



Caracterización bioquímica y funcional de una nueva serina/treonina quinasa
putativa (AKT-like) de *Trypanosoma cruzi*

Laura Montoya Osorio

Microbiólogo y Bioanalista

Tutores

Lesly Ortiz Joya, Doctor (PhD) en Ciencias básicas biomédicas

Marcel Marín Villa (PhD) en Biología

Universidad de Antioquia
Escuela de Microbiología
Microbiología y Bioanálisis
Medellín, Antioquia, Colombia
2023

Cita	Muñoz Zapata y Martínez Naranjo (1)
Referencia	(1) Montoya Osorio L, Ortiz-Joya L, Marín Villa M, Caracterización bioquímica y funcional de una nueva serina/treonina putativa (AKT-2 <i>like</i>) de <i>Trypanosoa cruzi</i> . [Trabajo de grado profesional]. Medellín, Colombia. Universidad de Antioquia; 2023.
Estilo Vancouver/ICMJE (2018)	



Grupo de Investigación Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET).

Sede de Investigación Universitaria (SIU).



Biblioteca Carlos Gaviria Díaz

Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y FUNCIONAL DE UNA NUEVA SERINA/TREONINA QUINASA PUTATIVA (AKT2-LIKE) DE *Trypanosoma cruzi*

Laura Montoya Osorio¹, Lesly Ortiz-Joya¹, Marcel Marín Villa¹

¹ Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales- PECET. Universidad de Antioquia. Medellín-Colombia.

• Corresponding author: laura.montoyao@udea.edu.co. Cl. 62 #52-59 Medellín, Antioquia

RESUMEN

Existe la necesidad de encontrar nuevas alternativas farmacológicas para la enfermedad de Chagas, una patología sistémica sin cura efectiva en su etapa crónica, debido a la baja eficiencia y la toxicidad de los pocos medicamentos disponibles para su tratamiento. Las proteínas quinasa son objetivos farmacológicos utilizados en el tratamiento de varios tipos de cáncer, debido a su papel esencial en vías de señalización y promoción de la supervivencia celular. La serina/treonina quinasa AKT-like ha sido propuesta como diana en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de enfermedades parasitarias con resultados promisorios hasta la fecha. Por tanto, proponemos la identificación y validación funcional de una proteína asociada a la vía de señalización PI3K/AKT/TOR como potencial diana farmacológica, una posible segunda serina/treonina quinasa B-like/AKT de *Trypanosoma cruzi*. Mediante análisis bioinformáticos realizados en nuestro grupo y por Bachmaier et al. en 2013, se encontró una posible isoforma de la primera AKT reportada (UniProtKB ID Q4D6D3), esta nueva proteína (UniProtKB ID Q4DL90) presenta los tres dominios funcionales conservados; sin embargo, diverge en la región amino terminal con el dominio (FYVE/PHD) que no está en ninguna de las tres isoenzimas AKT humanas y cuya secuencia tiene una identidad máxima del 41% con los dominios FYVE/PHD humanos, un hecho que permite el diseño racional de compuestos que aprovechen estas diferencias con el parásito. En este trabajo, mediante herramientas de biología molecular se obtuvieron los plásmidos pET-ZT2-AKT-2 y pET28a-AKT-2 que permitieron la expresión de la proteína recombinante AKT2-

like full-length en *E. coli*, al igual que el vector pET28a- Δ NtAKT-2 que expresó únicamente el dominio quinasa. La purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC) y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC); y la actividad quinasa se evaluó mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas en fase sólida (ELISA). Adicionalmente, se obtuvieron anticuerpos policlonales de conejo anti-AKT2-*like* que permitieron la detección de la proteína endógena en epimastigotes de *T. cruzi* tulahuen y Gal61S mediante ensayos de Western-blot. Los resultados experimentales nos permitieron validar la existencia de una segunda serina/treonina quinasa B-*like* en *T. cruzi*, lo que la convierte en una candidata como diana terapéutica para investigaciones futuras.

PALABRAS CLAVES: *Trypanosoma cruzi*, quinasa, AKT/PKB, enfermedad de Chagas, dominio FYVE/PHD.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, es una enfermedad parasitaria sistémica causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* y transmitida por vectores hemípteros de la subfamilia Triatominae. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) es una de las enfermedades tropicales más desatendidas actualmente [1]. Esta parasitosis ha sido considerada endémica en América Latina, siendo prevalente en las áreas rurales; sin embargo, en los últimos años debido a los constantes flujos migratorios y el progresivo desarrollo económico se ha favorecido su expansión a regiones clásicamente consideradas como no endémicas, convirtiéndose en un problema de salud pública a nivel global. Entre 6 y 8 millones de personas la padecen en todo el mundo, y entre 65 y 100 millones de personas están en riesgo de contraer la infección [2].

Las alternativas terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son limitadas, aún no se cuenta con una vacuna efectiva en el mercado y los compuestos nitroheterocíclicos:

benznidazol y nifurtimox, únicos fármacos de primera línea disponibles están lejos de ser medicamentos ideales, su eficacia en el estadio crónico de la enfermedad todavía es incierta y los esquemas terapéuticos pueden extenderse durante meses, por lo que la toxicidad de los efectos adversos suele ser frecuente, dificultando la adherencia al tratamiento por parte de los pacientes [3]. Así mismo, se ha reportado cepas con resistencia natural a los nitroderivados y la capacidad de inducir resistencia en este parásito, tanto *in vitro* como *in vivo*, por presiones continuas a estos medicamentos [4]. Teniendo en cuenta el panorama anterior, es necesario la búsqueda de nuevas dianas moleculares y agentes terapéuticos que sean más seguros, eficaces y que tengan baja probabilidad de desarrollar cepas resistentes a la hora del uso en tratamiento. Para lograr este objetivo, se hace fundamental el estudio de la biología y bioquímica del parásito, para así establecer blancos moleculares que puedan ser usados como alternativas farmacológicas.

Las proteínas quinasas han sido durante los últimos años potenciales dianas terapéuticas debido a su papel esencial en vías de señalización celular, actuando como interruptores en una red de encendido y apagado de procesos que dependen de la adición o remoción de grupos fosfatos [5]. Dentro de esta familia hay un subgrupo de proteínas llamadas quinasas AGC Ser/Thr con capacidad de fosforilar residuos de serina y/o treonina, y que se agrupan según su actividad en: quinasa dependiente de GMPc (PKG), quinasa dependiente de AMPc (PKA) y la proteína quinasa C (PKC) [6]. Las quinasas AGC Ser/Thr han sido descritas como fundamentales en procesos de regulación de la homeostasis en células eucariotas, promoviendo la respuesta a estímulos hormonales o de estrés, y procesos de supervivencia al regular la síntesis o degradación de moléculas portadoras de energía [7,8]. También se ha descrito su papel en el control y señalización en el ciclo celular, donde la cascada de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) son elementos frecuentes en la transducción de señales de células eucariotas, regulando procesos celulares al activar factores de transcripción que promueven la división celular [9,10].

Dentro de las AGC Ser/Thr quinasas, se encuentra una proteína de gran relevancia, la quinasa B (PKB o AKT). La AKT es una proteína citoplasmática que es reclutada a la membrana celular

actuando en la vía de señalización celular PI3K-PKB/AKT. Ante estímulos de estrés o de activación de procesos metabólicos se da la formación de fosfatidil inositol trifosfato (PIP3), que promueve el anclaje de la AKT a la membrana celular mediante la unión PIP3 y el dominio de homología pleckstrin (PH). Esta interacción induce cambios conformacionales en la proteína permitiendo su fosforilación por otras quinasas, como las proteínas dependientes de 3-fosfoinositol, PDKs o el complejo mTORc2. Al ser activada, la AKT regula una amplia gama de respuestas biológicas que incluyen la motilidad celular, crecimiento, proliferación y supervivencia, así como la transcripción, síntesis de proteínas y metabolismo de nutrientes [11]. En humanos, es conocida por su papel central en las vías de transducción de señales activadas en respuesta a factores de crecimiento o insulina, y contribuye a varias funciones celulares incluyendo la apoptosis, el crecimiento celular y el metabolismo de nutrientes [12,13]. La alteración de esa vía se ha asociado a la proliferación de células cancerígenas y tumorales [14]. Se ha reportado además que el fenotipo transformado en algunos tumores es impulsado por la activación de la vía AKT como resultado de la activación o sobreexpresión del receptor, y que su inactivación específica genera procesos apoptóticos sin afectar a las células normales [15]. Dadas sus características en la conexión de distintas rutas metabólicas y considerarse esencial en procesos de supervivencia celular en condiciones de estrés, la AKT se ha convertido en un blanco molecular prometedor en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas.

En tripanosomátidos se ha reportado la presencia de quinasas, indicando que la fosforilación de proteínas es un mecanismo clave en la regulación de los procesos celulares del parásito y las respuestas que estos deben generar ante ambientes adversos que enfrentan en el huésped [16]. Estas proteínas ocupan aproximadamente el 2 % del genoma en el parásito (17). Teniendo en cuenta lo anterior, se ha descrito una quinasa *AKT-like* en los genomas de *Leishmania spp*, *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei* que conserva los tres dominios funcionales: un dominio catalítico (AGC) fundamental para la fosforilación de los sustratos, un dominio regulatorio C-terminal (PK) encargado de la regulación enzimática, y un dominio de homología pleckstrin (PH) en el N-terminal crucial para la activación de la quinasa, ya que se une al

fosfolípido de membrana fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (PtdIns-3,4,5-P3) mediando el reclutamiento a la membrana plasmática, para la señalización efectiva aguas abajo de las proteínas presentes en la vía PI3K/AKT/TOR [18, 19, 20]. No obstante, a pesar de su similitud con la AKT humana, presenta diferencias en su secuencia que ha permitido el desarrollo de inhibidores específicos [21]. En *Leishmania donovani*, se ha reportado su activación bajo condiciones de estrés térmico y nutricional, lo que sugiere un papel en los procesos de supervivencia celular. Además, su inhibición induce eventos de apoptosis y disminuyen la capacidad infecciosa del parásito. Adicionalmente, mediante estudios de *docking* molecular y estudios *in vitro* se han evaluado inhibidores alostéricos de la AKT-like tanto de *Leishmania panamensis* como en *T. cruzi* y *T. brucei*, donde bajo condiciones de estrés se inhibe la proliferación de los parásitos debido a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, cambios en la morfología, afección en la integridad del ADN y la estabilidad de la membrana celular. [22,18]

En cuanto a *Trypanosoma cruzi*, por análisis bioinformáticos realizados tanto en nuestro grupo de investigación [18] como por Bachmaier et al. [23] se encontró otra posible isoforma de la primera AKT-like reportada (Q4D6D3), la proteína AKT-2 like (Q4DL90). Ambas proteínas pertenecen a diferentes secciones del genoma del parásito (*contigs*) que no ha sido completamente ensamblado, pero con suficientes diferencias para considerarlos dos productos genéticos individuales. Las proteínas comparten un 45 % de identidad y los mismos dominios funcionales (dominio PH, dominio quinasa y dominio AGC); sin embargo, la nueva isoforma propuesta posee un dominio amino terminal (FYVE/PHD) similar a unos dedos de zinc, cuya función principal en células eucariotas es la regulación de procesos transcripcionales. Algo interesante es que este dominio no está presente en ninguna de las tres proteínas AKT humanas, y la secuencia que se encuentra en TcAKT2-like tiene una identidad máxima del 41 % con los dominios FYVE/PHD de humanos [18]. Este precedente, permite el estudio a nivel bioquímico de la proteína AKT2-like del parásito y abre la posibilidad de la búsqueda y diseño de nuevos inhibidores específicos de una quinasa que puede ser esencial en procesos de supervivencia para estos importantes patógenos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Análisis bioinformático de la proteína AKT2-like. De la base de datos UniProtKB se obtuvo la información de la quinasa de interés (código Q4DL90). La determinación de los parámetros fisicoquímicos se realizó empleando la herramienta ProtParam disponible en el servidor ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>). Para la determinación y descripción de los dominios se usaron los servidores InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) y Pfam (<https://pfam.xfam.org/>). Adicionalmente, se realizó un alineamiento múltiple con Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) contrastando las secuencias de las tres isoenzimas humanas (códigos de acceso en UniProtKB: (AKT1 (P31749), AKT2 (P31751), AKT3 (Q9Y243)) con la secuencia de la TcAKT-2 like de *T. cruzi*.

2.2 Cultivos de *Trypanosoma cruzi*

Epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* tulahuen (cepa transfectada con la enzima *B*-galactosidasa) y Gal61S (M.RATTUS/CO/91/GAL-61cl11) fueron cultivados en medio RPM1 1640 (Sigma Aldrich) suplementado con 0.02% de hemina, 0.5% de tripticasa peptona, 0.002 M de HEPES, suero fetal bovino inactivado al 10% (SFB) y 100 U*mL⁻¹ penicilina y 0.1 mg*mL⁻¹ estreptomina. Los parásitos fueron mantenidos en frascos T-25 a 26 °C. Adicionalmente, para el mantenimiento de las cepas se empleó el medio bifásico Novy-MacNeal-Nicolle (0.6 % de NaCl; 0.8% de glucosa) con 1 ml de fase líquida a 26 °C.

2.3 Obtención del vector pET-TcAKT-2 mediante mutagénesis dirigida

El vector pET-TcAKT-2 se obtuvo mediante la técnica de mutagénesis sitio dirigida por PCR usando el kit Q5[®] Site-Directed Mutagenesis (New England Biolabs, NEB). Se emplearon los cebadores diseñados (Primer directo: 5'-GGC AGT GGT TCT GAG AAT CTT TAT TTC-3'. Primer Reverso: 5'-CAT GGG GTG ATG GTG ATG GTG ATG -3'). Como vector plantilla se usó el vector pET-ZT2-AKT-2 obtenido previamente en nuestro laboratorio, conformado por un

promotor T7 diseñado para la expresión génica de la proteína, Kanamicina como antibiótico de selección, y una etiqueta de solubilidad ZTag2 (dominio Z de la proteína A de *Staphylococcal*). La reacción de PCR fue realizada a un volumen final de 50 μ l, con 0.25 μ L de Q5® High-Fidelity DNA Polimerasa (2U/ μ L), 20 ng de DNA plantilla y una concentración final para cada uno de los cebadores de 0.5 μ M. El ciclo de desnaturalización inició a una temperatura de 98 °C por 30 segundos, seguido de 25 ciclos con temperaturas de desnaturalización, alineamiento y extensión de 98 °C (30 s), 50 °C (30 s) y 72 °C (2 min), respectivamente. Posterior a la amplificación, se adicionó 1 μ L de la endonucleasa DpnI y se incubó una hora a 37 °C. Finalmente, se realizó una incubación a temperatura ambiente durante dos horas con 1 μ L de la T4 ligasa (NEB) para completar la circulación del material genético amplificado.

Posteriormente, células químicamente competentes DH5 α fueron transformadas con 5 μ L de DNA producto de ligación (pET-TcAKT-2) mediante choque térmico [24], las células fueron recuperadas en 700 μ l de medio líquido Luria Bertani (LB) e incubadas 1 h a 37 °C. Se sembró por confluencia 200 μ L del inóculo en medio sólido LB suplementado con 50 μ g/ml de kanamicina para la selección de los clones. La extracción de plásmido fue realizada mediante el kit comercial FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit (Favorgen). Para la confirmación de la obtención del vector, se realizó digestión enzimática con NcoI y NotI (NEB) y electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) en buffer TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA) y tinción con bromuro de etidio 0.05% (v/v). Adicionalmente, el vector fue verificado por secuenciación del ADN en LGC Genomics GmbH.

En cuanto al vector pET28a-AKT2, este fue sintetizado por BioCat GmbH (Heidelberg, Alemania) con la secuencia génica de la AKT2-like (UniProtKB ID: Q4DL90) optimizada para su expresión en *E. coli*. Posee el promotor T7, Kanamicina como antibiótico de selección, y permite la expresión de la proteína con una etiqueta 6His en el extremo carboxilo.

2.4 Obtención del vector pET28a-ΔNt AKT-2 mediante mutagénesis dirigida

Con el fin de obtener el dominio quinasa de la proteína y evaluar su actividad enzimática, se obtuvo el vector pET-ΔNtAKT-2 mediante la técnica de mutagénesis sitio dirigida por PCR usando el kit Q5[®] Site-Directed Mutagenesis (New England Biolabs). Con esta técnica se delecionó la secuencia génica que codifica para los dominios PH y FYVE/PHD presentes en el extremo amino de la AKT2-like. Para ello, se emplearon los siguientes cebadores: directo, 5'-GATTTTGAAGCTGCTGACC-3'; Reverso: 5'-CATGGTATATCTCCTTCTTAAAG-3'. Como vector plantilla se usó el vector pET28a-AKT-2. La reacción de PCR fue realizada a un volumen final de 50 µl, con 0.25 µL de Q5[®] High-Fidelity DNA Polimerasa (2U/µL), 20 ng de DNA plantilla y una concentración final para cada uno de los cebadores de 0.5 µM. El ciclo de desnaturalización inició a una temperatura de 98 °C por 30 segundos, seguido de 25 ciclos con temperaturas de desnaturalización, alineamiento y extensión de 98°C (30 s), 52°C (30 s) y 72°C (3 min), respectivamente. El resto de la metodología fue realizada como se describió en el numeral 2.3. Finalmente, se realizó digestión enzimática con la enzima de restricción BamHI (NEB) y se observó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) en buffer TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA) en tinción con bromuro de etidio 0.05% (v/v).

2.5 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes TcAKT2-like-6His y ΔNtAKT-2-6His.

Para la obtención de las proteínas recombinantes se empleó el sistema heterólogo de *Escherichia coli*. Los plásmidos (pET28a-AKT2 y pET-TcAKT-2 que expresan la proteína *full-length*, y pET28a-ΔNtAKT-2 que expresa el dominio quinasa) se introdujeron en células de expresión *E. coli* BL21(DE3) mediante transformación por choque térmico [24]. Los clones fueron seleccionados en medio sólido LB con kanamicina 50 µg/ml. Las bacterias se cultivaron a 37 °C en un litro de LB hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.6 y se indujo la expresión de la proteína mediante la adición de 0.5 mM de isopropil-1-tio-β-D- galactopiranosido (IPTG) *overnight* a 25 °C. Las bacterias fueron colectadas y resuspendidas en buffer de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 5 mM beta-mercaptoetanol, 0.1 mg/ml DNasa, 1 mM MgCl₂, 1 mM

MnSO₄ e inhibidor de proteasa Roche). Luego, mediante sonicación en el equipo Ultrasonic Cell Disruptor UCD-650 de BIOBASE se realizó la ruptura celular durante 15 minutos a 20 % de potencia y pulsos de 2 segundos. El lisado bacteriano se centrifugó a 18000 g durante 20 minutos a 4 °C, y el sobrenadante obtenido se sometió a cromatografía de afinidad a metales inmovilizados. La columna de gravedad con 3 ml de resina de Ni-NTA (Qiagen) fue equilibrada con 10 volúmenes de columna (CV) de buffer de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol); seguido a esto, la fracción soluble fue pasada por la columna dos veces y se realizó un gradiente de imidazol de 10 mM, 25 mM, 35 mM y finalmente una elución con 300 mM imidazol. Se tomaron 20 µl de todas las fracciones y se prepararon en buffer de carga 1X para su evaluación en un SDS-PAGE 12%. Se realizó cromatografía de exclusión de tamaño usando buffer SEC (50 mM Tris-HCl pH 7.0, 200 mM NaCl) en el equipo FPLC GE Healthcare AKTA purifier 10, con la columna Superdex 75 pg Hiload 16/600 (GE Healthcare). Se inyectó 2 ml de proteína a una concentración de 1,46 mg/ml y se colectaron las fracciones. La concentración de proteínas se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm y usando el coeficiente de absorción molar (*TcAKT2-like* $\epsilon/1000= 63,3$) con el Nanodrop 1000 ThermoFisher.

2.6 Determinación de la actividad quinasa de la proteína AKT-2 like mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas en fase sólida.

La actividad enzimática se determinó mediante el Akt Kinase Activity Assay Kit (Abcam, Cat # ab139436), siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se agregó 50 µl de buffer de ensayo quinasa en los pozos durante 10 min a temperatura ambiente y se retiró la solución mediante aspiración. Posteriormente, se adicionó 30 µl de cada muestra: blanco (buffer de ensayo quinasa), control positivo de actividad con la AKT-1 de *T. cruzi* a una concentración de 200 ng, y la proteína AKT-2 like en concentraciones de 400 ng, 800 ng y 1200 ng. Cada concentración fue evaluada por duplicado. Seguido a esto, se inició la reacción al adicionar 10 µl de ATP diluido a cada pozo, se cubrió la placa con adhesivo y se dejó en incubación 90 minutos a 30 °C en agitación cada 20 minutos. Se detuvo la reacción al aspirar la solución y secar los pozos al invertir la placa. Posteriormente, se adicionó 40 µl del sustrato fosfoespecífico a cada pozo, se cubrió la

placa y se incubó a temperatura ambiente durante 60 min en agitación constante. Terminado el tiempo, se aspiró todo el líquido de los pozos, para adicionar 100 µl de buffer de lavado 1X a todos los pozos. Se realizaron 4 lavados cada uno de 2 minutos. Se adicionó 40 µl del anticuerpo anti-IgG de conejo: HRP diluido a cada pozo y se incubó a temperatura ambiente 30 minutos en agitación. Seguidamente, se realizaron nuevamente 4 lavados. Se añadió 60 µl del sustrato TMB a cada pozo y se incubó 60 minutos. Finalmente, se adicionó 20 µl de solución de parada a cada pozo y se leyó a 450 nm en un lector de microplatos (Varioskan™ LUX Multimode Reader - Thermo Scientific, USA).

2.7 Obtención de anticuerpos policlonales de conejo anti AKT-2 like

Los anticuerpos policlonales anti-AKT-2 *like* se obtuvieron mediante la inmunización de un conejo de laboratorio adulto macho New Zealand de 2 Kg. La inmunización fue realizada con la proteína recombinante AKT-2 *like* de *trypanosoma cruzi* en una concentración 0.52 µg/µl y con adyuvante incompleto de Freund; estos fueron emulsionados en una mezcla de partes iguales (500 µl de proteína y 500 µl de adyuvante) e inoculada vía subcutánea en la zona dorsal del animal. Cada quince días se inmunizaron los conejos y se tomaron muestras de sangre de la vena principal de la oreja en condiciones asépticas. El suero final se recogió por punción cardíaca, bajo anestesia mezclando 5 mg/kg de Xilacina y 35 mg/kg de Ketamina, por vía intramuscular. El suero se dividió en alícuotas de 2 ml cada una para ser almacenadas a -20 °C hasta su uso.

2.8 Purificación de anticuerpos policlonales anti-AKT2 like mediante afinidad con antígenos inmovilizados en membranas de western blot.

En un SDS-PAGE al 12% se sembró 370 µg de proteína recombinante AKT2-*like* purificada. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Thermo Scientific 0.45 µm 26.5 cm x 3.7 cm) en sistema húmedo mediante el buffer de transferencia (50 mM Tris, 380 mM glicina, 10 % metanol, pH 8.3) *overnight* a 20 mA. La membrana fue teñida con rojo ponceau y cortada en pedazos pequeños en el sitio donde hubo transferencia. Posteriormente, se realizó pre-elución de la membrana con 100 mM de glicina pH 2.5 durante 10 minutos y tres lavados con TBS-T (100

mM Tris pH 7.4, 0.3 M NaCl, Tween-20 0.01 %) durante 5 minutos cada uno. La membrana se bloqueó con leche descremada en polvo al 5 % (p/v) en TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavó nuevamente tres veces en TBS-T. Se incubó la membrana en 2 ml del suero *overnight* a 4 °C, se realizaron los lavados correspondientes y se realizó la elusión de los anticuerpos con 100 mM glicina pH 2.5 durante 2 minutos, seguido a esto se adiciono 52 µl de 1 M Tris-HCl pH 8.5. Este procedimiento se repitió 3 veces y finalmente se almacenaron los anticuerpos a -20°C hasta su uso [25].

2.9 Extracción de proteínas totales de epimastigotes de *T. cruzi* tulahuén y Gal61S

Los parásitos fueron contados en cámara de Neubauer dilución 1:100 y colectados después de 72 horas de crecimiento en fase exponencial a 5000 g durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y los pellets fueron lavados 3 veces con PBS. Se realizó la lisis de 92.5×10^6 parásitos en 100 µl de buffer (10 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 1% de CHAPS e inhibidor de proteasa Roche, pH 6.0). La solución se dejó en agitación constante durante 30 minutos a 4 °C. Finalmente, se centrifugó a 13000 g durante 15 minutos. El sobrenadante se cuantificó por espectrofotometría a 280 nm en el Nanodrop 1000 (ThermoFisher) y se almacenó a -20°C.

2.10 Reconocimiento de la proteína AKT-2 like recombinante y la proteína endógena en extractos de epimastigotes de *T. cruzi* mediante Western blot.

Se separaron 30 µg de proteína recombinante 6His-AKT-2 like mediante SDS-PAGE al 12%. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Thermo Scientific 0.45 µm 26.5 cm x 3.7 cm) en sistema húmedo mediante el buffer de transferencia (Tris 50 mM pH 8.3, glicina 380 mM, metanol 10%) durante 2 h a 250 mA. La membrana fue lavada tres veces durante cinco minutos con TBS-T y posteriormente se realizó el revelado con rojo Ponceau para la confirmación de la transferencia. La membrana se dejó en incubación con leche descremada en polvo al 5% (p/v) en TBS-T al 0.1% O.N a 4 °C en agitación constante. Se realizó la incubación de la membrana con el anticuerpo primario policlonal de conejo anti-AKT2 en diluciones 1:200, 1:400, 1:800 y 1:1600 durante una hora, después de haber realizado 3 lavados previos durante 5 minutos con TBS-T.

Posteriormente, las membranas se lavaron 3 veces y se incubaron por una hora con el anticuerpo anti-conejo IgG conjugado a peroxidasa (Sigma Aldrich) como anticuerpo secundario en una dilución 1:10000 en TBS-T. El revelado fue realizado con el sustrato precipitable de peroxidasa (4-Cl-1 naftol, TBS y H₂O₂ 35 %). Para contrastar el resultado, se realizó la detección de la cola de histidinas (6His). Para ello, se cargaron 15 µg de proteína recombinante 6His-AKT-2-*like* y empleando el anticuerpo primario Anti-6XHis tag® antibody (ab213204) en dilución 1:5000 en TBS-T.

En cuanto a la detección de la proteína endógena, se emplearon extractos de proteínas totales (100 µg) de epimastigotes de *T. cruzi* cepas tulahuen y Gal61 siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Se empleó el anticuerpo primario policlonal de conejo anti-AKT2 obtenido anteriormente (dilución 1:7000 en TBS-T). Como anticuerpo secundario se empleó el anticuerpo anti-rabbit IgG H&L (IRDye® 800CW) de abcam en dilución 1:20000 en buffer TBS-T por 1h. La detección de proteínas se llevó a cabo con el sistema de imágenes Odyssey CLx (Li-COR Biosciences).

3. RESULTADOS

3.1 Análisis bioinformático de la quinasa AKT-2 *like* de *T. cruzi*.

La secuencia de la proteína AKT-2 *like* de *T. cruzi* se obtuvo de la base de datos UniProtKB con el ID Q4DL90. El modelamiento de la proteína fue realizado previamente en nuestro grupo mediante diferentes servidores informáticos y metodologías. Se usaron los servidores ModWeb y SwissModel para el modelamiento por homología, por *threading* con el servidor I-TASSER, y por *deep learning* usando distancias de contacto en el servidor trRosetta. Se seleccionó el mejor modelo obtenido del servidor trRosett como se puede observar en la figura 1.

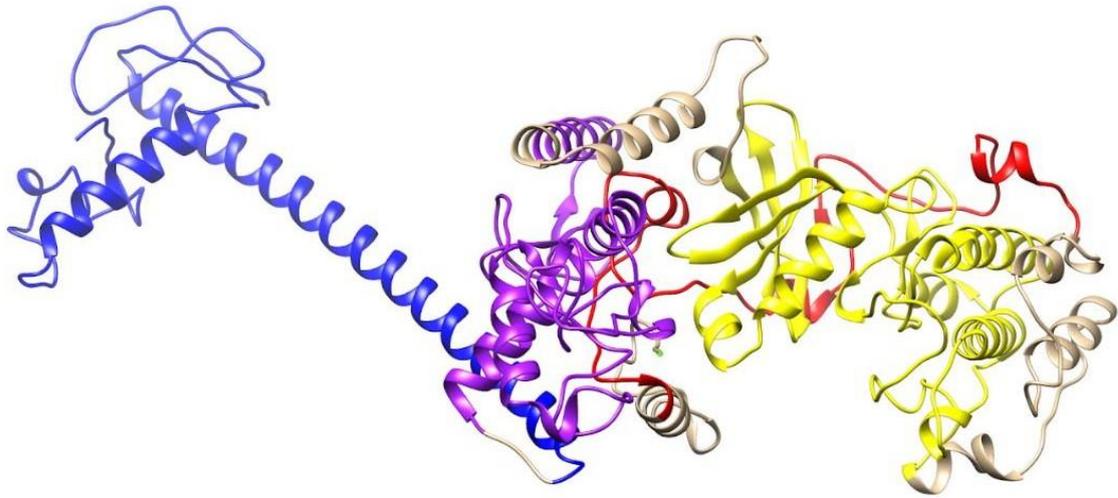


Figura 1: Modelamiento 3D de la proteína AKT2-like obtenido con el servidor trRosetta. Dominio FYVE N-terminal ubicado en la posición 89 – 143 representado con color azul. Dominio PH ubicado en la posición 149 – 312 representado con color violeta. Dominio quinasa ubicado en la posición 351 – 604 representado con color amarillo. Dominio AGC-quinasa C-terminal ubicado en la posición 605 – 676 representado color rojo. Modelo visualizado en el servidor UCSF Chimera versión 3.1.

La proteína AKT2-like posee 705 residuos, un peso molecular de 78 kDa y un punto isoeléctrico teórico de 8.47. La composición de residuos según su polaridad se muestra en la figura 2. Esta proteína conserva los mismos dominios funcionales descritos para las AKT: un dominio PH, dominio quinasa y dominio AGC; sin embargo, el candidato en contraste con la AKT-1 de *T. cruzi* posee un dominio FYVE/PHD adicional en el N-terminal (Figura 3).

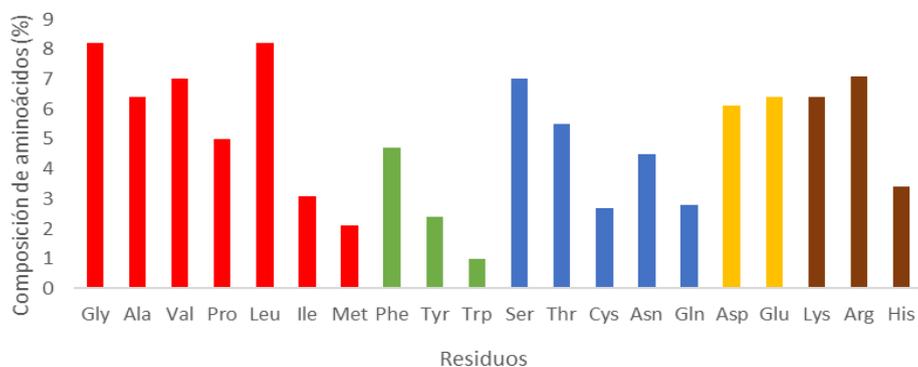


Figura 2. Composición de aminoácidos de la serina-treonina quinasa AKT2-like Q4DL90 de *T. cruzi*. *(Rojo) residuos no polares alifáticos; (Verde) residuos aromáticos; (azul) residuos polares no cargados; (amarillo) residuos cargados negativamente; (café) residuos cargados positivamente.

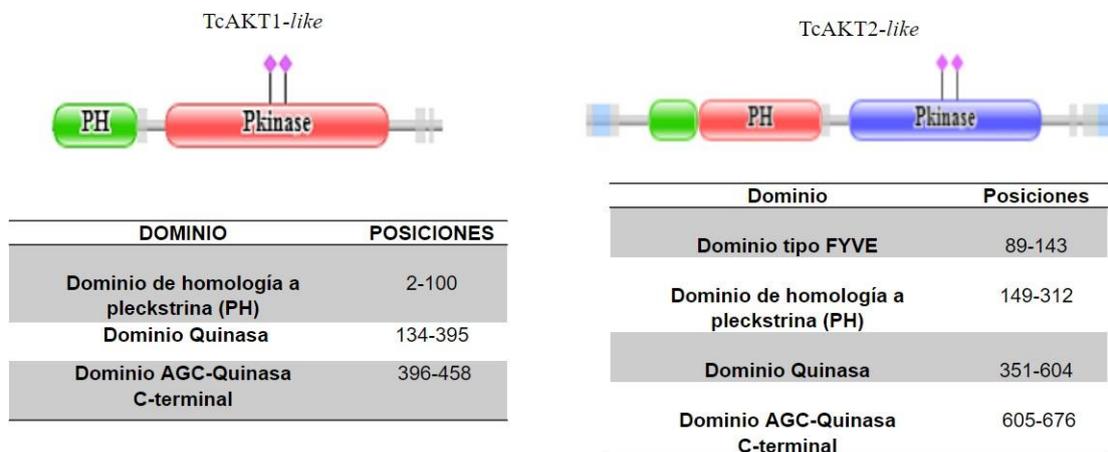


Figura 3. Descripción de dominios de las quinasas AKT1 y 2-like de *T. cruzi*. Para la determinación y descripción de los dominios se emplearon los servidores InterPro y Pfam. Se describen las posiciones de los residuos que conforman los dominios FYVE/PHD, PH, quinasa y AGC para las proteínas TcAKT- 1 y 2 like.

Para la comparación a nivel de estructura primaria de las secuencias de las AKTs de *Homo sapiens* y la AKT-2 like de *T. cruzi*, se realizó un alineamiento múltiple con Clustal Omega. Se contrastaron las secuencias de las tres isoenzimas humanas (AKT1 (P31749), AKT2 (P31751), AKT3 (Q9Y243)), con las secuencias de la TcAKT-2 like. Como se observa en la figura 4, de manera conservada se localizaron los residuos del motivo de unión a ATP, el bucle G rico en glicina, y el residuo de treonina involucrado en la fosfoactivación de esta quinasa.

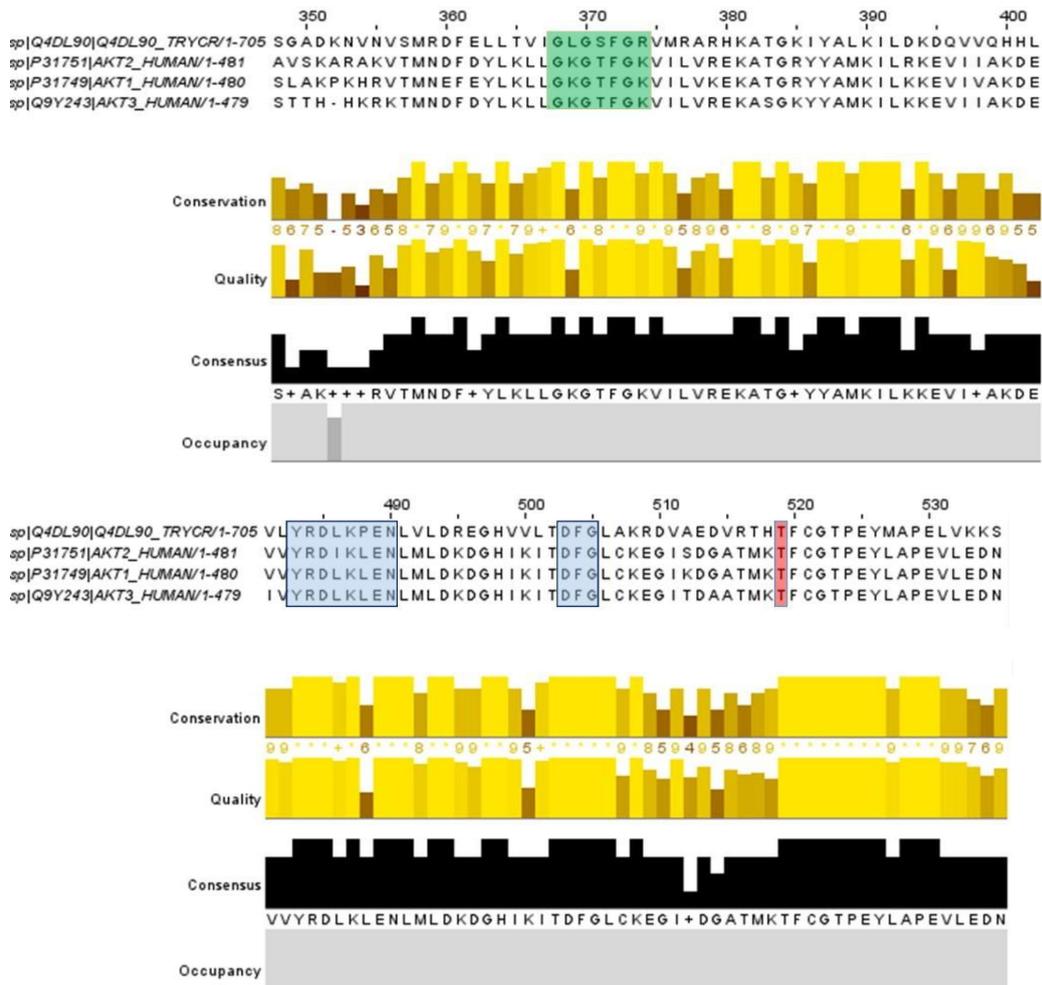


Figura 4. Alineamiento múltiple de la proteína AKT2-like de *T. cruzi* (Q4DL90) y las iso-enzimas humanas AKT1-3. En el recuadro verde se señala el bucle G, en los recuadros azules los motivos reportados de unión a ATP. En rojo el residuo de treonina clave en la fosfoactivación. El porcentaje de identidad entre las secuencias es proporcional a la altura de las barras amarillas. El alineamiento se generó con el programa Clustal Omega.

Para el estudio bioquímico de este candidato fue necesaria la obtención de la proteína recombinante, para ello, se obtuvieron los vectores de expresión tanto de la proteína *full-length* como de su dominio quinasa. Se determinaron rendimientos, solubilidad y se logró la purificación de la recombinante a la cual se evaluó su actividad quinasa.

3.2. Obtención del vector pET-TcAKT-2 y expresión de la proteína 6His-TcAKT2-like

El vector pETZT2-AKT-2, previamente obtenido en nuestro grupo de investigación, fue construido con la secuencia codificante de la proteína AKT2-like amplificada por PCR a partir de ADN genómico de *T. cruzi* (M.RATTUS/CO/91/GAL-61c111) y el vector pETZT2-1a (amablemente donado por el Dr. Klaus Zangger, University of Graz). Dicho constructo permitió la expresión de la recombinante fusionada a la cola de solubilidad Ztag2 (ZT2) al igual que la etiqueta 6His en el extremo amino (79 kDa). Con el fin de evaluar la solubilidad de la recombinante sin la cola ZT2, se realizó mutagénesis sitio dirigida por PCR para obtener el vector pET-TcAKT2 (7675 pb). Una vez obtenido el vector, la confirmación de la clonación se realizó mediante digestión enzimática con las enzimas NcoI y NotI que liberan la secuencia génica (akt2). El vector digerido tiene un tamaño de 5573 pb y la secuencia codificante de la AKT-2-like de 2102 pb. La cola de solubilidad contiene 171 pb que corresponden a 57 residuos, por lo tanto, la deleción de la etiqueta Ztag2 se corrobora con el resultado obtenido para los clones 1 y 2, donde se observa una diferencia de aproximadamente 200 pb con respecto a al vector plantilla pETZT2-AKT-2 digerido (figura 5A). Con el fin de evaluar la expresión de la proteína a partir del nuevo vector, se realizó la comparación de las fracciones solubles de la cepa *E. coli* B121 transformada con los vectores pETZT2-AKT2 y pET-TcAKT2 (figura 5B). La recombinante 6His-TcAKT2 expresada presenta una diferencia de aproximadamente 6,5 kDa con la proteína 6His-ZT2-TcAKT2 equivalente a la cola Ztag2. Aún sin el tag de solubilidad, la recombinante se expresa de manera soluble permitiendo su purificación.

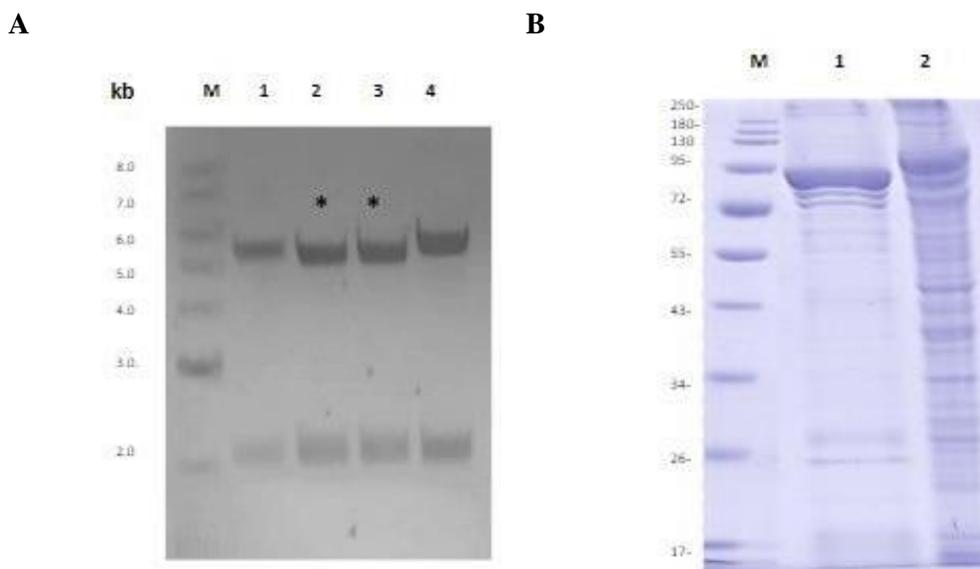


Figura 5. Obtención del vector pET-AKT-2 y expresión de la proteína recombinante. (A) Gel agarosa 1% (p/v) teñido con bromuro de etidio. Tamaño del vector linealizado: 5573 pb. Tamaño gen de la AKT-2 *like*: 2102 pb. Digestión enzimática con NcoI y NotI del vector pET-AKT-2 *like* clones 1, 2 y 3. Se observa en los carriles de izquierda a derecha: **M**: marcador de peso molecular **1**. Vector plantilla pETZT2-AKT2, **2, 3 y 4**. Digestión del pET-AKT-2 *like* clon 1,2 y 3, respectivamente. (B) Fracciones solubles de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el vector pET-TcAKT-2 y pETZT2-AKT2. SDS-PAGE 12%, tinción en azul de Coomassie. Se observa en los carriles de izquierda a derecha: **M**: Marcador de peso molecular, **1**: Fracción soluble de la proteína 6His-AKT-2 (79kDa), **2**: Fracción soluble de la proteína 6His-ZT2-AKT-2. (86.5 kDa).

3.3. Expresión y purificación de la proteína recombinante 6His-AKT2-*like*

Se evaluó la expresión de la proteína 6His-AKT-2 *like* obtenida tanto del vector pET-TcAKT-2 previamente construido, como del vector comercial pET28a-AKT-2. Se compararon los extractos de proteínas totales de *E. coli* pre y post inducción como se observa en la figura 6. El peso teórico de la proteína AKT-2 *like* es 78 kDa, no obstante, con la etiqueta 6His, se espera un peso molecular aproximado de 79 kDa. Las figuras 6A y 6B muestran la expresión de la proteína en células *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el vector pET-TcAKT-2 y el vector pET28a-AKT-2, respectivamente. Los carriles 1 y 3 corresponden a las proteínas totales de los lisados bacterianos no inducidos, donde no hay expresión de la proteína recombinante 6His-AKT-2 *like* (79 kDa), en comparación a los carriles 2 y 4 donde hubo inducción y hay una expresión de la proteína en el

tamaño esperado.

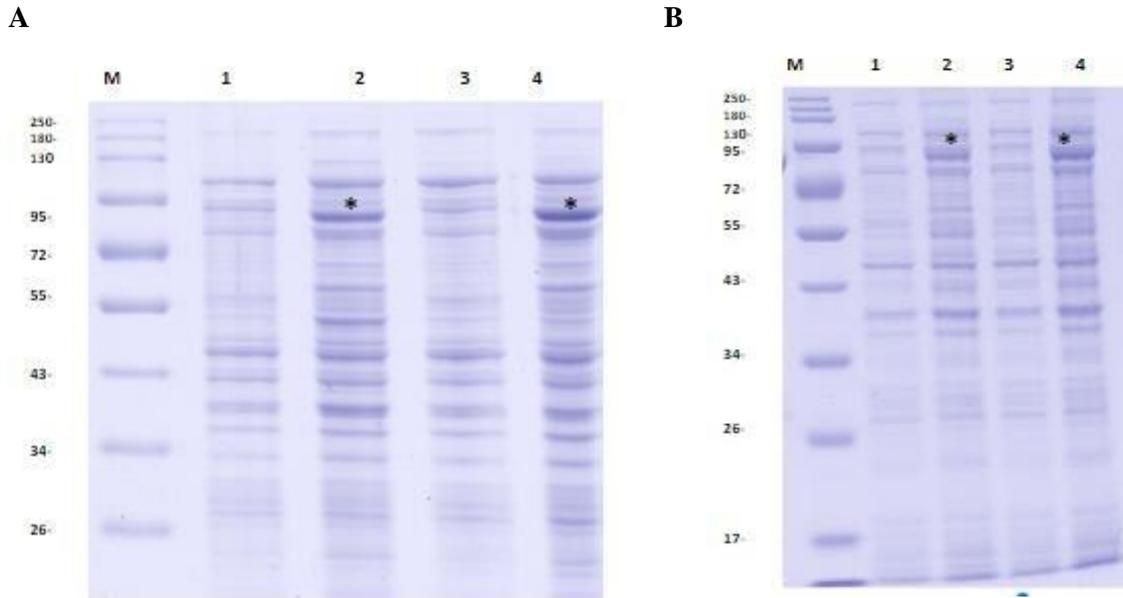


Figura 6: Expresión de la proteína 6His AKT-2 like en *E. coli* BL21. SDS PAGE 12%, tinción en azul de Coomassie. (A) Células *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el vector pET-TcAKT-2. Se observa en los carriles de izquierda a derecha: **M:** Marcador de peso molecular **1 y 3:** proteína total no inducido **2 y 4:** proteína total inducido clon 1 y 2 respectivamente (B) células *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el vector pET28A-AKT-2. **M:** Marcador de peso molecular, **1 y 3:** proteína total no inducido, **2 y 4:** proteína total inducido clon 1 y 2, respectivamente.

Con el propósito de comparar el rendimiento en la producción de la proteína a partir de ambos vectores (pET-TcAKT2 y pET28a-AKT2) se realizó la purificación de la proteína 6His-AKT-2 like mediante cromatografía de afinidad a níquel como se observa en la figura 7. Para ambas purificaciones se observa que una concentración de 300 mM de imidazol logra la purificación parcial de la proteína 6His-AKT2 like. La concentración de la proteína purificada a partir del vector pET-TcAKT2 fue de 0.52 mg/ml (figura 7A) y para la proteína purificada a partir del vector pET28a-AKT2 (figura 7B) fue de 0.61 mg/ml. Partiendo en ambos casos de 1L de cultivo bacteriano, el rendimiento más alto se obtuvo con el vector pET28a-AKT2.

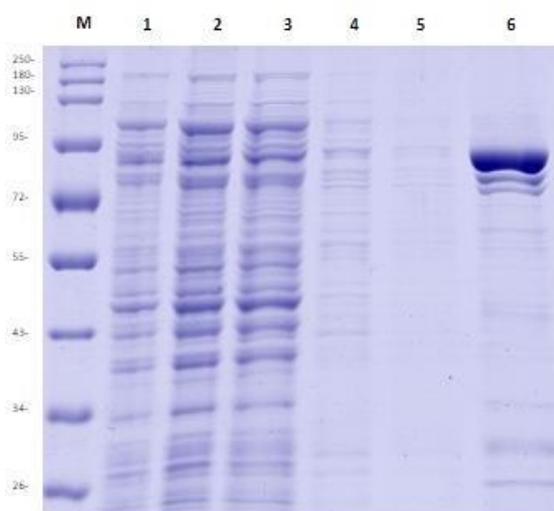
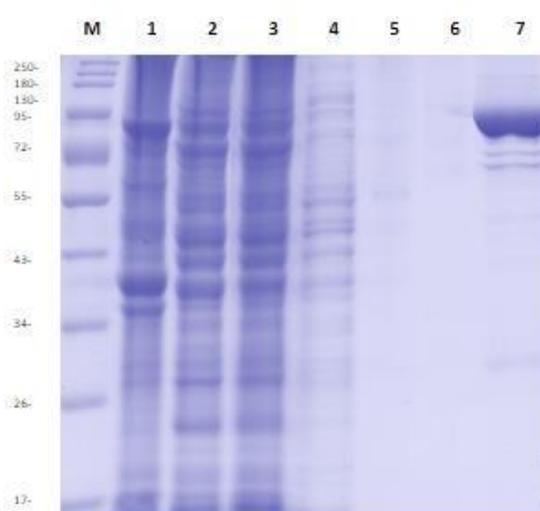
A**B**

Figura 7: Purificación por afinidad a níquel de la proteína 6His- AKT-2 like expresada a partir de los vectores pET-TcAKT-2 y pET28a-AKT-2. SDS PAGE 12% tinción en azul de Coomassie. **(A)** *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el vector pET-TcAKT-2. Se observa en los carriles de izquierda a derecha: **M:** Marcador de peso molecular **1:** fracción soluble, **2:** proteínas no unidas, **3:** lavado 1 (50 mM Tris, 1M NaCl, 10 mM Imidazol pH 8.0), **4:** Lavado 2 (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 25 mM Imidazol pH 8.0), **5:** lavado 3 (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 35 mM Imidazol pH 8.0), **6:** Elución (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 300 mM Imidazol pH 8.0). **(B)** *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el vector pET28a-AKT-2. **M:** Marcador de peso molecular **1:** fracción insoluble, **2:** fracción soluble, **3:** proteínas no unidas, **4:** lavado 1 (50 mM Tris, 1 M NaCl, 10 mM Imidazol pH 8.0), **5:** lavado 2 (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 25 mM Imidazol pH 8.0), **6:** lavado 3 (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 35 mM Imidazol pH 8.0), **7:** elución (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 300 mM Imidazol pH 8.0).

Teniendo en cuenta que se obtuvo un mejor rendimiento con el vector pET28a-AKT2, se continuó el trabajo con este vector y se procedió a realizar la estandarización de la purificación. Se emplearon dos tipos de buffer a diferentes pH, con el fin de optimizar el rendimiento del proceso como se observa en la figura 8. Se evaluó el buffer Tris (50 mM Tris-HCl pH 7.0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol) y el buffer fosfato (KH₂PO₄/K₂HPO₄ 50 mM pH 6.0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol). En la figura 8A se observa la purificación con el buffer fosfato pH 6.0, donde se obtuvo en el eluido a 300 mM de imidazol una concentración de 0.66 mg/ml de la recombinante. En la

figura 8B con el buffer Tris-HCl se obtuvo una concentración de la proteína de 0.97 mg/ml mostrando un mayor rendimiento. Para ambas concentraciones se partió de 1L de cultivo bacteriano.

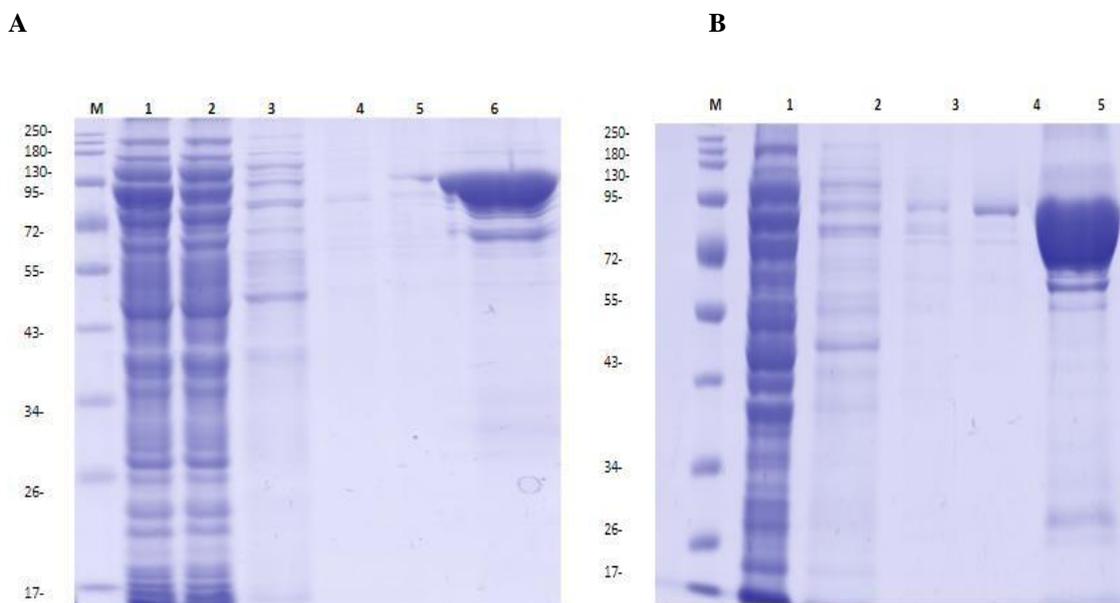
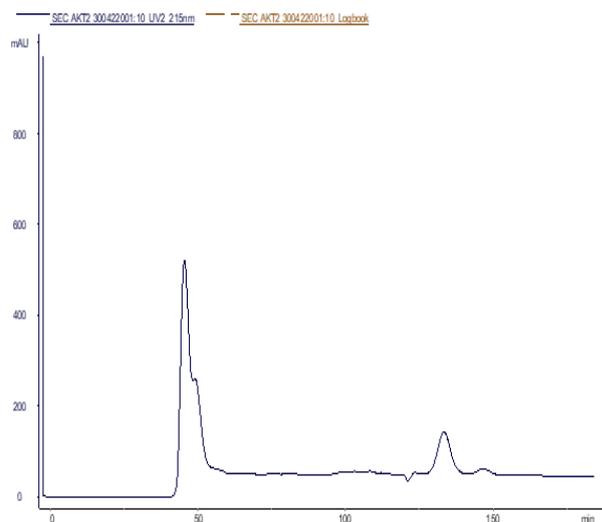


Figura 8. Purificación por afinidad a níquel de la proteína 6xHis AKT-2 like. SDS PAGE 12% tinción en azul de Coomassie. **(A)** *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el vector pET28a-AKT-2 buffer fosfato (50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol pH 6.0). Se observa en los carriles de izquierda a derecha: **1:** fracción soluble, **2:** proteínas no unidas, **3:** lavado 1 (50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 1 M NaCl, 10 mM Imidazol), **4:** lavado 2 (50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 300 mM NaCl, 25 mM Imidazol), **5:** lavado 3 (50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 300 mM NaCl, 35 mM Imidazol) **6:** Elución (50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 300 mM NaCl, 300 Mm Imidazol). **(B)** *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el vector pET28a-AKT-2 buffer Tris (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol pH 7.0). Se observa en los carriles de izquierda a derecha: **1:** proteínas no unidas, **2:** lavado 1 (50 mM Tris, 1 M NaCl, 25 mM Imidazol), **3:** lavado 2 (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 25 mM Imidazol), **4:** Lavado 3 (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 35 mM Imidazol), **5:** Elución (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 300 mM Imidazol).

Con los eluidos obtenidos de la purificación por afinidad a níquel a partir del vector pET28a-AKT-2 se procedió a realizar cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) con el fin de mejorar la purificación de la proteína. En la figura 9 se observa la purificación con buffer SEC Tris (50 mM Tris, 200 mM NaCl pH 7.0) donde se inyectó en la columna 2 ml de proteína a una concentración de 1,46 mg/ml con un tiempo de retención de 50 minutos. En la figura 10 se observa

la purificación con el buffer SEC fosfato (50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 200 mM NaCl, pH 6.0), la proteína inyectada tenía una concentración de 1.23 mg/ml. Para ambas purificaciones la proteína con mayor pureza se observa en los carriles 1 y 2, respectivamente.

A



B

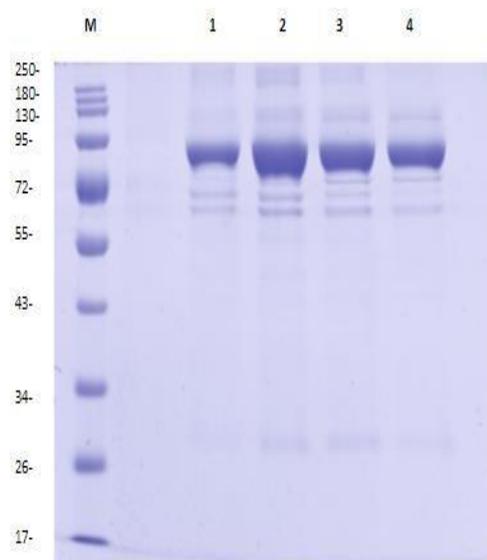


Figura 9: Purificación de exclusión de tamaño (SEC) de la proteína 6His AKT-2 like vector pET28a-AKT-2 (buffer Tris) (A) Cromatograma obtenido en una columna Superdex 75 pg Hiloal 16/600 monitorizada mediante el registro de la absorbancia a 280 nm en buffer SEC (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl pH 7.0) (B) SDS PAGE 12% tinción en azul de Coomassie. Se observa en los carriles de izquierda a derecha: **1: Fracción B4, **2:** Fracción B3, **3:** proteínas B2, **4:** Fracción B1 presentes en el primer pico del cromatograma.**

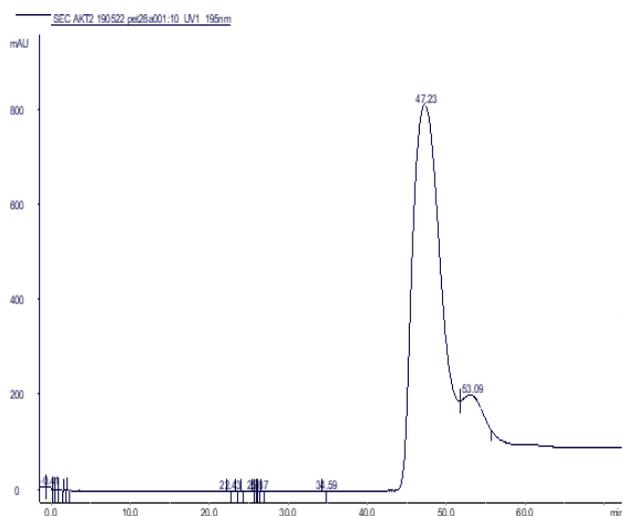
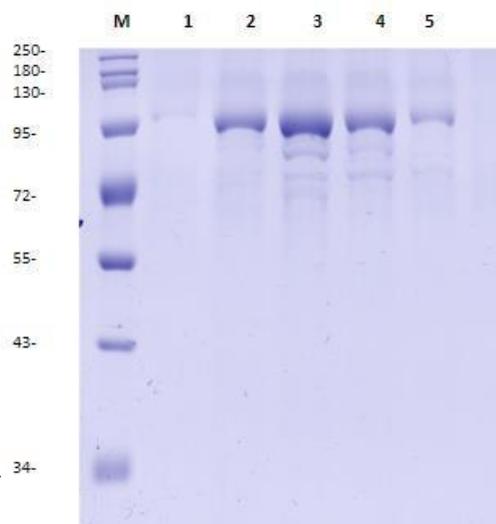
A**B**

Figura 10: Purificación de exclusión de tamaño (SEC) de la proteína 6His AKT-2 *like* vector pET28a-AKT-2 (buffer fosfato) (A) Cromatograma obtenido en una columna Superdex 75 pg Hiload 16/600 monitorizada mediante el registro de la absorbancia a 280 nm en buffer SEC (50mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, 200mM NaCl pH 6.0) (B) SDS PAGE 12% tinción en azul de Coomassie. Se observa en los carriles de izquierda a derecha: **1: fracción B4, **2:** fracción B3, **3:** fracción B2, **4:** fracción B1 presentes en el primer pico del cromatograma.**

3.4 Actividad quinasa de la proteína 6His AKT2 *like*

Con la proteína recombinante purificada se realizó la determinación de la actividad quinasa mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas en fase sólida (ELISA) como se observa en la figura 11. En el gráfico se observa el control positivo de actividad quinasa con la AKT-1 *like* de *T. cruzi*, en una concentración de 200 ng representado en color verde oscuro. Esta proteína fue expresada y purificada en nuestro grupo de investigación y su actividad quinasa fue confirmada previamente mediante esta metodología. La actividad de la proteína AKT-2 *like* fue evaluada en concentraciones de 400 ng, 800 ng y 1200 ng. Con los resultados preliminares obtenidos en este ensayo se determinó una actividad basal, sin embargo, no se logró medir una actividad proporcional a la cantidad de enzima.

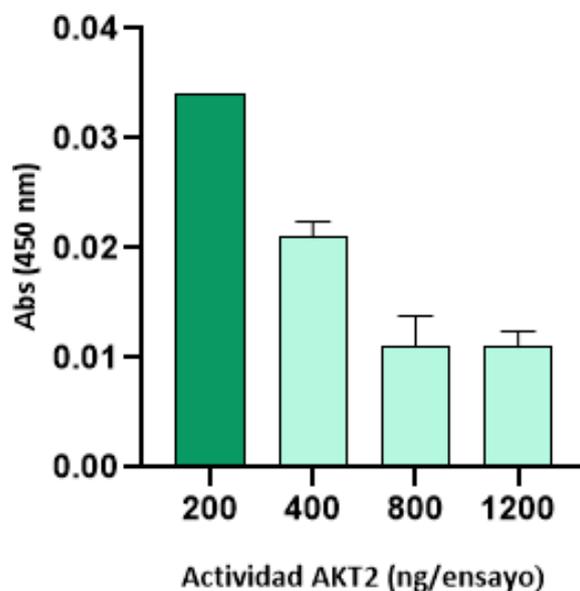


Figura 11: Determinación de la actividad quinasa de la proteína AKT-2 like mediante Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas en fase sólida. Se observa el control positivo de actividad de la AKT-1 de *T. cruzi*, en una concentración de 200 ng representado en color verde oscuro. La actividad de la proteína AKT-2 fue evaluada en concentraciones de 400 ng, 800 ng y 1200 ng.

3.5. Obtención del vector pET28a-ΔNtAKT-2 y expresión del dominio quinasa en *E. coli* BL21 (DE3).

Con el objetivo de evaluar la actividad exclusivamente del dominio quinasa de la proteína AKT-2-like, se obtuvo el vector pET28a-ΔNtAKT-2 mediante mutagénesis dirigida. En este caso, el vector plantilla pET28a-AKT2 tiene un tamaño de 7411 pb, teniendo en cuenta la delección realizada de 972 pb, se espera que el nuevo vector pET28a-ΔNt AKT-2 presente un tamaño de 6439 pb, este resultado es observado en la figura 12A (carriles 2 y 3) al linealizar el vector con la enzima BamHI. Este nuevo constructo permitió la expresión de la versión delecionada de la proteína como se observa en la figura 12B, donde se observa en el carril 1 el lisado bacteriano pre inducción, en el carril 2 la fracción insoluble, donde se observa la expresión del dominio quinasa (34 kDa) y en el carril 3 la fracción soluble. La proteína se expresa mayoritariamente como en la

fracción insoluble como cuerpos de inclusión, impidiendo la determinación de su actividad quinasa.

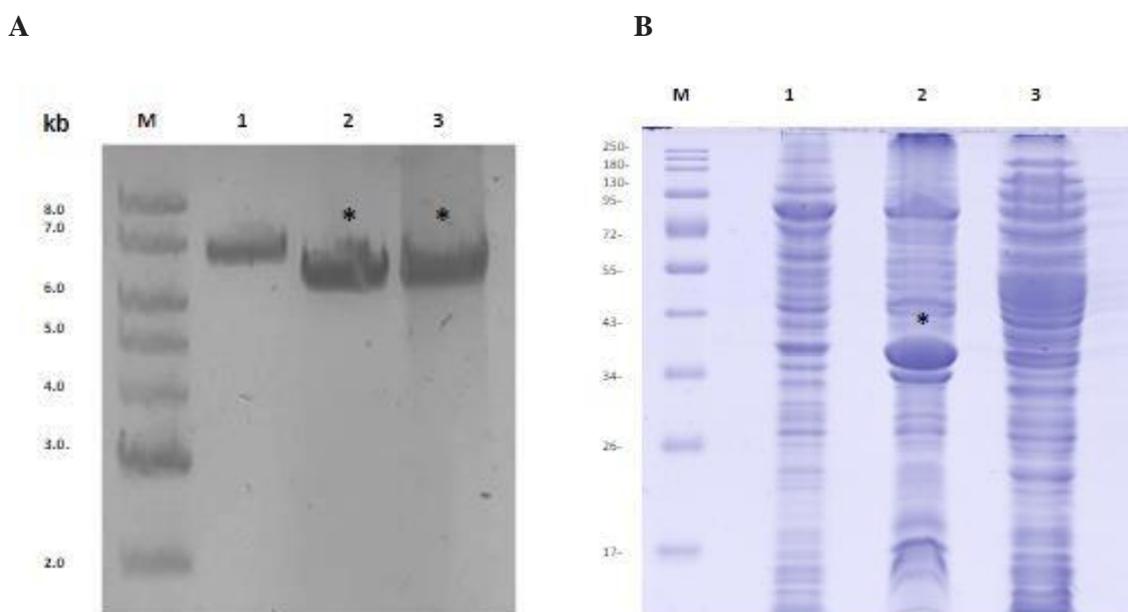


Figura 12: Obtención del vector pET28a- Δ Nt AKT-2 y expresión del dominio quinasa en *E. coli* BL21 (DE3) (A) Gel agarosa 1% (p/v) teñido con bromuro de etidio. Digestión del vector pET28a- Δ Nt AKT-2 con enzima BamHI. Se observa en los carriles de izquierda a derecha: **M**: marcador de peso molecular **1**. vector plantilla pET28a-AKT-2, **2**: digestión del clon 1, **3**: digestión del clon 2. **(B)** SDS PAGE 12%, tinción en azul de Coomassie. Células *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el vector pET28a- Δ Nt AKT-2. **1**. proteína total no inducido, **2**: fracción insoluble, **3**: fracción soluble.

3.6 Detección de la proteína endógena AKT-2 like en extractos de proteínas totales de epimastigotes de *T. cruzi* cepa tulahuen y Gal61S y detección de la proteína recombinante 6His AKT-2 like.

La proteína purificada se empleó como antígeno para la producción de los anticuerpos. Los cuales se purificaron por afinidad y se evaluaron en ensayos de western blot. Se puede observar en la figura 13A el reconocimiento de los anticuerpos policlonales de conejo (anti-AKT-2 like) hacia la proteína recombinante. Para la estandarización del ensayo fueron usadas varias diluciones del anticuerpo primario, siendo la dilución 1:1600 la que mostró una mayor especificidad hacia la

proteína, sin embargo, se observan uniones inespecíficas del anticuerpo. El western blot de la figura 13B fue usado con un control con el anticuerpo Anti-6X His tag, para corroborar la detección con la recombinante.

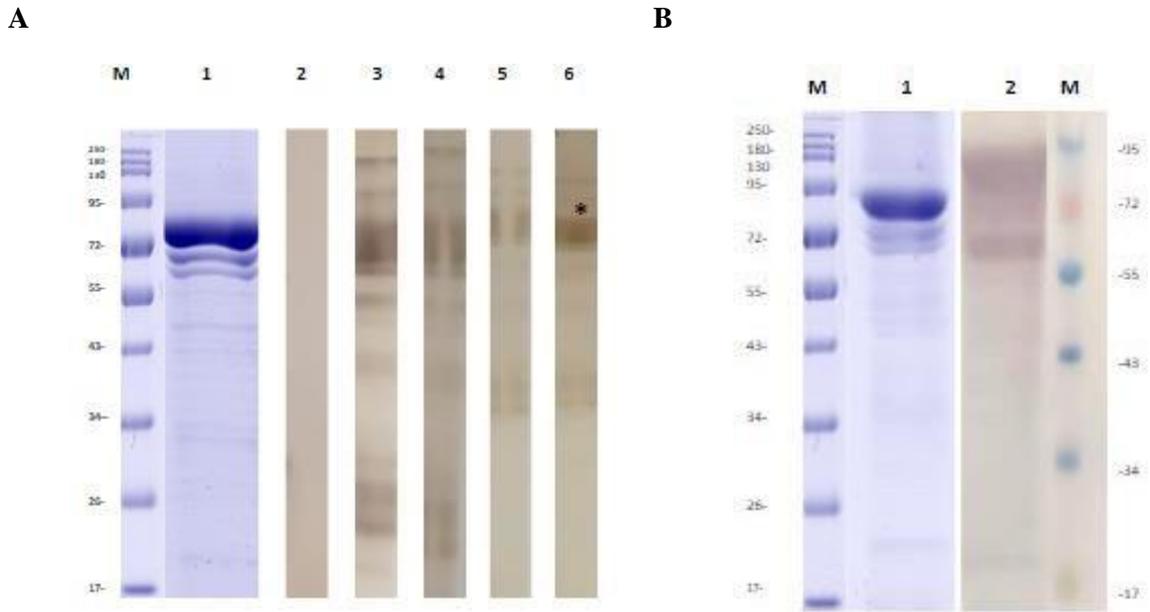


Figura 13: Detección de la proteína recombinante AKT-2. con anticuerpo policlonal anti AKT-2 y anticuerpo anti 6His (A) M: marcador de peso molecular **1:** SDS PAGE 12% tinción en azul de Coomassie: Proteína recombinante AKT-2 6His **2:** control suero pre-inmune **3, 4, 5, 6:** anticuerpo primario anti-AKT2 dilución 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 respectivamente **(B):** detección de la proteína recombinante AKT-2 *like* con anticuerpo anti 6His. **M:** marcador de peso molecular, **1:** SDS PAGE 12% tinción en azul de Coomassie: Proteína recombinante AKT-2 *like*, **2:** Western blot en membrana de PDVF con anticuerpo primario anti-6xHis dilución 1:10000. Para ambas detecciones fue usado el anticuerpo secundario anti-conejo IgG conjugado a peroxidasa

Adicionalmente, se realizó la evaluación de los anticuerpos policlonales anti AKT-2 *like* con las proteínas recombinantes AKT-1 *like* y AKT-2 *like* de *T. cruzi*, con el fin de determinar si hay un doble reconocimiento por parte de los anticuerpos obtenidos. Como se observa en la figura 14, se confirmó el reconocimiento de ambas proteínas, la proteína AKT-1 *like* con un peso molecular de 56 kDa y la proteína AKT-2 *like* con un peso molecular de 79 kDa.

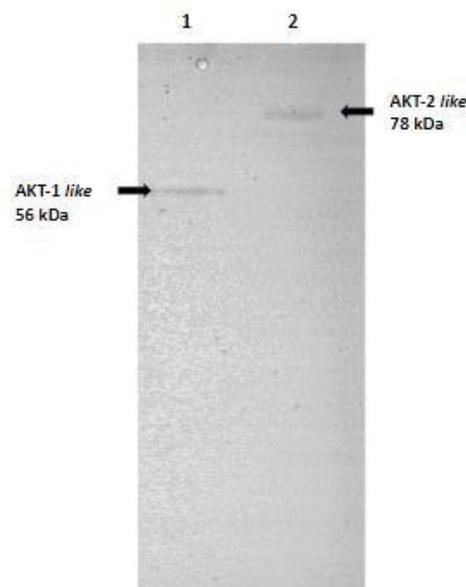


Figura 14: Detección de la proteína recombinante AKT-2 *like* y AKT-1 *like* con anticuerpo policlonal anti AKT-

2. 1: Detección de la proteína AKT-1 *like* en membrana de PDVF **2:** detección de la proteína AKT-2 *like*. Para ambas proteínas se usó el anticuerpo primario anti AKT-2 dilución 1:7000 y el anticuerpo secundario anti rabbit marcado con HRP en dilución 1:10000.

Se realizó la detección de la proteína endógena AKT-2 *like* en epimastigotes de las cepas *T. cruzi* tulahuen y Gal 61S (M.RATTUS/CO/91/GAL-61c111) mediante sistema de revelado de peroxidasa y fluorescencia con el anticuerpo anti rabbit IgG H&L. En la figura 15 se observa la detección de una banda entre 95-72 kDa, indicando la presencia de la proteína en este estadio parasitario. Se observa la detección de dos bandas en la figura 16 que por tamaño pueden corresponder a la primera AKT reportada (AKT-1 *like*) y a la AKT-2 *like*, con un peso molecular de 56 KDa y 79 kDa, respectivamente. Esto corrobora el resultado obtenido en la figura 14, donde los anticuerpos policlonales de conejo anti AKT-2 *like* reconocen también la AKT-1 *like*, debido posiblemente a la identidad compartida del 45% que presentan ambas proteínas, y sumado a los tres dominios funcionales PH, ACG y PK que poseen.

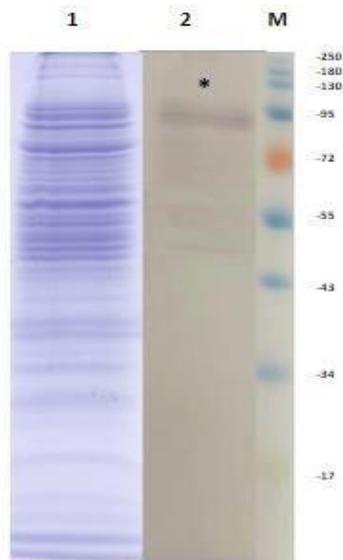


Figura 15: Detección de la proteína endógena AKT-2 like en proteínas totales de la cepa *T. cruzi* tulahuen .M: marcador de peso molecular, **1.** SDS PAGE 12% tinción azul de coomassie: proteínas totales de epimastigotes de *T. cruzi tulahuen*, **2:** detección de la proteína endógena AKT-2 en membrana de PDVF con sistema de revelado de peroxidasa, dilución 1:5000 anticuerpo primario anti AKT-2 y dilución 1:10000 anticuerpo secundario anti rabbit marcado con HRP

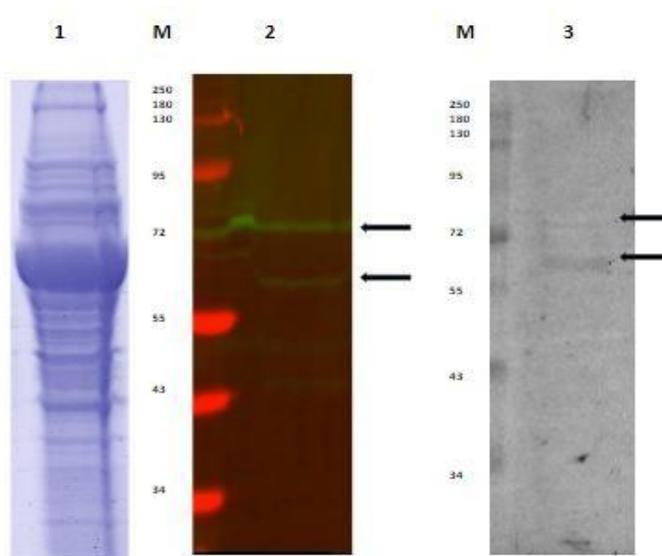


Figura 16: Detección de la proteína endógena AKT-2 like en proteínas totales de *T. cruzi* Gal61S 1: SDS PAGE 12% tinción azul de coomassie: proteínas totales de epimastigotes de *T. cruzi* Gal61S, **2:** detección de la proteína endógena AKT-2 en membrana de PDVF, dilución 1:7000 anticuerpo primario anti AKT-2 y dilución 1:20000 anticuerpo secundario anti rabbit IgG H&L **3:** detección de la proteína endógena AKT-2, dilución 1:10000 anticuerpo primario anti AKT-2 y dilución 1:20000 anticuerpo secundario anti rabbit IgG H&L .

DISCUSIÓN

Con las concentraciones obtenidas para la recombinante 6His-AKT-2 *like* a partir de la purificación mediante cromatografía a metales inmovilizados, se determinó un rendimiento más alto con el vector pET28a-AKT2 que con el pET-TcAKT2. Se ha reportado la importancia de factores como la optimización de codones para maximizar el rendimiento en la obtención de proteínas recombinantes expresadas en sistemas heterólogos como *E. coli*. Esto es debido a que las diferencias en el uso de codones entre procariotas y eucariotas causa un impacto significativo a la hora de la producción de proteínas heterólogas, donde la presencia de codones raros en genes clonados, afecta el nivel de expresión de las proteínas, del mRNA y la estabilidad del plásmido. A su vez, la alta cantidad de estos codones, puede provocar alteraciones en los ribosomas, llevando a errores en la traducción y a la formación de estructuras secundarias que pueden afectar los niveles de transcripción. También, puede verse afectada la síntesis de proteínas, el crecimiento celular y el ARNt en células *E. coli*. [26]. Se ha demostrado, que los codones AGA y AGG son particularmente raros y causan errores en la traducción, así como niveles más bajos de expresión de proteínas [27]. Debido a lo mencionado, al realizar la optimización del gen heterólogo en el vector pET28a-AKT2 para su expresión eficiente en *E. coli*, aseguramos un aumento en el nivel de expresión de la proteína recombinante, así como la promoción del crecimiento de la célula huésped después de la inducción de IPTG.

Adicionalmente, con el fin de mejorar el rendimiento y la purificación de la recombinante, se tuvo en cuenta el punto isoeléctrico teórico de la misma (8.47); cuando el entorno tiene un valor de pH igual al punto isoeléctrico, la carga neta de la proteína es cero, por lo cual, no se da una interacción con las cargas del medio, generando un deficiente rendimiento del método de purificación [28]. Debido a esto, empleamos dos buffer a un pH menor a el punto isoeléctrico, aquí los grupos ionizables se encuentran protonados y por ende, la carga neta de la proteína es positiva, optimizando así el rendimiento. Se determinó que el buffer Tris pH 7.0 para la purificación de la

proteína 6His AKT2 *like* es más eficiente que el buffer fosfato a pH 6.0, esto puede deberse también a que la afinidad de proteínas etiquetadas con IMAC normalmente se realiza a un pH neutro o ligeramente básico para garantizar que los grupos histidina imidazol no se protonen [29]. Estos resultados ayudan a experimentos posteriores orientados a la caracterización estructural y dinámica de la proteína que implican altos rendimientos y muestras altamente purificadas, así como buffer adecuados que actúen como amortiguadores para regular el pH, como espectroscopia de resonancia magnética nuclear y cristalografía de rayos X.

Ahora bien, continuando con la determinación de la actividad enzimática de este nuevo candidato, aunque sabemos que presenta el dominio quinasa conservado, su actividad no fue determinada a totalidad. Se observó una mayor actividad en las menores concentraciones evaluadas, sin embargo, se espera una actividad dependiente de la cantidad de enzima, por lo cual, es necesario la evaluación de la estabilidad e integridad en el tiempo de la proteína, ya que la rápida degradación de la proteína puede afectar la capacidad de fosforilación del péptido. Así mismo, suponemos, que la proteína AKT2 *like* podría necesitar de un paso de activación adicional, posiblemente requiere cofactores como el ZINC, teniendo en cuenta su dominio adicional FYVE/PHD, para llevar a cabo la fosforilación. También, es importante considerar que esta proteína puede presentar diversas funciones que no conocemos además de su actividad quinasa, teniendo en cuenta el dominio adicional (FYVE/PHD) puede actuar en procesos de modificación transcripcional, o tener mecanismos de activación específicos que no permitieron obtener un resultado concluyente de actividad enzimática.

Con el fin de determinar si la proteína AKT2 *like* presentaba actividad quinasa, aun sin el dominio PH y N-terminal como ha sido lo reportado para las AKT humanas [30], se expresó la recombinante a partir del vector pET28a- Δ NtAKT-2, sin embargo, la proteína fue expresada como cuerpos de inclusión. En *E. coli*, múltiples factores pueden contribuir a la formación de estos agregados proteicos, usualmente cuando el nivel de expresión de la proteína supera el 2% del total de las proteínas celulares totales se forman cuerpos de inclusión, también, un fuerte

sistema promotor, alta concentración de inductores y copias del gen favorecen el agregamiento proteico [31]. Con la delección del dominio PH y del dominio N terminal, se pudo generar un mal plegamiento de la proteína, lo que pudo conducir a un estrés celular al momento de la inducción, al someter a la bacteria a la producción de elevadas concentraciones de la proteína y, por ende, a la formación de cuerpos de inclusión. Se pueden emplear técnicas para la solubilización de los cuerpos de inclusión como la lisis bacteriana mediante métodos mecánicos, no mecánicos o la combinación de ambos, así como varios pasos de lavado con bajas concentraciones de agentes desnaturizantes, sacarosa o detergentes. La separación de los cuerpos de inclusión del resto de los componentes presentes en el lisado celular se puede lograr también mediante la centrifugación, la ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa y la microfiltración [32].

Finalmente, con la detección de la proteína endógena en epimastigotes de *T. cruzi* corroboramos por primera vez la presencia de esta proteína en el parásito, esto abre un precedente para su detección en futuros ensayos en los diferentes estadios, que permitan dilucidar de mejor manera su posible papel en los procesos biológicos del parásito, así como en su mecanismo de infección. Se ha reportado que la serina/treonina quinasa B o AKT ha sido conservada desde los metazoos primitivos hasta los humanos y ha surgido como una molécula de señalización crítica dentro de las células eucariotas. [33] Se han encontrado tres isoformas de la PKB en mamíferos, la PKBa (AKT1) detectada de forma ubicua, la PKBb (AKT2) expresada en tejidos sensibles a la insulina y la PKBg (AKT3) encontrada principalmente en el cerebro. Cada una de estas isoformas están codificadas por un gen individual, pero comparten más del 80 % de aminoácidos en secuencia y una organización estructural comparable que incluye tres dominios funcionales: un dominio amino-terminal regulatorio, que incluye un dominio de homología pleckstrin (PH), un dominio quinasa donde se encuentra un residuo conservado de Thr308 necesario para la fosforilación y una región carboxi-terminal que cuenta con una Ser473 y contiene el motivo hidrofóbico, una característica de quinasas AGC necesaria para la inducción y mantenimiento de la actividad quinasa [34, 35].

Las quinasas muestran funciones cruciales en el metabolismo y son proteínas conservadas a lo largo de la evolución. Está claro que los tripanosomátidos exhiben un genoma alto en plasticidad y la alta diversidad genómica entre los linajes de *T. cruzi* pueden originarse a través de diferentes eventos de recombinación intragénica, su polimorfismo genético hace que estos parásitos puedan presentar isoenzimas, como en este caso, donde el parásito presenta una posible isoforma de la primera *AKT-like* reportada y puede darse su asociación con diversos procesos y ubicaciones celulares, como es lo observado en humanos donde existen tres isoformas con localizaciones subcelulares y funciones fisiológicas diferentes [36]. Se ha reportado que diferentes isoformas de la AKT humanas pueden estar asociadas con distintas alteraciones en procesos biológicos aguas abajo y su modo de acción es diferente en cada una, donde se han identificado proteínas que interactúan con uno o más de los dominios funcionales de AKT, y con una o más de sus isoformas, como es el caso de la PDK1, inosina-5' monofosfato deshidrogenasa (IMPDH), la histona H3 metiltransferasa SETDB1, y la proteína fosfatasa de repetición rica en leucina de dominio (PHLPP). También, otras proteínas que interactúan con AKT carecen de actividades enzimáticas intrínsecas discernibles, esto sugiere que sus interacciones con una o más regiones de las isoformas afectan la actividad quinasa de la AKT, el acceso a componentes reguladores aguas arriba, o a su localización intracelular, por ejemplo, en el dominio quinasa interactúan proteínas con dedos de zinc (BTB/POZ), en el dominio PH la oncoproteína Tcl-1, y con el C terminal la proteína de choque térmico 90 (Hsp90) [37].

En cuanto al dominio adicional de la *AKT-2 like*, se ha descrito que los dominios FYVE son pequeños dominios similares a los dedos de zinc de alrededor de 70-80 aminoácidos presentes de manera conservada en una amplia gama de proteínas eucariotas. Actúan en el tráfico de membranas que reconoce específicamente el fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3-P); reclutan varias proteínas a membranas enriquecidas con PI3-P y dirigen las proteínas a los endosomas uniéndose específicamente al fosfatidilinositol-3-fosfato en la membrana. Se ha reportado su papel en la regulación de la homeostasis de la endomembrana, incluida la unión del endosoma, el reciclaje endocítico, la clasificación de proteínas de membrana y la maduración del autofagosoma [38].

Estas proteínas generalmente se localizan en compartimentos subcelulares específicos, como endosomas tempranos, vesículas internas de cuerpos multivesiculares y fagosomas. En cuanto a su estructura, el dominio tiene ocho posibles posiciones de cisteína coordinadoras de zinc y se caracteriza por la presencia de aminoácidos alrededor de las cisteínas, posee tres secuencias conservadas: el N-terminal WxxD, un motivo básico en el primera cadena B (R/K)(R/K)HHCRxCG, que genera un carga positiva para formar un sitio de unión compacto con el PI(3)P y un motivo RVC C-terminal [39]. Los dominios FYVE se unen al PtdIns(3)P y dirigen una amplia variedad de proteínas citosólicas a las membranas durante los procesos de señalización celular, esto es realizado mediante un mecanismo general de anclaje a membrana que implica contactos electrostáticos no específicos con lípidos de la membrana celular, activación del interruptor de histidina, inserción hidrofóbica en las bicapas y en algunos casos ladimerización, todo esto en conjunto, contribuye a la especificidad del dominio FYVE y la afinidadpor PtdIns(3)P incrustado en membranas. Se ha reportado el bloqueo en el reclutamiento de proteínas FYVE en endosomas y vacuolas de levadura por eliminación de PI3K, mutaciones de residuos conservados del dominio FYVE, o por la presencia del inhibidor quinasa wortmannin [39].

El dominio PHD, es un dedo de zinc tipo C4HC3, estos residuos de cisteína e histidina coordinan y estabilizan el pliegue de la proteína a través de su unión con iones de zinc. Estos dominios son encontrados en un gran número de factores reguladores de la cromatina y son ampliamente distribuidos en todo el proteoma eucariota, teniendo una ubicación universalmente nuclear. Se ha demostrado que el dominio PHD del factor de transcripción WSTF tiene un pliegue con sorprendente similitud con la del dominio FYVE, en la proteína supresora de tumores ING2, se reporta la unión específica al fosfatidilinositol 5-fosfato (PI(5)P) y los residuos básicos implicados en este reconocimiento son necesarios para la regulación de las vías apoptóticas dependientes de p53 para esta proteína [40].

Teniendo en cuenta el dominio adicional de este nuevo candidato y las funciones de las proteínas

que cuentan con el dominio FYVE, su función puede estar relacionada en la endocitosis y la degradación lisosomal para la absorción de nutrientes, diferenciación y eliminación de opsoninas del huésped, como se ha descrito en otros tripanosomátidos [41]. La endocitosis y secreción se produce por medio de una invaginación especializada de la membrana plasmática llamada bolsillo flagelar, que se encuentra rodeando el flagelo único de estos parásitos, las organelas implicadas en estos procesos: endosomas, cuerpos multivesiculares y aparato de Golgi se encuentran generalmente localizados en las proximidades de la bolsa flagelar [42]. Se ha reportado en *Leishmania major*, la proteína LmFYVE-1 que se une a PtdIns(3)P *in vitro* y tiene la capacidad de dirigirse a proteínas estructurales de la red endosoma-lisosoma tardío, teniendo una especificidad hacia organelas ácidas, esto es importante ya que en la etapa de infección inicial de los tripanosomátidos, estos se encuentran expuestos a condiciones de pH bajas al invadir el fagolisosoma de los macrófagos huéspedes, condiciones que se sabe resultan en la acidificación del parásito [43]. También, en el genoma de *T. brucei* se reportó una GTPasa, que posee un dominio FYVE N-terminal llamada TbFRP, se ha descrito su ubicación a nivel endosomal y su papel como un posible mecanismo alternativo para el anclaje endosomal, con el potencial de integrar pequeñas vías de señalización de GTPasa y el PI(3)P en el parásito [44].

En *T. cruzi*, se han reportado diversas proteínas con el dominio FYVE implicadas en distintos procesos celulares. Se han descrito fosfodiesterasas (PDE) involucradas en la regulación de los niveles intracelulares de AMP cíclico que cuentan con este dominio adicional. La proteína TcrPDEC2 ubicada en el complejo de la vacuola contráctil, presenta un papel importante de osmorregulación, donde parásitos transgénicos sin el dominio FYVE muestran una falla en su orientación al complejo y una marcada disminución en la actividad de PDE, también, el tratamiento con inhibidores de la proteína en epimastigotes mostró una disminución del volumen regulatorio en la vía de señalización del AMP cíclico después del estrés hiposmótico. Se ha informado la proteína TcrPDEC2 interactúa con la subunidad catalítica PKA (TcPKAc) y dos proteínas implicadas en la osmorregulación: TcAQP y una fosfatidilinositol 3 quinasa de clase III (TcVps34), también se encuentra altamente expresada en tripomastigotes metacíclicos, lo que

sustenta la importancia del dominio en el estrés osmótico regulando los niveles a nivel intracelular de este segundo mensajero [45]. Adicionalmente, se ha reportado en *T. cruzi* la identificación de un gen PIK (Tc001047053506425.80) que codifica para un dominio FYVE en la posición N-terminal, la función exacta de este gen FYVE-PIK es desconocida hasta la fecha, pero la presencia del dominio FYVE sugiere un papel en los compartimentos membranosos. La arquitectura FYVE-PIK solo está presente en tripanosomátidos y en virus como *Acanthamoeba mimivirus*, lo que sugiere una adquisición horizontal de genes [46]. En base a lo anterior, se podría investigar si el dominio FYVE de la AKT2 *like* de *T. cruzi* tiene un papel en la fase inicial de infección, actuando en la adhesión, el reconocimiento y la internalización de *T. cruzi* en las células diana del huésped. Se sabe que el reconocimiento del parásito por parte de las células huésped implica la interacción de numerosas moléculas y dominios de la membrana plasmática de la célula huésped y del parásito [47] asegurando así la internalización mediante la activación de los mecanismos de endocitosis desencadenados por varias cascadas de señalización tanto en las células huésped como en el parásito, esto aumenta el calcio citoplasmático y niveles de AMPc; se desencadena la remodelación del citoesqueleto y la asociación del sistema intracelular de endosomas y lisosomas, lo que conduce a la formación de vacuolas parasitóforas [48].

CONCLUSIONES

1. En este trabajo se validó experimentalmente una segunda isoforma de la primera AKT reportada en *T. cruzi*, mediante el sistema heterólogo de *E. coli* que permitió la obtención y purificación de la proteína recombinante a partir de los vectores pET28a-AKT2 y pET-TcAKT2. Con la estandarización realizada para la obtención y purificación de la proteína recombinante AKT-2, se determinó un mejor rendimiento con el buffer Tris pH 7.0, al obtener una mayor concentración de la proteína en comparación con el buffer Tris pH 8.0 Y buffer KPi pH 6.0. La proteína Δ NtAKT-2-6His fue expresada como cuerpos de inclusión, por lo cual no fue usada para la determinación de la actividad quinasa.

2. Se produjeron y evaluaron anticuerpos policlonales anti AKT2 *like* que servirán para futuros ensayos como inmunolocalización e inmunoprecipitación, que permitan dilucidar en posteriores investigaciones, el papel y la localización de esta proteína en el parásito. La detección de la proteína endógena AKT-2 *like* en epimastigotes de la cepa *T. cruzi* tulahuen y Gal61 mediante ensayos de western blot, corroboró la presencia de esta proteína en este estadio parasitario, además, se determinó el reconocimiento de los anticuerpos policlonales anti AKT2 *like*, hacía la primera AKT *like* reportada para *T. cruzi*.
3. La actividad quinasa de la proteína no pudo ser determinada a totalidad, por lo cual, es importante analizar las posibles variables que pueden afectar la medición, si se requieren cofactores para su activación, o si el kit no es el adecuado para este tipo de proteína, así como las concentraciones que se emplearon. Se observó que la proteína recombinante AKT-2 *like* es muy inestable en el tiempo y se degrada rápidamente, por lo cual, este es un factor que pudo haber interferido al momento del ensayo.

PERSPECTIVAS

Se continuarán con ensayos a nivel *in vitro* de la actividad tripanocida y citotóxica de inhibidores dirigidos al dominio quinasa de esta proteína. También, con estudios futuros se pretende establecer el papel biológico de esta proteína en *T. cruzi*, con el fin de contribuir a un mejor entendimiento de la biología básica del parásito que permita dilucidar de mejor manera los mecanismos de supervivencia y resistencia que posee este y así contribuir a nuevos estudios orientados al desarrollo y síntesis de dianas terapéuticas. Este precedente permitirá el desarrollo de inhibidores potenciales que puedan actuar sobre esta vía de señalización intracelular esencial y evaluar su potencial como diana farmacológica para la enfermedad de Chagas.

AGRADECIMIENTOS: Un agradecimiento especial a mis tutores, el profesor Marcel Marín y la estudiante de doctorado Lesly Ortiz, por su acompañamiento y mentoría en este proceso, por

permitirme hacer parte de esta investigación de la cual solo me llevo aprendizajes para mi vida profesional. A mis compañeros de laboratorio, muchas gracias

FINANCIAMIENTO: CODI-Convocatoria programática 2019-2020: Ciencias de la Salud. Acta (2020-33254), Universidad de Antioquia

DECLARACIONES DE INTERES: Ninguno

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1]. Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A. (2016) Actualización en enfermedad de Chagas. *Enferm Infec Microbiol Clin*. 2016;34(2):132–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2015.12.008>

[2]. World Health Organization. (2019). *World Chagas report 2019*. World Health Organization.

[3]. Mejía, A. M., Hall, B. S., Taylor, M. C., Gómez-Palacio, A., Wilkinson, S. R., Triana-Chávez, O., & Kelly, J. M. (2012). Benznidazole-resistance in trypanosoma cruzi is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. *Journal of Infectious Diseases*, 206(2), 220–228. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis331>

[4]. Mejía-Jaramillo, A. M., Fernández, G. J., & Montilla, M. (2012). Sensibilidad al benzonidazol de cepas de Trypanosoma cruzi sugiere la circulación de cepas naturalmente resistentes en Colombia. In *Biomédica* (Vol. 32).

[5]. Biondi, R. M., & Nebreda, A. R. (2003). Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions. In *Biochem. J* (Vol. 372).

[6]. Bachmaier, S. & Boshart, M. Kinetoplastid AGC Kinases. in Protein Phosphorylation in Parasites (eds. Doerig, C., Sp€ath, G. & Martin, W.) 99 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Boschstr., 2013). doi:10.1002/9783527675401

[7]. Shears, S. B. Protein kinases as therapeutic targets. *Pharm. Res.* 17, 1345–1353 (2000).

[8]. Fayard, E.; Tintignac, L.A.; Baudry, A.; Hemmings, B.A. Protein Kinase B/Akt at a Glance. *J. Cell Sci.* 2005, 118, 5675–5678. [CrossRef] [PubMed]

[9.] Robinson, M. J., & Cobb, M. H. (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Current Opinion in Cell Biology*, 9, 180–186.

[10]. MacCorkle, R. A., & Tan, T.-H. (2005). *Mitogen-Activated Protein Kinases in Cell-Cycle Control. Cell Biochemistry and Biophysics*, 43(3), 451–462. doi:10.1385/cbb:43:3:451

[11]. Bahia, D., Oliveira, L. M., Mortara, R. A. & Ruiz, J. C. Phosphatidylinositol-and related-kinases: A genome-wide survey of classes and subtypes in the *Schistosoma mansoni* genome for designing subtype-specific inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380, 525–530 (2009).

[12]. Hanada, M., Feng, J., & Hemmings, B. A. (2004). Structure, regulation and function of PKB/AKT - A major therapeutic target. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1697(1–2), 3–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2003.11.009>

[13]. Mabuchi, S., Kuroda, H., Takahashi, R., & Sasano, T. (2015). The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in ovarian cancer. In *Gynecologic Oncology* (Vol. 137, Issue 1, pp. 173–179). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2015.02.003>

- [14] Prêtre, V., & Wicki, A. (2018). Inhibition of Akt and other AGC kinases: A target for clinical cancer therapy? In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 48, pp. 70–77). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.04.011>
- [15]. Hanada, M., Feng, J., & Hemmings, B. A. (2004). Structure, regulation and function of PKB/AKT - A major therapeutic target. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1697(1–2), 3–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2003.11.009>
- [16]. Parsons, M., Worthey, E. A., Ward, P. N., & Mottram, J. C. (2005). Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. In *BMC Genomics* (Vol. 6). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-6-127>
- [17]. Bahia, D., Oliveira, L. M., Lima, F. M., Oliveira, P., Silveira, J. F. da, Mortara, R. A., & Ruiz, J. C. (2009). The TryPIKinome of five human pathogenic trypanosomatids: *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major*, *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* - New tools for designing specific inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390(3), 963–970. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.10.086>
- [18]. Ochoa, R., Rocha-Roa, C., Marín-Villa, M., Robledo, S. M., & Varela-M, R. E. (2018). Search of allosteric inhibitors and associated proteins of an AKT-like kinase from *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12). <https://doi.org/10.3390/ijms19123951>
- [19]. Ochoa, R., Ortega-Pajares, A., Castello, F. A., Serral, F., Fernández Do Porto, D., Villapulgarin, J. A., Varela-M, R. E., & Muskus, C. (2021). Identification of potential kinase inhibitors within the pi3k/akt pathway of leishmania species. *Biomolecules*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/biom11071037>

- [20]. Brazil, D. P., Park, J., & Hemmings, B. A. (2002). PKB Binding Proteins: Getting in on the Akt. *Cell*, *111*(3), 293–303. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01083-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01083-8)
- [21]. Tirado-Duarte, D., Marín-Villa, M., Ochoa, R., Blandón-Fuentes, G., Soares, M. J., Robledo, S. M., & Varela-Miranda, R. E. (2018). The Akt-like kinase of *Leishmania panamensis*: As a new molecular target for drug discovery. *Acta Tropica*, *177*, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.10.008>
- [22]. Díez, A. F. Caracterización funcional de la quinasa AKT-like de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei* como blanco para una nueva estrategia terapéutica contra la tripanosomiasis. Universidad de Antioquia (2019).
- [23]. Bachmaier, S. & Boshart, M. Kinetoplastid AGC Kinases. in Protein Phosphorylation in Parasites (eds. Doerig, C., Spēath, G. & Martin, W.) 99 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, Boschstr., 2013). doi:10.1002/9783527675401
- [24]. Froger, A., & Hall, J. E. (2007). Transformation of Plasmid DNA into E. Coli using the heat shock method. *Journal of Visualized Experiments*, *6*. <https://doi.org/10.3791/253>
- [25].Fang, L. (n.d.). *Antibody Purification from Western Blotting*. <http://www.bio-protocol.org/e133>
- [26] Menzella, H. G. (2011). Comparison of two codon optimization strategies to enhance recombinant protein production in Escherichia coli. *Microbial Cell Factories*, *10*. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-15>
- [27]. Zhou, Z., Schnake, P., Xiao, L., & Lal, A. A. (2004). Enhanced expression of a recombinant

malaria candidate vaccine in *Escherichia coli* by codon optimization. *Protein Expression and Purification*, 34(1), 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2003.11.006>

[28]. Kozłowski, L. P. (2021). IPC 2.0: Prediction of isoelectric point and pK_a dissociation constants. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W285–W292. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab295>

[29]. Mishra V. (2020) Affinity Tags for Protein Purification. *Curr Protein Pept Sci*. 2020;21(8):821-830. doi: 10.2174/1389203721666200606220109

[30]. Bradley, E. W., Carpio, L. R., Newton, A. C., & Westendorf, J. J. (2015). Deletion of the PH-domain and leucine-rich repeat protein phosphatase 1 (Phlpp1) increases fibroblast growth factor (Fgf) 18 expression and promotes chondrocyte proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 290(26), 16272–16280. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.612937>

[31]. Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M., & Panda, A. K. (2015). Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. In *Microbial Cell Factories* (Vol. 14, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0222-8>

[32]. Falero-Morejón, A., Brito-Molina, S., González-Acevedo-Forte, D., Serrano-Rivero, Y., Aldama-Paz, G., Pimienta-Rodríguez, (2015). Purificación de los cuerpos de inclusión que contienen la proteína L1 del Virus del Papiloma Humano 16 producidos en la cepa Rosetta de *Escherichia coli*. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*

[33]. Risso, G., Blaustein, M., Pozzi, B., Mammi, P., & Srebrow, A. (2015). Akt/PKB: One kinase, many modifications. In *Biochemical Journal* (Vol. 468, Issue 2, pp. 203–214). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/BJ20150041>

[34]. Fayard, E., Xue, G., Parcellier, A., Bozulic, L., & Hemmings, B. A. (2010). *Protein Kinase*

B (*PKB/Akt*), a Key Mediator of the *PI3K* Signaling Pathway (pp. 31–56).

https://doi.org/10.1007/82_2010_58

[35]. Mahadevan, D.; Powis, G.; Mash, E.A.; George, B.; Gokhale, V.M.; Zhang, S.; Shakalya, K.; Du-Cuny, L.; Berggren, M.; Ali, M.A.; et al. Discovery of a novel class of AKT pleckstrin homology (PH) domain inhibitors. *Mol. Cancer Ther.* 2008, 7, 2621–2632.

[36] Silva, M. C., da Silva Medina, T., Fuzo, C. A., Dias, F. C., Freitas-Castro, F., Fukutani, K. F., Donadi, E.A., Cunha-Neto, E., Cunha, T. M., & Silva, J. S. (2021). Polymorphism in the catalytic subunit of the *PI3K γ* gene is associated with *Trypanosoma cruzi*-induced chronic chagasic cardiomyopathy. *Infection, Genetics and Evolution*, 88. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104671>

[37] Franke, T. F. (2008). Intracellular signaling by Akt: Bound to be specific. In *Science Signaling* (Vol.1, Issue 24). <https://doi.org/10.1126/scisignal.124pe29>

[38] Kutateladze, T. G. (2007). Phosphatidylinositol 3-phosphate recognition and membrane docking by the FYVE domain. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* (Vol.1761, Issue 8, pp. 868–877). <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.03.011>

[39]. Stenmark H, Aasland R, Driscoll PC. (2002) The phosphatidylinositol 3-phosphate-binding FYVE finger. *FEBS Lett.* doi: 10.1016/s0014-5793(01)03308-7. PMID: 11911884.

[40]. DiNitto, J. P., Cronin, T. C., & Lambright, D. G. (2003). Membrane Recognition and Targeting by Lipid-Binding Domains. *Science Signaling*. doi:10.1126/stke.2132003re16

[41] Venkatesh, D., Boehm, C., Barlow, L. D., Nankissoor, N. N., O'Reilly, A., Kelly, S., ... Field, M. C. (2017). Evolution of the endomembrane systems of trypanosomatids, conservation

and specialization. *Journal of Cell Science*, 130(8), 1421–1434. doi:10.1242/jcs.197640 v

[42] Caradonna KL, Burleigh BA. (2011) Mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Adv Parasitol*. 76:33-61. doi: 10.1016/B978-0-12-385895-5.00002-5. PMID: 21884886.

[43]. Mertens, H. D. T., Callaghan, J. M., Swarbrick, J. D., McConville, M. J., & Gooley, P. R. (2007). A high-resolution solution structure of a trypanosomatid FYVE domain. *Protein Science*, 16(11), 2552–2559. <https://doi.org/10.1110/ps.073009807>

[44] Adung'a, V. O., & Field, M. C. (2013). TbFRP, a novel FYVE-domain containing phosphoinositide-binding Ras-like GTPase from trypanosomes. *Experimental Parasitology*, 133(3), 255–264. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.11.007>

[45] Schoijet, A. C., Miranda, K., Medeiros, L. C. S., de Souza, W., Flawiá, M. M., Torres, H. N., Pignataro, O. P., Docampo, R., & Alonso, G. D. (2011). Defining the role of a FYVE domain in the localization and activity of a cAMP phosphodiesterase implicated in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular Microbiology*, 79(1), 50–62. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07429.x>

[46] Oliveira, P., Lima, F. M., Cruz, M. C., Ferreira, R. C., Sanchez-Flores, A., Cordero, E. M., Cortez, D.R., Ferreira, É. R., Briones, M. R. da S., Mortara, R. A., Silveira, J. F. da, & Bahia, D. (2014). *Trypanosoma cruzi*: Genome characterization of phosphatidylinositol kinase gene family (PIK and PIK-related) and identification of a novel PIK gene. *Infection, Genetics and Evolution*, 25, 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.03.022>

[47] Rodríguez-Bejarano OH, Avendaño C, Patarroyo MA. (2021) Mechanisms Associated with *Trypanosoma cruzi* Host Target Cell Adhesion, Recognition and Internalization. *Life (Basel)*.doi: 10.3390/life11060534. PMID: 34207491; PMCID: PMC8227291.

[48] Fernandes MC, Cortez M, Flannery AR, Tam C, Mortara RA, Andrews NW. Trypanosoma cruzi subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion. *J Exp Med*. 2011 May 9;208(5):909-21. doi: 10.1084/jem.20102518.