Caracterización biológica y bioquímica del homólogo de la quinasa 8 regulada extracelularmente (TbERK8) en *Trypanosoma brucei*

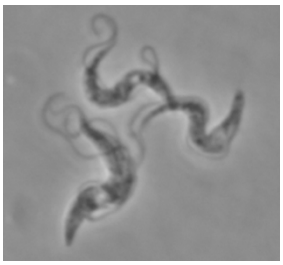
Nombre completo del investigador: Ana Lisa Valenciano Murillo, PhD

Breve descripción de su formación académica: Ingeniera en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica, PhD en Bioquímica del Virginia Polytechnic Institute and State University

Investigadores asociados: Zachary Mackey, PhD; Giselle Knudsen, PhD; Aaron Ramsey, Msc; Webster Santos, PhD.

Centro de investigación: Departamento de Bioquímica, Virginia Tech

Biological and biochemical characterization of the extracellular signal-regulated kinase 8 homolog (TbERK8) in *Trypanosoma brucei*



La especie *Trypanosoma brucei* es un parásito protozoo que habita en un vector (mosca tse-tse) y por medio de este transmite la enfermedad de typanosomiasis Humana Africana (Human African typanosomiasis (HAT)) o nagana en ganado. En humanos, la enfermedad causada por este parasito es mortal si no es tratada a tiempo. Los tratamientos para esta enfermedad son complejos dado que las drogas disponibles para tratarla no son eficaces contra el parásito y tienen una larga lista de efectos secundarios asociados con su uso. Hay una clara necesidad de identificar nuevas terapias que sean menos tóxicas para el paciente y más eficaces en contra de *T. brucei*. Nuestro enfoque para encontrar nuevos tratamientos es identificar nuevos blancos o puntos sensibles en el parásito que puedan ser modulados por pequeñas moléculas sintéticas. Las quinasas de la vía MAP (por sus siglas en ingles Mitogen-Activated Protein) son parte de una reacción de cascada de señales de tres niveles que regula la respuesta de la célula a estímulos y están involucradas en procesos esenciales para la sobrevivencia de las células. Las quinasas MAP pueden regular diferenciación celular, virulencia, apoptosis, ciclo celular y expresión de genes; esto hace a las quinasas MAP sean dianas terapéuticas de interés en *T. brucei*. El homólogo de la quinasa 8 regulada extracelularmente (TbERK8 por sus siglas en ingles ERK extracelular signal-regulated) es esencial para la sobrevivencia de *T. brucei* que vive en el torrente sanguíneo del paciente. El trabajo realizado para finalizar la disertación de doctorado involucro la caracterización de esta quinasa MAP de *T.brucei* para entender mejor su función biológica e identificar pequeñas moléculas sintéticas que puedan inhibir su actividad y así eliminar al parasito. Se logró llegar a la conclusión de que TbERK8 es una MAP quinasa atípica que es capaz de fosforilarse a sí misma y no hay otra quinasa antes de TbERk8 que haya sido identificada. Aquí se demuestra que TbERk8 también es capaz de fosforilar el homólogo en *T. brucei* del antígeno nuclear de

proliferación celular (TbPCNA). Esto en contraste a la función que ha sido reportada en el caso de ERK8 y PCNA en humanos, donde las proteínas forman un complejo estable en células normales de senos lo que no resulta la fosforilación del PCNA. También se reporta que TbPCNA es forsforilada por TbERK8 en tres residuos de aminoácidos localizados en una inserción en forma de lazo única en el homólogo de PCNA de *T.brucei*.

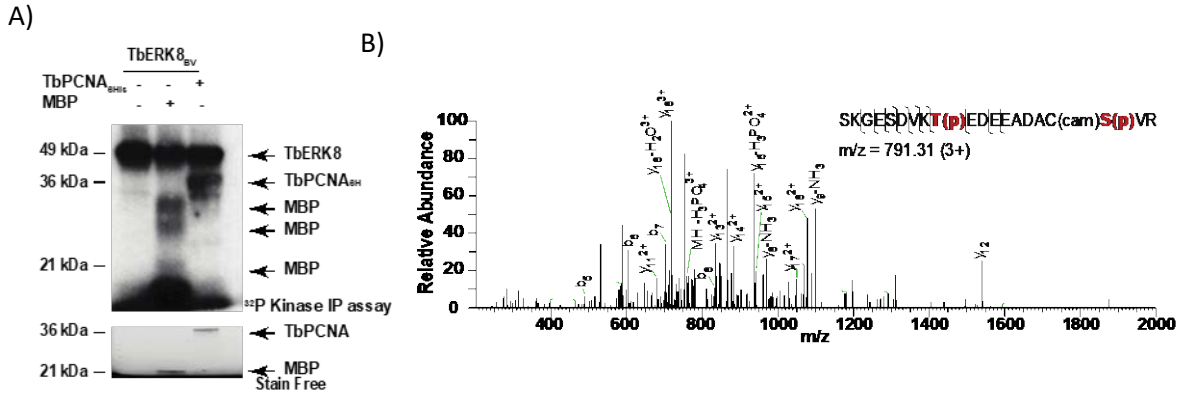


Figure 1. Especificidad *In vitro* del substrato de TbERK8 expresada de forma recombinante. (A) $TbERK8_{BV}$ recombinante expresada en células de insecto Sf9 fosforila eficientemente MBP (myelin basic protein) y $TbPCNA_{6H}$. El panel muestra el patrón de fosforilación de TbERK8. La primera línea es autofosforilación de la quinasa sin substrato, la segunda línea posee 100 μ mol MBP, y la tercera línea posee 100 μmol de $TbPCNA_{6H}$. (B) LC-MS/MS espectro de masas del péptido $_{194}$SKGESDVKT(phospho)EEDEEADAC(cam)S(phosphor)VR$_{213}$ de TbPCNA mostrando los residuos Thr_{202} and Ser_{211} fosforilados, con m/z = 791.31.65 (3+), 1.9 ppm error.

En esta tesis de doctorado también se dio a la tarea de estudiar a fondo la caracterización bioquímica y biológica de TbPCNA debido a su interacción con TbERK8. TbPCNA está encargado de controlar la replicación de ADN del parásito y es regulada tan estrictamente que si se incrementa o disminuye la regulación de su expresión inhibirá la proliferación del parásito. TbPCNA podría ser una buena diana terapéutica pero su relación tan cercana a PCNA de humanos lo descarta. Aunque este mecanismo de fosforilación es específico para TbPCNA el rol que esta fosforilación cumple en regular en el parásito TbPCNA no se conoce hasta el monto.

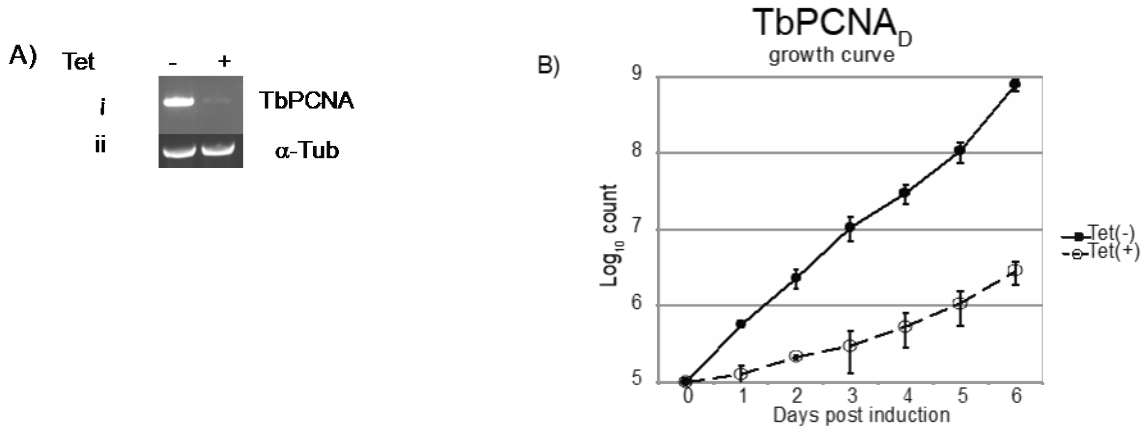


Figura 2. La disminución de la cantidad de mRNA así como la sobreexpresión de la proteína dentro del afecta el crecimiento de los parásitos y la replicación del ADN. (A) Reacción de PCR en tiempo real (RT-PCR) analizada en un gel de agarosa donde se muestra (i) producto de TbPCNA después de 23 ciclos. (ii) RT-PCR de α-Tub utilizado como control de expresión. (B) Curva de crecimiento de la media acumulativa después de 6 días de medición. La silenciación del mRNA de TbPCNA se inicia al agregar tetraciclina. Las líneas solidas muestran el medio sin tetraciclina y la línea discontinua con tetraciclina.

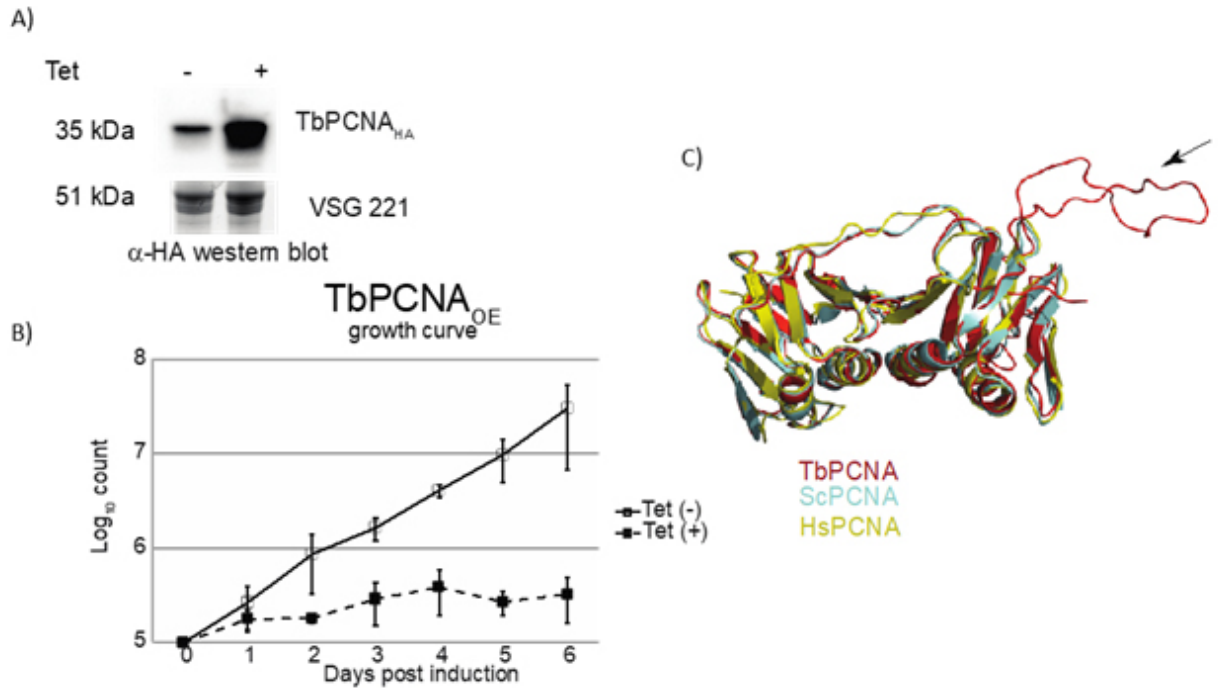


Figura 3. (A) Gel de poliacrilamida de 10% muestra la sobreexpresión del TbPCNA que se inicia al agregar tetraciclina al cultivo. El segundo panel es un "stain free" gel donde se muestra VSG (variant Surface glycoprotein) utilizado como un control. (B) Curva de crecimiento hecha con la media de 6 días de monitoreo donde se mide la proliferación del parásito. Cultivos sin (línea solida) y con (línea discontinua) tetraciclina. Se realizaron tres experimentos independientes. (C) Modelo de los homólogos de PCNA en *T. brucei*, yeast y humanos. La flecha señala la estructura en forma de lazo específica a TbPCNA formada por el inserto de aminoácidos.

Finalmente, se identificó una pequeña molécula sintética que puede inhibir selectivamente TbERk8 y no HsERK8, demostrando que TbERK8 puede ser inhibida selectivamente para eliminar al parásito. Las propiedades únicas de TbERK8 que fueron identificadas durante esta disertación de doctorado pueden ser explotadas por pequeñas moléculas que pueden ser desarrolladas en nuevas terapias específicas que pueden matar el parásito *T. brucei* con menores efectos secundarios para los pacientes.

Los resultados completos se publicaron en una serie de tres publicaciones que se pueden buscar en las referencias al final del documento.

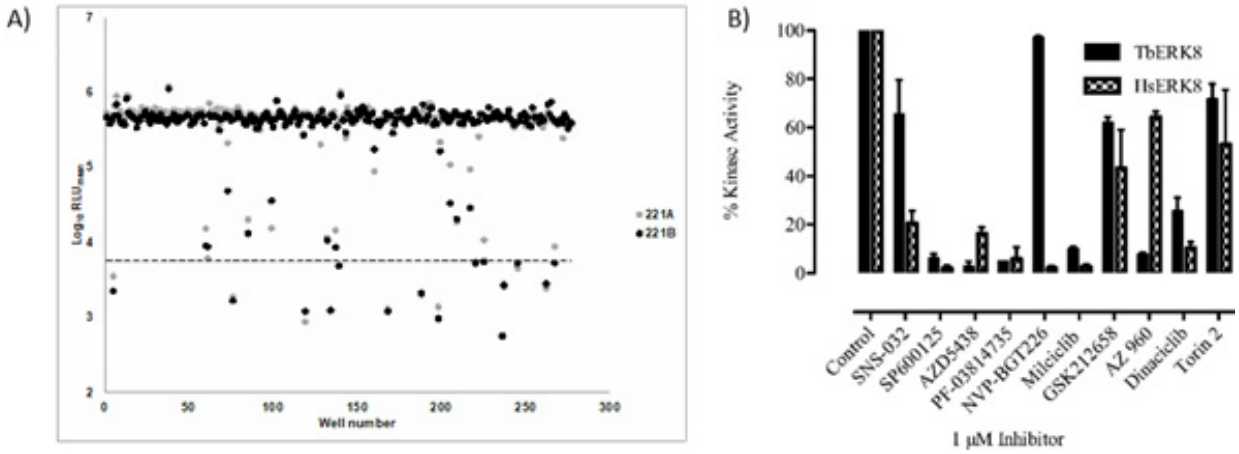


Figura 4. Ensayo donde se probó la eficacia de 100 inhibidores conocidos de quinasas en células de *T. brucei*. (A) Diagrama de dispersión mostrando los resultados del ensayo, las drogas bajo la línea discontinua tuvieron alta eficiencia al matar al parasito. (B) Se eligieron 12 drogas para ser probadas en TbERk8 recombinante. El grafico de barras muestra la inhibición de la fosforilación de MBP por parte de TbERK8 o HsERk8.

Bibliografía

(Valenciano, Knudsen, & Mackey, 2016; Valenciano, Ramsey, & Mackey, 2015; Valenciano, Ramsey, Santos, & Mackey, 2016)Valenciano, A. L., Knudsen, G. M., & Mackey, Z. B. (2016). Extracellular-signal regulated kinase 8 of Trypanosoma brucei uniquely phosphorylates its proliferating cell nuclear antigen homolog and reveals exploitable properties. *Cell Cycle, 15*(20), 2827-2841. doi:10.1080/15384101.2016.1222340

Valenciano, A. L., Ramsey, A. C., & Mackey, Z. B. (2015). Deviating the level of proliferating cell nuclear antigen in Trypanosoma brucei elicits distinct mechanisms for inhibiting proliferation and cell cycle progression. *Cell Cycle, 14*(4), 674-688. doi:10.4161/15384101.2014.987611

Valenciano, A. L., Ramsey, A. C., Santos, W. L., & Mackey, Z. B. (2016). Discovery and antiparasitic activity of AZ960 as a Trypanosoma brucei ERK8 inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry, 24*(19), 4647-4651. doi:https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.07.069