

**FARNESIL DIFOSFATO SINTETASA DE *Leishmania major*:
ESTUDIOS DE UNA POTENCIAL DIANA TERAPÉUTICA**



**Instituto de Parasitología y Biomedicina “López- Neyra”.
Consejo Superior Investigaciones Científicas (C.S.I.C.)
Granada**

AURORA ORTIZ GÓMEZ

Tesis Doctoral

Julio 2005

INDICE

A. INTRODUCCIÓN	1
A.I. INTRODUCCIÓN	1
A.II. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GÉNERO <i>Leishmania</i>	4
A.II.1. TAXONOMÍA Y CICLO DE VIDA.....	4
A.II.2. BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOQUÍMICA DE <i>Leishmania major</i>	6
A.III. BIOSÍNTESIS DE ISOPRENOIDES	9
A.III.1. COMPOSICIÓN DE ESTEROLES EN <i>Leishmania</i>	11
A.III.2. INHIBICIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE ISOPRENOIDES.....	12
A.IV. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA ENZIMA FARNESIL DIFOSFATO SINTETASA	14
A.IV.1. CRISTALIZACIÓN Y ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA FPPS.....	15
A.IV.2. MECANISMO DE ACCIÓN	16
A.V. ESTUDIOS DE INHIBICIÓN DE LA ENZIMA FPPS	18
A.V.1. MECANISMO DE ACCIÓN DE BISFOSFONATOS SOBRE EL HUESO.....	18
A. V.2. AMINOBISFOSFONATOS COMO AGENTES ANTIPROTOZOARIOS.....	19
A.V.2.1. Otros efectos de bisfosfonatos que podrían mejorar su actividad antiprotozoaria.....	20
A.VI. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE ESTEROLES	20
A.VII. REGULACIÓN DE LA ENZIMA FPPS	21
A.VIII. RELACIÓN ENTRE EL METABOLISMO DE ISOPRENOIDES Y EL CRECIMIENTO CELULAR	23
A.IX. MECANISMOS DE RESISTENCIA A FÁRMACOS EN <i>Leishmania</i>	25
B. MATERIAL Y MÉTODOS	28
B.I. MATERIAL	28
B.I.1. LÍNEAS CELULARES Y FAGOS.....	28
B.I.1.1. Parásitos	28
B.I.1.2. Bacterias	28
B.I.1.3. Fagos.....	28
B.I.2. MEDIOS DE CULTIVO	29
B.I.2.1. Para parásitos	29
B.I.2.1.1. Compuestos adicionados a los medios de cultivo	29

B.I.2.2. Para bacterias	30
B.I.2.2.1. Compuestos adicionados a los medios de cultivo	30
B.I.3. TAMPONES Y SOLUCIONES.....	32
B.I.4. MATERIAL PARA BIOLOGÍA MOLECULAR.....	34
B.I.4.1. Vectores	34
B.I.4.2. Oligonucleótidos.....	34
B.I.4.3. Reactivos.....	35
B.I.5. MATERIAL PARA EL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	36
B.I.5.1. Para la caracterización de la proteína recombinante y purificación de cuerpos de inclusión.....	36
B.I.5.2. Para medidas de actividad enzimática	36
B.I.6. MATERIAL PARA EL ANÁLISIS INMUNOLÓGICO	36
B.I.7. INSTRUMENTACIÓN	37
B.I.7.1. Para cultivos celulares.....	37
B.I.7.2. Para electroforesis y transferencia de DNA y proteínas	37
B.I.7.3. Centrífugas	37
B.I.7.4. Para electroporación.....	38
B.I.7.5. Otros.....	38
B.I.8. SOFTWARE	38
B.II. MÉTODOS	39
B.II.1. CULTIVO Y MANIPULACIÓN DE CÉLULAS.....	39
B.II.1.1. Parásitos	40
B.II.1.1.1. Cultivo de <i>Leishmania</i>	40
B.II.1.1.2. Criopreservación y descongelación de <i>Leishmania</i>	40
B.II.1.1.3. Determinación de la Dosis Inhibitoria 50 de crecimiento (IC50)	40
B.II.1.1.4. Cultivo de <i>Leishmania</i> para estudios de regulación de la FPPS	41
B.II.1.1.5. Transfección estable por electroporación	41
B.II.1.1.6. Obtención de clones	41
B.II.1.1.7. Obtención de extractos totales de parásitos	42
B.II.1.2. Bacterias	42
B.II.1.2.1. Cultivo de <i>Escherichia coli</i>	42
B.II.1.2.2. Conservación.....	43
B.II.2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	43
B.II.2.1. Preparación de células competentes	43
B.II.2.1.1. Método del CaCl ₂	43
B.II.2.1.2. Células electrocompetentes	43
B.II.2.2. Transformación de células competentes	43
B.II.2.2.1. Método del choque térmico	43
B.II.2.2.2. Electroporación	44

B.II.2.3. <i>Screening</i> de una genoteca de cDNA de <i>L. major</i>	44
B.II.2.3.1. Excisión <i>in vivo</i> del fagémido pBK-CMV	45
B.II.2.4. Extracción de DNA	45
B.II.2.4.1. Extracción de DNA genómico de <i>Leishmania</i>	45
B.II.2.4.2. Extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	46
B.II.2.5. Extracción de RNA poliadenilado	46
B.II.2.6. Análisis del DNA aislado.....	46
B.II.2.6.1. Digestión de DNA con endonucleasas de restricción	46
B.II.2.6.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	47
B.II.2.6.3. Reacción de ligación de DNA.....	47
B.II.2.6.4. Tratamiento del DNA con fosfatasa alcalina	48
B.II.2.7. Secuenciación de DNA.....	48
B.II.2.8. Marcaje radiactivo de DNA. Síntesis de una sonda radiactiva.	48
B.II.2.9. Electroforesis de DNA y RNA.....	49
B.II.2.9.1. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	49
B.II.2.9.2. Electroforesis de DNA en campo pulsado (PFGE)	49
B.II.2.9.3. Electroforesis de RNA en geles de agarosa	50
B.II.2.10. Transferencia de DNA y RNA a filtros de <i>nylon</i> o nitrocelulosa	50
B.II.2.10.1. Transferencia de DNA, <i>Southern blot</i>	50
B.II.2.10.2. Transferencia de RNA, <i>Northern blot</i>	51
B.II.2.11. Hibridación de DNA y RNA con sondas radiactivas	51
B.II.2.12. Deshibridación de filtros de DNA y RNA.....	51
B.II.2.12.1. Deshibridación de filtros de DNA	51
B.II.2.12.2. Deshibridación de filtros de RNA	51
B.II.3. TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE LA PROTEÍNA	51
B.II.3.1. Obtención de extractos de <i>E. coli</i> que sobreexpresan la LmFPPS.....	51
B.II.3.1.1. Inducción de la proteína recombinante LmFPPS con IPTG	51
B.II.3.1.2. Preparación de extractos solubles de bacterias	52
B.II.3.2. Purificación de la LmFPPS recombinante.....	52
B.II.3.2.1. Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	52
B.II.3.2.2. Cromatografía en columna de hidroxipatito	53
B.II.3.3. Caracterización cinética de la proteína FPPS de <i>L. major</i>	53
B.II.3.3.1. Determinación de la actividad FPPS.....	53
B.II.3.3.2. Efecto de la concentración de la enzima sobre la actividad FPPS de la LmFPPS.....	54
B.II.3.3.3. Determinación de la K_m y la V_{max} para diferentes sustratos.....	54
B.II.3.3.4. Cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel.....	54
B.II.3.3.5. Estudios de inhibición <i>in vitro</i> de la LmFPPS	54

B.II.4. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS.....	55
B.II.4.1. Obtención de anticuerpos policlonales frente a la FPPS de <i>L. major</i>	55
B.II.4.1.1. Purificación de la proteína recombinante LmFPPS	55
B.II.4.1.2. Inmunizaciones	55
B.II.4.1.3. Obtención de suero	56
B.II.4.1.4. Purificación del anticuerpo anti- LmFPPS.....	56
B.II.4.2. Transferencia de proteínas, <i>Western blot</i>	56
B.II.4.3. Inmunodetección.....	57
B.II.5. ESTUDIO DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA FPPS DE <i>L. major</i>	57
B.II.5.1. Inmunocitoquímica y observación por microscopía electrónica de transmisión	57
B.II.5.1.1. Preparación de inclusiones de parásitos. Procesamiento para inmunocitoquímica (LRWhite).	57
B.II.5.1.2. Inmunocitoquímica	58
B.II.5.2. Inmunofluorescencia	59
B.II.5.3. Permeabilización de <i>L. major</i> con digitonina.....	60
C. OBJETIVOS	62
D. RESULTADOS	64
D.I. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN DE LA FARNESIL PIROFOSFATO SINTETASA DE <i>Leishmania major</i> 252	64
D.I.1. AISLAMIENTO DEL GEN <i>LmFPPS</i>	64
D.I.1.1. Obtención de una sonda homóloga del gen <i>LmFPPS</i>	64
D.I.1.2. <i>Screening</i> de una genoteca de cDNA de <i>L. major</i> construida en el fago ZAP-Express®	65
D.I.2. CARACTERIZACIÓN DEL GEN DE LA FARNESIL DIFOSFATO SINTETASA DE <i>L. major</i>	65
D.I.2.1. Análisis de la secuencia nucleotídica del gen <i>LmFPPS</i>	65
D.I.2.2. Organización genómica del gen <i>LmFPPS</i>	67
D.I.2.2.1. Determinación del número de copias del gen <i>LmFPPS</i>	67
D.I.2.2.2. Localización cromosómica del gen <i>LmFPPS</i>	68
D.II. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE FPPS DE <i>L. major</i> EN EL SISTEMA HETERÓLOGO <i>Escherichia coli</i>	69
D.II.1. Construcción del sistema de expresión.....	69
D.III. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA FPPS DE <i>L. major</i>.71	
D.III.1. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE <i>LmFPPS</i>	71

D.III.2. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD <i>LmFPPS</i>	71
D.III.3. DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR DE LA PROTEÍNA NATIVA.....	72
D.III.4. DETERMINACIÓN DE K_m y V_{max} PARA LOS SUSTRATOS IPP Y GPP.....	74
D.III.4.1. K_m y V_{max} para el isopentenil pirofosfato y geranil pirofosfato.....	74
D.IV. ESTUDIOS DE INHIBICIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA <i>LmFPPS</i>	76
D.V. FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LA FPPS DE <i>L. major</i>	84
D.V.1. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES FRENTE A LA FPPS DE <i>L. major</i>	84
D.V.1.1. Estudio de la especificidad del anticuerpo anti-FPPS mediante <i>Western blot</i> . 84	
D.V.2. ANÁLISIS DE LA SOBREEXPRESIÓN DE LA FPPS EN PROMASTIGOTES DE <i>L. major</i>	85
D.V.2.1. Obtención de mutantes de <i>L. major</i> que sobreexpresan la FPPS.....	85
D.V.2.1.1. Construcción del plásmido de transfección.....	85
D.V.2.1.2. Electroporación de <i>Leishmania</i>	86
D.V.2.1.3. Análisis del clon transformado con el plásmido pX63NEO-FPPS mediante CHEF electroforesis.. ..	86
D.V.2.2. Estudio del patrón de crecimiento del clon pX63NEO-FPPS-1	87
D.V.2.3. Medidas de actividad FPPS en mutantes que sobreexpresan la proteína.....	89
D.V.3. ESTUDIO DEL FENOTIPO DEL CLON pX63NEO-FPPS1 EN PRESENCIA DE INHIBIDORES DE LA BIOSÍNTESIS DE ESTEROLES.....	89
D.V.3.1. Efecto de risedronato	90
D.V.4. MODULACIÓN DE LA FPPS DE <i>Leishmania</i> POR RISEDRONATO.....	91
D.VI. LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE LA FPPS DE <i>L. major</i>	94
D.VI.1. Inmunofluorescencia.....	94
D.VI.2. Inmunocitoquímica y observación mediante microscopía electrónica.....	
de transmisión.....	96
D.VI.3. Estudios de localización de la enzima en células permeabilizadas con.....	
digitonina.....	98
D.VII. CARACTERIZACIÓN DE UNA LÍNEA CLONADA DE <i>L. major</i> 252 RESISTENTE A RISEDRONATO	100
D.VII.1. Inducción del proceso de resistencia	100
D.VII.2. Caracterización del mecanismo de resistencia.....	100
E. DISCUSIÓN	104

E.I. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN DE LA FARNESIL DIFOSFATO SINTETASA DE <i>Leishmania major</i> 252.....	104
E.I.1. Organización genómica del gen <i>LmFPPS</i>	104
E.I.2. Análisis de la secuencia primaria de la proteína FPPS de <i>L. major</i>	106
E.II. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE FPPS DE <i>L. major</i> EN EL SISTEMA HETERÓLOGO <i>E. coli</i>.....	107
E.II.1. Construcción del sistema de expresión	107
E.III. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA FPPS DE <i>L. major</i>	107
E.III.1. Purificación de la proteína recombinante <i>LmFPPS</i>	107
E.III.2. Determinación cuantitativa de la actividad <i>LmFPPS</i>	108
E.III.3. Determinación de la masa molecular de la proteína nativa	108
E.IV. ESTUDIOS DE INHIBICIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA <i>LmFPPS</i>	109
E.V. FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LA FPPS DE <i>L. major</i>	113
E.V.1. ANÁLISIS DE LA SOBREEXPRESIÓN DE LA FPPS EN PROMASTIGOTES DE <i>L. major</i>	113
E.V.2. ESTUDIO DEL FENOTIPO DEL CLON pX63NEO-FPPS1 EN PRESENCIA DE INHIBIDORES DE LA BIOSÍNTESIS DE ESTEROLES.....	113
E.V.2.1. Efecto de risedronato.....	114
E.VI. REGULACIÓN DE LA FPPS DE <i>Leishmania</i> POR RISEDRONATO	115
E.VII. LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE LA FPPS DE <i>L. major</i>	115
E.VIII. CARACTERIZACIÓN DE UNA LÍNEA CLONADA DE <i>L. major</i> 252 RESISTENTE A RISEDRONATO	117
F. CONCLUSIONES	121
G. BIBLIOGRAFÍA.....	123

ABREVIATURAS

Amp. Ampicilina.
 ATP. Adenosina trifosfato.
 BrEt. Bromuro de Etidio.
 BSA. Albúmina sérica bovina.
 °C. Grados centígrados.
 CHEF. Electroforesis
 Ci. curio.
 cm. Centímetro.
 col. Colaboradores.
 cpm. Cuentas por minuto.
 Da. Dalton.
 dATP. Desoxiadenosina trifosfato.
 dCTP. Desoxicitidina trifosfato.
 DEPC. Dietilpirocarbonato.
 dGTP. Desoxiguanosina trifosfato.
 DMSO. Dimetil sulfóxido.
 DNA. Ácido desoxirribonucleico.
 DNAsa I. Desoxirribonucleasa I.
 dNTP. Desoxi nucleósido 5'- trifosfato.
 D.O. Densidad óptica.
 DTT. Ditioneitol.
 dTTP. Desoxitimidina 5'- trifosfato.
 EDTA. Ácido etilén diamino tetraacético.
 FPPS. Farnesil pirofosfato sintasa.
 h. Hora.
 HMG-CoA. 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA.
 IC50. Dosis inhibitoria de crecimiento 50.
 IgG. Inmunoglobulina G
 IPTG. Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido.
 kb. Kilobase.
 kDa. Kilodalton.
 K_m . Constante de Michaelis.
 kV. Kilovoltio.
 LmFPPS. Farnesil difosfato sintetasa de *Leishmania major*.
 M. Molar.
 Mb. Megabase.
 mg. Miligramo.

min. Minuto.

ml. Mililitro.

mM. Milimolar.

MOPS. Ácido 3-[N-morfolino]-propano sulfónico.

mRNA. Ácido ribonucleico mensajero.

MOPS. Ácido 3-[N-morfolino]-propano sulfónico.

μCi. Microcurio.

μl. Microlitro.

μM. Micromolar.

ng. Nanogramo.

nM. Nanomolar.

PAM. Fracción de membrana asociada a membrana plasmática.

PBS. Tampón fosfato salino.

PCR. Reacción en cadena de la DNA polimerasa.

pb. Pares de bases.

pI. Punto Isoeléctrico.

PFGE. Electroforesis de DNA en campo pulsado.

pmol. Picomol.

PMSF. Fenil metil sulfonil fluoruro.

PPi. Pirofosfato.

PVDF. Fluoruro de polivinilideno.

RNA. Ácido ribonucleico.

SBF. Suero bovino fetal.

SDS. Dodecil sulfato sódico.

SDS-PAGE. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida.

SMT. $\Delta^{24-(25)}$ -esterol metiltransferasa.

SQS. Escualeno sintasa.

SREBP. Proteína de unión al elemento regulador de esteroides.

TEMED. N,N,N',N' - Tetrametil-etilenodiamino.

Tris. Tris(hidroximetil)-amino metano.

ufp. Unidades formadoras de placa.

V. Voltio.

V_{max} . Velocidad máxima.

Xgal. 5-bromo-4-chloro-3-indolil-βD-galactosido

A. INTRODUCCIÓN

A.I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias constituyen uno de los principales problemas sanitarios debido a que afectan a un elevado porcentaje de la población mundial (Chang y col., 1985). Diferentes especies de protozoos flagelados pertenecientes a los géneros *Plasmodium*, *Leishmania* y *Tripanosoma*, son los agentes causales de enfermedades protozoarias que afectan a millones de personas en el mundo. El hecho de que estas enfermedades parasitarias afecten principalmente a los países más desfavorecidos, hace que su control sea muy difícil.

En el caso de la leishmaniasis, los parásitos son transmitidos por la picadura de un mosquito hembra infectado y dependiendo de la especie de *Leishmania* que este vector transmita, así como del sistema inmune del hospedador, tendremos diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad:

* Leishmaniasis cutánea o botón de oriente: es producida principalmente por *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. major* y algunas especies de *L. mexicana*. En la zona de la picadura del mosquito, se desarrolla una lesión que se agranda y comienza a necrotizarse en la parte central. La ulceración es invadida por macrófagos, que sirven de hospedadores a los parásitos para multiplicarse en su interior en forma amastigote. Los síntomas pueden durar meses hasta su curación espontánea, tras la cual los pacientes adquieren una alta inmunidad (Glew y col., 1988; Modabber, 1993).

* Leishmaniasis mucocutánea o espundia: es producida por *Leishmania braziliensis* y produce lesiones en las mucosas, generalmente en nariz, boca, garganta y tejidos circundantes, causando la destrucción total o parcial de las misma. Esta enfermedad puede ser fatal en caso de que se produzca una infección bacteriana o una obstrucción nasogástrica (Glew y col., 1988; Modabber, 1993).

* Leishmaniasis visceral o *Kala-azar*: se caracteriza por la presencia de fiebre acompañada de hepatomegalia, esplenomegalia, pérdida de peso, inflamación de glándulas linfáticas y pérdida de pelo. Es producida principalmente por *L. donovani* y *L. infantum* (*L. chagasi* en América). Es una manifestación mortal en el 90% de los casos no tratados (Glew y col., 1988; Modabber, 1993).

Las leishmaniasis aparecen en 88 países de diversos contextos geográficos, con una prevalencia de 12 millones de enfermos y una incidencia de unos dos millones de casos nuevos anuales, de ellos, el 25% son viscerales y el 75% son cutáneos (www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm). La población en riesgo se eleva a 350 millones de personas. La mayor parte de los casos viscerales se concentran en la India, Bangladesh, Brasil, Nepal y Sudan, mientras que el 90% de los casos cutáneos aparecen en Afganistán, Irán, Siria, Arabia Saudí, Brasil, y Perú (Desjeux, 2004).

Dicha prevalencia e incidencia sólo pueden ser estimadas de manera tentativa por ser enfermedades de transmisión rural, localizadas en zonas remotas, y porque muchos casos no son diagnosticados por falta de atención médica o por ser asintomáticos. La notificación de los casos es obligatorio en sólo 32 de los 88 países afectados por la enfermedad y el incremento global de los casos se debe a la penetración de colonos en la selva y medio rural, a la agresión del medio ambiente por el hombre, a la interrupción del uso de insecticidas para el paludismo, etc...(Desjeux, 2004).

Actualmente cobra especial interés el hecho de que no todas las personas infectadas por *Leishmania* manifiestan la enfermedad, y algunas sólo la desarrollan en condiciones de inmunosupresión. En este sentido, presenta gran interés la coinfección de *Leishmania*-VIH, la cual está considerada como una enfermedad emergente, especialmente en el sur de Europa, donde un 25-70% de los casos de leishmaniasis visceral están relacionados con la infección, y un 2-9% de los casos de SIDA desarrollan leishmaniasis visceral. Las personas drogadictas han sido consideradas como población de riesgo por el hecho de compartir jeringuillas, lo que facilitaría la transmisión del parásito sin la necesidad de que existiera un vector (Desjeux, 1998). Estudios recientes han puesto de manifiesto que las cepas latentes del VIH que replican muy lentamente en cultivos celulares, se activan en presencia de *Leishmania*. Esta constatación *in vitro* sugiere que también pueda ocurrir *in vivo*, siendo una explicación plausible de la patogenia de la coinfección (Herwaldt, 1999).

En la figura A.I. se muestra la distribución mundial de la leishmaniasis, indicándose las zonas en que existe coinfección de *Leishmania*/VIH.

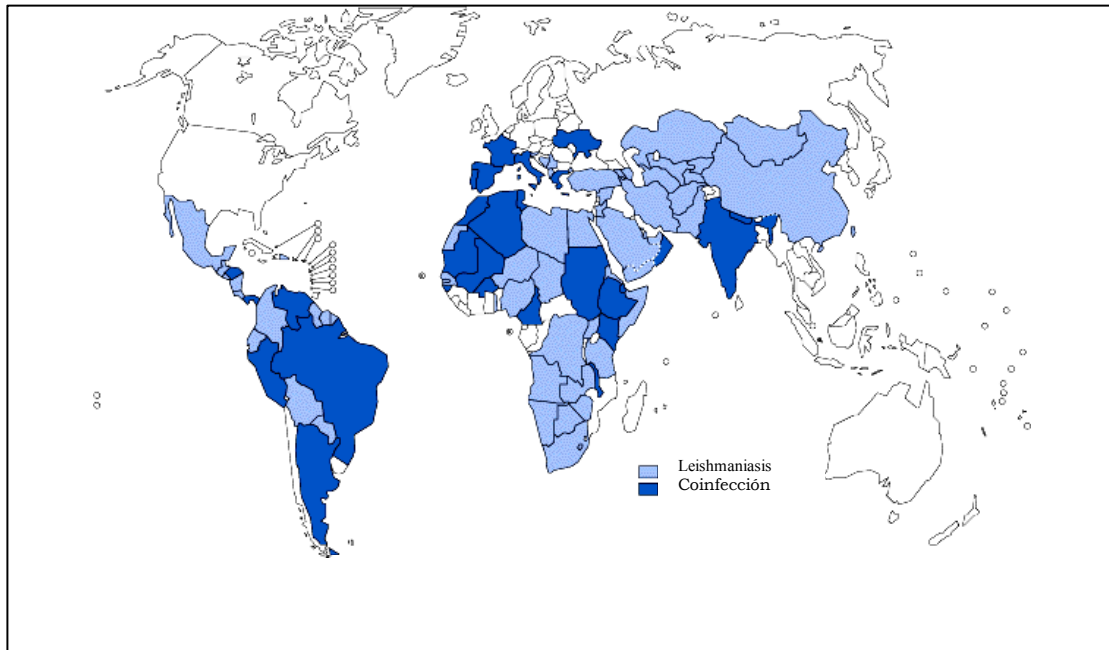


Figura A.I. Distribución global de leishmaniasis y de coinfección *Leishmania*/VIH. En azul claro se muestran los casos de leishmaniasis, y en azul oscuro los casos de coinfección de *Leishmania*/VIH en el período 1990-1998. (Organización Mundial de la Salud)

La quimioterapia empleada para combatir la enfermedad consiste en la administración de antimoniales pentavalentes (Pentostán, Neostibosán y Glucantime), anfotericina B y su formulación lipídica Ambisome®, y pentamidina. Los antimoniales fueron introducidos por primera vez en 1945 y aún permanecen como un tratamiento efectivo para algunas formas de leishmaniasis, sin embargo, la necesidad de someter al paciente a una administración parenteral del fármaco durante 28 días, la variable eficacia frente a leishmaniasis visceral y cutánea, su elevado coste, así como la emergente resistencia a dicho fármaco, comprometen su uso en gran medida. El antibiótico poliénico anfotericina B ha sido probado con una alta eficacia frente a leishmaniasis visceral resistente a antimoniales, sin embargo, su elevada toxicidad y la necesidad de una perfusión intravenosa lenta durante al menos cuatro horas, dificulta su éxito como tratamiento. Una alternativa eficaz fue la formulación de anfotericina B asociada a lípidos Ambisome®, que reduce enormemente los efectos colaterales ya que presenta una vida media más prolongada, permitiendo una mejor captación del compuesto por los macrófagos; aunque de nuevo, su elevado coste limita su uso. Por último, las diaminas, al igual que la anfotericina B, constituyen un tratamiento de segunda elección ya que presentan una elevada toxicidad. Se suelen administrar cuando la infección se hace resistente a antimoniales (Croft y col., 2003).

Actualmente están siendo ensayados otros compuestos como futuros fármacos antiprotozoarios como son miltefosina, paramomicina, azoles como ketoconazol y fluconazol, bisfosfonatos, etc.. El uso de miltefosina ha sido recientemente aprobado en

la India (Sundar y col.,2002), y ha supuesto el primer tratamiento oral para la leishmaniasis visceral; presenta pocos efectos secundarios además de un bajo coste. Sin embargo, tiene una gran limitación debido a su teratogenicidad.

El hecho de que las vacunas desarrolladas frente a la leishmaniasis se encuentren en fase clínica y que el tratamiento utilizado ofrezca resultados variables, presente alta toxicidad, un elevado coste y además el parásito haya desarrollado resistencias frente a él, ha fomentado la búsqueda de nuevas estrategias para combatir la enfermedad.

A.II. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GÉNERO *Leishmania*.

A.II.1. TAXONOMÍA Y CICLO DE VIDA.

Las distintas especies de *Leishmania* son indistinguibles en lo morfológico y, sin embargo causan lesiones que evolucionan de forma variopinta, por lo que la taxonomía de este género reviste especial importancia médica. En general, la clasificación de las especies se basa en la patología y los síntomas de la enfermedad, el lugar de infección, la especie del vector y el reservorio. Aunque por otra parte, tenemos una serie de factores intrínsecos al parásito que nos permite analizarlo en su genotipo, mediante técnicas de biología molecular como es el análisis de isoenzimas, el patrón cromosómico específico de cada especie, así como la amplificación y el análisis de fragmentos de DNA (Macedo y col., 1992; Guizani y col., 1994; Mendoza- Leon y col., 1995).

Durante muchos años se admitió como correcta la clasificación de estos organismos dentro de cuatro grandes complejos: complejo *L. mexicana*, complejo *L. braziliensis*, complejo *L. tropica* y complejo *L. donovani*. Actualmente, aunque la taxonomía no es todavía definitiva, una clasificación aceptada internacionalmente reconoce a 12 especies. Esta clasificación incluye un complejo *L. mexicana* con 2 especies (*L. mexicana* y *L. amazonensis*), un complejo *L. donovani* con 3 especies (*L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi*), *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* y un grupo del subgénero *Viannia* con 4 especies (*L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis*, *L.(V.) panamensis*, *L.(V.) peruviana*). Las diferentes especies son morfológicamente indistinguibles, pero se pueden diferenciar según la composición de isoenzimas, antígenos y ácidos nucleicos como decíamos anteriormente (Grimaldi y col., 1989; Walton, 1989).

Leishmania es un protozoo parásito unicelular de la familia Trypanosomatidae, orden Kinetoplástida. Su ciclo de vida es digenético: realiza parte de su ciclo biológico en el tubo digestivo del hospedador invertebrado en forma flagelar (promastigote), y en

el vertebrado dentro de los fagocitos mononucleares, principalmente macrófagos, en forma aflagelar (amastigote).

Cuando un flebotomo parasitado ingurgita sangre de un vertebrado, inocula con su saliva los promastigotes presentes en la probóscide. Una vez que el parásito está en lo capilares cutáneos del hospedador vertebrado, se produce su fagocitosis por el macrófago quien lo engloba en una vacuola parasitófora y trata de eliminarlo mediante una cascada de metabolitos derivados del oxígeno como el óxido nítrico y la liberación de hidrolasas lisosomales, todo ello vertido al espacio intravacuolar. Pero *Leishmania* evade esas reacciones inmunológicas inespecíficas del macrófago para vivir y multiplicarse en su interior, mediante la expresión en su superficie celular de moléculas de lipofosfoglicano (LPG) y de metaloproteasa gp63, principalmente. Por su parte, el LPG es capaz de quelar el calcio del macrófago, para reducir su actividad biológica, como los radicales libres que éste produce como mecanismo de defensa. Por otra parte, la metaloproteasa gp63 es capaz de inactivar las hidrolasas vertidas en la vacuola parasitófora. De la eficacia de la respuesta inmune y la virulencia de este protozoo depende la progresión de la leishmaniasis. Si sobreviven las leishmanias, los monocitos parasitados circulantes son ingeridos por otro flebotomo, en cuyo intestino se liberan los amastigotes que recuperan la forma de promastigotes. Tras varios días, alcanzan la capacidad infectiva, proceso denominado metacicloogénesis, (Descoteaux y col., 1999) ya en la proximidad de la probóscide, quedando así dispuestos para ser inoculados de nuevo y cerrando de esta forma el ciclo (Chang y col., 1985) (figura A.II.).

Las poblaciones naturales de *Leishmania* se reproducen exclusivamente mediante un proceso clonal de división binaria (Tibayrenc y col., 1990), aunque se ha llegado a describir en algunos casos y a muy bajos niveles un tipo de reproducción sexual (ocasional dentro de una población que se reproduce asexualmente), y se sugiere que sólo se haría evidente cuando el fenotipo híbrido confiriese alguna ventaja selectiva para la población (Kelly y col., 1991; Lanotte y col., 1990; Evans y col., 1987).

Los hospedadores infectados pueden ser humanos, animales salvajes como roedores y animales domésticos como perros. La mayoría de las leishmaniasis son zoonosis, en el caso del hombre es infectado cuando de forma accidental se expone al ciclo natural de transmisión de la enfermedad. Sin embargo, se puede tratar de una antroponosis, en cuyo caso el hombre se comporta como único hospedador reservorio.

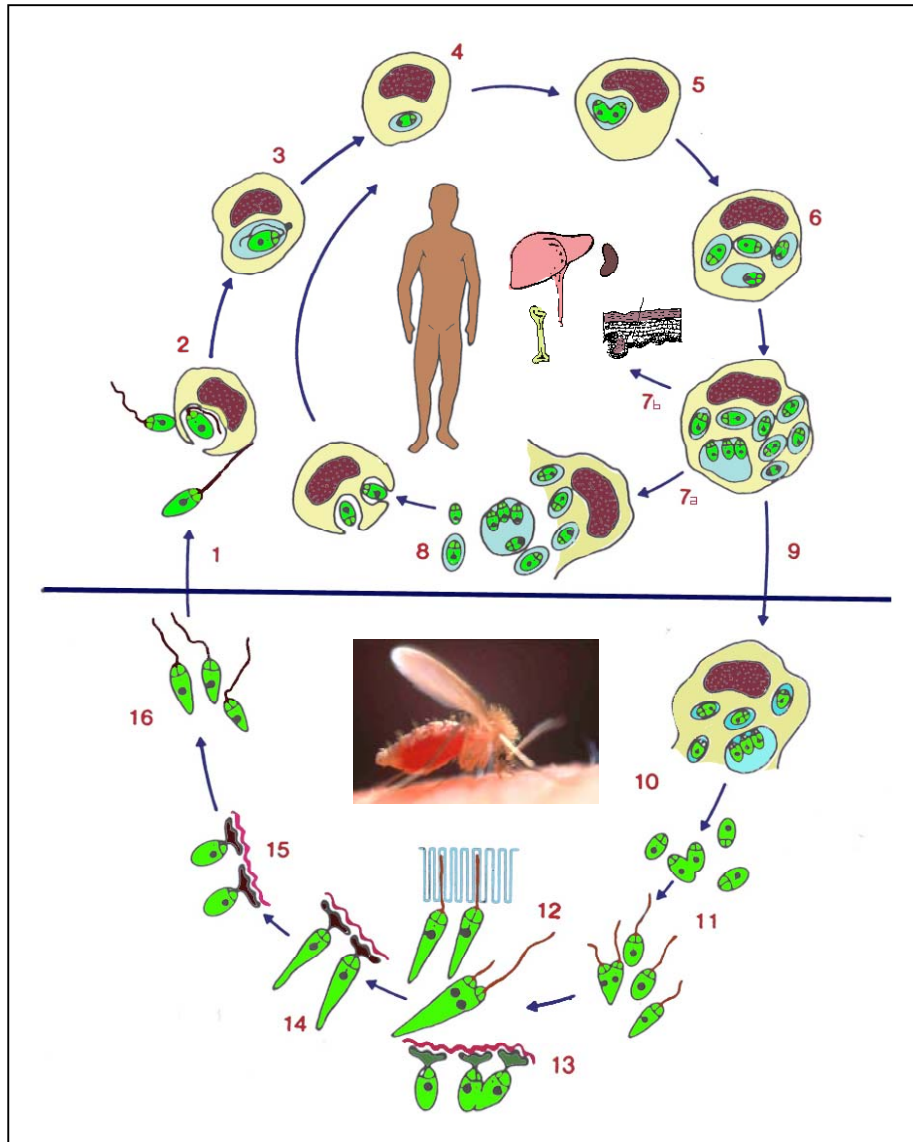


Figura A.II. Ciclo de vida de *Leishmania* (Chang y col., 1985)

A.II.2. BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOQUÍMICA DE *Leishmania*.

Leishmania, al igual que otras especies del orden Kinetoplástida, presenta peculiaridades moleculares y bioquímicas que la diferencian del resto de organismos eucariotas. Entre las características moleculares a destacar: **(I)** Presentan un orgánulo característico denominado **Kinetoplasto** donde se concentra el DNA de la única mitocondria que poseen. Este DNA mitocondrial está formado por maxicírculos y minicírculos que se enlazan entre sí para formar una red gigante de DNA, y representa el 10-15 % del DNA total del parásito. En los maxicírculos se encuentra el DNA que codifica RNAs ribosomales y transferentes, además de proteínas mitocondriales como citocromos. Los minicírculos contienen los RNAs guía (Simpson, 1987; Shapiro y col.,

1995; Morris y col., 2001). **(II)** Presentan **transcripción policistrónica**, generándose unos RNAs inmaduros que contienen más de un gen, al igual que ocurre en organismos procariotas (González y col., 1985; Muhich y Boothroyd, 1988). **(III)** La maduración del mRNA se realiza a través de un proceso de **transplicing**, de modo que al extremo 5' de los RNAs codificantes se adiciona una secuencia de 39 nucleótidos denominada miniexón o *spliced leader* y en el extremo 3' una cola de poliadenilación, mediante un mecanismo en el que ambos procesos parecen estar acoplados (LeBowitz y col., 1993; Borst y col., 1986). La región intergénica 5' posee un sitio AG que actúa como aceptor del SL. Además, el extremo 3' de cada RNA mensajero está poliadenilado a una distancia de entre 100 y 400 nucleótidos corriente arriba de las señales para el trans-empalme del miniexón del siguiente gen (Papadopoulou, 2003). De esta manera se forman unidades de traducción monocistrónicas, compuestas por el miniexón, el gen y la cola de poliadenilación. Esta estructura cap o miniexón protege al RNA mensajero de la acción de nucleasas, prolongando así su vida media, además de asegurar la traducción, ya que hace del RNA mensajero una estructura reconocible por los ribosomas. En *Leishmania* no se ha identificado ningún promotor específico para Pol II y la transcripción de genes a partir de vectores tampoco requiere de este promotor (Kelly, 1992; Kelly, 1995; Freedman, 1993; Kapler, 1990). La práctica totalidad de los genes de tripanosomátidos carecen de intrones, pero existe una dependencia importante de la presencia de las regiones intergénicas para la expresión de genes, lo cual sugiere que éstas podrían contener las señales necesarias para la transcripción y maduración del mRNA (Papadopoulou, 2003). Por ello, para la expresión transitoria de genes en *Leishmania* se usan vectores de expresión circulares que contengan la secuencia de un gen reportero flanqueado por regiones intergénicas del parásito. **(IV) Edición de RNA mitocondrial o RNA editing** (Stuart y col., 2002), que consiste en la inserción y eliminación de uracilos en RNAs sin sentido genético con el fin de obtener mensajeros con sentido. Un complejo de moléculas de RNA y proteínas, ayudado por los llamados RNAs-guía, está involucrado en el mecanismo de acción. Recientemente han sido aislados de la mitocondria de tripanosomátidos numerosos factores, que forman complejos que interaccionan dinámicamente durante el proceso de edición (Simpson y col., 2003). Los RNAs que son editados están codificados en el DNA de los maxicírculos del kinetoplasto, mientras que los RNAs-guía se localizan en su mayoría en el DNA de los minicírculos (Shapiro y col., 1995). **(V)** La existencia de orgánulos característicos como el **glicosoma**, que son organelas formadas por una membrana lipídica simple que contienen las enzimas que intervienen en las primeras etapas de la glucólisis (Parsons y col., 2001; Cannata y col., 1984), algunas enzimas implicadas en la β -oxidación de los ácidos grasos (Müller, 1980) y en la biosíntesis de lípidos, además de las enzimas que participan en la síntesis de pirimidinas y en el salvamento de purinas (Opperdoes, 1987;). Los glicosomas (aunque los de parásitos de mamíferos carecen de catalasa) se clasifican

dentro de la familia de los microcuerpos, a la que también pertenecen los peroxisomas y glioxisomas, estando estos últimos presentes en plantas y algunos microorganismos. También se han detectado **acidocalcisomas**, que son orgánulos donde se acumulan grandes cantidades de calcio y pirofosfato (Docampo y col., 2001). En *Leishmania* se ha relacionado esta acumulación de calcio con la virulencia del parásito (Lu y col., 1997). Además de en *Leishmania*, este orgánulo también ha sido descrito en otros organismos como *T. cruzi* (Docampo y col., 1995). **(VI)** Ausencia visible de condensación cromosómica a lo largo de su ciclo de vida (Vickerman y Preston, 1970). Además, estos organismos se caracterizan por su gran **plasticidad cromosómica**; presentan diploidía para la mayoría de los genes y aneuploidía para otros (Lighthall y Giannini, 1992). El número de cromosomas es de 36 (www.LeishDB.org), presentando un tamaño del genoma comprendido entre 10^7 y 10^8 pb, con un contenido en G+C del 60% (Villalba y col., 1982).

Desde el punto de vista bioquímico también se observan algunas peculiaridades en el parásito *Leishmania*. Estudios metabólicos han demostrado que los promastigotes de *Leishmania* utilizan como principal fuente de energía algunos aminoácidos y catabolizan la glucosa sólo al final de la fase exponencial y al principio de la fase estacionaria de crecimiento (Cazzulo y col., 1985). Este comportamiento metabólico se entiende como una adaptación del parásito a unos ambientes pobres en glucosa libre y ricos en proteínas como son el intestino del insecto. En el caso de formas amastigotes tienen significativamente incrementada la β -oxidación de los ácidos grasos y consumen poca glucosa y aminoácidos, lo que sugiere que los ácidos grasos son su principal fuente de energía (Oppenheimer, 1995).

Otro aspecto bioquímico singular en tripanosomátidos es la presencia de **tripanotión** (bis (glutacionil)-espermidina), que junto con la tripanotión reductasa juega un papel importante en el mantenimiento de un ambiente intracelular reductor, protegiendo a la célula del estrés químico y oxidativo (Fairlamb y col., 1992; Krauth-Siegel y col., 2003). Además, las especies de *Leishmania* no pueden sintetizar purinas *de novo*, y por tanto, dependen de un suplemento externo de purinas preformadas y obtenidas a partir de una ruta de “salvamento” de purinas catabolizadas (Asan y Coombs, 1987), mientras que la mayoría de protozoos que pertenecen al orden Kinetoplastida, como *Leishmania*, posee la maquinaria necesaria para la síntesis *de novo* de pirimidinas (LaFon y col., 1982; Hammon y Gutteridge, 1984).

Los lípidos totales de *Leishmania* constituyen el 12-20 % del peso húmedo celular. Están constituidos principalmente por lípidos polares como fosfolípidos y lípidos neutros como triacilgliceroles y esteroides (Beach y col., 1979). La ruta de síntesis de isoprenoides adquiere importancia en tripanosomátidos debido a que conduce a la síntesis de **ergosterol**, principal esteroide para estos parásitos, que difiere en su estructura del colesterol, esteroide mayoritario en células de mamíferos. Debido a

la importancia que presenta el ergosterol para los tripanosomátidos, la inhibición de la ruta de biosíntesis de isoprenoides se ha convertido en una estrategia de gran interés en la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos antiprotozoarios (Urbina, 1997).

A.III. BIOSÍNTESIS DE ISOPRENOIDES

La síntesis de isoprenoides es una de las rutas metabólicas más complejas en células eucariotas, en la que se dan una serie de reacciones que pueden agruparse en tres etapas (figura A.III.).

1) **El acetil-CoA se convierte en mevalonato.** La primera reacción está catalizada por la tiolasa, y condensa dos moléculas de acetil-CoA para dar acetoacetil-CoA. A continuación, otra molécula de acetil-CoA reacciona con el acetoacetil-CoA produciendo así 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), mediante la acción de la HMG-CoA sintasa. Finalmente la enzima HMG-CoA reductasa, dependiente de NADPH, se encarga de reducir al HMG-CoA hasta mevalonato (Bach y col., 1999; Cabrera y col., 1986; Chappell y col., 1995; Gill y col., 1985). La HMG-CoA reductasa es una enzima limitante en el proceso de control de la velocidad de la biosíntesis de colesterol en mamíferos (Basson y col., 1986) y es la enzima más estrictamente controlada de la ruta.

2) **El mevalonato se transforma en escualeno.** Para ello, el mevalonato sufre dos fosforilaciones sucesivas y una descarboxilación hasta convertirse en isopentenil pirofosfato, llamado también isopreno activo, que se isomeriza a dimetil-alil pirofosfato por la isopentenil pirofosfato isomerasa. Ambas moléculas, de cinco carbonos cada una, se condensan y producen geranyl pirofosfato (GPP), que reacciona con otra molécula de isopentenil pirofosfato (IPP) para dar farnesil pirofosfato. Ambas reacciones son catalizadas por la enzima farnesil pirofosfato sintasa (FPPS). Finalmente se produce la condensación de dos moléculas de farnesil pirofosfato, mediante la acción de la escualeno sintasa (SQS), dando lugar a escualeno. El farnesil pirofosfato participa en la síntesis de otros derivados isoprenoides fundamentales para la viabilidad celular, como son el dolicol, la ubiquinona y el grupo hemo A. Además, existen diferentes proteínas citosólicas involucradas en los sistemas de transducción de señales que necesitan ser modificadas post-traduccionalmente por isoprenilación para anclarse a la membrana y ser funcionales (Gelb y col., 1998). Entre ellas destacan la proteína *ras*, *rho* y *rab*.

3) Por último, se da **la conversión del escualeno en colesterol o ergosterol.** Es en esta etapa donde se ponen de manifiesto las diferencias entre la ruta de biosíntesis de esteroides de mamíferos y de tripanosomátidos. El escualeno sufre un proceso de ciclación para dar lugar a lanosterol, molécula de 30 carbonos que tras

varias transformaciones entre las que pierde tres grupos metilo, da lugar al colesterol en células de mamífero, a partir del cual se sintetizan hormonas esteroideas, vitamina D, ácidos biliares y lipoproteínas. Sin embargo, en tripanosomátidos el lanosterol sigue una ruta diferente, ya que además de ser desmetilado en posición 4 y 14, es metilado en posición 24. La desmetilación en posición 14 es realizada por la 14 α -desmetilasa, enzima dependiente del citocromo P-450. La metilación en posición 24 está catalizada por la enzima $\Delta^{24-(25)}$ -esterol metiltransferasa (SMT), que es dependiente de S-adenosil-L-metionina (AdoMet), y es característica de tripanosomátidos, hongos y plantas. El ergosterol (28 carbonos) es el principal esteroles en tripanosomátidos y el estigmasterol (29 carbonos) también está presente pero en menor proporción.

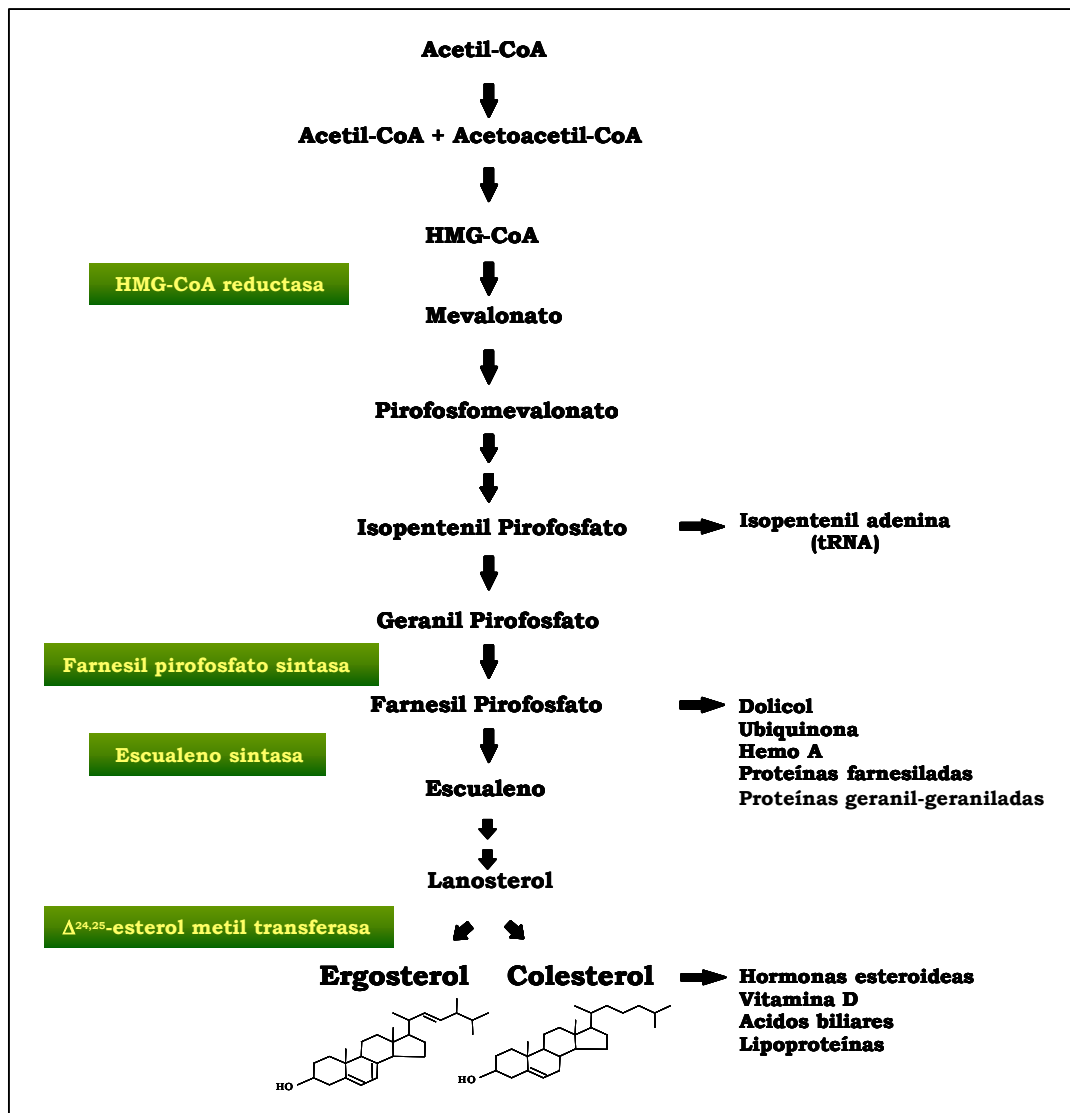


Figura A.III. Ruta de biosíntesis de isoprenoides.

A.III.1. COMPOSICIÓN DE ESTEROLES EN *Leishmania*

El esteroles mayoritario en promastigotes de *Leishmania tropica*, *L. donovani*, *L. mexicana* y *L. amazonensis* es el ergosta-5,7,24(24¹)-trien-3 β -ol, mientras que en *L. major* es el ergosta-7,24(24¹)-dien-3 β -ol. El ergosterol (ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol) es otro de los principales esteroides de 28 carbonos presente en protozoos parásitos, que difiere estructuralmente del colesterol, que presenta 27 carbonos (figura A.IV.). Los promastigotes de *Leishmania* también contienen esteroides de 29 carbonos como el estigmasta-5,7,22-trien-3 β -ol, que suelen suponer alrededor de un 5% del total (Roberts y col., 2003). Por el contrario, en amastigotes la cantidad de estigmasteroides supone el 20% de los esteroides endógenos (Roberts y col., 2003) y se han identificado como principales representantes el estigmasta-5,7,24(24¹)-trien-3 β -ol y el estigmasta-7,24(24¹)-dien-3 β -ol (figura A.IV.). Por otra parte, se ha demostrado que los promastigotes pueden tomar grandes cantidades de colesterol del medio de cultivo, pero no son capaces de metabolizarlo ni de sintetizarlo *de novo* a partir de mevalonato (Chance y col., 1997). El colesterol puede representar hasta el 50% de los esteroides totales en promastigotes, pero no es capaz de satisfacer los requerimientos celulares, y un alto contenido del mismo en las membranas del parásito se relaciona con pérdida de viabilidad. Por lo tanto, los tripanosomátidos necesitan sintetizar sus propios esteroides debido al importante papel que juegan tanto en el metabolismo celular como en el mantenimiento de las propiedades físicas de las membranas celulares. De ahí, la importancia de esta ruta para la búsqueda de nuevos inhibidores de la ruta como futuros fármacos antiprotozoarios (Urbina, 1997).

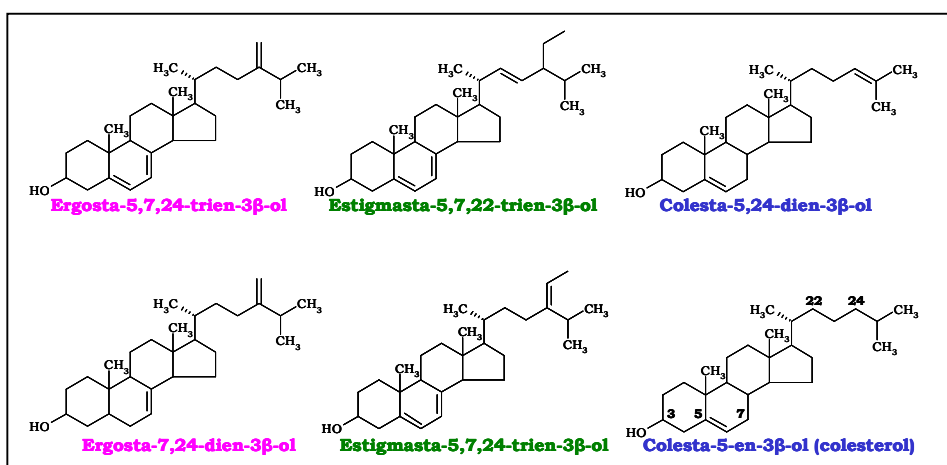


Figura A.IV. Estructura de los principales esteroides de mamífero y *Leishmania*. En la estructura del colesterol se indican con números los átomos de carbono para identificarlos en los demás esteroides.

A.III.2. INHIBICIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE ISOPRENOIDES

Dada la importancia de la ruta de biosíntesis de isoprenoides, ya existe un gran número de inhibidores específicos que tienen como blanco de acción algunas de las enzimas que la componen:

(I) La HMG-CoA reductasa es bloqueada por **estatinas**, que actualmente son utilizadas como agentes hipocolesterolemiantes en humanos. Estos compuestos son análogos estructurales del HMG-CoA, por lo que bloquean de forma competitiva a la enzima. La compactina (mevastatina) fue la primera sustancia de este grupo que fue aislada de *Penicillium citrinum* (Endo y col., 1976). El estudio de la relación estructura-actividad biológica de la compactina permitió la obtención de una serie de análogos provenientes de microorganismos o de técnicas biológicas y químicas. Surgieron así inhibidores como la lovastatina (mevinolina), metabolito de origen fúngico, y la simvastatina (sinvinolina), derivado sintético de la lovastatina. Estos fármacos son hidrolizados *in vivo* y pasan de una forma lactónica inactiva a su correspondiente hidroxiácido activo.

(II) La enzima FPPS es inhibida por compuestos denominados **bisfosfonatos** (Rogers, 1997; Rodan, 1998; Brown, 1999; Rodan, 2000). Estos fármacos se utilizan actualmente en clínica para el tratamiento de la osteoporosis post-menopáusica, enfermedad de Paget, metástasis óseas de tumores de mama, etc..(Hillner, 2000). Su mecanismo de acción está basado en la elevada afinidad que estos compuestos presentan por el tejido óseo, donde de forma específica se acumulan en osteoclastos, provocando la apoptosis de dicha células como consecuencia de la inhibición de la enzima FPPS. En tripanosomátidos se ha visto que estos compuestos, especialmente los que contienen nitrógeno como el pamidronato y el alendronato, inhiben el crecimiento de parásitos cultivados tanto *in vitro* como *in vivo*, en modelos animales de la enfermedad (Urbina y col., 1999).

(III) Una serie de inhibidores de la enzima SQS han sido diseñados gracias al estudio de su mecanismo de acción, tales como análogos estables de los intermedios carbocatiónicos de alta energía de la reacción, **1,1-bisfosfonatos lipofílicos** y análogos, incluso combinaciones de ambos tipos, como los 1,1-bisfosfonatos lipofílicos con nitrógeno. Paralelamente, se ha visto que metabolitos secundarios de hongos derivados del ácido zaragóxico, como son las escualestatinas, son capaces de inhibir de forma específica a la enzima SQS (Bergstrom y col., 1995).

(IV) La escualeno epoxidasa es inhibida por **alilaminas**, siendo el principal representante de este grupo la terbinafina. Este compuesto es capaz de inhibir la proliferación *in vitro* de células de *T. cruzi* y *Leishmania*, y se sugiere que su mecanismo de acción está basado en la alteración del contenido normal de esteroides en la membrana de estas células (Urbina, 1997).

(V) La 14 α -desmetilasa es inhibida por compuestos **azoles** como el ketoconazol (Urbina y col., 1996a; Urbina y col., 1998), potentes agentes antimicóticos que bloquean la 14 α -desmetilación oxidativa del lanosterol y otros 14 α -metilesteroles. Estos fármacos se unen al citocromo P-450, del cual es dependiente la desmetilasa, y como consecuencia se acumulan 14 α -metilesteroles y se producen cambios en la composición de esteroides de la membrana plasmática, a los que se atribuye la acción citotóxica de estos compuestos. Sin embargo, el ketoconazol es ineficaz frente a infecciones producidas por *T. cruzi*, debido a que se necesitan dosis muy elevadas de fármaco para producir cura parasitológica (Urbina y col., 1995). Frente a los distintos tipos de leishmaniasis la respuesta terapéutica es variable y depende del agente etiológico que la produzca. Así, el ketoconazol es efectivo para el tratamiento de algunas leishmaniasis cutáneas, pero no para la leishmaniasis visceral.

(VI) La enzima SMT es bloqueada por **azasteroles**. Estos compuestos son análogos de sustrato y están protonados a pH fisiológico. Se cree que mimetizan los intermediarios de alta energía producidos durante la reacción de metilación. Se ha visto que tienen efecto antiproliferativo frente a *Leishmania* (Haughan y col., 1995) y *T. cruzi* (Urbina y col., 1996b). La inhibición del crecimiento está asociada a la disminución de los 24-metilesteroles, que tienen un importante papel en la proliferación celular.

Por otra parte, la utilización conjunta de inhibidores que actúan a distintos niveles en la ruta de biosíntesis de isoprenoides aumenta de forma sinérgica la acción con respecto a la utilización individual de cada uno de los fármacos. Así, la combinación de un agente azol con un inhibidor de otra enzima de la ruta potencia fuertemente la acción de ambos (Rangel y col., 1996). Se ha demostrado un efecto sinérgico *in vitro* de la lovastatina y el miconazol frente a *Leishmania* (Haughan y col., 1992). Incluso se ha descrito cura parasitológica de ratones infectados con *T. cruzi* utilizando un tratamiento combinado de lovastatina y ketoconazol (Urbina y col., 1993). Estudios recientes han puesto de manifiesto un efecto sinérgico entre ketoconazol y risedronato (aminobisfosfonato) sobre la inhibición del crecimiento de *T. cruzi* (Martin, 2001). En este último trabajo se sugiere que la inhibición del crecimiento de estas células que produce el risedronato por sí solo es más potente que el que produce el ketoconazol, lo que nos deja entrever que quizás la inhibición de la isoprenilación de proteínas toma parte importante en esta muerte celular. En definitiva, el uso combinado de inhibidores que actúan en diferentes puntos de la biosíntesis de isoprenoides parece ser una buena estrategia a seguir para el desarrollo de un efectivo tratamiento antiprotozoario.

A.IV. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA ENZIMA FPP

La enzima farnesil pirofosfato sintetasa tiene un papel fundamental en la ruta de síntesis de esteroides, ya que supone un punto de ramificación importante para la síntesis de muchos tipos de isoprenoides (esteroides, colesterol, retinoides, carotenoides, ubiquinonas, proteínas preniladas, etc...), que son componentes esenciales de la maquinaria celular de todos los organismos, debido al papel que estas moléculas desempeñan en una gran variedad de procesos biológicos. Así, por ejemplo, los retinoides están involucrados en morfogénesis y fototransducción, mientras que proteínas preniladas como *ras* y *rho* GTPasas ejercen de segundos mensajeros en la traducción de señales. Además, los esteroides tienen muy distintas funciones biológicas, desde la regulación de la absorción de sodio por aldosterona, hasta el control del desarrollo sexual femenino mediado por estrógenos. Los isoprenoides presentan una gran variabilidad de tamaño, pero son meras repeticiones de unidades de isopreno, así por ejemplo, los esteroides y el colesterol son derivados de una molécula de farnesil pirofosfato (FPP), mientras que carotenoides y retinoides se forman a partir de una molécula de geranylgeranyl pirofosfato (GGPP). Asimismo, es de gran importancia destacar que la enzima farnesil pirofosfato sintetasa exhibe diferentes niveles de actividad en respuesta al nivel de colesterol en las células de mamífero, lo que hace de esta enzima un punto de regulación importante de la ruta de síntesis de esteroides. Teniendo en cuenta todas estas razones que hacen de esta enzima una diana importante de estudio, Clarke y col. consiguieron aislar el cDNA de hígado de rata de la FPPS, uniendo a este logro, la identificación de 30 residuos de dicha proteína implicados en la determinación del centro activo de la misma. Desde entonces, una gran variedad de cDNAs de esta enzima de muchos organismos diferentes han sido clonados hasta la fecha, incluyendo cDNA de *Saccharomyces cerevisiae* (Anderson, 1989), *E. coli* (Fijisaki, 1990), *Bacillus stearothermophilus* (Koyama, 1993), *White lupin* (Attucci, 1995), *Arabidopsis thaliana* (Cunillera, 1996) y humano (Sheares, 1989; Wilkin, 1990) entre otros. De igual manera, algunas de estas enzimas recombinantes han sido purificadas a homogeneidad, como las de *Bacillus stearothermophilus* (Koyama, 1993), *Saccharomyces cerevisiae* (Eberhardt, 1975), rata (Marrero, 1992), humano (Ding, 1991) y ave (Tarshis, 1994). Todas estas FPP sintetasas se han descrito como enzimas homodiméricas con subunidades comprendidas entre 32 a 44 kDa.

A.IV.1. CRISTALIZACION Y ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA FPPS.

La primera preniltransferasa que fue purificada a homogeneidad fue la FPPS de *S. cerevisiae* (Eberhardt, 1975), sin embargo, la primera FPPS cristalizada fue la de ave, obtenida por Tarshis en 1994, con una resolución de 2.6 Å. Esta enzima está compuesta por 10 α -helices dispuestas alrededor de una cavidad central hacia cuyo interior están dispuestos todos los residuos involucrados en catálisis, pertenecientes a las siete regiones altamente conservadas a lo largo de la familia de preniltransferasas.

La comparación de las secuencias aminoacídicas no sólo de farnesil pirofosfato sintetasas, sino también de geranylgeranyl pirofosfato sintetasas y hexaprenil pirofosfato sintetasas de varios organismos, ha permitido revelar la presencia de estas siete regiones altamente conservadas dentro de dicha familia de preniltransferasas (figura A.V.). Cabe destacar que dos de estas regiones son ricas en residuos de aspártico, ($D^1D^2xxD^3xxxxR^1R^2G$) y ($GxxFQxxD^4D^5xxD^6$), y se les ha denominado regiones 2 y 6, o bien, dominios I y II, respectivamente. Para profundizar en la importancia que tienen todos estos residuos conservados en las enzimas FPPSs, se han llevado a cabo numerosos experimentos de mutagénesis que serán comentadas a continuación.

Joly y Edwards demostraron que la mutagénesis de los residuos Asp-104, Asp-107, Arg-112, Arg-113 y Asp-243 de la FPPS de rata, que a su vez corresponden a los residuos D^2 , D^3 , R^1 , R^2 y D^4 en regiones 2 y 6, respectivamente, provocó una disminución de la V_{max} de aproximadamente 1000 veces si la comparamos con la V_{max} de la proteína salvaje (los residuos de Asp y Arg se reemplazaron por Gly y Lys respectivamente). Sin embargo, no se apreciaron cambios aparentes en los valores de K_m para el IPP ni para el GPP, lo que nos sugiere que estos residuos están involucrados en catálisis más que en unión a sustrato. Paralelamente, se reemplazaron los residuos Asp-103 (D^1) y Asp-247 (D^6) por residuos de Glu sin observar ningún cambio en las propiedades cinéticas. Si el reemplazamiento del primer residuo de aspártico Asp-243 de la región 6 (D^4) se hace por Glu, se ha visto que el valor de K_m de IPP aumenta unas 26 veces (Marrero, 1992). Si se mutan los residuos de lisina conservados en las regiones I y V (Lys-47 y Lys-183) por aminoácidos alifáticos, se observa una disminución de la afinidad de la enzima por IPP (Koyama, 1996). Todos estos experimentos sugieren que tanto las lisinas de regiones I y V como el primer residuo de aspártico de la región 6 contribuyen a la afinidad de unión de la enzima por el IPP. Más tarde, en 1996, Tarshis y colaboradores cristalizan la enzima FPPS de ave con sus respectivos sustratos y sugieren, en concordancia con lo que ya se había sugerido anteriormente con los experimentos de mutagénesis realizados, que los sustratos alílicos (DMAPP, GPP y FPP) se unen a la primera región rica en residuos de aspártico (dominio I) gracias al establecimiento de puentes de magnesio entre los grupos carboxilo de las aspárticos y los grupos fosfatos de los sustratos, y que el sustrato

homoalílico (IPP) se uniría a la segunda región rica en aspártico (dominio II), estableciendo puentes de magnesio de igual modo. Asimismo, determinaron que los residuos de fenilalanina dispuestos en las posiciones cuarta y quinta corriente arriba del primer aspártico del dominio I, están íntimamente ligados a la longitud del producto final, ya que son capaces de crear un bolsillo hidrofóbico que anida los sustratos DMAPP, GPP y FPP, pero no hay suficiente espacio como para que la cadena hidrofóbica del producto siga creciendo. A continuación, se han hecho mutaciones de estos dos residuos por aminoácidos de menor tamaño, como alanina y serina respectivamente (F112A y F113S) en la FPPS de rata, y se ha corroborado que este mutante se comporta de una manera similar a como lo hace la enzima geranil-geranil pirofosfato sintetasa, que genera un producto de 20 carbonos, gracias a un aumento en la profundidad del bolsillo hidrofóbico (Tarshis, 1996).

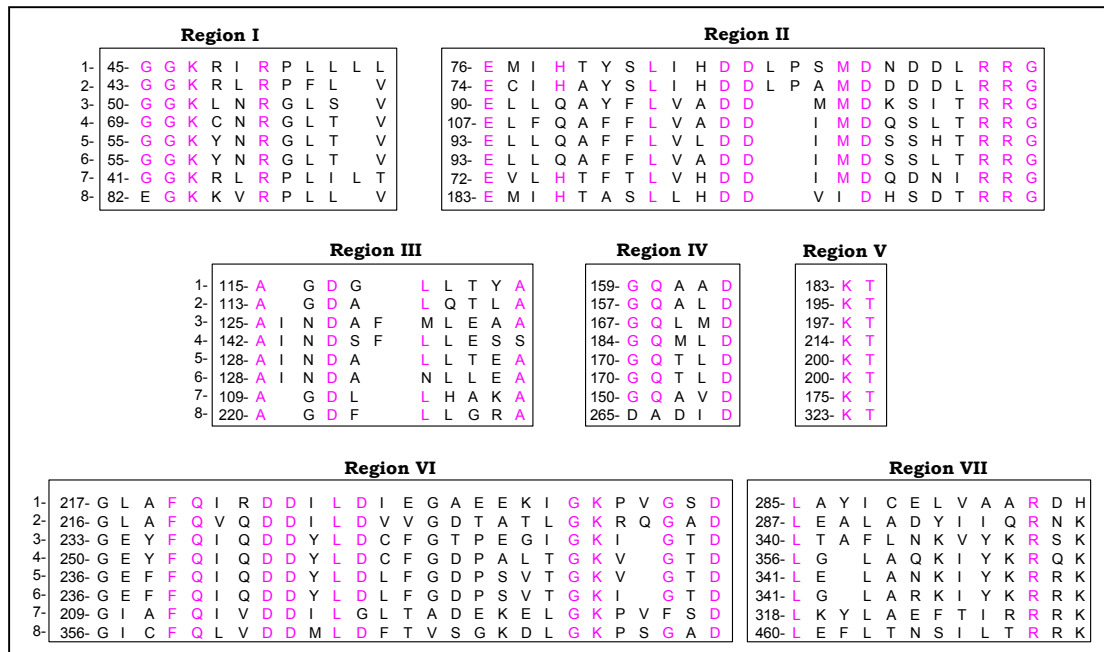


Figura A.V. Alineamiento de las secuencias aminoácidas de las siete regiones altamente conservadas en preniltransferasas. 1) FPP sintasa de *B. stearotherophilus* (Koyama, 1993), 2) FPPS de *E. coli* (Fujisaki, 1990), 3) FPPS de *S. cerevisiae* (Anderson, 1989), 4) FPPS de ave (Chen, 1994), 5) FPPS de rata (Clarke, 1987), 6) FPPS humana (Wilkin, 1990), 7) geranilgeranil difosfato sintasa de *Sulfolobus acidocaldarius* (Ohnuma, 1994) y 8) hexaprenil difosfato sintasa de *S. cerevisiae* (Ashby Edwards, 1990). El número indicado a la izquierda corresponde al primer aminoácido de cada cuadro. En rosa se destacan los residuos altamente conservados.

A.IV.2. MECANISMO DE ACCIÓN

La enzima farnesil pirofosfato sintetasa cataliza la condensación de una molécula de IPP (5 carbonos) con una de DMAPP (5 carbonos), para dar GPP (10

carbonos). A continuación, incorpora otra molécula de IPP a la de GPP, para obtener el producto final de la reacción, FPP, de 15 carbonos. El mecanismo de condensación cabeza-cola que se produce entre los sustratos alílico y homoalílico ha sido objeto de controversia durante los últimos 20 años, aunque finalmente prevalece la teoría que Poulter sugirió en 1978, cuando llevó a cabo ensayos con fluoromarcaje de sustratos. Este autor propuso que el mecanismo de reacción de la enzima FPPS se divide en tres etapas: ionización- condensación- eliminación. Como podemos ver en la figura A.VI., la molécula de DMAPP está sujeta a un proceso de ionización debido a la gran electronegatividad del grupo pirofosfato que atrae los electrones del C₁, generándose así un carbocatión alílico, con una carga positiva distribuida entre los átomos de carbono C₁, C₂ y C₃, y la consecuente liberación del grupo pirofosfato. Esta carga positiva del carbocatión alílico, que está estabilizada por el grupo pirofosfato liberado, así como por interacciones con la enzima FPPS (Hosfield, 2003), sufrirá un rápido ataque nucleofílico por parte de los electrones del doble enlace de la molécula de IPP (etapa de condensación). A continuación, hay una reordenación de cargas que conlleva a la eliminación de un protón y la consecuente formación de un doble enlace para obtener así la molécula de GPP. De igual manera tendremos la condensación de la molécula de GPP con una de IPP mediante la obtención de GPP en estado de carbocatión, seguido del ataque nucleofílico por parte de los electrones del doble enlace de IPP.

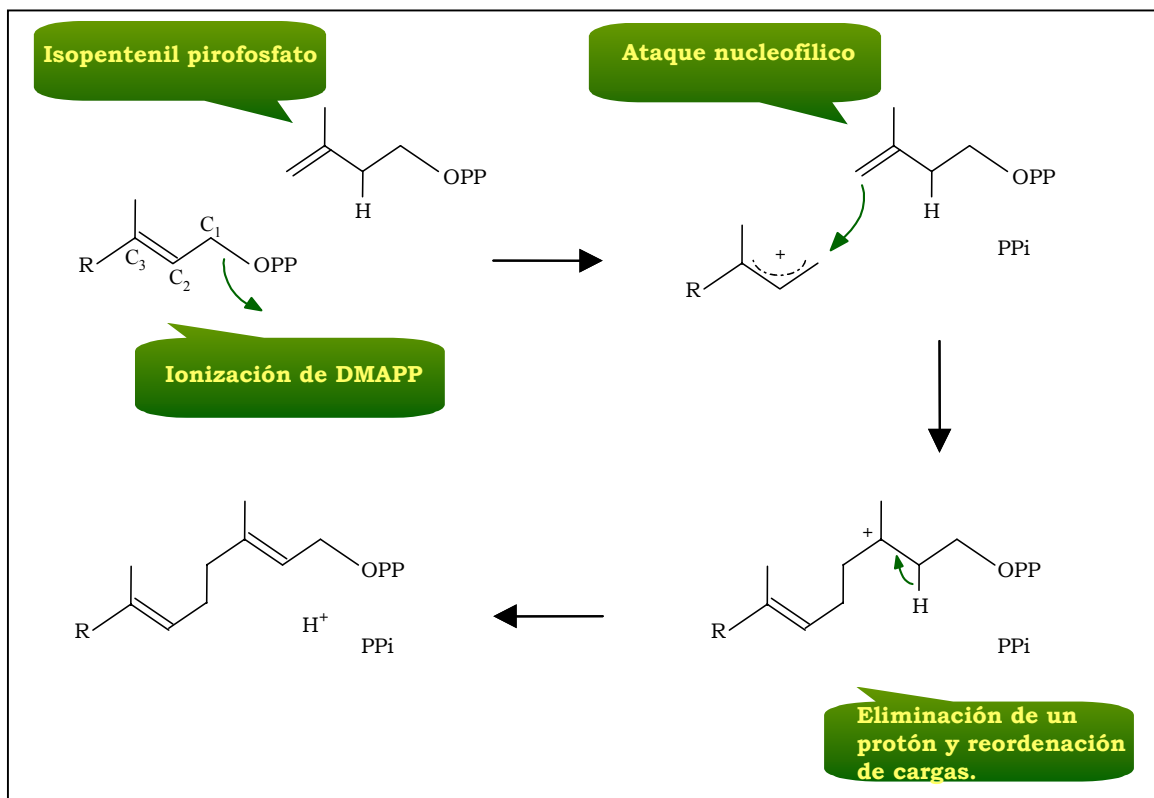


Figura A.VI. Hipótesis de la catálisis de la FPPS mediante un mecanismo de ionización- condensación-eliminación (Poulter, 1978).

A.V. ESTUDIOS DE INHIBICIÓN DE LA ENZIMA FPPS

A.V.1. MECANISMO DE ACCIÓN DE BISFOSFONATOS SOBRE EL HUESO.

Durante los últimos años ha cobrado especial interés el estudio del mecanismo de acción de los bisfosfonatos. Estos fármacos son compuestos sintéticos análogos de pirofosfato en los que se ha sustituido el átomo de oxígeno que aparece entre los dos átomos de fósforo por un átomo de carbono, y son usados actualmente en medicina para combatir afecciones óseas como: osteoporosis, metástasis óseas, osteolisis en mielomas, enfermedad de Paget, etc.. (Rogers, 1997; Rodan, 1998; Brown, 1999; Rodan, 2000). Gracias a su semejanza estructural con el pirofosfato cálcico y a su resistencia a fosfatasas ácida y alcalina, estos fármacos pueden anclarse a la superficie mineral del hueso con gran avidéz, donde son selectivamente internalizados por los osteoclastos (células involucradas en la resorción ósea) mediante endocitosis. Tras la acumulación selectiva de los bisfosfonatos en los osteoclastos, estos compuestos son capaces de conducir a la célula hacia un proceso de apoptosis. Dependiendo del mecanismo por el que se produzca esta muerte celular, los bisfosfonatos podrán clasificarse en dos grandes grupos:

- **Bisfosfonatos que no contienen nitrógeno:** son metabolizados hasta un citotóxico y no hidrolizable análogo de ATP por células de mamífero, provocando la apoptosis de osteoclastos mediante la inhibición de la H^+ -ATPasa vacuolar. Como ejemplo tenemos clodronato, etidronato y tiludronato.

- **Bisfosfonatos que contienen nitrógeno o aminobisfosfonatos:** no son metabolizados por el osteoclasto, y provocan su apoptosis mediante la inhibición de la enzima farnesil pirofosfato sintetasa y la consecuente inhibición de la prenilación post-transcripcional de pequeñas proteínas GTPasas como *ras*, *rac*, *rab* y *rho* (Dundford, 2001). Estas proteínas están involucradas en procesos biológicos tan importantes como el tráfico vesicular y el mantenimiento del citoesqueleto de la célula, pero para ello, previamente se les ha de transferir un grupo isopreno en su extremo carboxilo terminal, bien FPP o bien GGPP, que les permita anclarse a la membrana celular y ejercer así su función biológica (Coxon, 2002). Se ha propuesto que los aminobisfosfonatos actúan como análogos del estado de transición del geranil pirofosfato (Hosfield, 2004). Como ejemplo tenemos risedronato, alendronato, pamidronato, ibandronato y zolendronato.

Recientemente se ha confirmado que tanto en plantas como en amebas, el blanco intracelular de los aminobisfosfonatos es, al igual que en osteoclastos, la enzima farnesil pirofosfato sintetasa (Van Beek, 1999; Cromartie, 1999; Grove, 2000).

A.V.2. AMINOBISFOSFONATOS COMO AGENTES ANTIPROTOZOARIOS.

El interés que han despertado estos fármacos como futuros fármacos antiprotozoarios se debe al reciente hallazgo de que los bisfosfonatos son capaces de inhibir el crecimiento *in vitro* de parásitos como *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. donovani*, *T. gondii* y *P. falciparum* (Martin, 2001), sin provocar daño aparente en la célula hospedadora. Asimismo, se ha visto que risedronato es capaz de producir cura parasitológica de ratones con leishmaniasis visceral (causada por *L. donovani*) (Yardley, 2002), así como de ratones con enfermedad de Chagas (causada por *T. cruzi*) (Garzoni, 2004). Paralelamente, se ha comprobado que pamidronato también es capaz de producir cura parasitológica de leishmaniasis cutánea (causada por *L. mexicana*) (Rodríguez, 2002) en ratones, sin apreciar toxicidad en la célula hospedadora en ninguno de los tres casos.

Por otra parte, desde que se sabe que la biosíntesis de esteroides está afectada por inhibidores de la farnesil pirofosfato sintetasa, se ha investigado el efecto de risedronato (uno de los bisfosfonatos más potentes sobre proliferación parasitológica) sobre la biosíntesis de esteroides en *T. cruzi*, en conjunción con ketoconazol (inhibidor de la enzima 14- α -desmetilasa). Cuando ambas drogas se usan en combinación, se aprecia una completa inhibición del crecimiento y lisis celular. Además, hay una disminución en la cantidad de esteroides 14- α desmetilados, mientras que no se detectó acumulo de escualeno. Este fue uno de los primeros hallazgos que llevaron a pensar que los bisfosfonatos estaban actuando a un nivel pre-escualeno en parásitos, algo que concordaba con la idea de que el principal blanco del fármaco podría ser la farnesil pirofosfato sintetasa como ocurre en osteoclastos, plantas y eucariotas primitivos (Martin, 2001).

Se ha postulado que la actividad selectiva de aminobisfosfonatos sobre tripanosomátidos y parásitos apicomplexa podría ser consecuencia de un acúmulo preferencial de estos inhibidores en el parásito debido a la presencia de un orgánulo llamado acidocalcisoma, rico en calcio y pirofosfato. Este orgánulo jugaría un papel equivalente al del hueso mineral, el cual presenta una alta afinidad en la unión de estos compuestos (Urbina, 1999; Docampo, 1999). Esta hipótesis ha sido reforzada muy recientemente, gracias a la demostración del acúmulo de pamidronato marcado con tritio en acidocalcisosmas intactos de *T. cruzi*. (Ruiz FA y Docampo, resultado sin publicar). Los acidocalcisosmas son compartimentos ácidos ricos en calcio, magnesio, sodio, zinc y polifosfatos de cadena corta y larga, y están presentes en tripanosomátidos y parásitos apicomplexa (Docampo, 2001). Curiosamente, *D. discoideum* presenta una estructura similar y es probable que la entrada de aminobisfosfonatos a este organismo esté mediado por este orgánulo rico en calcio, magnesio y polifosfatos (Rogers, 1995; Schlatterer, 1994).

A.V.2.1. Otros efectos de bisfosfonatos que podrían mejorar su actividad antiprotozoaria.

Es interesante destacar que los macrófagos (células hospedadoras preferidas de las especies de *leishmania*), así como los osteoclastos, parecen ser susceptibles a los bisfosfonatos, lo que ha facilitado su uso como potentes fármacos antiosteoporóticos (Rogers, 1997). A esto se suma, que el hígado y el bazo (tejidos diana de infección por *Leishmania*) pueden alcanzar altos niveles de bisfosfonatos con respecto a la concentración encontrada en plasma (Ylitalo, 1996).

Por otra parte, se ha demostrado que los aminobisfosfonatos son capaces de generar un efecto inmunomodulatorio sobre el paciente puesto que son capaces de aumentar los niveles de linfocitos $\gamma\delta$ T en sangre periférica así como de interferón alfa (Kunzman, 2000). Este hecho tiene su explicación ya que el isopentenil pirofosfato (IPP), un isoprenoide de la ruta de esteroides, fue caracterizado como un ligando natural de receptores de células $\gamma\delta$ T (Tanaka, 1995), estando este compuesto relacionado estructuralmente con los bisfosfonatos.

Todo estos factores unidos al hecho de que los bisfosfonatos son fármacos ya aprobados en clínica, hacen de ellos un atractivo grupo para desarrollo de fármacos antiprotozoarios.

A.VI. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE ESTEROLES

La localización de la enzima FPPS reviste una gran controversia; durante los últimos diez años numerosos estudios han demostrado el papel central de los peroxisomas en la biosíntesis de isoprenoides. Estos trabajos destacan que la gran mayoría de las enzimas envueltas en el segmento pre-escualeno de la síntesis de esteroides, incluyendo a la HMGCoA reductasa (Keller y col., 1985), la mevalonato quinasa (Biardi y col., 1994), la fosfomevalonato quinasa (Olivier y col., 1999), la mevalonato pirofosfato descarboxilasa (Biardi y col., 1996), la isopentenil pirofosfato isomerasa (Paton y col., 1997) y la farnesil pirofosfato sintasa (Krisans y col., 1994; Gupta y col., 1999), podrían estar localizadas, si no en su mayoría, principalmente, en dichos orgánulos. Sin embargo, una serie de trabajos recientes dejan de avalar esta localización peroxisomal tanto de la mevalonato quinasa (Hogenboom y col., 2004) como de la fosfomevalonato quinasa (Hogenboom y col., 2004), sugiriendo que se trata de enzimas predominantemente citosólicas.

La localización de la ruta de biosíntesis de esteroides en tripanosomátidos es poco conocida. La HMGCoA reductasa ha sido descrita como una enzima de matriz mitocondrial en *Leishmania major* y *Trypanosoma cruzi* (Peña-Díaz, 2003), lo que estaría de acuerdo con el establecimiento de la leucina como sustrato mayoritario para la síntesis de esteroides en tripanosomátidos (Ginger y col., 2001). Este hecho supone un ahorro de energía muy importante para la célula, al igual que ocurre en tejidos animales, plantas y hongos. En cuanto a la localización de enzimas como SQS y SMT en *T. cruzi* y *L. mexicana*, Urbina y col. (2002) observaron una localización dual entre glicosoma y mitocondria altamente dependiente de la fase de crecimiento del cultivo. Sin embargo, estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio han puesto de manifiesto una localización mayoritaria de la enzima SMT en la membrana de acidocalcisoma de *Leishmania major*.

En definitiva, estudios sobre la localización de la biosíntesis de esteroides y del mecanismo de transporte de estos compuestos a nivel intracelular tiene una elevada trascendencia para la comprensión del papel biológico de los esteroides en la familia *Trypanosomatidae*. La información obtenida ayudará en el diseño de fármacos para el tratamiento de enfermedades protozoarias.

A.VII. REGULACIÓN DE LA ENZIMA FPPS

El ergosterol es un componente esencial de la membrana plasmática que afecta a la fluidez, permeabilidad y actividad de las enzimas de unión a membrana. Intermediarios de su síntesis están involucrados en la obtención del grupo hemo A, ubiquinonas, dolicoles, así como en modificaciones post-transcripcionales de proteínas de unión a GTP. Considerando todas las funciones que desempeñan estos isoprenoides, es obvio pensar que el nivel de síntesis de los mismos debe estar estrictamente controlado.

Durante los últimos años, algunos de los genes que controlan la síntesis de estos intermediarios han sido clonados, y los mecanismos moleculares de regulación de la ruta del mevalonato están empezando a conocerse. Durante la últimas décadas se había puesto de manifiesto el incuestionable papel regulador de la HMGCoA reductasa en la ruta del mevalonato, gracias a la gran cantidad de inhibidores disponibles que existen frente a dicha enzima. Sin embargo, estudios más recientes sugieren que la regulación de la ruta de biosíntesis de isoprenoides parece ser compleja en todos los organismos eucariotas superiores estudiados (incluyendo la levadura *Saccharomyces cerevisiae*), aceptando distintos puntos de regulación que actuarían controlando el flujo de esteroides. Con el fin de examinar los distintos puntos de regulación de dicha ruta, Dimster-Denk y col., mediante estudios de genómica

funcional con levaduras, analizaron la expresión de todos los genes involucrados en la biosíntesis de isoprenoides, en respuesta al tratamiento de las células con 8 inhibidores de diferentes puntos de la ruta: L659-699 (inhibe a la HMGCoA sintasa), estatinas (inhiben a la HMGCoA reductasa), ácido zaragózico (inhibe a la escualeno sintetasa) y diferentes azoles, entre ellos la lovastatina (inhiben a la 14- α -desmetilasa). Como resultado se obtuvo una inducción compensatoria de la expresión de una serie de genes involucrados en la síntesis de isoprenoides como son los de mevalonato quinasa, fosfomevalonato quinasa, fosfomevalonato descarboxilasa, escualeno sintetasa, C-8 esteroles isomerasa y farnesil difosfato sintetasa (Dimster-Denk, 1999).

Desde que la estructura cristalina de la FPPS de ave fue presentada por Tarshis y col. (Tarshis, 1994), se pudo obtener un modelo para la FPPS de levadura (Plochocka y col., 2000) que facilitó la obtención de mutantes de levadura que presentaran diferentes actividades de la enzima FPPS, mediante la mutación de diferentes residuos críticos implicados en la actividad de la misma (Karst, 2004). Tras el análisis de estos mutantes se demuestra que un descenso de la actividad de la FPPS a un 42%, no conlleva a una disminución en el nivel de ergosterol (en este caso se muta la fenilalanina en posición 96 por triptofano, F96W). Esto nos sugiere que el flujo de FPP se dirige principalmente a la síntesis de ergosterol para mantenerlo en un nivel constante. Cuando la actividad de la FPPS se ve disminuida hasta un 20% con respecto a la cepa salvaje (K197R), el nivel de ergosterol disminuye hasta un 50%. Pero sorprendentemente, cuando la actividad de la FPPS en el mutante disminuye hasta un rango de 2-20% (K197V), el nivel de ergosterol permanece prácticamente inalterado, manteniéndose en un nivel del 50%. Por tanto, se sugiere que la mayor parte del FPP producido por estas enzimas mutadas se dirige hacia la síntesis de ergosterol para mantener un nivel constitutivo que asegura la supervivencia de la célula. Asimismo, se analizó el crecimiento de las levaduras transformadas con los diferentes plásmidos que generan diferentes actividades de la enzima y se comprobó que aquellas en que la actividad de la FPPS queda disminuida a un 42%, la velocidad de crecimiento no se ve afectada. Esto podría ser debido a que en momentos de alta demanda de esteroides durante la formación de membranas ricas en ergosterol, los esteroides de esteroles almacenados en la célula se hidrolizan para obtener ergosterol, y de esta manera no se ve afectada la concentración de FPP requerido para la prenilación de proteínas. Curiosamente, con una actividad de la enzima entre 2-20%, se aprecia una notable disminución del crecimiento. Estos resultados demuestran que hay una estrecha correlación entre la actividad de la FPPS, el nivel de ergosterol y la fisiología de la levadura. Asimismo, Szkopinska y colaboradores, además de demostrar que un aumento de 6 veces en la actividad de la FPPS conlleva a un aumento de la síntesis de ergosterol y dolicol (80 y 32%, respectivamente), vieron que la actividad de la HMG-CoA reductasa no se ve alterada, lo que nos sugiere que la FPPS, independientemente de la

HMG-CoA reductasa, es responsable de dirigir la formación de FPP hacia la SQS y preniltransferasas, actuando como una enzima limitante de velocidad de la síntesis de escualeno e isoprenilación. Paralelamente, demostraron que las levaduras crecidas en presencia de ergosterol, y con el gen SQS mutado, presentan una disminución en la actividad tanto de FPPS como de HMG-CoA reductasa (78 y 83% de disminución, respectivamente); mientras que en la misma cepa privada de ergosterol la actividad FPPS aumenta 10 veces, mientras que la actividad de la HMGCoA reductasa permanece inalterada. Todos estos resultados presentados sugieren que la regulación de la síntesis de mevalonato estaría gobernada no sólo por la HMG-CoA reductasa como se ha venido pensando en los últimos años, sino que también la FPPS y la SQS podrían tener un papel importante en dicha regulación.

La regulación de la ruta del mevalonato ha sido muy poco estudiada en protozoos parásitos. En concreto, en *Leishmania*, se ha estudiado la regulación de la HMGCoA reductasa, cuya expresión aumenta en presencia de estatinas como la lovastatina (inhibidor de la HMGCoA reductasa) así como de ketoconazol (inhibidor de la 14 α -desmetilasa). Por tanto, podríamos decir que una disminución en la síntesis de compuestos esenciales para la proliferación y viabilidad de la célula, produciría un aumento en la actividad reductasa destinado a satisfacer los requerimientos celulares. Este aumento en la expresión de la reductasa parece deberse a un aumento en la tasa de traducción, aunque no se puede descartar la existencia de mecanismos de regulación postraduccionales.

A.VIII. RELACIÓN ENTRE EL METABOLISMO DE ISOPRENOIDES Y EL CRECIMIENTO CELULAR.

El hecho de que productos derivados del mevalonato como el farnesil pirofosfato y el geranil-geranil pirofosfato sean incorporados a proteínas que participan en la regulación del crecimiento, ha despertado un gran interés en determinar la relación entre el metabolismo de isoprenoides y el crecimiento celular. Diferentes proteínas involucradas en la traducción de señales como *ras* y *rho*, han de ser isopreniladas postraduccionalmente para asegurar así su translocación a la membrana plasmática y su función.

Las proteínas *ras* componen una superfamilia de proteínas de bajo peso molecular y de unión a GTP, que incluye 21 miembros de la subfamilia rho como son *rhoA*, *rac* y *Cdc42*; y 18 miembros de la subfamilia Ras como H-Ras, N-Ras y K-Ras; estas proteínas están mutadas en un 10 % de los casos de cáncer humanos (Coleman y col., 2004). Su actividad depende de una alternancia entre un estado inactivo en que permanecen unidas a GDP y un estado activo en que aparecen unidas a GTP. Las

proteínas G generalmente se encuentran cerca del receptor de membrana en forma inactiva, unidas a GDP. Cuando llega un estímulo determinado, el receptor de membrana interacciona con la proteína G inactiva, y ésta sufre un cambio de conformación y un intercambio de GDP por GTP. En este momento, estas proteínas son capaces de interactuar con otras proteínas cercanas, desencadenando una cascada de reacciones que están involucradas en una gran variedad de procesos celulares como la división celular o el mantenimiento del citoesqueleto. Finalmente, tras la hidrólisis del nucleótido de guanina, la proteína vuelve a adoptar su conformación inactiva unida a GDP.

Tanto *ras* como *rho* son capaces de promover la formación y desarrollo de un tumor, como resultado de un incremento en la intensidad y/o duración de la señal que codifican (Sahai y col., 2002; Downward y col., 2002). En el caso de *ras*, se ha demostrado que la presencia de mutaciones en dicha proteína conllevan a un bloqueo del estado activo de la misma, cuando se encuentra unida a GTP, lo que provoca una prolongación en la activación de la transcripción celular, activándose de manera desregulada la división celular (Dasgupta y col., 2003). Por su parte, entre las *rho* GTPasas no se conocen casos de mutaciones, pero sí de sobreexpresión relacionados con tumorigénesis (Sahai y col. 2002).

Dada la relevante importancia de estas proteínas en la formación y progresión de tumores, han sido consideradas como importantes dianas terapéuticas para el desarrollo de fármacos antitumorales. El hecho de que esta familia de proteínas GTPasas citosólicas requieran una serie de modificaciones postraduccionales como son la farnesilación (unión de una molécula de FPP) o geranil-geranilación (unión de una molécula de GGPP) para anclarse a la membrana y actuar como intermediarios en numerosas cascadas de señalización, ha abierto un nuevo campo de desarrollo de compuestos antineoplásicos que tienen como objetivo el impedimento de la isoprenilación de dichas proteínas.

Las estatinas son compuestos inhibidores específicos de la HMGCoA reductasa que fueron originalmente creados como agentes hipocolesterolémicos. Dado que son compuestos capaces de disminuir la síntesis de FPP y GGPP, así como el posterior proceso de isoprenilación, se ha venido desarrollado una serie de estudios en clínica que han demostrado su aplicabilidad como futuros agentes antineoplásicos (Wong y col., 2002; Kawata y col., 2001).

Asimismo, los aminobisfosfonatos son otra clase de compuestos terapéuticos usados actualmente para combatir enfermedades óseas. Numerosos estudios han puesto de manifiesto la capacidad antiproliferativa y antiapoptótica de estos fármacos, como resultado de la inhibición de la isoprenilación de proteínas *rho* y *ras*, que se produce como consecuencia de la inhibición de la FPPS (Tassone y col., 2003; Caraglia y col., 2004; Oades y col., 2003; Luckman y col., 1998; Senaratne y col., 2002; Denoyelle y col., 2003). Los aminobisfosfonatos han sido usados con éxito en el

tratamiento de pacientes con metástasis óseas, aunque todavía queda por resolver si el efecto antitumoral observado *in vitro* y en modelos animales se podría trasladar a una terapia eficaz frente a tumores de tejidos blandos. Se ha propuesto que el uso de una terapia combinada de estatinas y aminobisfosfonatos podría ser una buena alternativa como terapia eficaz, ya que la inhibición de la síntesis de isoprenoides estaría mediada por el bloqueo de la ruta del mevalonato en dos puntos críticos (Vincanzi y col., 2003).

A.IX. MECANISMOS DE RESISTENCIA A FÁRMACOS EN *Leishmania*.

La ausencia de fármacos efectivos frente a los protozoos parásitos unido al desarrollo de resistencias frente a los fármacos utilizados supone un grave impedimento para el control de enfermedades parasitarias.

En *Leishmania*, la resistencia a fármacos se ha asociado a la amplificación génica y gran parte de los estudios de transfección se han enfocado a aclarar los mecanismos de resistencia a drogas (Ouellette, 2001). Estos DNAs amplificados son en su mayoría DNAs extracromosómicos circulares que suelen llevar varios elementos implicados en la resistencia. Al igual que las amplificaciones de mamíferos, estos DNAs se forman a partir del DNA cromosómico y pueden mantenerse como formas estables o inestables; y, a diferencia de lo que ocurre en procariotas, no existe la transmisión entre células de este material extracromosómico.

Un modelo establecido para la amplificación de genes en *Leishmania* sugiere que estos organismos contienen dentro de su genoma ciertas secuencias que participan en ciclos de amplificación y pérdida de determinados loci (Beberley, 1991). Bajo condiciones de presión selectiva o incluso de forma natural, parte de la información contenida en el genoma salvaje dirige la formación de estructuras amplificadas en una pequeña porción de células de la población, de modo, que en el caso de que haya una presión de fármaco, habrá una selección de las células resistentes, mientras que las salvajes morirán. Cuando la presión selectiva se elimina, generalmente, el DNA extracromosómico desaparece y sólo queda la copia del locus original; aunque en algunas ocasiones, estas amplificaciones se pueden convertir en estables si se prolonga el tiempo de exposición al fármaco (Garvey y Santi, 1986). En mamíferos, se ha visto que la transición de inestable a estable de un elemento extracromosómico se debe a la relocalización cromosómica del mismo; sin embargo, esto no ocurre en *Leishmania*, donde los elementos extracromosómicos permanecen como tal (Garvey y Santi, 1986).

El esclarecimiento de los mecanismos moleculares implicados en la generación y mantenimiento de elementos extracromosómicos en *Leishmania* ayudará a comprender las bases genéticas de la replicación y la regulación génica en estos organismos. Por

otra parte, su estudio contribuirá al desarrollo de estrategias para el diseño de nuevos fármacos útiles en el control de casos resistentes de leishmaniasis.

B. MATERIAL Y MÉTODOS

B.I. MATERIAL

B.I.1. LÍNEAS CELULARES Y FAGOS

B.I.1.1. Parásitos

Se utilizaron promastigotes del clon CC-1 P2 de la cepa de *Leishmania major* 252 cedidas por la Dra. Angela Cruz (Kapler y col., 1990)

B.I.1.2. Bacterias

Fueron empleadas las siguientes cepas de *Escherichia coli*:

XL1-Blue (Bullock y col., 1987)

Rec A1, end A1, gyr A96, thi-1, hdsR17, supE44, relA1, lac [F⁺ *proAB lacI^q ΔM15 Tn10* (Tet^r)]

XL1-Blue MRF⁺ (Kretz y col., 1991)

Δ(mcrA)183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi⁻¹, recA1, gyrA96, relA1, lac [F⁺ *proAB lacI^q ΔM15 Tn10* (Tet^r)]

XL0LR (Alting-Mees y col., 1993)

Δ(mcrA)183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, thi⁻¹, recA1, gyrA96, relA1, lac [F⁺ *proAB lacI^q ΔM15 Tn10* (Tet^r)], Su⁻, λ^r

BL21(DE3) (Phillips y col., 1984)

F dcm, ompT, hsdS (r_B⁻ m_B⁻) gal λ (DE3)

B.I.1.3. Fagos

ZAP ExpressTM (Alting-Mess y col., 1993)

Es utilizado para la elaboración de la genoteca de expresión. Con la ayuda del fago *helper* pExAssistTM es capaz de excindirse y dar origen al fagémido pBK-CMV.

pExAssistTM (Alting-Mess y col., 1993)

Fago de DNA de cadena sencilla (5 kb) que participa en la excisión del fago ZAP Express™ para originar el fagémido pBK-CMV.

B.I.2. MEDIOS DE CULTIVO

B.I.2.1. Para parásitos

M199

Este medio se utilizó para cultivar *in vitro* formas promastigotes de *L. major* 252. El M199 (Gibco) fue tamponado con 25 mM de Hepes a pH 7.4 (Sigma) y enriquecido con un 10% de suero bovino fetal (SBF) (Gibco) previamente inactivado a 56°C durante 30 minutos. Se esterilizó por filtración a través de membranas de 0.22 µm (Sistema de filtración *VacuCap*™ de Gelman Sciences).

M199 completo (Kapler y col., 1990)

Fue elaborado para el cultivo *in vitro* de formas promastigotes transfectadas de *L. major* 252. Está compuesto por M199 1x (Gibco), SBF 10% (Gibco), Adenina 100µM (stock preparado en Hepes 50mM, pH 7.5 (Sigma)), Hepes 40mM, pH 7.5 (Sigma), hemina 0,0005% (stock preparado a 0.25% en trietanolamina 50% (Sigma)), biotina 0,0001% (stock preparado a 0.1% en etanol 95%), penicilina 50 U/ml, estreptomycinina 0,05 mg/ml y biopterina 0.0006 mg/ml (Sigma). El medio sólido presenta un 1% de agar noble (Gibco).

B.I.2.1.1. Compuestos adicionados a los medios de cultivo

➤ **Antibióticos**

Geneticina (G-418) (Gibco)

Es un inhibidor de la síntesis de proteínas. Se utilizó como marcador para la selección de las células de *L. major* 252 transfectadas con el vector que contiene el gen de la neomicina fosfotransferasa. Se adicionaron cantidades de fármaco diferentes (16, 32, 100, 480 µg/ml) a partir de una solución acuosa de 3.2 mg/ml.

➤ **Otros compuestos**

Bisfosfonatos (cedidos por el Dr. Eric Oldfield)

Son compuestos inhibidores de la FPPS que se prepararon a una concentración de 40 mM en PBS. Posteriormente se realizaron diluciones para llevar a cabo los ensayos de inhibición.

Para ensayos de inhibición de crecimiento de promastigotes de *L. major* se utilizó Risedronato (aminobisfosfonato). Este fármaco se preparó a una concentración de 40mM en PBS, se neutralizó con NaOH hasta alcanzar pH.7 y se filtró con *Acrodisc* de 0.22 μm antes de adicionar al medio de cultivo.

B.I.2.2. Para bacterias

Medio líquido LB (Luria-Bertani) (Sambrook y col., 1989)

Este medio contiene 10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura y 5 g/l de NaCl. El medio sólido contiene 15 g/l de bacto-agar.

Medio líquido NZ (Sambrook y col., 1989)

Está compuesto por 10 g/l de NZamina, 5 g/l de NaCl, 5 g/l de extracto de levadura, 1 g/l de casaminoácidos y 2 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, con un pH de 7.5. El medio sólido (*bottom agar*) contiene además 15 g/l de bacto-agar y para favorecer el crecimiento de los fagos se generan capas adicionales (*top agar*) suplementando las placas de medio NZ con 7 g/l de agarosa.

B.I.2.2.1. Compuestos adicionados a los medios de cultivo

➤ **Antibióticos**

Ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Roche Molecular Biochemicals)

Se utilizó para seleccionar las bacterias portadoras de plásmidos que contienen el gen de la β -lactamasa. El producto de este gen confiere resistencia al antibiótico.

Kanamicina (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Sigma)

Fue empleada para la selección de *E. coli* XLOLR transformadas con el fagémido pBK-CMV obtenido en la excisión del fago λ -ZAP Express™ en el *screening* de cDNA. Este plásmido pBK-CMV contiene el gen *kan*, cuyo producto de expresión es el responsable de la resistencia a kanamicina.

Tetraciclina (12 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Sigma)

El gen *Th10* es el responsable de la resistencia a este antibiótico. Se localiza en el episoma F' de *E. coli* XL1-MRF'. El episoma contiene genes que intervienen en la formación del pili F' que es necesario para que las bacterias puedan ser infectadas por

fagos filamentosos (fago pExAssist™). Además presenta una mutación en el gen *lacZ* que permite seleccionar recombinantes por α -complementación de este gen.

➤ **Otros compuestos**

Maltosa (0.2 %, p/v)(Sigma)

Es utilizado para favorecer la infección de las bacterias por los fagos, ya que induce al operón maltosa que contiene a los genes *lamb*. Estos genes codifican el receptor que utiliza el fago para la infección.

MgSO₄ (10 mM)(Sigma)

Es adicionado a los medios de cultivo porque estimula la unión del fago λ al receptor, favoreciendo así la infección de las bacterias.

Isopropil- β -D-tio-galactopiranosido (IPTG) (0.25 mM) (Roche)

Se adicionó al medio de cultivo de bacterias transformadas con plásmidos que poseen el sistema de selección del operón *lac*. El IPTG inactiva el producto del gen *lacI* (represor del operón *lac*) e induce la expresión del gen *lacZ* que codifica a la β -galactosidasa. En el *polylinker* de estos plásmidos se localiza el gen *lacZ*, de manera que cuando se clonan fragmentos de DNA se interrumpe su expresión.

5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-galactopiranosido (Xgal) (0.417 mg/ml) (Roche)

Este compuesto es reconocido por la β -galactosidasa, dando lugar a un producto azulado. El color de las colonias bacterianas en el medio de cultivo con IPTG y Xgal permite seleccionar bacterias recombinantes positivas y negativas.

B.I.3. TAMPONES Y SOLUCIONES**Tabla B.I**

TAMPÓN/SOLUCIÓN	COMPOSICIÓN
HBS. Tampón para transfectar parásitos (Kapler y col., 1990)	Hepes 21 mM, NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Na ₂ HPO ₄ 0.7 mM, glucosa 6 mM (pH 7.5)
TE 1x (Sambrook y col., 1989)	Tris-HCl 10 mM (pH 7.4), EDTA 1 mM (pH 8.0)
PBS (tampón fosfato salino) (Sambrook y col., 1989)	NaCl 0.14 M, KCl 2.6 mM, NaH ₂ PO ₄ 10 mM, KH ₂ PO ₄ 1.5 mM (pH 7.2).
PBS con inhibidores de proteasas para obtener extractos crudos de parásitos.	PBS, leupeptina 25 µg/ml, aprotinina 50 µg/ml, 1,10-fenantrolina 10 mM, inhibidor de tripsina 50 µg/ml, benzamidina 1 mM, PMSF 50 µM, pH 7.2
Solución desnaturalizante para transferir geles de agarosa con DNA (Sambrook y col., 1989).	NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M.
Solución neutralizante para transferir geles de agarosa con DNA (Sambrook y col., 1989)	NaCl 1.5 M, Tris-HCl 0,5 M, (pH 7.0)
SSC 20x (Sambrook y col., 1989).	NaCl 3M, citrato sódico 0.3 M (pH 7.0).
Solución de hibridación (Sambrook y col., 1989).	Formamida 50%, solución Denhardt 5x, SSC 5x, DNA de esperma de arenque 1%, EDTA 5 mM (pH 8.0).
Solución Denhardt 50x (Sambrook y col., 1989).	Ficoll 400 10g/l, polivinilpirrolidona 10g/l, albúmina de suero bovino 10g/l. Esterilizado por filtración.
Solución de lavado para filtros con DNA o RNA (Sambrook y col., 1989).	SSC 2x, SDS 0.1% (p/v).
Solución para deshibridar filtros de <i>nylon</i> con DNA. (Ausubel y col., 1983).	Tris-HCl (pH 7.5) 0.2 M, SDS 0.1%, SSC 0.1x.
Tampón SM (Sambrook y col., 1989)	NaCl 0.1 M, MgSO ₄ 10 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7.4), gelatina 0.01 % (p/v)
TAE 1x (Sambrook y col., 1989)	Tris-Acetato 0.04 M, EDTA 1 mM (pH 8.0)

TAMPÓN/SOLUCIÓN	COMPOSICIÓN
TBE 1x (Sambrook y col., 1989)	Tris-borato 0.089 M, ácido bórico 0.089 M, EDTA 0.002 M (pH 8.0)
Tampón de carga 6x para DNA (Sambrook y col., 1989)	Azul de bromofenol 0.25 % (p/v), xileno cianol 0.25 % (p/v), glicerol 30 % (v/v)
Tampón de carga 4x para proteínas en geles SDS-PAGE (Laemmli, 1970)	Tris-HCl 0.27 M, SDS 12 % (p/v), glicerol 40 % (v/v), 2-mercaptoetanol 20 % (v/v)
Solución para teñir geles con proteínas (Ausubel y col., 1983).	Azul Commassie R250, metanol 25 %, ácido acético 10 %
Tampón A para purificación de la enzima.	Tampón fosfato potásico 12mM pH. 7, β-mercaptoetanol 10mM.
Tampón de elución para purificación de la enzima.	Tampón fosfato potásico 60mM pH. 7, β-mercaptoetanol 10mM.
Solución de transferencia de proteínas.	Tris 0.025 M, glicina 0.15 M, metanol 20 %, pH 8.1-8.4.
Solución de lavado para filtros con proteínas (Ausubel y col., 1983).	PBS 1x ó TBS 1x, Tween 20 0.1% (v/v).
Solución de bloqueo de proteínas.	BSA 0.1 % (p/v), leche desnatada 5 % (p/v), Tween 20 0.1 % (p/v) en PBS 1x ó TBS 1x.
Fijador de parásitos para inmunocitoquímica.	Glutaraldehído tipo I 0.4 %, Formaldehído 4 %, Sacarosa 3,5%, ácido pícrico 0,5% en tampón Cacodilato 0.1 M, pH 7.4
Tampón de bloqueo para inmunofluorescencia	PBS 1x pH 8.0, BSA 1.5 %
Tampón C para permeabilización con digitonina.	Sacarosa 0,25 M, Hepes 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 20 mM, EGTA 2 mM.

B.I.4. MATERIAL PARA BIOLOGÍA MOLECULAR

B.I.4.1. Vectores

pBK-CMV (Stratagene). Fagémido de 4518 pb que se utilizó para clonar el gen *LmFPPS* de *L. major*. Los plásmidos se originaron tras la excisión del fago λ -ZAP Express™, donde fue construida la genoteca de expresión, con ayuda del fago helper pExAssist™. Los plásmidos resultantes se denominaron FPPS-1 y FPPS-2.

pET-11c (Novagen). Vector de expresión de 5675 pb en el que se clonó el gen *LmFPPS*, permitiendo la sobreexpresión en *E. coli* de la proteína LmFPPS .

pX63NEO (LeBowitz y col., 1991). Vector de 6061 pb, utilizado para la expresión homóloga del gen *LmSMT* en *L. major* 252.

pGEM-T (Promega). Vector de 3003 pb, que proviene de la digestión del vector pGEM®-5Zf(+) con la endonucleasa de restricción *EcoRV* y posterior adición de residuos de desoxitimidina (T) a los extremos 3' en el sitio de inserción. Se utiliza como vector de amplificación para clonar fragmentos de DNA obtenidos por PCR.

B.I.4.2. Oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos utilizados han sido sintetizados en los Servicios Técnicos del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra".

En la Tabla B.II se señala el nombre de cada oligonucleótido y su secuencia en orientación 5'→3'.

Tabla B.II

Nombre	Secuencia (5' → 3')
LmFPPS-1	CGCCGCGGT/CCAGCCC/GTGCTGG
LmFPPS-2	ATA/GTCG/CGTA/GCC(A/G/C)AC/TCTTA/GCC
T7	AATACGACTCACTATAG
SP6	ATTTAGGTGACACTATA
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG
T7 para pBK-CMV	GTAATACGACTCACTATAGGGC
LmFPPS-4	CTCATTCTGCTGGCCTGG
LmFPPS-5	CCAGGCCAGCAGAATGAG
LmFPPS-6	CGACGTGACGTCGTACAG
LmFPPS-7	GCCCGCTTCGAGGAGTACGAG
LmFPPS-8	ACCCCTCCCCTGCAAAA
LmFPPS-9	ATGATGGACACTACGTGCCTC
LmFPPS-10	CGCCTGCGGACATGTAGA
LmFPPS-11	GTGGGCGTGTGGGCATGGGTG
LmFPPS-12	CGAAGGCGGCATTCTGCGCCT
LmFPPS-13	CTCGGGCGGGGTGAAGCAGTC
LmFPPS-14	GGGAATTCATATGGCGCACATGGAA
LmFPPS-15	CGCGGATCCTTACTTTTGGCGCTT
LmFPPS-16	GGTCGCGTCTCTCTGCCT
LmFPPS-17	CACGCTAGCCGCGAAGGC
LmFPPS-18	CTTTCGGTCCACTTTCGC
LmFPPS-19	GTGTCTGTCTTCGTGTGT
T7 terminator	GCTAGTTATTGCTCAGC
LmFPPS-20	GCGGATCCATGGCGCACATGGAA
LmFPPS-21	GAAGATCTTACTTTTGGCGCTT

B.I.4.3. Reactivos

Schleicher & Schuell: Filtros de nylon (Nytran[®] N) y filtros de nitrocelulosa (Protran BA 85).

Bio-Rad: Agarosa de bajo punto de fusión para hacer bloques de DNA de *Leishmania*.

Amersham.: Desoxicitidín 5'-trifosfato[α -³²P] (3000 Ci/mmol) para marcar fragmentos de DNA.

Pharmacia: Sephadex[®] G-50, para purificar sondas de DNA radiactivas.

Promega (Biological Research Products): Vector pGEM-T[®], para clonar fragmentos de PCR. Para aislar DNA plasmídico se empleó Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System. Para purificar DNA sintetizado mediante PCR se utilizó Wizard[®] DNA Clean-Up System. A partir del fago ϕ X174 y del fago λ se obtuvieron los marcadores de DNA de alto y bajo peso molecular, respectivamente.

Gibco BRL (Life Technologies): Concert[™] High Purity Plasmid Maxiprep System para aislar DNA plasmídico.

Roche Molecular Biochemicals: Endonucleasas de restricción, polimerasa Klenow, T4 DNA ligasa, fosfatasa alcalina, Taq DNA polimerasa, *Random Primed DNA Labeling Kit* para marcaje radiactivo de DNA, desoxirribonucleótidos.

Sigma (Molecular Biology Reagents): DNAsa, RNAsa, proteinasa K, DNA de esperma de arenque y seroalbúmina (BSA).

Kodak: Películas para autorradiografías.

Novagen: El sistema de clonaje y expresión pET®.

B.I.5. MATERIAL PARA EL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

B.I.5.1. Para la caracterización de la proteína recombinante.

Amersham Pharmacia Biotech: Columna de exclusión molecular Superdex™ -200 HR 10/30.

Bio-Rad: *Bio-Rad Protein Assay*, para medir concentración de proteínas. Marcadores de proteínas de bajo peso molecular para SDS-PAGE, solución para secar geles 1x, láminas de celofán para secar geles *Cellophane Membrane Backing*®. Acrilamida, bis-acrilamida, N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) y persulfato amónico.

Life Sciences: Filtros de 0.22 µm Acrodisc®.

Whatman: Filtros de microfibra de vidrio GF/C de 24 mm.

B.I.5.2. Para medidas de actividad enzimática

Perkin Elmer: [4-¹⁴C] IPP.

Sarstedt: Viales de 13 ml.

National Diagnostics: Hidrofluor.

Merck: 1-butanol, etanol absoluto.

Sigma (Molecular Biology Reagents): tampón fosfato potásico, MgCl₂, isopentenil pirofosfato, geranil pirofosfato, NaCl.

B.I.6. MATERIAL PARA EL ANÁLISIS INMUNOLÓGICO

Sigma (Molecular Biology Reagents): Rojo-Ponceau-S, adyuvante completo e incompleto de Freund. Anticuerpos Anti-IgG de conejo conjugados con partículas de oro de 10 nm, anticuerpos Anti-IgG de conejo conjugados con FITC.

Millipore: Membranas de transferencia Immobilon™ -P.

Amersham: Reactivos ECL™ de detección para *Western blot*.

Promega: Anticuerpo Anti-IgG de conejo conjugados con peroxidasa.

Vector laboratories: Vectashield con DAPI.

Menzel-Glaser: Portaobjetos.

Marienfeld: Cubreobjetos circulares.

Merck: p-formaldehído.

Molecular Probes: MitoTracker® Red CMXRos

B.I.7. INSTRUMENTACIÓN

B.I.7.1. Para cultivos celulares

Coulter: Contador de células *Coulter Z-1*.

Equipments Scientifiques et Industriels. S.A. Flufrance: Cabinas estériles de flujo laminar vertical *Supcris Model A*.

Telstar S.A.: Cabinas estériles de flujo laminar vertical *AV-10 Cytair 125*.

Leitz (Labovert) y Olympus CK2: Microscopios de objetivo invertido.

Memmert: Incubador *Edelstahl RostFrei*.

New Brunswick Scientific Co. Inc. y Gallenkamp: Incubadores con agitación orbital para cultivo de bacterias *Controlled Enviroment Incubator Shaker*, y agitador orbital *Gyrotory® Shaker-Model G2*.

Revcon: Incubador con agitación orbital para cultivo de parásitos.

Sarstedt: Viales de congelación de 2 ml.

B.I.7.2. Para electroforesis y transferencia de DNA y proteínas

Bio-Rad: Cubeta de electroforesis *DNA Sub-Cell®*, fuentes de alimentación *Model 3000 Xi Computer Controlled Electrophoresis Power Supply* y *Power-Pac 300*. Cubeta de transferencia semiseca *Trans-blot® SD semi-dry transfer cell*.

LKB-Bromma: Sistema de electroforesis CHEF con controlador de pulsos (*2015-Pulsaphor Plus Control Unit*) y sistema de refrigeración (*2219 Multitemp II Thermostatic Circulator*).

Sigma: Minicubeta para electroforesis horizontal convencional, sistema de electroforesis vertical *Mini-PROTEAN II electrophoresis cell*, fuentes de alimentación de 250, 500 y 4000 V: PS250-2, PS500-2 y PS4000-2.

B.I.7.3. Centrífugas

Beckman: Centrífugas refrigeradas J2-MC, rotores JA-14 y JA-20, ultracentrífuga L8-70M, centrífugas de mesa GPR, microfuga E™ de mesa, microcentrífuga 11. Rotor para ultracentrífuga 70Ti.

Ettich: Microcentrífugas de mesa EBA 12 y EBA 21.

Kubota: Centrífuga de mesa KS-8000.

Sorvall: Centrífugas refrigeradas RC5C, rotores ss-34, GSA, HB-4 y JS13.

B.I.7.4. Para electroporación

BTX: sistema de electroporación ECM 600 y cubetas *Disposable Cuvette P/N 620, 2 mm gap*.

B.I.7.5. Otros

Afora S.A.: Baños termostatzados con y sin agitación *Unitronic 320 OR*.

Agfa: Revelador automático modelo *Curix 60*.

Applied Biosystems: Secuenciador (ABI) 373 *Stretch*, con estación de trabajo robotizada *Beckman Biomek 2000* y ciclador térmico *Perkin Elmer Geneamp PCR System 9600*.

Eppendorf: Micropipetas de 10, 20, 200 y 1000.

FOTODYNE y UVP: Transiluminadores de luz UV, modelos 6-3200 y TM-36 respectivamente.

GELPRINTER: Cámara fotográfica impresora modelo *00-GELPRINT*.

Hewlett Packard: Espectrofotómetro de diodos 8452A en interfase con un ordenador *Pentium 166 MMX*. Espectrofotómetro 8453 en interfase con un ordenador *Compaq PC Model Deskpro 2000*.

Hoeffler: Aparato de filtración *Ten-place Filter Manifold*, FH224V y FH225V.

LKB-Wallac: Contador de centelleo 1209 *Rackbeta Liquid Scintillation Counter*.

P. Selecta: Baños termostatzados con y sin agitación, *Precistern*.

Savant: Secador de geles *Slab Gel Dryer SGD 4050*, evaporador AS160 *Automatic Speed Vac*®.

Sonics and Materials Inc: Sonicador *Vibra Cell*.

Stratagene: *Robocycler 40* (termociclador para PCR).

Zeiss: Microscopio electrónico de transmisión *Zeiss 902*.

Pharmacia LKB: *ÅKTA Purifier*, para purificación de proteínas.

Arcus 1200 AGFA: Escaner.

B.I.8. SOFTWARE

Los ordenadores utilizados para la elaboración y análisis de los resultados incluyen *PC Pentium III, PC MMX, PC Pentium II, Macintosh LC475, Macintosh Performa 630, Power Macintosh G3, Macintosh IMAC G3*.

➤ **Programas informáticos utilizados:**

- *Windows NT, 95 y 98, Microsoft.*
- *Paquete Microsoft Office 2000 (Microsoft Word, Microsoft Excel y Microsoft Power Point).*
- *Adobe Photoshop™ versión 5.5*
- *Agfa Foto Look versión 3.5*
- *DNA Strider® versión 1.1 Service de Biochimie-Departament de Biologie. Inst. de Recherche Fondamentale. Commissariat s l'Energie Atomique. France.*
- *Gene Construction Kit® versión 1.03.1 (1990) B. Gross, A. Pytte y P. Rice. Textco, Inc.*
- *Isis Draw® version 2.3 MDL Information System, Inc.*
- *1-D Manager versión 1.3, Tecnología para Diagnóstico e Investigación S.A.*
- *HP 89542A UV-Visible General Scanning Software.*
- *HP 89542A UV-Visible General Kinetic Software.*
- *Paquete "GCG Sequence analysis software", Genetics Computer Group.*
- *INSTANT IMAGER electronic autoradiographic, Packard*
- *Netscape Navigator™*

➤ **Bases de datos consultadas:**

- **BLOCKS:** diccionario de patrones. Acepta secuencias de proteínas o de DNA en formato *FASTA, GenProt, GenBank, EMBL, Swiss-Prot, GCG* o *PIR*. (Fred Hutchinson, *Cancer Research Center*. Iowa).
- **EMBL:** Secuencias de DNA y RNA (EMBL, Heidelberg, Alemania).
- **GenBank:** Secuencias de DNA y RNA (*Laboratory Los Alamos, NM*).
- **PIR:** Secuencias de proteínas (*National Biomedical Research Foundation, Washington, DC*).
- **Paquete de programas GCG (Universidad de Wisconsin):** Se utilizó para la búsqueda de secuencias, análisis de similitud entre ellas y alineamientos.
- **SWISS-PROT:** Secuencias de proteínas (Universidad de Ginebra, Suiza).
- **NCBI:** Utilizada para realizar búsquedas de secuencias de DNA, proteínas y bibliográficas.

B.II. MÉTODOS

B.II.1. CULTIVO Y MANIPULACIÓN DE CÉLULAS

B.II.1.1. Parásitos

B.II.1.1.1. Cultivo de *Leishmania*

Las formas promastigotes de *Leishmania* fueron cultivadas *in vitro* a 28°C y agitación en medio 199 suplementado con un 10% (v/v) de SBF inactivado. Para mantener los parásitos en cultivo, cuando alcanzaron la fase logarítmica tardía de la curva de crecimiento, se procedió a la resiembra de 4×10^6 células/ml en 5 ml de cultivo fresco. Se utilizaron botellas estériles de 25 cm³ para el cultivo celular.

B.II.1.1.2. Criopreservación y descongelación de *Leishmania*

Las células fueron conservadas a -80°C y en nitrógeno líquido en alícuotas de 1 ml de cultivo con un 10% (v/v) de glicerol. Se utilizaron viales de congelación de 2 ml de *Sarstedt*. La congelación se realizó cuando el cultivo estaba en fase logarítmica de la curva de crecimiento ($10\text{-}20 \times 10^6$ células/ml).

Para recuperar los parásitos, las alícuotas se descongelaron a 37°C y centrifugaron a 2500 x g durante 10 min con el objetivo de retirar el glicerol. Finalmente, las células se resuspendieron en 2-5 ml de medio de cultivo.

B.II.1.1.3. Determinación de la Dosis Inhibitoria 50 de crecimiento (IC50)

La IC50 se define como la concentración de fármaco que reduce el número de células en un 50% cuando el cultivo en ausencia de fármaco alcanza la fase logarítmica tardía de crecimiento (Ellenberger y col., 1989).

Se calculó la IC50 de *L. major* 252 y de los promastigotes transfectados en presencia de Risedronato. Se partió de preinóculos de 0.5 millones de células/ml que fueron cultivados en tubos estériles de poliestireno con 3 ml de cultivo en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de fármaco. El recuento de parásitos se realizó cada 24 h en un contador de células *Coulter*® Z1 hasta que los cultivos alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento.

La IC50 se calculó a partir de los datos que derivan de la curva de crecimiento de cada uno de los cultivos en el tiempo. Seguidamente, se determinó el porcentaje de crecimiento de cada cultivo, considerando el 100% de crecimiento al número de células/ml del cultivo en ausencia de fármaco en fase logarítmica tardía. Se realizó un ajuste logarítmico del porcentaje de crecimiento frente a la concentración de fármaco y mediante interpolación se obtuvo el valor de IC50.

B.II.1.1.4. Cultivo de *Leishmania* para estudios de regulación de la FPPS.

Para analizar la modulación de la enzima por Risedronato se prepararon cultivos de *L. major* 252 a una concentración inicial de 0.5 millones de parásitos/ml en medio M199 suplementado con 10 % (v/v) de SBF, a los que se añadió 10 y 50 μM de risedronato, y se incubaron a 28°C y 60 rpm durante 48 horas hasta alcanzar la fase estacionaria.. Transcurrido ese tiempo se recogieron muestras que fueron centrifugadas, lavadas con PBS y sonicadas. Los cultivos se mantuvieron durante dos semanas en presencia de fármaco, y se recogieron de nuevo para analizar la expresión de la proteína FPPS mediante *Western blot*.

Posteriormente, se incuban parásitos de igual forma pero en presencia de 50, 100 y 150 μM de risedronato. En este caso, partimos de 2 millones de parásitos/ml y se recogieron muestras en la fase logarítmica así como en la fase estacionaria para analizar si había diferencias entre ambos estadíos.

B.II.1.1.5. Transfección estable por electroporación

La transfección es una técnica que consiste en la introducción de material genético extraño en células eucariotas. El proceso se llevó a cabo en células de *L. major* 252 mediante electroporación (Kapler y col., 1990).

Se procedió a la transfección de formas promastigotes de *L. major* 252 CC-1 clon P2 según el protocolo de Kapler y col. (1990). Cuando las células se encontraban en fase logarítmica tardía de crecimiento fueron recogidas, lavadas dos veces con tampón HBS esterilizado por filtración (Tabla B.I) y resuspendidas en la misma solución hasta una concentración de 10^8 células/ml. Hasta el momento de la transfección, las células se mantuvieron en hielo en alícuotas de 400 μl . El DNA plasmídico se aisló mediante con el kit Concert™ High Purity Plasmid Maxiprep System (Life Technologies), se precipitó con etanol y finalmente se resuspendió en TE (tabla B.I) a una concentración de 1 mg/ml. Posteriormente, cada alícuota de células se mezcló con 80 μg de plásmido y se transfirió a una cubeta de electroporación *BTX*, dejándolas durante 10 min en hielo. Las condiciones de electroporación en el sistema *ECM 600*® *BTX* fueron: 1300 μF , 13 Ω , 450 V (2.25 Kvol/cm). Inmediatamente después del pulso, las células fueron transferidas a 10 ml de medio con biopterina y sin antibiótico y se incubaron durante 24 h a 28 °C.

B.II.1.1.6. Obtención de clones

Para la obtención de clones se procedió a la siembra de las células transfectadas en medio completo semisólido (Iovannisci y col., 1983). Para la

elaboración de las placas, se utilizó medio de cultivo completo concentrado (2x) que se mantuvo a 55°C para mezclarlo con un volumen igual de agar al 2% estéril y a temperatura de sobrefusión (\approx 50°C). A cada placa Petri de 100 mm se añadieron 25 ml de la mezcla junto con la cantidad de fármaco selectivo adecuada, dejándose solidificar a temperatura ambiente durante toda la noche. Al día siguiente, el medio semisólido se equilibró a pH fisiológico durante 2 h en una estufa al 5% de CO₂ y a 37°C. Sobre las placas se vertieron los parásitos transfectados que previamente habían sido centrifugados y resuspendidos en 100-200 μ l de medio de cultivo. Con la ayuda de una varilla de vidrio estéril, se procedió a la extensión de las células sobre el medio. La incubación se desarrolló en ambiente húmedo a 28°C tras cerrar las placas con parafilm y colocarlas boca abajo. Transcurridas 1-2 semanas desde el inicio de la incubación, se observaron grumos de crecimiento celular. Los clones fueron aislados con puntas estériles y transferidos a 1 ml de medio de cultivo líquido con la cantidad de fármaco adecuada. La selección de los clones se realizó a una concentración de G-418 de 16 μ g/ml.

Posteriormente, se incrementó la dosis de fármaco con el fin de aumentar los niveles de expresión del gen transfectado.

B.II.1.1.7. Obtención de extractos totales de parásitos

En general, las células son recogidas en fase logarítmica de la curva de crecimiento (15-20x 10⁶ células/ml), aunque puede variar de acuerdo con el experimento realizado. Una vez determinada la concentración a la que se encuentra el cultivo, los parásitos se centrifugan a 2500 rpm durante 15 min a 4 °C, se lavan con PBS (Tabla B.I) dos veces y se almacenan congelados a -80°C. A continuación, las células son resuspendidas en tampón PBS con inhibidores de proteasas (Tabla B.I) y sonicadas en frío ocho veces a intervalos de 30 s y con ciclos del 50%. La concentración de proteínas del extracto se determina mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) para su posterior análisis.

B.II.1.2. Bacterias

B.II.1.2.1. Cultivo de *E. coli*

Para asegurar la existencia de una población homogénea, los cultivos líquidos de *E. coli* proceden de una colonia aislada en medio de cultivo sólido. El cultivo líquido de *E. coli* se incubó a 37°C con agitación. Las bacterias también crecieron en medio

sólido de LB al 1,5% de agar. Además, el medio se suplementó con el antibiótico adecuado según la resistencia que confiera el plásmido que transporta la bacteria.

B.II.1.2.2. Conservación

Las células fueron conservadas a -80°C en alícuotas de 1ml cuando se encontraban en fase estacionaria de crecimiento en medio suplementado con un 15% de glicerol.

B.II.2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

B.II.2.1. Preparación de células competentes

B.II.2.1.1. Método del CaCl_2

Con este método se obtienen células competentes que pueden ser transformadas mediante choque térmico. El CaCl_2 tiene la capacidad de hacer permeables las paredes celulares, de tal manera que el DNA presente en el medio extracelular tiene capacidad para atravesarlas con facilidad. Cuando las células de *E. coli* se encontraban en fase exponencial de la curva de crecimiento ($\text{DO}_{590} = 0.375-0.4$) se trataron sucesivamente con MgCl_2 (0.1 M) y CaCl_2 (0.1 M) y se conservaron a -80°C con un 15% de glicerol (Hanahan, 1983). La eficiencia de transformación fue de 1×10^6 células/ μg de DNA plasmídico.

B.II.2.1.2. Células electrocompetentes

Se siguió el protocolo de Sherman (comunicación personal, 1992). Las células fueron crecidas hasta alcanzar la fase exponencial de la curva de crecimiento ($\text{DO}_{590} = 0.5-1$), momento en el que fueron recogidas y lavadas tres veces con 0.5 volúmenes de agua bidestilada estéril a 4°C , y posteriormente centrifugadas a $4000 \times g$ durante 15 min a 4°C . A continuación, las células fueron lavadas una vez más con 0.02 volúmenes de agua y resuspendidas en 0.002-0.003 volúmenes de glicerol al 10%. La eficiencia de transformación fue de $1 \times 10^8 - 1 \times 10^9$ células/ μg de DNA plasmídico.

B.II.2.2. Transformación de células competentes

B.II.2.2.1. Método del choque térmico

Este método (Hanahan, 1983) se ha empleado para transformar *E. coli* con plásmidos que presentan un origen de replicación y un marcador de resistencia a antibiótico. Una alícuota de 100 μ l de células tratadas con CaCl_2 se mezcló con 10-100 ng de plásmido y se mantuvo en hielo durante 30 min. Seguidamente las células se sometieron a choque térmico durante 45 s a 42°C y posterior incubación en hielo durante 2 min. Tras la transformación, las células se recuperaron a 37°C en 0.9 ml de medio líquido LB sin antibiótico durante 1 h y agitación. Finalmente, las células fueron sembradas en medio semisólido con el antibiótico adecuado.

B.II.2.2.2. Electroporación

Una alícuota de 40 μ l de células electrocompetentes se mezcló con 1 μ l de DNA plasmídico (1 ng/ μ l) y transfirió a una cubeta de electroporación que previamente se encontraba en hielo. Las bacterias fueron transformadas bajo las condiciones de pulso eléctrico descritas por Sherman en 1992 (comunicación personal): 2.45 kV; 129 Ω ; 12.25 kV/cm, con una longitud de pulso de 5-6 ms. Rápidamente, las células fueron recuperadas en 960 μ l de medio líquido LB sin antibiótico durante 1h a 37°C y agitación. Una alícuota de 100 μ l de las células transformadas fue sembrada en medio de cultivo semisólido con antibiótico.

B.II.2.3. Screening de una genoteca de cDNA de *L. major*

Para llevar a cabo el experimento se utilizó una genoteca de cDNA de *L. major* construida por Camacho y col. (1997) en el fago ZAP Express™, con un título de 2×10^9 ufp/ml. Las bacterias XL1B-MRF' fueron cultivadas en medio semisólido LB con tetraciclina (12.5 μ g/ml) a 37°C durante una noche. Una colonia aislada fue inoculada en 50 ml de LB suplementado con tetraciclina (12.5 μ g/ml), maltosa al 0.2 % y MgSO_4 10 mM e incubada a 37°C y agitación hasta alcanzar una DO_{600} igual a 1. A continuación, las células fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 10 min y resuspendidas en MgSO_4 10 mM hasta una DO_{600} de 0.5. Se prepararon cuatro muestras iguales, conteniendo cada una 300 μ l de células y 2,5 μ l de fago (1×10^7 ufp/ml). La infección de las bacterias transcurrió durante 15 min a temperatura ambiente. A continuación se mezcló cada muestra con 10 ml de medio NZ (*top agar*) a 48°C, se vertió sobre una placa de Petri con medio de cultivo semisólido LB (*bottom agar*) y se mezcló longitudinalmente. Una vez solidificado el *top agar* a temperatura ambiente, las placas fueron incubadas durante una noche a 37°C.

Las placas de lisis fueron transferidas a filtros de nitrocelulosa durante 1 min y por duplicado. Las membranas se trataron con solución desnaturalizante durante 5 min, solución neutralizante 5 min y SSC 20x durante 15 min (Tabla B.I).

Posteriormente se hibridaron con una sonda de DNA marcada con [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP, correspondiente a un fragmento del gen *LmFPPS* de 483 pb, amplificado mediante PCR a partir de DNA genómico de *L. major* con los oligonucleótidos LmFPPS-1 y LmFPPS-2 (Tabla B.II). Estos oligonucleótidos se diseñaron a partir de zonas conservadas de un alineamiento entre FPPSs de diferentes organismos.

Las placas de lisis positivas fueron identificadas con la ayuda de autorradiografías, aisladas de la placa de cultivo, eluidas en tampón SM (500 μl) (Tabla B.II) con cloroformo (20 μl) y conservadas a 4°C. Con el fin de obtener cada fago positivo totalmente aislado, se realizaron un segundo y un tercer *screening*, utilizando en cada caso diferentes diluciones de los fagos aislados en el *screening* anterior.

B.II.2.3.1. Excisión *in vivo* del fagémido pBK-CMV

Para excindir los fagémidos, en primer lugar se prepararon cultivos de células XL1B-MRF' y XLOLR en LB con tetraciclina (12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se incubaron en agitación a 30°C durante una noche. A la mañana siguiente se realizaron sendas diluciones 1:100 de los cultivos, en un volumen final de 50 ml de LB, y se incubaron a 37°C y agitación. Las bacterias XL1B-MRF' se recogieron cuando la DO_{600} estaba entre 0.2 y 0.5, se centrifugaron a 1000 x g durante 10 min, y se resuspendieron en MgSO_4 10 mM hasta una DO_{600} de 1 (8×10^8 células/ml). A continuación se mezclaron 10^6 células con 10^5 ufp del fago aislado y con 10^8 ufp del fago *helper* pExAssist™. La mezcla se incubó a 37°C y transcurridos 15 min se añadieron 3 ml de medio LB y se incubó de nuevo a 37°C y agitación durante 14 h. A continuación se calentó 15 min a 70°C y se centrifugó a 4000 x g 15 min. El sobrenadante obtenido contenía el fagémido pBK-CMV excindido, y se conservó a 4°C. Diferentes diluciones del fagémido se mezclaron con bacterias XLOLR crecidas hasta DO_{600} de 1; la mezcla se incubó a 37°C durante 15 min, se añadieron 300 μl de LB y se incubó de nuevo 45 min a 37°C. Por último, se plaquearon 200 μl en placas de LB con kanamicina (50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) que fueron incubadas a 37°C durante una noche. Los fagémidos excindidos y aislados se conservaron a -80°C.

B.II.2.4. Extracción de DNA

B.II.2.4.1. Extracción de DNA genómico de *Leishmania*

Se siguió el método descrito por Coderre y col. (1983), utilizando cultivos de 10 a 50 ml de parásitos en fase estacionaria de la curva de crecimiento ($20\text{-}30 \times 10^6$ células/ml). Las células fueron centrifugadas a 2500 x g durante 10 min a 4°C,

lavadas dos veces con PBS y lisadas con una solución de Tris-HCl 0.2 M (pH 8), EDTA 0.1 M, SDS 0.5 % y 100 µg/ml de proteinasa K durante 4 h a 37°C o toda la noche a temperatura ambiente. Tras una extracción fenólica, la fase acuosa fue tratada con RNAsa A y después de una segunda extracción fenólica, el DNA fue precipitado con etanol y resuspendido en agua bidestilada estéril.

B.II.2.4.2. Extracción de DNA plasmídico de *E. coli*

Para el aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala se ha seguido el protocolo de aislamiento del *kit Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System*. (Promega).

Para el aislamiento de DNA plasmídico a gran escala se utilizó el método descrito en *Current protocols in Molecular Biology* (Ausubel y col., 1987-1994), y el *kit Concert™ High Purity Plasmid Maxiprep System* (Gibco BRL).

B.II.2.5. Extracción de RNA poliadenilado

El RNA poliadenilado fue aislado de 1×10^7 células de *Leishmania*, que fueron centrifugadas a 2500 x g durante 10 min a 4°C y lavadas dos veces con PBS. Se siguió el protocolo del *QuickPrep Micro mRNA Purification Kit* de *Pharmacia*, que utiliza columnas de Oligo(dT)-celulosa.

Debido a que el RNA es degradado con facilidad por ribonucleasas contaminantes, es importante preparar tanto las soluciones requeridas para la extracción como todo el material: eppendorf, puntas, gradillas, etc. con dietilpirocarbonato (DEPC), que es un inhibidor de RNAsas. Para ello se preparó una solución de DEPC al 0.1% (v/v) en la que se mantuvo en agitación durante una noche todo el material. A continuación, tanto las soluciones empleadas como el material fueron autoclavados. Hay que tener en cuenta que el DEPC no es efectivo en presencia de Tris.

B.II.2.6. Análisis del DNA aislado

B.II.2.6.1. Digestión de DNA con endonucleasas de restricción

La reacción de digestión se desarrolló en un volumen de 20 µl. El tampón utilizado se elige en función de la actividad de cada endonucleasa en presencia del

mismo, intentando elegir el más favorable para ambas enzimas (la actividad viene indicada por la casa comercial). Después de incubar dos horas a 37°C, la reacción fue interrumpida con 6 µl de tampón de carga 6x (Tabla B.I).

B.II.2.6.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Este método descrito por Arnheim y col. (1992), permite obtener grandes cantidades de DNA específico a partir de una muestra de DNA complejo.

La reacción de síntesis se realizó en un volumen final de 50 µl, con una cantidad de DNA molde variable: si se trataba de DNA plasmídico se utilizó 0.1 µg, mientras que si era DNA genómico total se utilizó 0.1-0.5 µg, 50 pmol de oligonucleótido 5´ y 50 pmol de oligonucleótido 3´, 50 µM de cada uno de los dNTPs, tampón Taq polimerasa 1x y 2.5 U de Taq polimerasa.

En general, las condiciones de PCR fueron: un ciclo de desnaturalización a 95°C durante 10 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1min, acoplamiento a 58°C durante 1min y extensión a 72°C durante 1 min. Finalmente, la reacción concluyó con un ciclo de extensión a 72°C durante 10 min. Para optimizar la amplificación, las condiciones se modificaron teniendo en cuenta las temperaturas de fusión de los oligonucleótidos. El producto de cada PCR fue analizado mediante electroforesis en un gel de agarosa y si el DNA amplificado era el adecuado, la mezcla de reacción se purificó con el kit *Wizard® DNA Clean-Up System* de Promega.

B.II.2.6.3. Reacción de ligación de DNA

La reacción de ligación de fragmentos de DNA a vectores plasmídicos es llevada a cabo por la T4 DNA ligasa (Gibco BRL), la cual procede del bacteriófago T4. Cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 5´-fosfato y 3´-hidroxilo de DNA de doble cadena, pudiendo ser extremos cohesivos o romos. La reacción de ligación fue optimizada para cada construcción; en las ligaciones realizadas con pGEM-T® y con pET-11c se utilizó una relación molar 1:1 (DNA:vector), mientras que para el vector pX63NEO se utilizó una mayor cantidad de inserto respecto a la de vector. Con los vectores pX63NEO y pET-11c, el volumen final fue de 20 y 10 µl respectivamente y las reacciones se desarrollaron a 16°C durante una noche. El volumen de reacción de ligación con pGEM-T® fue de 10 µl y transcurrió a temperatura ambiente durante una hora, o bien toda la noche a 4°C. En todos los casos se utilizó el tampón T4 DNA ligasa suministrado por la casa comercial y 3 U de enzima.

La enzima fue inactivada a 65°C durante 10 min y la mezcla de ligación se utilizó para transformar *E. coli* competentes. Los transformantes positivos fueron seleccionados mediante aislamiento y análisis de restricción del plásmido de

resistencia, así como transfiriendo las colonias de células transformadas a filtros de nitrocelulosa (Hanahan y col., 1980; Hanahan y col., 1983) y posterior hibridación del filtro con sondas específicas.

B.II.2.6.4. Tratamiento del DNA con fosfatasa alcalina

En una reacción de ligación en la que se utiliza un vector digerido con una sola enzima de restricción, cabe la posibilidad de que el vector vuelva a religar sus extremos. Para evitar falsos positivos, una vez digerido el vector es tratado con la fosfatasa alcalina, la cual hidroliza los grupos fosfato en posición 5' del DNA. Se empleó fosfatasa alcalina bovina (Roche) bajo las condiciones indicadas por la casa comercial.

B.II.2.7. Secuenciación de DNA

El DNA fue secuenciado en los Servicios Técnicos del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra". El procedimiento empleado se basó en la técnica descrita por Sanger y col. (1977) en la cual la cadena de DNA es sintetizada por la acción de una polimerasa que utiliza DNA de hebra simple como molde.

En cada reacción de secuenciación se emplearon de 300 a 500 ng de DNA puro y de 1.6 a 3.2 pmol de oligonucleótido en un volumen final de 6 μ l. La polimerasa utilizada fue AmpliTaq® FS y los terminadores marcados con fluorescencia de ABIPRISM™ *Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* de Perkin Elmer.

B.II.2.8. Marcaje radiactivo de DNA. Síntesis de una sonda radiactiva.

Para el marcaje de DNA se empleó el procedimiento de *random priming* (Feinberg y col., 1983). Consiste en utilizar un fragmento específico de DNA como molde para la síntesis de hebras complementarias por parte del fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa, en presencia de cebadores que hibridan al azar con el DNA molde y añadiendo a la mezcla de dNTPs el [α -³²P]dCTP.

En un volumen de 20 μ l se marcaron de 50 a 200 ng de DNA en presencia de 0.030 mM de cada desoxirribonucleósido trifosfato (excepto dCTP), 50 μ Ci de [α -³²P]dCTP y 2 U de polimerasa *Klenow*. Las reacciones transcurrieron durante 2 h a 37°C, y se detuvieron con EDTA 50 mM. El DNA marcado fue purificado mediante cromatografía en una columna de 1 ml de Sephadex G-50 (Sambrook y col., 1989). Finalmente, el DNA marcado fue eluido en 100 μ l de agua bidestilada estéril, utilizando 1 μ l para determinar el número de cuentas por minuto (cpm) en el contador de centelleo.

B.II.2.9. Electroforesis de DNA y RNA

B.II.2.9.1. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La electroforesis en geles de agarosa permite separar fragmentos de DNA en función de su peso molecular. Una vez ha sido desarrollada la electroforesis, el gel es teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/ml), el cual se intercala entre las hebras de DNA y permite observar las diferentes bandas a la luz ultravioleta.

Se emplearon geles de agarosa entre 0.8 y 1.2 % en tampón TAE 1x (Tabla B.I), desarrollando la electroforesis horizontal en el mismo tampón a un voltaje 50-100 V durante 1-4 h. Los marcadores de peso molecular fueron productos de la digestión de DNA de los fagos λ y ϕ 174 con *Hind*III y *Hae*III respectivamente.

➤ Recuperación de DNA de los geles de agarosa

Los fragmentos de DNA obtenidos mediante PCR o como producto de una digestión con enzimas de restricción fueron recuperados de geles de agarosa por filtración a través de lana de vidrio.

B.II.2.9.2. Electroforesis de DNA en campo pulsado (PFGE)

La técnica de electroforesis en campo pulsado (Schawrtz y col., 1984) permite separar fragmentos de DNA de hasta 2000 Kb mediante el cambio de forma periódica de la migración de las moléculas de DNA. Para ello se emplea una técnica llamada *Clamped Homogeneous Electric Field (CHEF) electrophoresis* (Chu y col., 1986) que utiliza un circuito de electrodos dispuestos de forma hexagonal que genera campos eléctricos homogéneos y producen patrones rectos de bandas.

Se utilizaron geles de agarosa al 1 % en tampón TBE 0.5 x. Las condiciones de pulsos utilizadas se seleccionaron de acuerdo al estudio. Para separar los cromosomas del parásito se generaron gradientes de pulsos de: 60 s norte-sur, 60 s este-oeste durante 2 h; 80 s norte-sur, 80 s este-oeste durante 8 h, 100 s norte-sur, 100 s este-oeste por 8 h, 110 s norte-sur, 110 s este-oeste por 4 h, 120 s norte-sur, 120 s este-oeste por 2 h a 160 v. Mientras que para separar el DNA extracromosómico del cromosómico se utilizaron las condiciones descritas por Olmo y col. (1995): 900 s norte-sur, 300 s este-oeste durante 11 h; 300 s norte-sur, 900 s este-oeste durante 11 h a 160 v.

Finalmente el DNA fue transferido a un filtro de *nylon* e hibridado con una sonda marcada radiactivamente.

➤ **Preparación de muestras para CHEF**

La obtención de cromosomas de *Leishmania* se realizó según el método descrito por Garvey y col. (1986) y consiste en la lisis suave de las células embebidas en bloques de agarosa. Se recogieron 80×10^6 células de *Leishmania* en fase exponencial **tardía** de crecimiento y se centrifugaron a $2000 \times g$ durante 15 min. Tras lavar dos veces con PBS, las células fueron resuspendidas en 0.3 ml de PBS y mezcladas con un volumen igual de agarosa fundida de bajo punto de fusión al 1.2 % en PBS. La mezcla fue distribuida en moldes y solidificada a 4°C durante 10 min. Los bloques fueron tratados con la solución de lisis (0.5 M EDTA pH 9, 1% N-lauril-sarcosina, 1mg/ml proteinasa K) durante 48 h a 50°C. Tras lavar dos veces con EDTA 0.2 M pH 8 durante 2 h a 50°C, los bloques se conservaron en la misma solución a 4°C.

B.II.2.9.3. Electroforesis de RNA en geles de agarosa

Se utilizaron geles desnaturalizantes de agarosa al 1% en tampón MOPS 1x (tabla B.I) y formaldehído (37%) 2 M. La electroforesis se desarrolló a 4°C durante 2 h y a 65 v. El RNA fue aislado utilizando el protocolo de Pharmacia para *QuickPrep Micro mRNA Purification Kit*. Cada muestra de RNA-poly A+, resuspendida en 7.5 μ l de agua bidestilada estéril tratada con DEPC, se mezcló con dos volúmenes de tampón de carga (tabla B.I), fue desnaturalizada a 100°C durante 10 min y puesta en hielo. Tras adicionarle 2 μ l de glicerol al 50% la muestra fue cargada en el gel. Se utilizaron marcadores de peso molecular de mRNA (Gibco BRL). El gel de agarosa fue expuesto a la luz ultravioleta para visualizar el RNA.

B.II.2.10. Transferencia de DNA y RNA a filtros de nylon o nitrocelulosa

B.II.2.10.1. Transferencia de DNA, Southern blot

Se siguió la técnica descrita por Southern (1974), basada en la transferencia de DNA desnaturalizado desde un gel de agarosa a una membrana de nylon (Nytran[®] N de Schleicher & Schuell). Posteriormente, el filtro fue incubado con una sonda radiactiva que hibridó con su cadena complementaria.

B.II.2.10.2. Transferencia de RNA, Northern blot

Este proceso no requiere el tratamiento previo del gel de agarosa ya que las muestras están desnaturalizadas. El procedimiento de transferencia es similar al indicado para transferir DNA.

B.II.2.11. Hibridación de DNA y RNA con sondas radiactivas

Los filtros de *nylon* o nitrocelulosa con DNA o RNA fueron hibridados con sondas marcadas radiactivamente tal y como se detalla en el apartado B.II.2.8. Las hibridaciones se realizaron a 42°C durante una noche, adicionando 1×10^6 cpm de DNA marcado por cada ml de solución de hibridación (Tabla B.I). Tras la incubación, los filtros fueron lavados dos veces durante 20 min con la solución de lavado (Tabla B.I) en condiciones suaves (42°C) o drásticas (65°C) según se requiriera. Los filtros se secaron a temperatura ambiente y se expusieron a películas de autorradiografía X-OMAT®AR (Kodak) junto con pantallas amplificadoras DuPont. A continuación se almacenaron a -80°C hasta ser reveladas.

B.II.2.12. Deshibridación de filtros de DNA y RNA**B.II.2.12.1. Deshibridación de filtros de DNA**

Los filtros de DNA marcados fueron deshibridados incubando primero con NaOH 0.1 M durante 30 min y después el mismo tiempo con la solución de deshibridación para DNA (Tabla B.I). Todo el tratamiento se realizó a 45°C.

B.II.2.12.2. Deshibridación de filtros de RNA

Los filtros de RNA marcados fueron deshibridados a 65°C durante 1-2 h de incubación con la solución de deshibridación para RNA (Tabla B.I).

B.II.3. TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE LA PROTEÍNA**B.II.3.1. Obtención de extractos de *E. coli* que sobreexpresan la LmFPPS****B.II.3.1.1. Inducción de la proteína recombinante LmFPPS con IPTG**

Las células *E. coli* BL21 (DE3) fueron transformadas con el plásmido de expresión pET11c-LmFPPS, cuyo producto de expresión (LmFPPS) está bajo el control del promotor *T7lac*. Una colonia de células transformadas fue cultivada en 10 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml) a 37°C y agitación hasta alcanzar una DO_{600} entre 0.6 y 1. A continuación se utilizó para inocular 40 ml de medio y fue incubado a 37°C durante una noche. A la mañana siguiente se inoculó 1 litro de medio con ampicilina con 40 ml de cultivo, se incubó a 37°C y agitación hasta alcanzar una DO_{600} de 0.6, momento en el que se adicionó 1 mM de IPTG. La incubación con el agente inductor se prolongó durante 4 h. Seguidamente, las células fueron centrifugadas a 7000 x g a 4°C durante 10 min y congeladas a -80°C.

B.II.3.1.2. Preparación de extractos solubles de bacterias

Las células *E. coli* BL21 (DE3) inducidas con IPTG durante 4 horas fueron resuspendidas en 25 ml de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.4, MgCl₂ 2 mM, β-mercaptoetanol 2mM, glicerol 5% (v/v) e inhibidores de proteasas y sonicadas en frío 3 veces durante 30 s con ciclos del 50 %. El homogenizado de bacterias se centrifugó a 12000 rpm durante 30 min a 4°C para separar el extracto soluble de los cuerpos de inclusión.

B.II.3.2. Purificación de la LmFPPS recombinante

B.II.3.2.1. Precipitación con (NH₄)₂SO₄

Una vez separados los 25 ml de extracto soluble de los cuerpos de inclusión, llevamos a cabo una precipitación salina con sulfato amónico como primer paso de la purificación enzimática. Para ello, añadimos 2.65 g de (NH₄)₂SO₄ (20% p/v), se agita durante 20 min a 4°C y se centrifuga a 12000rpm durante 20 min a 4°C. El precipitado se desechó y el sobrenadante se volvió a tratar con 2.71 g de (NH₄)₂SO₄ (40% p/v) de igual forma a la anterior. El pellet conseguido se resuspendió en 4 ml de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.4, MgCl₂ 2 mM, β-mercaptoetanol 2mM, glicerol 5% (v/v) e inhibidores de proteasas, analizándose el grado de purificación de la enzima LmFPPS mediante un gel de SDS-poliacrilamida, así como con una medida de actividad de la misma.

B.II.3.2.2. Cromatografía en columna de hidroxapatito.

El hidroxifosfato cálcico es conocido en su forma cristalina como hidroxapatito de calcio. En cuanto al mecanismo de adsorción de las proteínas al hidroxapatito cálcico, por una parte tenemos los grupos amino que establecen interacciones electrostáticas con los grupos fosfato, mientras que los grupos carboxilo se unen al calcio de la columna formando clusters.

Se utilizaron 0.05 g de resina por mg de proteína; el hidroxapatito fue resuspendido en tampón A y empaquetado en una columna de 1cm x 20 cm. A continuación, la columna se equilibró con tampón A durante 3 horas y a un flujo de 0.5 ml/min. La cromatografía se llevó a cabo a 4°C. La proteína obtenida tras la precipitación con sulfato amónico al 40% fue diluida a una concentración de 1mg/ml con tampón A y se aplicó a la columna al mismo flujo. Después, la columna se lavó con 100 ml de tampón A para asegurarnos de que la adherencia de la proteína a la columna había sido correcta. Finalmente, para eluir la proteína de la resina se aplicó un gradiente lineal de tampón fosfato potásico pH.7 (12-60 mM) sin variar el flujo. Se recogieron fracciones de 2ml, se determinó en qué fracciones había eluido la proteína así como la concentración de las mismas, se prepararon las correspondientes muestras para visualizar en un gel si correspondía a la banda esperada, se concentraron y, por último, se procedió a la medida de actividad.

B.II.3.3. Caracterización cinética de la proteína FPPS de *L. major***B.II.3.3.1. Determinación de la actividad FPPS**

Los ensayos de actividad FPPS se realizaron en un volumen final de 100 µl, que contenía 850 nmoles de tampón fosfato potásico pH.7, 85 nmoles de MgCl₂, 10 nmoles de genanil pirofosfato y 5 nmoles de una mezcla isotópica de isopentenil pirofosfato-¹⁴C con una actividad específica de 6.34 Ci/mol. La reacción enzimática se inició con la adición de 10 ng de proteína recombinante purificada, fue incubada durante 15 minutos a 30°C y finalizada con la adición de 1 ml de una solución de NaCl saturado. El farnesil pirofosfato formado se extrajo con 1 ml de 1-butanol. Después de una breve agitación con vortex y posterior centrifugación para separar ambas fases, 0.5 ml de fase orgánica se transfirieron a un vial de centelleo que contenía 10 ml de hidrofluor, y se midió la radiactividad de la muestra.

B.II.3.3.2. Efecto de la concentración de enzima sobre la actividad FPPS de la LmFPPS

Para establecer el rango de linealidad de la actividad FPPS con respecto a las concentraciones de sustrato utilizadas en el apartado anterior, se ensayó la reacción con 10, 20, 50, 100 y 200 ng de proteína recombinante purificada.

B.II.3.3.3. Determinación de la K_m y la V_{max} para diferentes sustratos

Los ensayos de determinación de K_m y V_{max} para los diferentes sustratos se realizaron a concentración de enzima constante, utilizando en todos los casos 10 ng de proteína recombinante purificada.

Para el sustrato isopentenil pirofosfato, se ensayaron concentraciones comprendidas entre 1 y 150 μM , manteniendo constante la concentración de geranil pirofosfato a 200 μM . Para el sustrato geranil pirofosfato, se ensayaron concentraciones comprendidas entre 2 y 200 μM , manteniendo constante la concentración de isopentenil pirofosfato a 200 μM .

B.II.3.3.4. Cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel.

Se utilizó una columna SuperdexTM-200 HR 10/30 acoplada a un dispositivo de cromatografía de alta resolución AKTA purifier de Pharmacia. La columna fue equilibrada a temperatura ambiente con 50 ml de tampón (KH_2PO_4 50mM, NaCl 150mM) a un flujo de 0.5 ml/min. Como patrones de peso molecular se inyectaron 100 μl de una solución, preparada en el mismo tampón, que contenía azul de dextrano (1mg/ml), ferritina (1 mg/ml), aldolasa (7mg/ml), ovoalbúmina (4 mg/ml) y ribonucleasa A (5 mg/ml). Finalmente se inyectaron 100 μl de la proteína purificada (2.5 mg/ml). Las soluciones fueron previamente filtradas con Ultrafree MC.

B.II.3.3.5. Estudios de inhibición *in vitro* de la LmFPPS.

Para realizar los ensayos de inhibición *in vitro* de la proteína LmFPPS, las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo como se describe en el apartado B.II.3.2.1., pero adicionando el compuesto inhibidor. Se ensayó un rango de concentraciones desde 0.1 μM hasta 100 μM . Cada compuesto se resuspendió en primer lugar en un

volumen mínimo de su correspondiente disolvente, y después se añadió a la reacción diluido en solución acuosa.

B.II.4. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

B.II.4.1. Obtención de anticuerpos policlonales frente a la FPPS de *L. major*

B.II.4.1.1. Purificación de la proteína recombinante LmFPPS

En primer lugar, se indujo la expresión de LmFPPS en el sistema *E. coli* BL21(DE3)-pET11c-LmFPPS, a 37°C y a una concentración final de agente inductor (IPTG) de 1 mM. La inducción se llevó a cabo durante 4 horas. El *pellet* bacteriano obtenido tras centrifugar, se resuspendió en tampón de sonicación (TrisHCl 50mM pH.7.5 , MgCl₂ 2mM, β-mercaptoetanol 2 mM, glicerol 5% (v/v)) con inhibidores de proteasas (0,02 mg/ml de leupeptina, 1 mM de benzamidina, 0,05 mg/ml de inhibidor de tripsina, 52 μM de PMSF, 0,05 mg/ml de aprotinina y 0,01 M de fenantrolina), se sonicó 3 veces durante 30 s con ciclos del 50 % y se centrifugo a 12000rpm durante 30 minutos. A continuación, se añade sulfato amónico saturado al 40% al sobrenadante, se agita durante 20 minutos a 4°C y se centrifuga a 12000 rpm durante 20 minutos. El pellet resultante se disuelve en 4 ml de tampón de sonicación y se diluye a 1 mg/ml con tampón de iniciación 12 mM de fosfato potásico pH.7 y 10 mM de β-mercaptoetanol. La solución proteica fue aplicada a una columna de hidroxapatito (Biorad) previamente equilibrado con tampón de iniciación y, a continuación, se establece un gradiente lineal de fosfato potásico pH.7 desde 12 mM a 60 mM. Las fracciones que contenían actividad enzimática fueron recogidas, concentradas y analizadas en geles de SDS-PAGE.

B.II.4.1.2. Inmunizaciones

Para la obtención de anticuerpos policlonales frente a la FPPS de *L. major* se utilizó un conejo de la cepa *New Zealand White*. Previamente a la primera inmunización se extrajeron 15 ml de sangre con el fin de obtener el suero preinmune que fue utilizado como control. El conejo fue inmunizado cuatro veces por vía subcutánea con la proteína recombinante purificada LmFPPS. En la primera inmunización se inyectó una emulsión de 0.4 mg de proteína en 0.5 ml de PBS mezclado con el mismo volumen de Adyuvante Completo de Freund. Con un intervalo de dos semanas se realizaron una segunda y tercera inmunización y transcurrido un mes la cuarta inmunización, inoculando en todos los casos una emulsión (v/v) de LmFPPS en PBS y Adyuvante Incompleto de Freund. Transcurrida una semana de

cada inmunización, se extrajeron 20 ml de sangre del conejo, se aisló el suero y se analizó mediante *Western blot*. Tras un mes en reposo, se inoculó la última dosis de proteína y transcurrida una semana se desangró al animal, alcanzando un título aproximado de 1: 1.024.000.

B.II.4.1.3. Obtención de suero

Para la obtención del suero, la sangre se dejó a temperatura ambiente durante 2 h; a continuación se incubó durante 20 min a 37°C y finalmente para favorecer la contracción del coágulo se mantuvo a 4°C durante 4h. Las muestras fueron centrifugadas a 2500 x g durante 10 min. Los sobrenadantes se almacenaron en alícuotas con azida sódica (0.02%) a 4°C y a -80°C.

B.II.4.1.4. Purificación del anticuerpo anti- LmFPPS

El suero fue sometido a una purificación de afinidad utilizando una resina de Affi-gel 15 con capacidad para fijar ligandos con aminas primarias, a la que previamente se le adhirió la proteína FPPS purificada. Para ello, el gel es secuencialmente lavado con 20 volúmenes de agua bidestilada y con 20 volúmenes de tampón de adherencia (Hepes 50mM pH.7.5). 1 mg de proteína FPPS purificada se diluyó en 4 ml de buffer de adherencia, se cargó en la columna y se mezcló lentamente a 4 °C durante toda la noche utilizando un agitador orbital. Al día siguiente, la columna se lavó con 20 volúmenes de cada una de las siguientes soluciones: tampón de bloqueo (100 mM etanolamina-HCl pH.8), PBS, tampón de elución (0,1M de glicina pH.2.5), 100 mM Tris-HCl pH.8, PBS.500 y finalmente con PBS 1x. A continuación, se aplicaron 10 ml de suero a la columna, se dejó recircular 2 veces y finalmente el anticuerpo fue eluido con 5 volúmenes de glicina 100mM pH. 2.5 y neutralizado con 1 M de Tris pH.9.5.

B.II.4.2. Transferencia de proteínas, *Western blot* (Burnette, 1981)

Se utilizaron membranas de difluoropolivinilideno (PVDF) Immobilon-P que presentan un tamaño de poro de 0.45 µm y son capaces de retener proteínas de más de 10 kDa. La membrana de Immobilon-P fue sumergida en metanol absoluto durante 30 seg y lavada 2 min con agua bidestilada estéril. A continuación, la membrana y el

gel fueron incubados durante 30 min en la solución de transferencia (Tabla B.I) y luego se colocaron entre seis piezas de papel Whatman® 3MM previamente humedecidas en la misma solución. La transferencia se desarrolló en un Trans-Blot®SD-Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) y las condiciones fueron: 10 V durante 30 min para un gel (máximo 5.5 mA/cm²), mientras que la transferencia de dos geles se realizó durante 60 min a 15 V (máximo 3 mA/cm²). A continuación, la membrana fue teñida con una solución de Rojo-Ponceau (0.5%) y ácido acético (1%) durante 1 min. Posteriormente, se lavó con agua bidestilada hasta visualizar las proteínas. Para desteñir el filtro se utilizó NaOH 0.1N.

La membrana fue bloqueada en agitación con una solución de leche desnatada al 5 % y azida sódica al 0.02 % en PBS o TBS con 0.1 % de Tween 20 y un 1% de BSA durante 2 h a temperatura ambiente o bien durante toda la noche a 4°C. Tras lavar el filtro dos veces durante 5 min y dos veces durante 15 min con la solución de lavado (Tabla B.I) quedó listo para llevar a cabo la inmunodetección con un anticuerpo marcado.

B.II.4.3. Inmunodetección

Para detectar las proteínas fijadas a la membrana de PVDF, se incubó durante 1 h con una dilución (1:4000000) del anticuerpo primario purificado en solución de lavado (Tabla B.I). Seguidamente, se realizaron dos lavados de 5 min y dos de 15 min, y se incubó durante 1 h con una dilución (1:5000) de anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (*HRP-peroxidase*). A continuación, el filtro fue lavado en las mismas condiciones e incubado durante 1 min con los reactivos de ECLTM. Finalmente, las proteínas marcadas se observaron tras el revelado de la película autorradiográfica HyperfilmTM ECLTM (Amersham Pharmacia Biotech) expuesta a la membrana tratada.

B.II.5. ESTUDIO DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA FPPS DE *L. major*

B.II.5.1. Inmunocitoquímica y observación por microscopía electrónica de transmisión

B.II.5.1.1. Preparación de inclusiones de parásitos. Procesamiento para inmunocitoquímica (LRWhite).

Tanto la preparación de las inclusiones como el montaje de los cortes sobre las rejillas de níquel fueron realizados en el Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada. Para cada una de

las inclusiones se requirieron $1-10 \times 10^7$ células en la fase exponencial de la curva de crecimiento, que fueron lavadas con tampón PBS estéril (Tabla B.I) e incubadas a 4°C durante 4 h con fijador de Karnovsky (Glutaraldehído tipo I 0.4 %, Formaldehído 4 %, sacarosa 3,5% y ácido pícrico 0,5% en tampón Cacodilato 0.1 M, pH 7.4). Posteriormente, se realizaron tres lavados de 20 min con tampón cacodilato a 4°C . A continuación la muestra fue resuspendida en un volumen de 500 μl y transferida a un *eppendorf*. Los sitios carboxi-aldehído reactivos se bloquearon con glicina 0.1 M en el mismo tampón durante 1 h. Se centrifugó, y se descartó el sobrenadante. La muestra fue entonces deshidratada con concentraciones crecientes de etanol según el siguiente esquema:

Resuspensión en etanol 50 %, 20 min, -20°C . Centrifugación.

Resuspensión en etanol 70 %, 20 min, -20°C . Centrifugación.

Resuspensión en etanol 90 %, 20 min, -20°C . Centrifugación.

Resuspensión en etanol 100 %, 20 min, -20°C (2 veces). Centrifugación.

El material fue, posteriormente, transferido a un frasco de inclusión e infiltrado en la resina de la siguiente forma:

Etanol-Resina LRWhite 25 %, 2 h, -20°C

Etanol-Resina LRWhite 50 %, 2 h, -20°C

Etanol-Resina LRWhite 75 %, 2 h, -20°C

Etanol-Resina LRWhite 100 %, 2 h, -20°C (2 veces)

Por último, se transfirió el material a una cápsula de gelatina, se cubrió con resina y se dejó polimerizando durante 2 días en cámara UV a -20°C , y un día a temperatura ambiente.

Una vez obtenidos los bloques de inclusión se hicieron cortes semifinos de 1 μm de espesor que se tiñeron con azul de toluidina al 2 % en borax al 1 % en placa caliente. Dichas secciones se observaron en un microscopio óptico. Examinados los cortes semifinos se procedió a la elección de la zona de interés para la posterior obtención de cortes ultrafinos de 500 Å de espesor en un ultramicrotomo Ultracut R de Leica. Los cortes se montaron sobre rejillas de níquel de malla 300.

B.II.5.1.2. Inmunocitoquímica

Todo el proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente en atmósfera húmeda. Las soluciones utilizadas se filtraron previamente con filtros de 0.22 μm Acrodisc® PF (Gelman Sciences). Cada una de las gradillas que contenían cortes correspondientes a formas promastigotes de *L. major*, células transfectadas con el plásmido pX63NEO o con el plásmido pX63NEO-FPPS fue incubada durante 30 min a temperatura ambiente con 20 μl de NH_4Cl 80 mM. A continuación las gradillas fueron incubadas durante 30 min con una solución de PBS-BSA al 3% y tratadas con una dilución (1:3000) de

anticuerpo policlonal anti-LmFPPS en PBS-BSA al 1% y Tween 20 al 0.01% durante 2 horas. Los controles incubados con preimmune también se trataron con una dilución (1:3000). Con el fin de eliminar los anticuerpos no unidos se procedió a realizar una serie de lavados: 5 veces durante 5 min con una solución de PBS-BSA al 3% y 30 min con una solución de PBS-BSA al 1 % y 0,01% de tween 20. A continuación se incubó con el anticuerpo secundario (Anti IgG de conejo conjugado con partículas de oro de 10 nm) en dilución (1:100) en PBS-BSA al 1 % y Tween 20 0.01 % durante 1 h a temperatura ambiente. Se hicieron entonces 5 lavados de 5 min con PBS 1x y otros 5 lavados de 5 min con agua bidestilada. El pH del PBS utilizado en todo el proceso es de 8. Se dejó secar toda la noche y al día siguiente las muestras se contrastaron con acetato de uranilo al 2 % y fueron visualizadas y fotografiadas en un microscopio de transmisión Zeiss 902 10 CR a 100 kV.

B.II.5.2. Inmunofluorescencia

Se recogieron aproximadamente 10^7 parásitos en fase logarítmica de crecimiento mediante centrifugación, se lavaron dos veces con PBS a pH 7.2 filtrado y se resuspendieron en PBS hasta obtener una densidad de 0.6 millones de parásitos por cada 100 μ l. A continuación, incubo los parásitos vivos con MitoTracker[®] 100nM a 28°C durante 15min. 100 μ l de solución de parásitos fueron adheridos durante 20 min a cubreobjetos circulares, previamente revestidos con Poli-L-Lisina durante 15 min a temperatura ambiente y lavados tres veces con PBS. Tras lavar los cubreobjetos dos veces con PBS después de la adhesión, se llevó a cabo la fijación de los parásitos con p-formaldehído al 4 % durante 30 min y se lavó de nuevo tres veces. A continuación, las células adheridas y fijadas fueron permeabilizadas con NP40 0,01% en PBS a temperatura ambiente y transcurridos 5 min se rehidrataron las muestras con dos lavados de PBS a pH 8.0. El bloqueo se realizó con BSA al 1.5 % en PBS a pH 8.0 durante 1 h a temperatura ambiente cambiando una vez la solución. Después se dieron dos lavados de 5 min, y se incubó 1 h con dilucion 1:10000 del anticuerpo anti-FPPS. Como controles se incubaron muestras con suero preimmune diluidas de la misma manera. Posteriormente se realizaron cuatro lavados de 10 min con tampón de bloqueo y a continuación se incubó en oscuridad con una dilución (1:40) de anti IgG de conejo conjugado con fluoresceína durante 1 hora. Tras 5 lavados de 5 min con solución de bloqueo, en oscuridad y a temperatura ambiente, se realizó el montaje de las muestras tratadas en portaobjetos con 3 μ l de Vectashield con DAPI. Finalmente se sellaron con esmalte y se dejaron secar durante 15 min. Las muestras se conservaron protegidas de la luz y a 4 °C hasta su observación.

La observación de las muestras se realizó en microscopios de fluorescencia Leica.

B.II.5.3. Permeabilización de *L. major* con digitonina.

Las células permeabilizadas con digitonina se emplearon para estudiar la localización subcelular de la farnesil pirofosfato sintetasa. Un cultivo de 100 de *L. major* crecido hasta fase exponencial de la curva de crecimiento (15×10^6 células/ml) fue lavado en PBS 1x y los parásitos fueron resuspendidos en tampón C (Tabla B.I) con inhibidores de proteasas (200×10^6 células /ml). Alicuotas de 1 ml de la suspensión fueron tratadas con diferentes concentraciones de digitonina (0.031, 0.062, 0.025, 0.05, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8 y 1mg/ml) durante 30 min a 28°C y centrifugadas a 13000x g durante 2 min. El sobrenadante se utilizó para determinar la actividad citrato sintasa, hexoquinasa, farnesil pirofosfato sintetasa y piruvato quinasa. La actividad total de cada enzima fue ensayada a partir del sobrenadante de los parásitos incubados con 0.5 % de Tritón-X 100.

D. RESULTADOS

D.I. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN DE LA FARNESIL PIROFOSFATO SINTETASA DE *L. major* 252

D.I.1. AISLAMIENTO DEL GEN *LmFPPS*

D.I.1.1. Obtención de una sonda homóloga del gen *LmFPPS*

En el momento de iniciar este estudio, la secuencia correspondiente al gen de *LmFPPS* no se encontraba disponible en la base de datos del genoma de *Leishmania*. Por tanto, en primer lugar, se procedió a la obtención de una sonda homóloga para el gen *LmFPPS*, mediante la técnica de PCR. Para ello se utilizó DNA genómico de *L. major* cepa 252, y los oligonucleótidos degenerados LmFPPS-1 y LmFPPS-2 (Tabla B.II), que se diseñaron a partir de regiones de alta homología de un alineamiento de secuencias codificantes de la enzima FPPS en otros organismos. El diseño de oligonucleótidos se hizo teniendo en cuenta el uso de codones descrito para tripanosomátidos (Langford y col., 1992).

El producto de PCR fue analizado en un gel de agarosa al 1%, observándose una banda de aproximadamente 500 pb (figura D.I.). El DNA de la banda fue aislado del gel de agarosa y purificado. Posteriormente se clonó en el vector de amplificación pGEM-T® y el plásmido construido fue propagado en *E.coli* XL1Blue. También fue secuenciado el DNA amplificado observándose que su tamaño exacto era de 483 pb.

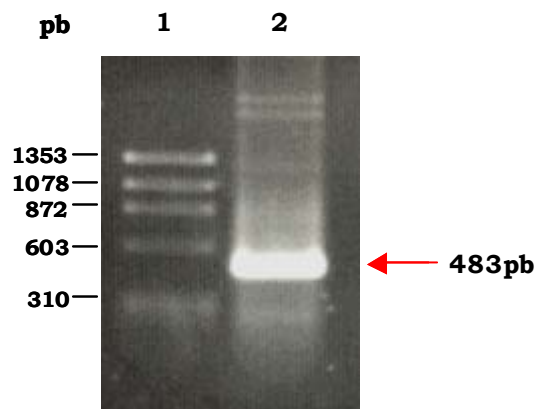


Figura D.I. Electroforesis en agarosa al 1%. (1) Marcadores de DNA.(2) Sonda homóloga amplificada por PCR a partir de DNA genómico de *L. major* 252, utilizando los oligonucleótidos degenerados LmFPPS-1 y LmFPPS-2 (Tabla B.II).

D.I.1.2. Screening de una genoteca de cDNA de *L. major* construida en el fago λ -ZAP-Express®

Con la sonda homóloga obtenida por PCR, se procedió al *screening* de una genoteca de cDNA de *L. major* 252, construida en el fago ZAP-Express™. Aproximadamente $1,25 \times 10^5$ ufp (unidades formadoras de placa) fueron plaqueadas y transferidas a filtros de nitrocelulosa. Dos de éstas hibridaron con la sonda de 483 pb correspondiente a un fragmento del gen *LmFPPS*. Los dos clones fueron sometidos a dos *screenings* adicionales con el fin de eliminar posibles fagos no positivos. Finalmente se seleccionaron dos fagos positivos que provenían respectivamente de los dos clones iniciales, para ser excindidos *in vivo*. Los fagémidos pBK-CMV resultantes, se comportaron como plásmidos en *E. coli* XL0LR. Se procedió al análisis del cDNA de los dos clones elegidos, FPPS-1 y FPPS-2, mediante digestión de los plásmidos con las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *XhoI*, que liberan el inserto. Se obtuvo el mismo patrón de digestión para ambos, presentando un inserto de un tamaño aproximado de 2 kb. Posteriormente se procedió a la secuenciación de uno de ellos, FPPS-1, utilizando los oligonucleótidos T₃ y T₇, específicos del fagémido pBK-CMV, y oligonucleótidos internos de la secuencia génica (figura D.II). Se consiguió secuenciar un fragmento de 1729 pb que alcanzaba el miniexón en el extremo 5', pero no se consiguió secuenciar el poli A en el extremo 3'.

D.I.2. CARACTERIZACIÓN DEL GEN DE LA FARNESIL DIFOSFATO SINTETASA DE *L. major*

D.I.2.1. Análisis de la secuencia nucleotídica del gen *LmFPPS*

Tras el análisis de la secuencia clonada en el fago FPPS-1, se observó que el inserto presentaba un tamaño aproximado de 2000 pb, 1086 de las cuales correspondían a una pauta abierta de lectura. La secuencia presentaba el *spliced leader* característico del género *Leishmania* en el extremo 5', localizado a 189 pb del codón de iniciación. El primer triplete ATG que aparece corriente abajo después del *spliced leader* fue considerado como el codón de iniciación de la traducción. Se encontró que la pauta abierta de lectura de 1086 pb codifica una proteína de 362 residuos, con un peso molecular teórico de 41 kDa. En la figura D.II. se muestra la secuencia nucleotídica del gen *FPPS* de *L. major*.

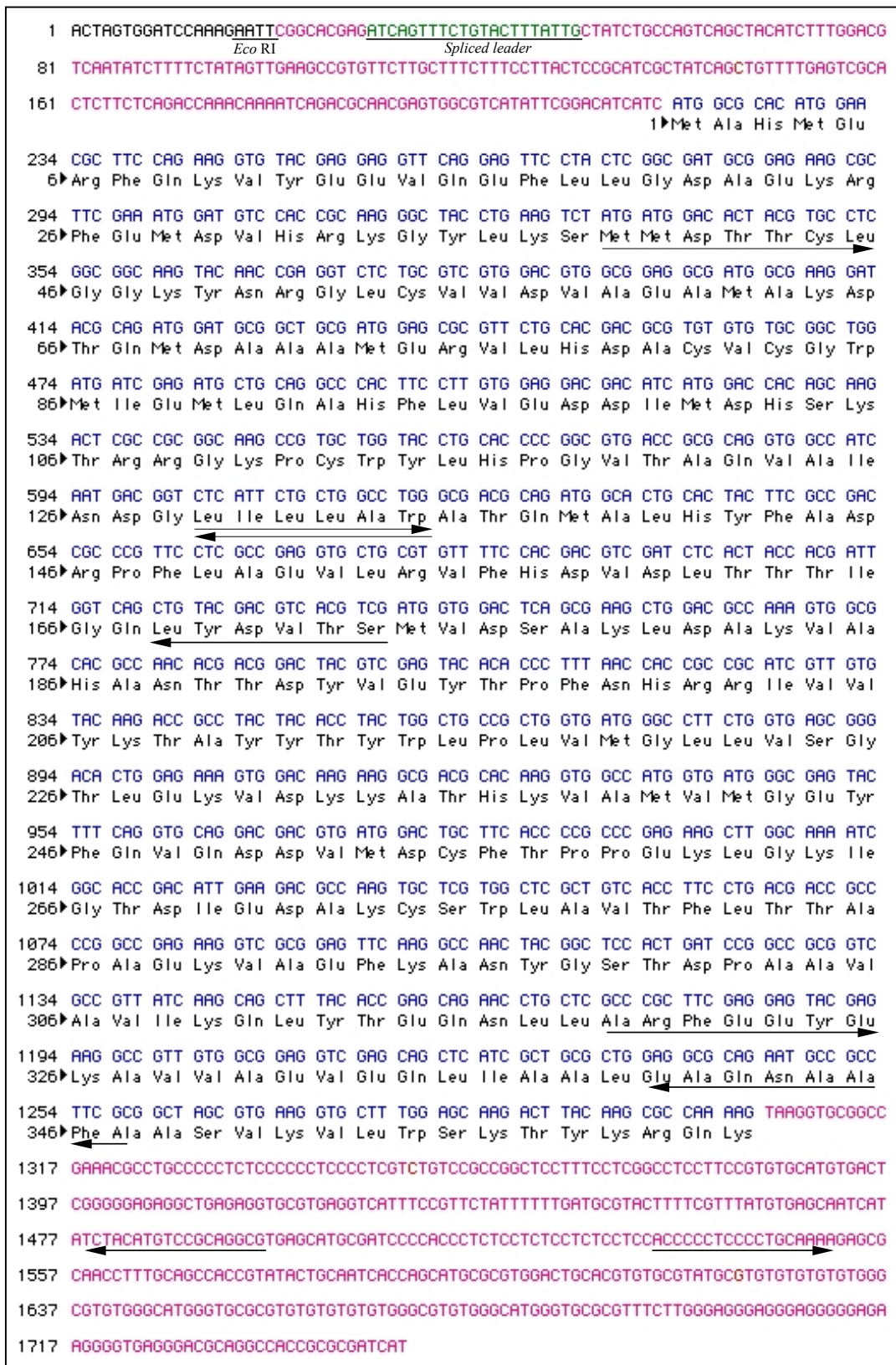


Figura D.II. Secuencia del gen *FPPS* de *L. major* contenida en el fago FPPS-1. Se indican con flechas los oligonucleótidos utilizados para secuenciar el gen. En color rosa se indica la secuencia no traducida y en azul la pauta abierta de lectura. En color negro aparece el fragmento de la secuencia del fago pBK-CMV y el sitio de restricción *EcoRI*, que junto al enzima *XhoI*, fue utilizado para liberar el cDNA que abarca el gen *FPPS*. En verde aparece el minixón o *spliced leader* característico de *Leishmania*.

D.I.2.2. Organización genómica del gen *LmFPPS*

D.I.2.2.1. Determinación del número de copias del gen *LmFPPS*

El número de copias de un gen se determina con el patrón de digestión que resulta al digerir DNA genómico con endonucleasas de restricción. Se utilizan enzimas que reconocen su diana una vez en la secuencia codificante del gen y otras cuya diana está ausente en ella. El producto de la digestión nos permitirá determinar si el gen es de copia única o está repetido.

Para determinar el número de copias del gen *LmFPPS*, se trató DNA genómico procedente de formas promastigotes de *L. major* 252 con las enzimas *HindIII*, *NcoI* y *PstI*, las cuales presentan un punto de corte dentro del gen, y *BamHI*, *EcoRI* y *SaII*, que no tienen diana de restricción en la secuencia codificante. Los productos de digestión fueron separados mediante electroforesis en un gel de agarosa, y posteriormente transferidos a un filtro de *nylon*. La membrana fue hibridada con una sonda que correspondía a la región codificante del gen *LmFPPS*. En la figura D.III. se muestra el resultado obtenido. Al digerir con enzimas que presentan un único punto de corte en el gen, se obtuvieron dos fragmentos que hibridaban con la sonda radiactiva. Sin embargo, al hacerlo con enzimas de restricción sin diana en el gen, apareció una sola banda de hibridación en cada caso.

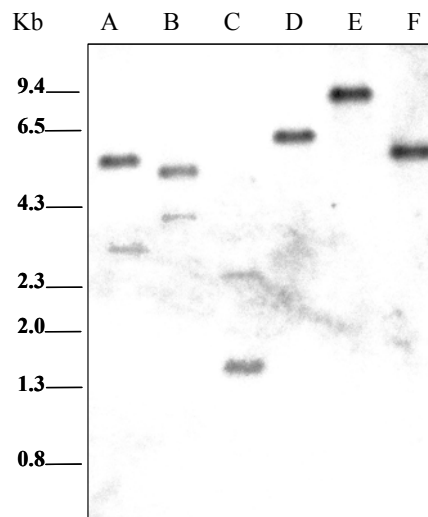


Figura D.III. El DNA genómico total de *L. major* fue digerido con *HindIII* (calle A), *NcoI* (calle B), *PstI* (calle C), *BamHI* (calle D), *EcoRI* (calle E) y *SaII* (calle F). Los fragmentos de DNA fueron separados en gel de agarosa al 1%, transferidos a filtro de *nylon* e hibridados con la secuencia codificante completa.

D.I.2.2.2. Localización cromosómica del gen *LmFPPS*

El tamaño de los cromosomas de *Leishmania* está comprendido entre 300 y 2800 kb y pueden ser separados mediante electroforesis en campo pulsante (CHEF). Utilizando las condiciones descritas en el apartado B.II.2.9.2. de MATERIAL Y MÉTODOS, los cromosomas de formas promastigotes de *L. major* 252 fueron separados mediante *CHEF* electroforesis. A continuación, el DNA fue transferido a un filtro de *nylon* e hibridado con una sonda correspondiente a la secuencia codificante del gen *LmFPPS*. En el panel B de la figura D.IV. aparece la señal obtenida que corresponde a un cromosoma de aproximadamente 680 Kb. Este resultado ha sido posteriormente corroborado gracias a la secuenciación del genoma de *Leishmania major cepa friedlin* (www.LeishDB.org), donde se ha localizado el gen *LmFPPS* en el cromosoma 16. En el panel A se muestra esquemáticamente el tamaño en Mb que tiene cada uno de los 36 cromosomas de *Leishmania*.

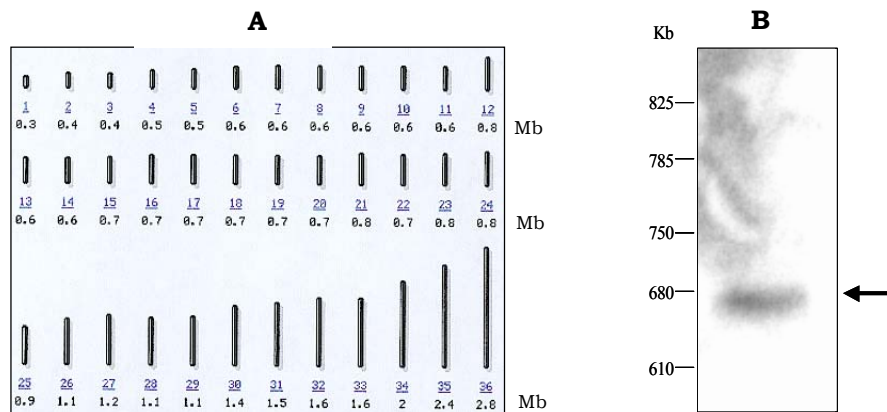


Figura D.IV. Localización cromosómica del gen *LmFPPS* de *L. major*. **A.** Esquema del tamaño de los 36 cromosomas de *Leishmania* comprendidos entre 0.3 y 2.8 Mb. **B.** Autorradiografía correspondiente al filtro de *nylon* hibridado con la secuencia codificante de la FPPS de *L. major*. La flecha indica la banda que aparece al hibridar con la sonda específica.

D.II. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE FPPS DE *L. major* EN EL SISTEMA HETERÓLOGO *E. coli*

D.II.1. CONSTRUCCIÓN DEL SISTEMA DE EXPRESIÓN

Para desarrollar un sistema de expresión se empleó el vector pET11-c de la serie pET de Novagen, en los que se introdujo la secuencia codificante LmFPPS, con el fin de obtener proteína recombinante soluble. El vector pET-11c permite la expresión de la proteína en forma nativa.

En primer lugar se amplificó mediante PCR la secuencia codificante del gen *LmFPPS* y se clonó en el vector pGEM-T® (*Promega*). Para llevar a cabo la reacción de amplificación, se empleó como molde el DNA del clon FPPS-1 aislado a partir de la genoteca de cDNA de *L. major* y se utilizaron los oligonucleótidos LmFPPS-14 y LmFPPS-15, complementarios a los extremos 5' y 3' de la zona codificante respectivamente. Así, el oligonucleótido LmFPPS-14 era complementario a las posiciones +1 a +15, e incluía la secuencia reconocida por la enzima *NdeI*, mientras que el oligonucleótido LmFPPS-15 era complementario a la secuencia +1072 a +1086, además de presentar la diana de la enzima *BamHI*. El plásmido resultante se denominó pGEMT-LmFPPS.

Para la construcción del plásmido de expresión pET11c-LmFPPS (figura D.VI.), el inserto liberado por el vector pGEMT-LmFPPS, tras ser digerido con *NdeI* y *BamHI*, fue ligado al vector pET-11c, que previamente había sido digerido con las mismas enzimas y defosforilado con fosfatasa alcalina. El plásmido fue propagado en *E. coli* XL1Blue y mediante secuenciación se comprobó que durante el proceso de amplificación la *Taq* DNA polimerasa no había introducido ningún nucleótido erróneo.

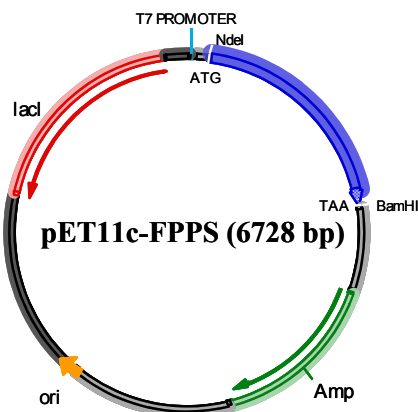


Figura D.VI. Plásmido de expresión pET11c-LmFPPS

Para sobreexpresar la proteína recombinante se transformaron bacterias *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido pET11c-LmFPPS. Esta cepa presenta una copia lisogénica del gen que codifica para la T7RNA polimerasa y cuya expresión se encuentra bajo el control del promotor *T7lac*. Así, en presencia de IPTG se induce la expresión de la T7 RNA polimerasa y la del gen clonado en el vector correspondiente. La inducción se llevó a cabo con IPTG a una concentración final de 1 mM a 37°C, y se recogieron muestras a distintos tiempos (2, 4, 6 y 8h). Bajo las condiciones experimentales empleadas pudimos observar una elevada sobreexpresión de la enzima recombinante, tanto en los extractos solubles (Figura D.VI.) como en la fracción particulada asociada a cuerpos de inclusión (figura no mostrada).

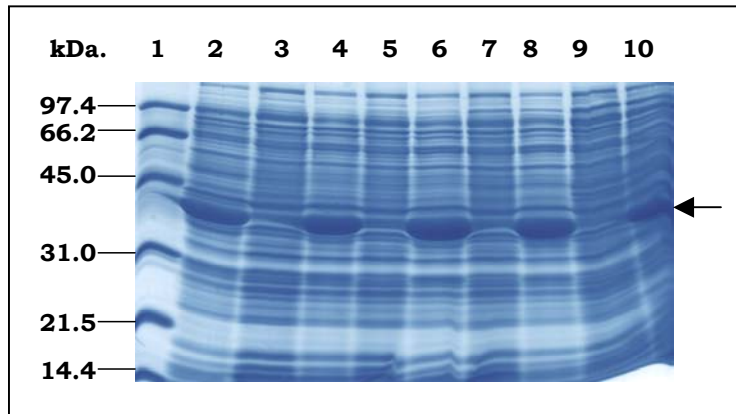


Figura D.VI. Sobreexpresión de la proteína LmFPPS en *E. coli* BL21 (DE3). La inducción se llevó a cabo a 37°C con IPTG 1 mM. Gel SDS-PAGE correspondiente a extractos solubles. (1), marcadores de peso molecular. (3), (5), (7) y (9), control de bacterias *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con pET11c y crecidas durante 2, 4, 6 y 8 h respectivamente. (4), (6), (8) y (10), bacterias *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pET11c-LmFPPS, inducidas con IPTG durante 2, 4, 6 y 8 h respectivamente. (2), bacterias *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con pET11c-LmFPPS crecidas durante 8 horas en ausencia de IPTG. La proteína LmFPPS sobreexpresada migra a un tamaño aproximado de 41 kDa y aparece señalada con una flecha negra.

D.III. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA FPPS DE *L. major*

D.III.1. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE LmFPPS

La purificación de la enzima se llevó a cabo a partir de células *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pET11c-LmFPPS e inducidas durante 4 horas con 1mM de IPTG como se indica en el apartado B.II.3 de MATERIALES Y MÉTODOS. La proteína fue analizada a lo largo de los diferentes pasos de purificación mediante electroforesis en geles desnaturizantes SDS-PAGE D.VII. y la determinación de la actividad enzimática se realizó por el método radiactivo.

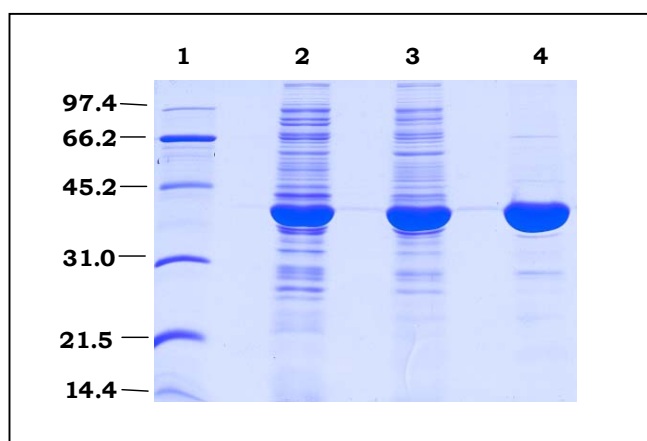


Figura D.VII. Purificación de la FPPS recombinante de *L. major* sobreexpresada en *E. coli* BL21 (DE3). SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Comassie-R250. 1) marcadores de peso molecular; 2) extracto soluble BL21(DE3)-pET11c-LmFPPS inducido con 1mM de IPTG durante 4 horas; 3) precipitado obtenido al 40% de saturación con sulfato amónico; 4) fracción obtenida de la cromatografía de hidroxapatito.

D.III.2. DETERMINACION CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD LmFPPS

Para llevar a cabo la caracterización cinética de la proteína recombinante LmFPPS, se utilizó el método descrito por Eberhardt y Rilling (1975) que consiste en la utilización de los sustratos GPP e IPP, que componen la segunda parte de la reacción que cataliza la FPPS, estando el IPP marcado con C^{14} . De esta forma, se puede cuantificar la incorporación de IPP marcado radiactivamente en el producto FPP por la LmFPPS respecto al tiempo (nmoles/min). Como se observa en la tabla D.I., tras la precipitación con sulfato amónico y la cromatografía en columna de hidroxapatito, conseguimos un grado de purificación de 3.32 veces, con un rendimiento del 25%.

Fracción	Volumen (ml)	Proteína total (mg)	Actividad específica (unidades/mg)	Actividad total (unidades)	Grado de purificación	Rendimiento (%)
Extracto soluble	49	445.9	529.3	235.997	1.0	100
Sulfato amónico 40%	4	165.4	1059.3	175.201	2.0	74
Hidroxiapatito	6,6	34.5	1757.6	60.672	3.3	25

Tabla D.I. Procedimiento de purificación de la FPPS recombinante de *L.major* procedente de 1 litro de cultivo de *E. coli* BL21 (DE3)-pET11c-LmFPPS. Una unidad de enzima se define como la actividad requerida para incorporar 1 nmol de 4-[¹⁴C] IPP a 4-[¹⁴C] FPP en un minuto.

D.III.3. DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR DE LA PROTEÍNA NATIVA.

Para determinar la masa molecular de la proteína nativa recombinante se utilizó una columna de filtración en gel o exclusión molecular Superdex 200. En primer lugar se determinaron los tiempos de retención de las proteínas patrón de masa molecular conocida y posteriormente el de la proteína recombinante.

La masa molecular correspondiente a la FPPS de *Leishmania major*, deducida a partir de su secuencia de aminoácidos es de 40967 Da. En la Figura D.VIII.A., podemos apreciar que el pico de elución correspondiente a la enzima FPPS de *L.major* presenta un tiempo de retención de 26.79 min y aparece entre los picos de elución correspondientes a la aldolasa y la ovoalbúmina. A partir de los tiempos de retención de las proteínas estándar y el logaritmo del peso molecular de cada una de ellas, se obtuvo una recta patrón que permitió determinar que la masa molecular aparente de la FPPS de *Leishmania major* es de 86920 Da (Figura D.VII.B). Este resultado sugiere que la enzima presenta una estructura homodimérica.

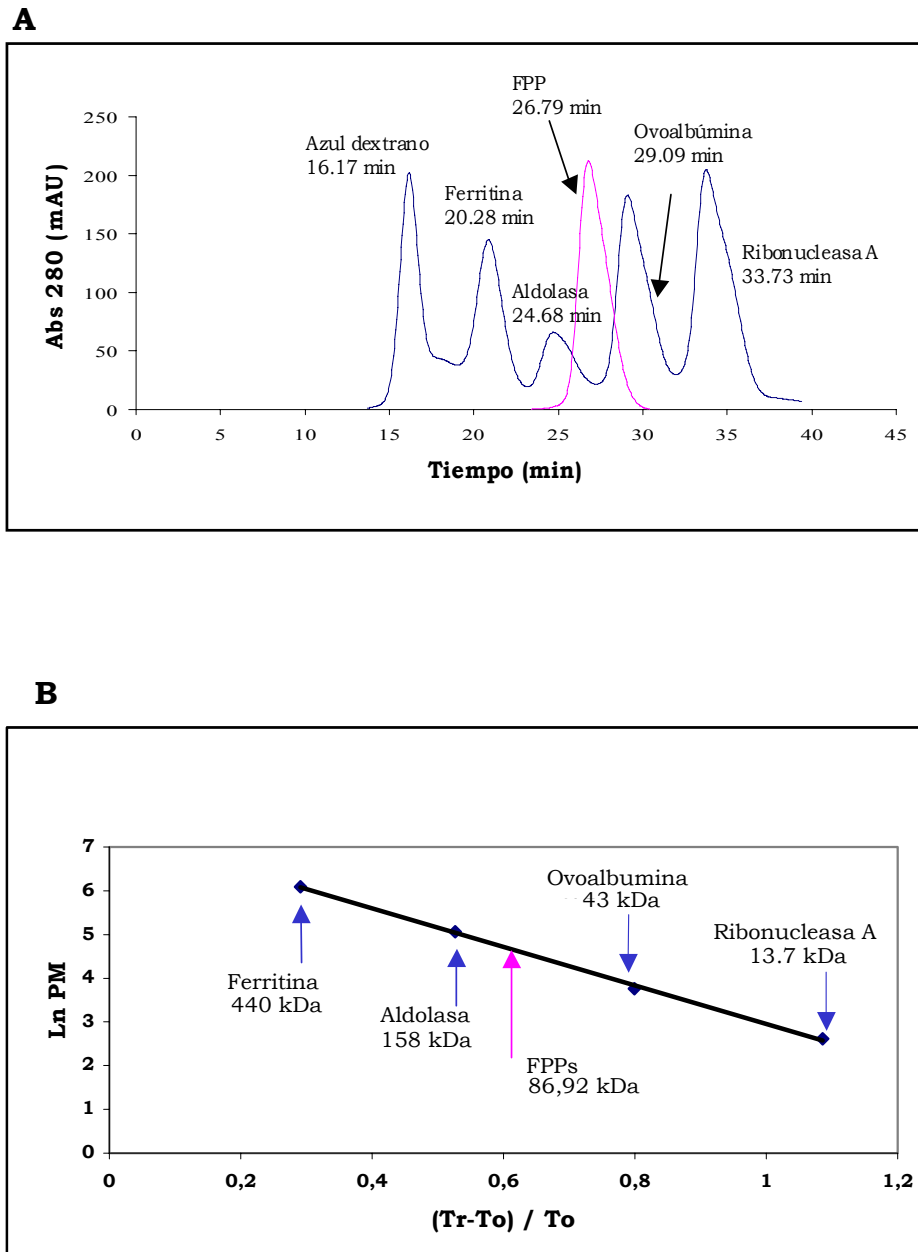


Figura D.VIII. Determinación de la masa molecular de la FPPS nativa de *L.major*. **A)** La proteína fue aplicada a una columna de exclusión molecular y eluyó entre la aldolasa y la ovoalbúmina. **B)** Curva de calibrado obtenida a partir del cromatograma de las proteínas estándar. **To**, es el tiempo transcurrido desde el comienzo de la cromatografía hasta la elución del azul dextrano. **Tr**, corresponde al tiempo que tarda en eluir cada una de las proteínas estándar.

D.III.4. DETERMINACIÓN DE K_m Y V_{max} PARA LOS SUSTRATOS IPP Y GPP.

En primer lugar se estableció el rango para el que la actividad enzimática era lineal con respecto a la concentración de enzima LmFPPS utilizada, a concentraciones saturantes de los sustratos geranil pirofosfato (100 μ M) e isopentenil pirofosfato (50 μ M), resultando lineal hasta 50 ng de enzima con dichas concentraciones de sustratos.

Para obtener los valores de K_m , la actividad enzimática fue determinada utilizando concentraciones crecientes de cada sustrato. La concentración de enzima empleada fue de 10 ng en 100 μ l de reacción. Los valores de K_m y V_{max} para ambos sustratos se obtuvieron a partir de la representación lineal de Lineweaver-Burk o de los “dobles recíprocos”, que representa los datos inversos de velocidad obtenidos frente a la inversa de las concentraciones de sustrato utilizadas (figuras D.IX.A y D.IX.B.), tras ser ajustados los datos experimentales a la ecuación.

D.III.4.1. K_m y V_{max} para el isopentenil pirofosfato y geranil pirofosfato

Para determinar el valor de K_m correspondiente a geranil pirofosfato, se midió la actividad enzimática de 10 ng de proteína pura en presencia de 200 μ M de isopentenil pirofosfato, y de concentraciones crecientes de geranil pirofosfato entre 2 y 200 μ M. De igual modo, para la determinación de la K_m de isopentenil pirofosfato, se midió la actividad enzimática de 10 ng de proteína purificada en presencia de 200 μ M de geranil pirofosfato, y de concentraciones crecientes de isopentenil pirofosfato entre 1 y 150 μ M. Los datos experimentales de actividad frente a concentración de sustrato se ajustaron a la ecuación de Michaelis Menten, y posteriormente se realizó el ajuste lineal de los dobles inversos obteniéndose la representación de Lineweaver-Burk, a partir de la cual se obtuvieron los valores de K_m y V_{max} para el geranil pirofosfato e isopentenil pirofosfato.

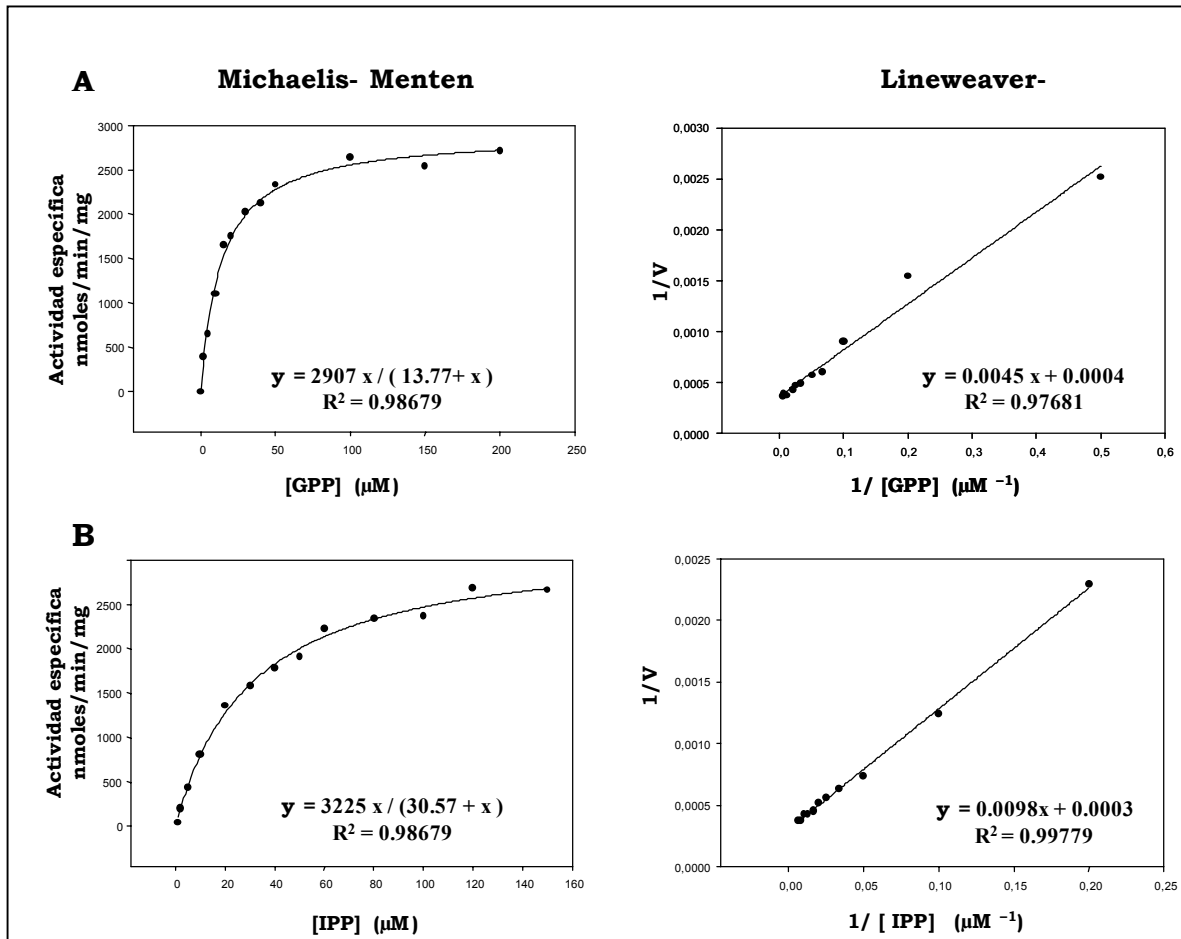


Figura D.IX Determinación de los valores de K_m y V_{max} de la LmFPPS para GPP e IPP. Los ensayos se realizaron utilizando 10 ng de enzima. (A) Representación gráfica de los datos obtenidos para el GPP. La actividad enzimática fue determinada en presencia de concentraciones de GPP comprendidas entre 2-200 μM . (B) Representación gráfica de los datos obtenidos para el IPP. La actividad enzimática fue determinada en presencia de concentraciones de IPP comprendidas entre 1-150 μM . Los valores de K_m , V_{max} se obtuvieron a partir de la representación de Lineweaver-Burk, una transformación de la ecuación (1).

En la tabla D.II. se muestran agrupados los valores de K_m y V_{max} para los sustratos ensayados.

	Geranil pirofosfato	Isopentenil pirofosfato
K_m (μM)	13.77	30.57
V_{max} (nmolmin ⁻¹)	2907	3225

Tabla D.II. Valores de K_m y V_{max} para los sustratos de la proteína FPPS ensayados: geranil pirofosfato e isopentenil pirofosfato.

D.IV. ESTUDIOS DE INHIBICIÓN *IN VITRO* DE LA LmFPPS

En colaboración con el Dr. Eric Oldfield, del Departamento de Química de la Universidad de Illinois (Estados Unidos), se ensayó una colección de compuestos conocidos con el nombre genérico de bifosfonatos (BPs), análogos de GPP, frente a la enzima FPPS recombinante purificada a homogeneidad de *L.major* (las tablas D.III. (I., II., III. y IV.) corresponden a la primera colección de 62 BPs ensayada y las tablas D.IV. (I. y II.), corresponden a la segunda colección de 14 BPs).

Los bisfosfonatos tienen un grupo difosfato común, pero difieren fundamentalmente en los sustituyentes de la cadena hidrocarbonada lateral. Algunos de ellos presentan nitrógeno en la estructura, denominándose aminobifosfonatos. En la figura D.X., tenemos un ejemplo de aminobifosfonato, el risedronato, en el que podemos apreciar la presencia del grupo difosfato, así como el átomo de nitrógeno.

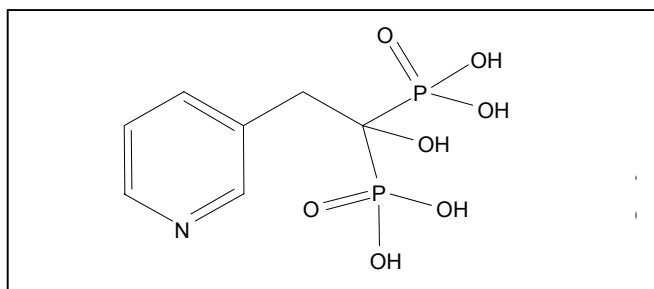


Figura D.X. Estructura química del risedronato.

Se analizó la cinética de inhibición para cada compuesto utilizando GPP e IPP como sustratos. Para ello, se ensayaron 6 concentraciones de inhibidor: 0.1, 0.5, 1, 10 y 100 μM . En todos los casos se utilizó 10 ng de proteína FPPS recombinante purificada. La concentración de GPP fue de 100 μM y la de IPP- ^{14}C 50 μM , con una actividad específica de 40-60 mCi/mmol. Todas las reacciones se llevaron a cabo a 30°C y pH 7 durante 15 min. (Apartado B.II.3.3.1. de MATERIAL Y MÉTODOS).

Para cada inhibidor se calculó el valor de IC₅₀, que se define como la concentración de compuesto que produce un 50 % de inhibición de la actividad enzimática. Dicho valor se obtuvo representando los porcentajes de inhibición obtenidos frente a las distintas concentraciones de inhibidor, realizando un ajuste hiperbólico de los datos con el programa *Sigma plot* y posteriormente interpolando el valor de concentración de compuesto que produce un 50 % de inhibición de la actividad enzimática (figura D.XI.). El valor de IC₅₀ obtenido para el risedronato fue de 0.17 μM .

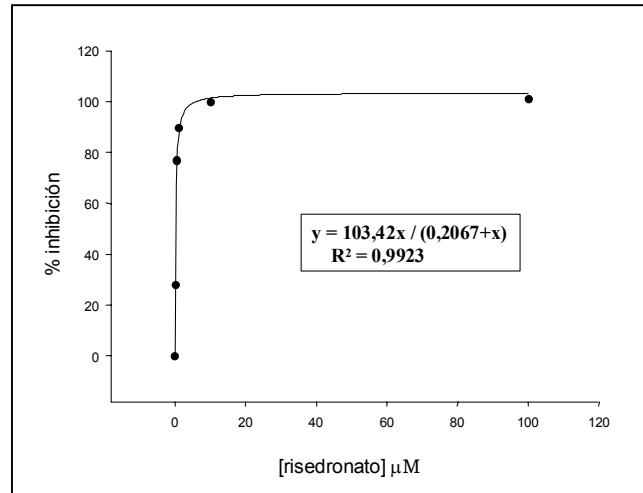


Figura D.XI. Inhibición de la actividad FPPS por el compuesto risedronato. La gráfica muestra un ajuste hiperbólico del porcentaje de inhibición frente a diferentes concentraciones de inhibidor, desde 0,1 hasta 100 μM .

n°BP	ESTRUCTURA	IC50 (μ M)	K _i (μ M)	n°BP	ESTRUCTURA	IC50 (μ M)	K _i (μ M)
1		0.11	0.010	9		0.21	0.020
2		0.11	0.011	10		0.21	0.020
3		0.14	0.014	11		0.23	0.022
4		0.16	0.016	12		0.24	0.023
5		0.16	0.015	13		0.25	0.024
6		0.17	0.016	14		0.31	0.030
7		0.17	0.016	15		0.33	0.032
8		0.18	0.017	16		0.35	0.033

Tabla D.III.I. Primera colección de 62 bifosfonatos ensayados frente a la proteína FPPS recombinante. Se muestran los valores de IC₅₀ y K_i obtenidos para cada compuesto. Los compuestos están ordenados de acuerdo a su valor de IC₅₀.

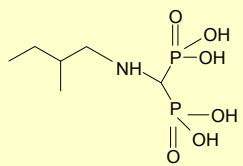
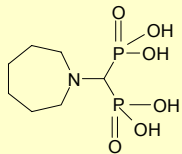
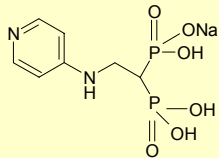
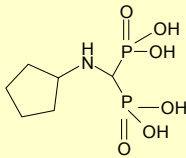
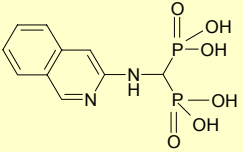
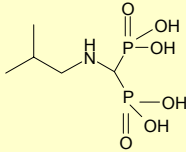
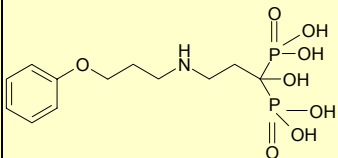
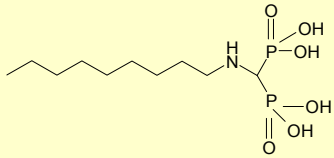
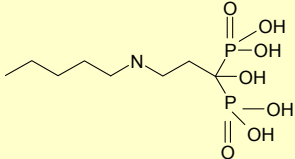
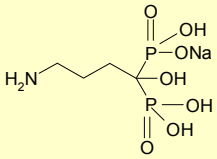
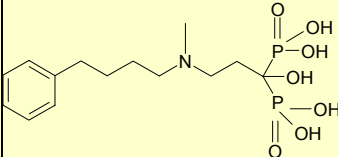
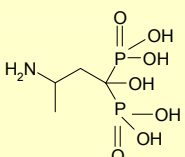
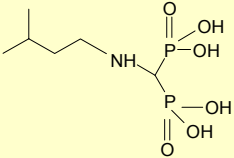
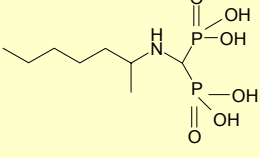
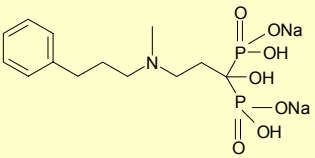
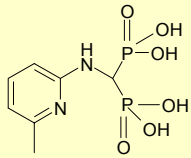
n°BP	ESTRUCTURA	IC50 (μ M)	K _i (μ M)	n°BP	ESTRUCTURA	IC50 (μ M)	K _i (μ M)
17		0,36	0.034	25		0,51	0.049
18		0,42	0.040	26		0,54	0.052
19		0,43	0.041	27		0,78	0.075
20		0,45	0.043	28		0,90	0.086
21		0,48	0.046	29		0,95	0.091
22		0,49	0.046	30		1,0	0.10
23		0,49	0.047	31		1.1	0.11
24		0,50	0.047	32		1.3	0.12

Tabla D.III.II. Primera colección de 62 bifosfonatos ensayados frente a la proteína FPPS recombinante. Se muestran los valores de IC₅₀ y K_i obtenidos para cada compuesto. Los compuestos están ordenados de acuerdo a su valor de IC₅₀.

n°BP	ESTRUCTURA	IC50 (μM)	K_i (μM)	n°BP	ESTRUCTURA	IC50 (μM)	K_i (μM)
33		1.3	0.13	41		3.2	0.30
34		1.4	0.14	42		3.3	0.31
35		1.7	0.16	43		3.4	0.33
36		1.7	0.17	44		4.4	0.42
37		1.9	0.18	45		4.6	0.44
38		1.9	0.18	46		5.4	0.51
39		2.4	0.23	47		5.9	0.56
40		2.4	0.23	48		6.5	0.62

Tabla D.III.III. Primera colección de 62 bifosfonatos ensayados frente a la proteína FPPS recombinante. Se muestran los valores de IC50 y K_i obtenidos para cada compuesto. Los compuestos están ordenados de acuerdo a su valor de IC50.

n°BP	ESTRUCTURA	IC50 (μM)	K_i (μM)	n°BP	ESTRUCTURA	IC50 (μM)	K_i (μM)
49		6.7	0.64	56		17	1.6
50		6.8	0.65	57		18	1.7
51		7.8	0.74	58		20	1.9
52		9.3	0.90	59		41	3.9
53		9.6	0.92	60		43	4.1
54		11	1.0	61		43	4.2
55		15	1.5	62		76	7.3

Tabla D.III.IV. Primera colección de 62 bifosfonatos ensayados frente a la proteína FPPS recombinante. Se muestran los valores de IC50 y K_i obtenidos para cada compuesto. Los compuestos están ordenados de acuerdo a su valor de IC50.

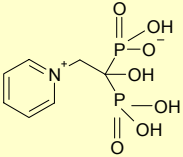
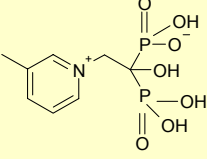
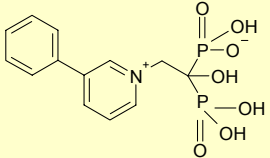
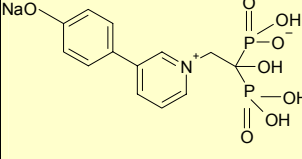
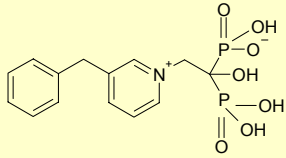
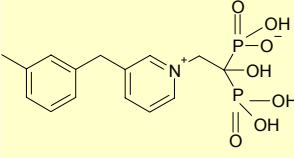
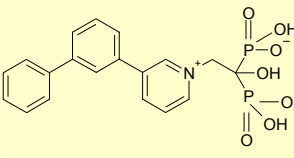
n°BP	ESTRUCTURA	<i>L.major</i> FPPS K_i (nM)	<i>D.discoideum</i> IC50 (μ M) *	estimulación células $\gamma\delta$ T EC50 (μ M) *	resorción ósea "in vitro" IC50 (μ M) *
63		18	2.1	4.8	0.67
64		38	1.5	4.5	0.22
65		9	3.8	4.1	0.41
66		75	2.9	2.5	N.D.
67		160	11	91	N.D.
68		70	9.2	44	N.D.
69		950	2.3	inactivo	N.D.

Tabla D.IV.I. Segunda colección de 14 bifosfonatos ensayados frente a la proteína FPPS recombinante. En la tabla se muestran los valores de IC50 y K_i obtenidos para cada compuesto frente a la enzima "in vitro", así como los valores de inhibición de crecimiento de la ameba *D.discoideum*, de resorción ósea y de activación de células $\gamma\delta$ T con el fin de establecer una relación estructura-actividad en los cuatro casos.

* Valores obtenidos de Sanders, 2005.

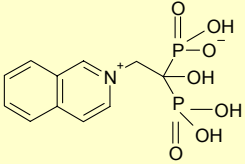
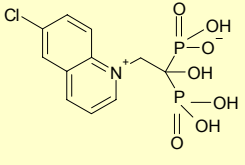
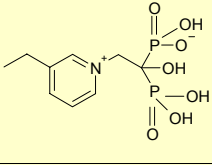
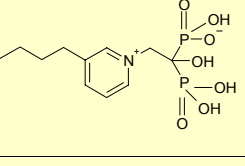
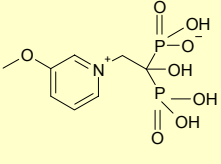
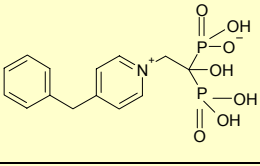
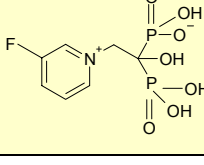
n°BP	ESTRUCTURA	<i>L.major</i> FPPS K_i (nM)	<i>D.discoideum</i> IC50 (μ M) *	estimulación células $\gamma\delta$ T EC50 (μ M) *	resorción ósea "in vitro" IC50 (μ M) *
70		80	20	30	N.D.
71		380	72	56	N.D.
72		20	5.6	4.4	N.D.
73		20	2.9	4.3	N.D.
74		30	6.0	9.3	0.37
75		110	12	150	N.D.
76		50	4.6	2.7	0.075

Tabla D.IV.II. Segunda colección de 14 bifosfonatos ensayados frente a la proteína FPPS recombinante. En la tabla se muestran los valores de IC50 y K_i obtenidos para cada compuesto frente a la enzima "in vitro", así como los valores de inhibición de crecimiento de la ameba *D.discoideum*, de resorción ósea y de activación de células $\gamma\delta$ T con el fin de establecer una relación estructura-actividad en los cuatro casos.

* Valores obtenidos de Sanders, 2005.

D.V. FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LA FPPS DE *L. major*

D.V.1. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES FRENTE A LA FPPS DE *L. major*

La obtención de anticuerpos policlonaes frente a la FPPS recombinante de *L. major*, permitió estudiar la expresión de la proteína tanto en promastigotes de *L. major* 252 como en transfectantes que la sobreexpresan, así como la localización subcelular de la proteína en el parásito.

D.V.1.1. Estudio de la especificidad del anticuerpo anti-FPPS mediante *Western blot*

Para conocer el grado de especificidad del anticuerpo policlonaal, se realizó un *Western blot* con extractos crudos de bacterias *E. coli* BL21(DE3) transformadas con el plásmido pET11c-LmFPPS e inducidas con 1 mM de IPTG durante 4 h. Como control negativo se utilizaron bacterias transformadas con pET11c (Figura D.XII.). El método utilizado se detalla en los apartados B.II.4.2. y B.II.4.3. de MATERIAL Y MÉTODOS.

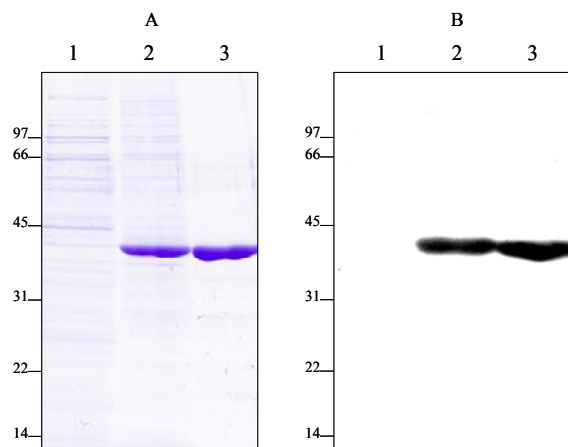


Figura D.XII. Estudio de la especificidad del anticuerpo anti-FPPS frente a extractos de *E. coli* BL21 (DE3). Panel A: Gel SDS-PAGE del 12 % transferido. (1), extracto crudo de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con pET11c, utilizados como control negativo. (2), extracto crudo de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pET11c-LmFPPS e inducidas a 37°C durante 4 h con IPTG 1 mM. (3), proteína LmFPPS purificada en cromatografía de hidroxipatito. Panel B: *Western blot* realizado con suero anti-FPPS, carriles (1), (2) y (3). En los carriles (2) y (3) se observa la inmunodetección de la proteína LmFPPS por el anticuerpo policlonaal anti-FPPS.

D.V.2. ANÁLISIS DE LA SOBREEXPRESIÓN DE LA FPPS EN PROMASTIGOTES DE *L. major*

En la caracterización de la función biológica de la FPPS en *L. major*, presenta gran interés la obtención de mutantes que sobreexpresan la proteína, ya que un estudio detallado del fenotipo resultante provee de información acerca del mecanismo de acción de los bifosfonatos. Asimismo facilita estudios de determinación de la localización intracelular.

D.V.2.1. Obtención de mutantes de *L. major* que sobreexpresan la FPPS

D.V.2.1.1. Construcción del plásmido de transfección

Para la construcción de mutantes se utilizó el vector de transfección pX63NEO, cedido por el Dr. S. Beverley, que utiliza como marcador de transfección el gen de la neomicina fosfotransferasa (*NEO*). La región codificante del gen *LmFPPS* fue amplificada mediante la técnica de PCR utilizando los oligonucleótidos *LmFPPS*-20 y *LmFPPS*-21 (Tabla B.II); el primero de ellos es complementario al extremo 5' e introduce la diana de restricción *Bam*HI, y el segundo es complementario al extremo 3' e incluye el sitio *Bg*III. Las condiciones de PCR se detallan en el apartado B.II.2.6.2. de MATERIAL Y MÉTODOS. El inserto se aisló de un gel de agarosa y se purificó mediante filtración a través de lana de vidrio, fue digerido con *Bam*HI y *Bg*III y clonado en el vector pX63NEO previamente digerido con las mismas enzimas y desfosforilado con fosfatasa alcalina. En la figura D.XIII. se muestra el esquema del plásmido de transfección pX63NEO-FPPS, señalando los sitios de clonación de la secuencia codificante *LmFPPS*.

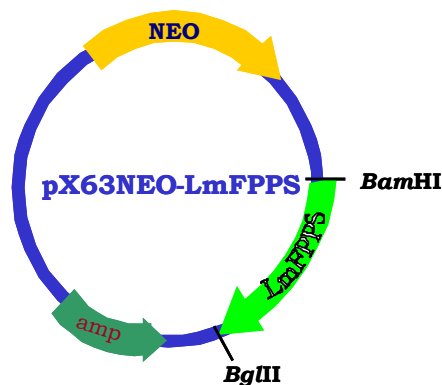


Figura D.XIII. Plásmido de transfección pX63NEO-FPPS para sobreexpresar la proteína *LmFPPS* en un sistema homólogo. En verde claro se indica el gen *LmFPPS* clonado en el *cassette Bam*HI-*Bg*III. Tanto el gen *NEO*, marcador de resistencia, como la secuencia clonada presentan las secuencias aceptoras de *spliced leader* y de poliadenilación del gen *DHFR*

D.V.2.1.2. Electroporación de *Leishmania*

La transfección de células de *Leishmania* con pX63NEO-FPPS y pX63NEO se realizó mediante electroporación. Los experimentos se realizaron por duplicado; como control positivo de transfección se utilizó el vector pX63NEO y como control negativo las células electroporadas en ausencia de vector. Formas promastigotes de *Leishmania* en fase logarítmica tardía de crecimiento, fueron transfectadas siguiendo las condiciones descritas en el Apartado B.II.1.1.5. de MATERIAL Y MÉTODOS. La selección de los clones se realizó en medio completo sólido con 16 µg/ml de G-418, tras ser incubados durante 24 h en medio líquido enriquecido con biopterina y en ausencia de fármaco. Transcurridos 7 a 10 días desde el inicio del ensayo, se observaron colonias de parásitos. Los trece clones positivos obtenidos se sembraron en medio líquido con 16 µg/ml de G418, y 2 de ellos, uno transformado con el vector pX63NEO y otro con el plásmido pX63NEO -FPPS, se adaptaron a concentraciones crecientes del fármaco: 32, 100 y 480 µg/ml, respectivamente.

D.V.2.1.3. Análisis del clon transformado con el plásmido pX63NEO-FPPS mediante CHEF electroforesis

Para corroborar la presencia del plásmido de transfección y que éste se encuentra de forma episomal, se llevó cabo la electroforesis bajo las condiciones descritas por Olmo y col. (1995), que permiten la separación del DNA extracromosómico del cromosómico. Para ello previamente se prepararon bloques de dicho clon adaptados a 16 µg/mL de G-418 según el procedimiento descrito en el apartado B.II.2.9.2. de MATERIAL Y MÉTODOS. En el panel A de la figura D.XIV. se observan bandas correspondientes a DNA plasmídico que migran menos que el DNA cromosómico; estas bandas no aparecen en el carril correspondiente a la cepa salvaje, ni en los carriles control de parásitos transfectados con el vector vacío. El gel fue transferido a un filtro de *nylon* mediante la técnica de *Southern blot*, y al hibridarlo con la sonda *LmFPPS* se detectó el DNA extracromosómico. (Panel B de la figura D.XIV.)

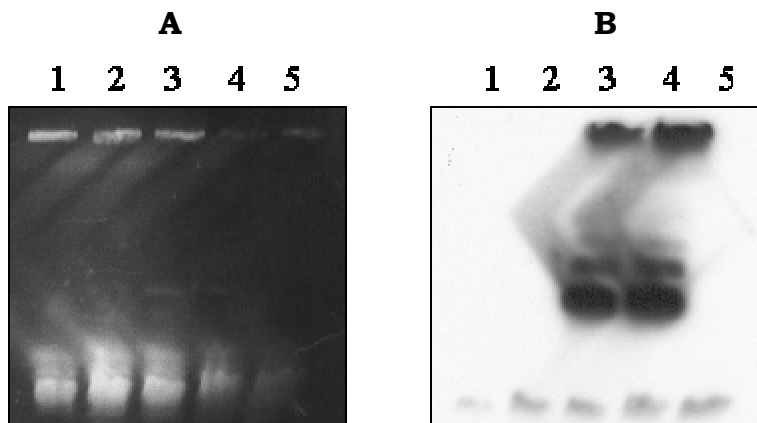


Figura D.XIV. Presencia de DNA extracromosómico en dos de los clones transfectados con el plásmido pX63NEO-FPPS. Los cromosomas de los parásitos transfectados fueron separados del DNA plasmídico mediante CHEF electroforesis. (A) Gel de agarosa teñido con BrEt. (1) DNA del clon sin transfectar; (2) y (5) DNA de los clones control 1 y 2 transfectados con pX63NEO, respectivamente; (3) y (4) DNA de los clones 1 y 2 transfectados con pX63NEO-FPPS, respectivamente. (B) Autorradiografía del filtro del gel anterior transferido e hibridado con la sonda *LmFPPS*.

D.V.2.2. Estudio del patrón de crecimiento del clon pX63NEO-FPPS-1

Se estudió el patrón de crecimiento del clon 1 transfectado con la construcción pX63NEO-FPPS en presencia de concentraciones crecientes de G-418 con respecto al de la cepa salvaje no transfectada y transfectada con el vector pX63NEO.

En la figura D.XV. se muestran las curvas de crecimiento de la cepa salvaje, del clon1 pX63NEO-FPPS y del transfectante control, los dos últimos adaptados tras varios cambios del medio de cultivo a cuatro concentraciones de G-418. La fase estacionaria se alcanza 2 días después de iniciar el ensayo, comenzando con una concentración de 1 millón células/ ml. Las células transfectadas con pX63NEO (NEO) y pX63NEO-FPPS presentan un crecimiento similar entre ellas cuando están adaptadas a 16, 32, 100 y 480 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de G-418.

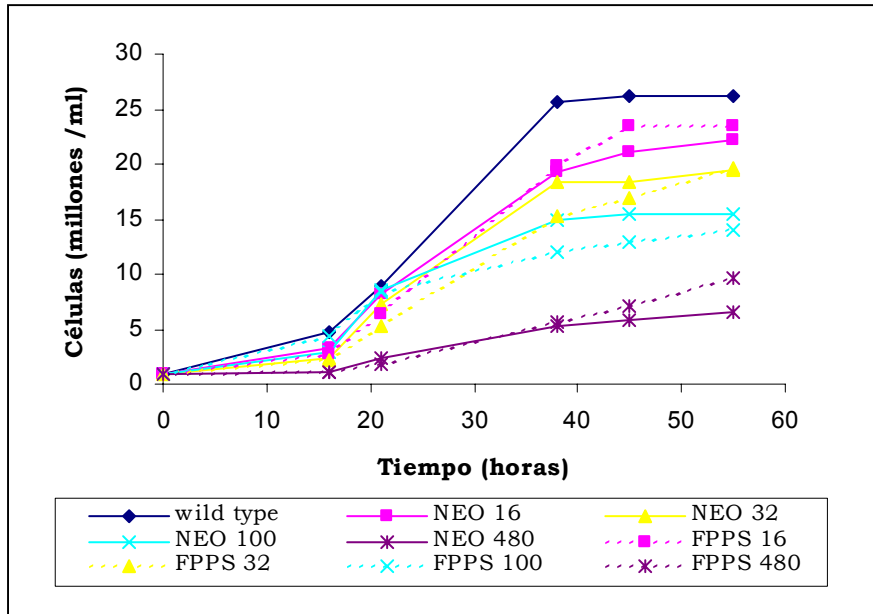


Figura D.XV. Curvas de crecimiento de promastigotes de *L. major* 252 (WT), en color azul oscuro, de parásitos transfectantes NEO, representadas con líneas continuas y transfectantes FPPS, representadas con líneas punteadas, adaptados a concentraciones crecientes de fármaco G-418: 16 (color rosa), 32 (color amarillo), 100 (color azul) y 480 µg/ml (color morado), respectivamente.

Mediante *Western blot* se analizó el nivel de expresión de la FPPS de células salvajes y de células transfectantes NEO y FPPS respectivamente (figura D.XVI.). El anticuerpo policlonal purificado obtenido frente a la LmFPPS permitió inmunodetectar la FPPS, observándose que las células mutantes FPPS adaptadas a concentraciones crecientes de antibiótico (16, 32, 100 y 480 µg/ml de G-418) expresan el producto de expresión del gen clonado, y que el máximo nivel de expresión de la enzima lo obtenemos en presencia de 32 µg/ml de G-418.

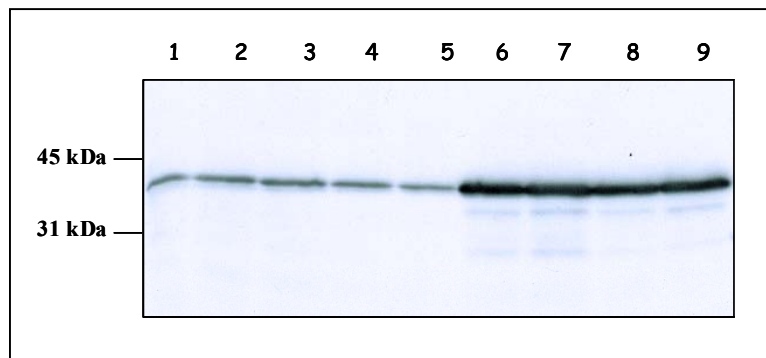


Figura D.XVI. Inmunodetección mediante *Western blot* de la FPPS en extractos solubles de formas promastigotes de *L. major* 252. Las muestras corresponden a 9 µg de extractos totales de parásitos salvajes

(1), transfectantes NEO adaptados a 16, 32, 100 y 480 $\mu\text{g/ml}$ de G-418 (2), (3), (4) y (5) y transfectantes FPPS adaptados a 16, 32, 100 y 480 $\mu\text{g/ml}$ de G-418 (6), (7), (8) y (9), respectivamente.

D.V.2.3. Medidas de actividad FPPS en mutantes que sobreexpresan la proteína

Una vez comprobado que el clon pX63NEO-FPPS1 sobreexpresa la proteína FPPS, se midió actividad en extractos totales de parásitos salvajes, transfectantes NEO y FPPS. La medida se llevó a cabo según el procedimiento descrito en el apartado B.II.3.3.1. de MATERIAL Y MÉTODOS, y se utilizaron parásitos en fase logarítmica de crecimiento. Los resultados se muestran en la figura D.XVII. Los niveles de actividad aumentan 13, 22, 17 y 20 veces en parásitos adaptados a 16, 32, 100 y 480 $\mu\text{g/ml}$ de G-418, con respecto a cada uno de sus controles transfectados con pX63NEO.

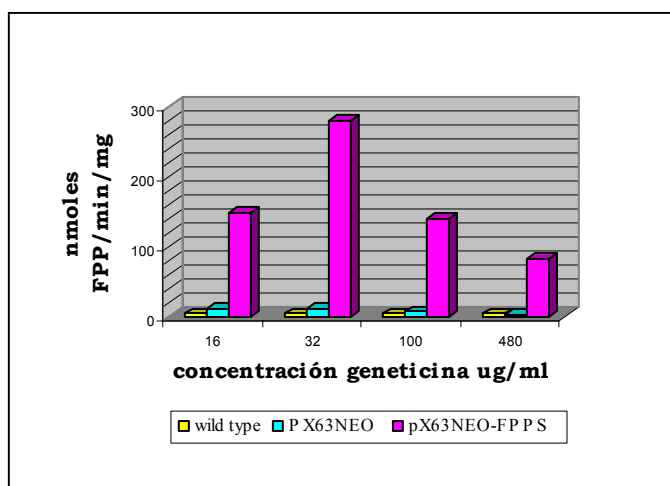


Figura D.XVII. Medidas de actividad FPPS realizadas con 1 μg de extracto total de parásitos salvajes (amarillo), transfectantes NEO (azul) y transfectantes FPPS (rosa).

D.V.3. ESTUDIO DEL FENOTIPO DEL CLON pX63NEO-FPPS1 EN PRESENCIA DE INHIBIDORES DE LA BIOSÍNTESIS DE ESTEROLES

Se analizó la existencia de un posible fenotipo de resistencia a bifosfonatos en parásitos transfectados con la construcción pX63NEO-FPPS. Para ello, se realizaron experimentos *in vitro* con promastigotes de *L. major* 252, controles NEO32 y transfectantes FPPS32, que sobreexpresan la proteína, con el fin de observar si se produce una reversión de la sensibilidad al risedronato en los parásitos que expresan mayores niveles de FPPS.

D.V.3.1. Efecto de risedronato

El risedronato es un compuesto que inhibe la proliferación celular en tripanosomátidos. Con el fin de establecer si este compuesto afecta al crecimiento mediante la inhibición específica de la FPPS, se cultivaron promastigotes de *L. major*, transfectantes FPPS32 y controles NEO32 en presencia de distintas concentraciones de risedronato (entre 0 y 10 mM), con el objetivo de analizar si la sobreexpresión de la FPPS revertía la inhibición mediada por dicho compuesto. En la figura D.XVIII. se muestran los resultados obtenidos que ponen de manifiesto que la sobreexpresión de la FPPS confiere resistencia a risedronato.

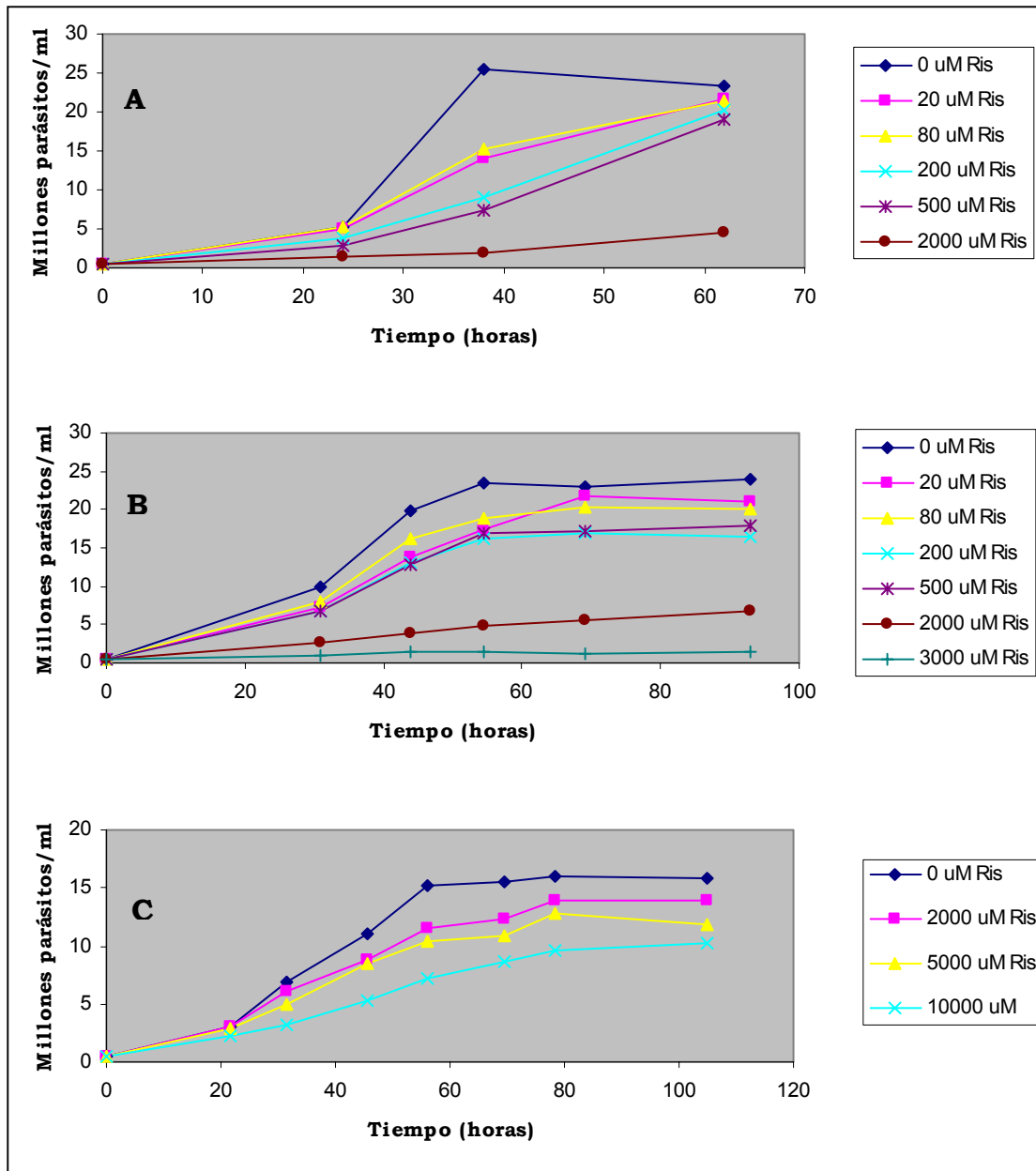


Figura D.XVIII. Representación gráfica del crecimiento de parásitos salvajes (A), transfectantes NEO-32 (B) y transfectantes FPPS-32 (C), en presencia de concentraciones crecientes de risedronato.

Utilizando los datos anteriores se ha determinado la IC50 para el risedronato que se calculó a partir del ajuste logarítmico de los valores de porcentaje de inhibición frente a concentración de compuesto. Mediante interpolación en la curva se obtiene el valor de concentración de risedronato que produce un 50 % de inhibición del crecimiento. Los valores obtenidos para los promastigotes salvajes, controles y transfectantes que sobreexpresan la FPPS se exponen en la tabla D.V. Como se puede apreciar, los transfectantes FPPS presentan un valor de IC50 25 veces mayor con respecto al su control NEO, es decir, aparece una resistencia a risedronato aproximadamente en la misma cuantía en que la proteína FPPS se sobreexpresa.

WT	NEO 32	FPPS 32
120 μM	358 μM	9120 μM

Tabla D.V. Valores de IC50 para el risedronato en parásitos salvajes (WT), transfectantes NEO adaptados a 32 μ g/ml de G-418 (NEO32) y transfectantes FPPS adaptados a 32 μ g/ml de G-418 (FPPS32).

D.V.4. MODULACIÓN DE LA FPPS DE *Leishmania* POR RISEDRONATO

Se analizó la expresión de la proteína FPPS en parásitos como respuesta al tratamiento con risedronato, tanto en la fase estacionaria como en la logarítmica, con el fin de averiguar si existe algún tipo de regulación de la expresión de la enzima en *Leishmania* mediada por este compuesto. Para ello se realizaron experimentos de *Western-blot* de extractos crudos de parásitos tratados con risedronato y de parásitos control utilizando el anticuerpo anti-FPPS (figura D.XIX.).

Para el primer ensayo en el que analizamos la expresión de FPPS en presencia de risedronato en la fase estacionaria, se prepararon cultivos de *L. major* 252 a una concentración inicial de 0.5 millones de parásitos/ml en presencia de 10 y 50 μ M de risedronato, que son concentraciones inferiores a la IC50 para el fármaco en *L. major*, y se incubaron a 28°C y 60 rpm durante 48 horas hasta alcanzar la fase estacionaria donde se hizo la primera recogida de parásitos. A continuación, se vuelven a incubar estos parásitos partiendo de la misma concentración inicial de parásitos y con las mismas concentraciones de droga hasta alcanzar una segunda fase estacionaria donde volvemos a recoger parásitos. Repetimos esto una última vez para recoger una tercera fase estacionaria. Tras centrifugar, las células fueron resuspendidas en PBS con

inhibidores de proteasas y sonicadas. El nivel de expresión de la proteína FPPS para cada muestra se analizó mediante electroforesis en geles desnaturizantes SDS-PAGE y *Western blot*. En la figura D.XIX. se observa el resultado.

Como podemos observar, no existen diferencias apreciables en la expresión de la FPPS en ninguna de las tres fases estacionarias consecutivas en que se recogieron los parásitos.

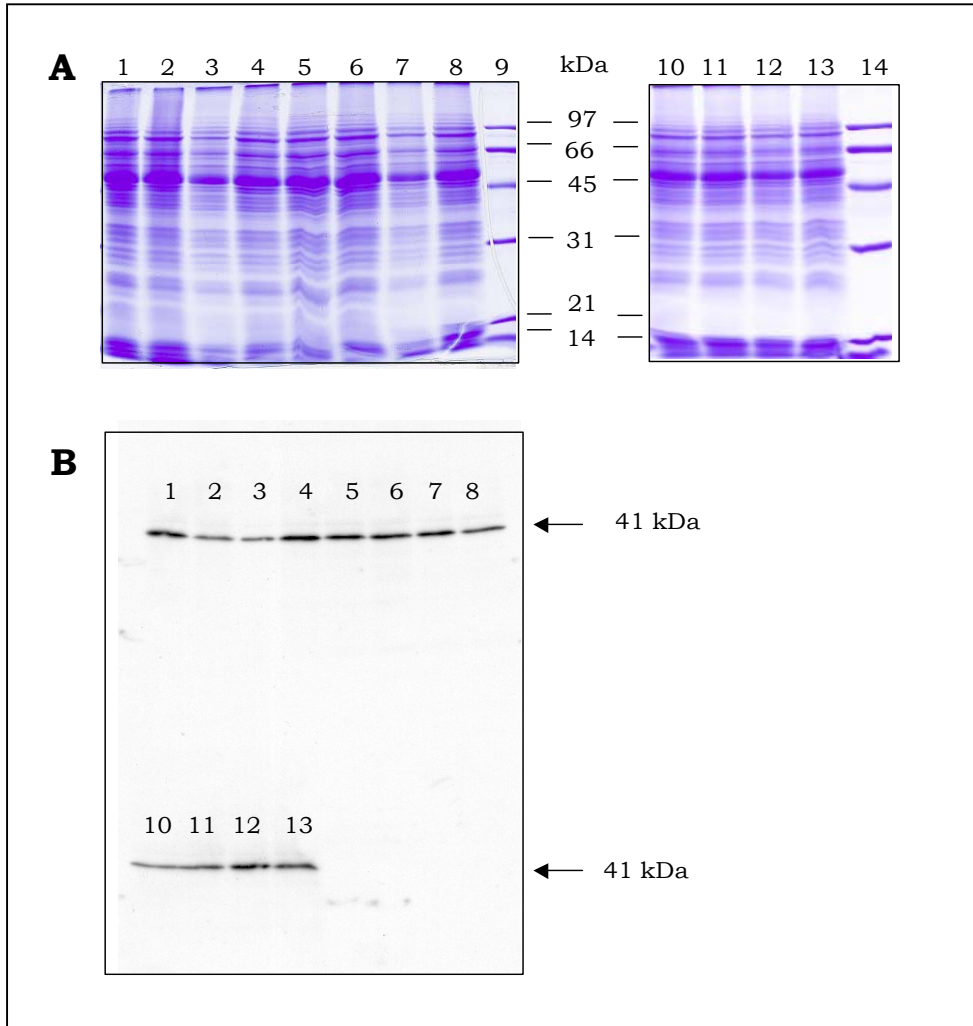


Figura D.XIX. Análisis mediante *Western-blot* de los niveles de expresión de proteína FPPS en extractos crudos de *L. major* 252 tratados con risedronato. Se cargaron 21 μ g de proteína soluble en cada pocillo y se utilizó el anticuerpo policlonal anti-FPPS. (A) Gel SDS-PAGE correspondiente a las tres fases estacionarias recogidas; (1), parásitos control incubados sin fármaco; (2), parásitos control tratados con DMSO; (3) y (4), parásitos tratados con risedronato 10 μ M y 50 μ M respectivamente. Los carriles (5), (6), (7), y (8), son equivalentes a (1), (2), (3), y (4) pero corresponden a la segunda fase estacionaria. De igual forma, los carriles (10), (11), (12) y (13), corresponden a la tercera fase estacionaria. (B) Autorradiografía obtenida tras realizar el *Western-blot*. (9) y (14), marcadores de peso molecular.

Para el segundo ensayo, analizamos la expresión de FPPS en presencia de risedronato en la fase logarítmica. Para ello, se prepararon cultivos de *L. major* 252 a una concentración inicial de 2.25 millones de parásitos/ml en presencia de 50, 100 y 150 μM de risedronato y 24 horas más tarde, cuando los parásitos salvajes están a 9 millones/ ml, las células se centrifugan, se resuspenden en PBS con inhibidores de proteasas, se sonicán y se cargan 9 μg de proteína soluble de cada extracto en cada carril.

El nivel de expresión de la proteína FPPS para cada muestra se analizó mediante electroforesis en geles desnaturizantes SDS-PAGE y *Western blot*. Como podemos observar en la figura D.XX., el nivel de expresión de la enzima FPPS aumenta en presencia de 50 y 100 μM de risedronato durante la fase logarítmica de crecimiento de dichos parásitos.

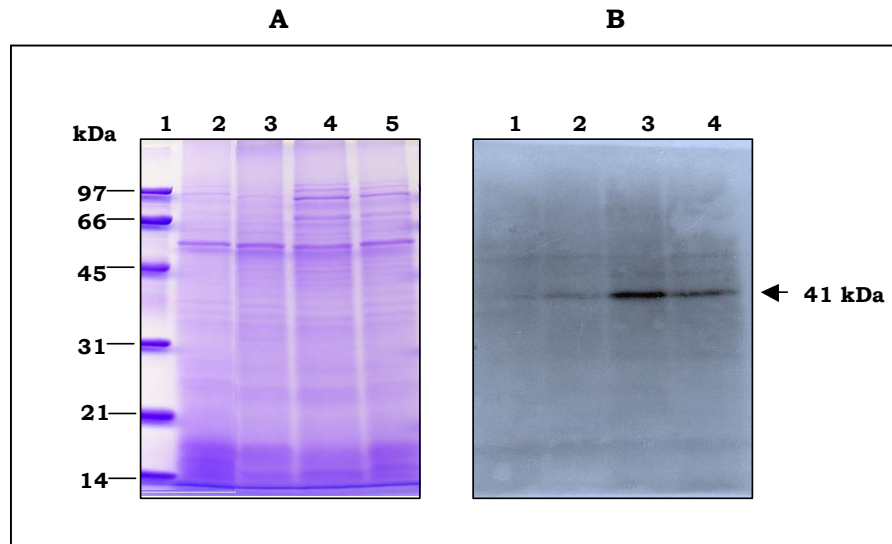


Figura D.XX. Análisis mediante *Western-blot* de los niveles de expresión de proteína FPPS en extractos crudos de *L. major* 252 tratados con risedronato. Se cargaron 9 μg de proteína soluble en cada pocillo y se utilizó el anticuerpo policlonal anti-FPPS. (A) Gel SDS-PAGE correspondiente a (1), marcadores, (2), parásitos salvajes incubados sin fármaco; (3), (4) y (5), parásitos tratados con risedronato 150, 100 y 50 μM respectivamente. (B) Autorradiografía obtenida tras realizar el *Western-blot* correspondiente a (1), parásitos salvajes incubados sin fármaco; (3), (4) y (5), parásitos tratados con risedronato 150, 100 y 50 μM respectivamente.

D.VI. LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE LA FPPS DE *L. major*

Como se ha mencionado anteriormente, mediante ensayos de Western blot y medidas de actividad se analizó el nivel de expresión de la proteína FPPS en extractos de células salvajes y transfectantes NEO y FPPS, comprobándose que la proteína se encuentra aumentada 13 y 22 veces en células FPPS16 y FPPS32, respectivamente, en relación a sus controles correspondientes NEO16 y NEO32. (Figuras D.XVI. y D.XVII.). Para determinar la localización subcelular de la proteína se realizaron experimentos de inmunocitoquímica, inmunofluorescencia indirecta y precipitación con digitonina. En el primer caso se emplearon parásitos transfectantes NEO16 y FPPS-16 embebidos en bloques de resina LR-white, y en el segundo y tercer caso, formas promastigotes de *L. major* 252 salvajes y transfectantes FPPS32.

D.VI.1. Inmunofluorescencia.

Para contribuir al establecimiento de la localización intracelular de la proteína FPPS se llevó a cabo un análisis mediante inmunofluorescencia indirecta siguiendo el protocolo descrito en el apartado B.II.5.2. y utilizando diluciones (1:1200) para parásitos salvajes y (1:20000) para parásitos transfectantes del anticuerpo policlonal purificado anti-FPPS. Como control se utilizó suero preinmune a las mismas concentraciones. El anticuerpo secundario utilizado fue anti-IgG de conejo conjugado con fluoresceína a una dilución (1:40). Los resultados se visualizaron en un microscopio de fluorescencia de Leica. En las figura D.XXI. se muestran algunas de las fotografías obtenidas.

Los resultados obtenidos sugieren una localización citosólica de la enzima, ya que la marcación aparece dispersa y homogénea a lo largo de todo el volumen celular. Los parásitos control, tratados con suero preinmune, no presentaban marcación fluorescente (resultado no mostrado).

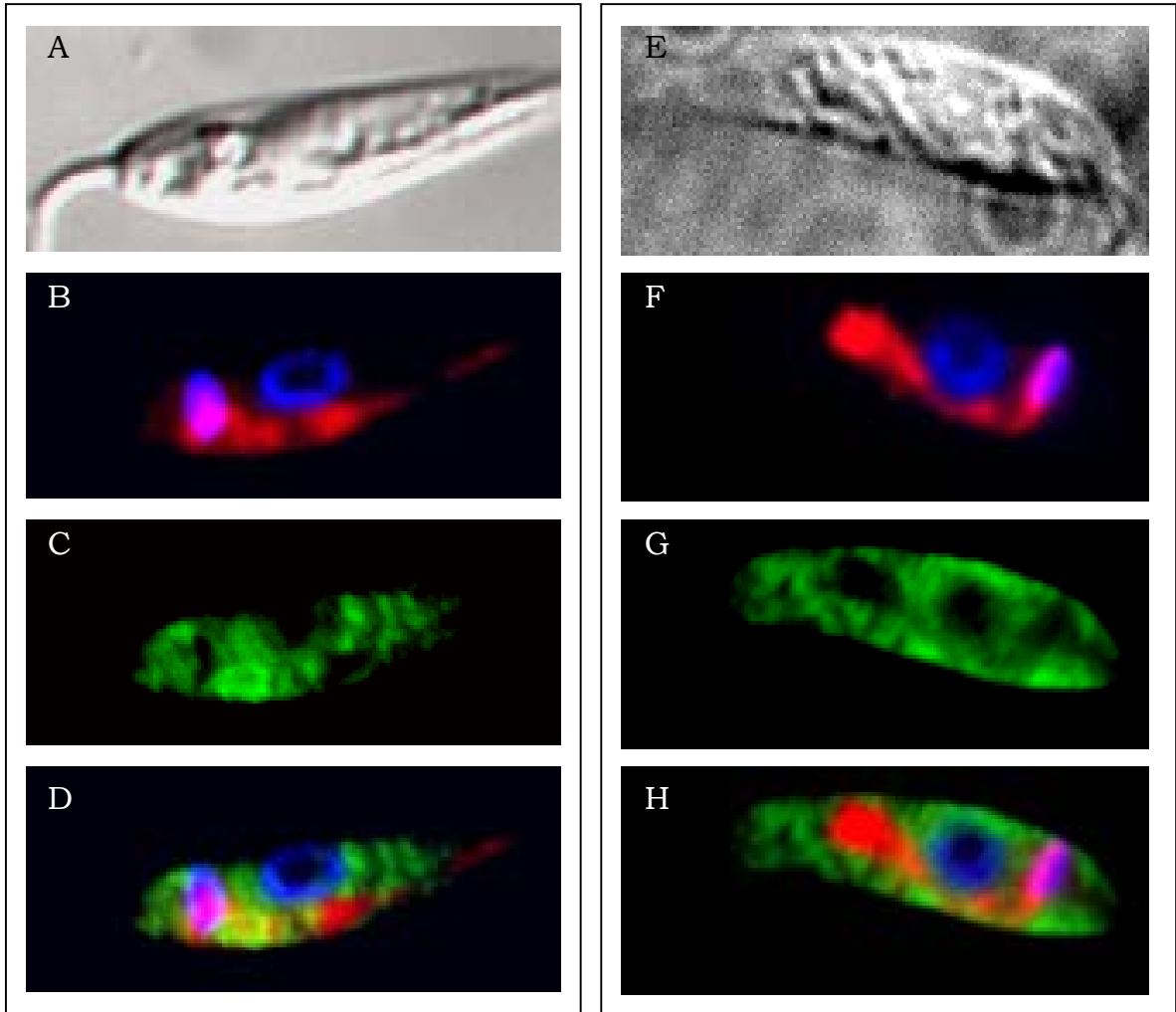


Figura D.XXI. Inmunofluorescencia de formas promastigotes de *L. major* 252 salvajes y transfectadas con pX63NEO-FPPS adaptadas a 32 µg/ml de geneticina tratadas con el anticuerpo policlonal anti-FPPS purificado. A, B, C, y D, células salvajes; E, F, G y H, células pX63NEO-FPPS adaptadas a 32µg/ml de geneticina. A y E, contraste interdiferencial; B y F, fluorescencia correspondiente a DAPI y Mitotracker, indicando la localización de ADN en el núcleo y kinetoplasto en azul y de la mitocondria en rojo, respectivamente. C y G, fluorescencia producida por la fluoresceína. D y H, superposición de fluorescencia de fluoresceína/DAPI/Mitotracker.

D.VI.2. Inmunocitoquímica y observación mediante microscopía electrónica de transmisión

El procedimiento seguido para la detección de la proteína se detalla en el apartado B.II.5.1. de MATERIAL Y MÉTODOS. Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente durante 2 h con una dilución (1:200) del anticuerpo anti-FPPS purificado para parásitos control NEO16 y con una (1:3000) para transfectantes FPPS16, que sobreexpresan la enzima FPP sintetasa trece veces con respecto al control NEO16. A continuación se trataron con diluciones (1:100) de anticuerpo secundario anti-IgG conjugado con partículas de oro de 10 nm de diámetro durante una hora a temperatura ambiente. Una vez lavados se procedió al contraste y visualización del marcaje en el microscopio electrónico ZEISS. Paralelamente, como control se trataron muestras con suero preimmune como anticuerpo primario para comprobar que no presentaban marcación inespecífica.

Los resultados obtenidos para los promastigotes de parásitos NEO16 se muestran en la figura D.XXII (D), y los de parásitos transfectados FPPS16 en las figuras D.XXII (A), (B) y (C). En ambos casos se aprecia un patrón de acumulación de partículas de oro a lo largo de todo el volumen citosólico, corroborando así los resultados de inmunofluorescencia indirecta.

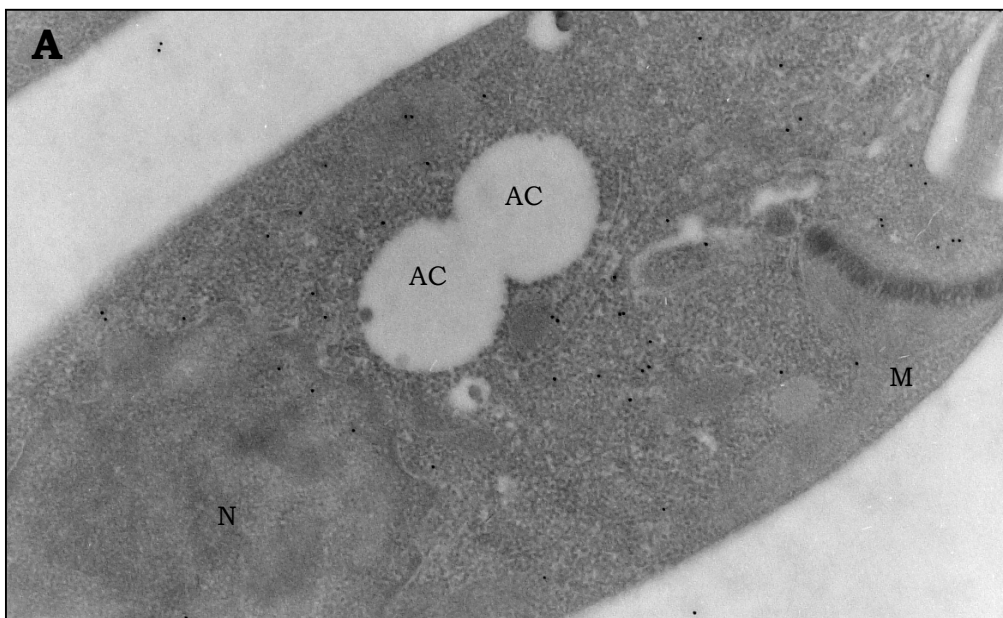
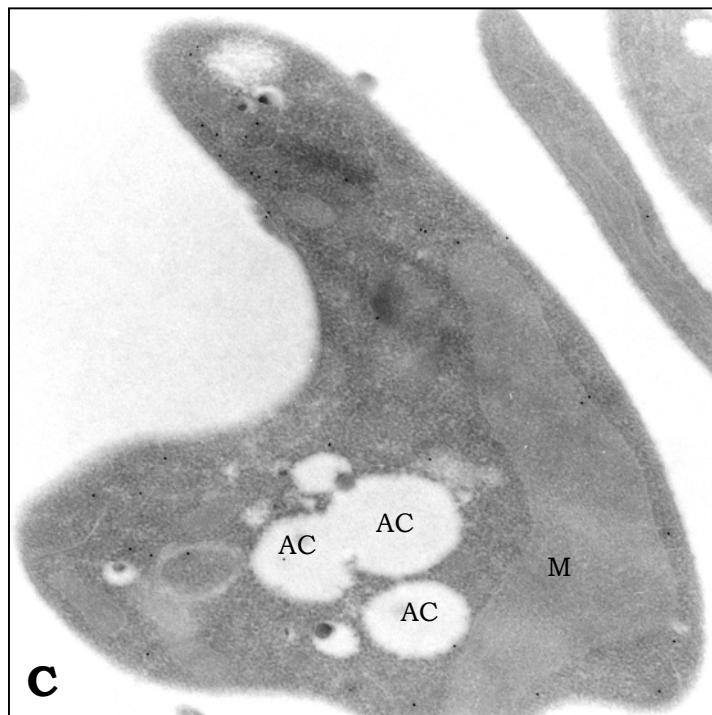
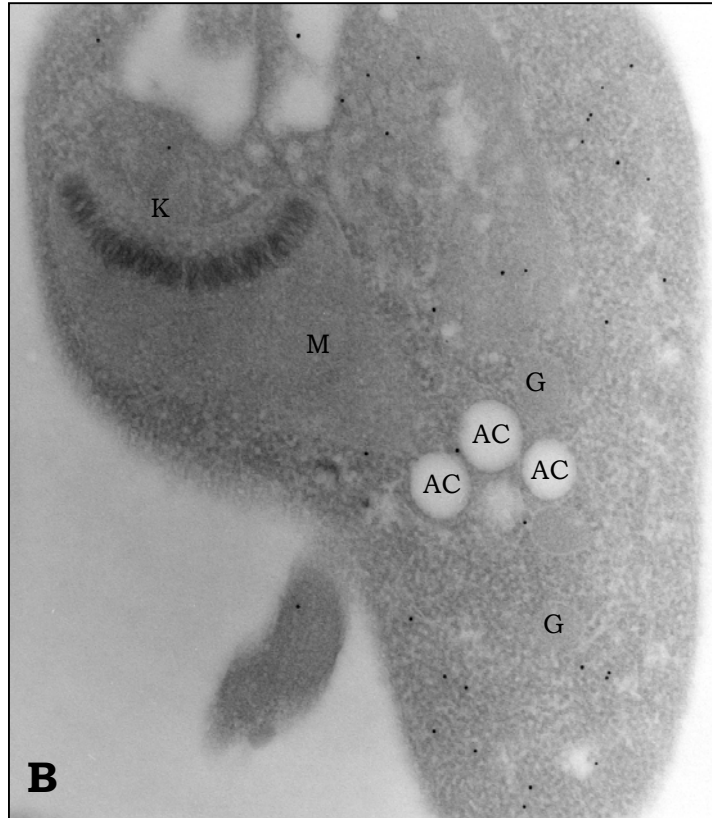


Figura D.XXII.A. Microscopía electrónica de transmisión de secciones ultrafinas correspondientes a transfectantes FPPS-16, inmunomarcadas con anticuerpo policlonal anti-FPPS, seguido de anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con partículas de oro de 10 nm. (A) x 25000. G. Glicosoma. AC. Acidocalcisoma. K. Kinetoplasto. N. Núcleo. M. Mitocondria.



Figuras D.XXII.B. y D.XXII.C. Microscopía electrónica de transmisión de secciones ultrafinas correspondientes a transfectantes FPPS-16, inmunomarcadas con anticuerpo policlonal anti-FPPS, seguido de anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con partículas de oro de 10 nm. (B) x 40000; (C) x 25000 G. Glucosoma. AC. Acidocalcisoma. K. Kinetoplasto. N. Núcleo. M. Mitochondria.

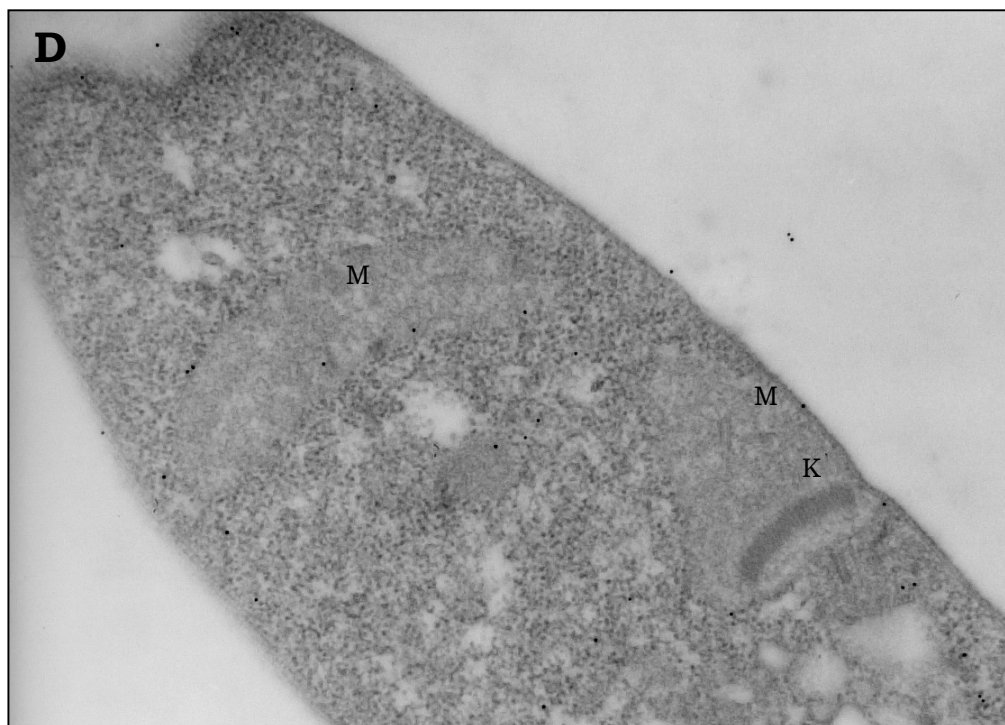


Figura D.XXII.D. Microscopía electrónica de transmisión de secciones ultrafinas correspondientes a parásitos control NEO16, inmunomarcadas con anticuerpo policlonal anti-FPPS, seguido de anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con partículas de oro de 10 nm. (D) x 25000. G. Glicosoma. AC. Acidocalcisoma. K. Kinetoplasto. N. Núcleo. M. Mitocondria.

D.VI.3. Estudios de localización de la enzima en células permeabilizadas con digitonina

La permeabilización con digitonina es una manera clásica de acceder a la localización subcelular de una enzima. El hecho de que a bajas concentraciones de detergente podamos permeabilizar la membrana plasmática, mientras que las membranas de glicosoma y mitocondria requieren una mayor cantidad del mismo, nos permite separar enzimas con diferente localización subcelular.

Para determinar la localización subcelular de LmFPPS, los parásitos fueron tratados con diferentes concentraciones de digitonina, como se indica en el apartado B.II.5.3. de MATERIAL Y MÉTODOS. Este detergente permeabiliza las membranas y las células quedan intactas. Los sobrenadantes obtenidos tras incubar los parásitos con digitonina fueron utilizados para medir la actividad de LmFPPS y enzimas marcadoras como: piruvato quinasa (PK) localizada en el citoplasma, hexoquinasa (HK) exclusiva de glicosomas y citrato sintasa (CS), enzima mitocondrial. El 100% de actividad de

cada enzima fue determinada a partir del sobrenadante de las células tratadas con 0.5% de Tritón X-100.

En las figuras D.XXIII.A. y D.XXIII.B. se representa el porcentaje de actividad enzimática total frente a la concentración de digitonina expresada en mg/ml de una suspensión de 200 millones de parásitos. Como se observa en las gráficas, tanto en parásitos salvajes como en transfectantes que sobreexpresan la proteína (FPPS32), la enzima LmFPPS presenta un perfil de actividad similar al de la piruvato quinasa, sugiriéndose así, que estamos ante una proteína citosólica.

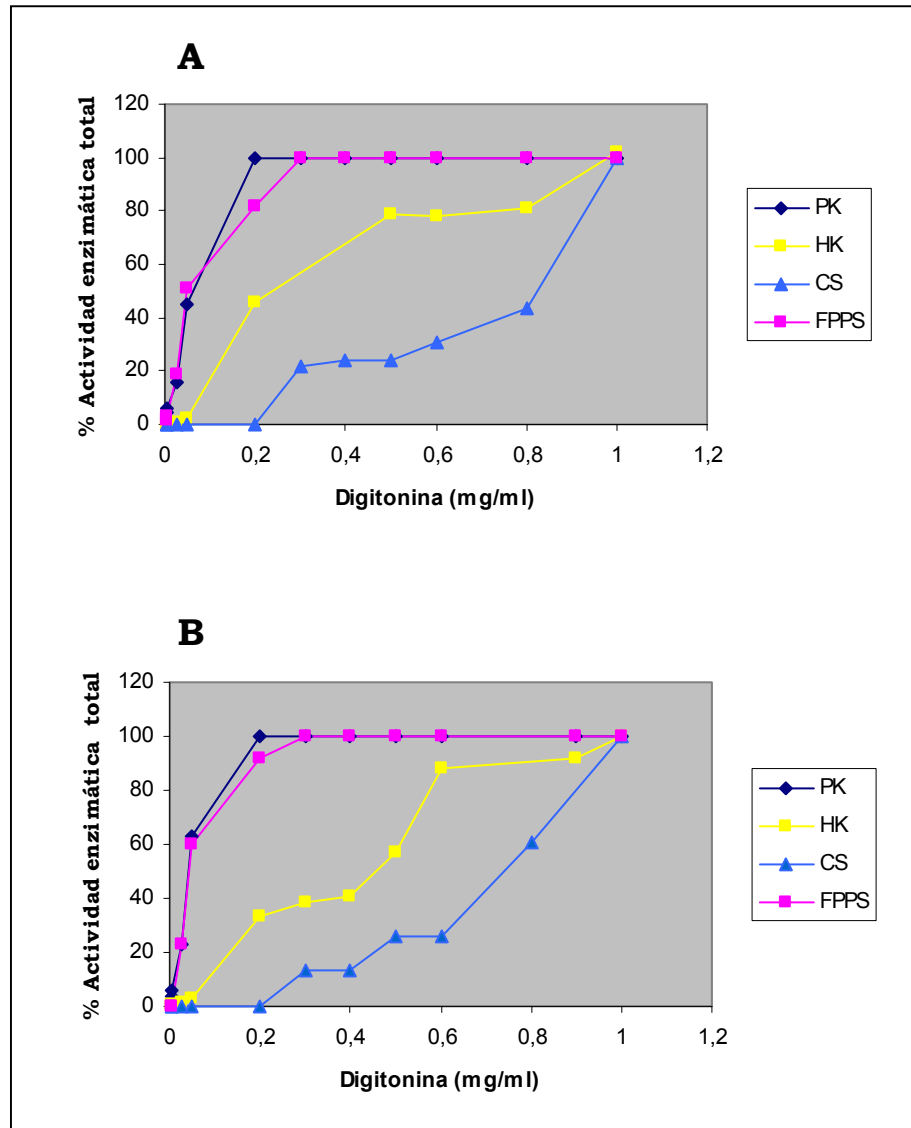


Figura D.XXIII. Actividad de la LmFPPS y de las enzimas marcadoras en sobrenadantes de promastigotes de *L.major* salvajes (A), y en transfectantes FPPS-32 (B). Las actividades PK (enzima citoplasmática), HK (enzima glicosomal), CS (enzima mitocondrial) y LmFPPS son expresadas como porcentajes frente a las diferentes concentraciones de digitonina. El 100% de cada actividad enzimática fue determinada a partir del sobrenadante de las células tratadas con 0.5% de Tritón X-100

D.VII. CARACTERIZACIÓN DE UNA LINEA CLONADA DE *L.major* 252 RESISTENTE A RISEDRONATO.

D.VII.1. Inducción del proceso de resistencia.

Promastigotes de la cepa *L.major* 252 resistentes a risedronato se obtuvieron “in vitro”, tal y como se describe en el apartado X de MATERIAL Y MÉTODOS, sometiéndolos a concentraciones crecientes del fármaco hasta alcanzar una resistencia a 1200 μ M de risedronato. Esta línea de parásitos resistente a 1200 μ M fue sometida a diferentes ensayos con el fin de estudiar su mecanismo de resistencia.

D.VII.2. Caracterización del mecanismo de resistencia.

Dado que los experimentos llevados a cabo durante el desarrollo de este trabajo habían puesto de manifiesto que la enzima LmFPPS es blanco principal de acción de este fármaco en promastigotes de *L.major*, quisimos analizar en primer lugar si el gen que transcribe dicha proteína en la línea resistente presentaba alguna mutación. El resultado de la secuenciación del gen *LmFPPS* de la cepa resistente, amplificado previamente por PCR y clonado en el vector pGEMT, demostró que dicho gen no presentaba ninguna mutación con respecto al gen *LmFPPS* de la cepa salvaje.

En segundo lugar, se analizó la expresión de la proteína LmFPPS en esta línea resistente mediante ensayo de western blot y utilizando el anticuerpo policlonal anti-FPPS. (Figura D.XXIV.)

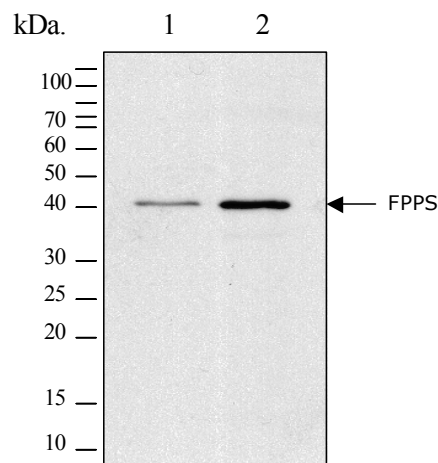


Figura D.XXIV. Análisis mediante western-blot de los niveles de expresión de proteína FPPS. Se cargó un millón de parásitos por carril en cada pocillo y se utilizó el anticuerpo policlonal anti-FPPS. (1) extracto crudo de *L.major* 252; (2) extracto crudo de parásitos resistentes a 1200 μ M de risedronato.

Una densitometría del *Western blot* resultante reveló que los niveles de proteína LmFPPS aumentaban aproximadamente 3,4 veces en los parásitos resistentes a 1200 μM con respecto a los salvajes.

Con el fin de poner de manifiesto si este aumento en los niveles de proteína LmFPPS en células resistentes correspondía a un aumento en los niveles de RNA mensajero del gen *LmFPPS*, se realizó un *Northern blot* con RNA total de parásitos salvajes y resistentes a risedronato. Después de transferir el gel a un filtro de nylon y de hibridar con una sonda del gen completo de la LmFPPS, pudimos observar un aumento de 2,6 veces en los niveles de RNA mensajero de células resistentes con respecto a las salvajes, corroborando así el resultado obtenido mediante *Western-blot*.

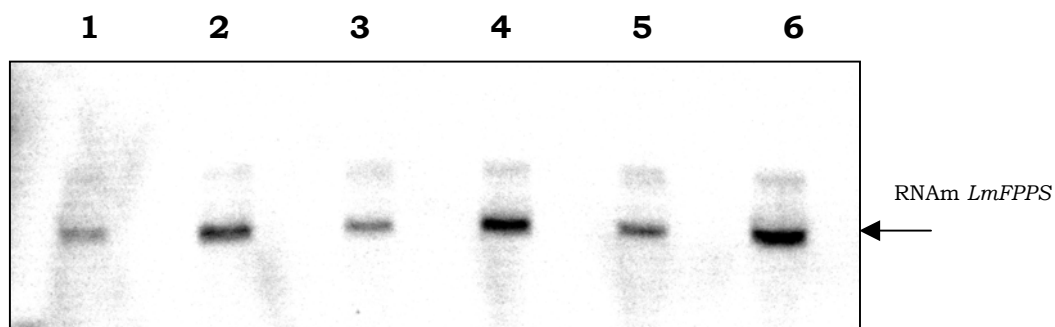


Figura D.XXV. Análisis mediante *Northern-blot* de los niveles de mRNA de la LmFPPS en parásitos salvajes y parásitos resistentes a 1200 μM de risedronato. Los carriles (1), (3) y (5) corresponden a 2.5, 5 y 10 μg de RNA de células salvajes; los carriles (2), (4) y (6) corresponden a 2.5, 5 y 10 μg de RNA de células resistentes a risedronato, respectivamente.

Como en el laboratorio se disponía de otros anticuerpos frente a distintas enzimas de la ruta del mevalonato así como de sus genes correspondientes, se pudo hacer un estudio de la expresión de otras proteínas de la ruta en parásitos resistentes a risedronato, así como un análisis de sus niveles correspondientes de RNA mensajero, con el fin de analizar si existía alguna alteración en ellas como consecuencia de la sobreexpresión de la LmFPPS. Se analizó el nivel de expresión de las enzimas HMGCoA reductasa, escualeno sintetasa y 24-metiltransferasa. Tan sólo se vio alterada la expresión de la escualeno sintetasa, lo que podría corroborar su papel de proteína reguladora en la ruta de síntesis de esteroides en parásitos. (Figura D.XXVI.).

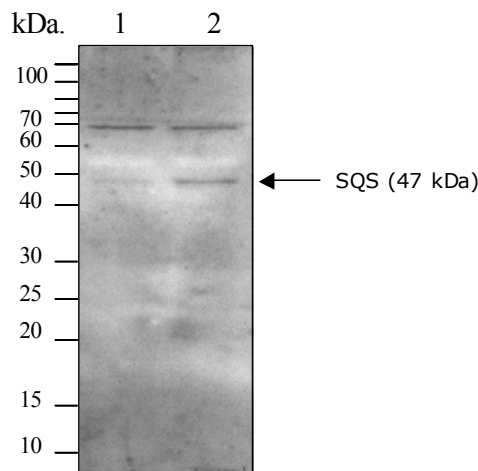


Figura D.XXVI. Análisis mediante western-blot de los niveles de expresión de proteína SQS. Se cargó un millón de parásitos por carril en cada pocillo y se utilizó un anticuerpo policlonal anti-SQS. (1) extracto crudo de *L.major* 252; (2) extracto crudo de parásitos resistentes a 1200 μ M de risedronato.

Como podemos observar en la figura anterior, el nivel de expresión de la proteína escualeno sintetasa aumenta al doble en parásitos resistentes a risedronato en relación a la expresión de dicha enzima en parásitos salvajes. Este resultado se corroboró mediante *Northern blot*, donde se puede apreciar un aumento de dos veces en la cantidad de mRNA de parásitos resistentes respecto a los salvajes (Figura D.XXVII.).

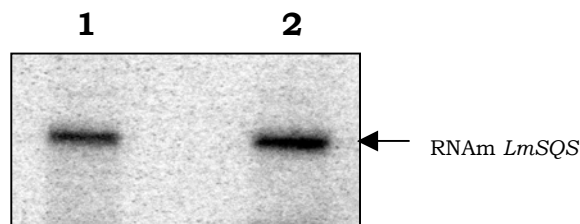


Figura D.XXVII. Análisis mediante *Northern-blot* de los niveles de mRNA de la LmSQS en parásitos salvajes y parásitos resistentes a 1200 μ M de risedronato. Se hibrida con sonda del gen completo de la SQS. (1) 10 μ g RNA de células salvajes. (2) 10 μ g RNA de células resistentes a 1200 μ M de risedronato.

E. DISCUSIÓN

E.I. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN DE LA FARNESIL DIFOSFATO SINTETASA DE *Leishmania major* 252

Los clones positivos de la genoteca de cDNA de *L. major* se obtuvieron mediante tres *screenings* sucesivos, utilizando una sonda homóloga generada por PCR, correspondiente a una zona altamente conservada de la FPPS.

Uno de los dos fagos positivos obtenidos fue secuenciado; se denominó FPPS-1, y presentó un tamaño de aproximadamente 2 kb y una pauta abierta de lectura de 1086 pb, la cual está de acuerdo con el uso de codones en el género *Leishmania* (Langford y col., 1992). El cDNA presentaba la secuencia *spliced leader* característica de estos protozoos parásitos en el extremo 5', a 189 pb corriente arriba de la primera metionina (figura D.II.), por lo que fue fácil determinar cuál era el primer codón de iniciación de la secuencia codificante de la FPPS de *L. major*. Tras varios intentos utilizando diferentes oligonucleótidos de la secuencia que ya conocíamos, no logramos secuenciar la cola de poliadenilación en la zona 3' no codificante, quizás debido a un alto contenido en pares GC que dificultaba la desnaturalización de las hebras. La pauta abierta de lectura de 1086 pb codifica una proteína de 362 aminoácidos y presenta una masa molecular teórica de 40.9 kDa. En la figura E.II. se observa un alineamiento entre FPPSs de distintos organismos y la secuencia deducida de *L. major*, donde podemos observar las siete regiones altamente conservadas en preniltransferasas.

E.I.1. Organización genómica del gen *LmFPPS*

Los experimentos de hibridación del DNA genómico total del parásito digerido con distintas endonucleasas de restricción pusieron de manifiesto la existencia de una sola copia del gen *FPPS* en el genoma de *L. major*, mientras que estudios de electroforesis en campo pulsado indicaron que está localizado en un cromosoma de un tamaño de aproximadamente 0.68 kb, que de acuerdo con la reciente clasificación de los cromosomas de *Leishmania* (www.LeishDB.org), corresponde al cromosoma 16. *Leishmania* se considera un organismo diploide y, por tanto, también para el gen *FPPS*. Sin embargo, debido a que se han descrito casos de aneuploidía para determinados genes (Scholler y col., 1986; Galindo y col., 1989) y a que los cromosomas homólogos suelen comigrar, es difícil confirmar si este gen es diploide.

E.I.2. Análisis de la secuencia primaria de la proteína FPPS de *L. major*

La pauta abierta de lectura del gen *FPPS* codifica para una proteína de 362 aminoácidos, con una masa molecular teórica de 40.9 kDa y un punto isoelectrico de 5.51. La secuencia primaria de la proteína se encuentra muy conservada con respecto a las FPPSs descritas en otros organismos. Presenta una identidad del 36-45% y una similitud del 46-53% con otras FPPSs representativas como las de mamíferos, plantas y hongos. Las FPPSs forman un grupo de proteínas con una serie de regiones altamente conservadas. En general, podemos decir que estas siete regiones conservadas no sólo están presentes en las FPPSs sino también en otras preniltransferasas como geranylgeranyl pirofosfato sintetasas y hexaprenil pirofosfato sintetasas, que de igual modo, su misión es incorporar restos de isopreno, IPP, a la cadena nascente. De estos motivos consenso cabe destacar dos regiones o dominios ricos en aspártico, la región II o dominio I (DDxxDxxxxRRG), que está involucrada en unión al sustrato alílico: DMAPP, GPP y FPP; y la región VI o dominio II (GxxFQxxDDxxD), que está involucrada en unión al sustrato homoalílico: IPP (Tarshis, 1996). Los enlaces enzima-sustrato están sujetos a la formación de puentes de magnesio entre los grupos carboxilo de los residuos de aspártico y los grupos difosfato de los sustratos. Como mencionamos en la introducción, numerosos estudios de mutagénesis han sido realizados en FPPSs de diferentes organismos para resaltar la importancia de estos residuos conservados en el mecanismo catalítico. Una característica interesante de esta enzima cuando comparamos las secuencias de ave y humano con la de *Leishmania major*, es el cambio en *Leishmania* de un residuo de Phe por una His en posición 93. Un análisis de la estructura de la enzima de ave mediante rayos-X, puso de manifiesto que los dos residuos de Phe situados en las posiciones cuarta y quinta anteriores al primer residuo de aspártico del dominio I están involucrados en la determinación de la longitud de la cadena del producto final de la reacción, ya que los anillos aromáticos de estos residuos estarían interaccionando con la cadena lateral de la molécula de FPP, impidiendo que ésta siga creciendo (Tarshis, 1996). Por el contrario, geranylgeranyl pirofosfatasa y otras preniltransferasas que sintetizan productos de mayor longitud presentan aminoácidos más pequeños en esta posición, permitiendo así que la cadena lateral del producto final se elongue. Por tanto, podríamos suponer que en este caso, el residuo de histidina se está comportando como uno de fenilalanina debido a su gran tamaño, como se supone que ocurre en las FPPSs de *T. cruzi* (Montalvetti y col., 2001) y *T. brucei* (Montalvetti y col., 2003).

Una de las grandes diferencias que apreciamos entre las FPPSs de mamíferos, plantas y hongos con respecto a las de tripanosomátidos, es la aparición en éstas de una inserción de 11 aminoácidos entre las regiones conservadas IV y V, que podría

explicar las diferencias encontradas en los valores de inhibición de aminobisfosfonatos frente a las enzimas de *T. cruzi* y *L. major*, con respecto a la humana. Uno de los experimentos futuros para concluir este trabajo es el de analizar la importancia de esta inserción de once residuos en el mecanismo catalítico de la enzima mediante estudios de mutagénesis dirigida.

E.II. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE FPPS DE *L. major* EN EL SISTEMA HETERÓLOGO *E. coli*

E.II.1. Construcción del sistema de expresión

Para la construcción del sistema de expresión de la FPPS de *L. major*, se escogió el vector pET-11c (Novagen), que permite la producción de elevadas cantidades de proteína soluble. Tras la construcción del plásmido de expresión pET-11c-LmFPPS, se llevó a cabo la transformación de bacterias *E. coli* BL21 (DE3) y se indujo la expresión de la proteína LmFPPS en presencia de 1mM de IPTG a 37°C. Esta inducción se llevó a cabo durante diferentes tiempos, 2, 4, 6 y 8 horas. Mediante un gel de SDS-PAGE pudimos visualizar que la proteína, con un tamaño de 41 kDa, se expresaba como proteína soluble, obteniéndose a las 4 horas de inducción la mayor cantidad de proteína LmFPPS expresada. Como podemos observar en la figura D.VI. de RESULTADOS, en la columna 2, la proteína LmFPPS también se expresa en esta cepa de *E.coli* de forma constitutiva, en ausencia de IPTG.

E.III. PURIFICACION Y CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA FPPS DE *L. major*

E.III.1. Purificación de la proteína recombinante LmFPPS

La purificación de la FPPS de *L. major* se llevó a cabo con extractos solubles de bacterias *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pET11c-LmFPPS, que sobreexpresan la proteína recombinante LmFPPS. Tras un período de inducción de 4 horas con IPTG a 37°C, se obtuvo una elevada cantidad de proteína recombinante en extracto soluble. La expresión fue analizada mediante SDS-PAGE.

Tras un primer paso de purificación mediante precipitación con sulfato amónico, pudimos determinar que en presencia de un 40% de saturación de esta sal, conseguíamos precipitar una elevada proporción de la LmFPPS. Siendo esta etapa un

proceso de precipitación no desnaturalizante, a continuación se resuspendió este pellet en tampón A (B.I.3. MATERIAL Y METODOS) hasta obtener una concentración de 1mg/ml para cargar en un columna de hidroxiapatito. Tras estos pasos conseguimos purificar la enzima en un 90% aproximadamente e hicimos una medida de actividad de la misma en cada uno de los pasos de purificación para determinar el grado de pureza alcanzado.

E.III.2. Determinación cuantitativa de la actividad LmFPPS

Para la determinación de la actividad específica de la proteína purificada, en primer lugar se ensayó un intervalo de concentración de la misma: 10, 20, 50, 100 y 200 ng para analizar la linealidad de la reacción a las concentraciones de sustrato utilizadas (100 μ M de GPP y 50 μ M de IPP). Tras analizar la curva obtenida determinamos que con 10 ng de proteína purificada la reacción se ajusta a una ecuación lineal, lo que supone un aumento de la velocidad proporcional a la concentración de proteína utilizada. Esta cantidad de proteína recombinante purificada es la que utilizamos además en cada uno de los ensayos de inhibición con bisfosfonatos.

La actividad específica obtenida para la enzima LmFPPS recombinante purificada es de 1757 nmol min⁻¹mg⁻¹.

E.III.3. Determinación de la masa molecular de la proteína nativa

La masa molecular correspondiente a la LmFPPS de *Leishmania major*, deducida a partir de su secuencia de aminoácidos es de 40967 Da. Para la determinación de su masa molecular aparente se utilizó una columna de exclusión molecular Superdex 200, y se obtuvo un valor de 86920 Da. Este valor se corresponde con el perfil esperado para este enzima, sugiriendo que se trata de un dímero, ya que todas las FPPSs descritas hasta el momento son homodímeros de peso molecular comprendido entre 64 y 88 kDa (Koyama y col., 2000).

Con el objetivo de determinar la importancia de cada subunidad dentro del homodímero, Koyama y colaboradores analizaron si cada una de ellas tenía un centro activo independiente o si bien, los sitios activos estaban creados por interacción entre las dos subunidades. Para ello, se llevó a cabo la construcción de monómeros mutados dentro del dímero de la FPPS de *Bacillus stearothermophilus* así como las medidas de actividad global correspondientes. Los resultados del estudio sugirieron que las subunidades de la FPPS interactúan mutuamente para formar un sitio activo

compartido en el homodímero, aunque cada una libere una molécula de FPP independientemente.

E.IV. ESTUDIOS DE INHIBICIÓN *IN VITRO* DE LA LmFPPS

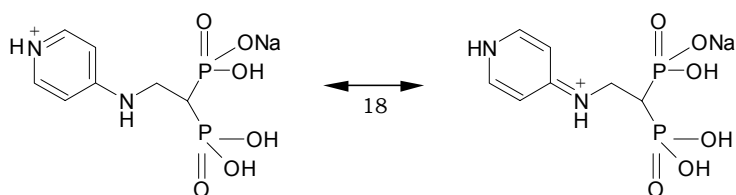
Los bisfosfonatos son fármacos que generan una contribución multimillonaria al mercado farmacéutico global, desde que son usados ampliamente en el tratamiento de varias enfermedades óseas como osteoporosis y enfermedad de Paget (Rodan y col., 2000). Además, estos compuestos tienen actividad como herbicidas (Cromartie y col., 1998), como anticancerígenos (Tassone y col., 2003; Caraglia y col., 2004; Oades y col., 2003; Luckman y col., 1998; Senaratne y col., 2002; Denoyelle y col., 2003) y como antiparasitarios (Martin y col. 2001; Docampo y col., 2001). Hasta muy recientemente, el modo de acción de los bisfosfonatos era desconocido, pero en recientes trabajos se vislumbró que el blanco de acción estaba en la ruta de síntesis del mevalonato hasta finalmente descubrir que se trataba de la enzima farnesil pirofosfato sintetasa. En los primeros trabajos de la literatura acerca de este estudio encontramos que Cromartie y colaboradores demostraron la potente capacidad herbicida de estos compuestos debido a la inhibición de la FPPS de *daffodils* (narciso) (Cromartie y col., 1999). En el 2000, Grove y col. demuestran que estos fármacos actúan como inhibidores del crecimiento de eucariotas primitivos como *Dictyostelium discoideum* mediante la inhibición de la FPPS. Paralelamente, muchos grupos han demostrado que el blanco de acción de los aminobisfosfonatos en osteoclastos es la FPPS (Van Beek y col., 1999; Keller y col., 1999; Bergstrom y col., 2000; Dunford y col., 2001), derivándose de ello un decrecimiento de la isoprenilación de proteínas de estas células que conduce a la apoptosis (Benford y col., 1999). En cuanto a la actividad sobre osteoclastos, Dundford y col. encontraron una clara correlación entre la capacidad de estos compuestos para inhibir a la FPPS *in vitro*, la capacidad de inhibir prenilación de proteínas en osteoclastos cultivados *in vitro* y la capacidad antiresorptiva *in vivo*. Este hallazgo demostró una vez más la importancia de esta enzima en la ruta biosintética de esteroides, ya que supone un eslabón clave para la isoprenilación de proteínas en la células, y más aún en el campo de la parasitología, desde que sabemos que la isoprenilación de proteínas ocurre y es esencial en tripanosomátidos (Yokohama y col., 1998). Posteriormente, se encontró que estos compuestos eran capaces de inhibir el crecimiento de tripanosomátidos como *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. donovani* (Martin y col., 2001), despertando así un gran interés en su investigación como futuros fármacos antiprotozoarios. Paralelamente, Martin y col., investigaron el efecto de risedronato sobre la biosíntesis de esteroides en *T. cruzi* (Martin y col., 2001), en conjunción con ketoconazol (inhibidor de la enzima 14 α -desmetilasa). Cuando ambas drogas se usaron en combinación, se apreció una disminución en la cantidad de esteroides 14- α -

desmetilados, mientras que no se detectó acumulo de escualeno; esto sugirió que quizás estos compuestos estarían actuando a un nivel pre-escualeno, consistente con la idea de que la FPPS pudiera ser el blanco de acción principal en el parásito, en concordancia con lo que previamente se había descubierto en osteoclastos, plantas y amebas (Dunford y col., 2001). Por último, Montalvetti demostró que estos aminobisfosfonatos eran capaces de inhibir a las FPPSs recombinantes de *T. cruzi* y de *T. brucei*. En resumen, todos estos resultados previos nos indujeron a pensar que la enzima FPPS pudiera ser el blanco de acción de estos compuestos en parásitos.

Con los ensayos realizados durante este trabajo, hemos demostrado la inhibición *in vitro* de la LmFPPS por distintos bisfosfonatos. En ensayos de actividad enzimática con la enzima recombinante purificada a homogeneidad, se ha puesto de manifiesto una inhibición mediada por estos compuestos. Los inhibidores ensayados mimetizan al intermediario de GPP en estado de carbocación generado en el transcurso del mecanismo catalítico, lo que puede sugerir una mayor afinidad en la unión a la enzima que al sustrato natural. En el caso del risedronato, su alta actividad como inhibidor de la enzima FPPS es atribuible a la mínima desviación que esta molécula presenta con respecto al carbocación GPP⁺, gracias a la presencia del grupo difosfato y a una distancia óptima entre el átomo de nitrógeno (átomo susceptible de protonación, que generara una carga positiva) y dicho grupo difosfato (Martin y col., 1999).

En cuanto al análisis de los resultados de la primera colección de 62 bisfosfonatos analizados y basándonos en la relación estructura-actividad, podemos extraer una serie de conclusiones:

- i) La mayoría de los compuestos más activos (1, 2, 3, 5, 6, 7, 8) contienen un átomo de nitrógeno, así como un anillo aromático. Se ha sugerido que la aparición del N dentro del anillo presumiblemente ayudaría a la deslocalización de la carga positiva y la consecuente estabilización del carbocación; aunque esta deslocalización no sería esencial, ya que compuestos como 4, 9, 11 y 16 son muy activos y no la presentan.
- ii) El segundo grupo de compuestos (30-50) son menos activos y tienen valores de IC₅₀ aproximadamente entre 1-10 μ M. Ocho de estos compuestos (39, 43, 47, 48, 49 y 50) pierden la carga positiva (nitrógeno), mientras que cinco de ellos (29, 33, 44, 45 y 46) tienen la carga positiva demasiado distante del grupo difosfato como para mimetizar al carbocación intermediario de GPP.
- iii) La alta actividad de compuestos como 2, 5, 7 y 18, se atribuye a la gran deslocalización de la carga positiva que se genera, gracias a la existencia de dos átomos de nitrógeno.



- iv) La presencia de un grupo polar en posición “para” del anillo aromático del compuesto 61 supone un descenso en la actividad anti-LmFPPS. Este resultado concuerda con el resultado obtenido frente a la FPPS de plantas (Suzuki, 1978).
- v) El origen de la baja actividad del compuesto 32 (frente a los compuestos 2 y 8), así como la del compuesto 34 (frente al compuesto 12) sugiere la presencia de un efecto estérico que podría estar operando en ambos compuestos.
- vi) El compuesto 19 presenta un valor de IC₅₀ esperado, puesto que la presencia de grupos metilo en las posiciones 3' y 4' del anillo no disminuyen la actividad anti-LmFPPS.
- vii) En cuanto a los últimos compuestos ensayados (54-62) con valores de IC₅₀ entre 11 y 76 μM, podemos destacar la ausencia de carga positiva en 56 y 58, la ausencia de anillo o carbono aromático en 57 y 58, así como la presencia de una carga positiva demasiado distante del grupo difosfato en el 61.

A modo de resumen podemos generalizar diciendo que los bisfosfonatos que presentan una mayor actividad anti-FPPs, presentan un átomo de nitrógeno a una distancia determinada del grupo difosfato que permita una buena mimetización de la molécula de GPP, así como un anillo aromático que permitan la deslocalización y la consecuente estabilización de la carga positiva.

Posteriormente se ensayó una segunda colección de 14 compuestos denominados 1-piridinio bisfosfonatos, que al igual que el compuesto 1 de la primera colección (IC₅₀ 0.11 μM), presentan un átomo de nitrógeno con 8 electrones en su capa de valencia, estando además este átomo englobado en un anillo aromático. Esta colección se diseñó con el objetivo de mejorar la actividad anti-FPPS, ya que presentaban una mayor carga positiva con respecto a los inhibidores de la primera colección. En general, con estas estructuras de 1-piridinio bisfosfonatos se obtuvieron resultados muy alentadores, ya que se consiguió el valor de IC₅₀ más bajo de inhibición de la LmFPPS encontrado hasta el momento (compuesto 65, IC₅₀ 0.09 μM). Esto nos hace pensar que quizás el tamaño de esta molécula sea óptimo para mimetizar al sustrato GPP, por lo que consideraremos a este compuesto un nuevo e importante cabeza de serie para continuar estos estudios. Recientemente, se ha puesto

de manifiesto la alta correlación que existe entre el efecto inhibitorio de estos bisfosfonatos frente a la enzima FPPS y su capacidad para estimular células $\gamma\delta$ T del sistema inmune en humanos (Sanders y col., 2005), lo que los hace un atractivo grupo de compuestos para el desarrollo de fármacos tanto antiprotozoarios como inmunoterápicos.

Dentro de la iniciativa multidisciplinar que ha supuesto el desarrollo de estos inhibidores se ha analizado también, como decíamos anteriormente, el efecto que ejercen sobre la capacidad antripliferativa de tripanosomátidos. En la tabla E.I., se muestran los resultados obtenidos de algunos bisfosfonatos con respecto a la inhibición del crecimiento de tripanosomátidos como *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. donovani* (Martín, 2001), así como los datos de inhibición obtenidos frente a las enzimas recombinantes de *L. major*, *T. cruzi* y humana (Sanders y col., 2003; Montalvetti y col., 2001; Montalvetti y col., 2003; Dunford y col., 2001) a efectos comparativos.

	Ki (μM) FPPS de <i>L. major</i>	Ki (μM) FPPS de <i>T. cruzi</i>	Ki (μM) FPPS humana	IC50 (μM) <i>L. donovani</i> amastigotes	IC50 (μM) <i>T. cruzi</i> amastigotes	IC50 (μM) <i>T. brucei</i> tripomastigotes
Alendronato	0.02	1.04	0.0005	82.5	147	>200
Risedronato	0.01	0.032	0.0001	2.3	123	8.6

Tabla E.I. Valores de IC50 de alendronato y risedronato ensayados frente a las proteínas FPPS recombinantes de *L. major*, *T. cruzi*, y humana y frente a amastigotes de *T. cruzi* y *L. donovani* cultivados intracelularmente y tripomastigotes de *T. brucei* (Sanders y col., 2003; Montalvetti y col., 2001; Dundford y col., 2001; Martín y col., 2001).120

En cuanto a la diferencia que podemos apreciar entre los valores de inhibición *in vitro* de las respectivas enzimas recombinantes que presentan estos inhibidores con respecto a los valores de inhibición *in vitro* sobre la proliferación de parásitos, podríamos sugerir que podría ser debido a la dificultad que estos compuestos tan hidrofílicos encuentran al atravesar la membrana plasmática del parásito. También es importante destacar que los valores de IC50 de las enzimas de *T. cruzi* y *L. major* son parecidas entre sí, pero difieren del valor obtenido frente a la enzima humana; esto nos podría sugerir que estos inhibidores se acoplan mejor al centro activo de la FPPS humana, y quizás sea debido a que carece de la inserción de 11 aminoácidos que presentan los centros activos de las enzimas de *T. cruzi* y *L. major*.

E.V. FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LA FPPS DE *L. major*

Para establecer la importancia de la proteína FPPS en la ruta de biosíntesis de esteroides en el parásito y determinar su localización subcelular se obtuvieron mutantes de *L. major* que presentaban niveles aumentados de FPPS. Para ello, se transfectaron promastigotes de *Leishmania* con el plásmido pX63NEO-LmFPPS, que contenía la secuencia codificante correspondiente a la proteína LmFPPS. Posteriormente, se verificó que los parásitos portaban el plásmido mediante CHEF electroforesis en condiciones que separaban el DNA extracromosómico del cromosómico.

E.V.1. ANÁLISIS DE LA SOBREENPRESIÓN DE LA FPPS EN PROMASTIGOTES DE *L. major*

Una vez obtenidos los transfectantes, se adaptaron a concentraciones crecientes de G-418 con el fin de aumentar el número de copias de plásmido en el parásito, y en consecuencia, expresar mayores niveles intracelulares de FPPS. Las concentraciones utilizadas fueron 16, 32, 100 y 480 µg/ml. A continuación se analizó mediante *Western blot* el nivel de sobreexpresión de la proteína en los parásitos, que en efecto mostraba un aumento en la expresión de la proteína en los parásitos transfectados con la construcción pX63NEO-FPPS. Posteriormente se determinó la actividad enzimática de extractos totales de parásitos adaptados a 16, 32, 100 y 480 µg/ml de G-418, junto a un control de promastigotes salvajes y otro de parásitos transfectados con pX63NEO. Los resultados obtenidos confirmaron que la sobreexpresión era aproximadamente 13, 22, 18 y 19 veces mayor en parásitos transfectados con la construcción pX63NEO-FPPS adaptados a 16, 32, 100 y 480 µg/ml de G-418 respecto a los parásitos control y que la proteína era activa.

E.V.2. ESTUDIO DEL FENOTIPO DEL CLON pX63NEO-FPPS-1 EN PRESENCIA DE INHIBIDORES DE LA BIOSÍNTESIS DE ESTEROLES

Tras analizar la sobreexpresión de la FPPS en los mutantes, y comprobar que la proteína era activa, se plantearon una serie de experimentos para estudiar el fenotipo de los parásitos en presencia de inhibidores de la biosíntesis de esteroides. Esta ruta es de suma importancia para el parásito, habiéndose demostrado que la inhibición de uno o varios pasos catalíticos compromete su viabilidad, ya que conlleva a una disminución de la síntesis de ergosterol, que es el esteroide mayoritario en tripanosomátidos, así como a una disminución de la isoprenilación de proteínas (Yokoyama, 1998). Se han publicado numerosos trabajos que muestran el efecto antiproliferativo de inhibidores de la biosíntesis de esteroides sobre el crecimiento de *Leishmania* (Urbina y col., 1997;

Rodrigues y col., 2002; Haughan y col., 1995; Vannier-Santos y col., 1995; Martin y col., 2001).

Como se ha mencionado anteriormente, son numerosos los estudios que se han ido desarrollando hasta el momento para vislumbrar el mecanismo de acción de los bisfosfonatos, llegando a la conclusión de que el blanco de acción de aminobisfosfonatos en osteoclastos, plantas y eucariotas superiores es claramente la enzima FPPS. Martin y col., pusieron de manifiesto que el risedronato (aminobisfosfonato) produce una disminución del crecimiento de parásitos como *T. cruzi* y *L. mexicana*, así como en la síntesis de esteroides de estos parásitos. Pero curiosamente, llegaron a la conclusión de que la disminución de la síntesis de esteroides provocada por este compuesto era insuficiente como para disminuir el crecimiento de los parásitos de tal modo, por lo que se consideró que algo más estaba ocurriendo en el interior de los parásitos. Posteriormente, este autor sugirió que si efectivamente fuese la FPPS el blanco de acción de aminobisfosfonatos, probablemente la elevada reducción del crecimiento de parásitos en presencia de risedronato, no sólo se debería a la disminución de la síntesis de ergosterol, sino también a una disminución en la isoprenilación de proteínas en la célula.

E.V.2.1. Efecto del risedronato

Con el fin de determinar si el mecanismo de inhibición del crecimiento de *Leishmania* mediado por risedronato es específico de FPPS, se analizó si la sobreexpresión de la proteína en el parásito confiere un fenotipo de resistencia a la acción de bisfosfonatos.

Se ensayaron concentraciones de compuesto comprendidas entre 2 μ M y 20mM, observándose diferencias de crecimiento significativas entre parásitos salvajes, controles transfectados con pX63NEO (NEO32) y mutantes que sobreexpresan la FPPS (FPPS32). El valor de IC₅₀ obtenido en parásitos salvajes fue de 120 μ M, en parásitos control (pX63NEO32) fue de 358 μ M, mientras que en parásitos que sobreexpresan la FPPS fue de 9120 μ M. Claramente los mutantes que tienen mayores niveles de FPPS presentan un fenotipo de resistencia a risedronato asociado a la sobreexpresión de la proteína.

En definitiva, podemos concluir que la FPPS parece ser uno de los blancos principales de acción de risedronato en *Leishmania major*, ya que el fenotipo de resistencia que presentan los mutantes que sobreexpresan la enzima, está íntimamente ligado a dicha sobreexpresión. A partir de ahora, uno de los objetivos más importantes de este trabajo es analizar, como sugirieron Martin y col., si el risedronato implica una disminución de la isoprenilación de proteínas, y si este hecho tiene una

mayor implicación en la inhibición del crecimiento de parásitos que la propia inhibición de la síntesis de ergosterol.

E.VI. REGULACIÓN DE LA FPPS DE *Leishmania* POR RISEDRONATO

En los estudios de inhibición de la FPPS de promastigotes de *L. major* 252 por risedronato, se ensayaron concentraciones de 10 y 50 μM , a las cuales los parásitos mantienen la viabilidad celular respecto a los salvajes, aunque los tratados con 50 μM de fármaco tardan más tiempo en alcanzar la fase estacionaria de crecimiento.

Los niveles de proteína FPPS de parásitos tratados con risedronato se analizaron mediante *Western-blot* tras alcanzar la fase logarítmica tardía de crecimiento, y no se observó ninguna diferencia en la expresión de la enzima con respecto a los parásitos salvajes. El estudio se realizó nuevamente con los parásitos tras tres y seis días en cultivo, y se observó de nuevo la misma expresión de FPPS en parásitos tratados con risedronato y parásitos salvajes.

A continuación se planteó realizar el mismo experimento pero en presencia de mayores concentraciones de risedronato: 50, 100 y 150 μM . En esta ocasión se recogieron los parásitos durante la fase logarítmica de crecimiento, así como en el comienzo de la fase estacionaria. Mediante *Western-blot* pudimos observar que al principio de la fase estacionaria, los parásitos tratados con risedronato presentan la misma expresión de FPPS que el control; sin embargo, cuando se analiza la expresión de FPPS durante la fase logarítmica se aprecia un ligero aumento de expresión de dicha enzima en parásitos tratados con 50 y 100 μM de risedronato, con respecto al parásito salvaje.

La hipótesis que podemos plantear frente a este resultado es que los parásitos podrían sobreexpresar la FPPS para defenderse ante la agresión del fármaco durante los primeros estadios de crecimiento, lo que estaría reforzando la idea de que la FPPS es uno de los blancos principales de acción de los bisfosfonatos, pero sin embargo, podrían ser capaces de desarrollar otro mecanismo de resistencia cuando alcanzan su fase estacionaria.

E.VII. LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE LA FPPS DE *L. major*

La localización intracelular de la biosíntesis de esteroides es un tema sujeto a controversia. En el caso de la HMG-CoA reductasa, se ha estudiado su localización subcelular en protozoos como *T. brucei*, para el que se ha descrito su asociación a

microsomos (Coppens y col., 1995), a matriz mitocondrial (Heise y col., 2000) y minoritariamente a membrana de glicosomas y posiblemente de retículo endoplásmico. Trabajos realizados en *T. cruzi* por Concepción y col. (1998) sugieren una localización mayoritariamente glicosomal y minoritariamente asociada a la fracción citosólica. Sin embargo, en nuestro laboratorio, tanto para la HMG-CoA reductasa de *T. cruzi* como para la de *L. major*, se han llevado a cabo estudios de permeabilización de células intactas con digitonina e inmunocitoquímica y microscopía electrónica, que sugieren una asociación de la proteína a matriz mitocondrial (Peña-Díaz y col., 2004).

En el caso de enzimas como la escualeno sintasa y la 24-metiltransferasa (SMT), Urbina y col. (2002) sugieren una localización dual, en glicosoma y mitocondria, altamente dependiente de la fase de crecimiento. Sin embargo, los experimentos de inmunocitoquímica e inmunofluorescencia realizados en nuestro laboratorio con promastigotes de *L. major* tratados con el anticuerpo policlonal anti-SMT sugieren que la proteína SMT está localizada en la membrana de acidocalcisomas. Estos orgánulos, también conocidos como “gránulos de volutina” o “cuerpos de polifosfato”, se observaron por primera vez a comienzos del siglo XX (Meyer, 1904) y están presentes en muchos microorganismos como bacterias, hongos, algas, aunque es en protozoos donde fueron descritos como tales por vez primera (Vercesi y col., 1994; Docampo y col., 1995). Los acidocalcisomas son de naturaleza ácida, electrodensos y contienen una matriz de pirofosfato y polifosfatos unidos a calcio y otros cationes. Son estructuras esféricas y con un diámetro de aproximadamente 200 nm, que pueden observarse en todas las porciones de la célula, aunque se localizan preferentemente en la periferia (de Souza, 2002).

En cuanto a la localización subcelular de la FPPS, durante mucho tiempo ha sido considerada como una enzima principalmente citosólica tanto en animales como en plantas (Hugueney y col., 1996), debido a la presencia de la misma en las fracciones solubles de células y tejidos; aunque también se han descrito FPPSs localizadas en cloroplastos (Sanmiya y col., 1999) y mitocondrias (Cunillera y col., 1997) de plantas. Durante los últimos diez años se ha puesto de manifiesto una localización mayoritariamente peroxisomal para muchas de las enzimas de la ruta de biosíntesis de isoprenoides en mamíferos, localizadas a nivel pre-escualeno, que incluye: HMGCoA reductasa (Keller y col., 1985), mevalonato quinasa (Biardi y col., 1995), fosfomevalonato quinasa (Olivier y col., 1999), mevalonato difosfato descarboxilasa (Biardi y col., 1996), isopentenil difosfato isomerasa (Paton y col., 1997) y farnesil difosfato sintetasa (Krisans y col., 1994). Sin embargo, se han publicado una serie de trabajos recientes que ponen en entredicho todo lo que se había postulado acerca del papel de los peroxisomas en la síntesis de isoprenoides en humanos. En estos últimos estudios se ha analizado la localización subcelular de mevalonato quinasa, fosfomevalonato quinasa y mevalonato difosfato descarboxilasa sugiriendo

una localización predominantemente citosólica (Hogenboom y col., 2004). En cuanto a su localización en tripanosomátidos, hasta el momento no había sido estudiada. Los estudios de localización de esta enzima llevados a cabo en promastigotes de *Leishmania major* han puesto de manifiesto una localización citosólica de la enzima. Si bien, no se puede descartar la presencia minoritaria de esta enzima en otros orgánulos, podemos deducir que tras los ensayos de inmunofluorescencia, microscopía electrónica y permeabilización con digitonina realizados, la FPPS presenta una localización mayoritariamente citosólica en *Leishmania major*.

Existe gran interés en conocer la localización de la ruta de biosíntesis de esteroides en tripanosomátidos. Las enzimas que participan en las primeras etapas de la ruta son solubles, y dado que la HMG-CoA reductasa parece presentar una localización mitocondrial, es posible que otras enzimas que intervienen a continuación presenten la misma localización. La presencia de la HMG-CoA reductasa en la mitocondria podría deberse a que la degradación de leucina en los tripanosomátidos ocurre en este orgánulo (Ginger y col., 2001), y este hecho podría suponer una importante fuente de carbono para la biosíntesis de isoprenoides, contribuyendo así a un ahorro metabólico en la célula como ocurre en tejidos de animales, plantas y hongos. El hecho de que el producto final de la FPPS, FPP, sea utilizado en la prenilación de proteínas por la farnesiltransferasa, una enzima citosólica (Yokoyama, 1998), da una mayor relevancia a la presencia de la FPPS en el citosol. En algún punto debe exportarse el producto final de alguno de los pasos catalíticos desde la mitocondria hacia el citosol, frente a lo que se ha especulado que quizás sea el mevalonato el metabolito que atraviesa la membrana de la mitocondria, ya que los productos fosforilados del mevalonato podrían presentar una gran dificultad a la hora de atravesar dicha membrana. La parte hidrofóbica de la ruta comienza a partir de la síntesis de escualeno, ya que la SQS es una enzima anclada a membrana. A partir de este punto se sugiere que el resto de enzimas presenta elevada hidrofobicidad y tal vez se encuentren unidas a membrana, bien de retículo endoplásmico, glicosoma, o como se ha visto para la SMT, de acidocalcisoma. Esta suposición viene apoyada por estudios realizados en levadura, donde se ha observado que enzimas como la escualeno epoxidasa, SMT o SQS aparecen fundamentalmente en fracción de membrana asociada a membrana plasmática (PAM), que es una subfracción del retículo endoplásmico (Pichler y col., 2001).

E.VIII. CARACTERIZACIÓN DE UNA LINEA CLONADA DE *L.major* 252 RESISTENTE A RISEDRONATO.

Al problema que plantea la inexistencia de fármacos efectivos para el tratamiento de las enfermedades protozoarias, se une el desarrollo cada vez más frecuente de infecciones refractarias al tratamiento. El hecho de que el tratamiento de elección para la leishmaniasis siga siendo el mismo desde hace más de 50 años, unido al mal uso que en muchos países se ha hecho de él debido a la falta de recursos para adquirir el tratamiento completo, ha favorecido la aparición de cuantiosas resistencias clínicas en distintas partes del mundo (Guerin y col., 2002). Concretamente, en el Noroeste de la India más del 50% de los casos de leishmaniasis visceral son resistentes a antimoniales (Sundar y col., 2000). La resistencia a antimoniales pentavalentes en *Leishmania* ha llegado a ser una prioridad para la Organización Mundial de la Salud (www.who.int/infectious-disease-report/2000). A menudo, estas resistencias aparecen debido a una mutación en el gen que codifica la proteína diana del fármaco, de modo que cambia la disposición estructural de la proteína y su afinidad por el inhibidor; o bien, a una regulación negativa del sistema de ingesta del fármaco; o bien, a una amplificación génica de la proteína diana, etc....

La posibilidad de obtener *in vitro* promastigotes de *Leishmania* resistentes a fármacos mediante el cultivo en medio selectivo ha contribuido al esclarecimiento de los mecanismos moleculares implicados en el proceso de resistencia. Asimismo, con este trabajo se intenta hacer un análisis de los mecanismos implicados en la resistencia a risedronato. En primer lugar, se analizó la posibilidad de que hubiese una mutación en la secuencia del gen *LmFPPS*, y para ello se hizo una comparación de la secuencia del gen *LmFPPS* de parásitos salvajes con la de el gen de parásitos resistentes. Se amplificaron ambos genes mediante una reacción de PCR, utilizando como cebadores oligonucleótidos de los extremos 5' y 3' del marco abierto de lectura. Las dos secuencias obtenidas no presentaron diferencias. A continuación, se analizó la expresión de la proteína FPPS de los parásitos salvajes y resistentes mediante *Western blot*, a modo comparativo. Un análisis densitométrico reveló que el nivel de expresión de la proteína era 3.4 veces superior en parásitos resistentes, lo que confirmó la idea de que estamos ante una proteína diana de risedronato en *L. major*. La realización de un *Northern blot* para analizar los niveles de mensajero de ambas líneas celulares confirmó que el aumento de RNA mensajero en resistentes se corresponde con el aumento en la expresión de proteína, por lo que podríamos estar ante un caso de amplificación génica como mecanismo de resistencia. Una conclusión que podemos extraer de estos resultados es que la sobreexpresión de la proteína FPPS no parece ser el único mecanismo responsable de la resistencia a risedronato, ya que no vemos una correlación directa entre el aumento del valor de IC50 de risedronato en la cepa resistente y el aumento de expresión de FPPS.

Por último y con el fin de determinar si como consecuencia del aumento de la expresión de la FPPS en parásitos resistentes a risedronato hubiera otras proteínas de

la ruta del mevalonato afectadas, se analizó la expresión de HMGCoA reductasa, escualeno sintetasa (SQS) y 24-metiltransferasa, tanto en la línea salvaje como en la resistente, a modo comparativo. Tras realizar los respectivos ensayos de *Western blot*, con anticuerpos policlonales específicos obtenidos en nuestro laboratorio, pudimos apreciar un ligero aumento de casi dos veces en la expresión de la enzima escualeno sintetasa en parásitos resistente, con respecto a los salvajes.

Es bien conocido que en mamíferos y en levaduras la HMGCoA reductasa es la principal enzima reguladora de la ruta de síntesis de esteroides (Goldstein y col., 1990; Hampton y col., 1994). Sin embargo, mediante estudios de genómica funcional realizados en levadura se ha puesto de manifiesto que pueden existir puntos adicionales de control en dicha ruta. Así, en el trabajo realizado por Dimster-Denk y col., se analizó el perfil de expresión de todos los genes implicados en la biosíntesis de isoprenoides en respuesta al tratamiento con los siguientes inhibidores de la ruta: L659-699 (inhibe a la HMGCoA sintasa), estatinas (inhiben a la HMGCoA reductasa), ácido zaragóxico (inhibe a la escualeno sintetasa) y diferentes azoles, entre ellos la lovastatina (inhiben a la 14- α -desmetilasa). En general, el bloqueo de estos cuatro pasos en la biosíntesis de ergosterol causaron una inducción compensatoria de la expresión de varios genes de la ruta, destacando los de mevalonato quinasa, fosfomevalonato quinasa, fosfomevalonato descarboxilasa, escualeno sintetasa y C-8 esterol isomerasa, como los más consistentemente inducidos; mientras que el gen de la FPPS, así como uno de los genes que codifica una isoenzima de la HMGCoA reductasa (HMG1) resultaron ser relativamente sensibles a casi todas estos fármacos, aunque la inducción de la expresión de sendos genes en respuesta a la presión de los distintos inhibidores no son tan destacables como las de los genes anteriores (Dimster-Denk y col., 1999).

La regulación de la ruta del mevalonato ha sido muy poco estudiada en protozoos parásitos. En concreto, en *Leishmania*, se ha estudiado la regulación de la HMGCoA reductasa, cuya expresión aumenta en presencia de inhibidores específicos como la lovastatina (Montalvetti y col., 2000). Curiosamente, este aumento en la actividad de la HMGCoA reductasa provocada por este inhibidor en *Leishmania* es similar al aumento de la expresión génica de HMG1 en presencia del mismo inhibidor en levaduras (Dimster-Denk y col., 1999).

La hipótesis que podemos plantear a la vista de los estudios realizados con la línea de *L. major* resistente a risedronato, donde vemos un ligero aumento de expresión de las enzimas FPPS y SQS con respecto a la línea salvaje, es que la regulación de la ruta biosintética de isoprenoides en *Leishmania* parece ser compleja, dejando entrever que enzimas como HMGCoA reductasa, farnesil difosfato sintetasa y escualeno sintetasa, podrían estar involucradas en su regulación.

F. CONCLUSIONES

1. El gen estructural que codifica la proteína FPPS de *L. major* es de copia única, se transcribe dando lugar a un mRNA de 1.86 kb y se encuentra localizado en el cromosoma 16 de *L. major* cepa friedlin, con un tamaño de 7 kb. Presenta una pauta abierta de lectura de 1086 nucleótidos que codifica una proteína de 362 aminoácidos, la cual tiene elevada identidad con FPPSs de otros organismos.
2. La proteína recombinante, purificada a homogeneidad mediante una combinación de precipitación con sulfato amónico y cromatografía de absorción, se comporta en estado nativo como una proteína dimérica de idénticas subunidades
3. Se determinaron los valores de K_m y V_{max} de la LmFPPS resultando ser muy superiores a los descritos para las enzimas de ave y humana, aunque similares a los de las enzimas de *T. cruzi* y *T. brucei*. La proteína de *Leishmania* presenta mayor afinidad por el sustrato GPP que por el IPP. Los ensayos de inhibición realizados con la proteína pura recombinante muestran que el risedronato la inhibe de forma efectiva, con una IC50 de 0.17 μ M.
4. Los estudios de inhibición del crecimiento de mutantes que sobreexpresan la proteína FPPS muestran un fenotipo de resistencia al risedronato directamente proporcional a dicha sobreexpresión, lo que pone de manifiesto un mecanismo de acción específico de este inhibidor frente a la LmFPPS.
5. Estudios de modulación de la FPPS en promastigotes salvajes tratados con risedronato muestran un aumento de la expresión de la proteína frente a parásitos no tratados, indicando la existencia de una regulación positiva de los niveles de enzima mediada por este compuesto.
6. Los experimentos de inmunocitoquímica y microscopía electrónica realizados con promastigotes transfectados con pX63NEO y mutantes que sobreexpresan la FPPS ponen de manifiesto que la proteína se localiza en el citosol. Estudios de inmunofluorescencia y permeabilización con digitonina realizados con promastigotes salvajes, así como con transfectantes que sobreexpresan la enzima confirman esta localización.
7. La línea de *L. major* 252 resistente a risedronato presenta un aumento de expresión de la enzima FPPS, proporcional al aumento en los niveles de mensajero de dicha proteína. Estudios futuros ayudarán a comprender mejor el mecanismo de resistencia de *Leishmania* a dicho fármaco, lo que facilitará la búsqueda de nuevos fármacos útiles en el control de la leishmaniasis.

G. BIBLIOGRAFÍA

Alting-Mees MA, Short JM. (1993) Polycos vectors: a system for packaging filamentous phage and phagemid vectors using lambda phage packaging extracts. *Gene* 137, 93-100.

Anderson, MS., Yarger, JG., Burck, CL., Poulter, CD. (1989) Farnesyl diphosphate synthetase. Molecular cloning, sequence, and expression of an essential gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 15;264(32):19176-84.

Arnheim, N., Erlich, H. (1992) Polymerase chain reaction strategy. *Annu. Rev. Biochem.*;61, 131-56.

Ashby, MN., Edwards, PA. (1990) Elucidation of the deficiency in two yeast coenzyme Q mutants. Characterization of the structural gene encoding hexaprenyl pyrophosphate synthetase. *J Biol Chem.* 265(22):13157-64.

Attucci, S., Aitken, SM., Ibrahim, RK., Gulick, PJ. (1995) A cDNA encoding farnesyl pyrophosphate synthase in white lupin. *Plant Physiol.* 108(2):835-6.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1983) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience.

Bach, T.J., Boronat, A., Campos, N., Ferrer, A., Vollack, K.U. (1999) Mevalonate biosynthesis in plants. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 34, 107-22.

Basson, M.E., Thorsness, M., Rine, J. (1986) *Saccharomyces cerevisiae* contains two functional genes encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 83, 5563-7.

Beach, D.H., Holz, G.G. Jr., Anekwe, G.E. (1979) Lipids of *Leishmania promastigotes*. *J. Parasitol.* 65, 201-16.

Benford, HL., Frith, JC., Auriola, S., Monkkonen, J., Rogers, MJ. (1999) Farnesol and geranylgeraniol prevent activation of caspases by aminobisphosphonates: biochemical evidence for two distinct pharmacological classes of bisphosphonate drugs. *Mol Pharmacol.* 56(1):131-40.

Bergstrom, J.D., Dufresne, C., Bills, G.F., Nallin-Omstead, M., Byrne, K. (1995) Discovery, biosynthesis, and mechanism of action of the zaragozic acids: potent inhibitors of squalene synthase. *Annu Rev Microbiol.* 49, 607-39.

Bergstrom, JD., Bostedor, RG., Masarachia, PJ., Reszka, AA., Rodan, G. (2000) Alendronate is a specific, nanomolar inhibitor of farnesyl diphosphate synthase. *Arch Biochem Biophys.* 373(1):231-41.

Beverley, SM. (1991) Gene amplification in *Leishmania*. *Annu Rev Microbiol.* 45:417-44.

Biardi, L., Sreedhar, A., Zokaei, A., Vartak, NB., Bozeat, RL., Shackelford, JE., Keller, GA., Krisans, SK. (1994) Mevalonate kinase is predominantly localized in peroxisomes and is defective in patients with peroxisome deficiency disorders. *J Biol Chem.* 269(2):1197-205.

- Biardi, L., Krisans, SK.** (1996) Compartmentalization of cholesterol biosynthesis. Conversion of mevalonate to farnesyl diphosphate occurs in the peroxisomes. *J Biol Chem.* 271(3):1784-8.
- Borst, P.** (1986) Discontinuous transcription and antigenic variation in trypanosomes. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 701-32.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-54.
- Bullock, W.O., Fernández, J.M., Short, JM** (1987) XL1Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5, 376-378.
- Burnette, W.N.** (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112, 195-203.
- Cabrera, J.A., Bolds, J., Shields, P.E., Havel, C.M., Watson, J.A.** (1986) Isoprenoid synthesis in *Halobacterium halobium*. Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a concentration in response to mevalonate availability. *J. Biol. Chem.* 261, 3578-83.
- Cannata, J.J., Cazzulo, J.J.** (1984) Glycosomal and mitochondrial malate dehydrogenases in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 11, 37-49.
- Caraglia, M., D'Alessandro, AM., Marra, M., Giubert,i G., Vitale, G., Viscomi, C., Colao, A., Prete, SD., Tagliaferri, P., Tassone, P., Budillon, A., Venuta, S., Abbruzzese, A.** (2004) The farnesyl transferase inhibitor R115777 (Zarnestra) synergistically enhances growth inhibition and apoptosis induced on epidermoid cancer cells by Zoledronic acid (Zometa) and Pamidronate. *Oncogene.* 23(41):6900-13.
- Cazzulo, J.J., Franke de Cazzulo, B.M., Engel, J.C., Cannata, J.J.** (1985) End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 16, 329-43.
- Chance, M.L., Goad, L.J.** (1997) Sterol metabolism of *Leishmania* and trypanosomes: Potential for chemotherapeutic exploitation. In: *Trypanosomiasis and leishmaniasis.* Hide, G., Mottram, J.C., Coombs, G.H., Holmes, P.H. (ed), Cab International, London. Pp. 163-176.
- Chang, K.P., Fong, D., Bray, R.S.** (1985) Biology of *Leishmania* and leishmaniasis. In: *Leishmaniasis.* Chang/Bray (ed.) Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam. Vol. 1, pp. 1-30.
- Chappell, J., Wolf, F., Proulx, J., Cuellar, R., Saunders, C.** (1995) Is the Reaction Catalyzed by 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase a Rate-Limiting Step for Isoprenoid Biosynthesis in Plants? *Plant Physiol.* 109, 1337-1343.
- Chen, A., Kroon, PA., Poulter, CD.** (1994) Isoprenyl diphosphate synthases: protein sequence comparisons, a phylogenetic tree, and predictions of secondary structure. *Protein Sci.* 3(4):600-7.
- Chu, G., Vollrath, D., Davis, R.W.** (1986) Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* 234, 1582-5.

- Clarke, CF., Tanaka, RD., Svenson, K., Wamsley, M., Fogelman, AM., Edwards, PA.** (1987) Molecular cloning and sequence of a cholesterol-repressible enzyme related to prenyltransferase in the isoprene biosynthetic pathway. *Mol Cell Biol.* 7(9):3138-46.
- Coderre, J.A., Beverley, S.M., Schimke, R.T., Santi, D.V.** (1983) Overproduction of a bifunctional thymidylate synthetase-dihydrofolate reductase and DNA amplification in methotrexate-resistant *Leishmania tropica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 2132-6.
- Coleman, ML., Marshall, CJ., Olson, MF.** (2004) RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(5):355-66.
- Concepción, J.L., Gonzalez-Pacanowska, D., Urbina, J.A.** (1998) 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase in *Tripanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: subcellular localization and kinetic properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 352, 114-20.
- Coppens, I., Bastin, P., Levade, T., Courtoy, P.J.** (1995) Activity, pharmacological inhibition and biological regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 69, 29-40.
- Coxon, FP., Rogers, MJ.** (2003) The role of prenylated small GTP-binding proteins in the regulation of osteoclast function. *Calcif Tissue Int.* 72(1):80-4. Epub 2002 Oct 10.
- Croft, S., Coombs, G.,** (2003) Leishmaniasis- current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *TRENDS in Parasitology.* 19 (11), 502-508.
- Cromartie, T., Fisher, K., Grossman, J.** (1999) The discovery of a novel site of action for herbicidal bisphosphonates. *Pesticide Biochemistry and Parasitology* 63, 114-126.
- Cunillera, N., Arro, M., Delourme, D., Karst, F., Boronat, A., Ferrer, A.** (1996) *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed farnesyl-diphosphate synthase genes. *J Biol Chem.* 271(13):7774-80.
- Cunillera, N., Boronat, A., Ferrer, A.** (1997) The *Arabidopsis thaliana* FPS1 gene generates a novel mRNA that encodes a mitochondrial farnesyl-diphosphate synthase isoform. *J Biol Chem.* 272(24):15381-8.
- Dasgupta, B., Gutmann, DH.** (2003) Neurofibromatosis 1: closing the GAP between mice and men. *Curr Opin Genet Dev.* 13(1):20-7.
- Denoyelle, C., Hong, L., Vannier, JP., Soria, J., Soria, C.** (2003) New insights into the actions of bisphosphonate zoledronic acid in breast cancer cells by dual RhoA-dependent and -independent effects. *Br J Cancer.* 88(10):1631-40.
- Descoteaux, A., Turco, S.J.** (1999) Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1455, 341-52.
- Desjeux, P.** (2004) Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 305-318.
- Desjeux, P.** and UNAIDS. (1998) *Leishmania* and HIV in gridlock. Geneva, World Health Organization and UNAIDS, WHO/CTD/LEISH/98.9 and UNAIDS/98.23.
- Dimster-Denk, D., Rine, J., Phillips, J., Scherer, S., Cundiff, P., DeBord, K., Gilliland, D., Hickman, S., Jarvis, A., Tong, L., Ashby, M.** (1999) Comprehensive evaluation of isoprenoid biosynthesis regulation in *Saccharomyces cerevisiae* utilizing the Genome Reporter Matrix. *J. Lipid Res.* 40, 850-60.

- Ding, VD., Sheares, BT., Bergstrom, JD., Ponpipom, MM., Perez, LB., Poulter, CD.** (1991) Purification and characterization of recombinant human farnesyl diphosphate synthase expressed in *Escherichia coli*. *Biochem J.* Apr 1;275 (Pt 1):61-5.
- Docampo, R., Scott, D.A., Vercesi, A.E., Moreno, S.N.** (1995) Intracellular Ca²⁺ storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* 310, 1005-12.
- Docampo, R., Moreno, S.N.** (1999) Acidocalcisome: A novel Ca²⁺ storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. *Parasitol. Today* 15, 443-8.
- Docampo, R., Moreno, S.N.** (2001) The acidocalcisome. *Mol. Biochem. Parasitol.* 114, 151-9.
- Docampo, R., Moreno, SN.** (2001) Bisphosphonates as chemotherapeutic agents against trypanosomatid and apicomplexan parasites. *Curr Drug Targets Infect Disord.* (1):51-61.
- Downward, J.** (2003) Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 3(1):11-22.
- Dunford, JE., Thompson, K., Coxon, FP., Luckman, SP., Hahn, FM., Poulter, CD., Ebetino, FH., Rogers, MJ.** (2001) Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. *J Pharmacol Exp Ther.*296(2):235-42.
- Eberhardt, NL., Rilling, HC.** (1975) Prenyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. Purification to homogeneity and molecular properties. *J Biol Chem.* 10;250(3):863-6.
- Endo, A., Kuroda, M., Tanzawa, K.** (1976) Competitive inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236^a and ML-236B, fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. *FEBS Lett.* 98, 323-26.
- Ellenberger, T.E., Beverley, S.M.** (1989) Multiple drug resistance and conservative amplification of the H region in *Leishmania major*. *J. Biol. Chem.* 264, 15094-103.
- Evans, D.A., Kennedy, W.P., Elbihari, S., Chapman, C.J., Smith, V., Peters, W.** (1987) Hybrid formation within the genus *Leishmania*? *Parasitologia*, 29, 165-73.
- Fairlamb, A.H., Cerami, A.** (1992) Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu. Rev. Microbiol.* 46, 695-729.
- Feinberg, A.P., Vogelstein, B.** (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6-13.
- Freedman DJ, Beverley SM.** (1993) Two more independent selectable markers for stable transfection of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol.* 62:37-44.
- Fujisaki, S., Hara, H., Nishimura, Y., Horiuchi, K., Nishino, T.** (1990) Cloning and nucleotide sequence of the *ispA* gene responsible for farnesyl diphosphate synthase activity in *Escherichia coli*. *J Biochem (Tokyo).* 108(6):995-1000.
- Galindo, I., Ramírez-Ochoa, J.L.** (1989) Study of *Leishmania mexicana* electrokaryotype by clamped homogeneous electric field electrophoresis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 34, 245-52.
- Garvey, E.P., Santi, D.V.** (1986) Stable amplified DNA in drug-resistant *Leishmania* exists as extrachromosomal circles. *Science* 233, 535-40.

- Garzón, LR., Waghab,i MC., Baptista, MM., de Castro, SL., Meirelles, Mde. N., Britto, CC., Docampo, R., Oldfield, E., Urbina, JA.** (2004) Antiparasitic activity of risedronate in a murine model of acute Chagas' disease. *Int J Antimicrob Agents*. 23(3):286-90.
- Gelb, M.H., Scholten, J.D., Sebolt-Leopold, J.S.** (1998) Protein prenylation: from discovery to prospects for cancer treatment. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 40-8.
- Gill, J.F. Jr., Beach, M.J., Rodwell, V.W.** (1985) Mevalonate utilization in *Pseudomonas* sp. M. Purification and characterization of an inducible 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J. Biol. Chem.* 260, 9393-8.
- Ginger, ML., Chance, ML., Sadler, IH., Goad, LJ.** (2001) The biosynthetic incorporation of the intact leucine skeleton into sterol by the trypanosomatid *Leishmania mexicana*. *J Biol Chem*. 276(15):11674-82. Epub 2001 Jan 8.
- Glew RH, Saha AK, Das S, Remaley AT.** (1988) Biochemistry of the *Leishmania* species. *Microbiol. Rev.* 52, 412-32
- Goldstein, JL., Brown, MS.** (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. (6257):425-30.
- González, A., Lerner, T., Huecas, M., Sosa-Pineda, B., Nogueira, N., Lizardi, P.** (1985) Apparent generation of a segmented mRNA from two separate tandem gene families in *Tripanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Research*. Vol.13 (16), 5789-5802.
- Grimaldi, G. Jr., Tesh, R.B., McMahon-Pratt, D.** (1989) A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg.* 41, 687-725.
- Grove, JE., Brown, RJ., Watts, DJ.** (2000) The intracellular target for the antiresorptive aminobisphosphonate drugs in *Dictyostelium discoideum* is the enzyme farnesyl diphosphate synthase. *J Bone Miner Res.* 15(5):971-81.
- Guerin, PJ., Olliaro, P., Sundar, S., Boelaert, M., Croft, SL., Desjeux, P., Wasunna, MK., Bryceson, AD.** (2002) Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis.* 2(8):494-501.
- Guizani, I., Van Eys G., Ismael, R., Dellagi, K.,** (1994) Use of recombinant DNA probes for species identification of Old World *Leishmania* isolates. *Am J Trop Med Hyg.* 50, 632- 640.
- Gupta, SD., Mehan, RS., Tansey, TR., Chen, HT., Goping, G., Goldberg, I., Shechter, I.** (1999) Differential binding of proteins to peroxisomes in rat hepatoma cells: unique association of enzymes involved in isoprenoid metabolism. *J Lipid Res.* 40(9):1572-84.
- Hammond, DJ., Gutteridge, WE.** (1984) Purine and pyrimidine metabolism in the Trypanosomatidae. *Mol Biochem Parasitol.* 13(3):243-61.
- Hampton, R.Y., Rine, J.** (1994) Regulated degradation of HMG-CoA reductase, an integral membrane protein of the endoplasmic reticulum, in yeast. *J. Cell Biol.* 125, 299-312.
- Hanahan, D., Meselson, M.** (1980) Plasmid screening at high colony density. *Gene* 10, 63-7.

- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-80.
- Hanahan, D., Meselson, M.** (1983) Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol.* 100, 333-42.
- Haughan, P.A., Chance, M.L., Goad, L.J.** (1992) Synergism in vitro of lovastatin and miconazole as anti-leishmanial agents. *Biochem. Pharmacol.* 44, 2199-206.
- Haughan, P.A., Chance, M.L., Goad, L.J.** (1995) Effects of an azasterol inhibitor of sterol 24-transmethylation on sterol biosynthesis and growth of *Leishmania donovani* promastigotes. *Biochem. J.* 308, 31-8.
- Heise, N., Opperdoes, F.R.** (2000) Localisation of a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in the mitochondrial matrix of *Trypanosoma brucei* procyclics. *Z. Naturforsch [C]* 55, 473-7.
- Herwaldt, B.L.** (1999) Leishmaniasis. *Lancet.* 354, 1191-9.
- Hillner BE.** (2000) The role of bisphosphonates in metastatic breast cancer. *Semin Radiat Oncol.* 10(3):250-3.
- Hogenboom, S., Tuyp, JJ., Espeel, M., Koster, J., Wanders, RJ., Waterham, HR.** (2004) Mevalonate kinase is a cytosolic enzyme in humans. *J Cell Sci.* 117(Pt 4):631-9.
- Hogenboom, S., Tuyp, JJ., Espeel, M., Koster, J., Wanders, RJ., Waterham, HR.** (2004) Phosphomevalonate kinase is a cytosolic protein in humans. *J Lipid Res.* 45(4):697-705. Epub 2004 Jan 16.
- Hosfield, DJ., Zhang, Y., Dougan, DR., Broun, A., Tari, LW., Swanson, RV., Finn, J.** (2004) Structural basis for bisphosphonate-mediated inhibition of isoprenoid biosynthesis. *J Biol Chem.* 279(10):8526-9. Epub 2003 Dec 12.
- Huguency, P., Bouvier, F., Badillo, A., Quennemet, J., d'Harlingue, A., Camara, B.** (1996) Developmental and stress regulation of gene expression for plastid and cytosolic isoprenoid pathways in pepper fruits. *Plant Physiol.* 111(2):619-26.
- Iovannisci, D.M., Ullman, B.** (1983) High efficiency plating method for *Leishmania* promastigotes in semidefined or completely-defined medium. *J. Parasitol.* 69, 633-6.
- Joly, A., Edwards, PA.** (1993) Effect of site-directed mutagenesis of conserved aspartate and arginine residues upon farnesyl diphosphate synthase activity. *J Biol Chem.* 268(36):26983-9.
- Kapler GM, Coburn CM, Beverley SM.** (1990) Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. *Mol. Cell Biol.* 10, 1084-94.
- Karst, F., Plochocka, D., Meyer, S., Szkopinska, A.** (2004) Farnesyl diphosphate synthase activity affects ergosterol level and proliferation of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biol Int.* 28(3):193-7.
- Kawata, S., Yamasaki, E., Nagase, T., INRI, Y., Ito, N., Matsuda, Y., Inada, M., Tamura, S., Noda, S., Imai, Y., Matsuzawa, Y.** (2001) Effect of pravastatin on survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma. A randomized controlled trial. *Br J Cancer.* 84(7):886-91.

- Keller, GA., Barton, MC., Shapir, DJ., Singer, SJ.** (1985) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase is present in peroxisomes in normal rat liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82(3):770-4.
- Keller, RK., Fliesler, SJ.** (1999) Mechanism of aminobisphosphonate action: characterization of alendronate inhibition of the isoprenoid pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 266(2):560-3.
- Kelly, J.M., Law, J.M., Chapman, C.J., Van Eys, G.J., Evans, D.A.** (1991) Evidence of genetic recombination in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol.* 46, 253-63.
- Kelly JM, Ward HM, Miles MA, Kendall G.** (1992) A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucleic Acids Res.* Aug 11;20(15):3963-9.
- Kelly JM.** (1995) Trypanosomatid shuttle vectors: new tools for the functional dissection of parasite genomes. *Parasitol Today.* Dec;11(12):447-51.
- Koyama, T., Obata, S., Osabe, M., Takeshita, A., Yokohama, K., Uchida, M., Nishino, T., Ogura, K.** (1993) Thermostable farnesyl diphosphate synthase of *Bacillus stearothermophilus*: molecular cloning, sequence determination, overproduction, and purification. *J Biochem (Tokyo)* 113(3):355-63.
- Koyama, T., Tajima, M., Sano, H., Doi, T., Koike-Takeshita, A., Obata, S., Nishino, T., Ogura, K.** (1996) Identification of significant residues in the substrate binding site of *Bacillus stearothermophilus* farnesyl diphosphate synthase. *Biochemistry.* 35(29):9533-8.
- Koyama T., Gotoh, Y., Nishino, T.** (2000) Intersubunit location of the active site of farnesyl diphosphate synthase: reconstruction of active enzymes by hybrid-type heteromeric dimers of site-directed mutants. *Biochemistry.* 39(2):463-9.
- Krauth-Siegel, R.L., Meiering, S.K., Schmidt, H.** (2003) The parasite-specific trypanothione metabolism of *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Biol. Chem.* 384, 539-49.
- Kretz PL, Kohler SW, Short JM.** (1991) Identification and characterization of a gene responsible for inhibiting propagation of methylated DNA sequences in *mcrA mcrB1 Escherichia coli* strains. *J. Bacteriol.* 173, 4707-16.
- Krisans, SK., Ericsson, J., Edwards, PA., Kelle, GA.** (1994) Farnesyl-diphosphate synthase is localized in peroxisomes. *J Biol Chem.* 269(19):14165-9.
- Kunzmann, V., Bauer, E., Feurle, J., Weissinger, F., Tony, HP., Wilhelm, M.** (2000) Stimulation of gamma delta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood.* 96(2):384-92.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- LaFon, SW., Nelson, DJ., Berens, RL., Marr, JJ.** (1982) Purine and pyrimidine salvage pathways in *Leishmania donovani*. *Biochem Pharmacol.* 15;31(2):231-8.
- Langford, C.K., Ullman, B., Landfear, S.M.** (1992) *Leishmania*: codon utilization of nuclear genes. *Ex. Parasitol.* 74, 360-1.
- Lanotte, G., Rioux, J.A.** (1990) Cell fusion in *Leishmania* (Kinetoplastida, *Trypanosomatidae*) *C R Acad Sci III* 310, 285-8

- LeBowitz, J.H., Coburn, C.M., Beverley, S.M.** (1991) Simultaneous transient expression assays of the trypanosomatid parasite *Leishmania* using beta-galactosidase and beta-glucuronidase as reporter enzymes. *Gene* 103, 119-23.
- LeBowitz, J.H., Smith, H.Q., Rusche, L., Beverley, S.M.** (1993) Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes Dev.* 7, 996-1007.
- Lighthall, G.K., Giannini, S.H.** (1992) The chromosomes of *Leishmania*. *Parasitol. Today* 8, 192-9.
- Lu, H.G., Zhong, L., Chang, K.P., Docampo, R.** (1997) Intracellular Ca²⁺ pool content and signaling and expression of a calcium pump are linked to virulence in *Leishmania mexicana amazonensis* amastigotes. *J. Biol. Chem.* 272, 9464-73.
- Luckman, SP., Coxon, FP., Ebetino, FH., Russell, RG., Rogers, MJ.** (1998) Heterocycle-containing bisphosphonates cause apoptosis and inhibit bone resorption by preventing protein prenylation: evidence from structure-activity relationships in J774 macrophages. *J Bone Miner Res.* 13(11):1668-78.
- Macedo, A.M., Melo, M.N., Gomes, R.F., Pena, S.** (1992) DNA fingerprints: a tool for identification and determination on the relationship between species and strains of *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 53, 63-70.
- Marrero, PF., Poulter, CD., Edwards, PA.** (1992) Effects of site-directed mutagenesis of the highly conserved aspartate residues in domain II of farnesyl diphosphate synthase activity. *J Biol Chem.* 267(30):21873-8.
- Martin, M.B., Grimley, J.S., Lewis, J.C., Heath, H.T. 3rd, Bailey, B.N., Kendrick, H., Yardley, V., Caldera, A., Lira, R., Urbina, J.A., Moreno, S.N., Docampo, R., Croft, S.L., Oldfield, E.** (2001) Bisphosphonates inhibit the growth of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, and *Plasmodium falciparum*: a potential route to chemotherapy. *J. Med. Chem.* 44, 909-16.
- Mendoza- Leon, A., Havercroft, J., Barker, D.,** (1995). The RFLP analysis of the β -tubulin gene region in New World *Leishmania*. *Parasitology.* 111, 1-9.
- Meyer, A.** (1904) Orientierende Untersuchungen ueber Verbreitung. Morphologie, und Chemie des Volutins. *Bot Zeit* 62, 113-52.
- Modabber, F.** (1993) Leishmaniasis. Special programme for research and training in tropical diseases. Tropical Disease Research (TDR) Progress 1991-92. TDR Eleventh Programme Report. UNDP/World Bank/WHO.
- Montalvetti, A., Peña-Díaz, J., Hurtado, R., Ruiz-Perez, L.M., Gonzalez-Pacanowska, D.** (2000) Characterization and regulation of *Leishmania major* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *Biochem. J.* 349, 27-34.
- Montalvetti, A., Bailey, BN., Martin, MB., Severin, GW., Oldfield, E., Docampo, R.** (2001) Bisphosphonates are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farnesyl pyrophosphate synthase. *J Biol Chem.* 276(36):33930-7. Epub 2001 Jul 2.
- Montalvetti, A., Fernandez, A., Sanders, JM., Ghosh, S., Van Brussel, E., Oldfield, E., Docampo, R.** (2003) Farnesyl pyrophosphate synthase is an essential enzyme in *Trypanosoma brucei*. In vitro RNA interference and in vivo inhibition studies. *J Biol Chem.* 278(19):17075-83. Epub 2003 Mar 4.
- Morris, J.C., Drew, M.E., Klingbeil, M.M., Motyka, S.A., Saxowsky, T.T., Wang, Z., Englund, P.T.** (2001) Replication of kinetoplast DNA: an update for the new millennium. *Int. J. Parasitol.* 31, 453-8.

- Muhich, ML., Boothroyd, JC.** (1988) Polycistronic transcripts in trypanosomes and their accumulation during heat shock: evidence for a precursor role in mRNA synthesis. *Mol Cell Biol. Sep*; 8(9):3837-46.
- Müller, M.** (1980) The hydrogenosome. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 30, 127-42.
- Oades, GM., Senaratne, SG., Clarke, IA., Kirby, RS., Colston, KW.** (2003) Nitrogen containing bisphosphonates induce apoptosis and inhibit the mevalonate pathway, impairing Ras membrane localization in prostate cancer cells. *J Urol.* 170(1):246-52.
- Ohnuma, S., Suzuki, M., Nishino, T.** (1994) Archaeobacterial ether-linked lipid biosynthetic gene. Expression cloning, sequencing, and characterization of geranylgeranyl-diphosphate synthase. *J Biol Chem.* 269(20):14792-7.
- Olivier, LM., Chambliss, K.L, Gibson, KM., Krisans, SK.** (1999) Characterization of phosphomevalonate kinase: chromosomal localization, regulation, and subcellular targeting. *J Lipid Res.* 40(4):672-9.
- Olmo, A., Arrebola, R., Bernier, V., Gonzalez-Pacanowska, D., Ruiz-Perez, L.M.** (1995) Co-existence of circular and multiple linear amplicons in methotrexate-resistant *Leishmania*. *Nucleic Acids Res.* 23, 2856-64.
- Oppendoes, F.R.** (1987) Topogenesis of glycolytic enzymes in *Trypanosoma brucei*. *Biochem. Soc. Symp.* 53, 123-9.
- Oppendoes, F.R.** (1995) Carbohydrate and energy metabolism of aerobic protozoa. In: Marr JJ, Müller M. editors. *Biochemistry and molecular biology of parasites*. London: Academic Press, 19-32.
- Ouellette, M.** (2001) Biochemical and molecular mechanisms of drug resistance in parasites. *Trop Med Int Health.* 6(11):874-82.
- Papadopoulou, B., Huang, XF., Boucher, N., McNicoll, F.** (2003) Stage-specific regulation of gene expression in *Leishmania*. *ASM News.* 69: 282-8.
- Parsons, M., Furuya, T., Pal, S., Kessler, P.** (2001) Biogenesis and function of peroxisomes and glycosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 115, 19-28.
- Paton, VG., Shackelford, JE., Krisans, SK.** (1997) Cloning and subcellular localization of hamster and rat isopentenyl diphosphate dimethylallyl diphosphate isomerase. A PTS1 motif targets the enzyme to peroxisomes. *J Biol Chem.* 272(30):18945-50.
- Peña-Díaz, J., Montalvetti, A., Flores, C.L., Hurtado-Guerrero, R., de Souza, W., Gancedo, C., Ruiz-Pérez, L.M., González-Pacanowska, D.** (2004) Mitochondrial localization of the mevalonate pathway enzyme 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biol Cell.* 15(3):1356-63. Epub 2003 Dec 29.
- Phillips, T.A., VanBogelen, R.A., Neidhardt, F.C.** (1984) lon gene product of *Escherichia coli* is a heat-shock protein. *J. Bacteriol.* 159, 283-7.
- Pichler, H., Gaigg, B., Hrastnik, C., Achleitner, G., Kohlwein, S.D., Zellnig, G., Perktold, A., Daum, G.** (2001) A subfraction of the yeast endoplasmic reticulum associates with the plasma membrane and has a high capacity to synthesize lipids. *Eur. J. Biochem.* 268, 2351-61.
- Plochocka, D., Karst, F., Swiezewska, E., Szkopinska, A.** (2000) The role of ERG20 gene (encoding yeast farnesyl diphosphate synthase) mutation in long dolichol formation. *Molecular modeling of FPP synthase. Biochimie.* 82(8):733-8.

- Poulter, CD., Argyle, JC., Mash, EA.** (1978) Farnesyl pyrophosphate synthetase. Mechanistic studies of the 1'-4 coupling reaction with 2-fluorogeranyl pyrophosphate. *J Biol Chem.* 253(20):7227-33.
- Rangel, H., Dagger, F., Hernández, A., Liendo, A., Urbina, J.A.** (1996) Naturally azole-resistant *Leishmania braziliensis* promastigotes are rendered susceptible in the presence of terbinafine: comparative study with azole-susceptible *Leishmania mexicana* promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 2785-91.
- Roberts, C.W., McLeod, R., Rice, D.W., Ginger, M., Chance, M.L., Goad, L.J.** (2003) Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Mol. Biochem. Parasitol.* 126, 129-42.
- Rodan, GA.** (1998) Mechanisms of action of bisphosphonates. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 38:375-88.
- Rodan, GA., Martin, TJ.** (2000) Therapeutic approaches to bone diseases. *Science.* 289(5484):1508-14.
- Rodrigues, J.C., Attias, M., Rodriguez, C., Urbina, J.A., Souza, W.** (2002) Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22,26-azasterol, a delta(24(25))-sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 487-99.
- Rodríguez, N., Bailey, BN., Martin, MB., Oldfield, E., Urbina, JA., Docampo, R.** (2002) Radical cure of experimental cutaneous leishmaniasis by the bisphosphonate pamidronate. *J Infect Dis.* 186(1):138-40. Epub 2002 Jun 5.
- Rogers, MJ., Xiong, X., Brown, RJ., Watts, DJ., Russell, RG., Bayless, AV., Ebetino, FH.** (1995) Structure-activity relationships of new heterocycle-containing bisphosphonates as inhibitors of bone resorption and as inhibitors of growth of *Dictyostelium discoideum* amoebae. *Mol Pharmacol.* 47(2):398-402.
- Rogers, MJ., Watts, DJ., Russell, RG.** (1997) Overview of bisphosphonates. *Cancer.* 15; 80(8 Suppl):1652-60.
- Sahai, E., Marshall, CJ.** (2002) RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2(2):133-42.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanders, JM., Gomez, AO., Mao, J., Meints, GA., Van Brussel, EM., Burzynska, A., Kafarski, P., Gonzalez-Pacanowska, D., Oldfield, E.** (2003) 3-D QSAR investigations of the inhibition of *Leishmania major* farnesyl pyrophosphate synthase by bisphosphonates. *J Med Chem.* 46(24):5171-83.
- Sanders, JM., Song, Y., Chan, JM., Zhang, Y., Jennings, S., Kosztowski, T., Odeh, S., Flessner, R., Schwerdtfeger, C., Kotsikorou, E., Meints, GA., Gomez, AO., Gonzalez-Pacanowska, D., Raker, AM., Wang, H., van Beek, ER., Papapoulos, SE., Morita, CT., Oldfield, E.** (2005) Pyridinium-1-yl bisphosphonates are potent inhibitors of farnesyl diphosphate synthase and bone resorption. *J Med Chem.* (8):2957-63.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-7.
- Sanmiya, K., Ueno, O., Matsuoka, M., Yamamoto, N.** (1999) Localization of farnesyl diphosphate synthase in chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 40(3):348-54.

- Schlatterer, C., Buravkov, S., Zierold, K., Knoll, G.** (1994) Calcium-sequestering organelles of *Dictyostelium discoideum*: changes in element content during early development as measured by electron probe X-ray microanalysis. *Cell Calcium*. 16(2):101-11.
- Scholler, J.K., Reed, S.G., Stuart, K.** (1986) Molecular karyotype of species and subspecies of *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20, 279-93.
- Schwartz, D.C., Cantor, C.R.** (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37, 67-75.
- Senaratne, SG., Colston, KW.** (2002) Direct effects of bisphosphonates on breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 4(1):18-23. Epub 2001 Nov 14.
- Shapiro, T.A., Englund, P.T.** (1995) The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 117-43.
- Sheares, BT., White, SS., Molowa, DT., Chan, K., Ding, VD., Kroon, PA., Bostedor, RG., Karkas, JD.** (1989) Cloning, analysis, and bacterial expression of human farnesyl pyrophosphate synthetase and its regulation in Hep G2 cells. *Biochemistry*. 28(20):8129-35.
- Simpson, L.** (1987) The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu. Rev. Microbiol.* 41, 363-82.
- Simpson, L., Sbicego, S., Aphasizhev, R.** (2003) Uridine insertion/deletion RNA editing in trypanosome mitochondria: a complex business. *RNA* 9, 265-76.
- Southern, E.M.** (1974) An improved method for transferring nucleotides from electrophoresis strips to thin layers of ion-exchange cellulose. *Anal. Biochem.* 62, 317-8.
- de Souza, W.** (2002) Special organelles of some pathogenic protozoa. *Parasitol. Res.* 88, 1013-25.
- Stuart, K., Panigrahi, A.K.** (2002) RNA editing: complexity and complications. *Mol. Microbiol.* 45, 591-6.
- Sundar, S., More, DK., Singh, MK., Singh, VP., Sharma, S., Makharia, A., Kumar, PC., Murray, HW.** (2000) Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clin Infect Dis.* 31(4):1104-7.
- Sundar, S., Jha, T.K., Thakur, C.P., Engel, J., Sindermann, H., Fischer, C., Junge, K., Bryceson, A., Berman, J.** (2002) Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N. Engl. J. Med.* 347, 1739-46.
- Szkopinska, A., Swiezewska, E., Karst, F.** (2000) The regulation of activity of main mevalonic acid pathway enzymes: farnesyl diphosphate synthase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, and squalene synthase in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun.* 267(1):473-7.
- Tanaka, Y., Morita, CT., Tanaka, Y., Nieves, E., Brenne,r MB., Bloom, BR.** (1995) Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature.* 375(6527):155-8.
- Tarshis, LC., Yan, M., Poulter, CD., Sacchettini, JC.** (1994) Crystal structure of recombinant farnesyl diphosphate synthase at 2.6-Å resolution. *Biochemistry*. 13;33(36):10871-7.

- Tarshis, LC., Proteau, PJ., Kellogg, BA., Sacchetti, JC., Poulter, CD.** (1996) Regulation of product chain length by isoprenyl diphosphate synthases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(26):15018-23.
- Tassone, P., Tagliaferri, P., Viscomi, C., Palmieri, C., Caraglia, M., D'Alessandro, A., Galea, E., Goel, A., Abbruzzese, A., Boland, CR., Venuta, S.** (2003) Zoledronic acid induces antiproliferative and apoptotic effects in human pancreatic cancer cells in vitro. *Br J Cancer.* 88(12):1971-8.
- Tibayrenc, M., Kjellberg, F., Ayala, F.J.** (1990) A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87, 2414-8.
- Urbina, J.A., Lazard, K., Marchan, E., Visbal, G., Aguirre, T., Piras, M.M., Piras, R., Maldonado, R.A., Payares, G., de Souza, W.** (1993) Mevinolin (lovastatin) potentiates the antiproliferative effects of ketoconazole and terbinafine against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: in vitro and in vivo studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 580-91.
- Urbina, J.A., Vivas, J., Visbal, G., Contreras, L.M.** (1995) Modification of the sterol composition of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes by delta 24(25)-sterol methyl transferase inhibitors and their combinations with ketoconazole. *Mol. Biochem. Parasitol.* 73, 199-210.
- Urbina, J.A., Payares, G., Molina, J., Sanoja, C., Liendo, A., Lazard, K., Piras, M.M., Piras, R., Perez, N., Wincker, P., Ryley, J.F.** (1996a) Cure of short- and long-term experimental Chagas' disease using D0870. *Science.* 273, 969-71.
- Urbina, J.A., Vivas, J., Lazard, K., Molina, J., Payares, G., Piras, M.M., Piras, R.** (1996b) Antiproliferative effects of delta 24(25) sterol methyl transferase inhibitors on *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: in vitro and in vivo studies. *Chemotherapy* 42, 294-307.
- Urbina, J.A.** (1997) Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. *Parasitology* 114, 91-9.
- Urbina, J.A., Payares, G., Contreras, L.M., Liendo, A., Sanoja, C., Molina, J., Piras, M., Piras, R., Perez, N., Wincker, P., Loebenberg, D.** (1998) Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: in vitro and in vivo studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 1771-7.
- Urbina, J.A., Moreno, B., Vierkotter, S., Oldfield, E., Payares, G., Sanoja, C., Bailey, B.N., Yan, W., Scott, D.A., Moreno, S.N., Docampo, R.** (1999) *Trypanosoma cruzi* contains major pyrophosphate stores, and its growth in vitro and in vivo is blocked by pyrophosphate analogs. *J Biol Chem.* 274, 33609-15.
- Urbina, J.A., Concepcion, J.L., Rangel, S., Visbal, G., Lira, R.** (2002) Squalene synthase as a chemotherapeutic target in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 125, 35-45.
- Van Beek, E., Pieterman, E., Cohen, L., Lowik, C., Papapoulos, S.** (1999) Farnesyl pyrophosphate synthase is the molecular target of nitrogen-containing bisphosphonates. *Biochem Biophys Res Commun.* 264(1):108-11.
- Vannier-Santos, M.A., Urbina, J.A., Martiny, A., Neves, A., de Souza, W.** (1995) Alterations induced by the antifungal compounds ketoconazole and terbinafine in *Leishmania*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 42, 337-46.

- Vercesi, A.E., Moreno, S.N., Docampo, R.** (1994) Ca²⁺/H⁺ exchange in acidic vacuoles of *Trypanosoma brucei*. *Biochem. J.* 304, 227-33.
- Vincenzi, B., Santini, D., Rocci, L., Tonini, G.** (2003) Bisphosphonates: new antiangiogenic molecules in cancer treatment? *Ann Oncol.* 14(5):806-7.
- Vickerman, K., Preston, T.M.** (1970) Spindle microtubules in the dividing nuclei of trypanosomes. *J. Cell Sci.* 6, 365-83.
- Walton, B.C.** (1989) Leishmaniasis. A worldwide problem. *Int J Dermatol.* 28, 305-7.
- Wilkin, DJ., Kutsunai, SY., Edwards, PA.** (1990) Isolation and sequence of the human farnesyl pyrophosphate synthetase cDNA. Coordinate regulation of the mRNAs for farnesyl pyrophosphate synthetase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase by phorbol ester. *J Biol Chem.* 265(8):4607-14.
- Yardley, V., Khan, AA., Martin, MB., Slifer, TR., Araujo, FG., Moreno, SN., Docampo, R., Croft, SL., Oldfield, E.** (2002) In vivo activities of farnesyl pyrophosphate synthase inhibitors against *Leishmania donovani* and *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 46(3):929-31.
- Ylitalo, R., Monkkonen, J., Urtti, A., Ylitalo, P.** (1996) Accumulation of bisphosphonates in the aorta and some other tissues of healthy and atherosclerotic rabbits. *J Lab Clin Med.* 127(2):200-6.
- Yokoyama, K., Trobridge, P., Buckner, FS., Scholten, J., Stuart, KD., Van Voorhis, WC., Gelb, MH.** (1998) The effects of protein farnesyltransferase inhibitors on trypanosomatids: inhibition of protein farnesylation and cell growth. *Mol Biochem Parasitol.* 94(1):87-97.