

## **Identificación y caracterización de nuevas estrategias terapéuticas para el control de las enfermedades protozoarias.**

**Dolores González Pacanowska- Luis M. Ruiz Pérez.** Dpto. Bioquímica y Farmacología Molecular; IPBLN-CSIC, Parque Tecnológico de la Salud, 18100-Armilla (Granada).

Nuestro Grupo de Investigación (BIO199) está considerado por el PAI como grupo consolidado desde 1991. El principal objetivo de nuestras actividades es la búsqueda de nuevos tratamientos para las enfermedades protozoarias tropicales y los proyectos del laboratorio están centrados en procesos que presentan interés por su aplicabilidad al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas aunque abarcan aspectos básicos relacionados con la biología de parásitos protozoos. El grupo de investigación está integrado en consorcios internacionales destinados al descubrimiento de nuevos fármacos, actividad que es necesariamente una iniciativa multidisciplinar y que implica a químicos, farmacólogos, biólogos estructurales y expertos en la bioquímica y biología celular del patógeno. Esta actividad colaborativa ha dado lugar al diseño de nuevos inhibidores basados en el conocimiento de la estructura de las proteínas diana que junto con la información de la relación estructura-actividad han permitido desarrollar un elevado número de nuevos compuestos con actividad antiparasitaria. En la actualidad el grupo está compuesto por 11 personas que incluyen científicos de plantilla, becarios predoctorales, postdoctorales y técnicos.

Determinados procesos metabólicos y enzimas presentan características singulares en protozoos parásitos que son explotables en el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de enfermedades protozoarias de gran impacto. En particular existe una necesidad de nuevas moléculas capaces de inhibir el crecimiento de especies de los géneros *Plasmodium*, *Leishmania* y *Trypanosoma*, agentes causales de enfermedades protozoarias como la malaria, la leishmaniasis o la tripanosomiasis africana y americana, que afectan a millones de personas y para las que no existe tratamiento eficaz.

La actividad del grupo se centra en tres rutas metabólicas de elevado potencial terapéutico:

- (i) La biosíntesis de esteroides**
- (ii) El metabolismo de pirimidinas**
- (iii) La reparación del DNA por escisión de bases**

**(i) Biosíntesis de esteroides en parásitos protozoos de la familia Trypanosomatidae**

Cabe destacar la especial susceptibilidad que presenta los tripanosomátidos a inhibidores de la biosíntesis de esteroides por lo que algunos de estos compuestos están en fase de ser aplicados en la clínica. Hemos establecido que la ruta de biosíntesis de esteroides exhibe en parásitos protozoos una serie de características singulares. Las propiedades cinéticas, la localización intracelular y la función biológica de enzimas como la HMGCoA reductasa (17), farnesil difosfato sintetasa (15), escualeno sintasa (20) y una enzima específica de la síntesis de ergosterol (un esteroide exclusivo de tripanosomátidos), la 24 esteroide metil transferasa (10) difieren significativamente de las del hospedador mamífero. Hemos determinado que la HMGCoA reductasa de *Leishmania* y *Trypanosoma* constituye el único ejemplo de enzima eucariótica soluble que se localiza de forma preponderante en la mitocondria. La HMGCoA sintasa también presenta en estos organismos una localización mitocondrial mientras que la mevalonato quinasa es glicosomal lo que plantea la existencia de una compartimentalización intracelular singular (5). Los esfuerzos para desarrollar inhibidores específicos que puedan tener una utilidad en el tratamiento de la enfermedad se ha desarrollado en el marco de dos proyectos europeos de cooperación internacional coordinados por nuestro grupo. Estos estudios han permitido identificar nuevas cabezas de serie y un conjunto de compuestos con enorme potencial leishmanicida y antichagásico (4, 8, 14).

## **(ii) El metabolismo de pirimidinas**

En relación con la síntesis de pirimidinas, nuestro objetivo era explorar la posibilidad de inhibir de forma específica distintas enzimas de *Plasmodium falciparum*, *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei* con respecto a los ortólogos humanos. Estos organismos dependen de la síntesis *de novo* de pirimidinas para su supervivencia e inhibidores de esta ruta han sido ampliamente utilizados en el tratamiento de distintas enfermedades infecciosas y el cáncer lo que constituye una muestra de su interés terapéutico. Concretamente hemos realizado estudios destinados a identificar nuevos inhibidores de las enzimas dihidrofolato reductasa-timidilato sintasa (11, 19), timidilato quinasa (22) y timidina quinasa como potenciales agentes para el tratamiento de las enfermedades producidas por tripanosomátidos y *Plasmodium*.

Especial atención ha recibido en nuestro laboratorio la enzima desoxiuridina trifosfato nucleótido hidrolasa (3). Inhibidores de esta familia de proteínas presentan interés como

antitumorales o antivirales y dado que pueden actuar de forma sinérgica con antifolatos, el grupo abordó la identificación y caracterización de proteínas con capacidad para hidrolizar el dUTP en protozoos. Como resultado de estos estudios, hemos identificado una nueva familia de proteínas en tripanosomátidos que hidrolizan el dUTP y que se ha denominado **dUTPasas diméricas**, careciendo de homología de secuencia y estructura con dUTPasas típicas eucarióticas triméricas (2, 6). Sabemos que las enzimas diméricas son el resultado de un proceso de evolución convergente o transferencia génica, están presentes en determinados fagos, tripanosomátidos (como únicos representantes eucarióticos) y en diversas eubacterias (12). La resolución de la estructura de la dUTPasa de *Trypanosoma cruzi* (9) constituyó el primer ejemplo de estructura tridimensional de esta clase de enzimas y reveló un nuevo modelo de plegamiento para proteínas que unen nucleótidos. Todo ello ha permitido la identificación de una nueva superfamilia de proteínas, las todo- $\alpha$  nucleótido hidrolasas, que está ampliamente distribuida en la naturaleza (12). Recientemente hemos caracterizado la dUTPasa trimérica de *Plasmodium falciparum* y se han identificado inhibidores altamente selectivos con respecto a la enzima humana (1, 13). La resolución de la estructura de un complejo enzima-inhibidor ha dado lugar a información que ha sido esencial para el establecimiento de las bases moleculares de la inhibición y ha permitido el desarrollo racional de nuevos análogos de nucleósidos del uracilo con actividad antimalárica (23).

### **(iii) Reparación del DNA por escisión de bases**

En relación con la presencia de uracilo en el DNA, estamos llevando a cabo múltiples estudios relacionados con mecanismo de reparación del DNA por escisión de bases (BER) en *Leishmania* y *Trypanosoma* (7, 16, 18, 21). Reviste especial interés el papel de BER en la protección a agentes alquilantes y oxidantes y la caracterización y determinación de la función de las enzimas AP endonucleasa y uracil glicosilasa en la respuesta a estrés oxidativo y la preservación de la integridad genómica.

En la actualidad nuestra actividad sigue centrada en el estudio de las características peculiares de enzimas implicadas en la interconversión y homeostasis de pirimidinas en protozoos. Por otra parte, seguiremos explorando, desde una perspectiva innovadora y utilizando la información contenida en el genoma-proteoma, aspectos novedosos relacionados con las rutas de síntesis *de novo* y recuperación de bases y el control de la inserción de uracil en el DNA.

Por otra parte, queremos identificar el papel del control de los niveles de dUTP y de la reparación por escisión de bases en la integridad genética mediante el empleo de técnicas de knock-out y silenciamiento génico y el análisis de la naturaleza y la frecuencia de mutaciones. Este tipo de estudios se están realizando en *Trypanosoma brucei*, un protozoo donde se pueden realizar con relativa facilidad experimentos de genética reversa. Por otra parte, una actividad mayoritaria del grupo es la búsqueda de potenciales inhibidores de las dUTPasas dimericas de tripanosomátidos. Esta iniciativa constituye un proyecto europeo coordinado por nuestro grupo (Trypobase, GA 223238).

## **PUBLICACIONES RECIENTES Y REPRESENTATIVAS**

- B.O. Baragana, McCarthy, P. Sanchez, C. Bosch-Navarrete, M. Kaiser, R. Brun, J. L. Whittingham, S. M. Roberts, X. X. Zhou, K. S. Wilson, N. G. Johansson, D. Gonzalez-Pacanowska, and I. H. Gilbert.. beta-Branched acyclic nucleoside analogues as inhibitors of *Plasmodium falciparum* dUTPase. *Bioorganic and Medicine Chemistry* 2011 (en prensa)
- V. A. Bernier-Villamor, Camacho, F. Hidalgo-Zarco, J. Perez, L. M. Ruiz-Perez, and D. Gonzalez-Pacanowska. 2002. Characterization of deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase from *Trypanosoma cruzi*. *FEBS Letters* 2002, 526:147-150.
- A.F. Camacho, Hidalgo-Zarco, V. Bernier-Villamor, L. M. Ruiz-Perez, and D. Gonzalez-Pacanowska. Properties of *Leishmania major* dUTP nucleotidohydrolase, a distinct nucleotide-hydrolysing enzyme in kinetoplastids. *Biochemical Journal* 2000, 346 :163-168.
- S.B. Cammerer, S. B., C. Jimenez, S. Jones, L. Gros, S. O. Lorente, C. Rodrigues, J. C. Rodrigues, A. Caldera, L. M. Ruiz Perez, W. da Souza, M. Kaiser, R. Brun, J. A. Urbina, D. Gonzalez Pacanowska, and I. H. Gilbert. Quinuclidine derivatives as potential antiparasitics. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2007, 51:4049- 4061.
- J. Carrero-Lerida, J., G. Perez-Moreno, V. M. Castillo-Acosta, L. M. Ruiz-Perez, and D. Gonzalez-Pacanowska. 2009. Intracellular location of the early steps of the isoprenoid biosynthetic pathway in the trypanosomatids *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. *International Journal of Parasitology* 2009, 39:307-314.
- V.M. Castillo-Acosta., A. M. Estevez, A. E. Vidal, L. M. Ruiz-Perez, and D. Gonzalez-Pacanowska. Depletion of dimeric all-alpha dUTPase induces DNA strand breaks and impairs cell cycle progression in *Trypanosoma brucei*. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2008,40:2901-2913.
- C. Gallego, A. M. Estevez, E. Farez, L. M. Ruiz-Perez, and D. Gonzalez-Pacanowska. 2005. Overexpression of AP endonuclease protects *Leishmania major* cells against methotrexate induced DNA fragmentation and hydrogen peroxide. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2005, 141:191-197.

- L. Gros., S. O. Lorente, C. J. Jimenez, V. Yardley, L. Rattray, H. Wharton, S. Little, S. L. Croft, L. M. Ruiz-Perez, D. Gonzalez-Pacanowska, and I. H. Gilbert. Evaluation of azasterols as anti-parasitics. *Journal of Medical Chemistry* 2006, 49:6094-103.
- M. Harkiolak, E. J. Dodson, V. Bernier-Villamor, J. P. Turkenburg, D. Gonzalez-Pacanowska, and K. S. Wilson. 2004. The crystal structure of *Trypanosoma cruzi* dUTPase reveals a novel dUTP/dUDP binding fold. *Structure* 12:41-53.
- Jimenez-Jimenez, C., J. Carrero-Lerida, M. Sealey-Cardona, L. M. Ruiz Perez, J. A. Urbina, and D. Gonzalez Pacanowska. Delta24(25)-sterol methenyltransferase: intracellular localization and azasterol sensitivity in *Leishmania major* promastigotes overexpressing the enzyme. *Molecular Biochemical Parasitology* 2008, 160:52-59.
- S.Khabnadideh, D. Pez, A. Musso, R. Brun, L. M. Perez, D. Gonzalez-Pacanowska, and I. H. Gilbert. Design, synthesis and evaluation of 2,4-diaminoquinazolines as inhibitors of trypanosomal and leishmanial dihydrofolate reductase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2005, 13:2637-2649.
- O.V. Moroz, M. Harkiolaki, M. Y. Galperin, A. A. Vagin, D. Gonzalez-Pacanowska, and K. S. Wilson. The crystal structure of a complex of *Campylobacter jejuni* dUTPase with substrate analogue sheds light on the mechanism and suggests the "basic module" for dimeric d(C/U)TPases. *Journal Molecular Biology* 2004, 342:1583-1597.
- C. Nguyen, G. F. Ruda, A. Schipani, G. Kasinathan, I. Leal, A. Musso-Buendia, M. Kaiser, R. Brun, L. M. Ruiz-Perez, B. L. Sahlberg, N. G. Johansson, D. Gonzalez-Pacanowska, and I. H. Gilbert. Acyclic nucleoside analogues as inhibitors of *Plasmodium falciparum* dUTPase. *Journal of Medical Chemistry* 2006, 49:4183-4195.
- S. Orenes Lorente, R. Gomez, C. Jimenez, S. Cammerer, V. Yardley, K. de Luca-Fradley, S. L. Croft, L. M. Ruiz Perez, J. Urbina, D. Gonzalez Pacanowska, and I. H. Gilbert. Biphenylquinuclidines as inhibitors of squalene synthase and growth of parasitic protozoa. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2005, 13:3519-3529.
- A. Ortiz-Gomez, C. Jimenez, A. M. Estevez, J. Carrero-Lerida, L. M. Ruiz-Perez, and D. Gonzalez-Pacanowska. Farnesyl diphosphate synthase is a cytosolic enzyme in *Leishmania major* promastigotes and its overexpression confers resistance to risedronate. *Eukaryotic Cell* 2006, 5:1057-1064.
- J.Pena-Diaz, M. Akbari, O. Sundheim, M. E. Farez-Vidal, S. Andersen, R. Sneve, D. Gonzalez-Pacanowska, H. E. Krokan, and G. Slupphaug. *Trypanosoma cruzi* contains a single detectable uracil-DNA glycosylase and repairs uracil exclusively via short patch base excision repair. *Journal of Molecular Biology* 2004, 342:787-799.
- J.Pena-Diaz, A. Montalvetti, C. L. Flores, A. Constan, R. Hurtado-Guerrero, W. De Souza, C. Gancedo, L. M. Ruiz-Perez, and D. Gonzalez-Pacanowska. Mitochondrial localization of the mevalonate pathway enzyme 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase in the Trypanosomatidae. *Molecular Biology of the Cell* 2004, 15:1356-1363.
- J.Perez, C. Gallego, V. Bernier-Villamor, A. Camacho, D. Gonzalez-Pacanowska, and L. M. Ruiz-Perez. Apurinic/aprimidinic endonuclease genes from the trypanosomatidae

- Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* confer resistance to oxidizing agents in DNA repair-deficient *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* 1999, 27:771-777.
- D. Pez, I. Leal, F. Zuccotto, C. Boussard, R. Brun, S. L. Croft, V. Yardley, L. M. Ruiz Perez, D. Gonzalez Pacanowska, and I. H. Gilbert. 2,4-Diaminopyrimidines as inhibitors of Leishmanial and Trypanosomal dihydrofolate reductase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2003, 11:4693-4711.
- M. Sealey-Cardona, M., S. Cammerer, S. Jones, L. M. Ruiz-Perez, R. Brun, I. H. Gilbert, J. A. Urbina, and D. Gonzalez-Pacanowska. Kinetic characterization of squalene synthase from *Trypanosoma cruzi*: selective inhibition by quinuclidine derivatives. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2007,51:2123-9.
- A.E. Vidal, A. E., M. Harkiolaki, C. Gallego, V. M. Castillo-Acosta, L. M. Ruiz-Perez, K. Wilson, and D. Gonzalez-Pacanowska. Crystal structure and DNA repair activities of the AP endonuclease from *Leishmania major*. *Journal of Molecular Biology* 2007, 373:827-38.
- J.L. Whittingham., J. Carrero-Lerida, J. A. Brannigan, L. M. Ruiz-Perez, A. P. Silva, M. J. Fogg, A. J. Wilkinson, I. H. Gilbert, K. S. Wilson, and D. Gonzalez-Pacanowska. 2010. Structural basis for the efficient phosphorylation of AZT-MP (3'-azido-3'-deoxythymidine monophosphate) and dGMP by *Plasmodium falciparum* type I thymidylate kinase. *Biochemical Journal* 2010, 428:499-509.
- J.L. Whittingham, J. L., I. Leal, C. Nguyen, G. Kasinathan, E. Bell, A. F. Jones, C. Berry, A. Benito, J. P. Turkenburg, E. J. Dodson, L. M. Ruiz Perez, A. J. Wilkinson, N. G. Johansson, R. Brun, I. H. Gilbert, D. Gonzalez Pacanowska, and K. S. Wilson. dUTPase as a platform for antimalarial drug design: structural basis for the selectivity of a class of nucleoside inhibitors. *Structure* 2005, 13:329-338.