas con un punto (.). La proteína encontrada en *T. equiperdum* contiene 499 residuos de aminoácidos (Calabokis y col., 2016).

Dentro de este grupo de investigación, Lugo (2014)⁷ observó un aumento progresivo de la actividad quinasa en los sobrenadantes y sedimentos de homogenatos de *T. equiperdum* que fueron sometidos previamente a condiciones de estrés metabólico por ausencia de glucosa en intervalos de tiempo entre 15 y 60 minutos (**figura 7**), al utilizar un péptido sintético conocido como kémtido (Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly), el cual sirve como sustrato de la subunidad C de la

PKA de mamíferos. Además también observó que esta actividad kémptido quinasa fue inhibida cuando los parásitos estresados durante una hora volvieron a incubarse en presencia de glucosa por 30 minutos, evidenciando que la glucosa regula directa o indirectamente esta actividad quinasa en *T. equiperdum* (Lugo, 2014).

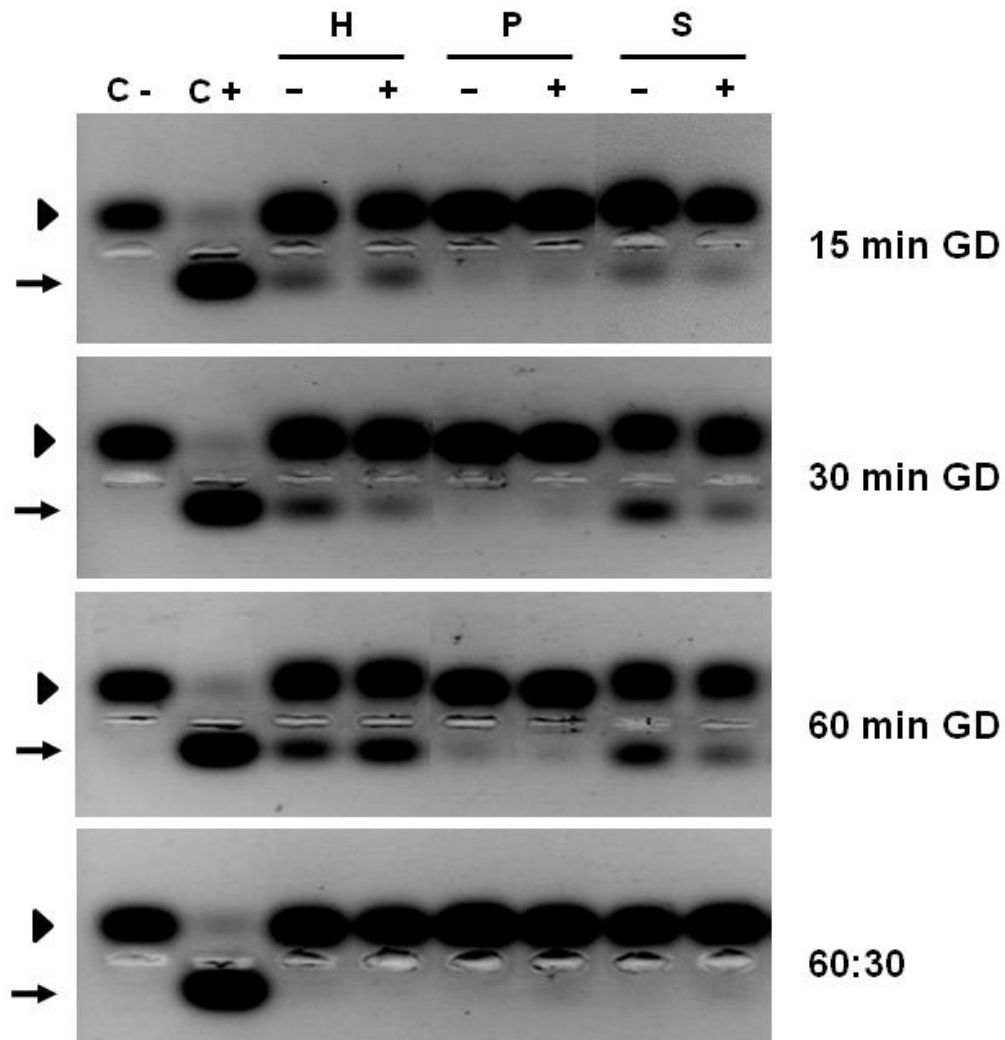


Figura 7. Ensayos quinasas de parásitos de *T. equiperdum* estresados metabólicamente.

Los parásitos fueron sometidos a estrés metabólico por ausencia de glucosa y se midió la actividad quinasa a los 0, 15, 30 y 60. H: homogenato. S: sobrenadante. P: pellet (Tomado de Bubis y col, 2017)

Guevara (2015), por medio de sedimentación en un gradiente de sacarosa seguido de cromatografías consecutivas de intercambio aniónico y exclusión molecular, logró purificar parcialmente una proteína de *T. equiperdum* que presentó una actividad kémptido quinasa. La proteína purificada presentaba un tamaño de aproximadamente 38.11kDa, y su actividad quinasa fue dependiente exclusivamente de Mg²⁺ y ATP (Guevara, 2015).

Hasta los momentos no se tiene un tratamiento efectivo contra la durina. En otros tripanosomatideos como *T. evansi* se han usado drogas como la pentamidina, diamidina y suramina; sin embargo, estas drogas poseen una alta toxicidad para el hospedador y su efectividad está limitada solamente a la fase aguda inicial de la enfermedad, por lo que un prospecto inmediato de un tratamiento efectivo es hasta ahora incierto. Por lo tanto, existe una necesidad de obtener conocimientos fundamentales de las proteínas involucradas en los procesos de señalización celular de *T. equiperdum*, así como sus mecanismos de regulación, con el objetivo de identificar blancos susceptibles para un tratamiento efectivo contra la durina.

Como es sabido, la fosforilación reversible de proteínas es uno de los mecanismos más ampliamente empleados en la integración de señales en células eucariotas, y se ha reportado información acerca de cómo este proceso de fosforilación puede regular procesos fundamentales como el ciclo celular en otros tripanosomatídeos. Además se han identificado proteínas quinasas en estos parásitos que presentan alta homología con la PKA de mamíferos. La purificación de proteínas que presenten actividad quinasa puede dar camino para estudios que puedan caracterizar su actividad y elucidar su mecanismo de acción en el parásito, y así poder desarrollar moléculas o compuestos inhibidores altamente específicos que puedan utilizarse como blancos terapéuticos para tratar a la durina.

Apoyándose en la evidencia de la presencia de proteínas en *T. equiperdum* con actividad quinasa capaces de fosforilar sustratos específicos de la PKA de mamífero, así como la alta homología encontrada, en este proyecto de trabajo

especial de grado se plantea la purificación de proteínas de *T. equiperdum* que presentan homología con la subunidad C de la PKA de mamífero. Para lograr este objetivo, se empleó la estrategia de purificación descrita por Hemmer y colaboradores (1997), promoviendo la formación de complejos holoenzimáticos heterólogos de las proteínas presentes en la fracción soluble de un homogenato de *T. equiperdum* con subunidades R de la PKA de mamífero expresadas en bacterias.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Purificar proteínas de *Trypanosoma equiperdum* que presentan homología con la subunidad catalítica de la PKA de mamífero.

3.2 Objetivo específicos

- Expresar y purificar las mutantes H₆R^Iβ y H₆R^{II}α(R213K) recombinantes de las subunidades reguladoras R^Iβ y R^{II}α de la PKA de mamífero.

- Expandir y purificar parásitos de *Trypanosoma equiperdum* de ratas con la finalidad de obtener extractos totales y separar las fracciones soluble y particulada.

- Purificar proteínas de *Trypanosoma equiperdum* que presentan homología con la subunidad catalítica de la PKA de mamíferos, promoviendo la formación de complejos holoenzimáticos heterólogos con las subunidades reguladoras H₆R^Iβ y H₆R^{II}α(R213K).

- Caracterizar bioquímicamente las proteínas purificadas de *Trypanosoma equiperdum* que presentan homología con la subunidad catalítica de la PKA de mamífero.

4. METODOLOGÍA

4.1. Transformación de bacterias *Escherichia coli* BL21 Star™ (DE3) con los vectores de expresión pRSETB-H₆R^Iβ y el pRSETB- H₆R^{II}α(R213K).

4.1.1 Vectores de expresión.

Los plásmidos utilizados durante este trabajo contienen los genes que codifican para la subunidades H₆R^Iβ de *Homo sapiens* y H₆R^{II}α(R213K) de *Bos taurus*, presentando este último una mutación puntual de Arg a Lys en la posición 213. Estos plásmidos fueron construidos usando el vector de expresión pRSETB (**figura 8**) cuyos genes fueron insertados usando los sitios de restricción *Nde*I en el extremo 5' y *Hind*III en el extremo 3' para el caso de H₆R^Iβ, y *Nco*I en el extremo 5' y *Bst*BI en el extremo 3' para H₆R^{II}α(R213K). Adicionalmente estos plásmidos presentan una secuencia que codifica para una etiqueta de 6 histidinas (poli-histidina), la cual se expresa en el extremo N-terminal de la proteína, y contienen un gen que confiere resistencia para el antibiótico ampicilina.

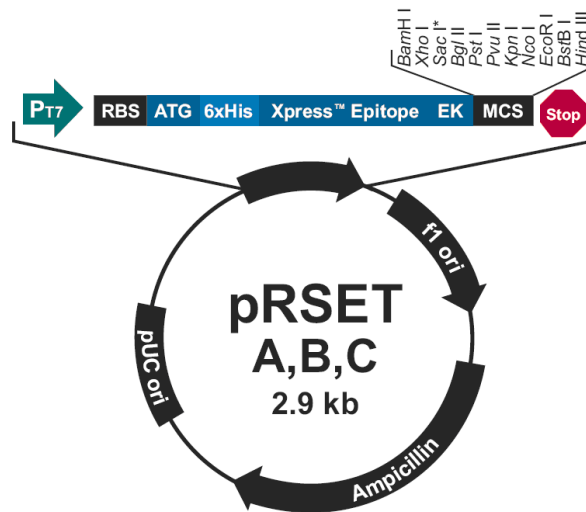


Figura 8. Esquema del mapa del vector de expresión pRSETB.

En el esquema se señala que el vector de expresión presenta un tamaño aproximadamente de 2900 pares de bases. También se señala la región promotora T7 regulada por la ARN polimerasa del bacteriófago T7; los sitios de reconocimiento para diversas enzimas de restricción; y el gen que codifica la resistencia para la ampicilina.

4.1.2. Preparación de células bacterianas *Escherichia coli* BL21 Star™ (DE3) competentes.

Se tenía a disposición bacterias *E. coli* BL21(DE3) (genotipo: *fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHI ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5*) en estado latente almacenadas en glicerol. Estas fueron activadas por su siembra por agotamiento en placas con medio Luria-Bertani o Medio LB (8g/L de Triptona, 5g/L de extracto de levadura, 10g/L de NaCl) con agar al 1,5% y su posterior incubación a 37°C durante 16 horas.

Luego se tomó una colonia activada de la placa y se incubó en Medio LB a 37°C con agitación a 250 rpm durante 16 horas. Este cultivo se diluyó 1:25 en Medio LB y se dejó nuevamente en incubación a 37°C con agitación a 100 rpm hasta que alcanzara una densidad óptica (DO) de ~0,6 (a un $\lambda=600\text{nm}$). Una vez alcanzado este valor de DO el cultivo fue sometido a centrifugación a $6.000 \times g$ a 4°C durante 10 minutos y el sobrenadante fue descartado. El sedimento de células fue resuspendido en 100mM de MgCl_2 frío con la ayuda de una pipeta. Nuevamente se centrifugó bajo las mismas condiciones, el sobrenadante fue descartado y el sedimento fue resuspendido en 100mM de CaCl_2 frío con la ayuda de una pipeta y se dejó incubar la suspensión de células en hielo durante 60 minutos. Se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones y se descartó el sobrenadante y finalmente el sedimento fue resuspendido en un 1/5 del volumen original con 100mM de CaCl_2 obteniendo la suspensión de células bacterianas *E. coli* BL21(DE3) competentes.

4.1.3. Transformación de bacterias *Escherichia coli* BL21 Star™ (DE3) competentes.

Para la transformación de las células *E. coli* BL21(DE3) competentes se mezclaron 200 μl de dichas células en tubos separados con 1 μg de cada plásmido que contiene los genes que codifican para las subunidades $\text{H}_6\text{R}^{\text{I}\beta}$ de *Homo sapiens* y $\text{H}_6\text{R}^{\text{II}\alpha}$ (R213K) de *Bos taurus*. Como control de transformación se dejó

un tubo con solo 200µl de células competentes. Los tubos de reacción se dejaron en incubación durante 20 minutos en hielo y después fueron sometidos a un choque térmico a 42°C por 90 segundos, luego nuevamente se dejaron en incubación en hielo por 2 minutos, y a cada tubo se le agregó 1ml de Medio LB. Se homogenizó por inversión y se dejaron los tubos en incubación a 37°C durante 60 minutos. Los tubos se sometieron a centrifugación a 6.000 x g durante 1 minuto, el sobrenadante fue descartado por inversión quedando el sedimento con una pequeña cantidad de medio. El sedimento fue resuspendido y se sembró por rastrilleo en placas LB con agar al 1,5% y ampicilina (25 µg/ml), las placas se dejaron en incubación a 37°C durante 16 horas.

4.1.4. Aislamiento del ADN plasmídico de las colonias transformadas.

Para confirmar que las bacterias fueron transformadas exitosamente se tomó cada una de las colonias transformadas y se dejaron crecer en Medio LB con Ampicilina (25 µg/ml) durante 16 horas a 37°C. Luego se realizó una dilución del cultivo 1:25 en un volumen final de 25 ml con Medio LB/Ampicilina y se dejaron nuevamente en incubación a 37°C con agitación a 100 rpm hasta que alcanzara una DO ~0,6 (a un $\lambda=600\text{nm}$). Una vez alcanzado este valor de DO el cultivo se centrifugó a 6.000 x g a 4°C durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y los sedimentos fueron resuspendidos mediante agitación con 2ml de solución salina (SS) al 0,85 % y se luego se completó a un volumen final de 10ml con SS. Se centrifugó bajo las mismas condiciones, los sedimentos fueron resuspendidos con 100 µl de Solución I (25mM Tris-HCL, 10mM EDTA, 50mM Glucosa. pH 7,5) y se dejó en incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 200 µl de Solución II (200mM NaOH, 1% SDS), se homogenizó la mezcla por inversión varias veces y se dejó en incubación por 5 minutos en hielo. Se agregó 15µl de Solución III (3M acetato de potasio, 5M ácido acético. pH 4,5) y se dejó incubar en hielo durante 8 minutos. Posteriormente se centrifugó a 16.000 x g por 15 minutos.

Se tomaron los sobrenadantes, se mezclaron por inversión con un volumen igual de una mezcla Cloroformo-Fenol (1:1) y se centrifugó a 16.000 x *g* por 15 minutos. Se tomó con mucho cuidado la fase acuosa, la cual se mezcló con un volumen igual de etanol al 100% y se dejó en incubación en hielo por 10 minutos. Se centrifugó nuevamente a 16.000 x *g* por 15 minutos y el sedimento fue resuspendido en etanol al 70%. Se descartó el sobrenadante dejando secar el sedimento de ADN plásmidico y finalmente este sedimento fue resuspendido en 50µl de tampón TE (1mM EDTA, 10mM Tris-HCl. pH 8,0).

Con el fin de evaluar la integridad estructural del ADN plasmídico-aislado se realizaron corridas electroforéticas en geles de agarosa al 0,8% en tampón Tris-Acetato-EDTA o TAE a 80 voltios durante 25 minutos. Los geles fueron teñidos con SYBR Safe, y se visualizaron en un Transiluminador-UV.

4.1.5. Digestión con enzimas de restricción de los ADN plasmídicos

Los ADN plásmidicos aislados fueron sometidos a la digestión con una enzima de restricción con la finalidad de linearizarlo y determinar su tamaño mediante su separación por electroforesis en geles de agarosa. La enzima utilizada fue *HindIII* ya que el vector de expresión pRSETB posee un sitio de reconocimiento para dicha enzima. Adicionalmente por medio del programa NEBcutter V2.0 se analizó si estaba presente el sitio de reconocimiento en las secuencias de los genes insertados en el vector.

Se mezclaron 0,13 unidades/µl de la enzima *HindIII*, 0,1 µg/µl del tampón correspondiente (10mM Tris-HCl, 250mM NaCl, 0,1mM EDTA, 1mM DTT, 0,5mg/ml BSA, 50% glicerol. pH 7,4) y 0,89 µg/µl del ADN plásmidico para un volumen final de 15µl. Las mezclas se dejaron en incubación a 37°C durante 16 horas, y luego fueron corridas en geles de agarosa al 1,5% en tampón TAE a 80

voltios durante 25 minutos. Los geles fueron teñidos con SYBR Safe, y se visualizaron en un Transiluminador-UV.

4.2. Expresión de las subunidades recombinantes H₆R^Iβ y H₆R^{II}α(R213K) en *Escherichia coli* BL21 StarTM (DE3)

Para evaluar el nivel expresión de las subunidades H₆R^Iβ y H₆R^{II}α(R213K) se tomó una colonia transformada aislada y se incubó en Medio LB con Ampicilina (25 µg/ml) a 37°C con agitación a 250 rpm durante 16 horas. Este cultivo se diluyó 1:25 en Medio LB/Ampicilina y se dejó nuevamente en incubación a 37°C con agitación a 100 rpm hasta que alcanzara una DO de entre 0,5 y 0,8 ($\lambda = 600\text{nm}$). Una vez alcanzado este valor de DO el cultivo fue dividido en dos fracciones: una fracción se utilizó para la expresión agregando isopropil-β-D-1tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1mM, mientras que la otra fracción sirvió de control negativo al cual no se le agregó IPTG. Se tomaron alícuotas de 1ml del cultivo a cada hora después de la inducción durante 5 horas y después de 16 horas. Las alícuotas fueron centrifugadas a 6.000 x g durante 15 minutos a 4°C y los sedimentos se almacenaron a -20°C.

Para determinar la presencia de las proteínas expresadas se realizaron corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida al 12% en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

Una vez determinado cuál de los tiempos de inducción proporcionaba la mayor cantidad de las proteínas expresadas, se repitió el procedimiento descrito en la sección anterior en fiolas de 1 y 2 litros con un 1/3 de su capacidad. Las bacterias inducidas se centrifugaron a 12.000 x g durante 30 minutos a 4°C y los sedimentos se almacenaron a -20°C.

4.3. Purificación de las subunidades recombinantes H₆R^Iβ y H₆R^{II}α(R213K).

Los sedimentos de las bacterias inducidas a macroescala fueron lisados mezclándolos con tampón de lisis (9M Urea, 50mM MES, 200mM NaCl. pH 6,5) a una temperatura de 55°C. Luego de que todo el sedimento fue solubilizado se dializó en tampón de diálisis (50mM Tris-HCl, 100mM NaCl. pH 7,5) usando membranas de diálisis con un rango de exclusión de 12.000-14.000 Da.

El dializado fue centrifugado a 27.000 x *g* y la fracción soluble se dejó en incubación con agitación constante a 4°C durante toda la noche con una resina comercial acoplada a iones Ni²⁺ (ProBond™) previamente equilibrada en tampón de unión nativo (50mM NaH₂PO₄, 500mM NaCl. pH 8,0) en presencia de inhibidores de proteasas (50μM PMSF, 50μM leupeptina, 28 μM TPCK, 28μM TLCK, 1μM pepstatina, 50 μM E-64, 1mM de benzamidina). Luego se realizó el proceso cromatográfico por lotes, para ello la resina se centrifugó a 800 x *g* y se guardó el sobrenadante. Se realizaron lavados de la resina con tampón de lavado nativo (50mM NaH₂PO₄, 500mM NaCl, 20mM Imidazol. pH 8,0). Finalmente, las subunidades recombinantes H₆R^Iβ y H₆R^{II}α(R213K) fueron eluidas con un tampón de elución nativo (50mM NaH₂PO₄, 500mM NaCl, 300mM Imidazol. pH 8,0) recolectando fracciones de 1ml.

4.4. Expansión y purificación de *Trypanosoma equiperdum*.

El aislado original de *T. equiperdum* denominado TeAP-N/D1 con el cual se realizó este trabajo de investigación provino de un caballo infectado del estado Apure, el cual fue expandido en ratas albinas adultas de la cepa Sprague-Dawley y posteriormente criopreservado en nitrógeno líquido mezclando volúmenes iguales de la sangre infectada (100 parásitos/campo) con solución fosfato salino conteniendo glucosa o PBSG (95mM Na₂HPO₄, 5mM NaH₂PO₄, 74mM NaCl, 1% glucosa. pH 8,0) y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO).

Para la expansión de *T. equiperdum* se realizó la infección de ratas adultas (Sprague-Dawley) de alrededor de 300 g con 300 µl de sangre criopreservada con parásitos viables mediante inyección por vía intraperitoneal. La parasitemia fue monitoreada diariamente por medio de análisis directo en un microscopio óptico de la sangre extraída de la cola del animal. Cuando se alcanzaron valores entre 80-100 parásitos/campo se extrajo la sangre por punción cardíaca usando EDTA (500mM, pH 8,0) como anticoagulante. La sangre recolectada fue resuspendida en solución PBSG con el fin de disminuir el estrés metabólico que puedan presentar los parásitos durante el proceso de purificación de los mismos.

La purificación de los parásitos se realizó por medio de una cromatografía de intercambio aniónico usando como fase estacionaria una resina de DEAE-celulosa, de acuerdo a la metodología descrita por Lanham y Godfrey (1970). Para ello la sangre se centrifugó a 3.000 x g durante 15 minutos a 4°C, obteniendo de este proceso de centrifugación tres capas correspondiendo a los componentes sanguíneos: una capa superior con el plasma sanguíneo, una capa intermedia de color blanco donde se encuentran los glóbulos blancos y los parásitos, y una capa inferior de color rojo donde se localizan los glóbulos rojos. Se recolectó la capa en donde se encuentran los glóbulos blancos y los parásitos con mucho cuidado y fue cargada en una columna con la resina DEAE-celulosa previamente equilibrada con una solución de fosfato salino o PBS (193mM Na₂HPO₄, 12,8mM NaH₂PO₄, 142mM NaCl, pH 8,0). Los parásitos fueron eluidos de la resina usando PBSG, y cuando el eluato comenzó a tornarse ligeramente turbio indicando que los parásitos estaban saliendo de la resina se empezaron a recolectar fracciones de 1 ml.

Las eluciones fueron monitoreadas mediante observación directa con microscopio óptico, y se mezclaron todas las fracciones en donde se encontraron los parásitos viables. Se determinó el volumen final y se prosiguió a cuantificar el número de parásitos recolectados por conteo en una cámara de Neubauer. Para el conteo la muestra fue diluida 1:100 y el conteo se realizó en el primer cuadrante

de la cámara. La determinación de la concentración de parásitos se realizó de la siguiente manera:

Número total de parásitos [parásitos/ml] = Número de parásitos contados x 10^4 x Factor de dilución (100) / número de cuadros contados.

Con el fin de obtener parásitos que presentaran estrés nutricional, estos se centrifugaron a $3.000 \times g$ por 15 minutos para separar el PBSG, y el sedimento de parásitos fue resuspendido en solución PBS. Se dejó la suspensión de parásitos en incubación 60 minutos, y finalmente se centrifugó y se descartó el sobrenadante. El sedimento de parásitos estresados fue almacenado a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su posterior uso.

4.5. Purificación de las proteínas de *Trypanosoma equiperdum* que presentan homología con la subunidad catalítica de la PKA de mamífero.

Para esta purificación se tomó el sedimento de parásitos estresados y se homogenizó sonicando a 3 pulsos de 7 W a 4°C , por 30 segundos con pausas de 30 segundos entre los pulsos (Sonic Dismembrator 60 Fisher Scientific), en tampón de lisis (5mM HEPES (pH 7.2), con 1mM de benzamidina, 1mM de PMSF). El lisado fue centrifugado a $39.000 \times g$. El sobrenadante fue incubado en la resina acoplada a iones Ni^{2+} con las subunidades $\text{H}_6\text{R}^{\text{I}}\beta$ y $\text{H}_6\text{R}^{\text{II}}\alpha(\text{R213K})$ unidas en presencia de tampón de unión nativo con 15mM Mg^{2+} y 5mM ATP a 4°C durante 16 horas. Nuevamente el proceso cromatografico se realizó por lotes, centrifugando la resina a $800 \times g$ y guardando el sobrenadante. Luego de los lavados con tampón de unión nativo, se realizó la elución de las proteínas del parásito que interaccionaron con las subunidades $\text{H}_6\text{R}^{\text{I}}\beta$ y $\text{H}_6\text{R}^{\text{II}}\alpha(\text{R213K})$ usando una solución tampón de unión nativo con 5mM de AMPc, y se recolectaron fracciones de 1 ml.

4.6. Determinación de la actividad quinasa de las proteínas de *Trypanosoma equiperdum* purificadas.

La actividad quinasa de las proteínas purificadas se determinó mediante el método cualitativo descrito por Araujo y col. (2016), Para este ensayo se utilizó un heptapéptido sintético (kémptido), el cual posee la secuencia Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly, marcado con fluorescamina. El kémptido usado fue sintetizado en el Laboratorio Nacional de Proteómica e Inmunoquímica de Proteínas-LANPIP del Dr. Oscar Noya del Instituto de Medicina Tropical de la Universidad Central de Venezuela.

El marcaje del kémptido con la fluorescamina se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Lutz y colaboradores (1994). Se tomaron 0,5mg de kémptido y se mezclaron con 900µl de tampón de marcaje (0,4M ácido bórico, 20% glicerol, pH 9.0) y 100µl de fluorescamina (0,0646M en acetona), y la mezcla se dejó en agitación a 37°C durante 16 horas.

Después se realizó un estandarización para determinar la cantidad de kémptido marcado necesaria para observar una señal, para ello se mezclaron 0,5µL, 1µL, 2µL y 3µL del kémptido marcado con 5µL de tampón quinasa 5X (100mM Tris-HCl pH 7.4, 50mM MgCl₂ y 5mM ATP) y 15µl de una muestra que contenía la subunidad C de corazón de cochino aislada y purificada a partir de corazón de cochino por los estudiantes de postgrado que cursaron la asignatura “Laboratorio de Bioquímica de Proteínas y Biología Molecular” en la Universidad Simón Bolívar. Las mezclas de reacción se llevaron a un volumen final de 25µl y se incubaron a temperatura ambiente por 45 minutos. Después de la incubación, las muestras se calentaron a 80 °C durante 5 minutos, y se le añadió a cada una de ellas 1µl de azul de bromofenol al 5% y 2µl de glicerol al 99%. Finalmente, las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1,2% en un tampón de Tris 50mM (pH 8) por 30 minutos a 50V, y los geles fueron visualizados en un transiluminador con luz UV. El kémptido marcado cuando es fosforilado por acción de una quinasa migra hacia el lado positivo de la cámara debido a la presencia del grupo fosfato

cargado negativamente, mientras que si el péptido no es fosforilado no migrará, quedando en el bolsillo de carga el gel.

Una vez determinada la cantidad de péptido marcada a usar, se evaluó la presencia de actividad quinasa en cada una de las fracciones eluídas. Como control negativo se corrieron mezclas a las cuales no se les adicionó muestra, y como control positivo se incluyó una muestra que contenía la subunidad C de corazón de cochino.

4.7. Procedimientos generales.

4.7.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).

Las proteínas obtenidas durante los procesos de purificación fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS. Los geles fueron preparados con un espesor de 1,5mm y una concentración de poliacrilamida de 1 %. Las muestras se mezclaron con una solución tampón de carga (25mM Tris-HCl, 6% glicerol, 6% SDS, 6% β -mercaptoetanol y 0.01% azul de bromofenol), posteriormente fueron calentadas a 100°C durante 5 minutos y se sembraron en los bolsillos del gel. Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo en presencia de un tampón de corrida (25mM tris pH 8.3, 192mM glicina y 0,1% SDS), y los geles fueron coloreados con azul de Coomassie al 0.25% para la visualización de las bandas polipeptídicas,

4.7.2 Electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa e Inmunotincion o Western Blot.

Las proteínas luego de ser corridas previamente por SDS-PAGE fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa de poro 0.45 μ m, en una cámara de transferencia semiseca a 400mA, durante 75 minutos, en presencia de un tampón de transferencia (25mM Tris-HCl (pH 8.3), 192mM glicina y 20% metanol)

de acuerdo al procedimiento descrito por Towbin. La confirmación de que las proteínas fueron transferidas a la membrana de nitrocelulosa se realizó por la tinción reversible con una solución de Rojo de Ponceau S (0,2% de rojo Ponceau S, 30% ácido 5-sulfosalicílico, 30% ácido tricloroacético) (Towbin y col., 1979).

Las membranas de nitrocelulosa con las proteínas electrotransferidas fueron bloqueadas durante 1 h con solución TBST (50mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 0.5% Tween 20), con 5% de leche descremada. La detección de las bandas polipeptídicas se llevó a cabo incubando las membranas con el anticuerpo primario correspondiente durante 1 hora con agitación continua. Las membranas se lavaron 3 veces con TBST durante 15 min cada lavado. Luego se incubó con el anticuerpo secundario Anti-IgG conjugado con fosfatasa alcalina durante 1 hora, con agitación continua. Nuevamente, se realizó el proceso de lavado de las membranas y las bandas polipeptídicas que fueron reconocidas por el anticuerpo primario se visualizaron por la adición de solución al 0.5mg/mL de azul de nitrotetrazolio (NBT) (0.5mg/mL) y 0.25mg/mL de 5-bromo, 4-cloro, 3-indolilfosfato (BCIP) disueltos en un tampón AP (100mM Tris pH 9.5, 100mM NaCl, 2mM MgCl₂).

4.7.3 Determinación de concentración de proteínas mediante técnica colorimétrica de Bradford.

La cuantificación de proteínas de las muestras obtenidas se realizó mediante el método colorimétrico de Bradford, utilizando 10µl de muestra y 20 µl del reactivo de Bradford (Biorad) diluido 1:4 con agua destilada en una placa de ELISA. Se dejaron las mezclas incubando durante 5 minutos en oscuridad y se midió la absorbancia en un lector de placas de Elisa usando $\lambda=595$ nm. La curva de calibración fue realizada empleando albúmina de suero bovino (BSA) (Bradford, 1979).

4.8. Análisis bioinformático

Se emplearon herramientas de los servidores: T-Coffee y BLAST (<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/all.html> y <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para realizar una comparación entre las secuencias aminoacídicas de: a) las tres proteínas de *T. evansi* que presentan homología con las subunidades catalíticas de la PKA de mamíferos, PKAC1, PKAC2 y PKC3, b) las tres proteínas homologas presentes en *T. brucei*, c) dos proteínas homologas de *T. equiperdum*, y d) las tres isoformas de la subunidad catalíticas de la PKA de *H. sapiens*, C α , C β y C γ . Los alineamientos se realizaron con el fin de conocer si entre estas secuencias existían regiones conservadas, así como para evaluar cambios, inserciones y/o deleciones aminoacídicas

Las secuencias para las proteínas de *T. evansi* y *T. brucei* que presentan homología con las subunidades catalíticas de la PKA de mamífero fueron obtenidas de la base de datos virtual TritrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>). Las secuencias analizadas para *T. evansi* de las isoformas 1, 2 y 3 corresponden a los números de acceso **TevSTIB805.9.7920**, **TevSTIB805.9.7870** y **TevSTIB805.10.13650**, respectivamente. Para *T. brucei* las isoformas 1, 2 y 3 corresponden a los números de acceso **Tb927.9.11100**, **Tb927.9.11030** y **Tb927.10.13010**. Las secuencias de las tres isoformas de la subunidad catalítica de la PKA de *H. sapiens* fueron obtenidas de la base de datos virtual de proteínas Uniprot (<https://www.uniprot.org/>): Isoforma alpha (**P17612**), Isoforma beta (**P22694**) e Isoforma gamma (**P22612**). En el caso de las secuencias para *T. equiperdum*, estas fueron obtenidas de la base de datos del proyecto del genoma de *T. equiperdum* publicado por Hébert y col, (2017) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/wgs/?val=CZPT02#contigs>) bajo los números de acceso **SCU68910.1** y **SCU64246.1**.

5. RESULTADOS

5.1. Transformación de bacterias *Escherichia coli* BL21 Star™ (DE3) con los vectores de expresión pRSETB-H₆R^Iβ y pRSETB-H₆R^{II}α (R213k)

Las bacterias *E. coli* BL21 (DE3) que estaban almacenadas en glicerol y se encontraban en estado latente fueron reactivadas luego de ser sembradas por agotamiento en placas con medio LB. Posteriormente, las bacterias fueron transformadas con los plásmidos pRSETB-H₆R^Iβ y pRSETB-H₆R^{II}α(R213K). Una vez realizado este paso se prosiguió a aislar los ADN plasmídicos por lisis alcalina y se analizaron por medio de electroforesis en un gel de agarosa para evaluar su integridad como se muestra en la **figura 9**. En los **carriles 1 y 2** correspondientes a los ADN plasmídicos aislados de las bacterias transformadas con pRSETB-H₆R^Iβ y pRSETB-H₆R^{II}α(R213K), respectivamente, se pueden observar dos bandas, las cuales corresponden a las formas superenrollada y lineal de longitud completa de los ADN plasmídicos.

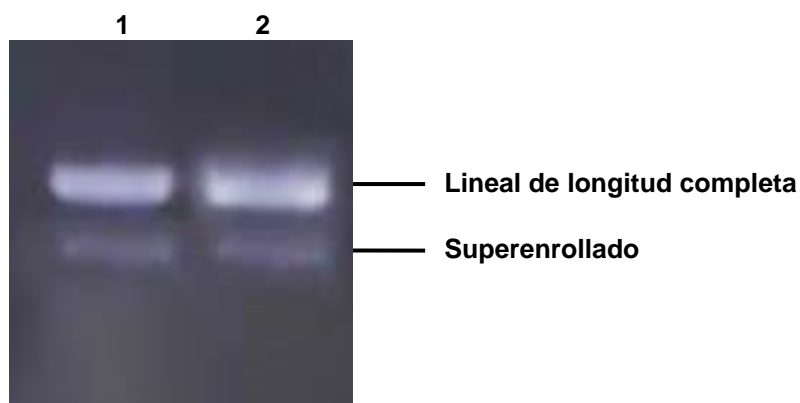


Figura 9. Análisis electroforético de la evaluación de la integridad de los ADN plasmídicos aislados.

Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% teñido con SYBR Safe, En el gel se corrieron las siguientes muestras: **1:** ADN plasmídico asilado de las bacterias transformadas con pRSETB-H₆R^Iβ. **2:** ADN plasmídico asilado de las bacterias transformadas con pRSETB-H₆R^{II}α(R213K).

Los ADN plásmidicos aislados fueron sometidos a una digestión con la enzima de restricción *Hind*III con el fin de linealizarlos y conocer sus tamaños, y de esta forma verificar la presencia de dicho plásmidos. El vector de expresión pRSETB presenta un solo sitio de reconocimiento para esta enzima, el cual fue determinado mediante el uso del programa NEBcutter V2.0. Adicionalmente, se determinó que las secuencias nucleotídicas de los genes que codifican para las proteínas H₆R^Iβ y H₆R^{II}α(R213K) no presentan sitios de reconocimiento para la enzima de restricción usada. Con este análisis se esperaba obtener ADN plásmidicos con tamaños de 4.975 pares de bases para pRSETB-H₆R^Iβ y 3.480 pares de bases para pRSETB-H₆R^{II}α(R213K). La **figura 10** muestra la corrida electroforética en gel de agarosa al 1,5% del análisis de los productos de digestión para pRSETB-H₆R^Iβ (**carril 2**) y H₆R^{II}α(R213K) (**carril 3**), los cuales migraron en el gel aproximadamente igual a los tamaños de pares de bases esperados cuando se comparan con el marcador de tamaño molecular (**carril 1**)

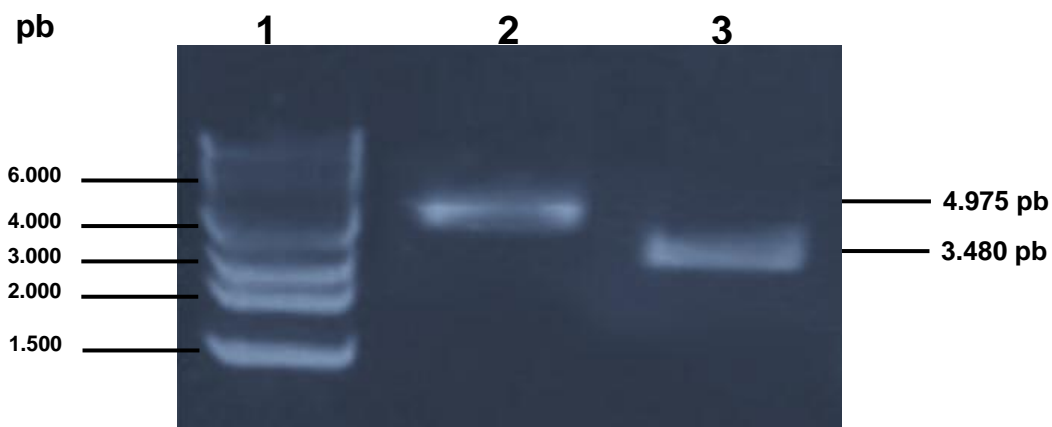


Figura 10. Análisis electroforético de los productos de digestión de los ADN plásmidicos aislados con la enzima de restricción *Hind*III.

Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñido con SYBR Safe, En el gel se corrieron las siguientes muestras: **1:** marcador de tamaño molecular de 10.000 pb. **2:** producto de digestión de pRSETB-H₆R^Iβ. **3:** producto de digestión de pRSETB-H₆R^{II}α(R213K).

5.2. Expresión de *Escherichia coli* BL21 Star™ (DE3) de las subunidades recombinantes H₆R^Iβ y H₆R^{II}α(R213K).

Se realizaron ensayos de expresión de las proteínas recombinante a microescala a 35°C, con el fin de evaluar si las mismas se expresaban correctamente en el sistema bacteriano, así como para determinar el tiempo en el cual se expresaba la mayor cantidad de proteína. Las **figura 11** y **12** muestran los perfiles proteicos a través del tiempo de los lisados de las bacterias transformadas con los plásmidos pRSETB-H₆R^Iβ y pRSETB-H₆R^{II}α(R213K), respectivamente, las cuales fueron crecidas en presencia (**paneles A**) y en ausencia (**paneles B**) de IPTG.

Se puede apreciar en los perfiles proteicos de los cultivos a los que se le agregó IPTG la aparición de una banda polipeptídica con una masa molecular aparente de aproximadamente 55kDa, la cual es señalada con una flecha roja. En el caso de las bacterias que sobreexpresaron a H₆R^Iβ (**figura 11, panel A, carril 9**), la banda polipeptídica que pudiera corresponder a la proteína migro con un Rf cercano al de la subunidad RII de la PKA de corazón de cochino usada como control. Mientras que en el caso de H₆R^{II}α(R213K) (**figura 12, panel A, carril 9**), la banda polipeptídica presenta un Rf más cercano al control, por tratarse también de una subunidad R tipo II. También se aprecia que esta banda en ambos casos aumenta su intensidad en el transcurso del tiempo, llegando a observarse una mayor cantidad de la proteína en las bacterias que se dejaron en inducción durante 16 horas (**carriles 9**).

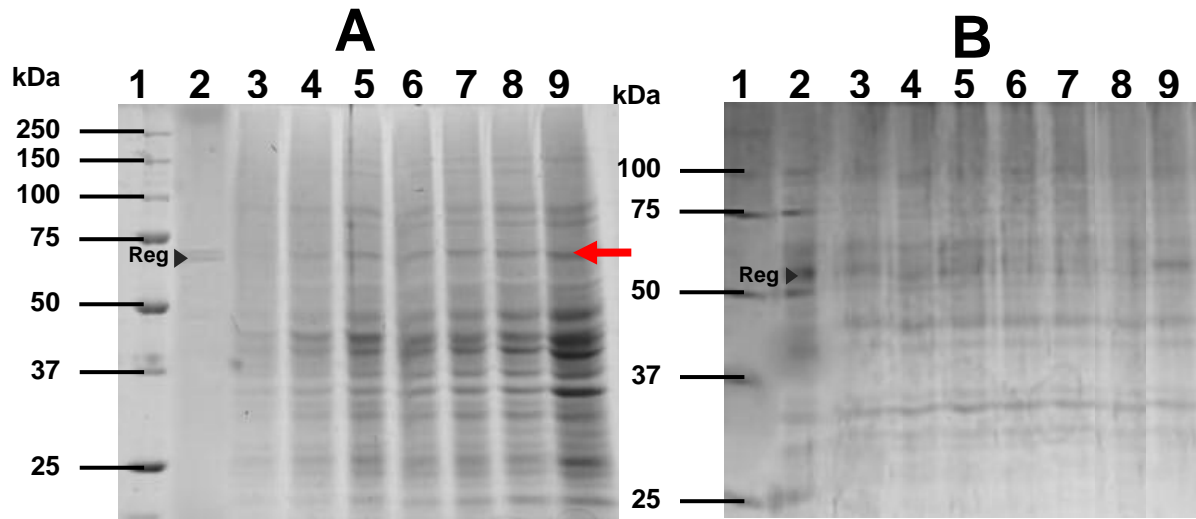


Figura 11. Perfil proteico del ensayo de expresión a diferentes tiempos de las bacterias transformadas con pRSETB-H₆R'β.

Electroforesis SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie de los lisados bacterianos de un cultivo en presencia (A) y en ausencia (B) de IPTG. 1: marcador de peso molecular (BIO-RAD). 2: subunidad reguladora de corazón de cochino. 3-9: muestras tomadas en los tiempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 16 horas después de IPTG.

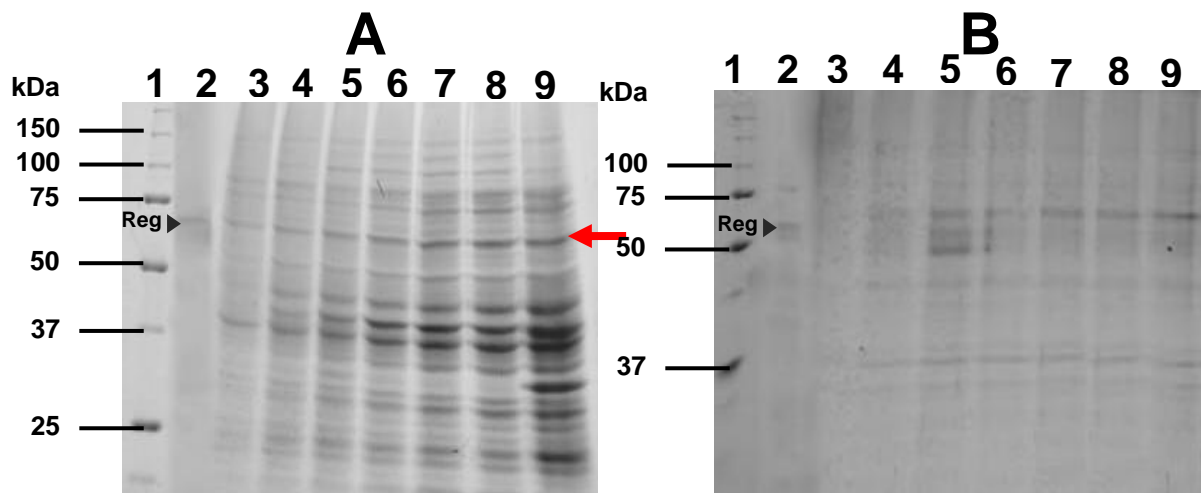


Figura 12. Perfil proteico del ensayo de expresión a diferentes tiempos de las bacterias transformadas con pRSETB-H₆R''α(R213K).

Electroforesis SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie de los lisados bacterianos de un cultivo en presencia (A) y en ausencia (B) de IPTG. 1: marcador de peso molecular (BIO-RAD). 2: subunidad reguladora de corazón de cochino. 3-9: muestras tomadas en los tiempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 16 horas después de IPTG.

Para corroborar que estas bandas correspondieran a las subunidades reguladoras de interés, las proteínas corridas en los geles de poliacrilamida fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa, y posteriormente se realizó una inmunodetección usando un anticuerpo primario Anti- α -PHSR recombinante de *T. equiperdum* (1:500) de ratón y un anticuerpo secundario Anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (1:1000). Este ensayo logró confirmar que las bandas de masa molecular aparente de 55kDa que fueron apareciendo a lo largo del tiempo durante la inducción con IPTG efectivamente correspondían a las subunidades reguladoras, como se muestra en la **figura 13**.

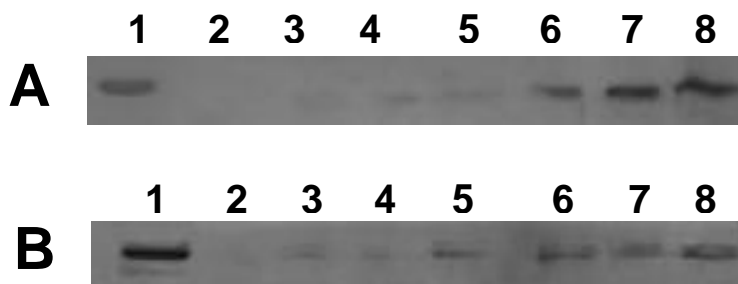


Figura 13. Western blot de los perfiles proteicos del ensayo de expresión con IPTG a diferentes tiempos de las bacterias transformadas con pRSETB-H₆R^β y pRSETB-H₆R^α(R213K).

Electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa de los perfiles proteicos de las bacterias transformadas con pRSETB-H₆R^β (**A**) y pRSETB-H₆R^α(R213K) (**B**) corridos en geles al 12% de poliacrilamida. Inmunomarcaje con anticuerpo primario Anti- α -PHSR recombinante de *T. equiperdum* (1:500) de ratón y anticuerpo secundario Anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (1:1000). **1:** sub-R de PKA de corazón de cochino; **2:** muestras tomada al momento de agregar IPTG. **3-7:** muestras tomadas cada hora durante 5 horas. **8:** muestra tomada después de 16 horas.

5.3. Purificación de las subunidades recombinantes H₆R^β y H₆R^α(R213K).

Las subunidades H₆R^β y H₆R^α(R213K) recombinantes fueron purificadas lisando las bacterias en presencia de urea 9M a una temperatura de 50°C. La urea fue removida por diálisis, y la fracción soluble del dializado resultante se incubó en una resina de iones inmovilizados de Ni²⁺ durante 16 horas a 4°C para promover

la unión de las proteínas recombinantes con la resina por medio de su etiqueta de poli-histidina. Las proteínas fueron eluidas de la resina en lote en fracciones de 1ml con imidazol a 300mM y fueron analizadas mediante corridas electroforéticas en geles de poli-acrilamida al 12% y su tinción con azul de Coomassie mostrado en los **paneles A** de las **figuras 14 y 15**. En las eluciones obtenidas (**carriles 8-10**) de las dos purificaciones se puede observar una banda polipeptídica mayoritaria con una masa molecular aparente de aproximadamente 55kDa indicada con una flecha roja, que migra nuevamente con el mismo Rf que el de una subunidad reguladora control. También se observa la presencia de la misma banda en los lavados con 20mM (**carriles 6**) y 50mM (**carriles 7**) de imidazol, mostrando la pérdida de proteína en los lavados iniciales empleando bajas concentraciones de imidazol.

El ensayo de Western blot usando el anticuerpo primario Anti- α -PHSR recombinante de *T. equiperdum* permitió confirmar que las bandas polipeptídica presentes en mayor cantidad de las eluciones obtenidas se trataban de las subunidades reguladoras recombinantes expresadas, como se observa en el **panel B** de las **figuras 14 y 15**. En el Western blot se evidenció el reconocimiento por parte del anticuerpo de otras bandas de polipeptídica con masas moleculares aparentes de menor tamaño, tanto en el proceso de purificación de H₆R^I β como con el de H₆R^{II} α (R213K). La presencia de estas bandas de menor masa molecular probablemente indiquen que las subunidades H₆R^I β y H₆R^{II} α (R213K) sufrieron degradaciones durante el proceso de purificación.

La tinción de proteínas con azul de Coomassie (**figuras 14 y 15, panel A**) muestra que las subunidades reguladoras obtenidas no fueron purificadas a homogeneidad, sino que se obtuvieron fracciones altamente enriquecidas con la proteína de interés. Esto es debido a que se pueden observar todavía unas pocas bandas polipeptídicas contaminantes.

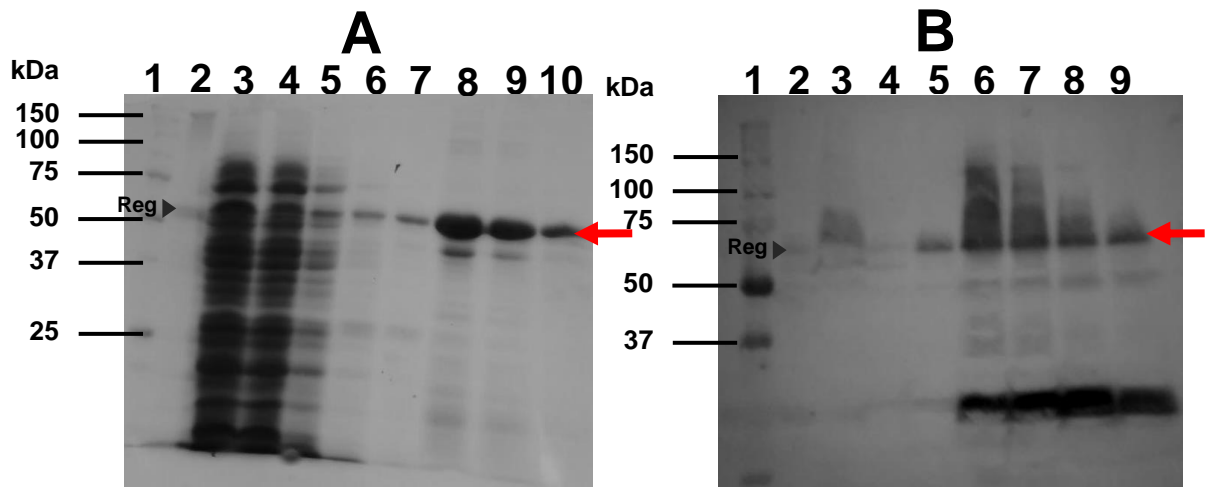


Figura 14. Análisis del proceso de purificación de H₆R¹β por medio de cromatografía de afinidad de metales inmovilizados con resina acoplada a iones níquel Ni²⁺.

(A) Electroforesis en gel al 12% de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie. 3: Dializado. 4: Lo que no se unió a la resina. 5: Lavado 1 con buffer nativo. 6: Lavado 1 con 20mM imidazol. 7: Lavado 1 con 50mM imidazol. 8-10: Eluciones con 300mM imidazol. (B) Electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa e inmunotinción con anticuerpo primario Anti-α-PHSR recombinante de *T. equiperdum* (1:500) de ratón y anticuerpo secundario Anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (1:1000). 3: Dializado. 4: Lavado 3 con 20mM. 5: Lavado 3 con 50mM. 6-9: Eluciones con 300mM imidazol

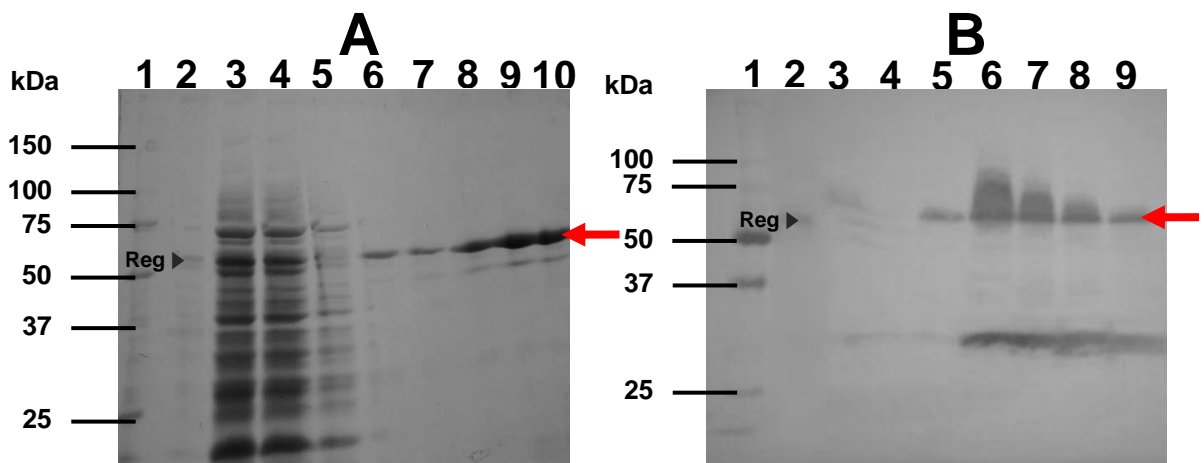


Figura 15. Análisis del proceso de purificación de H6R11α(R213K) por medio de cromatografía de afinidad de metales inmovilizados con resina acoplada a iones níquel Ni²⁺.

(A) Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% teñido con Azul de Coomassie. 3: Dializado. 4: Lo que no se unió a la resina. 5: Lavado 1 con buffer nativo. 6: Lavado 1 con 20mM imidazol. 7: Lavado 1 con 50mM imidazol. 8-10: Eluciones con 300 mMimidazol. (B) Electrotransferencia a

membranas de nitrocelulosa e inmunotinción con anticuerpo primario Anti- α -PHSR recombinante de *T. equiperdum* (1:500) de ratón y anticuerpo secundario Anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (1:1000). **3:** Dializado. **4:** Lavado 3 con 20mM. **5:** Lavado 3 con 50mM. **6-9:** Eluciones con 300mM imidazol

Mediante el método de cuantificación de proteínas por Bradford (1976) se estimó la concentración de proteínas totales de cada una de las eluciones (**tabla 1**). En ambos procesos de purificación se muestra que se obtuvo una mayor concentración de proteínas totales en las segundas eluciones. En estos procesos de purificación se logró obtener una mayor cantidad de proteína en el caso de la purificación de H₆R^I β , 8,4 mg de proteína por litro de cultivo bacteriano, dando un mayor rendimiento que en caso de la purificación de H₆R^{II} α (R213K) con la cual se obtuvo 6,66 mg de proteína por litro de cultivo.

Tabla 1. Cuantificación de proteínas totales de las eluciones obtenidas de la purificación de H₆R^I β y H₆R^{II} α (R213K).

El cálculo de las concentración de proteínas se realizó usando una curva de calibración ($y = 0,0369x + 0,0085$, $R^2 = 0,9933$) con un patrón de BSA (1 mg/ml).

Eluciones	Volumen final de elución	Concentración final (mg/ml)	Cantidad total (mg) por elución	Cantidad total (mg) por litro de cultivo
E1 H ₆ R ^I β	1 ml	2,04	2,04	8,4
E2 H ₆ R ^I β		3,39	3,39	
E3 H ₆ R ^I β		1,77	1,77	
E4 H ₆ R ^I β		1,20	1,20	
E1 H ₆ R ^{II} α (R213K)	1 ml	1,63	1,63	6,66
E2 H ₆ R ^{II} α (R213K)		2,29	2,29	
E3 H ₆ R ^{II} α (R213K)		1,49	1,49	
E4 H ₆ R ^{II} α (R213K)		1,25	1,25	

Adicionalmente, para poder corroborar que la H₆R^I β purificada correspondiera a una subunidad R tipo I se realizó un ensayo que consistió en correr en un gel de poliacrilamida la subunidad H₆R^I β purificada (**figura 16**), en presencia (**carril 3**) y ausencia (**carril 8**) de β -mercaptoetanol. Ya que las subunidades R tipo I pueden formar enlaces disulfuros intermoleculares, estas pueden dimerizar, lo que se puede detectar mediante una corrida electroforética en ausencia del agente reductor. Por esta razón se esperaba que H₆R^I β en

ausencia de β -mercaptoetanol migrara con un Rf menor, correspondiente al doble de su masa molecular, es decir, se esperaba la aparición de una banda de aproximadamente 110kDa. Sin embargo, en la figura 16 se puede observar una banda que presenta una masa molecular aparente dentro del rango esperado, de aproximadamente 150kDa.

Este resultado ratifica que la proteína $H_6R^I\beta$ purificada es capaz de oligomerizar y generar dímeros u formas de mayor número de entidades.

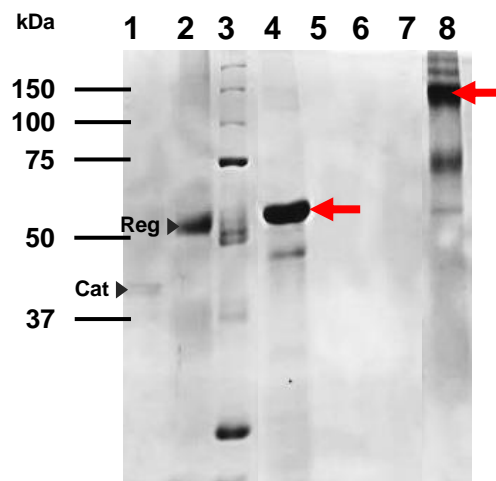


Figura 16. Ensayo para determinar la dimerización de la subunidad $H_6R^I\beta$ recombinante purificada.

Gel de poliacrilamida al 12% teñido con Azul de Coomassie. **1:** Subunidad catalítica de la PKA de corazón de cochino. **2:** Subunidad reguladora de la PKA de corazón de cochino **3:** Patrón de masas moleculares (BIO-RAD). **4:** $H_6R^I\beta$ corrida en presencia de β -mercaptoetanol. **8:** $H_6R^I\beta$ corrida en ausencia de β -mercaptoetanol. **5-7:** carriles vacíos.

5.4. Purificación de las proteínas de *Trypanosoma equiperdum* que presentan homología con las subunidades catalíticas de la PKA de mamífero.

La obtención de los parásitos se logró mediante la infección y expansión de estos en ratas albinas *Sprague-Dawley* a partir de criopreservados del aislado TeAP-N/D1 de *T. equiperdum*. A partir de aproximadamente 70 ml de sangre proveniente de 3 ratas infectadas se obtuvo una cantidad de $1,15 \times 10^9$ parásitos.

Los parásitos fueron homogenizados por sonicación y se separaron las fracciones soluble y particulada del lisado por centrifugación. La fracción soluble se incubó en presencia de ATP y Mg^{2+} durante 16 horas en resinas acopladas a Ni^{2+} que tenían unidas a ellas las subunidades $H_6R^I\beta$ y $H_6R^{II}\alpha(R213K)$ purificadas anteriormente, con el fin de promover la formación de los complejos holoenzima de las proteínas presentes en el lisado de parásitos con las subunidades reguladores recombinantes unidas a la resina.

Se realizaron eluciones de 1ml en lotes con AMPc las cuales fueron corridas en geles de poliacrilamida al 12% como se muestra en la **figura 17**. Los **carriles 2 y 3** muestran las eluciones obtenidas de $H_6R^I\beta$, mientras que los **carriles 5 y 6** son de las eluciones obtenidas de $H_6R^{II}\alpha(R213K)$. En todas las eluciones se puede apreciar que se purificaron distintas bandas polipéptidicas de diferentes masas moleculares aparentes que van desde los 30kDa hasta los 100kDa, sin embargo, una banda de aproximadamente 55kDa es la que se presenta en mayor cantidad en todas las eluciones. También se observa que se obtuvo una mayor cantidad de proteínas de las eluciones usando la resina unida a $H_6R^{II}\alpha(R213K)$ con respecto a $H_6R^I\beta$ como evidencia la tinción con azul de Coomassie.

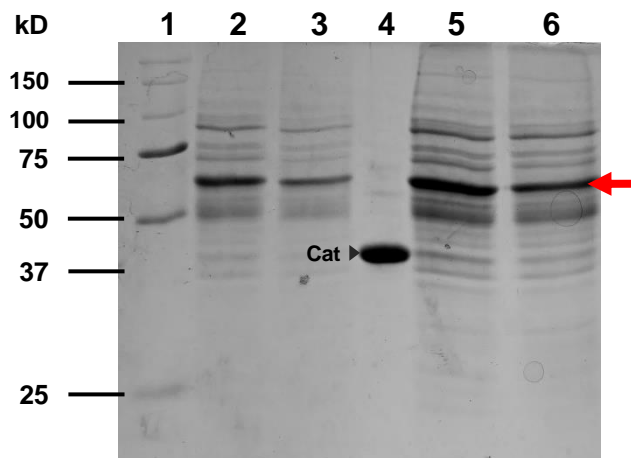


Figura 17. Análisis del proceso de purificación de las proteínas de la fracción soluble de *T. equiperdum* mediante cromatografía de afinidad.

Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% teñido con Azul de Coomassie de la eluciones obtenidas usando resina de Ni^{2+} unida con $H_6R^I\beta$ (**2 y 3**) y con $H_6R^{II}\alpha(R213K)$ (**5 y 6**). **1**: marcador de peso molecular (BIO-RAD). **4**: subunidad catalítica purificada de corazón de cochino.

Como la banda que se encuentra en mayor cantidad en todas las eluciones presenta una masa molecular igual a la de las subunidades R de la PKA de mamífero, se evaluó si las fracciones obtenidas de las separaciones cromatográficas contenían la correspondiente subunidad R recombinante, la cual pudo haberse despegado de las columnas durante las eluciones. Se realizó un Western blot usando anticuerpos primarios α -PHSR recombinante de *T. equiperdum* los cuales no detectaron ninguna proteína, por lo que las eluciones obtenidas no presentaron dichas subunidades (**figura 18**). Al realizar nuevamente la inmunotinción pero con anticuerpos primarios contra la subunidad C de la PKA de mamífero, fueron detectadas bandas de masa molecular aparente de 37-39kDa y de 55kDa mayoritariamente como muestra la **figura 19**

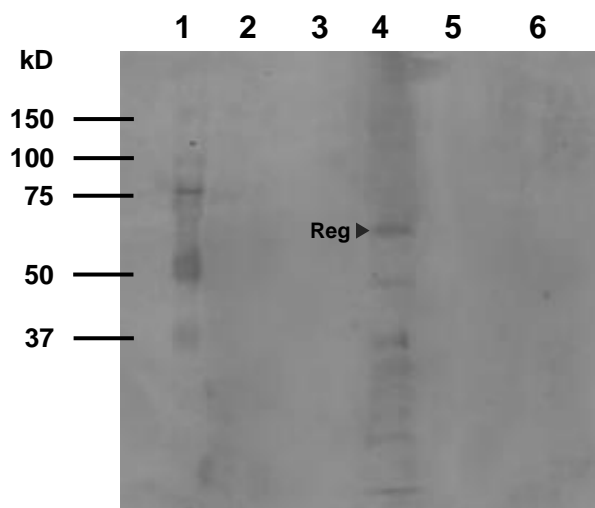


Figura 18. Análisis de Western blot para determinar la posible contaminación con la sub-R recombinante durante la purificación de las proteínas de la fracción soluble de *T. equiperdum*.

Electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa e inmunotinción con anticuerpo primario Anti- α -PHSR recombinante de *T. equiperdum* (1:500) de ratón y anticuerpo secundario Anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (1:1000). **1:** marcador de paso molecular (BIO-RAD). **2-3:** eluciones obtenidas usando resina de Ni^{2+} unida con $\text{H}_6\text{R}^1\beta$. **4:** sub-R de la PKA de corazón de cochino. **5-6:** eluciones obtenidas usando resina de Ni^{2+} unida con $\text{H}_6\text{R}^1\alpha(\text{R}213\text{K})$.

La cuantificación de proteínas mediante la técnica de Bradford (1976) determinó que se obtuvieron a partir de un lisado de $1,15 \times 10^9$ parásitos una cantidad de proteínas totales de 224,57mg de los cuales se lograron obtener 1,36mg de proteínas que potencialmente interaccionaron con H_6R^{β} ; y 1,95mg de proteínas que potencialmente interaccionaron $H_6R^{\alpha}(R213K)$. En la **tabla 2** se resumen los valores de concentración y cantidad de proteínas tanto del lisado de los parásitos como de las eluciones obtenidas, así como también el cálculo de los rendimientos obtenidos con respecto a la cantidad de proteínas totales del lisado y con respecto a la cantidad de proteínas totales de la primera fracción soluble.

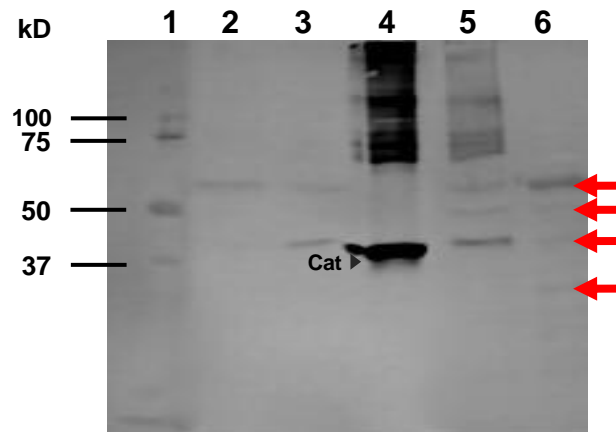


Figura 19. Análisis de Western blot para la detección de proteínas homologas a la sub-C de la PKA de mamífero de la purificación de la fracción soluble de *T. equiperdum*.

Electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa e inmunotinción con anticuerpo primario Anti-Sub-C (1:500) de conejo y anticuerpo secundario Anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (1:1000). **1:** marcador de paso molecular (BIO-RAP). **2-3:** eluciones obtenidas usando resina de Ni^{2+} unida con H_6R^{β} . **4:** sub-C de la PKA de corazón de cochino. **5-6:** eluciones obtenidas usando resina de Ni^{2+} unida con $H_6R^{\alpha}(R213K)$.

Tabla 2. Cuantificación del rendimiento de proteínas de *T. equiperdum* purificadas con la resina acoplada a Ni²⁺unida con H₆R^Iβ y H₆R^{II}α(R213K).

El cálculo de las concentración de proteínas se realizó usando una curva de calibración ($y = 0,0369x + 0,0085$, $R^2 = 0,9933$) con un patrón de BSA (1mg/ml).

Parásitos (1,15x10 ⁹ parásitos)	Volumen final de elución	Concentración final (mg/ml)	Cantidad total por elución (mg)	
Lisado inicial	25 ml	8,98	224,57	
Sobrenadante 1	25 ml	6,81	173,35	
Sedimento 1	12 ml	3,70	44,44	
Sobrenadante 2	12 ml	4,07	48,89	

Eluciones	Volumen final de elución	Concentración final (mg/ml)	Cantidad total por elución (mg)	Cantidad total (mg) por litro de cultivo
E1 H ₆ R ^I β	1 ml	0,77	0,77	1,36
E2 H ₆ R ^I β		0,59	0,59	
E1 H ₆ R ^{II} α(R213K)		1,16	1,16	1,95
E2 H ₆ R ^{II} α(R213K)		0,79	0,79	
Rendimiento				
Eluciones	Con respecto al lisado inicial		Con respecto al sobrenadante 1	
H ₆ R ^I β	0,006%		0,007%	
H ₆ R ^{II} α(R213K)	0,008%		0,011%	

5.5. Determinación de la actividad quinasa en geles de agarosa de las proteínas purificadas de *Trypanosoma equiperdum* que presentan homología con las subunidades catalíticas de la PKA de mamífero.

Finalmente se realizó la caracterización bioquímica de las eluciones obtenidas para determinar si presentan una actividad quinasa. Para ello se usó un ensayo que aprovecha la función de las quinasas de fosforilar a sus proteínas blanco por reconocimiento de una secuencia consenso. Como sustrato se utilizó un heptapéptido sintético conocido como kémptido. Previamente se realizó el marcaje del kémptido. Luego se realizó una estandarización simple para determinar la cantidad de kémptido marcado a utilizar, como se muestra en la **figura 20**, donde se usó en todas las pruebas una subunidad catalítica de la PKA de corazón de cochino. A partir del uso de 3μl de kémptido marcado se obtiene

una señal distinguible de la migración del kémptido en el gel de agarosa, indicativo de la actividad quinasa.

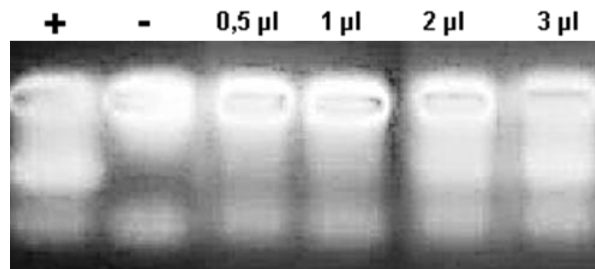


Figura 20. Estandarización del ensayo quinasa.

Gel de agarosa al 1.2% visualizado en luz UV. **1:** control positivo con kémptido disponible en el laboratorio. **2:** control negativo. **3:** 0,5µl de kémptido. **4:** 1µl de kémptido. **5:** 2µl de kémptido. **6:** 3µl de kémptido.

Al evaluar la actividad quinasa de los diferentes pasos del proceso de purificación de H₆R^{II}α(R213K) (**figura 21**) se puede observar una leve actividad quinasa en el lisado inicial de los parásitos como en los sobrenadantes y sedimentos, la baja actividad quinasa en todas estas fracciones pueden deberse a que sobrenadantes y sedimentos se encontraban diluidos. Ya al evaluar la actividad en las eluciones se puede detectar la presencia de una actividad quinasa de mayor intensidad, aunque sigue siendo baja en comparación al control positivo.

En el caso de las eluciones del proceso de purificación de las proteínas de *T. equiperdum* con H₆R^Iβ (**figura 22**) su actividad quinasa no fue evaluada inmediatamente después de obtener las fracciones como en el caso de la purificación con H₆R^{II}α(R213K), y al momento de realizar el ensayo no se observó ninguna señal indicativa de que hubo una fosforilación del kémptido. Nuevamente al medir la actividad quinasa de las eluciones con H₆R^{II}α(R213K) está también se perdió.

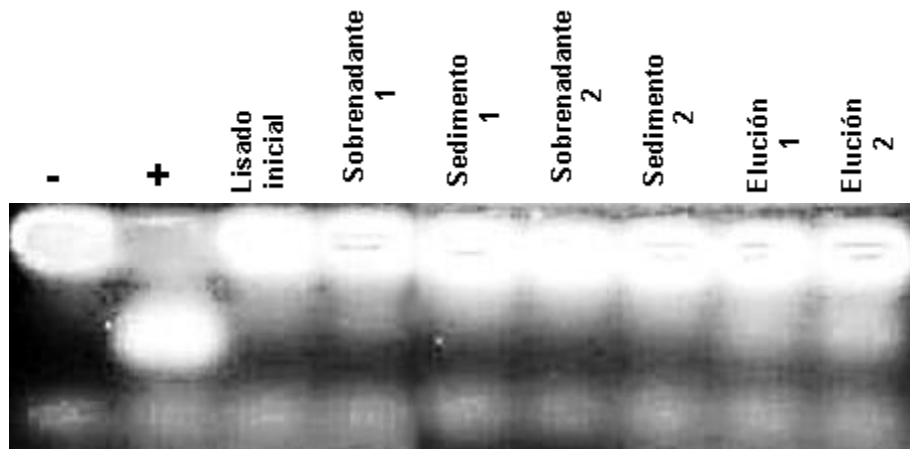


Figura 21. Evaluación de la actividad quinasa de la purificación de las proteínas de *T. equiperdum* eluidas con la resina de Ni²⁺ unida con H₆R^α(R213K).

Gel de agarosa al 1,2% visualizado en luz UV. 1: control positivo. 2: control negativo. 3: lisado inicial de parásitos. 4: sobrenadante 1. 5: sedimento 1. 6: sobrenadante 2. 7: sedimento 2. 8. Elución 1. 9. Elución 2.

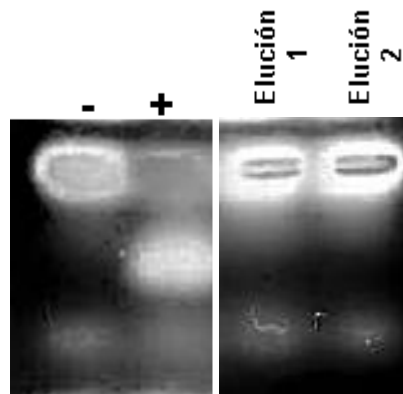


Figura 22. Evaluación de la actividad quinasa de la purificación de las proteínas de *T. equiperdum* eluidas con la resina de Ni²⁺ unida con H₆R^β(R213K).

Gel de agarosa al 1,2% visualizado en luz UV. 1: control positivo. 2: control negativo. 3: Elución 1. 4 Elución 2.

5.6. Análisis bioinformático.

Se realizó un análisis de identidad entre las tres isoformas de las proteínas de *T. evansi* que presentan homología con las subunidades C de la PKA de mamífero (**TevSTIB805.9.7920**, **TevSTIB805.9.7870**, **TevSTIB805.10.13650**) y sus contrapartes de *T. brucei*, (**Tb927.9.11100**, **Tb927.9.11030**, **Tb927.10.13010**) encontrándose que las isoformas 1, 2 y 3 tanto de *T. evansi* como de *T. brucei* presentan casi un 100% de identidad.

En una búsqueda dentro del primer bosquejo del genoma de *T. equiperdum* recientemente publicado (Hébert y col., 2017), se encontraron dos proteínas que presentan 100% de identidad con respecto a las isoformas 2 y 3 de *T. evansi* y *T. brucei* que presentan homología con las subunidades C de la PKA de mamífero, las cuales corresponden a los números de acceso **SCU68910.1** y **SCU64246.1**. Al comparar estas dos isoformas encontradas en *T. equiperdum* con las tres isoformas de la subunidad catalítica de la PKA de *H. sapiens* (**P17612**, **P22694**, **P22612**) se observó que estas arrojaron valores de identidad en promedio del 50%. En la **tabla 3** se resume el análisis de identidad realizado.

El alineamiento múltiple de estas 2 isoformas de *T. equiperdum* y las 3 isoformas C α , C β y C γ de la PKA de *H. sapiens* (**figura 23**), muestra una baja homología entre las proteínas de *T. equiperdum* y las de *H. sapiens* hacia los extremos amino y carboxilo terminal, al igual que en una pequeña región central de las secuencias. En el resto del alineamiento se muestra una alta homología al presentarse diversos aminoácidos que son idénticos tanto en las secuencias de *T. brucei* con respecto a las de *H. sapiens*, indicado con asteriscos (*), como también sustituciones aminoacídicas conservativas, indicado con dos puntos (:), o semi-conservativas, indicado con un punto (.). Los espacios vacíos indican las deleciones que ocurren entre las secuencias alineadas.

Tabla 3. Análisis de identidad de las 3 isoforma de las proteína con homología a la subunidad C de la PKA de mamífero de *T. evansi* y *T. brucei* y las 3 isoformas de la subunidad C de la PKA de *H. sapiens*.

Secuencia A	Secuencia B	Query cover	Valor E	% de Identidad Secuencia A:B
<i>T. evansi</i> PKAC1	<i>T. brucei</i> PKAC1	100%	0.0	99%
<i>T. evansi</i> PKAC1	<i>T. brucei</i> PKAC2	97%	0.0	97%
<i>T. evansi</i> PKAC1	<i>T. brucei</i> PKAC3	98%	5e-157	61%
<i>T. evansi</i> PKAC2	<i>T. brucei</i> PKAC1	96%	0.0	97%
<i>T. evansi</i> PKAC2	<i>T. brucei</i> PKAC2	100%	0.0	99%
<i>T. evansi</i> PKAC2	<i>T. brucei</i> PKAC3	96%	e-156	60%
<i>T. evansi</i> PKAC3	<i>T. brucei</i> PKAC1	97%	5e-157	61%
<i>T. evansi</i> PKAC3	<i>T. brucei</i> PKAC2	96%	8e-156	60%
<i>T. evansi</i> PKAC3	<i>T. brucei</i> PKAC3	100%	0.0	100%
<i>T. evansi</i> PKAC1	<i>T. equiperdum</i> PKAC1	97%	0.0	97%
<i>T. evansi</i> PKAC1	<i>T. equiperdum</i> PKAC2	98%	5e-157	91%
<i>T. evansi</i> PKAC 2	<i>T. equiperdum</i> PKAC1	100%	0.0	99%
<i>T. evansi</i> PKAC 2	<i>T. equiperdum</i> PKAC2	96%	8e-156	60%
<i>T. evansi</i> PKAC 3	<i>T. equiperdum</i> PKAC1	96%	8e-156	60%
<i>T. evansi</i> PKAC 3	<i>T. equiperdum</i> PKAC2	100%	0.0	100%
<i>H. sapiens</i> PKAC α	<i>T. equiperdum</i> PKAC1	85%	3e-127	55%
<i>H. sapiens</i> PKAC α	<i>T. equiperdum</i> PKAC2	83%	2e-121	52%
<i>H. sapiens</i> PKAC β	<i>T. equiperdum</i> PKAC1	85%	3e-126	54%
<i>H. sapiens</i> PKAC β	<i>T. equiperdum</i> PKAC2	83%	2e-124	53%
<i>H. sapiens</i> PKAC γ	<i>T. equiperdum</i> PKAC1	86%	2e-116	50%
<i>H. sapiens</i> PKAC γ	<i>T. equiperdum</i> PKAC2	81%	3e-113	50%

6. DISCUSIÓN

La fosforilación reversible de proteínas es un proceso que ocurre tanto en organismos procarióticos como eucarióticos, en el cual están implicadas un tipo particular de enzimas denominadas proteínas quinasas (Su y col., 1995; Hunter, 1995). Debido al papel de las quinasas en los procesos de señalización dentro de las células, es importante estudiarlas para comprender los mecanismos de regulación de estas proteínas, ya que si bien, estas están presentes en la mayoría de los organismos y presentan dominios catalíticos altamente conservados, también existen variaciones en sus mecanismos de regulación relacionado a diferencias en regiones dentro de sus secuencias aminoacídicas.

En el caso de los tripanosomatídeos se han encontrado una gran cantidad de genes que codifican para proteínas quinasas, ya que cerca del 2% del genoma en el caso de *T. brucei*, *T. cruzi* y *Leishmania*, posee información codificante para proteínas con alta homología a las quinasas presentes en organismos eucarióticos superiores. Esto claramente es un indicativo de que en los tripanosomatídeos las proteínas quinasas cumplen un papel importante en la regulación de los procesos de señalización celular (Parsons y col., 2005).

En este trabajo se purificaron proteínas que presentan actividad quinasa, a partir de fracciones solubles de *T. equiperdum*, tomando ventaja de la posibilidad de que interaccionaran con subunidades R recombinantes de la PKA de mamífero unidas a resinas acopladas con iones Ni^{2+} .

Con el fin de lograr este objetivo se transformaron bacterias *E. coli* BL21(D3) con los plásmidos pRSETB-H₆R^Iβ y pRSETB-H₆R^{II}α(R213K), los cuales tienen insertados los genes que codifican para las subunidades reguladoras H₆R^Iβ y R^{II}α(R213K) conteniendo una etiqueta de 6 residuos de histidinas en su N-terminal. Los genes codificantes para estas subunidades fueron previamente clonados e insertados en el vector de expresión pRSETB, este vector permite la expresión de los genes clonados que se hallan adyacentes al promotor T7, el cual es regulado por la ARN polimerasa del bacteriófago T7, que se encuentra bajo el

control *transcripcional* del promotor lacUV5. Gracias a esto se logró inducir la expresión de las subunidades H₆R^β y H₆R^α(R213K) en bacterias *E coli* BL21(DE3), adicionando al medio de cultivo un análogo no hidrolizable de la lactosa, el IPTG. La cantidad de proteínas expresadas fue optimizada al hacer uso de la cepa *E. coli* BL21(D3), gracias a que esta es defectiva en las proteasas OmpT y Lon, involucradas en la degradación de proteínas (Baneyx, F, 1999; Tabor y Richardson, 1985)

Generalmente, durante los ensayos de expresión de proteínas recombinantes es necesario evaluar la solubilidad de las mismas, ya que en muchos casos cuando las bacterias son forzadas a sobreexpresar proteínas en altas concentraciones, pueden llegarse a formar cuerpos de inclusión, los cuales son agregados citoplasmáticos insolubles causados por el plegamiento incorrecto de las proteínas (Lilie y col., 1998; Kopito, 2000). En este trabajo, se lograron establecer condiciones óptimas para la expresión de las subunidades H₆R^β y H₆R^α(R213K) en bacterias *E coli* BL21(DE3).

Una de las formas de extraer la mayor cantidad de proteínas sobreexpresadas en bacterias, aun cuando hayan llegado a formar cuerpos de inclusión, es el uso de agentes desnaturalizantes que permiten solubilizar los agregados proteicos precipitados, para luego renaturalizar la proteína a su forma activa. En este caso se utilizó la urea como agente desnaturalizante y solubilizante, ya que se ha demostrado que las subunidades reguladoras de la PKA de mamíferos pueden ser renaturalizadas luego de ser desnaturalizadas con altas concentraciones de urea, conservando todas sus propiedades cinéticas (Builder y col., 1980). Por este motivo durante los ensayo de expresión de las subunidades H₆R^β y H₆R^α(R213K) no fue evaluada su solubilidad.

Los registros fotográficos de los geles de poliacrilamida muestran que luego de la inducción con IPTG aparecieron bandas polipeptídicas con masas moleculares aparentes de aproximadamente 55kDa, tamaño correspondiente con las masas moleculares para los monómeros de las subunidades R^β y R^α

reportadas en otros trabajos (Foss y col., 1994; Solberg y col., 1994; Skålhegg y col., 1992; Calabokis y col., 2016; Grozdova y col., 1994)

Se realizaron análisis de Western blot empleando un anticuerpo contra una proteína recombinante de *Trypanosoma equiperdum* (cepa TeAp-N/D1) que presenta homología con las subunidades reguladoras de la PKA de mamífero (PHSR), con el cual se ha demostrado anteriormente que es capaz de reconocer a las proteínas nativas del parásito y a sus homólogos de mamíferos (Calabokis y col., 2016). Estos análisis lograron confirmar que H₆R^Iβ y H₆R^{II}α(R213K) se estaban expresando correctamente.

La purificación de las subunidades reguladoras H₆R^Iβ y H₆R^{II}α(R213K) fue llevada a cabo incubando la fracción soluble de las bacterias solubilizadas con urea y posteriormente dializada, con resinas acopladas a iones Ni²⁺. Esto con el fin de permitir la interacción de las subunidades reguladoras H₆R^Iβ y H₆R^{II}α(R213K), las cuales presentan una cola de poli-histidina en el extremo N-terminal, con los iones Ni²⁺ de la resina. Los lavados con concentraciones de 20mM y 50mM de imidazol permitieron eliminar las macromoléculas del extracto bacteriano que no se enlazaron a la resina, así como las interacciones inespecíficas que pudieron generarse entre la resina y las proteínas de la fracción soluble bacteriana.

La elución de las proteínas enlazadas se logró mediante lavados con concentraciones de 300mM de imidazol, permitiendo la obtención de fracciones enriquecidas con las proteínas recombinantes H₆R^Iβ y H₆R^{II}α(R213K), presentando masas moleculares aparente de aproximadamente 5kDa como muestran los análisis electroforéticos, correspondiendo nuevamente al tamaño de los monómeros de las subunidades reguladoras de la PKA de mamífero. El posterior análisis de Western blot con el anticuerpo Anti-α-PHSR recombinante de *T. equiperdum* logró confirmar que estas bandas correspondían a las subunidades reguladoras recombinantes. Sin embargo, los anticuerpos también revelaron la presencia de bandas polipeptídicas con masas moleculares aparentes menores, hecho que da a entender que hubo degradación de las subunidades H₆R^Iβ y H₆R^{II}α(R213K) durante los pasos de expresión y la purificación. Esta degradación

pudo deberse a que las subunidades reguladoras de la PKA de mamíferos poseen un sitio que es muy susceptible a degradación por proteasas, presente en la región bisagra ubicada hacia el extremo N-terminal (Potter y col., 1978; Potter y Taylor, 1980). Se obtuvieron rendimientos de 8,4mg de H₆R^Iβ y 6,66mg de H₆R^{II}α(R213K) por litro de cultivo bacteriano. Estos rendimientos son considerables, a pesar de ser menores a los reportados por Saraswat y col. (1988), quienes lograron obtener 15mg por litro de cultivo.

Se realizó una corrida electroforética de la H₆R^Iβ purificada en presencia y ausencia del β-mercaptoetanol, para corroborar que se trataba de una subunidad R tipo I. Este ensayo se basó en que existe una diferencia entre las subunidades R tipo I y II en el modo en cómo los monómeros se unen entre sí para formar el dímero. En las tipo II los dos monómeros se unen únicamente mediante enlaces no covalentes, mientras que en las tipo I se establecen, además de los enlaces de tipo no covalente, dos puentes disulfuro antiparalelos, en los que participan dos cisteínas de la región N-terminal de cada monómero (Zick y Taylor, 1982; Bubis y col., 1987). Esto permite diferenciar a ambas subunidades R comparando su movilidad en una electroforesis en presencia y ausencia del agente reductor (Solberget y col., 1994; León y col., 1997; Díaz-Enrichet y col., 2003). Como fue el caso se observó efectivamente esta diferencia de migración de la H₆R^Iβ pasando de una masa molecular aparente de aproximadamente 55kDa en presencia de β-mercaptoetanol a una de alrededor de 150kDa en ausencia de β-mercaptoetanol. Dado que la subunidad R^Iβ posee 4 residuos de Cys en su región de dimerización y anclaje, es posible que esta proteína tenga la posibilidad de formar oligómeros mayores a dímeros en ausencia del agente reductor, por ejemplo trímeros o tetrámeros, lo cual explicaría el mayor tamaño de la banda observada.

Otro ensayo que se puede llevar a cabo para la diferenciación de las isoformas R^{II}α y R^{II}β es mediante la evaluación de la diferencia en migración electroforética de sus formas fosforiladas y no fosforiladas. Las subunidad R tipo II pueden ser fosforiladas por la subunidad C en un residuo de serina fosforilable dentro del sitio inhibitor, a diferencia de las subunidad R tipo I que posee una

alanina en vez de la serina y por lo tanto no puede ser fosforilada. Al separar electroforéticamente la forma fosforilada y no fosforilada de la sub-R11 α se observa una doble banda de 55kDa y 57kDa, mientras que, en el caso de la subunidad R11 β se observa una única banda (Robinson-Steiner et al., 1984; Skalhegget y col., 1992).

Por medio de una resina cromatográfica de DEAE celulosa se lograron purificar parásitos de *T. equiperdum* proveniente de sangre infectada de ratas. Estos parásitos fueron sometidos a estrés nutricional al privarlos de glucosa por una hora, ya que como se demostró originalmente en el trabajo de Lugo (2014), hay un aumento de la actividad quinasa de los parásitos bajo estas condiciones. Un ensayo quinasa de la fracción soluble del lisado de los parásitos permitió confirmar los hallazgos descritos por Lugo (2014) y que también fueron replicados previamente por Guevara (2015) y Escalona (2017).

A partir de los parásitos purificados, se obtuvo la fracción soluble del homogenato celular de *T. equiperdum* mediante sonicación. Esta fracción soluble se incubó en las resinas acopladas a Ni²⁺ con H₆R1 β y H₆R11 α (R213K) unidas a ellas en presencia de Mg²⁺ y ATP. Luego de los lavados de la resina, las proteínas de *T. equiperdum* que interaccionaron con H₆R1 β y H₆R11 α (R213K) fueron eluidas con 2mM de AMPc obteniendo diversas bandas polipeptídicas con masas moleculares aparentes entre 35kDa y 100kDa, sin embargo, llamó mucho la atención una banda de aproximadamente 55kDa que se encontraba en mayor cantidad tanto en la purificación usando a H₆R1 β como con H₆R11 α (R213K). El Western blot usando anticuerpos Anti- α -PHSR recombinante de *T. equiperdum* permitieron observar que las fracciones obtenidas no presentaban subunidades reguladoras que se pudieron haber desacoplado de la resina de Ni²⁺. Como ya se había comprobado que anticuerpos Anti-sub-C de la PKA de mamífero son capaces de reconocer a proteínas quinasa homologas en *T. evansi* (Calabokis, 2008) se realizó un ensayo de Western blot empleando estos anticuerpos en las fracciones obtenidas, y se logró detectar una banda principal de 55kDa, y en menor cantidad se observaron otras bandas entre 30kDa y 40kDa.

Estas fracciones obtenidas fueron sometidas a un ensayo quinasa cualitativo, en el cual se evaluó si existía la presencia de proteínas capaces de fosforilar un sustrato, képtido, con la secuencia consenso de reconocimientos de las PKA de mamíferos. Este ensayo reveló que las eluciones obtenidas con H₆R^{II}α(R213K) lograron fosforilar al sustrato, dando evidencia de que una proteína quinasa de la fracción soluble del extracto de *T. equiperdum* interaccionó con H₆R^{II}α(R213K) de mamífero. Sin embargo esta señal fue de menor intensidad en comparación con el control del ensayo, que en este caso fue una sub-C de la PKA de corazón de cochino. Las eluciones obtenidas con H₆R^Iβ no fueron evaluadas en el instante en que se obtuvieron como si fue el caso de con H₆R^{II}α(R213K), y el momento de realizar el ensayo no se detectó ningún indicio de actividad quinasa, a pesar de que inicialmente si se detectó actividad en la fracción soluble de donde se comenzó la purificación. Nuevamente se evaluó la actividad quinasa de las fracciones obtenidas con H₆R^{II}α(R213K), y en este caso tampoco se logró detectar actividad quinasa alguna, ocurriendo lo mismo con la fracción soluble del parásito de partida donde inicialmente también se detectó actividad. Esto probablemente indica que la proteína con actividad quinasa extraída de *T. equiperdum* es inestable bajo las condiciones en la que fue purificada.

En *T. equiperdum* se ha clonado, expresado y purificado una proteína que presenta homología con la subunidad reguladora de la PKA de mamíferos (Bubis y col., 2018). Realizando un alineamiento de esta proteína homóloga de *T. equiperdum* contra la subunidad RI de mamífero, se ha encontrado que ambas presenta una alta homología en la secuencia de inhibición (IS), la cual está implicada en parte en la interacción con la subunidad catalítica (Calabokis y col., 2016). Esta alta homología entre estas regiones IS de la PKAR de *T. equiperdum* y la PKA-RI de humano apoyan la teoría de la posibilidad de interacción que puede ocurrir entre subunidades catalíticas homólogas del parásito con subunidades reguladoras de la PKA de mamíferos.

Al comparar la secuencias aminoacídicas por medio de alineamientos y BLAST de las isoformas reportadas de las proteínas de *T. brucei*, *T. evansi* y *T.*

equiperdum que son homologas a la sub-C de la PKA de mamífero, se encontró un alto porcentaje de similitud (cerca del 100%). Esto es otra prueba de la estrecha cercanía filogenética entre estas especies, apoyando la teoría de que tanto *T. evansi* como *T. equiperdum* evolucionaron a partir de *T. brucei* (Desquesnes y col., 2013). Dado que en el genoma hasta ahora descrito de *T. equiperdum* se han encontrado solo dos de las tres isoformas de la PKAC de *T. brucei* y *T. evansi*, para los siguientes análisis fueron usadas las secuencias de *T. brucei*, ya que probablemente la tercera isoforma también se encuentre presente en *T. equiperdum*.

Al realizar un análisis en el alineamiento de secuencias entre las tres isoformas de la PKAC de *T. brucei* con la sub-C α de humano (**figura 24**), se evidencia la presencia de aminoácidos (flechas verdes) en la sub-C α que se han descrito que están implicadas en la interacción con la subunidad R, los cuales se encuentran conservados en las tres isoformas de la proteína que presenta homología con la PKA de mamífero de *T. brucei*, y por ende, también deben estar presentes en *T. equiperdum*, análisis que apoya la posible interacción entre subunidad C α de la PKA de mamífero y las isoformas de la proteína homóloga de *T. brucei*.

Entre estos aminoácidos está el Glu127, conservado entre las tres isoformas de la PKAC de *T. brucei*, este aminoácido se encuentra en el segmento de unión de lóbulos acotado entre el aminoácido 120 hasta el 128 (sombreado naranja) en la sub-C α , y se ha descrito que establece un enlace con la ribosa del ATP y también interacciona con la Arg de la posición -3 del péptido sustrato. La arginina de la posición -2 de la secuencia consenso de reconocimiento, establece enlaces iónicos con el Glu170 y Glu230, altamente conservados en el parásito también. En el caso de la arginina de la posición -6 del sitio de alta afinidad de la subunidad R de la PKA de mamífero, establece un enlace con el Glu203, también conservado. Además, dentro de la región denominada bucle P+1 (sombreado en morado) de la subunidad C α , el cual proporciona una superficie hidrofóbica de anclaje para el aminoácido P+1 de la secuencia consenso del péptido/proteína sustrato de la

PKA, se ha descrito que la Leu de la posición +1 en el caso del péptido inhibidor PKI se posiciona en este bolsillo hidrofóbico conformado por las cadenas laterales de los aminoácidos Leu198, Pro202, Glu203 y Leu205, todos conservados en las tres isoformas de la PKAC de *T. brucei* (Smith y col., 1999)

También se realizó una comparación de los aminoácidos que pueden ser fosforilados en la sub-C α . Estos aminoácidos son la Ser10, Ser139, Thr197 y Ser338 (flechas rojas) (Yonemoto y col., 1993). Se encontró que tanto la Ser139 y la Ser338, están sustituidas por prolinas en las proteínas del parásito, a pesar de que la fosforilación de la Ser338 en las proteínas de mamíferos parece ser importante para que la enzima adquiera su conformación activa (Iyeret y col., 2005). No se encontró ningún aminoácido en *T. brucei* equivalente para la Ser10 de la subunidad C α . Se sabe que la fosforilación de la Thr197 es absolutamente necesaria para que la enzima sea catalíticamente activa, y de manera interesante, este residuo se encuentra conservado en las tres isoformas de *T. brucei* que presentan homología con la subunidad catalítica de la PKA de mamífero (Steinberg y col., 1993; Adams y col., 1995; Yonemoto et al., 1997; Cheng y col., 2005; 2006; Iyer et al., 2005; Kornev y col., 2006),

También se observaron en el alineamiento, regiones y aminoácidos en la sub-C α que están relacionados con la unión del Mg²⁺ y ATP, y que se encuentran conservados en las tres proteínas homologas de *T. brucei*. Como es el caso de la Tyr330 (flecha azul), que interacciona tanto con el ATP como con la Arg de la posición -3 del péptido sustrato (Narayanaet y col., 1997). También se observa la presencia del denominado bucle rico en glicinas (Gly50-Thr-Gly-Ser-Phe-Gly55) (sombreado azul claro), cuyos aminoácidos también se encuentran conservados en *T. brucei*, los cuales son importantes para la orientación adecuada de los fosfatos del ATP. La Lys72 (flecha azul) conservada en la mayoría de las proteína quinasas, y también en las de *T. brucei*, interacciona directamente con los fosfatos del ATP, y se ha visto que su sustitución genera una enzima inactiva y no fosforilada (Iyeret y col., 2005). Además, en el trabajo de Guevara (2015) se observó que una proteína con actividad quinasa purificada a partir de la fracción

soluble de *T. equiperdum* por medio de cromatografías de intercambio aniónico y exclusión molecular presentaba actividad ATP:fosfotransferasa dependiente únicamente de Mg^{2+} y de ATP, a diferencia de la PKA de mamífero que puede realizar esta actividad al utilizar GTP, Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} y Fe^{2+} como sustratos (Guevara 2015).

Se realizó una búsqueda de proteínas definidas como quinasas en el bosquejo publicado de *T. equiperdum* (Hébert y col., 2017) encontrándose un total de 114 proteínas. De esas 114 proteínas se seleccionaron las proteínas que mediante el cálculo de su peso molecular estuvieran dentro del rango de 30-60kDa, y de acuerdo a los tamaños de las masas moleculares aparentes de las proteínas que fueron purificadas de la fracción soluble de *T. equiperdum* que interaccionaron con las subunidades H_6R^{β} y $H_6R^{\alpha}(R213K)$, se encontraron un total de 46 proteínas potenciales. De estas 46 proteínas, 15 poseían masas moleculares entre 50-58kDa, por lo que pudieran corresponder a la banda polipeptídica de 55kDa presente en mayor cantidad en las eluciones obtenidas durante la purificación. Sin embargo, al realizar un análisis BLAST de estas 15 proteínas quinasas encontradas en *T. equiperdum* y comparándolas con las subunidades catalíticas de la PKA de mamífero como con las tres isoformas homologas reportadas para *T. brucei*, se calcularon valores de similitud por debajo del 20%.

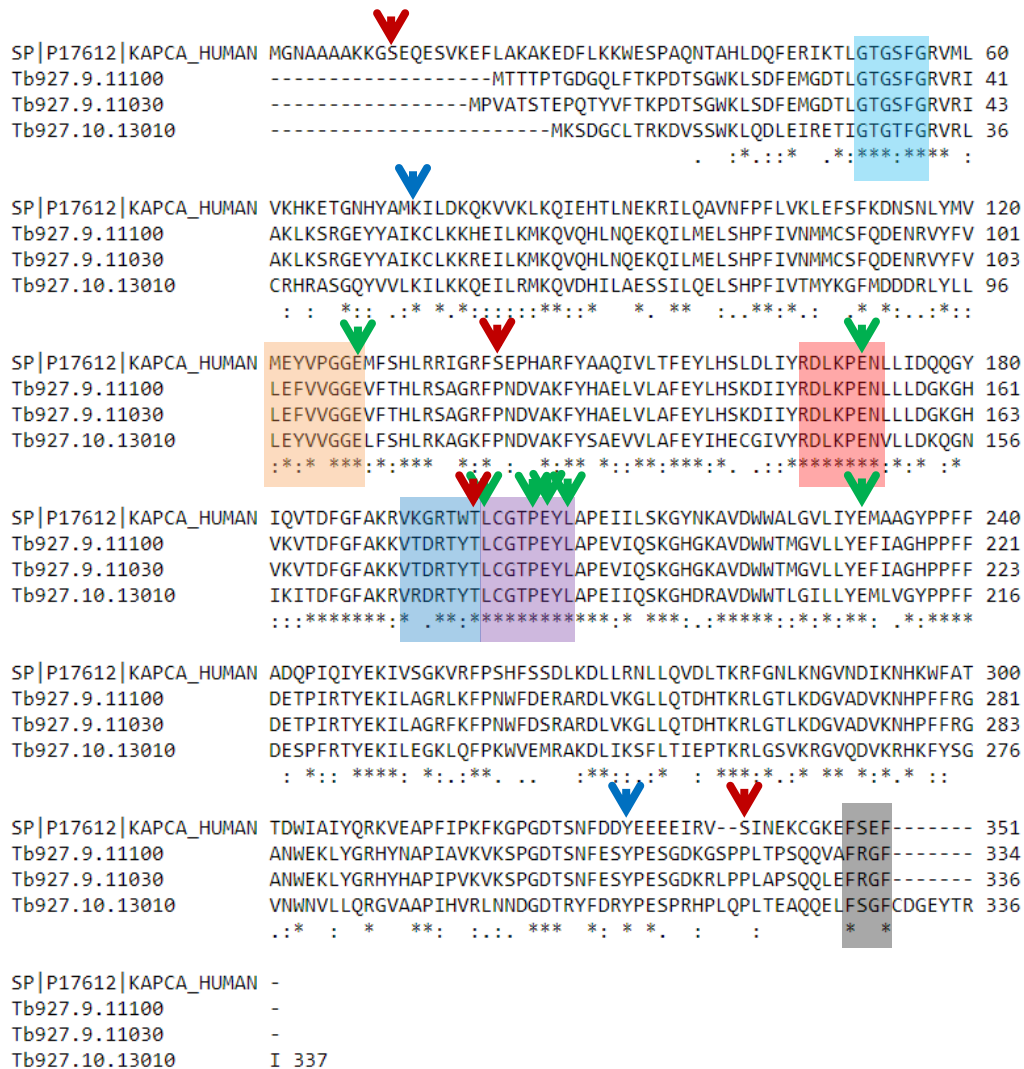


Figura 24. Alineamiento de la subunidad C α de la PKA de mamífero con las tres isodormas de la proteína con homología a la PKA de mamífero de *T. brucei*

Región sombreada en rojo: bucle catalítico. **Región sombreada en azul oscuro:** bucle de activación. **Región sombreada en morado:** bucle p+1. **Región sombreada en naranja:** segmento de unión de lóbulos. **Región sombreada en azul claro:** bucle rico en glicina. **Región sombreada en negro:** casquete hidrofóbico. **Cuadro rojo:** centro catalítico. **Flechas rojas:** aminoácidos fosforilables. **Flechas azules:** aminoácidos importantes en la unión con el ATP. **Flechas verdes:** aminoácidos implicados en la unión al sustrato.

Realizando el mismo análisis con el resto de las 46 proteínas de *T. equiperdum*, se encontraron dos proteínas que presentaron 100% de homología con las isoformas 2 y 3 de la proteína homóloga a la subunidad C de la PKA de

mamífero de *T. brucei* y *T. evansi*, como se mencionó anteriormente. El cálculo para las masas moleculares para cada una de las isoformas de la proteína homologa a la subunidad C de la PKA de mamífero de *T. evansi*, *T. brucei* y *T. equiperdum* estuvo acotado entre valores de 38.058,61 Da y 39.187,24 Da, valores cercanos para las masas moleculares aparentes de las proteínas encontradas que interaccionaron con las subunidades H₆R^Iβ y H₆R^{II}α(R213K) de acuerdo a los ensayos de electroforesis y Western blot . Estos valores de masas moleculares aparentes encontrados son también cercanos a los reportados para las subunidades catalíticas de la PKA de mamíferos, 40.62kDa (Slice, y col., 1989), viéndose que esta leve diferencia de masas moleculares es debido al menor número de aminoácidos encontrados en las proteínas homologas a la subunidad C de la PKA de mamífero de los parásitos.

Con el programa NetPhos 3.1 se determinaron los aminoácidos que presentan mayor probabilidad de ser fosforilados en las secuencias aminoacídicas de las tres isoformas de *T. brucei* que presentan homología con la subunidad catalítica de la PKA de mamífero (**anexo 2**),

Varios aminoácidos presentaron probabilidades de ser fosforilados cercanas al 100% (entre 0,837 y 0,989), sin embargo para estos aminoácidos la predicción no fue específica para un tipo de quinasa. Entre estos aminoácidos llamaron la atención las serinas S18, S20, y S14 de las tres isoformas de la proteína homologa a la subunidad C de la PKA de mamífero respectivamente, los cuales pudieran ser equivalentes a la S10 de la subunidad Cα de la PKA. Aunque no se reportado la función que puede tener la fosforilación de esta S10 en la subunidad C de la PKA, ya que no hay un efecto importante sobre la actividad de la subunidad C cuando esta fosforilada en este residuo (Toner-Webb y col., 1992).

Otros residuos con altas probabilidad de ser fosforilados que llamaron la atención son la T179, T181 y T174 de las tres isoformas respectivamente (flecha roja); estas treoninas resultaron ser homologas con la T197 de la subunidad Cα de la PKA. Como bien se sabe, la fosforilación de esta T197 en las subunidades C de la PKA mamífero es indispensable para que la enzima sea catalíticamente activa

(Steinberg y col., 1993; Adams y col., 1995; Yonemoto y col., 1997). Otros estudios en donde se realizaron simulaciones en computadoras de los cambios conformacionales durante el proceso catalítico de la subunidad C activa, y comparándolos contra una mutante que sustituye la T197 por alanina, mostraron que la fosforilación de la T197 no solo facilita la reacción de transferencia de grupos fosfatos al estabilizar el estado de transición a través de interacciones electrostáticas, sino que también afecta la conformación del sitio activo, y su dinámica con otras proteínas esenciales, incluida su capacidad para interactuar con la subunidad R (Cheng y col., 2006). Estas evidencias apoyan la formación de complejos holoenzimáticos heterólogos entre las subunidades R de la PKA de mamífero y las proteínas quinasas aisladas del parásito.

Otros aminoácidos también mostraron probabilidades de ser fosforilados por otras quinasas, tales como las proteínas quinasas CK2, la proteína quinasa C, proteínas quinasas activadas por mitógenos, proteína quinasa GSK-3, la cdc2, la PKG y la PKA, todas ellas presentes en los tripanosmatideos (Gómez y col., 1999; Gómez y col., 1989; Jensen y col., 2007; Boscán y col., 2017; Müller y col., 2002; Pfister y col., 2006; Ojo y col., 2011; Gómez y col., 2001).

La gran cantidad de posibles sitios de fosforilación para las isoformas de la proteína homóloga a la subunidad catalítica de la PKA de mamífero de *T. brucie*, *T. evansi* y *T. equiperdum* da camino a pensar que estas proteínas pueden ser fosforiladas en más residuos aminoacídicos con respecto a las subunidades catalíticas de la PKA de mamífero. Apoyándose en los hallazgos realizados en el Laboratorio de Proteínas Quinasas de la Universidad Simón Bolívar donde se ha encontrado que en *T. equiperdum* el estrés metabólico producido por la ausencia de glucosa produce un aumento de la fosforilación de diversas proteínas presentes en el parásito, se podría pensar que muy probablemente muchas de las proteínas que interaccionaron con las subunidades H₆R^β y H₆R^α(R213K) recombinantes se encontraban fosforiladas. Este posible exceso en el número de fosforilaciones podría incrementar la masa molecular aparente de las proteínas cuando son separadas en geles de poliacrilamida en presencia de β-

mercaptoetanol, como ocurre en el caso de la subunidad R tipo II α de la PKA de mamífero, lo que podría explicar la aparición de la banda polipeptídica de 55kDa. Además dicha banda polipeptídica de 55kDa fue reconocida por un anticuerpo dirigido contra la subunidades catalítica de la PKA de mamífero.

7. CONCLUSIONES

- Se expresaron y purificaron las subunidades reguladoras H₆R^Iβ y H₆R^{II}α(R213K) de la PKA de mamífero mediante cromatografía de afinidad con una resina acoplada a iones N²⁺. Obteniendo fracciones enriquecidas con las proteínas recombinantes con rendimientos de 8,4 mg de H₆R^Iβ y 6,66 mg H₆R^{II}α(R213K) por litro de cultivo bacteriano.
- Se lograron purificar proteínas provenientes de la fracción soluble de parásitos de *T. equiperdum* estresados nutricionalmente en ausencia de glucosa que interaccionaron con las subunidades recombinantes H₆R^Iβ y H₆R^{II}α(R213K) unidas a resina acopladas con iones Ni²⁺ a partir de la fracción soluble del homogenato de parásitos estresados metabólicamente.
- Las proteínas que interaccionaron con las subunidades recombinantes H₆R^Iβ y H₆R^{II}α(R213K) fueron separadas en geles de poliacrilamida revelando que presentaban masas moleculares aparentes de 37kDa, 40kDa y 55kDa, y además, fueron reconocidas por un anticuerpo dirigido contra la subunidad catalítica de la PKA de mamífero.
- Ensayos cualitativos de actividad quinasa en geles de agarosa revelaron que una o varias de las proteínas que interaccionaron con las subunidades recombinantes H₆R^Iβ y H₆R^{II}α(R213K) presentaban actividad quinasa al poder fosforilar un sustrato específico de la PKA de mamíferos.

8. BIBLIOGRAFÍA

Adams, J. A., McGlone, M. L., Gibson, R., Taylor, S. S. 1995. Phosphorylation modulates catalytic function and regulation in the cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry*, **34(8)**, 2447-2454.

Anand, G. S., Hotchko, M., Brown, S. H., Ten Eyck, L. F., Komives, E. A., Taylor, S. S. 2007. R-subunit isoform specificity in protein kinase A: distinct features of protein interfaces in PKA types I and II by amide H² H exchange mass spectrometry. *Journal of molecular biology*, **374(2)**, 487-499.

Araujo, N. A., Guevara, A., Lorenzo, M. A., Calabokis, M., Bubis, J. 2016. Fluram-Kemptide-Lys8 Non-radioactive Assay for Protein Kinase A. *The protein journal*, **35(4)**, 247-255.

Baneyx, F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current opinion in biotechnology*, **10(5)**, 411-421.

Bao, Y., Weiss, L. M., Braunstein, V. L., Huang, H. 2008. Role of protein kinase A in *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*, **76(10)**, 4757-4763

Baharani, A., Trost, B., Kusalik, A., & Napper, S. 2017. Technological advances for interrogating the human kinome. *Biochemical Society Transactions*, **45(1)**, 65-77.

Beebe, S.J. y Corbin, J.D. 1986 Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. En: *The Enzymes*, vol. 17 (Eds. Boyer P.D. y Krebs E.G.), pp. **43-111**, Academic Press, Inc., Orlando, Florida.

Boscán, B. E., Uzcanga, G. L., Calabokis, M., Camargo, R., Aponte, F., Bubis, J. 2017. Interaction of tubulin and protein kinase CK2 in *Trypanosoma equiperdum*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, **72(11-12)**, 459-465.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, **72(1-2)**, 248-254.

Brun, R., Hecker, H., Lun, Z. R. 1998. *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). *Veterinary Parasitology*, **79(2)**, 95-107.

Builder, S. E., Beavo, J. A., Krebs, E. G. 1980. The mechanism of activation of bovine skeletal muscle protein kinase by adenosine 3': 5'-monophosphate. *Journal of Biological Chemistry*, **255(8)**, 3514-3519.

Bubis, J., Vedvick, T. S., Taylor, S. S. 1987. Antiparallel alignment of the two protomers of the regulatory subunit dimer of cAMP-dependent protein kinase I. *Journal of Biological Chemistry*, **262(31)**, 14961-14966.

Bubis, J., Neitzel, J. J., Saraswat, L. D., Taylor, S. S. 1988. A point mutation abolishes binding of cAMP to site A in the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, **263(20)**, 9668-9673.

Bubis, J., Martínez, J. C., Calabokis, M., Ferreira, J., Sanz-Rodríguez, C. E., Navas, V., Escalona, J., Guo Y., Taylor, S. S. 2017. The gene product of a *Trypanosoma equiperdum* ortholog of the cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit is a monomeric protein that is not capable of binding cyclic nucleotides. *Biochimie*.

Callahan, H. A., Litaker, R. W., Noga, E. J. 2002. Molecular taxonomy of the suborder Bodonina (Order Kinetoplastida), including the important fish parasite, *Ichthyobodo necator*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **49(2)**, 119-128.

Calabokis, M. (2008). Clonación, expresión y caracterización de una isoforma de la subunidad catalítica de la PKA de *Trypanosoma evansi*. Trabajo de investigación de año sabático realizado en el Instituto de Estudios Avanzados (IDEA). Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela.

Carnes, J., Anupama, A., Balmer, O., Jackson, A., Lewis, M., Brown, R., y colaboradores. 2015. Genome and phylogenetic analyses of *Trypanosoma evansi* reveal extensive similarity to *T. brucei* and multiple independent origins for dyskinetoplasty. *PLoS Negl Trop Dis*, **9(1)**, e3404.

Calabokis, M., González, Y., Merchán, A., Escalona, J. L., Araujo, N. A., Sanz-Rodríguez, C. E., Bubis, J. 2016. Immunological identification of a cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit-like protein from the *Trypanosoma equiperdum* TeAp-N/D1 isolate. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, **37(5)**, 485-514.

Cheng, Y., Zhang, Y., McCammon, J. A. 2005. How does the cAMP-dependent protein kinase catalyze the phosphorylation reaction: an ab initio QM/MM study. *Journal of the American Chemical Society*, **127(5)**, 1553-1562.

Cheng, Y., Zhang, Y., McCammon, J. A. 2006. How does activation loop phosphorylation modulate catalytic activity in the cAMP-dependent protein kinase: A theoretical study. *Protein science*, **15(4)**, 672-683.

Corbin, J. D., Keely, S. L., Park, C. R. 1975. The distribution and dissociation of cyclic adenosine 3': 5'-monophosphate-dependent protein kinases in adipose, cardiac, and other tissues. *Journal of Biological Chemistry*, **250(1)**, 218-225.

Desquesnes, M., Holzmüller, P., Lai, D. H., Dargantes, A., Lun, Z. R., Jittaplaong, S. 2013. *Trypanosoma evansi* and surra: a review and perspectives on origin, history, distribution, taxonomy, morphology, hosts, and pathogenic effects. *BioMed Research International*, 2013.

Díaz-Enrich, M. J., Ibarra, I., Hellman, U., Villamarín, J. A. 2003. Characterization of a type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase from the bivalve mollusk *Mytilus galloprovincialis*. *Archives of biochemistry and biophysics*, **416(1)**, 119-127.

Escalona, J. 2017. Caracterización de una proteína de *Trypanosoma equiperdum* que presenta homología con la proteína quinasa de mamífero Tesis de maestría. Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela.

Foss, K. B., LANDMARK, B., Skaalhegg, B. S., TASKÉN, K., JELLUM, E., HANSSON, V., JAHNSEN, T. 1994. Characterization of in-vitro-translated human regulatory and catalytic subunits of cAMP-dependent protein kinases. *The FEBS Journal*, **220(1)**, 217-223.

Gesellchen, F., Bertinetti, O., Herberg, F. W. 2006. Analysis of posttranslational modifications exemplified using protein kinase A. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, **1764(12)**, 1788-1800.

Giardina, S., Paganico, G., Urbani, G., Rossi, M. 2003. A biochemical and immunological comparative study on *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma evansi*. *Veterinary research communications*, **27(4)**, 289-300.

Gizaw, Y., Megersa, M., Fayera, T. 2017. Dourine: a neglected disease of equids. *Tropical animal health and production*, **49(5)**, 887-897.

- Gómez, M. L., Erijman, L., Arauzo, S., Torres, H. N., Téllez-Iñón, M. T. 1989. Protein kinase C in *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms: partial purification and characterization. *Molecular and biochemical parasitology*, **36(2)**, 101-108.
- Gómez, M. L., Ochatt, C. M., Kazanietz, M. G., Torres, H. N., Téllez-Iñón, M. T. 1999. Biochemical and immunological studies of protein kinase C from *Trypanosoma cruzi*. *International journal for parasitology*, **29(7)**, 981-989.
- Gómez, E. B., Santori, M. I., Laría, S., Engel, J. C., Swindle, J., Eisen, H., Téllez-Iñón, M. T. 2001. Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Cdc2p-related protein kinase 1 and identification of three novel associating cyclins. *Molecular and biochemical parasitology*, **113(1)**, 97-108.
- Grozdova, I. D., Alexandrova, N. A., Sveshnikova, E. V., Melik-Nubarov, N. S., Sveshnikov, P. G., Severin, E. S. 1996. Properties of the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase type II from human brain. *IUBMB Life*, **40(6)**, 1159-1166.
- Guevara, A. (2015). Purificación parcial y caracterización de una proteína kémptido quinasa de *Trypanosoma evansi*. Tesis de licenciatura. Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela.
- Hanks, S. K., Quinn, A. M., Hunter, T. 1988. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, **241(4861)**, 42-52.
- Hanks, S. K., Hunter, T. 1995. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *The FASEB journal*, **9(8)**, 576-596.
- Hemmer, W., McGlone, M., Taylor, S. S. 1997. Recombinant strategies for rapid purification of catalytic subunits of cAMP-dependent protein kinase. *Analytical biochemistry*, **245(2)**, 115-122.
- Hébert, L., Bouziane Moumen, A. M., Steinbiss, S., Lakhdar, L., Van Reet, N., Büscher, P., y colaboradores. 2017. First Draft Genome Sequence of the Dourine Causative Agent: *Trypanosoma Equiperdum* Strain OVI. *Journal of Genomics*, **5**, 1.
- Hofmann, F. R. A. N. Z., Beavo, J. A., Bechtel, P. J., Krebs, E. G. 1975. Comparison of adenosine 3': 5'-monophosphate-dependent protein kinases from rabbit skeletal and bovine heart muscle. *Journal of Biological Chemistry*, **250(19)**, 7795-7801.
- Hofmann, F. 1980. Apparent constants for the interaction of regulatory and catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase I and II. *Journal of Biological Chemistry*, **255(4)**, 1559-1564.
- Hunter, T. 1995. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, **80(2)**, 225-236.
- Huse, M., Kuriyan, J. 2002. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell*, **109(3)**, 275-282.
- Iyer, G. H., Moore, M. J., Taylor, S. S. 2005. Consequences of lysine 72 mutation on the phosphorylation and activation state of cAMP-dependent kinase. *Journal of Biological Chemistry*, **280(10)**, 8800-8807.
- Jensen, B. C., Kifer, C. T., Brekken, D. L., Randall, A. C., Wang, Q., Drees, B. L., Parsons, M. 2007. Characterization of protein kinase CK2 from *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology*, **151(1)**, 28-40.
- Jensen, R. E., Simpson, L., Englund, P. T. 2008. What happens when *Trypanosoma brucei* leaves Africa. *Trends in Parasitology*, **24(10)**, 428-431.

- Kim, C., Vigil, D., Anand, G., Taylor, S. S. 2006. Structure and dynamics of PKA signaling proteins. *European journal of cell biology*, **85(7)**, 651-654.
- Kemp, B. E., Benjamini, E., Krebs, E. G. 1976. Synthetic hexapeptide substrates and inhibitors of 3': 5'-cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **73(4)**, 1038-1042.
- Kemp, B. E., & Pearson, R. B. 1991. [10] Design and use of peptide substrates for protein kinases. In *Methods in enzymology* (Vol. 200, pp. **121-134**). Academic Press.
- Knighton, D. R., Zheng, J., Ten Eyck, L. F., Ashford, V. A., Xuong, N., Taylor, S. S., Sowadski, J. M. 1991. Crystal Structure of the Catalytic Subunit of Cyclic Adenosine Monophosphate--Dependent Protein Kinase. *Science*, **253(5018)**, 407.
- Kornev, A. P., Haste, N. M., Taylor, S. S., Ten Eyck, L. F. 2006. Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103(47)**, 17783-17788.
- Kopito, R. R. 2000. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends in cell biology*, **10(12)**, 524-530.
- Lanham, S. M., Godfrey, D. G. 1970. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Experimental parasitology*, **28(3)**, 521-534.
- Lai, D. H., Hashimi, H., Lun, Z. R., Ayala, F. J., Lukeš, J. 2007. Adaptations of *Trypanosoma brucei* to gradual loss of kinetoplast DNA: *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma evansi* are petite mutants of *T. brucei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105(6)**, 1999-2004.
- León, D. A., Herberg, F. W., Banky, P., & Taylor, S. S. 1997. A stable α -helical domain at the N terminus of the R1 α subunits of cAMP-dependent protein kinase is a novel dimerization/docking motif. *Journal of Biological Chemistry*, **272(45)**, 28431-28437.
- Lilie, H., Schwarz, E., Rudolph, R. 1998. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Current opinion in biotechnology*, **9(5)**, 497-501.
- Lutz, M. P., Pinon, D. I., Miller, L. J. 1994. A nonradioactive fluorescent gel-shift assay for the analysis of protein phosphatase and kinase activities toward protein-specific peptide substrates. *Analytical biochemistry*, **220(2)**, 268-274.
- Lugo, C. 2014. Fosforilación dependiente de la subunidad catalítica de la PKA en *Trypanosoma evansi* bajo estrés metabólico. Tesis de licenciatura. Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela.
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S. 2002a. The protein kinase complement of the human genome. *Science*, **298(5600)**, 1912-1934.
- Manning, G., Plowman, G. D., Hunter, T., Sudarsanam, S. 2002b. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends in biochemical sciences*, **27(10)**, 514-520.
- Metcalf, E. S. (2001). The role of international transport of equine semen on disease transmission. *Animal Reproduction Science*, **68(3)**, 229-237.
- Müller, I. B., Domenicali-Pfister, D., Roditi, I., Vassella, E. 2002. Stage-specific requirement of a mitogen-activated protein kinase by *Trypanosoma brucei*. *Molecular biology of the cell*, **13(11)**, 3787-3799.

Narayana, N., Cox, S., Shaltiel, S., Taylor, S. S., Xuong, N. H. 1997. Crystal structure of a polyhistidine-tagged recombinant catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with the peptide inhibitor PKI (5– 24) and adenosine. *Biochemistry*, **36(15)**, 4438-4448.

Ojo, K. K., Arakaki, T. L., Napuli, A. J., Inampudi, K. K., Keyloun, K. R., Zhang, L., Van Voorhis, W. C. 2011. Structure determination of glycogen synthase kinase-3 from *Leishmania major* and comparative inhibitor structure–activity relationships with *Trypanosoma brucei* GSK-3. *Molecular and biochemical parasitology*, **176(2)**, 98-108.

Parsons, M., Worthey, E. A., Ward, P. N., Mottram, J. C. 2000. Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *BMC genomics*, **6(1)**, 1.

Pawson, T., Scott, J. D. 2005. Protein phosphorylation in signaling–50 years and counting. *Trends in biochemical sciences*, **30(6)**, 286-290.

Pfister, D. D., Burkard, G., Morand, S., Renggli, C. K., Roditi, I., Vassella, E. 2006. A mitogen-activated protein kinase controls differentiation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic cell*, **5(7)**, 1126-1135.

Potter, R. L., Stafford, P. H., Taylor, S. 1978. Regulatory subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase I from porcine skeletal muscle: purification and proteolysis. *Archives of biochemistry and biophysics*, **190(1)**, 174-180.

Potter, R. L., Taylor, S. S. 1980. The structural domains of cAMP-dependent protein kinase I. Characterization of two sites of proteolytic cleavage and homologies to cAMP-dependent protein kinase II. *Journal of Biological Chemistry*, **255(20)**, 9706-9712.

Robinson-Steiner, A. M., Beebe, S. J., Rannels, S. R., Corbin, J. D. 1984. Microheterogeneity of type II cAMP-dependent protein kinase in various mammalian species and tissues. *Journal of Biological Chemistry*, **259(16)**, 10596-10605.

Shalaby, T., Liniger, M., Seebeck, T. 2001. The regulatory subunit of a cGMP-regulated protein kinase A of *Trypanosoma brucei*. *European Journal of Biochemistry*, **268(23)**, 6197-6206.

Saraswat, L. D., Ringheim, G. E., Bubis, J., Taylor, S. S. 1988. Deletion mutants as probes for localizing regions of subunit interaction in cAMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, **263(34)**, 18241-18246.

Sandberg, M., Taskén, K., Øyen, O., Hansson, V., Jahnsen, T. 1987. Molecular cloning, cDNA structure and deduced amino acid sequence for a type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase from human testis. *Biochemical and biophysical research communications*, **149(3)**, 939-945.

Simpson, A. G., Stevens, J. R., Lukeš, J. 2006. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends in Parasitology*, **22(4)**, 168-174.

Skålhegg, B. S., Landmark, B., Foss, K. B., Lohmann, S. M., Hansson, V., Lea, T., Jahnsen, T. 1992. Identification, purification, and characterization of subunits of cAMP-dependent protein kinase in human testis. Reverse mobilities of human RII alpha and RII beta on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis compared with rat and bovine RIIs. *Journal of Biological Chemistry*, **267(8)**, 5374-5379.

Slice, L. W., Taylor, S. S. 1989. Expression of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, **264(35)**, 20940-20946.

- Smith, C. M., Radzio-Andzelm, E., Akamine, P., Taylor, S. S. 1999. The catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase: prototype for an extended network of communication. *Progress in biophysics and molecular biology*, **71(3-4)**, 313-341.
- Solberg, R., Taskén, K., Wen, W., Coghlan, V. M., Meinkoth, J. L., Scott, J. D., Taylor, S. S. 1994. Human regulatory subunit RI β of cAMP-dependent protein kinases: expression, holoenzyme formation and microinjection into living cells. *Experimental cell research*, **214(2)**, 595-605.
- Steinberg, R. A., Cauthron, R. D., Symcox, M. M., Shuntoh, H. 1993. Autoactivation of catalytic (C alpha) subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase by phosphorylation of threonine 197. *Molecular and Cellular Biology*, **13(4)**, 2332-2341.
- Su, Y., Dostmann, W. R., Herberg, F. W., Durick, K., Xuong, N. H., Ten Eyck, L., Varughese, K. I. 1999. Regulatory subunit of protein kinase A: structure of deletion mutant with cAMP binding domains. *Science*, **269(5225)**, 807-813.
- Struppe, J., Komives, E. A., Taylor, S. S., Vold, R. R. 1998. 2H NMR studies of a myristoylated peptide in neutral and acidic phospholipid bicelles. *Biochemistry*, **37(44)**, 15523-15527.
- Tabor, S., Richardson, C. C. 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **82(4)**, 1074-1078.
- Taylor, S. S. 1987. Protein kinases: a diverse family of related proteins. *Bioessays*, **7(1)**, 24-29.
- Taylor, S. S., Bubis, J., Toner-Webb, J., Saraswat, L. D., First, E. A., Buechler, J. A., Sowadski, J. 1988. CAMP-dependent protein kinase: prototype for a family of enzymes. *The FASEB journal*, **2(11)**, 2677-2685.
- Taylor, S. S., Kim, C., Vigil, D., Haste, N. M., Yang, J., Wu, J., Anand, G. S. 2005. Dynamics of signaling by PKA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, **1754(1-2)**, 25-37.
- Taylor, S.S. Ghosh, G. 2006 Protein kinases: catalysis and regulation. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **16**, 665-667.
- Tasken, K., Skålhegg, B. S., Solberg, R., Andersson, K. B., Taylor, S. S., Lea, T., Hansson, V. 1993. Novel isozymes of cAMP-dependent protein kinase exist in human cells due to formation of RI alpha-RI beta heterodimeric complexes. *Journal of Biological Chemistry*, **268(28)**, 21276-21283.
- Toner-Webb, J., Van Patten, S. M., Walsh, D. A., Taylor, S. S. 1992. Autophosphorylation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, **267(35)**, 25174-25180.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **76(9)**, 4350-4354.
- Walsh, D. A., Perkins, J. P., Krebs, E. G. 1968. An adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, **243(13)**, 3763-3765.
- Walsh, D. A., Ashby, C. D., Gonzalez, C., Calkins, D., Fischer, E. H., Krebs, E. G. 1971. Purification and characterization of a protein inhibitor of adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinases. *Journal of Biological Chemistry*, **246(7)**, 1977-1985.
- Walsh, D. A., Angelos, K. L., Van Patten, S. M., Glass, D. B., Garetto, L. P. 1990 in *Peptides and Protein Phosphorylation* (Kemp, B. E., ed) pp. **43-84**, CRC Press, Inc., Boca Raton. FL

Whitehouse, S., Walsh, D. A. 1983. Mg X ATP2-dependent interaction of the inhibitor protein of the cAMP-dependent protein kinase with the catalytic subunit. *Journal of Biological Chemistry*, **258(6)**, 3682-3692.

Yonemoto, W., Garrod, S. M., Bell, S. M., Taylor, S. S. 1993. Identification of phosphorylation sites in the recombinant catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, **268(25)**, 18626-18632.

Yonemoto, W., McGlone, M. L., Grant, B., Taylor, S. S. 1997. Autophosphorylation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Escherichia coli*. *Protein engineering*, **10(8)**, 915-925.

Zheng, J., Knighton, D. R., Taylor, S. S., Xuong, N. H., Sowadski, J. M., Eyck, L. F. T. 1993. Crystal structures of the myristylated catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase reveal open and closed conformations. *Protein Science*, **2(10)**, 1559-1573.

Zick, S. K., Taylor, S. S. 1982. Interchain disulfide bonding in the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase I. *Journal of Biological Chemistry*, **257(5)**, 2287-2293.

ANEXOS

Anexo 1. Calculo in silico de los puntos isoeléctricos y de las masas moléculas de las proteínas PKA de *T. evansi*, *T. brucei* y *T. equiperdum* homologas a la PKA de mamífero.

Secuencia	pl	MM (Da)	N° aa
<i>T. evansi</i> PKAC1	8.97	38058.61	344
<i>T. evansi</i> PKAC2	9.06	38569.30	336
<i>T. evansi</i> PKAC3	8.88	39187.24	337
<i>T. brucei</i> PKAC1	8.85	38097.57	344
<i>T. brucei</i> PKAC2	9.06	38569.30	336
<i>T. brucei</i> PKAC3	8.88	39183.24	337
<i>T. equiperdum</i> PKAC2	8.96	38550.25	336
<i>T. equiperdum</i> PKAC3	8.88	39183.24	337

Anexo 2. Calculo in silico de las probabilidades de fosforilación por distintas quinasas en las tres isoformas de la proteína que presenta homología con la subunidad catalítica de la PKA de mamífero.

<i>Trypanosoma evansi / Trypanosoma brucei</i>								
PKAC1			PKAC2			PKAC3		
S/T/Y (posición)	Probabilidad de fosforilación	Posible kinasa que fosforila	S/T/Y (posición)	Probabilidad de fosforilación	Posible kinasa que fosforila	S/T/Y (posición)	Probabilidad de fosforilación	Posible kinasa que fosforila
S18	0.842	unsp	S6	0.989	unsp	S14	0.997 0.758	unsp PKC
S23	0.605 0.518	CKII PKG	S20	0.842	unsp	S42	0.834	PKA
S46	0.987 0.555 0.519	unsp PKG PKA	S25	0.605 0.518	CKII PKG	S69	0.577 0.535	CKII cdc2
S116	0.701	unsp	S48	0.987 0.555 0.519	unsp PKG PKA	S107	0.544	cdc2
S302	0.998 0.508	unsp GSK3	S118	0.700	unsp	S219	0.930 0.584 0.517	Unsp cdk5 p38MAPK
S307	0.896 0.533	unsp CKII	S304	0.998 0.516 0.510	unsp GSK3 cdk5	S260	0.998 0.902 0.609	unsp PKC PKA
S311	0.938 0.653 0.504	unsp CKII CKI	S309	0.896 0.533	unsp CKII	S275	0.554	PKA
S315	0.528	CKII	S313	0.938 0.653 0.504	unsp CKII CKI	S310	0.946 0.628 0.560 0.517	unsp p38MAPK cdk5 GSK3
S320	0.739 0.552	unsp p38MAPK	S317	0.535 0.508	PKC CKII			
S326	0.631 0.583	DNAPK ATM	S328	0.591 0.535	DNAPK ATM			
T2	0.581	unsp	T5	0.762	unsp	T8	0.959	unsp
T4	0.956 0.557 0.532	unsp p38MAPK cdk5	T181	0.978 0.545 0.527	unsp CKI PKA	T30	0.807	PKC
T13	0.795	PKC	T185	0.517	p38MAPK	T172	0.706	PKB

			0.502	GSK3		0.595	PKA	
						0.584	PKG	
T179	0.978 0.545 0.527	unsp CKI PKA	T226	0.750 0.579	unsp cdk5	T174	0.978 0.699 0.526	unsp PKB CKI
T183	0.517 0.502	p38MAPK GSK3	T262	0.671	PKC	T178	0.517 0.502	p38MAPK GSK3
T224	0.750 0.579	unsp cdk5	T267	0.961 0.796 0.575	unsp PKC PKA	T251	0.763	unsp
T260	0.671	PKC				T255	0.527	unsp
T265	0.961 0.796 0.575	unsp PKC PKA				T335	0.520	CKII
T324	0.695 0.659 0.531	cdk5 unsp GSK3						
Y50	0.587 0.519	unsp SRC	Y12	0.837	unsp	Y45	0.762 0.500	unsp INSR
Y51	0.893	unsp	Y52	0.586	unsp	Y181	0.505	unsp
Y99	0.504	SRC	Y53	0.892	unsp	Y224	0.504	INSR
Y146	0.650	unsp	Y101	0.504	SRC	Y303	0.714 0.511	unsp EGFR
Y186	0.506	unsp	Y148	0.649	unsp	Y307	0.822	unsp
Y229	0.502	INSR	Y188	0.505	unsp	Y334	0.940 0.515	unsp SRC
Y288	0.706	unsp	Y231	0.503	INSR			
Y312	0.858	unsp	Y290	0.705 0.506	unsp SRC			
			Y314	0.857	unsp			