



Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra"
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Granada

**CARACTERIZACIÓN DE GENES DE LA SUBFAMILIA DE
TRANSPORTADORES ABCG DE *LEISHMANIA*
*INFANTUM***

Esther Castanys Muñoz
TESIS DOCTORAL
2007



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Universidad de Granada



Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra"
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE LA SUBFAMILIA DE TRANSPORTADORES ABCG DE *LEISHMANIA* *INFANTUM*

Directores de Tesis

Dr. Francisco Gamarro Conde

Dr. Santiago Castanys Cuello

Memoria presentada por la licenciada **Esther Castanys Muñoz** para optar al
grado de doctor por la Universidad de Granada.

Julio 2007

Esta Tesis Doctoral se ha realizado en el Departamento de Bioquímica y Farmacología Molecular del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” (C.S.I.C.) de Granada y ha sido financiada con una beca predoctoral de Formación de Profesorado Universitario (F.P.U.) del Ministerio de Educación y Ciencia (2002-2005) y con una beca de ayuda a la formación de la compañía farmacéutica Zentaris (2006-2007). Las estancias en el extranjero realizadas durante estos años han estado financiadas por el programa de estancias breves de las becas F.P.U del Ministerio de Educación y Ciencia. Las asistencias a congresos nacionales e internacionales se han podido realizar gracias a becas concedidas por la “Red de Flipasas”, dentro de los proyectos “Marie Curie” de la Unión Europea, así como por la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM),

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han sido publicados en:

Castanys-Muñoz, E., Alder-Baerens, N., Pomorski, T., Gamarro, F. y Castanys, S. (2007). A novel ATP-binding cassette transporter from *Leishmania* is involved in transport of phosphatidylcholine analogues and resistance to alkyl-phospholipids. *Mol Microbiol.* En prensa.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. LEISHMANIASIS	1
1.1. Generalidades	1
1.2. Agente etiológico: <i>Leishmania</i>	2
1.3. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	3
1.4. Establecimiento de la infección.....	5
1.5. Respuesta inmune del hospedador.....	6
1.6. Manifestaciones clínicas.....	9
1.7. Tratamiento.....	11
1.8. Mecanismos de resistencia a fármacos en <i>Leishmania</i>	17
1.9. Biología molecular y bioquímica de <i>Leishmania</i>	20
1.10. Componentes de la membrana de <i>Leishmania</i>	24
1.11. Tráfico vesicular en <i>Leishmania</i>	27
2. TRANSPORTADORES ABC	28
2.1. Organización estructural de los transportadores ABC.....	29
2.2. Mecanismo de acción.....	33
2.3. Clasificación de la familia ABC.....	36
2.3.1. Subfamilia ABCG.....	39
2.3.1.1. ABCG1.....	41
2.3.1.2. ABCG2.....	42
2.3.1.3. ABCG4.....	47
2.3.1.4. ABCG5 y ABCG8.....	48
2.4. Transportadores ABC en tripanosomátidos.....	49
2.4.1. Transportadores ABC en <i>Leishmania</i>	49
2.4.1.1. Subfamilia ABCA.....	49
2.4.1.2. Subfamilia ABCB.....	51
2.4.1.3. Subfamilia ABCC.....	51
2.4.2. Transportadores ABC en <i>Trypanosoma</i>	52
3. TRÁFICO DE LÍPIDOS	53
II. OBJETIVOS	61
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
1. MATERIALES	63
1.1. Líneas celulares.....	63
1.1.1. Parásitos.....	63
1.1.2. Bacterias.....	63
1.1.3. Levaduras.....	63

1.2. Medios de cultivo.....	64
1.2.1. Para <i>Leishmania infantum</i>	64
1.2.2. Para bacterias.....	65
1.2.3. Para levaduras.....	65
1.3. Tampones y soluciones.....	66
1.3.1. Reactivos generales.....	66
1.3.3. Para <i>Southern blot</i>	67
1.3.4. Para <i>Northern blot</i>	67
1.3.5. Soluciones de hibridación.....	67
1.3.6. Soluciones para electroforesis de proteínas.....	68
1.3.7. Soluciones para <i>Western blot</i> e inmunodetección.....	68
1.3.8. Soluciones para purificación de proteínas recombinantes.....	69
1.3.8.1. Condiciones nativas.....	69
1.3.8.2. Condiciones desnaturalizantes.....	69
1.3.9. Soluciones para purificación de los anticuerpos.....	69
1.3.10. Soluciones para fraccionamiento subcelular de levaduras.....	69
1.3.11. Soluciones para estudios funcionales en vesículas secretoras de levaduras.....	70
1.4. Vectores plasmídicos.....	70
1.4.1. Vectores de clonaje.....	70
1.4.2. Vectores de expresión.....	71
1.5. Oligonucleótidos.....	72
1.5.1. Para secuenciación de <i>LiABCG4</i>	72
1.5.2. Para clonaje de <i>LiABCG4</i>	72
1.5.3. Para mutagénesis de <i>LiABCG4</i>	73
1.5.4. Para secuenciación de <i>LiABCG6</i>	73
1.5.5. Para clonaje de <i>LiABCG6</i>	74
1.5.6. Oligonucleótidos comerciales.....	74
1.6. Reactivos.....	75
1.6.1. Reactivos de biología molecular.....	75
1.6.2. Reactivos para el análisis de proteínas.....	76
1.6.3. Reactivos para el análisis inmunológico.....	76
1.6.4. Reactivos para el estudio funcional de las proteínas <i>ABCG</i> de <i>L. infantum</i>	77
1.6.5. Reactivos para la expresión heteróloga de <i>LiABCG4</i> y <i>LiABCG6</i> en levaduras y para los estudios de funcionalidad.....	78
2. MÉTODOS.....	79
2.1. Cultivo y manipulación de <i>L. infantum</i>	79
2.1.1. Cultivo <i>in vitro</i>	79
2.1.2. Criopreservación y congelación.....	79
2.1.3. Recuento de parásitos.....	80
2.1.4. Transfección por electroporación.....	80
2.1.5. Determinación de la concentración inhibitoria 50 de crecimiento (Ensayos de MTT).....	80
2.2. Cultivo y manipulación de bacterias.....	81
2.2.1. Cultivo de bacterias.....	81
2.2.2. Preparación de células competentes por choque térmico y transformación.....	81
2.3. Cultivo y manipulación de levaduras.....	82
2.3.1. Cultivo de levaduras.....	82

2.3.2. Transformación de levaduras.....	82
2.3.3. Ensayos de sensibilidad a fármacos en levaduras.....	83
2.4. Aislamiento de ácidos nucleicos.....	83
2.4.1. Aislamiento de DNA genómico de <i>L. infantum</i>	83
2.4.2. Aislamiento de DNA plasmídico.....	83
2.4.3. Aislamiento de RNA total de <i>L. infantum</i>	84
2.5. Tratamiento enzimático de los ácidos nucleicos.....	84
2.5.1. Digestión del DNA con enzimas de restricción.....	84
2.5.2. Reacción de ligación.....	84
2.5.3. Tratamiento con fosfatasa alcalina.....	85
2.5.4. Marcaje radiactivo del DNA.....	85
2.5.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	85
2.5.6. Secuenciación del DNA.....	85
2.5.7. Mutagénesis dirigida.....	86
2.6. Electroforesis y transferencia de ácidos nucleicos.....	86
2.6.1. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	86
2.6.2. Purificación del DNA incluido en agarosa.....	87
2.6.3. Electroforesis de RNA en geles desnaturalizantes.....	87
2.6.4. Transferencia de DNA mediante <i>Southern blot</i>	87
2.6.5. Transferencia de RNA mediante <i>Northern blot</i>	87
2.6.6. Hibridación de ácidos nucleicos con sondas radiactivas.....	88
2.7. Técnicas de obtención y análisis de proteínas.....	88
2.7.1. Obtención de proteínas totales de <i>L. infantum</i>	88
2.7.2. Cuantificación de proteínas.....	89
2.7.3. Electroforesis de proteínas en geles SDS-PAGE.....	89
2.7.4. Transferencia de proteínas a membrana (<i>Western blot</i>).....	89
2.7.5. Obtención de proteína recombinante de bacterias transformadas.....	90
2.7.6. Cromatografía de afinidad con Ni ²⁺ -NTA.....	90
2.8. Técnicas inmunológicas.....	91
2.8.1. Obtención de anticuerpos policlonales de conejo.....	91
2.8.2. Titulación de los anticuerpos.....	92
2.8.3. Detección con anticuerpos de proteínas transferidas a membranas.....	92
2.8.4. Purificación de los anticuerpos.....	92
2.8.5. Inmunofluorescencia indirecta.....	93
2.9. Técnicas para el estudio funcional de los transportadores ABCG de <i>L. infantum</i>	94
2.9.1. Marcaje de parásitos con análogos fluorescentes de fosfolípidos.....	94
2.9.2. Marcaje de parásitos con miltefosina radiactiva.....	95
2.9.3. Microscopía de fluorescencia.....	96
2.10. Técnicas para el estudio funcional en levaduras de las proteínas ABCG de <i>L. infantum</i>	96
2.10.1. Fraccionamiento subcelular en gradiente de sacarosa.....	96
2.10.2. Preparación y fraccionamiento de vesículas secretoras de levaduras.....	97
2.10.3. Inmuno-afinidad de las vesículas secretoras.....	98
2.10.4. Entrecruzamiento químico.....	98
2.10.5. Análisis del transporte de análogos de fosfolípidos en vesículas secretoras.....	98

IV. RESULTADOS.....	101
1. AISLAMIENTO DE GENES TIPO ABCG DE <i>L. INFANTUM</i>	101
1.1. Aislamiento de los genes <i>LiABCG4</i> y <i>LiABCG6</i>	101
1.2. Análisis de la secuencia y análisis predictivo de la estructura de las proteínas <i>LiABCG4</i> y <i>LiABCG6</i>	102
2. ORGANIZACIÓN GENÓMICA DE LOS GENES <i>LiABCG4</i> Y <i>LiABCG6</i>	108
2.1. Caracterización de la subfamilia ABCG en <i>Leishmania</i>	108
2.2. Organización genómica de <i>LiABCG4</i> y <i>LiABCG6</i>	109
RESULTADOS I: LIABCG4.....	110
3. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES FRENTE A LA PROTEÍNA <i>LiABCG4</i>	110
3.1. Obtención de péptido recombinante para inmunización.....	110
3.2. Purificación del péptido recombinante <i>LiABCG4</i> -Ac.....	112
3.3. Obtención y titulación del suero inmune frente a <i>LiABCG4</i>	112
4. OBTENCIÓN DE PARÁSITOS TRANSFECTADOS CON EL GEN <i>LiABCG4</i>	112
4.1. Clonaje del gen <i>LiABCG4</i> en el vector de expresión.....	112
4.2. Transfección de <i>L. infantum</i>	113
4.3. Caracterización genómica de los parásitos transfectados con el gen <i>LiABCG4</i>	114
4.4. Análisis de la expresión de <i>LiABCG4</i> en los parásitos transfectados.....	115
4.4.1. Mediante <i>Northern blot</i>	115
4.4.2. Inmunodetección mediante <i>Western blot</i>	116
4.5. Obtención de parásitos que sobreexpresan la proteína <i>LiABCG4</i> mutada.....	117
5. LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA <i>LiABCG4</i> EN <i>L. INFANTUM</i>	117
5.1. Obtención de parásitos que sobreexpresan <i>LiABCG4</i> fusionada a GFP.....	117
5.2. Localización de la proteína <i>LiABCG4</i>	121
6. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA <i>LiABCG4</i>	122
6.1. Caracterización en <i>L. infantum</i>	122
6.1.1. Estudios de internalización de análogos de fosfolípidos.....	122
6.1.2. Ensayos de resistencia a fármacos.....	125
6.1.3. Ensayos de acumulación y eflujo de miltefosina radiactiva.....	128
6.2. Expresión heteróloga de la proteína <i>LiABCG4</i> en levaduras.....	129
6.2.1. Clonaje en los vectores de expresión.....	129
6.2.2. Expresión y localización de <i>LiABCG4</i>	130
6.2.3. Expresión de <i>LiABCG4</i> en vesículas secretoras.....	132
6.2.4. Transporte de lípidos mediado por <i>LiABCG4</i> en vesículas secretoras.....	134
6.2.5. Sensibilidad a alquil-fosfolípidos en levaduras que sobreexpresan <i>LiABCG4</i>	136
RESULTADOS II: LIABCG6.....	138
8. LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA <i>LiABCG6</i>	138

8.1. Obtención de parásitos que sobreexpresan LiABCG6 fusionada a GFP.....	138
8.2. Localización de la proteína LiABCG6 en <i>L. infantum</i>	140
9. OBTENCIÓN DE PARÁSITOS TRANSFECTADOS CON EL GEN <i>LiABCG6</i>.....	141
9.1. Clonaje en el vector de expresión.....	141
9.2. Análisis de la expresión de <i>LiABCG6</i> en los parásitos transfectados mediante <i>Northern blot</i>	142
10. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA LiABCG6.....	143
10.1. Caracterización en <i>L. infantum</i>	143
10.1.1. Estudios de internalización de análogos de fosfolípidos.....	143
10.1.2. Ensayos de resistencia a fármacos.....	145
10.1.3. Ensayos de acumulación de miltefosina radiactiva.....	146
10.2. Expresión heteróloga del gen <i>LiABCG6</i> en levaduras.....	146
10.2.1. Clonaje en el vector de expresión.....	146
10.2.2. Expresión y localización de LiABCG6.....	147
10.2.3. Sensibilidad a alquil-fosfolípidos en levaduras que sobreexpresan LiABCG6.....	149
V. DISCUSIÓN.....	151
1. SITUACIÓN ACTUAL DE LA LEISHMANIASIS.....	151
2. TRANSPORTADORES ABC EN LEISHMANIA.....	153
2.1. Caracterización molecular de la subfamilia ABCG de <i>L. infantum</i>	155
2.2. Análisis de la secuencia aminoacídica de LiABCG4 y LiABCG6.....	157
3. EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>LiABCG4</i> Y <i>LiABCG6</i> EN <i>L. INFANTUM</i>	159
3.1. Sobreexpresión de los genes <i>LiABCG4</i> y <i>LiABCG6</i>	159
3.2. Localización de LiABCG4 y LiABCG6.....	161
4. ESTUDIOS FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS LiABCG4 Y LiABCG6 DE <i>L. INFANTUM</i>	163
4.1. Caracterización en <i>L. infantum</i>	163
4.1.1. Implicación en el transporte de lípidos.....	163
4.1.2. Sensibilidad a fármacos.....	166
4.1.3. Acumulación y eflujo de miltefosina radiactiva.....	168
4.2. Expresión heteróloga de las proteínas LiABCG4 y LiABCG6 en levaduras.....	169
4.2.1. Expresión y localización de LiABCG4 y LiABCG6.....	169
4.2.2. Expresión de LiABCG4 en vesículas secretoras.....	171
4.2.3. Transporte de lípidos mediado por LiABCG4 en vesículas secretoras.....	172
6. PERSPECTIVAS.....	173
VI. CONCLUSIONES.....	175

VII. BIBLIOGRAFÍA	177
VIII. APÉNDICE	207

ABREVIATURAS

ABC	<i>ATP-Binding Cassette</i>
BSA	Albúmina de suero bovina
C ₆ -NBD-PC	palmitoil-(nitrobenzoxadiazol-hexanoil)-fosfatidilcolina
C ₆ -NBD-PE	palmitoil-(nitrobenzoxadiazol-hexanoil)-fosfatidiletanolamina
C ₆ -NBD-PS	palmitoil-(nitrobenzoxadiazol-hexanoil)-fosfatidilserina
C ₆ -NBD-SM	palmitoil-(nitrobenzoxadiazol-hexanoil)-esfingomielina
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane regulator</i>
DEPC	Dietil-pirocarbonato
DFP	Diisopropil-fluorofosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
GFP	Proteína verde fluorescente
GPI	Glicosil-fosfatidil-inositol
G418	Geneticina
IC50	Concentración inhibitoria del 50% del crecimiento
IL	Interleuquina
IFN	Interferón
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalacto-piranósido
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
LPG	Lipofosfoglicano
MDR	Multirresistencia a fármacos
MP	Membrana plasmática
MRP	Proteína asociada a multirresistencia
MTT	bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio
MVT	Túbulo multivesicular
NBS	Dominio de unión a nucleótidos (<i>nucleotide binding site</i>)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PC	Fosfatidilcolina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Fosfatidiletanolamina
Pgp	Glicoproteína-P

Abreviaturas

PMN	Granulocitos polimorfonucleares
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPG	Proteofosfoglicano
PS	Fosfatidilserina
PVDF	poli(difluoruro de vinilideno)
RE	Retículo endoplasmático
SBF	Suero bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato sódico
SM	Esfingomiélinea
TGN	Red de vesículas del trans-Golgi
TMD	Dominio transmembrana
TNF	Factor de necrosis tumoral
UTR	Región no codificante

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. LEISHMANIASIS

1.1. Generalidades.

La leishmaniasis es un conjunto de enfermedades parasitarias, con una amplia diversidad clínica y epidemiológica, causada por protozoos parásitos del género *Leishmania*.

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), actualmente hay un total de 350 millones de personas en situación de riesgo, de las que 12 millones están afectadas por la enfermedad, estimándose entre 1,5-2 millones de nuevos casos por año (Hirst y Stapley, 2000; Murray *et al.*, 2005) (<http://www.who.int/tdr/diseases>). La leishmaniasis es endémica en 88 países, 22 en el Nuevo Mundo y 66 en el Viejo Mundo, estando ausente en Australia y Oceanía (Fig. I-1). El 90% de los casos de leishmaniasis cutánea se localizan en Afganistán, Pakistán, Siria, Arabia Saudita, Argelia, Irán, Brasil y Perú; y más del 90% de los casos de leishmaniasis visceral se encuentran en la India, Bangladesh, Nepal, Sudán y Brasil (Murray *et al.*, 2005). La distribución geográfica de la leishmaniasis está relacionada con la distribución del vector, el cual es sensible a climas fríos, así como con su capacidad para soportar el desarrollo de determinadas especies de *Leishmania*.

La leishmaniasis afecta principalmente a los países en vías de desarrollo, concretamente a la población de más bajo nivel socio-económico, con una capacidad muy limitada a la hora de asumir los costes de la enfermedad (diagnóstico, hospitalización y tratamiento) (Desjeux, 2004).

La expansión de la leishmaniasis está relacionada con cambios medioambientales como la deforestación y la migración de personas no inmunes a las áreas endémicas. Además, la co-infección *Leishmania*-HIV ha aparecido como una enfermedad infecciosa emergente en la que el número de casos descritos está subestimado debido a las dificultades existentes en el reconocimiento, diagnóstico y seguimiento de ambas enfermedades en los países en vías de desarrollo (Wolday *et al.*, 1999).

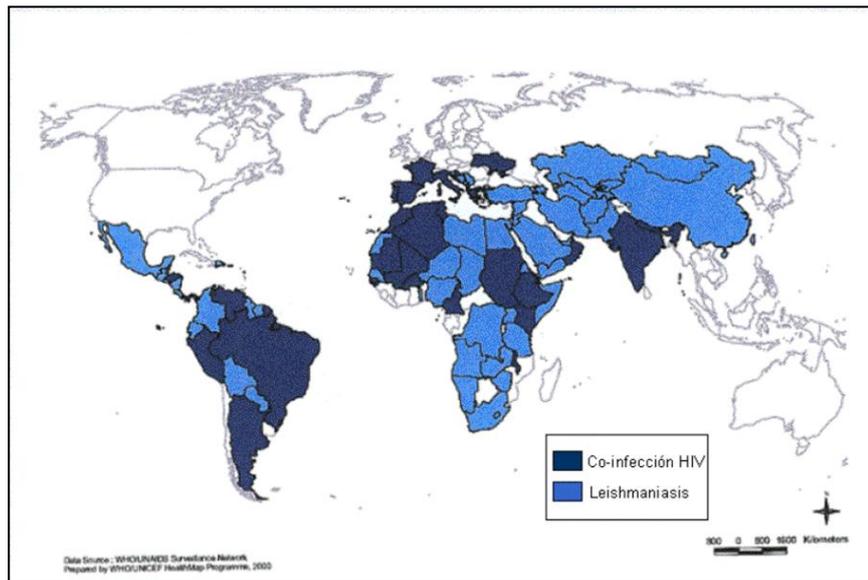


Figura I-1. Distribución geográfica de la leishmaniasis y países donde se ha descrito co-infección *Leishmania*-HIV. En azul claro están representadas las regiones con leishmaniasis, en azul oscuro las regiones donde se ha observado co-infección con el virus HIV (OMS).

1.2. Agente etiológico: *Leishmania*.

Leishmania es un protozoo parásito intracelular monoflagelado que pertenece a la familia *Trypanosomatidae*, orden *Kinetoplastida*, clase *Zoomastigophorea*, filum *Sarcomastogophora*. Su clasificación taxonómica aceptada actualmente incluye el complejo *L. mexicana* que comprende tres especies (*L. mexicana*, *L. enriettii* y *L. amazonensis*), un complejo *L. donovani* con tres especies (*L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi*), las especies *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, y un grupo del subgénero *Viannia* con otras cuatro especies (*L. (V) braziliensis*, *L. (V) guayanensis*, *L. (V) panamensis* y *L. (V) peruviana*). Las diferentes especies son muy similares morfológicamente, aunque se diferencian por su composición en isoenzimas, antígenos, patología y sensibilidad a fármacos (Grimaldi *et al.*, 1989; Walton, 1989).

1.3. Ciclo de vida de *Leishmania*.

Leishmania tiene un **ciclo de vida digenético** que incluye dos formas distintas del parásito. La forma **promastigota** (Fig. I-2A), alargada, flagelada y móvil, se desarrolla en el tracto digestivo del **hospedador invertebrado** (insectos hembras de los géneros *Plebotomus* y *Lutzomya* (Fig. I-2B) y la forma **amastigota** intracelular, no flagelada, que se desarrolla en células del **sistema mononuclear del hospedador vertebrado** (Fig. I-2C). El ciclo se inicia cuando las formas promastigotas metacíclicas, altamente infectivas, son inoculadas en el **hospedador vertebrado** mediante la picadura del insecto (Fig. I-3-1) y son rápidamente fagocitados por células del sistema mononuclear del mamífero (Fig. I-3-2). El fagosoma formado se fusiona con los lisosomas del **macrófago**, originando la vacuola fagolisosómica, donde el parásito se diferencia a la forma amastigota, capaz de dividirse por fisión binaria hasta romper la célula (Fig. I-3-3), liberándose para infectar otros macrófagos cercanos o de otros tejidos tras diseminarse. El ciclo se completa cuando el vector invertebrado ingiere macrófagos infectados al alimentarse de la sangre del hospedador vertebrado (Fig. I-3-4). Estos macrófagos se desintegran en la probóscide del insecto vector liberándose los amastigotes que, en un mínimo de siete días, se transformarán de nuevo en la forma promastigota, pudiendo ser nuevamente inoculados a un hospedador vertebrado. (Chang *et al.*, 1985).

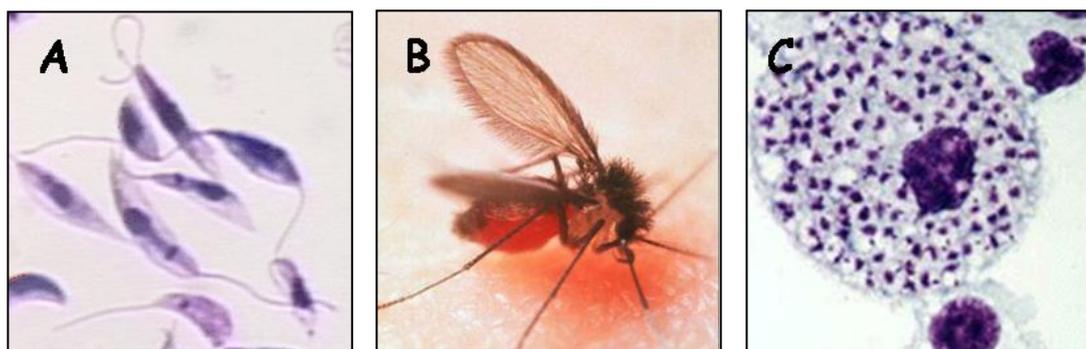


Figura I-2. Diferentes estadios del parásito. Promastigotes (A) y amastigotes intracelulares (C). Mosquito hembra del género *Phlebotomus* (B).

La mayoría de las leishmaniasis son **zoonosis** (transmitidas al hombre por los animales), donde el hombre es infectado al exponerse de forma accidental al ciclo natural de transmisión de la enfermedad en el cual los hospedadores vertebrados infectados, que actúan como reservorios, son animales. La familia del perro (lobo, zorro, perro y otros), y algunos pequeños roedores salvajes representan un importante grupo de reservorios. Por ejemplo, la rata es un importante reservorio en el área mediterránea. En el caso de *L. aethiopica*, el principal reservorio es el puerco-espín (*Procavia capensis*). Sin embargo, la leishmaniasis puede ser una **antroponosis** (leishmaniasis transmitida de una persona a otra a través del insecto vector), como se ha observado en algunas zonas de la India, donde el hombre parece ser el único hospedador reservorio (Modabber *et al.*, 1993); estos focos son fuente de epidemias de leishmaniasis visceral (Desjeux, 2004).

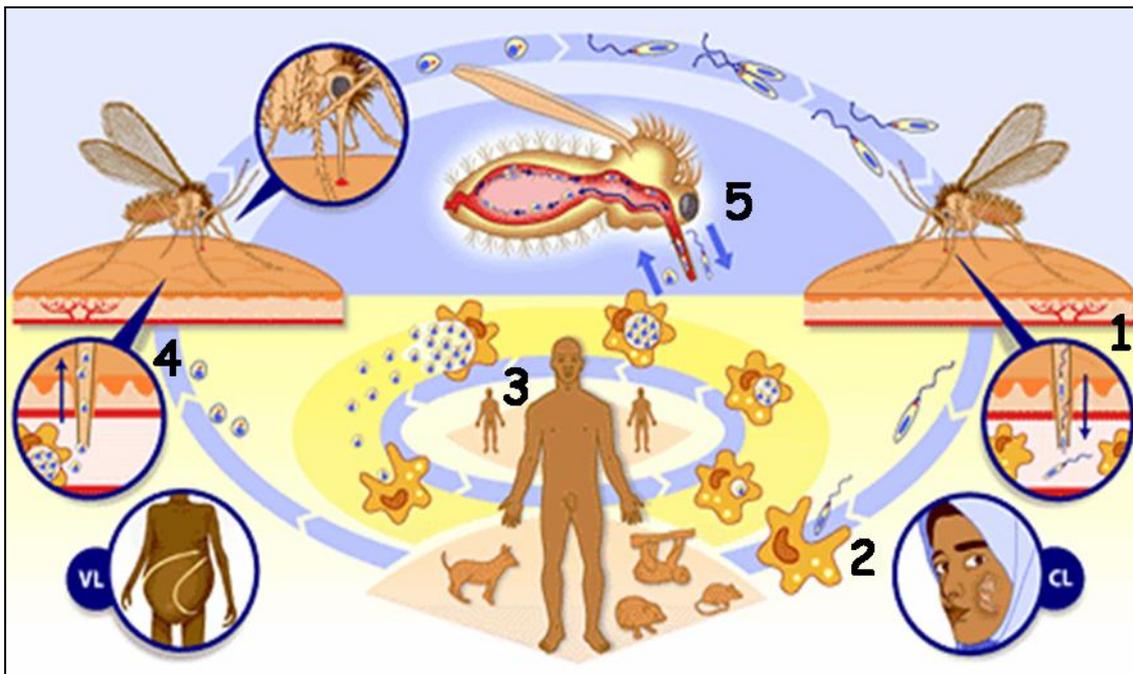


Figura I-2. Ciclo de vida de *Leishmania*. Mediante la picadura del insecto, los promastigotes infectivos son inoculados en el torrente sanguíneo del hospedador vertebrado (1), donde son fagocitados por los macrófagos (2). Tras la formación del fagosoma, los amastigotes se replican dentro del macrófago, lisando finalmente la célula para ser liberados e infectar nuevos macrófagos (3). El ciclo se cierra cuando el insecto vector ingiere macrófagos con amastigotes en una nueva picadura (4). Éstos vuelven a diferenciarse en promastigotes, se reproducen dentro del tracto intestinal del insecto y migran a la probóscide de éste (5) desde donde podrán ser inoculados nuevamente en el hospedador vertebrado tras una nueva picadura (1). VL: leishmaniasis visceral; CL: leishmaniasis cutánea.

1.4. Establecimiento de la infección.

Una vez transmitido al hospedador mamífero, *Leishmania* pasa al **torrente sanguíneo**, donde debe evitar ser destruido por el sistema inmune del hospedador (lisis mediada por el sistema del complemento) antes de infectar los **macrófagos**. Los promastigotes metacíclicos no sólo son capaces de **resistir la lisis del complemento**, sino que lo utilizan para entrar en los macrófagos (Descoteaux y Turco, 1999). La resistencia a la lisis es debida, en parte, a las moléculas de **lipofosfoglicano** (LPG) y a la metaloproteasa GP63, que los promastigotes expresan en grandes cantidades en sus membranas. LPG es también importante para la supervivencia de *Leishmania* en el insecto vector y recientemente se ha observado que una glectina repetida en tandem que se expresa en el intestino de *Phlebotomus papatasi* es usada por *L. major* como receptor para la unión al intestino del insecto (Kamhawi *et al.*, 2004).

Leishmania entra en el macrófago huésped mediante **fagocitosis mediada por receptor**, y se ha demostrado que tanto glicoproteínas asociadas a membrana como lípidos de la superficie del parásito están implicados en la adhesión de éste a la membrana plasmática del macrófago (Henriques y de Souza, 2000). En el reconocimiento e internalización del parásito participan varios receptores del macrófago, como son los receptores de la fibronectina, de la manosa-fucosa o receptores de complemento CR1 y CR3 (revisado por Alexander *et al.*, 1999). Un estudio reciente ha sugerido una variación del modelo, según la cual las primeras células fagocíticas que llegan al sitio de infección son los granulocitos polimorfonucleares (PMN), seguidos de oleadas de macrófagos unos dos días después. Los promastigotes de *Leishmania* serían internalizados por los PMN, sobreviviendo dentro de ellos, sin poder multiplicarse ni diferenciarse. Estos PMN infectados serían fagocitados por los macrófagos, donde *Leishmania* se diferenciaría y proliferaría (van Zandbergen *et al.*, 2004).

Una vez dentro del macrófago, los promastigotes metacíclicos son capaces de evitar la degradación, gracias a las moléculas de LPG y GP63 de su superficie. *Leishmania* se protege **inhibiendo mecanismos de defensa** tales como la señalización celular y producción de enzimas hidrolíticas, citoquinas y metabolitos tóxicos (revisado por (Denkers y Butcher, 2005; Gregory y Olivier, 2005). En una etapa posterior produce una activación alterada de ciertas funciones de los macrófagos, en particular la secreción de quimioquinas quimotácticas (revisado por Teixeira *et al.*, 2006). Los promastigotes tienen la capacidad de bloquear específicamente la expresión de IL-12 (citoquina inflamatoria)

que es esencial a la hora de desarrollar resistencia adquirida a patógenos intracelulares (Mosser y Karp, 1999). Además, LPG modula la expresión de moléculas de adhesión celular como ICAM-1 y VCAM-1, lo que reduce la capacidad de migración de los macrófagos. Es por esto que los sitios de infección con *Leishmania* están caracterizados por una alta concentración de macrófagos (Alexander *et al.*, 1999).

Los promastigotes endocitados por el macrófago son incluidos en un fagosoma conocido como la **vacuola parasitófora**, la cual presenta características de compartimento endosomal/lisosomal, está repleta de enzimas hidrolíticas y mantiene un pH ácido. Las moléculas de LPG protegen al promastigote de estas condiciones extremas y GP63 tiene actividad proteasa que protege al parásito de la degradación lisosomal. La vacuola parasitófora es una estructura dinámica que se forma a partir de la membrana plasmática la célula hospedadora, junto con otras tres estructuras citoplasmáticas como son los filamentos de actina, el sistema endosomal/lisosomal y el retículo endoplasmático (de Souza, 2005). Se sabe, además, que la formación y maduración de la vacuola es un proceso dinámico que implica un intercambio continuo de moléculas entre el parásito y el hospedador. Se ha visto que macromoléculas pertenecientes al hospedador entran en el promastigote por fagocitosis a través del bolsillo flagelar (Russell *et al.*, 1992). Igualmente, se ha demostrado que la vacuola parasitófora adquiere material citosólico mediante dos rutas independientes: una actividad transportadora de aniones orgánicos y un mecanismo de adquisición de macromoléculas modulado por compuestos que afectan a la autofagia (Schaible *et al.*, 1999).

1.5. Respuesta inmune del hospedador.

Cuando los promastigotes son inoculados, la piel del hospedador es la primera barrera que el parásito ha de atravesar. La **saliva del vector** contiene agentes de gran capacidad vasodilatadora (maxadilán, apirasa, prostaglandina E2) que inhiben la reacción de coagulación, lo que reduce la sensibilización e inflamación del hospedador, siendo ambas de gran importancia para la transmisión del parásito (de Almeida *et al.*, 2003). Los **PMN** son las primeras células que llegan al sitio de la infección por *Leishmania*, atraídas por moléculas no caracterizadas de la saliva del vector. En humanos, los PMN infectados con *Leishmania* secretan quimioquinas que atraen a más PMN. Los promastigotes pueden sobrevivir en el interior de las estas células, que serán

fagocitadas por los macrófagos, una vez que éstos lleguen al sitio de la infección. (revisado por Teixeira *et al.*, 2006).

Como cualquier cuerpo extraño que penetre en nuestro organismo, la entrada de *Leishmania* en el torrente sanguíneo desencadena una **respuesta inmune humoral**, pero dicha respuesta no es efectiva contra el parásito, puesto que se protege de ella como forma amastigote en el interior de los fagolisosomas de los macrófagos. Por lo tanto, los anticuerpos no son efectivos contra la infección, pudiendo incluso llegar a ser perjudiciales para el hospedador (Cunningham, 2002). Según esto, la **respuesta celular** dirigida por las células T *helper* (Th) pasa a desempeñar un papel importante en la respuesta inmune.

En esta respuesta inmune, los antígenos son captados, degradados y procesados por las células presentadoras de antígenos, entre las que destacan las células de Langerhans, pertenecientes a la familia de las células dendríticas. Los determinantes antigénicos son expuestos en la superficie de estas células y la activación de los linfocitos T precisa no sólo esta presentación, sino la interacción de ligandos del linfocito con otros receptores de las células presentadoras de antígenos, lo que determina una correcta señalización y activación. *Leishmania* inhibe parcialmente esta coestimulación. Es necesaria otra señal mediada por factores coestimuladores (adhesión de moléculas, citoquinas), que actúan de forma sinérgica para inducir el estado efector de la respuesta inmune. Los defectos en la transmisión de señales se traducen en **lesiones cutáneas**, y, si hay fallos en la coestimulación, el linfocito se hace incapaz de responder, o deriva a la muerte celular programada o apoptosis; la consecuencia clínica es la aparición de **leishmaniasis visceral** o de la **forma cutánea difusa**. Las distintas patologías causadas por las distintas especies de *Leishmania* se pueden explicar en función de su capacidad para activar eventos proinflamatorios o para reclutar células inflamatorias (Olivier *et al.*, 2005). *Leishmania* ha desarrollado estrategias para modular negativamente las rutas de señalización que conducen a la apoptosis celular prolongando, por lo tanto, la vida de la célula hospedadora y su propia supervivencia intracelular (Sacks *et al.*, 2000; Wanderley *et al.*, 2005).

En el modelo murino, las células Th se diferencian en dos subclases funcionalmente distintas, definidas por el perfil de citoquinas producido tras la infección por *L. major*. La **respuesta inmune Th1** es el elemento clave para prevenir la infección por *Leishmania*. En ratones resistentes se desarrolla una respuesta tipo Th1 con producción de interleuquina IL-2, interferón- γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral (TNF- α), lo que lleva a una reacción de hipersensibilidad retardada que termina en la curación de la lesión. Los

ratones susceptibles desarrollan una **respuesta Th2** con producción de IL-4, IL-5, e IL-10 que provoca una activación de linfocitos B con la consiguiente formación de anticuerpos, principalmente IgG, que son incapaces de contrarrestar al parásito intracelular, por lo que la enfermedad se disemina y el ratón muere. Es decir, la respuesta Th2 estimula la inmunidad humoral y, además inhibe la proliferación de la respuesta Th1 haciendo al macrófago poco susceptible para la activación por IFN- γ (revisado por Awasthi *et al.*, 2004). El IFN- γ junto con TNF- α producido por los macrófagos infectados estimula la producción de óxido nítrico mediante la activación del gen de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), lo que resulta tóxico para el parásito (Kane y Mosser, 2000). En el humano, durante el proceso de infección, tiene lugar una producción de células Th1 relacionadas con la protección, mientras que la proliferación de los clones Th2 se da con la propia enfermedad. Las células dendríticas producen interleuquina-12 (IL-12), que promueve la diferenciación de las células Th1 e induce la producción de IFN- γ y células *natural killer* (Herwaldt, 1999). La interleuquina IL-4 es esencial para la diferenciación de las células Th2, lo que confiere susceptibilidad frente a *Leishmania* mediante una regulación negativa de IL-12 e inhibición de la producción de IFN- γ , del receptor de IL-12 y de óxido nítrico (Alexander *et al.*, 1999). También se acepta que el IFN- γ estimula la diferenciación de los linfocitos CD4+ en las células propias de la respuesta Th1.

Los **macrófagos** desarrollan diferentes estrategias de lucha frente al parásito fagocitado, como es el desencadenamiento de un **proceso oxidativo** que produce una alta cantidad de radicales libres que interaccionan con las membranas del parásito, desestabilizándolas. También consiguen una **acidificación del medio intracelular** que conlleva la desnaturalización de las proteínas del parásito, quedando su DNA, RNA, proteínas y carbohidratos expuestos a la acción de hidrolasas ácidas (Cunningham, 2002).

Los antígenos de amastigotes y promastigotes provocan respuestas de interleuquinas cualitativamente distintas, de forma que los primeros provocan una respuesta celular más potente. Se sabe que el macrófago es capaz de matar promastigotes mediante la producción de metabolitos oxigenados en una primera etapa, y de óxido nítrico en una segunda, matando a los amastigotes.

El hecho de que ciertas formas de leishmaniasis cutáneas remitan espontáneamente y se adquiera resistencia a la reinfección, indica que es posible desarrollar inmunidad

frente al parásito, lo que hace pensar que la **vacunación preventiva** es un buen camino para controlar la enfermedad (de Almeida *et al.*, 2003).

1.6. Manifestaciones clínicas.

El resultado de la infección de *Leishmania* depende no sólo de las **especies** que inician la enfermedad, sino también del estado inmunológico del individuo a la hora de combatir el crecimiento del parásito. Y, aunque el estado general del hospedador y su condición fisiológica puede influir en la progresión de la enfermedad, existe una **predisposición genética** que sin duda tiene una gran importancia a la hora de determinar el resultado de la infección (Alexander *et al.*, 1999).

Existen tres manifestaciones clínicas principales, causadas por distintas especies de *Leishmania*: leishmaniasis visceral, cutánea y mucocutánea (Herwaldt, 1999).

-Leishmaniasis visceral. También conocida como kala-azar (término hindú para “fiebre negra”) (Fig. I-4). Está producida predominantemente por *L. donovani* en la India, este de Asia y África (en adultos y niños), y por *L. infantum* y *L. chagasi* en la cuenca mediterránea, Asia central y América del Sur (en niños pequeños). Es la forma más severa de la enfermedad, que puede resultar mortal si no se trata. Consiste en una infección generalizada del sistema retículo-endotelial que afecta al bazo, hígado, médula y nódulos linfáticos. La enfermedad se caracteriza por fiebre, esplenomegalia, hepatomegalia, y aumento de los nódulos linfáticos y amígdalas. Los síntomas incluyen malestar general, fiebre, debilidad, anorexia, anemia y abdomen inflamado como consecuencia del aumento del tamaño del hígado y bazo. Un tratamiento inadecuado puede llevar a lesiones cutáneas conocidas como “post kala-azar”, que pueden desaparecer fácilmente con tratamiento. La mayoría de las infecciones viscerales son asintomáticas en individuos inmunocompetentes.

-Leishmaniasis cutánea. También denominada “botón de oriente” (Fig. I-5). Es la manifestación más común de la enfermedad producida por *L. tropica* (en regiones pobladas de Etiopía, Kenya, norte de África, Oriente Medio e India) y *L. major* (en regiones relativamente deshabitadas del norte de África, Oriente Medio, India y Sudán). La enfermedad consiste en úlceras cutáneas localizadas generalmente en el sitio de la picadura del mosquito, ya que los amastigotes se replican en el sistema retículo-

endotelial y células linfoides de la piel. El período de incubación puede durar desde unos días a meses. Una pápula rojiza aparece en el sitio de la picadura, mostrando una infiltración de células plasmáticas, linfocitos y macrófagos. En casos sin complicaciones, la úlcera suele sanar espontáneamente en el plazo de 2 meses a un año. Sin embargo, son comunes las infecciones secundarias, que dejan cicatrices permanentes. Una variedad es la **leishmaniasis cutánea difusa**, caracterizada por lesiones nodulares diseminadas que recuerdan a la lepra. Las lesiones no suelen ser ulcerosas, pero no son fáciles de curar.

-Leishmaniasis mucocutánea. También conocida como “espundia” (Fig. I-6). Producida por *L. braziliensis* en América Central y del Sur, y transmitida por mosquitos del género *Lutzomyia*. La lesión inicial aparece en el sitio de la picadura, de modo similar a otras especies de *Leishmania*, pero la infección afecta las mucosas de la nariz y la cavidad bucal, produciendo degeneración de los tejidos cartilagosos. Estas ulceraciones generalmente desfiguran la nariz, labios y faringe. La muerte se suele deber a infecciones secundarias con bacterias o malnutrición.

En el caso de *L. mexicana*, en América Central, que generalmente es responsable de la leishmaniasis cutánea, puede llegar a afectar a las regiones mucocutáneas del cuerpo. Normalmente se cura espontáneamente en unos pocos meses, pero si la infección tiene lugar en el oído, se desfigura el pabellón auditivo, llegando incluso a destruirse.

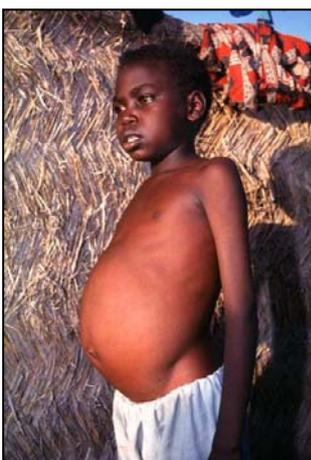


Figura I-4. Paciente con leishmaniasis visceral



Figura I-5. Lesión en leishmaniasis cutánea

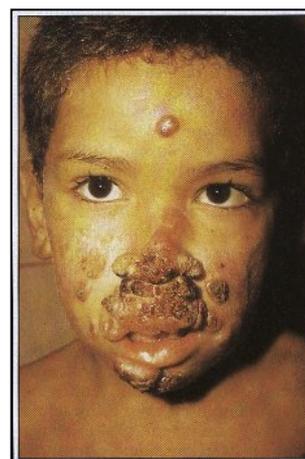


Figura I-6. Leishmaniasis mucocutánea

1.6.1. Coinfección con HIV.

La leishmaniasis visceral está emergiendo como una **infección oportunista** de gran seriedad entre enfermos de SIDA (WHO, 2000). Aunque los mosquitos infectados con *Leishmania* sp. pican a menudo a los humanos, éstos generalmente no desarrollan la enfermedad. Sin embargo, en personas inmunodeprimidas como resultado de una infección avanzada de HIV, por tratamiento inmunodepresivo para el trasplante de órganos o por enfermedades autoinmunes, los casos suelen evolucionar rápidamente hacia una leishmaniasis severa.

Por otra parte, tanto *Leishmania* como HIV pueden infectar y multiplicarse en los macrófagos, produciendo alteraciones y deficiencias en el sistema inmune. El parásito parece ser un cofactor en la patogénesis de la infección de HIV puesto que una de las moléculas mayoritarias de la superficie de *L. donovani*, el lipofosfoglicano, induce la transcripción de HIV en células CD4. Además, el HIV puede incrementar el crecimiento intracelular de los parásitos en los macrófagos (Olivier *et al.*, 2003; Russo *et al.*, 2003; Wolday *et al.*, 1999). De hecho, el SIDA aumenta el riesgo de leishmaniasis visceral de 100 a 1000 veces en áreas endémicas (WHO, 2000).

Los casos de coinfección *Leishmania*- HIV son cada vez más frecuentes en distintas partes del mundo, por lo que se espera una incidencia aún mayor en los próximos años, siendo una de las prioridades de la OMS. Actualmente se les considera un problema real (WHO, 2000), especialmente en el sur-oeste de Europa, donde se ha detectado el 90% de los casos. De éstos, la mayoría se dieron en España (alrededor del 60%), e incide especialmente en adictos a drogas por vía parenteral (71%), lo que indica la posibilidad de transmisión a través de jeringuillas contaminadas. Este hecho podría considerarse como un ciclo alternativo en la transmisión de la leishmaniasis, caracterizado por ser artificial, epidémico y antroponótico (revisado por Cruz *et al.*, 2006).

1.7. Tratamiento.

Puesto que no existen vacunas efectivas ni programas de control del vector, la **quimioterapia** es el principal recurso de defensa frente a la leishmaniasis, si bien el tratamiento de la enfermedad continúa siendo problemático.

La primera línea de tratamiento frente a la leishmaniasis visceral la constituyen los **antimoniales pentavalentes**: estibogluconato de sodio (Pentostam®) y antimonio de meglumine (Glucantime®). Su mecanismo de acción exacto se desconoce, si bien se sabe que interfieren con la glucólisis y la β -oxidación de los ácidos grasos, produciendo una depleción del ATP celular; recientemente se ha visto que median la fragmentación del DNA en *Leishmania*, lo que sugiere que podrían matar al parásito por un proceso similar a la apoptosis (revisado por Ouellette *et al.*, 2004).

Estos fármacos convencionales han dejado de ser eficientes debido a su toxicidad, los efectos secundarios y a la aparición de casos resistentes. El 50-80% de los casos de leishmaniasis visceral en el Estado de Bihar (India) son resistentes al Glucantime (Sundar, 2001), lo que, en gran parte, se ha debido a un mal uso de estos compuestos (administración de dosis subterapéuticas, interrupción del tratamiento, etc.).

La **pentamidina**, una diamidina aromática se ha usado durante años en el tratamiento de la leishmaniasis. Constituyó la segunda línea de tratamiento para casos de leishmaniasis visceral y cutánea que no respondían a antimoniales, si bien su eficacia ha disminuído rápidamente en India, lo que indica la aparición de parásitos resistentes (Sundar, 2001). El compuesto se acumula en la mitocondria del parásito, e inhibe la topoisomerasa II mitocondrial (Basselin *et al.*, 2002). La mayor desventaja consiste en su alta toxicidad ya que, a dosis terapéuticas, en el 30-50% de los pacientes aparecen efectos colaterales. La disminución en la eficacia, los casos de resistencia y la toxicidad asociada a este fármaco han provocado que no sea una alternativa aceptable para pacientes con leishmaniasis visceral, si bien se usa para la leishmaniasis cutánea y mucocutánea (Singh *et al.*, 2006).

Durante las dos últimas décadas se han introducido nuevas terapias para el tratamiento de la leishmaniasis.

El antibiótico poliénico **anfotericina B** es un fármaco antifúngico usado para el tratamiento de infecciones por hongos, que ha demostrado ser muy eficaz en el tratamiento de casos de leishmaniasis visceral resistentes a antimoniales. La anfotericina B se une a los esteroides de la membrana, preferentemente al ergosterol, lo que explica su eficacia contra *Leishmania*, ya que el parásito tiene ergosterol como esteroide mayoritario de la membrana. Varios estudios han confirmado que la anfotericina B produce poros en la membrana del parásito que alteran la permeabilidad a iones, lo que promueve su desorganización y despolarización (revisado por Leandro y Campino,

2003). Desgraciadamente, aunque muy efectiva, la anfotericina B es tóxica y tiene efectos secundarios graves. Sin embargo, en áreas donde los niveles de resistencia a antimoniales son elevados, la anfotericina B es el fármaco de elección. Existen nuevas formulaciones lipídicas de la anfotericina B (**Ambisome®**) que mantienen su alta capacidad leishmanicida mientras que disminuyen drásticamente la toxicidad (Sundar *et al.*, 2004). No se han descrito casos clínicos de resistencia a anfotericina B (revisado por Croft *et al.*, 2006b). Sin embargo, el precio de estos compuestos es prohibitivo para los afectados de países en vías de desarrollo. Se han usado otras formulaciones lipídicas de la anfotericina B también comerciales como son un complejo anfotericina B-lípido (Abelcet®), una dispersión coloidal de la anfotericina B (Anfocil™) y una formulación liposómica multilamelar, si bien son menos eficaces y ligeramente más tóxicas que el Ambisome® (revisado por Alvar *et al.*, 2006a). La OMS ha redactado un documento consenso sobre el uso de las formulaciones liposomales de la anfotericina B en el tratamiento de la leishmaniasis visceral. Sería importante realizar ensayos con combinaciones de fármacos en zonas con resistencias, así como estudios de tratamiento y profilaxis en pacientes co-infectados con HIV. Si se demuestra que es el fármaco más efectivo frente a la leishmaniasis visceral, sería esencial una reducción en el precio para facilitar el acceso al tratamiento (Bern *et al.*, 2006).

La **paromomicina** es un antibiótico aminoglicósido que actúa inhibiendo la síntesis proteica. Tiene una amplia actividad antiparasitaria, usándose por vía parenteral en casos de leishmaniasis visceral y de forma tópica para leishmaniasis cutánea. Administrada con antimoniales produce un efecto sinérgico (Singh y Sivakumar, 2004). Se han completado estudios comparativos en fase III en India para conseguir datos acerca de la eficacia y seguridad del uso de la paromomicina en la leishmaniasis visceral. Se ha registrado en Septiembre 2006 y se planea llevar a cabo estudios en fase IV (Alvar *et al.*, 2006a). La eficacia es similar a la de otros leishmanicidas, y la tolerabilidad es excelente, además de ser el fármaco menos costoso (revisado por Sundar y Chatterjee, 2006). Se siguen buscando formulaciones tópicas más efectivas y menos irritantes que las que existen actualmente para el caso de la leishmaniasis cutánea (Croft *et al.*, 2005).

El **alopurinol** es un análogo de purinas tóxico para el parásito puesto que interfiere con la síntesis del RNA. Su aplicación en solitario no ha dado resultados prometedores;

se ha usado en combinación con antimoniales o anfotericina B. Se usa principalmente contra la leishmaniasis canina (Singh y Sivakumar, 2004).

Se han estudiado otros fármacos antifúngicos, azoles (**ketoconazol**, **itraconazol**, **fluconazol**), como agentes leishmanicidas. Los azoles no han sido efectivos para el tratamiento de la leishmaniasis visceral usados individualmente; se suelen usar en combinación con alopurinol o antimoniales. El fluconazol ha sido muy eficaz frente a la leishmaniasis cutánea producida por *L. major* (Leandro y Campino, 2003).

Otro fármaco con propiedades leishmanicidas es la **sitamaquina**, actualmente en desarrollo por GlaxoSmithkline. Se trata de una 8-aminoquinoleína, análogo de la primaquina, usada desde hace 50 años para tratar la malaria (Baird y Rieckmann, 2003), y que presenta un amplio espectro de actividad antiprotozoaria (Yeates, 2002). Su mayor atractivo radica en su eficacia por vía oral. Aunque generalmente se tolera bien, se metaboliza rápidamente y la toxicidad parece ser relativamente baja, puede producir vómitos, dolor abdominal, y en algunos casos, efectos renales severos que obligan a continuar con la investigación (Wasunna *et al.*, 2005). En los estudios en fase clínica II llevados a cabo en India, la sitamaquina demostró una excelente actividad leishmanicida, si bien todavía es necesario evaluar ciertos aspectos de seguridad clínica. (Sundar y Chatterjee, 2006).

Su mecanismo de acción no se conoce a ciencia cierta. Se ha descrito que provoca un rápido colapso del potencial de membrana interno de la mitocondria, y la alcalinización de los acidocalcisomas (Vercesi *et al.*, 2000).

Un compuesto antiviral, **imiquimod**, se ha usado combinado con antimoniales para tratar pacientes con lesiones cutáneas que no respondieron al tratamiento previo con antimoniales. El imiquimod es un inmunomodulador de uso tópico que estimula la respuesta inmune local en el sitio de aplicación induciendo la producción de citoquinas y óxido nítrico en macrófagos (revisado por Croft *et al.*, 2006a).

Los alquil-fosfolípidos como la **miltefosina**, **edelfosina**, **perifosina** e **ilmofosina**, inicialmente desarrollados como fármacos antitumorales, son los compuestos más prometedores de cuántos se han propuesto como posibles leishmanicidas. Estudios en fase III llevados a cabo en la India demostraron que la **miltefosina oral** es muy eficaz contra la leishmaniasis visceral (Sundar y Rai, 2002), lo que supone un gran avance en

la quimioterapia contra la leishmaniasis. Se comercializó en India (2002) bajo el nombre de Impavido®, y en Colombia (2005). En India se espera que se pueda llegar a eliminar la enfermedad hacia 2015 (Ganguly, 2002).

Las principales limitaciones de la miltefosina se centran en su teratogenicidad, la elevada estabilidad que puede causar la aparición de resistencias, así como la variabilidad en la sensibilidad al fármaco que muestran las distintas especies de *Leishmania*, por lo que sería interesante optimizar su estructura (revisado por Croft *et al.*, 2006a). El modo de acción de la miltefosina no se conoce a ciencia cierta, pero está asociado con cambios en el metabolismo de los alquil-lípidos y la biosíntesis de fosfolípidos (Lux *et al.*, 2000, revisado por Urbina, 2006). Se observó que, en el promastigote, la miltefosina induce un proceso de muerte celular que recuerda a la apoptosis (Paris *et al.*, 2004).

En el caso de **coinfección *Leishmania*-HIV**, la mortalidad es elevada durante el primer mes tras el diagnóstico (alrededor del 25%), en parte debido a la toxicidad del tratamiento. Las tasas de cura con antimoniales son bajas (30-50%), y es muy frecuente la aparición de resistencias. Con la anfotericina B, se han alcanzado tasas de cura del 60%, pero se estima que el 25-60% de los pacientes sufren recaídas durante el primer año después de terminar el tratamiento. Estas recaídas se deben a la reactivación de parásitos latentes, puesto que el sistema inmune es incapaz de erradicar la infección, aunque los pacientes aparentemente se hayan recuperado (revisado por Cruz *et al.*, 2006). Cuando existen recaídas, el tratamiento se complica. La administración de miltefosina oral parece ser una alternativa prometedora, pero todavía debe establecerse un protocolo adecuado de administración (Sinha *et al.*, 2005).

Actualmente, no existe una política a nivel nacional o internacional para prevenir la emergencia de resistencia a fármacos leishmanicidas. El problema se podría abordar mediante el uso de combinaciones de fármacos. Dichas combinaciones han demostrado ser una característica esencial en la quimioterapia antimicrobiana para (i) incrementar la actividad a través del uso de compuestos con actividad sinérgica o aditiva, (ii) prevenir la emergencia de resistencia a fármacos, (iii) disminuir las dosis requeridas, reduciendo las probabilidades de efectos secundarios tóxicos, así como el coste, o bien (iv) aumentar el espectro de actividad (Alvar *et al.*, 2006a).

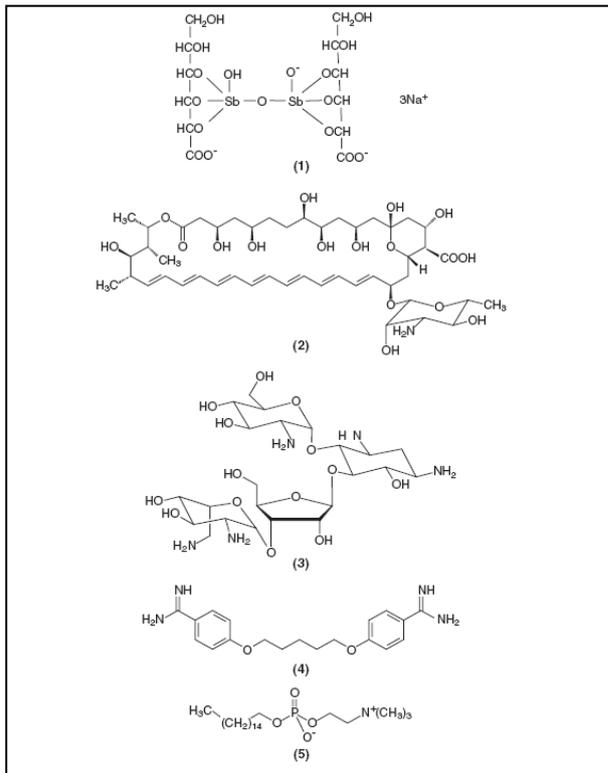


Figura I-7. Estructura de los fármacos utilizados en el tratamiento de la leishmaniasis.

(1) Pentostam. (2) Anfotericina B. (3) Paromomicina. (4) Pentamidina. (5) Miltefosina. Tomado de Alvar *et al.*, 2006.

La ausencia de un arsenal significativo de fármacos, así como el incremento de casos de **fallo terapéutico** frente a esta enfermedad parasitaria, obliga a establecer unas medidas de prevención y protección para, por un lado, preservar la eficacia de los fármacos actuales mediante una educación sanitaria en las zonas endémicas, y por otro lado, estimular la búsqueda de nuevos fármacos más eficaces y menos tóxicos que puedan ser empleados en los casos de fallo terapéutico.

El fallo terapéutico no es necesariamente sinónimo de resistencia a fármacos. En India, por ejemplo, existe una clara correlación entre lo que es fallo al tratamiento con antimoniales y resistencia intrínseca de los parásitos (Dube *et al.*, 2005; Lira *et al.*, 1999). Otros estudios llevados a cabo con especies del complejo *Viannia* han demostrado que la resistencia a fármacos contribuye, en la gran mayoría de los casos, al fallo terapéutico (Rojas *et al.*, 2006). Sin embargo, en Nepal, pacientes que no respondían al antimonio estaban infectados con cepas de parásitos sensibles, y recíprocamente, pacientes que respondían bien al tratamiento con antimoniales tenían cepas resistentes al antimonio (Rijal *et al.*, 2007). Todo esto indica que es necesario tener precaución a la hora de interpretar resultados y pone en tela de juicio la aplicación del concepto de fallo

terapéutico, por lo que son necesarios más estudios para considerar causas que, además de la resistencia intrínseca de los parásitos, puedan explicar el fallo terapéutico. Es necesario disponer de ensayos moleculares sencillos y de gran susceptibilidad para detectar claramente resistencia en aislados clínicos a los fármacos leishmanicidas (recomendación OMS, 2005). Su elucidación requiere previamente el estudio de los mecanismos de resistencia a fármacos en líneas experimentalmente resistentes a los fármacos más prometedores como la miltefosina, paromomicina y sitamaquina.

1.8. Mecanismos de resistencia a fármacos en *Leishmania*.

Una de las principales líneas de defensa frente a los patógenos es la **quimioterapia**. A su vez, uno de los problemas más importantes a los que se enfrenta la medicina es la aparición de mecanismos de **resistencia** a los fármacos utilizados en el tratamiento de las infecciones producidas por diferentes microorganismos patógenos, desde virus hasta parásitos, así como en el tratamiento del cáncer. Estos mecanismos han sido más estudiados en células tumorales, y muchos de ellos se han descrito también en parásitos (Fig. I-8).

Existen varios factores que pueden contribuir a la aparición de resistencias durante el tratamiento quimioterapéutico: no cumplir unas pautas de tratamiento adecuadas, la calidad del fármaco empleado, propiedades farmacocinéticas del fármaco, inaccesibilidad del fármaco a los sitios de localización del parásito, factores genéticos del hospedador, el estado inmune y la capacidad del parásito para desarrollar mecanismos de resistencia frente a los fármacos (que, en muchos casos, llevan siendo utilizados desde hace más de 50 años)(Sundar, 2001). Se ha descrito que la alta incidencia de resistencia a los antimoniales en el tratamiento de leishmaniasis visceral en la India se debe a la emergencia de líneas de *L. donovani* resistentes al antimonio (Lira *et al.*, 1999).

Algunos de los mecanismos descritos hasta el momento son:

-Amplificación de genes que codifican las enzimas blanco de acción (Beverly *et al.*, 1984).

-Amplificación de genes que codifican enzimas implicados en vías alternativas a la vía metabólica inhibida (Papadopoulou *et al.*, 1992) .

-Mutaciones puntuales que se traducen en cambios estructurales y/o funcionales en la proteína blanco de acción (Arrebola *et al.*, 1994).

- Alteraciones en el transporte del fármaco (Pérez-Victoria *et al.*, 2003b).
- Fenómeno de multirresistencia (MDR) (Pérez-Victoria *et al.*, 2006c).

La resistencia de *Leishmania* frente a un fármaco determinado puede ser natural, o bien adquirida cuando los parásitos se exponen a dosis sub-óptimas del fármaco. *Leishmania* tiene la capacidad de responder a la presión de fármacos de múltiples maneras (revisado por Croft *et al.*, 2006b).

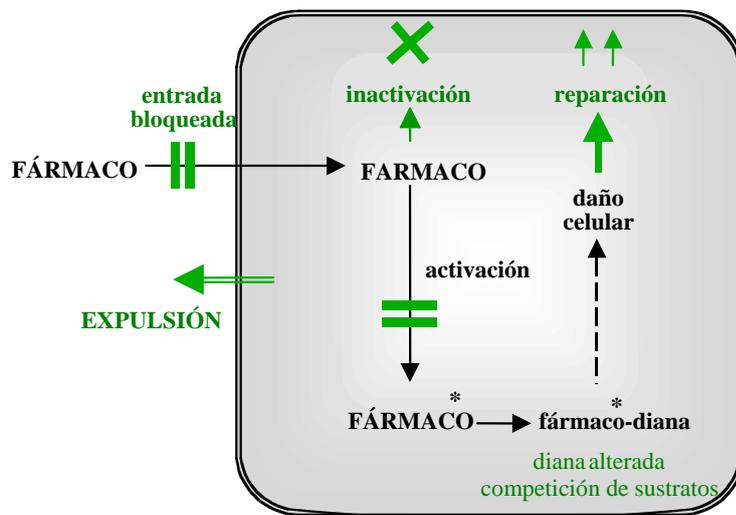


Figura I-8. Algunos de los mecanismos de resistencia a fármacos que podrían darse en protozoos parásitos. Para actuar, el fármaco debe entrar en la célula, en ocasiones ser activado, unirse a su blanco de acción y ejercer su efecto tóxico. La inhibición de algunos de estos pasos, o el aumento de los mecanismos de reparación del daño producido, puede generar resistencia a fármacos.

Entre los mecanismos moleculares propuestos para explicar la **resistencia a antimoniales**, destacan (revisado por Ouellette *et al.*, 2004; Singh, 2006): i) disminución de la reducción biológica de Sb^V a Sb^{III} ; ii) una alteración en la expresión de la aquagliceroporina 1, proteína responsable de la entrada de Sb^{III} ; iii) el incremento en los niveles de tripanotión, debido al aumento en la actividad de las enzimas limitantes en la síntesis de este tiol, la γ -glutamylcisteinsintetasa y/o la ornitina decarboxilasa; iv) el secuestro intracelular del Sb^{III} acompañado con tioles, mediado por la sobreexpresión de PgpA, un transportador perteneciente a la superfamilia ABC; y v) el eflujo de Sb^{III} acompañado con tioles mediado por un transportador aún desconocido. La mayoría de estos mecanismos han sido descritos experimentalmente *in vitro*, por lo que es muy importante estudiar si también están implicados en casos clínicos de resistencia. Estudios recientes con muestras clínicas han determinado que existen al menos dos proteínas que modularían la resistencia a antimoniales y otros fármacos, interfiriendo con la ruta de muerte celular programada (Vergnes *et al.*, 2006). Según esto, los

mecanismos de resistencia de los parásitos *in vivo* serían diferentes de aquellos parásitos resistentes seleccionados *in vitro*. Sin embargo, otros estudios realizados con muestras obtenidas en otra región geográfica, observan una disminución en la expresión de aquagliceroporina 1, proteína responsable de la entrada de Sb^{III} (Decuyper *et al.*, 2005).

En el caso de la **miltefosina**, se ha descrito un fenotipo de resistencia *in vitro* debido a una reducción en la acumulación del fármaco. Este fenotipo puede estar mediado por dos mecanismos independientes: i) un aumento en el **eflujo** del fármaco y ii) una **disminución en la entrada** del fármaco.

Se observó que una línea celular de *Leishmania* seleccionada mediante adaptación a concentraciones crecientes del fármaco antitumoral daunomicina contiene una amplificación y sobreexpresión del gen LMDR1 que presenta una alta similitud al de la glicoproteína-P (P-gp) humana (*MDR1*) (Pérez-Victoria *et al.*, 2001b). Estos parásitos presentaban resistencia cruzada a miltefosina, y una mayor velocidad de eflujo del fármaco, lo que sugiere que LMDR1 es la responsable de esta resistencia, actuando como **flopasa** de miltefosina (Pérez-Victoria *et al.*, 2001b; Pérez-Victoria *et al.*, 2006c).

Por otro lado, líneas de *L. donovani* resistentes a miltefosina seleccionadas *in vitro* han mostrado una **acumulación reducida** del fármaco (Pérez-Victoria *et al.*, 2003a), debido a un defecto en la translocación del fármaco de la cara externa a la cara interna de la membrana plasmática. El transportador de miltefosina (LdMT), perteneciente a la familia de ATPasas tipo-P de aminofosfolípido translocasas, fue aislado mediante rescate de la sensibilidad al fármaco a partir de una librería genómica de expresión (Pérez-Victoria *et al.*, 2003b). Se ha visto que mutaciones puntuales en posiciones distintas para cada uno de los dos alelos de la proteína estaban implicadas en este defecto en la internalización del fármaco. Además, el transportador de miltefosina LdMT requiere del concurso de la subunidad beta LdRos3 para que se produzca la translocación del fármaco. Por lo tanto, la disminución en la entrada de miltefosina se consigue tras la inactivación de cualquiera de las dos proteínas (revisado por Pérez-Victoria *et al.*, 2006a).

La miltefosina supone un gran descubrimiento en lo que al control de leishmaniasis se refiere, pero la facilidad con la que se obtienen resistencias *in vitro* es preocupante. Sería necesario ver si estas resistencias ocurren naturalmente, y, para disminuir el riesgo de aparición de fallos terapéuticos, sería aconsejable utilizar la miltefosina en combinación con otros fármacos.

1.9. Biología molecular y bioquímica de *Leishmania*.

La característica más peculiar de los organismos pertenecientes al orden Kinetoplastida, al que pertenece *Leishmania*, es poseer un orgánulo denominado **kinetoplasto** en el que se concentra todo el DNA de su única mitocondria y que se localiza cerca del cuerpo basal del flagelo. Este DNA mitocondrial se reparte en agrupaciones circulares y concatenadas, denominadas maxicírculos y minicírculos, y representa un 10-15% del DNA total del parásito (Feagin, 2000).

Otra característica excepcional de los tripanosomátidos es la **corrección del RNA mitocondrial** o RNA *editing* (Stuart y Panigrahi, 2002), un tipo de procesamiento post-transcripcional del RNA que consiste en la inserción o eliminación de uracilos en moléculas de RNA para crear codones de inicio y terminación, así como la secuencia que codifica la proteína a traducir. Esta actividad es llevada a cabo por el editosoma, un complejo multiproteico de alto peso molecular formado por la molécula de RNA a corregir, varias proteínas y los denominados RNAs-guía. Los RNAs-guía están codificados principalmente por el DNA de los minicírculos, mientras que los RNAs a corregir son codificados desde el DNA de los maxicírculos (Shapiro y Englund, 1995).

Al igual que en procariotas, *Leishmania* realiza una **transcripción policistronica** en la que se generan RNAs inmaduros constituidos por los transcritos de varios genes cuya maduración se produce mediante **trans-splicing** (Fig. I-9), caracterizado por la adición de secuencias características en ambos extremos de cada uno de los transcritos. En el extremo 5' se adiciona un RNA de unos 40 nucleótidos, denominado **miniexón** o *spliced-leader*, y en el extremo 3' una cola de poliadeninas, mediante un mecanismo en el que ambos procesos están acoplados y en el que la inhibición de la inserción del miniexón conlleva un bloqueo de la poliadenilación del transcrito situado corriente arriba (LeBowitz *et al.*, 1993).

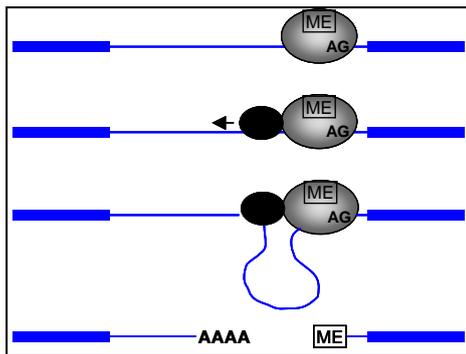


Figura I-9. Acoplamiento del *trans-splicing* y la poliadenilación. Modelo originalmente propuesto por LeBowitz *et al.* (1993) el cual plantea que la adición del miniexón (ME) a los extremos 5' de los mRNA recluta al complejo que participa en la poliadenilación, el cual a través de un mecanismo de rastreo 3'-5' encuentra el sitio adecuado para que ocurra el corte y la adición de la cola poliA. A partir de los resultados obtenidos por Ullu *et al.* (1993) se sabe que ambos eventos ocurren en un orden temporal preciso: el *trans-splicing* del gen ubicado corriente abajo precede a la poliadenilación del gen ubicado corriente arriba.

La secuencia aceptora del miniexón es normalmente el dinucleótido **AG** corriente arriba del marco abierto de lectura, precedido frecuentemente por una región rica en pirimidinas. Los tripanosomátidos carecen del sitio consenso AAUAAA para la poliadenilación y muestran heterogeneidad en el sitio de poliadenilación, con varios sitios posibles para ello, lo que sugiere que la terminación de la transcripción no está acoplada a la poliadenilación. Se observó que mutaciones puntuales en estos sitios aceptores afectan a la eficiencia del proceso (Hummel *et al.*, 2000). Aunque hasta hace poco no se habían identificado elementos promotores de la transcripción, se ha visto que un solo promotor bidireccional parece ser responsable de la expresión del cromosoma 1 de la cepa Friedlin de *Leishmania major* (Martínez-Calvillo *et al.*, 2003). En el cromosoma 3 de la misma cepa se ha visto que existen dos grandes grupos de genes convergentes, además de un único gen divergente en el extremo “izquierdo” del cromosoma. La transcripción comienza de forma bidireccional entre ese gen y el grupo de genes adyacente, así como en un sitio cercano al telómero “derecho” (Martínez-Calvillo *et al.*, 2004). Por otra parte, hasta el momento no se han encontrado intrones en los genes de *Leishmania*.

Leishmania major posee $33,6 \times 10^6$ pares de bases (33,6 Mb) por genoma haploide (Leishmania Genome Network, www.genedb.org), con un contenido en G+C del 60% (Álvarez *et al.*, 1994). Carece de condensación cromosómica en la mitosis (Vickerman y Preston, 1970), lo que imposibilitó la visualización de los cromosomas del parásito hasta que se desarrolló la técnica de electroforesis de campo pulsado (CHEF), en la que las bandas resueltas en geles de agarosa representan cromosomas completos, pudiéndose realizar “cariotipos” moleculares. Estos estudios pusieron de manifiesto la gran plasticidad cromosómica del parásito, ya que se suelen encontrar variaciones en el

tamaño de los cromosomas (Bastien *et al.*, 1992). Se estima que el número de cromosomas de *Leishmania* es de 36, con tamaños que oscilan entre 0.3 y 2.8 Mb (Wincker *et al.*, 1996). En general, la especie *Leishmania* se considera **diploide**, si bien el control de la ploidía no es estricto (Cruz y Tosi, 1996). Hasta el momento no se ha descrito que *Leishmania* posea reproducción sexual.

El **genoma** de *L. major* está secuenciado en su totalidad. Para el proyecto genoma de *Leishmania* se ha usado la cepa de *L. major* MHOM/IL/80/Friedlin (Ivens *et al.*, 2005) (www.genedb.org). Actualmente se está secuenciando el genoma de *L. infantum* clon JPCM5 (MCAN/ES/98/LLM-877). Se calcula un número de genes en torno a 8000, lo que equivaldría a un gen completo cada 3.5 Kb. Sin embargo, el número de proteínas es mucho mayor, lo que no puede deberse a procesos de splicing alternativos, puesto que *Leishmania* está desprovista de intrones (Ouellette *et al.*, 2003). Los primeros análisis indican que más de la mitad de estos genes serían únicos de *Leishmania*, y que una proporción bastante elevada no tienen función identificada.

El genoma de *Leishmania* tiene una elevada plasticidad, por lo que abundan los procesos de **amplificación génica** que utilizan en caso de estrés como la exposición a fármacos. Los genes no suelen tener promotores individuales, por lo que no pueden ser regulados a través de la iniciación de la transcripción. Cuando se necesitan niveles altos de ciertos transcritos, los genes aparecen con múltiples copias formando un tándem que se transcribe simultáneamente (Campbell *et al.*, 2003).

La **regulación de la expresión génica** en *Leishmania* se da predominantemente a nivel **post-transcripcional**, ya que los genes parecen transcribirse de forma constitutiva (Clayton, 2002). Existen varios puntos de regulación post-transcripcional en la expresión de genes de tripanosomátidos, como son los factores que afectan a la estabilidad del RNA mensajero, llegándose a identificar señales que median la estabilidad dentro de las regiones 3' no traducidas (UTR) (revisado por Teixeira y daRocha, 2003).

Leishmania se desarrolla en dos ambientes totalmente diferentes durante su ciclo de vida, por lo que existen una serie de diferencias en el metabolismo de los dos estadios del parásito. Los **promastigotes** se desarrollan en el intestino de mosquito y utilizan aminoácidos y azúcares como principal fuente de energía en condiciones aeróbicas, 25-27° C y pH 7. En cambio, los **amastigotes** proliferan en el interior de los fagolisosomas de los macrófagos del hospedador vertebrado, 37° C y pH 4-5, siendo la principal fuente

de energía los ácidos grasos de cadena larga, que son metabolizados por β -oxidación hasta CO_2 y agua. A pesar de estas diferencias, ambas formas de vida comparten una serie de características metabólicas muy diferentes de las del hospedador vertebrado, lo que proporciona dianas de interés para el diseño racional de fármacos (Balana-Fouce *et al.*, 1998).

Los **glicosomas** son orgánulos característicos de la familia Trypanosomatidae. Éstos son organelas formadas por una membrana simple que contienen todas las enzimas necesarias para realizar la glucólisis. También contienen sistemas enzimáticos peroxisomales típicos (revisado por Michels *et al.*, 2000), algunas enzimas implicadas en la biosíntesis de lípidos, además de enzimas que participan en la síntesis de pirimidinas y recuperación de purinas (Opperdoes, 1987).

Otros orgánulos característicos de los tripanosomátidos son los **acidocalcisomas**, orgánulos densos en los que se acumulan grandes cantidades de fósforo (pirofosfatos y polifosfatos) acoplados con calcio (Docampo y Moreno, 2001; Docampo *et al.*, 2005). En *Leishmania* la acumulación de calcio se ha relacionado con la virulencia del parásito (Lu *et al.*, 1997).

Entre los aspectos bioquímicos característicos de los tripanosomátidos destaca la presencia del **tripanotión** (bisglutacionil-espermidina), que juega un papel importante en el mantenimiento de un ambiente celular reductor, protegiendo al parásito del estrés químico y oxidativo (Krauth-Siegel *et al.*, 2003).

En el **metabolismo de purinas** existen diferencias con el hospedador, puesto que *Leishmania* es incapaz de sintetizar *de novo* el anillo de purina a partir de precursores metabólicos, y debe obtenerlo del hospedador. Es por esto que los parásitos han desarrollado un **sistema de transporte de purinas** desde el exterior muy activo y eficaz (Balana-Fouce *et al.*, 1998).

Por el contrario, sí se ha descrito que *Leishmania* posee la maquinaria necesaria para la **síntesis de novo de pirimidinas**. A diferencia del hospedador, las actividades timidilato sintasa (TS) y dihidrofolato reductasa (DHFR) se encuentran en una única proteína bifuncional, la **DHFR-TS** (Balana-Fouce *et al.*, 1998).

1.10. Componentes de la membrana de *Leishmania*.

La membrana plasmática de *Leishmania*, así como la de cualquier tripanosomátido, presenta tres características específicas que la diferencian de la de los eucariotas superiores. Toda la membrana plasmática se ve recubierta en su cara citoplasmática por una red de microtúbulos. La segunda característica específica de la membrana de los tripanosomátidos es debida probablemente a la anterior, ya que esa solidez impuesta por la red de microtúbulos restringe los procesos de endocitosis y exocitosis, que sólo se llevarán a cabo en una zona determinada de la membrana plasmática del parásito desprovista de éstos y situada en el extremo apical del parásito en la base del flagelo, denominada **bolsillo flagelar** (Overath *et al.*, 1997). Por último, *Leishmania* presenta una cubierta externa compuesta fundamentalmente por una gran cantidad de componentes con estructuras **GPI** (glicosilfosfatidilinositol) (Fig. I-10), la cual tiene una función de protección del parásito en procesos como la lisis mediada por complemento o por hidrolasas, a la vez que aportar virulencia. Las macromoléculas que componen esta envoltura externa son mayoritariamente glicoproteínas, proteofosfoglicanos (PPG) altamente glicosilados y lipofosfoglicanos (LPG) complejos (revisado por Ilgoutz y McConville, 2001).

Entre los componentes de la membrana del parásito anclados a GPI que contribuyen a la virulencia y patogénesis del parásito encontramos a la **glicoproteína GP63**. GP63 es la principal proteasa de la superficie de *Leishmania* perteneciente al grupo de las metaloproteasas. Tiene un tamaño de 63 KDa, y también se ha denominado leishmanolisina o PSP (de *promastigote surface protease*). Se expresa en promastigotes y amastigotes; cada promastigote está cubierto por 500.000 copias, lo que corresponde a un 1% del total de las proteínas celulares. Esta proteína facilita la evasión del parásito de la lisis mediada por complemento, puesto que es capaz de inactivar mediante procesamiento enzimático a ciertos componentes de este sistema como son los factores C3 o C3b. Igualmente, se sabe que actúa como una “opsonina”, facilitando la fijación del parásito a receptores del macrófago. Además, su actividad enzimática protege al amastigote de la degradación en el fagolisosoma (revisado por Yao *et al.*, 2003).

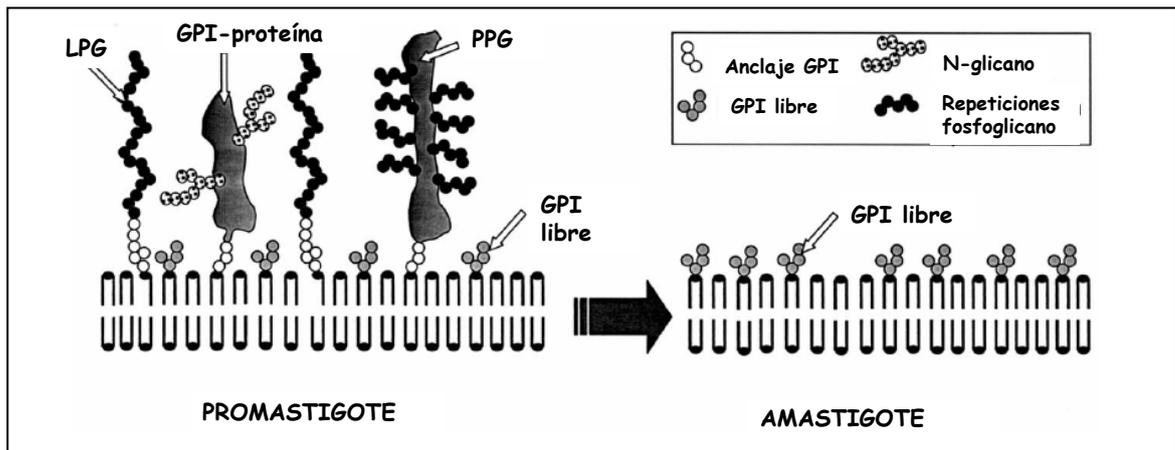


Figura I-10. Superficie celular de *Leishmania*. En la fase de promastigote, la cara externa de la membrana plasmática contiene varias clases de macromoléculas ancladas a GPI: lipofosfoglicanos (LPG), glicoproteínas (tales como GP63) y proteofosfolicanos (PPG). Por debajo de estas macromoléculas se encuentra una densa capa de GPIs libres. En la fase de amastigote, los GPIs se mantienen mientras que la expresión de las macromoléculas ancladas a GPI disminuye notablemente. Tomado de Ilgoutz y McConville (2001).

Los **LPG** son las macromoléculas más abundantes de la superficie de los promastigotes, ya que hay alrededor de 6 millones de unidades por células, y son además ubicuos en todas las especies de *Leishmania*. Al igual que los PPG presentan cadenas de fosfoglicanos, pero suelen ser mucho más largos, aunque tanto su longitud como su naturaleza varían en función del estado de desarrollo del parásito (McConville y Homans, 1992). Los LPG protegen al parásito frente a la respuesta humoral del hospedador, participan en la unión al macrófago, bloquean el proceso de maduración del fagosoma y defienden al parásito de la respuesta inmune inhibiendo la respuesta oxidativa o la traducción de señales del macrófago (revisado por Lodge y Descoteaux, 2005).

Durante la diferenciación de los promastigotes procíclicos a promastigotes metacíclicos (metaciclogénesis), la expresión de moléculas tales como LPGs o GP63 sufre modificaciones de importancia tanto a nivel cuantitativo como cualitativo (Muskus y Marín Villa, 2002).

Los **PPG** son menos abundantes que GP63 y LPG, pero no por ello dejan de ser componentes importantes en el glicocáliz de los promastigotes. Algunos de ellos también están anclados a la superficie por GPI, y están constituidos por un esqueleto polipeptídico modificado por cadenas complejas de fosfoglicano. Existen evidencias acerca de la contribución de los PPG al establecimiento de la infección en el hospedador por parte del parásito (Rogers *et al.*, 2004), no sólo a través de los fosfoglicanos, sino

también a través de unas estructuras con repeticiones de leucinas en el extremo N-terminal (Handman y Bullen, 2002).

Los glicolípidos **GPI libres** son numéricamente más abundantes que todas las macromoléculas ancladas a GPI juntas y, a diferencia de las anteriores, la cantidad de GPI libres no disminuye cuando los promastigotes se diferencian a amastigotes. Por ello, son los componentes de membrana más abundantes en la superficie de los amastigotes. Además, los amastigotes adquieren glicoesfingolípidos pertenecientes a los macrófagos que han infectado, lo que puede considerarse como un mecanismo de evasión inmune.

Mediante la selección de parásitos deficientes en cada uno de estos componentes, usando mutantes nulos de genes que participan en su biosíntesis y ensamblaje, se ha estudiado su función por evaluación tanto de las capacidades proliferativa e invasiva del parásito, así como por cambios en la supervivencia de éste en el interior del huésped. Así, Beverley y Turco (1998) identificaron varios genes involucrados en la síntesis de LPG, y se conoció que los LPG podían ser un factor de virulencia del parásito (Spath *et al.*, 2000). Se sabe que la eliminación de otro gen involucrado en la biosíntesis de LPG, *Lpg2*, produce parásitos viables pero incapaces de establecer una infección en el insecto vector (Sacks *et al.*, 2000) o que promastigotes mutantes en el gen *Lpg1*, deficientes en LPGs, tienen atenuada su virulencia, son susceptibles a la acción del complemento y sensibles a la respuesta oxidativa del macrófago (Spath *et al.*, 2003).

La diferencia más evidente con respecto a la naturaleza de los lípidos componentes de la superficie de *Leishmania*, es que el esteroles principal es el **ergosterol** (ergosta-5,7,24-trien-3 β -ol) y no el colesterol como ocurre en las células de mamíferos. Y, aunque el colesterol pueda representar en ocasiones el 50% del total de esteroides en promastigotes, el ergosterol no puede ser sustituido por colesterol para la supervivencia del parásito. Debido a la importancia que tiene el ergosterol para los tripanosomátidos, la inhibición de la ruta de síntesis se ha convertido en una estrategia de búsqueda de nuevos fármacos antiprotozoarios (Urbina, 1997). Por otra parte, los lípidos totales de *Leishmania* suponen el 12-20% del peso húmedo celular (Beach *et al.*, 1979), y son principalmente lípidos polares (70%) como fosfolípidos, lípidos neutros (20-25%) en forma de esteroides y diglicéridos, y glicolípidos (5-10%). La mayoría de los fosfolípidos están esterificados por ácidos grasos de cadena larga, aunque el 50% de la fosfatidiletanolamina de la superficie celular tiene esterificado el glicerol con formas alquil-

eter. Del total de fosfolípidos celulares, más del 50% es fosfatidilcolina, mientras que sólo el 1% es fosfatidilserina (Wassef *et al.*, 1985).

1.11. Tráfico vesicular en *Leishmania*.

Como ya se ha mencionado, los procesos de endocitosis y exocitosis de *Leishmania* se dan en una pequeña zona de la membrana plasmática localizada en la base del flagelo, denominada **bolsillo flagelar**. En él se concentra la maquinaria especializada de los procesos de endocitosis y exocitosis que garantizan la supervivencia del parásito ya que mediante ellos tiene lugar la entrada de nutrientes, la secreción de proteínas al medio extracelular, o la integración de proteínas de membrana en la superficie. Es el punto de inicio y final de las distintas vías de tráfico vesicular en el parásito (Overath *et al.*, 1997).

En el funcionamiento de las vías secretoras y endocíticas de tripanosomátidos intervienen distintos orgánulos, como son un gran retículo endoplásmico disperso en el citoplasma celular, un aparato de Golgi compuesto de 4-6 cisternas, un gran conjunto de vesículas ubicadas entre el retículo endoplásmico y la cara *cis* del aparato de Golgi y un conjunto de vesículas y elementos túbulovesiculares dispuestos entre la cara *trans* del aparato de Golgi y el bolsillo flagelar que forman la red de vesículas del *trans*-Golgi (TGN) (revisado por Landfear e Ignatushchenko, 2001) (Fig. I-11).

Las vías de tráfico vesicular en tripanosomátidos se han estudiado en relación con la biosíntesis de GPI (revisado por Dodge *et al.*, 2004). Experimentos de localización subcelular de enzimas involucradas en dicha biosíntesis pusieron de manifiesto una **estructura túbulovesicular** denominada MVT (*multivesicular tubule*), que es considerada un compartimento lisosomal terminal que se extiende desde la cara *trans* del aparato de Golgi (TGN) cerca del bolsillo flagelar, hasta el extremo posterior de la célula (Ilgoutz *et al.*, 1999; Mullin *et al.*, 2001; Weise *et al.*, 2000) (Fig. I-11).

Como ejemplo de proteínas de tripanosomátidos que utilizan la vía exocítica para ser secretadas al medio extracelular se ha descrito la fosfatasa ácida de *L. donovani* (Bates *et al.*, 1989; Doyle y Dwyer, 1993) que, sin estar muy presente en el citoplasma celular, se concentra conforme nos acercamos al bolsillo flagelar, desde donde es secretada después de sufrir ciertas modificaciones en el aparato de Golgi (Ilg *et al.*, 1999).

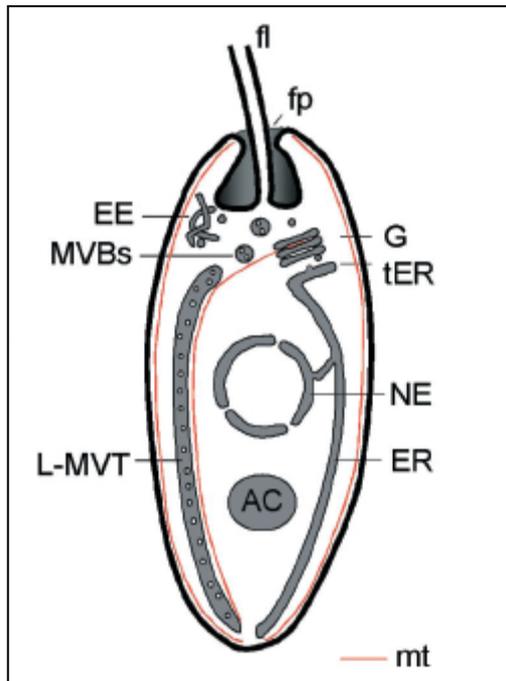


Figura I-11. Representación esquemática de los orgánulos que componen las vías de tráfico vesicular en promastigotes. fl, flagelo; fp, bolsillo flagelar; G, aparato de Golgi; ER, retículo endoplásmico; NE, envoltura nuclear; tER, retículo endoplásmico cercano a Golgi; EE, endosomas tempranos (representados como una red de túbulos y vesículas; L-MVT, túbulo multivesicular; MVBs, cuerpos multivesiculares; AC, acidocalcisoma; mt, microtúbulos. Tomada de McConville *et al.* (2002).

2. TRANSPORTADORES ABC.

Los transportadores ABC componen una de las mayores familias de proteínas, con una gran diversidad de funciones fisiológicas. Alrededor del 5% del genoma de *Escherichia coli* codifica transportadores ABC (Linton y Higgins, 1998). Presentan dominios de unión a ATP característicos, responsables de su denominación (ATP Binding Casette). Son proteínas altamente conservadas a lo largo de la evolución y muy ubicuas, encontrándose en todas las especies, desde procariontas hasta humanos (revisado por Higgins, 1992). Desempeñan una amplia variedad de funciones fisiológicas, y tienen una importancia médica y económica considerable. En microorganismos son esenciales para la resistencia a antibióticos y antifúngicos, mientras que en humanos están asociados a enfermedades de origen genético como la fibrosis quística, enfermedad de Tangier y resistencia a fármacos en cáncer.

Los transportadores ABC poseen una alta afinidad por sus sustratos y funcionan unidireccionalmente para translocar solutos en contra de altos gradientes de concentración. Los sustratos transportados son estructuralmente variables, encontrando

iones, metales pesados, carbohidratos, aminoácidos, antibióticos, fármacos anticancerígenos, proteínas, fosfolípidos, esteroides, pigmentos, etc., aunque no todas las proteínas ABC son transportadores, ya que pueden intervenir en la regulación de muchos procesos celulares.

Entre los transportadores ABC existen tanto exportadores como importadores. Los **importadores** son fundamentalmente procarióticos y su principal función es la de proporcionar nutrientes esenciales para la bacteria. Los **exportadores** se encuentran tanto en procariotas como en eucariotas, y participan en el eflujo de diferentes compuestos. Igualmente, la localización de estas proteínas en la célula es muy amplia, encontrándose en membrana plasmática, peroxisomas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, mitocondrias y vesículas intracelulares, lo que explica su participación en una gran variedad de actividades biológicas.

2.1. Organización estructural de los transportadores ABC.

Los transportadores ABC se componen de cuatro dominios estructurales: dos **dominios transmembrana hidrofóbicos** (TMD) y dos **dominios citosólicos hidrofílicos** que contienen la región de unión al ATP (NBS) (Higgins *et al.*, 1986; Hyde *et al.*, 1990). Estos cuatro dominios constituyen la unidad básica funcional de estas proteínas y pueden expresarse como péptidos independientes, como pares de dominios o como una sola proteína (Fig. I-12) (revisado por Higgins, 1992). Generalmente, los importadores bacterianos presentan cuatro polipéptidos independientes y necesitan de una proteína periplásmica extracelular de unión al sustrato para funcionar de manera óptima. Las proteínas ABC que no son transportadoras no tienen TMDs.

La característica principal de todas las proteínas ABC son los **NBSs**, que unen e hidrolizan el ATP, proporcionando la energía necesaria para la función de estas proteínas. Estos dominios son hidrofílicos, citosólicos y presentan tres motivos muy conservados: **Walker A**, **Walker B**, y el **motivo C** (también denominado motivo sello). Los motivos Walker A (GXXGXGKS/TS/T, donde X es cualquier aminoácido) y Walker B (h₄DE/D, donde h corresponde a un residuo hidrofóbico) se encuentran en muchas ATPasas; el tercer dominio o motivo sello que lleva la secuencia consenso LSGGQ, es característica y exclusiva de las proteínas ABC. Los NBSs son las regiones más

conservadas dentro de las proteínas ABC, alcanzando alrededor de un 30-40% de identidad entre distintos transportadores ABC. La integridad de estos dominios es esencial para la función de los transportadores ya que se han descrito mutaciones en los NBSs de varios transportadores que inhiben su actividad. Se ha demostrado que la hidrólisis del ATP es necesaria para que se produzca el transporte. Sin embargo, el ATP no es el único sustrato de estos transportadores, puesto que se ha visto que pueden utilizar otros nucleótidos. Por ejemplo, la proteína CFTR (*cystic fibrosis transmembrane regulator*) utiliza GTP (Randak *et al.*, 1996), y el NBS1 de ABCR funciona como una nucleotidasa general (Biswas, 2001).

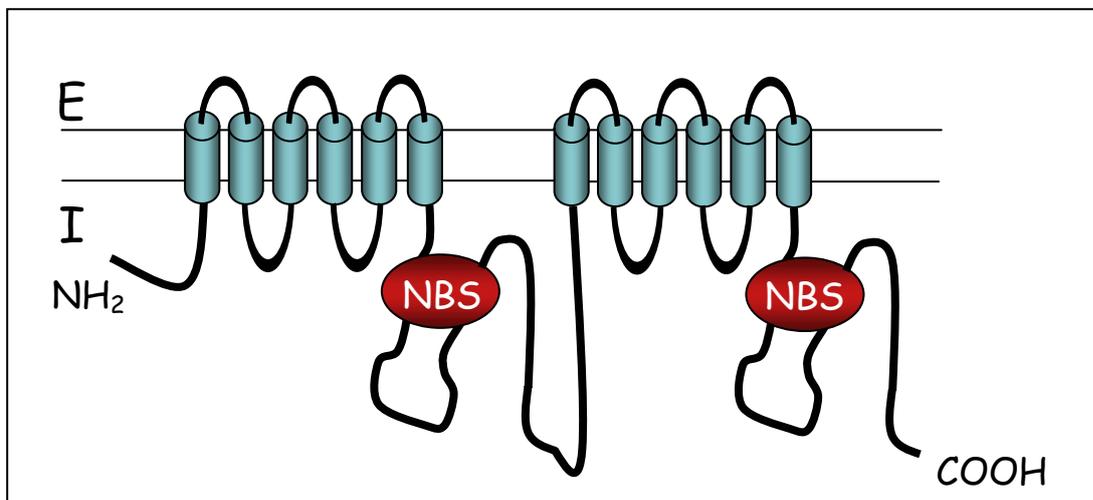


Figura I-12. Organización estructural de un transportador ABC típico. Se observan los segmentos hidrofóbicos (celestes) insertados en la membrana y los dominios de unión a nucleótidos NBS (rojo) dispuestos hacia el interior celular (I). (E), exterior celular

Los **dominios transmembrana** están constituidos por varios segmentos hidrofóbicos en α -hélice que atraviesan la membrana. La mayoría de los transportadores tienen 6 segmentos en cada TMD, pero hay variaciones respecto a esa estructura típica. Por ejemplo, algunas proteínas MRP contienen 5 segmentos hidrofóbicos adicionales con un extremo amino-terminal extracelular. Algunos de los segmentos pueden no ser esenciales para la función principal del transportador, pero pueden desempeñar funciones auxiliares de inserción en la membrana o regulación. Los TMDs conforman la vía a través de la cual los sustratos atraviesan la membrana, y determinan la especificidad del transportador mediante sitios de unión al sustrato, ya que mutaciones en los TMDs pueden cambiar la selectividad del transportador por el sustrato (Zhou *et al.*, 1999).

El tamaño y la hidrofobicidad de las proteínas ABC han impedido avanzar en la resolución de sus **estructuras tridimensionales** hasta que recientemente se consiguió la primera estructura de alta resolución (4,5 Å) de un transportador ABC completo, la proteína transportadora del lípido A, MsbA de *E. coli* (Chang y Roth, 2001), si bien la estructura propuesta ha sido posteriormente considerada como un artefacto (Davidson y Chen, 2005), lo que ha llevado a los autores a retractarse de su error (Chang *et al.*, 2006).

Recientemente se ha descrito la estructura (3 Å) de un transportador ABC (Sav1866) de *Staphylococcus aureus* (Dawson y Locher, 2006) (Fig. I-13-A), cuya secuencia y características bioquímicas lo emparentan con familia ABCB humana (en la que se encuentran MDR1 y TAP1/TAP2). La estructura predicha corrobora la obtenida para MDR1 humano mediante micrografía electrónica de baja resolución (Rosenberg *et al.*, 2005). La estructura presentada por Dawson y Locher apoya los datos genéticos, bioquímicos y estructurales de transportadores ABC homólogos, tanto bacterianos como humanos. Los autores muestran la estructura de un **transportador ABC multidroga bacteriano**, en una conformación abierta al exterior, con un único sitio de translocación de sustrato expuesto al medio extracelular. La unidad funcional de Sav1866 es un dímero con dos subunidades, y cada subunidad consiste en un dominio transmembrana amino-terminal (TMD) y un dominio de unión a nucleótidos carboxi-terminal (NBS). Las dos subunidades presentan un giro considerable una sobre otra, con lo que tanto los TMDs como los NBSs se encuentran interaccionando muy cercanos en el espacio (Fig. I-13-A). Los NBSs del homodímero presentan una estructura similar a la determinada por otros estudios. Exponen los motivos conservados de unión e hidrólisis del ATP en la superficie de interacción entre los dos NBSs, lo que crea un enlace directo entre los dos sitios y proporciona las bases moleculares de cooperatividad observada en la unión e hidrólisis del ATP. Los NBSs y los TMDs están unidos por un corto puente de lazos intracelulares. Los **cambios conformacionales** generados por la unión e hidrólisis del ATP se transmiten desde los NBSs a los TMDs a través de interacciones no covalentes en la superficie de contacto entre los lazos intracelulares y los NBSs. De hecho, la mayoría de los residuos que conforman esa región se encuentran muy conservados entre las proteínas ABC. Los dos TMDs forman una cámara dentro de la membrana que se abre a la cara citoplasmática de la membrana. Existiría una conformación que permitiría el acceso del sustrato desde el interior celular, y otra conformación abierta hacia el exterior celular, que permitiría la salida del sustrato. La estructura de Sav 1866 entra en conflicto con el esquema clásico del transportador ABC, puesto que, más que alineadas

una al lado de la otra, las dos subunidades del transportador estarían intrínsecamente asociadas, puesto que la mayor superficie de contacto de los lazos intracelulares sería con el NBS de la subunidad contraria (Fig. I-13-B). Esta hipótesis desafía los modelos mecánicos que sugieren que los NBSs dimerizan al unirse el ATP y se disocian por completo al finalizar el ciclo de transporte (ver apartado 2.2).

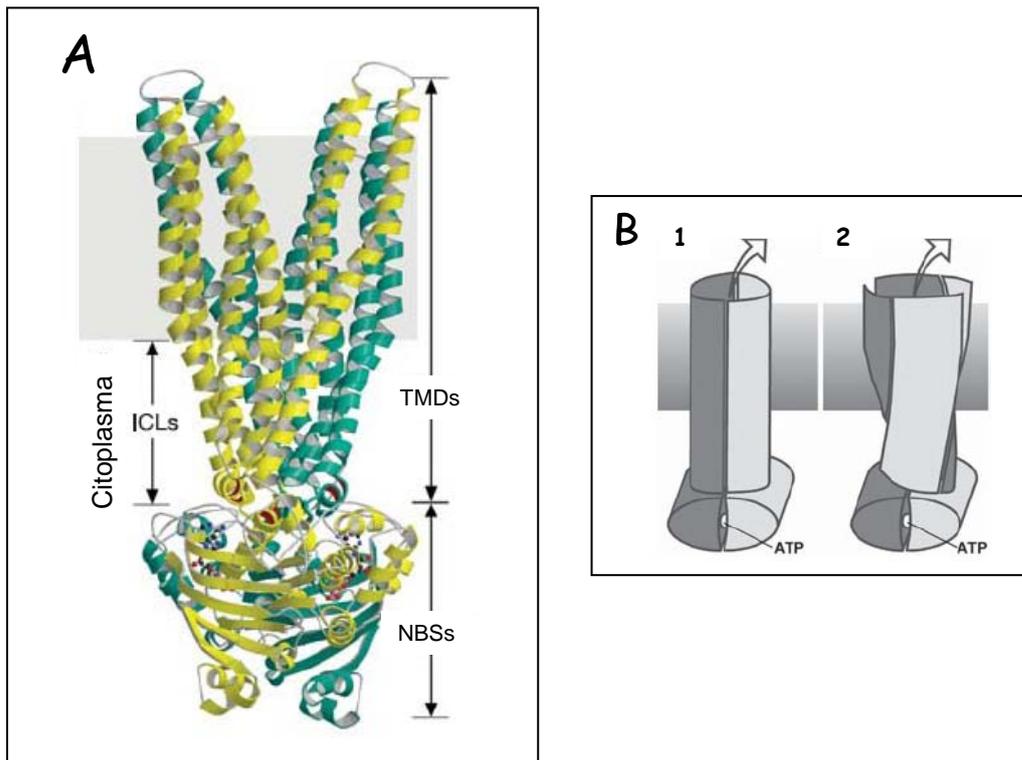


Figura I-13. A) Estructura de un transportador ABC bacteriano. Una subunidad del transportador está representada en turquesa; la otra, en amarillo. La sombra gris representa la posible localización de la membrana plasmática. TMDs, dominios transmembrana; NBSs, dominios de unión a nucleótidos; ICLs, lazos intracelulares.

B) Esquema de un transportador ABC. 1) Esquema inicial que representa dos subunidades alineadas, y sugiere una separación durante el ciclo de transporte. 2) Esquema de Sav1866 en la conformación observada, abierta al exterior. El dibujo enfatiza el giro de las subunidades. El rectángulo gris indica la localización de la membrana; las flechas indican la salida del fármaco hacia el espacio extracelular. Tomada de Dawson y Locher (2006).

Esta estructura está de acuerdo con la deducida para la glicoproteína-P (Pgp) mediante micrografía electrónica (Rosenberg *et al.*, 1997), en la que aparece un gran poro central cerrado en su cara citoplasmática que forma una cámara acuosa en la membrana. Últimamente se ha obtenido la estructura tridimensional de baja resolución de la Pgp de mamíferos en presencia y ausencia de nucleótidos mediante microscopía electrónica (Fig. I-14). En ausencia de nucleótidos, los dos TMDs forman un “barril” de 5-

6 nm de diámetro y 5 nm de profundidad constituyendo un poro a través de la membrana, que se abre hacia la cara extracelular de ésta. Cuando se une el nucleótido, se produce una reorganización de los TMDs en tres dominios compactos cada cual con 2-3 nm de diámetro y 5-6 nm de profundidad. Esta reorganización abre el poro central en toda su longitud, permitiendo el acceso de sustratos hidrofóbicos desde la bicapa lipídica (Rosenberg *et al.*, 2003).

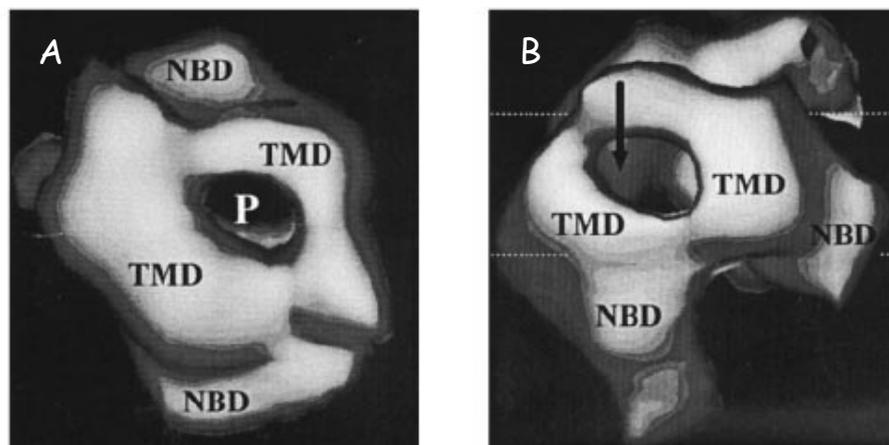


Figura I-14. Representación gráfica de la estructura tridimensional de la proteína Pgp deducida a partir de los resultados de microscopía electrónica. P, poro acuoso abierto hacia la cara externa de la membrana plasmática; TMD, dominios transmembrana; NBD, lóbulos de 3 nm que probablemente corresponden a los dominios de unión a nucleótidos. Vista perpendicular a la cara externa de la membrana (A). Vista lateral de la proteína (B), se observa una apertura (flecha) por la cual accede la fase lipídica de la bicapa (líneas horizontales) hacia el interior del poro. Tomada de Rosenberg *et al.* (2003).

2.2. Mecanismo de acción.

Clásicamente, dos modelos han intentado explicar el mecanismo por el cual los transportadores ABC llevan a cabo su función de transporte tomando como ejemplo a la proteína Pgp humana. El primero de estos modelos se denomina “**aspiradora hidrofóbica**” y plantea que los fármacos hidrofóbicos son directamente expulsados por la proteína desde la membrana plasmática (Gottesman y Pastan, 1993), mientras que otro modelo plantea que la Pgp actúa como una **flopasa**, transportando sustratos desde la cara interna de la bicapa lipídica hasta la cara externa, desde donde se liberan al exterior (Higgins, 1992). En consecuencia, el coeficiente de partición y la hidrofobicidad de los compuestos deben ser factores claves para determinar la eficiencia de transporte de la Pgp, de manera que la amplia selectividad de este transportador podría explicarse

por la capacidad de los sustratos para intercalarse en la bicapa donde serían reconocidos por la proteína.

Se ha propuesto que la **estructura topológica** de la Pgp cambia durante el proceso de transporte, siendo los segmentos transmembrana la parte móvil del transportador (Zhang, 2001). Los estudios de Rosenberg *et al.* (2001, 2003) mediante microscopía electrónica sobre los cambios conformacionales de la Pgp durante varias etapas del ciclo catalítico, concluyen que los huecos que quedan entre los dos TMDs permitirían el acceso del sustrato a la cámara desde la cara interna de la bicapa, lo que está de acuerdo con el modelo que propone una actividad *flopasa* para la proteína.

El **ciclo de transporte** de las proteínas ABC se inicia mediante la interacción específica del sustrato con los dominios transmembrana en puntos concretos de éstos, denominados farmacóforos, cuyo número no se conoce, aunque parecen ser dos (Fig. I-15-I). La unión del sustrato origina un cambio conformacional en los TMDs que se transmite a los NBSs para iniciar la hidrólisis del ATP (Fig. I-15-II). Para ello, se requieren los dos NDBs activos, aunque existe un mecanismo catalítico alternativo por el cual un solo NBS hidroliza el ATP. Hasta hace poco se pensaba que la hidrólisis de ATP producía cambios conformacionales en los NBSs que se transmiten a los TMDs, llevándose así a cabo el transporte. Todavía no se conoce cuántas moléculas de ATP deben ser hidrolizadas por cada molécula de sustrato transportada, probablemente 1 ó 2 (revisado por Higgins, 2001). Recientemente se ha observado que durante las diferentes etapas del ciclo catalítico, los TMDs de la proteína sufren una gran reorganización dentro de la membrana, debido principalmente a la unión del ATP a los NBSs (Higgins y Linton, 2004; Rosenberg *et al.*, 2003). Esto sugiere que es la **unión del ATP**, y no la hidrólisis, la que conduce a los cambios conformacionales de los dominios TMDs que exponen el sustrato al medio extracelular, si bien existe todavía una gran controversia (revisado por Loo y Clarke, 2005). El papel de la hidrólisis del ATP sería devolver a la proteína a su estado inicial, permitiendo que ésta quede libre para unir otra molécula de sustrato (Fig. I-15-III y IV) (revisado por Ambudkar *et al.*, 2006).

La actividad de las proteínas ABC puede estar regulada por el nivel de **fosforilación** de la proteína. Fosforilaciones en la región de unión entre ambas mitades de la Pgp pueden modular la interacción con ciertos sustratos (Szabo *et al.*, 1997). La proteína CFTR está regulada por proteínas kinasas y fosfatasas. La actividad del canal CFTR

aumenta unas 100 veces tras la fosforilación. El dominio regulador posee numerosos sitios susceptibles de ser fosforilados por PKA (revisado por Gadsby *et al.*, 2006).

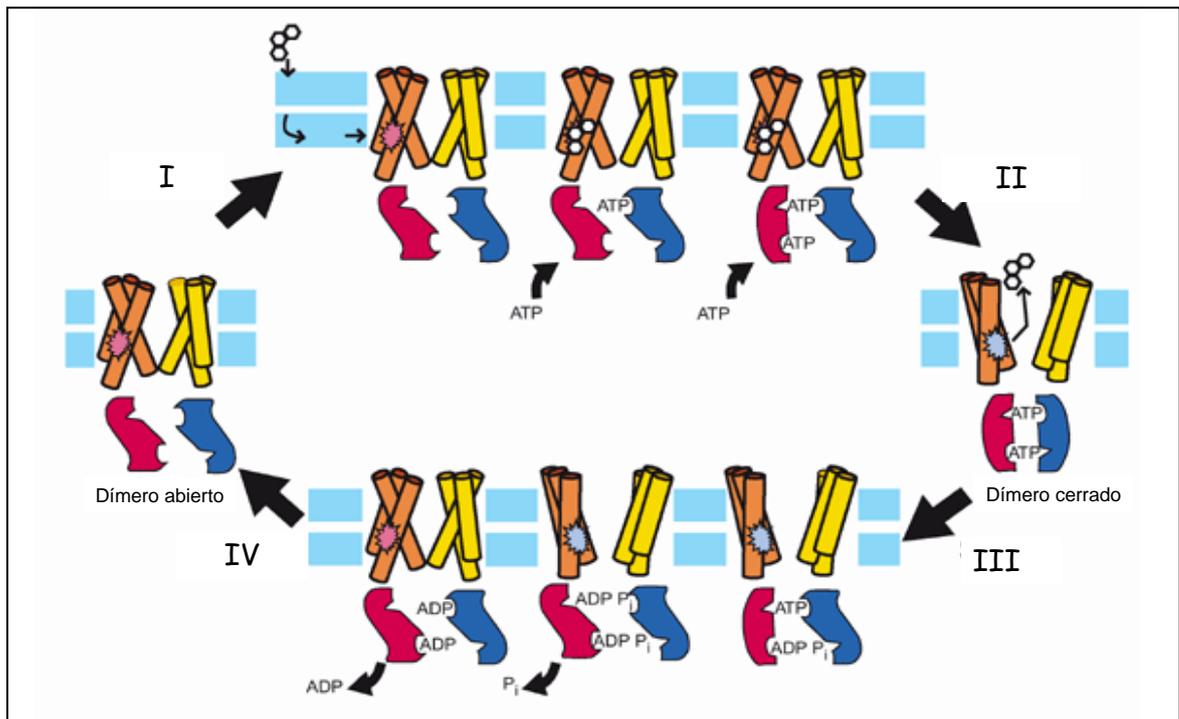


Figura I-15. Esquema del ciclo de transporte de un transportador ABC. Los TMDs aparecen como cilindros que atraviesan la membrana. Los NBSs se muestran esquemáticamente en el lado citoplasmático de la membrana (magenta y azul). El transportador en su estado basal tiene los NBSs formando un dímero abierto con baja afinidad por el ATP. El sitio de unión a fármacos (rosa) es de alta afinidad y se encuentra en la cara interna de la membrana. **I).** El ciclo de transporte se inicia con la unión del sustrato a su sitio de alta afinidad en el TMD. Aumenta la afinidad del NBS por el ATP, disminuyendo la energía de activación para la formación del dímero cerrado. Se unen dos moléculas de ATP cooperativamente para generar el dímero cerrado. **II).** El dímero cerrado formado por los NBSs induce un cambio conformacional en los TMDs, de forma que el sitio de unión a fármacos queda expuesto al exterior celular, reduciéndose su afinidad y liberando el fármaco. **III).** Se hidroliza el ATP, formándose un intermediario de transición. La hidrólisis de las dos moléculas de ATP suele ser secuencial. **IV).** La liberación secuencial de P_i y posteriormente ADP devuelve al transportador a su estado original. Tomado de Higgins y Linton (2004).

2.3. Clasificación de la familia ABC.

En el genoma humano podemos encontrar 49 genes que codifican proteínas ABC, las cuales se han clasificado en 7 subfamilias diferentes en base a la similitud de sus estructuras génicas y la homología de sus secuencias (Dean *et al.*, 2001b), (<http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm>) (Tabla I-1).

La subfamilia ABCA contiene actualmente 12 miembros, entre los cuales se encuentra ABCA1, involucrado en el transporte de colesterol y fosfolípidos, y ABCA4 o ABCR que transporta derivados de la vitamina A en las células fotorreceptoras de la retina.

La subfamilia ABCB comprende 11 miembros. A ella pertenece la Pgp MDR1 (ABCB1), que fue el primer gen ABC clonado y caracterizado por su capacidad de conferir el fenotipo de multirresistencia a fármacos (MDR) en células de cáncer. La proteína MDR3 o ABCB4 se expresa en el hígado y participa en la secreción de la fosfatidilcolina. En estas familias se encuentran también las proteínas ABCB2 y ABCB3 (TAP), los cuales son transportadores con una topología distinta a la de un transportador ABC clásico: tienen un único TMD y un NBS que heterodimerizan para transportar péptidos al retículo endoplasmático, los cuales son presentados como antígenos a las moléculas HLA de clase I.

Por su parte, la subfamilia **ABCC** contiene 12 transportadores que llevan a cabo funciones en el transporte de iones, secreción de toxinas y transducción de señales. En esta familia se incluye la proteína ABCC7 (CFTR), un transportador particular en cuanto a que es un canal de iones cloro, pero también ejerce funciones reguladoras sobre otros canales. ABCC8 y ABCC9 son los transportadores SUR que unen sulfonilurea y modulan los canales de potasio involucrados en la regulación de la secreción de insulina. El resto de la familia está compuesta por nueve proteínas MRP relacionadas con la multirresistencia. ABCC1, ABCC2 y ABCC3 transportan compuestos tóxicos conjugados con glutatión y otros aniones orgánicos. ABCC4, ABCC5, ABCC11 y ABCC12 son proteínas más pequeñas que carecen de un dominio amino-terminal.

La subfamilia **ABCD** engloba 4 proteínas con una topología particular (un único TMD y un NBS), localizadas en peroxisomas.

Las subfamilias **ABCE** y **ABCF** contienen proteínas ABC que no son transportadoras. Tienen dominios NBS, pero no TMD.

La subfamilia **ABCG** contiene 6 transportadores con un NBS en el extremo amino y un TMD en el extremo carboxilo, una orientación inversa a la del resto de transportadores ABC. ABCG1, ABCG5 y ABCG8 están implicados en el transporte de esteroides, mientras que ABCG2 (MXR, BCRP) se ha relacionado con la multirresistencia a fármacos en las células tumorales.

Hasta la fecha, un total de 18 transportadores ABC están asociados directamente con enfermedades (revisado por Dean, 2006). Los genes ABC generalmente codifican proteínas estructurales por lo que todas las **enfermedades** son **recesivas**. Mutaciones en genes que codifican varias proteínas ABC producen enfermedades genéticas severas como son la fibrosis quística, la adrenoleucodistrofia, la colestasis hepática, la distrofia macular de Stargardt y la enfermedad de Tangier.

Por otro lado, la sobreexpresión de ciertos transportadores ABC es la causa más frecuente de **resistencia** a agentes citotóxicos como antibióticos, antifúngicos, herbicidas y fármacos anticancerígenos. Concretamente, la sobreexpresión de la proteína Pgp ha mostrado ser una de las principales causas del fenotipo de multirresistencia a fármacos (MDR) en células tumorales (revisado por Ambudkar *et al.*, 2003). Las proteínas MRP también se han relacionado con el fenotipo MDR, siendo capaces de conferir resistencia a fármacos como la doxorubicina, daunomicina, vincristina o colchicina. También se ha descrito sobreexpresión de la proteína ABCG2 en casos de resistencia a antraciclinas en líneas celulares de cáncer de mama (Allikmets *et al.*, 1998; Doyle *et al.*, 1998; Miyake *et al.*, 1999).

Introducción

Subfamilia	Símbolo	Alias	Expresión	Función
ABCA	ABCA1	ABC1	Ubicua	Modula el eflujo de fosfolípidos y colesterol hacia HDL
	ABCA2	ABC2	Cerebro	Resistencia a estramustina
	ABCA3	ABC3,ABCC	Pulmón	Producción de surfactante pulmonar
	ABCA4	ABCR	Fotorreceptores	Eflujo de N-retinildien-PE
	ABCA5		Músculo, corazón y testículos	
	ABCA6		Hígado	Transporte de lípidos
	ABCA7		Bazo y timo	Transporte de lípidos
	ABCA8		Ovario	
	ABCA9		Corazón	
	ABCA10		Músculo y corazón	
	ABCA12		Estómago	
	ABCA13		Bajo en todos los tejidos	
	ABCB	ABCB1	MDR1	Tejido adrenal, riñon y cerebro
ABCB2		TAP1	Todas las células	Transporte de péptidos
ABCB3		TAP2	Todas las células	Transporte de péptidos
ABCB4		MDR3	Hígado	Transporte de fosfatidilcolina
ABCB5			Ubicua	
ABCB6		MTABC3	Mitocondria	Transporte de hierro
ABCB7		ABC7	Mitocondria	Transporte de Fe/S
ABCB8		MABC1	Mitocondria	
ABCB9			Corazón y cerebro	
ABCB10		MABC2	Mitocondria	
ABCB11		SPGP	Hígado	Transporte de sales biliares
ABCC	ABCC1	MRP1	Pulmón, testículos y PBMC	Resistencia a fármacos
	ABCC2	MRP2	Hígado	Eflujo de aniones orgánicos
	ABCC3	MRP3	Pulmón, intestino e hígado	Resistencia fármacos
	ABCC4	MRP4	Próstata	Transporte de nucleósidos
	ABCC5	MRP5	Ubicua	Transporte de nucleósidos
	ABCC6	MRP6	Riñón, Hígado	
	ABCC7	CFTR	Tejido exocrine	Canal de iones cloruro
	ABCC8	SUR	Páncreas	Receptor de sulfonilureas
	ABCC9	SUR2	Corazón y músculo	
	ABCC10	MRP7	Baja en todos los tejidos	
	ABCC11	MRP8	Baja en todos los tejidos	
	ABCC12	MRP9	Baja en todos los tejidos	
	ABCC13		Hígado fetal y médula ósea	
ABCD	ABCD1	ALD	Peroxisomas	Regulación del transporte de ácidos grasos de cadena muy larga
	ABCD2	ALD1, ALDR	Peroxisomas	
	ABCD3	PXMP1,PMP70	Peroxisomas	
	ABCD4	PMP69,P70R	Peroxisomas	
ABCE	ABCE1	OABP,RNS41	Ovarios, testículos y bazo	Proteína de unión a oligoadenilato
ABCF	ABCF1	ABC50	Ubicua	
	ABCF2		Ubicua	
	ABCF3		Ubicua	
ABCG	ABCG1	ABC8,White	Ubicua	Transporte de colesterol
	ABCG2	BCRP,ABCP,MXR	Placenta e intestino	Resistencia fármacos
	ABCG4	White2	Hígado	
	ABCG5	White3	Hígado e intestino	Transporte de esteroides vegetales
	ABCG8		Hígado e intestino	Transporte de esteroides vegetales

Tabla I-1. Lista de genes ABC humanos pertenecientes a las 7 subfamilias descritas. Se detallan, cuando corresponde, los nombres originales o alternativos de los genes. Tomada de ABC Proteins: From Bacteria to Man, B. Holland (2003).

2.3.1. Subfamilia ABCG.

La subfamilia ABCG humana contiene cinco proteínas caracterizadas, con la mitad del tamaño de un transportador ABC clásico. La organización de sus dominios es inversa a la del resto de los transportadores ABC, con un único NBS en el extremo amino y un TMD en el extremo carboxilo (Fig. I-16). Todas las proteínas ABCG humanas están formadas por “**half-transporters**” tipo NBS-TMD, aunque se han descrito transportadores completos con la organización NBS-TMD-NBS-TMD en organismos como *Saccharomyces cerevisiae* y *Arabidopsis thaliana*. El locus *White* de *Drosophila* fue identificado inicialmente por mapeo genético. La proteína *white* forma un heterodímero con cada una de las otras dos proteínas tipo ABCG, *brown* y *scarlet*, para transportar guanina y triptófano (moléculas precursoras de los pigmentos oculares) en las células oculares de la mosca (Chen *et al.*, 1996).

Sorprendentemente, existen sólo 5 genes en el genoma humano, mientras que existen 15 en el de *Drosophila*. En *A. thaliana* se identificó recientemente un transportador tipo ABCG implicado en el transporte de cera a la cutícula de la planta (Pighin *et al.*, 2004). Los análisis evolutivos de los genes de levadura demostraron que casi todos ellos divergieron hace mucho tiempo. Esto es también evidente por el análisis de la posición de los intrones, que no se conserva entre los genes. La única excepción son los genes ABCG1 y ABCG4, que están estrechamente relacionados tanto en la secuencia aminoacídica, como en la posición idéntica de sus intrones (revisado por Dean *et al.*, 2001a).

La mayoría de las proteínas ABCG humanas muestran menos del 30% de identidad y menos del 50% de homología. En las proteínas de *Homo sapiens*, *Mus musculus* y *Rattus norvegicus* existen varios residuos aminoacídicos altamente conservados en las 14 proteínas ABCG conocidas en estos organismos, diferentes de los que se encuentran en los motivos Walker A, B y el sello de la familia. Merece la pena destacar que la mayoría de estos residuos se encuentran en los NBSs, y sólo algunos se localizan en los TMDs, si bien se desconoce la función de estos aminoácidos con respecto a la función y estructura de la proteína.

La topología de estos transportadores es interesante en cuanto a la evolución de esta subfamilia de proteínas. Se han sugerido dos rutas posibles por las que podrían haber aparecido las proteínas ABCG (Anjard y Loomis, 2002). Una defiende que el gen ABCG

original, en el que el NBS precede al TMD, apareció de la fusión de regiones independientes que codificaban dichos dominios. Según los nuevos datos proteómicos predichos a partir de la secuencia genómica de *Dictyostelium discoideum*, Anjard y colaboradores formularon una segunda alternativa en la que el gen ABCG podría haberse originado a partir de la región central de un transportador ABC completo de las subfamilias A, B o C (TMD-NBS-TMD-NBS) tras la pérdida del primer TMD y del segundo NBS. La duplicación en tandem y fusión de los genes “half-transporters” ABCG podría haber dado lugar a los transportadores completos de la subfamilia ABCG (revisado por Lorkowski y Cullen, 2002)

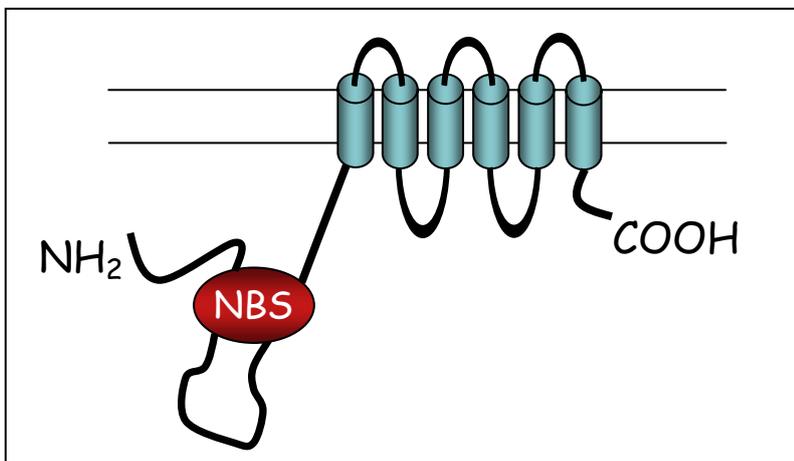


Figura I-16. Organización estructural de un transportador ABCG. Se observa el dominio de unión a nucleótidos (NBS) en el extremo amino, y los segmentos transmembrana (celestes) en el extremo carboxilo.

La mayoría de las proteínas ABCG humanas parecen estar implicadas en el metabolismo lipídico y/o de esteroides. ABCG1 se expresa de forma ubicua y está implicado en el transporte de colesterol, mientras que ABCG4, con el que comparte una gran identidad, podría tener una función parecida en el cerebro. ABCG5 y ABCG8 transportan esteroides de plantas en el intestino y el hígado. ABCG2 es un transportador con una alta capacidad de eflujo, está implicado en la resistencia a fármacos y reconoce una amplia variedad de sustratos, tanto de carga negativa como positiva, aniones orgánicos y compuestos conjugados a sulfato; se localiza en la membrana plasmática de las células, lo que es inusual entre los “half-transporters” de mamíferos, cuyos dímeros funcionales se habían localizado, hasta ahora, en membranas internas (revisado por Kusuhara y Sugiyama, 2007)

2.3.1.1. ABCG1.

ABCG1 fue descrito de manera independiente por Chen *et al.*, Croop *et al.*, y Savary *et al.* (Croop *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1996; Savary *et al.*, 1996) como el homólogo del gen *white* de *Drosophila*. Se han detectado varios transcritos de ABCG1 en distintos tipos celulares, procedentes de eventos de *splicing* alternativos o del uso de distintos sitios de iniciación de la transcripción (Lorkowski *et al.*, 2001). Cserepes y colaboradores realizaron estudios en células de insecto coexpresando ABCG1 con un mutante inactivo de ABCG4 y observaron una disminución en la actividad de ABCG1, lo que se debería a una interacción específica de ABCG4 con ABCG1 en un complejo heterodimérico (Cserepes *et al.*, 2004). Experimentos de entrecruzamiento parecen indicar que ABCG1 forma homodímeros (Vaughan y Oram, 2005), si bien esto no está totalmente claro.

Se piensa que ABCG1 está implicado en el **transporte de colesterol**, ya que su expresión se induce por la ruta de los receptores nucleares de hormonas LXR y RZR tras incubar los macrófagos con colesterol (Kennedy *et al.*, 2001; Klucken *et al.*, 2000). El gen *ABCG1* se expresa en pulmón, cerebro, bazo y macrófagos. En el hígado, ABCG1 se expresa principalmente en las células de Kupffer (Hoekstra *et al.*, 2003). La expresión de ABCG1 está incrementada en macrófagos de pacientes con la enfermedad de Tangier, comparados con macrófagos control (Lorkowski *et al.*, 2001). Kennedy y colaboradores describieron que, al eliminar el gen *ABCG1* en ratones sometidos a una dieta alta en grasas y colesterol, éstos mostraban acumulación de lípidos neutros y fosfolípidos en hepatocitos y macrófagos, mientras que la sobreexpresión de ABCG1 protegía los tejidos murinos de la acumulación de lípidos (Kennedy *et al.*, 2005; Klucken *et al.*, 2000). La proteína ABCG1 endógena se localiza en la región perinuclear y, en algunos casos, está distribuida en la membrana plasmática de macrófagos cargados con lípidos (Klucken *et al.*, 2000; Lorkowski *et al.*, 2001). La transcripción de ABCG1 está incrementada en macrófagos cargados de lípidos y depende de la presencia del receptor nuclear LXR. ABCG1 media el transporte de colesterol desde las células hacia las fracciones mayoritarias de HDL, HDL-2 y HDL-3, pero no a apoA-I libre de lípidos (Wang *et al.*, 2004), y redistribuye el colesterol a los dominios de la superficie celular que son accesibles para su retirada por HDL (Vaughan y Oram, 2005). La inhibición de la expresión de la proteína ABCG1 provoca una reducción en el eflujo de colesterol y fosfolípidos dependiente de HDL-3 en macrófagos (Klucken *et al.*, 2000). Estos resultados sugieren que ABCG1 está implicado en el eflujo de lípidos en células

periféricas, al igual que ABCA1. En cualquier caso, el mecanismo por el cual lleva a cabo este eflujo no está del todo claro (revisado por Cavelier *et al.*, 2006).

Estudios recientes han corroborado la presencia de ABCG1 en la **membrana plasmática** de las células y su implicación en el **eflujo de colesterol** y **fosfolípidos** (esfingomielina, preferentemente) (Kobayashi *et al.*, 2006). Se ha especulado sobre la posible implicación de ABCG1 en el transporte de oxiesteroles, y su papel protector frente a la muerte celular inducida por 7 β -hidroxicolesterol (Engel *et al.*, 2007).

2.3.1.2. ABCG2.

El gen ABCG2 humano fue clonado en 1998 por Doyle y colaboradores a partir de una línea celular MCF7 de cáncer de mama resistente a doxorubicina y recibió el nombre de BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) (Doyle *et al.*, 1998). Este término, sin embargo, resultó engañoso, puesto que el gen no estaba limitado ni al tejido mamario, ni a células cancerígenas. Más tarde, otros grupos clonaron el cDNA de BCRP y denominaron al gen MXR (Mitoxantrone Resistance Protein) y ABCP (Placental ABC Protein) (Allikmets *et al.*, 1998; Miyake *et al.*, 1999). Actualmente, siguiendo la recomendación del “*Human Genome Nomenclature Committee*” se le designa como ABCG2.

-DISTRIBUCIÓN Y FUNCIÓN DE ABCG2.

La proteína ABCG2 humana está sobreexpresada en líneas celulares resistentes a fármacos y tumores lo que, junto con su actividad de transporte de un gran número de agentes antitumorales, sugiere un papel de esta proteína en la **multirresistencia a fármacos en cáncer**. Además, ABCG2 se encuentra en muchos tejidos normales como la placenta, hígado, intestino delgado, pulmón, riñón, glándulas adrenales, endotelio y células madre (Fig. I-17). La expresión de ABCG2 en la membrana plasmática de los **sincitiotrofoblastos de la placenta** (Maliepaard *et al.*, 2001) sugiere que ABCG2 estaría protegiendo al feto mediante el eflujo de fármacos y toxinas desde la placenta a la circulación materna. La expresión de ABCG2 en la **membrana apical del canalículo biliar** parece corroborar la recientemente descrita capacidad de ABCG2 para transportar conjugados sulfatados de esteroides y xenobióticos, y la expresión en la **vesícula biliar** sugiere una función en la excreción de conjugados de ácidos biliares al intestino (Suzuki *et al.*, 2003). Tanto en el **intestino** humano como de ratón, ABCG2 se expresa en la

membrana apical de las células intestinales (Jonker *et al.*, 2002; Maliepaard *et al.*, 2001). Esta localización es ideal para limitar la absorción intestinal de compuestos ingeridos y, de hecho, ABCG2 modularía la absorción de materiales tóxicos de la comida, así como de algunos agentes farmacológicos de aplicación oral (Jonker *et al.*, 2002).

La expresión de ABCG2 en la **glándula mamaria** está regulada hormonalmente; ABCG2 aparece con niveles altos de expresión sólo en la membrana apical de las células epiteliales de los alveolos de la glándula mamaria y únicamente durante la fase tardía de embarazo y la lactancia (Jonker *et al.*, 2005). Se estudió el transporte de ciertos sustratos de ABCG2 que aparecen en la leche materna y se demostró que existe una secreción activa de topotecan, el carcinógeno de la dieta PhiP (2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b] piridina) y cimetidina (todos sustratos de ABCG2) a la leche materna. ABCG2 es probablemente uno de los principales factores implicados en la secreción activa de xenobióticos a la leche. Este hecho suscitó la posibilidad de que, aunque ABCG2 pudiera facilitar de manera involuntaria la transferencia de toxinas a la leche, también podría desempeñar una función en la transferencia de nutrientes a los lactantes (revisado por van Herwaarden *et al.*, 2006).

ABCG2 se expresa de manera constitutiva en el **endotelio de venas y capilares** (Maliepaard *et al.*, 2001). Por el contrario, apenas se aprecia en arteriolas. La mayor presencia de ABCG2 en las células endoteliales de las venas puede estar relacionada con la regulación de ABCG2 mediada por los niveles de oxígeno. En humanos, ABCG2 se localiza principalmente en la superficie luminal de las células endoteliales de los vasos del sistema nervioso central, sugiriendo una función de protección frente a fármacos en la barrera hemato-encefálica (Cisternino *et al.*, 2004).

Además, ABCG2 se expresa en **células madre**, donde parece tener una función clave en la diferenciación y protección frente a xenobióticos. Del mismo modo, ABCG2 se une e interacciona con las porfirinas, por lo que las células pueden utilizar ABCG2 para reducir la acumulación de hemo/porfirinas. ABCG2, por lo tanto, confiere una considerable ventaja a las células a la hora de sobrevivir en condiciones de hipoxia (Krishnamurthy *et al.*, 2004; Krishnamurthy y Schuetz, 2005). Los estudios sugieren que ABCG2 aumenta las probabilidades de supervivencia celular en ambientes pobres en oxígeno, disminuyendo la acumulación de metabolitos tóxicos del grupo hemo. Esto tiene una gran importancia para el tratamiento quimioterapéutico de tumores sólidos que

tengan una expresión incrementada de ABCG2 en condiciones de hipoxia, así como para la supervivencia de células madre en transplantes (revisado por Krishnamurthy y Schuetz, 2006).

Por su localización en la **membrana plasmática**, ABCG2 puede expulsar de las células una amplia variedad de fármacos, como los anticancerígenos mitoxantrona, topotecan y metotrexato, confiriendo, por lo tanto, resistencia a estas citotoxinas.

La función de ABCG2 de protección frente a xenobióticos, actuando como una bomba de eflujo de citotoxinas, está de acuerdo con su localización en la membrana plasmática (revisado por Hardwick *et al.*, 2007). De hecho, ABCG2 es único entre los ABC "half-transporters" en cuanto a su localización en la membrana plasmática y no en membranas intracelulares.

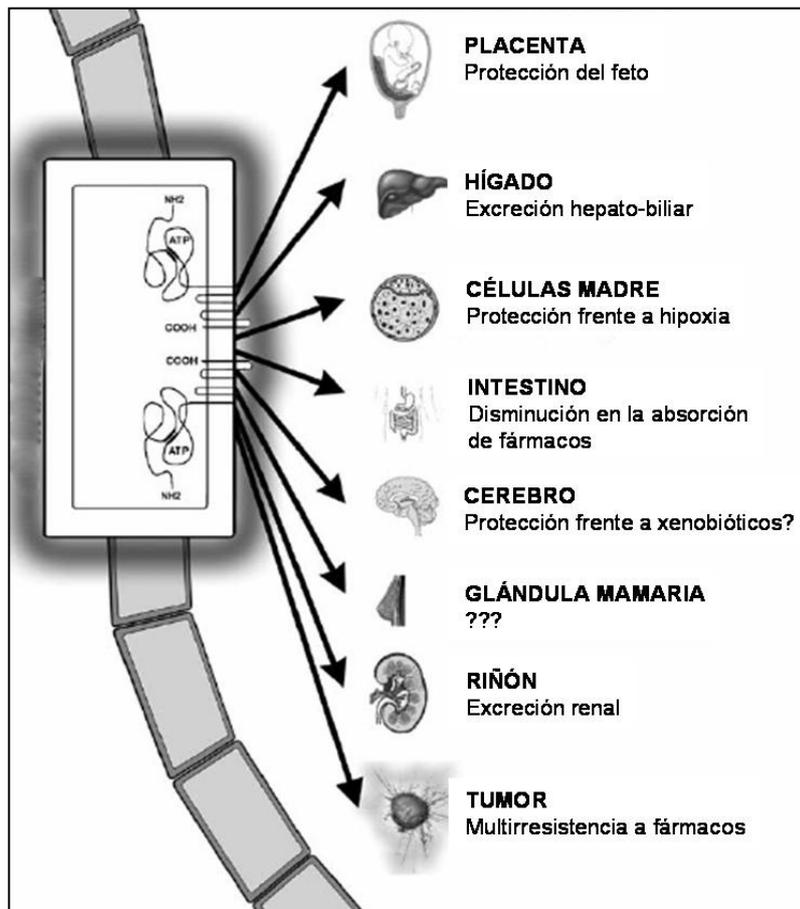


Figura I-17. Representación esquemática de la localización de ABCG2 y su función en el organismo. Tomada de (Staud y Pavek, 2005).

Los “half-transporters” funcionan formando homodímeros o heterodímeros. Los ensayos realizados con ABCG2 expresados en dos sistemas heterólogos argumentaron la formación de un homodímero (Sarkadi *et al.*, 2004). Kage y colaboradores demostraron la existencia de interacciones físicas que confirmaban la formación de **homodímeros** mediante enlaces disulfuro intermoleculares (Kage *et al.*, 2002). Estudios recientes sugieren la formación de **oligómeros** de ABCG2, siendo el tetrámero la forma funcional (Xu *et al.*, 2004). Más recientemente, ABCG2 se purificó en células de insecto y el estudio de su estructura proporcionó evidencias de que existe en forma **octamérica**, como un tetrámero de dímeros (McDevitt *et al.*, 2006). Aunque todavía se desconoce la relevancia fisiológica de estos oligómeros, sí es cierto que la formación de esos complejos podría afectar al tráfico de la proteína y la actividad de transporte alterando el número y/o funcionalidad de las moléculas en la membrana plasmática.

-SUSTRATOS E INHIBIDORES.

ABCG2 transporta un amplio rango de sustratos, que se solapan en parte con los de Pgp y MRP1. Transporta moléculas hidrofóbicas, con carga positiva o negativa, entre las que se encuentran **compuestos citotóxicos** (mitoxantrona, topotecan, flavopiridol, metotrexato), **sondas fluorescentes** (Hoechst 33342), y diferentes compuestos tóxicos que aparecen en la comida (2-amino-1-metil-6-fenilimidazol [4,5-b] piridina, **PhiP**) o **feofórbido** (revisado por Sarkadi *et al.*, 2004). La mayoría de las líneas que sobreexpresan ABCG2 se caracterizan por una gran resistencia a mitoxantrona. ABCG2, como en el caso de Pgp, no requiere glutatión para transportar los sustratos, mientras que MRP1 sí lo necesita (Zaman *et al.*, 1995). ABCG2 presenta variaciones en la capacidad de transporte dependiendo de los modelos utilizados para su caracterización. Por ejemplo, se ha demostrado que ABCG2 sólo transporta **esteroides sulfatados** en sistemas de vesículas de mamífero (Imai *et al.*, 2003). Por el contrario, el **estradiol** sin conjugado y el ácido biliar colato son sustratos de ABCG2 expresado en la bacteria grampositiva *Lactococcus lactis* (Janvilisri *et al.*, 2003). Estas diferencias pueden reflejar las distintas composiciones de las membranas de *L. lactis* y las células de mamíferos, o diferencias en los sistemas de ensayo (células frente a vesículas de membrana).

ABCG2 interacciona con las **porfirinas** y compuestos derivados de éstas, y estudios recientes sugieren que estos compuestos son sustratos naturales de ABCG2 (Jonker *et al.*, 2002; Krishnamurthy *et al.*, 2004;revisado por Krishnamurthy *et al.*, 2007). El **feofórbido A** es un metabolito de la clorofila, usado como fotosensibilizador en el

tratamiento experimental de tumores, y se ha demostrado que es un sustrato de ABCG2 (Robey *et al.*, 2004).

Recientemente se ha observado que ABCG2 secreta **riboflavina** (vitamina B2) a la leche, proporcionando así un nutriente esencial. Se trata del primer transportador ABC implicado en el transporte de alguna vitamina a la leche (van Herwaarden *et al.*, 2007).

La **inhibición** de la función de ABCG2 puede ser una estrategia farmacológica anticancerígena. En tumores con altos niveles de expresión de ABCG2 de forma natural (tumores de la línea germinal, cerebrales), la inhibición de ABCG2 puede incrementar los niveles intracelulares del agente quimioterapéutico, aumentando así la toxicidad. (revisado por Krishnamurthy y Schuetz, 2006). Sin embargo, el papel protector de ABCG2 en células madre hematopoyéticas y probablemente en otros tejidos podría complicar la aplicación de inhibidores eficaces de ABCG2 para mejorar la respuesta quimioterapéutica de los tumores que sobreexpresan ABCG2. Para incrementar la viabilidad de los fármacos citotóxicos en el tratamiento del cancer, pueden aplicarse en clínica inhibidores de ABCG2 como elacridar (Breedveld *et al.*, 2006). Obviamente, estos inhibidores pueden también inhibir ABCG2 en células madre y células progenitoras en tejidos normales, con lo cual los tejidos podrían desarrollar una susceptibilidad drástica como resultado de la inhibición de ABCG2. Para evitar estos efectos, habría que reducir la dosis requerida del fármaco, lo que ensombrecería cualquier beneficio del tratamiento con el inhibidor (van Herwaarden *et al.*, 2006).

Recientemente se ha demostrado que dos inhibidores específicos de tirosín quinasas, **imatinib** (Gleevec, ST1-571) y **gefitinib** (Iressa, ZD1839), interaccionan con ABCG2 con una alta afinidad, a pesar de que fueron desarrollados para interaccionar selectivamente con sus dianas intracelulares, las kinasas Bcr-Abl y ErbB1, respectivamente. Aunque gefitinib parece inhibir únicamente ABCG2 (Nakamura *et al.*, 2005), imatinib es, aparentemente, un inhibidor y un sustrato (Houghton *et al.*, 2004). La modulación de ABCG2 por los inhibidores de tirosín quinasas sería un factor de importancia en el tratamiento de pacientes con cáncer.

-VARIANTES.

Cambios en un único aminoácido en residuos clave de los transportadores ABC pueden alterar su especificidad por el sustrato. En el caso de ABCG2, el cambio de arginina a treonina o glicina en la **posición 482** altera la especificidad por el sustrato

(Allen *et al.*, 2002; Honjo *et al.*, 2001). Los estudios realizados demostraron que el transporte de rodamina 123 dependía del aminoácido en la posición 482. Una glicina o treonina en esa posición permitía el transporte de rodamina 123, mientras que una arginina no (Honjo *et al.*, 2001). Estos resultados indican que una mutación en un único aminoácido (mutación de ganancia de función) puede incrementar la capacidad de transporte. Un buen ejemplo es la capacidad de transportar antraciclinas adquirida por parte de ABCG2 con una glicina o treonina en 482. Sin embargo, aunque estos mutantes adquieren la capacidad de transportar ciertos sustratos, pierden la de transportar metotrexato (Volk *et al.*, 2002; Volk y Schneider, 2003). Merece la pena destacar que ABCG2 con arginina en 482 y ABCG2 con glicina en 482 tienen una capacidad similar de transporte de antibióticos, esteroides no conjugados y ácidos biliares primarios (Janvilisri *et al.*, 2005). Los autores especulan que la carga intracelular en la posición 482 es importante para las interacciones electrostáticas con algunos sustratos en la interfase membrana-citosol. Sin embargo, trabajos recientes sugieren que el efecto del cambio del aminoácido en la posición 482 no está mediado por la interacción con el sustrato, sino que el residuo en 482 afectaría a la actividad ATPasa o bien al ciclo de transporte de ciertos sustratos por ABCG2 (Ejendal *et al.*, 2006; Pozza *et al.*, 2006). La mutación en 482 podría ser una consecuencia de la selección por fármacos ya que en las líneas parentales sólo se encuentra la arginina en esa posición. Además de las mutaciones en la posición 482, existen otras variantes que han sido identificadas en líneas celulares obtenidas por selección de fármacos, pero no en las líneas parentales. En cualquier caso, ninguna de las variantes mostró diferencias con respecto a la línea salvaje en cuanto a localización y transporte de sustratos (revisado por Cervenak *et al.*, 2006). Otros estudios demostraron que sustituciones aminoacídicas puntuales en los dominios transmembrana 2, 3, 5, y 6 de ABCG2 afectan la especificidad por el sustrato (Miwa *et al.*, 2003).

2.3.1.3. ABCG4.

La proteína ABCG4 humana fue identificada independientemente en dos laboratorios, basándose en su homología y similitud con ABCG1 (Annino *et al.*, 2001; Oldfield *et al.*, 2002) y su cDNA se clonó a partir de librerías de testículo. ABCG4 comparte un 74% de identidad con ABCG1, y un 81% de similitud a nivel de la secuencia

aminoacídica. ABCG1 y ABCG4 guardan más identidad entre ellos que con cualquiera de los otros miembros de la subfamilia ABCG.

Se observó que la expresión del gen *ABCG4* estaba también regulada por oxiesteroles y retinoides, de manera similar a *ABCG1* (Klucken *et al.*, 2000). Todavía no existen datos de expresión y localización de la proteína. Mediante análisis de Northern blot empleando tejidos humanos y de rata, se determinó que ABCG4 se expresaba en el **cerebro** y en la **retina neural del ojo**, pero no en otros tejidos (Oldfield *et al.*, 2002).

Basándose en la similitud de secuencia de ABCG1 y ABCG4, así como en el hecho de que los niveles de expresión del mRNA de ambos transportadores están regulados positivamente por esteroides, ABCG1 y ABCG4 parecen ser buenos candidatos para formar un heterodímero (Cserepes *et al.*, 2004).

2.3.1.4. **ABCG5 y ABCG8.**

Los genes *ABCG5* y *ABCG8* (Berge *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001), se localizan enfrentados en sus extremos aminoterminal en el cromosoma humano 2p15-p16, y apenas 140 pares de bases separan sus respectivos sitios de inicio de la transcripción (Lu *et al.*, 2001). Estos genes codifican sterolin-1 y sterolin-2 respectivamente, y mutaciones en *ABCG5* o *ABCG8* producen **sitosterolemia**, una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por la acumulación de esteroides de origen vegetal (sitosterol, principalmente, pero también campesterol, estigmasterol y avenosterol) y animal (colesterol) en el plasma y los tejidos (Berge *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001). En pacientes con esta enfermedad existe un aumento en la absorción de esteroides neutros de la dieta, y un defecto en el eflujo de estos esteroides a la bilis, así como una biosíntesis disminuida de colesterol. Estos cambios en el tráfico de esteroides producen una acumulación de los esteroides neutros en la piel, en forma de xantomas, y en las arterias coronarias, lo que conduce a aterosclerosis prematura (revisado por Stefkova *et al.*, 2004).

ABCG5 y ABCG8 se expresan mayoritariamente en la membrana apical de **enterocitos del intestino y hepatocitos del hígado**. La co-expresión de ambos es necesaria para promover el transporte de esteroides neutros de los hepatocitos a la bilis.

El hecho de que las mutaciones en *ABCG5* o *ABCG8* produzcan un fenotipo clínico idéntico, así como el que la expresión de tanto ABCG5 como ABCG8 sea necesaria para que cada proteína sea transportada a la membrana plasmática de células en cultivo

sugiere que estos dos “half-transporters” funcionan como heterodímeros (Graf *et al.*, 2003).

2.4. Transportadores ABC en tripanosomátidos.

2.4.1. Transportadores ABC en *Leishmania*.

Hasta el momento, había tres subfamilias de transportadores ABC estudiadas en *Leishmania* sp.: las subfamilias ABCA, ABCB y ABCC, las cuales siguen la misma nomenclatura que los transportadores ABC humanos con los que presentan mayor homología (revisado por Pérez-Victoria *et al.*, 2001a). Además, el análisis de las secuencias del proyecto genoma de *Leishmania*, muestra la existencia de varias secuencias que presentan homologías significativas con proteínas ABC ya descritas, por lo que cabe esperar que se sigan investigando nuevas subfamilias de transportadores ABC en *Leishmania* (Ivens *et al.*, 2005; Leprohon *et al.*, 2006) (www.genedb.org) (Fig. I-18).

2.4.1.1. Subfamilia ABCA.

Con el clonaje y caracterización del gen ***LtrABC1.1*** de *L. tropica* nuestro grupo identificó esta nueva subfamilia de transportadores ABC en *Leishmania* (Parodi-Talice *et al.*, 2003), la cual está representada al menos por 10 genes en el genoma del parásito (Fig. I-18). *LtrABC1.1* es un gen duplicado en tándem, localizado en el cromosoma número 27 y que está flanqueado por secuencias repetidas invertidas; esta organización genómica sugiere que este locus podría ser susceptible de reordenamientos de secuencia en condiciones de presión por fármacos, aunque no se ha llegado a observar su amplificación ni su relación con resistencia a fármacos.

Por el contrario, tanto el gen *LtrABC1.1* de *L. tropica* como el transportador ABCA1 de mamíferos están involucrados en el tráfico de lípidos a través de membranas celulares. Además, se observó como la sobreexpresión de *LtrABC1.1* en parásitos transfectados con el gen, **disminuye la infectividad** de éstos (Parodi-Talice *et al.*, 2003).

El segundo gen de esta subfamilia, *LtrABCA2* de *L. tropica*, se localiza en el cromosoma número 11 y está duplicado. La proteína LtrABCA2 se localiza preferentemente en el bolsillo flagelar y en vesículas internas del parásito. LtrABCA2 está implicada en el **transporte de fosfolípidos** en *Leishmania*, lo que podría estar alterando el tráfico vesicular y la infectividad del parásito, ya que la sobreexpresión de LtrABCA2 disminuye la infectividad de los parásitos transfectados (Araújo-Santos *et al.*, 2005).

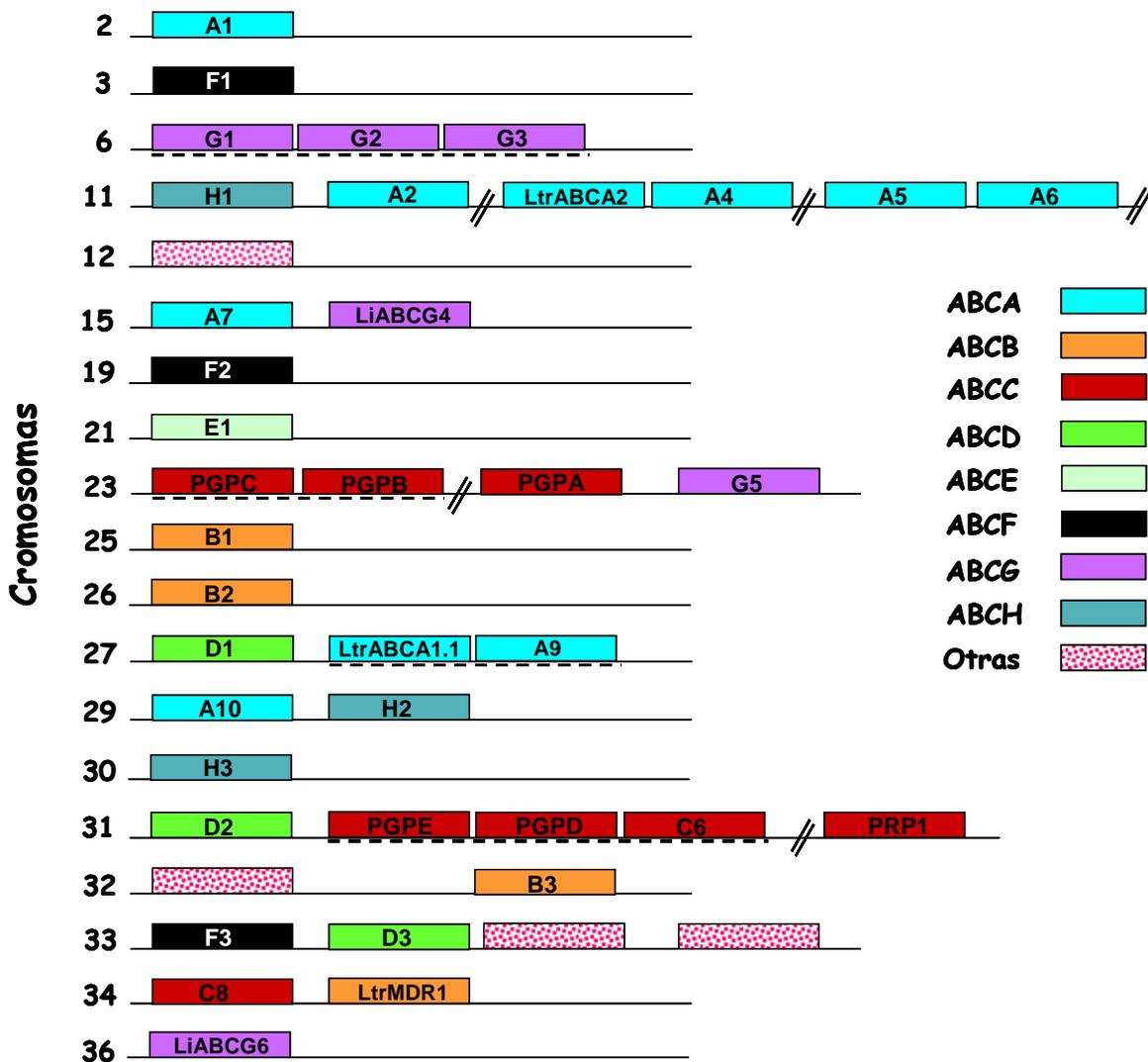


Figura I-18. Localización cromosómica de los genes que codifican proteínas ABC en *Leishmania*. Los cromosomas aparecen representados por líneas horizontales, y los genes ABC, como rectángulos coloreados. Una línea discontinua debajo de los genes, representa genes agrupados en tándem. Las líneas inclinadas en los cromosomas separan miembros de una misma familia que no están en el mismo locus. Adaptado de Leprohon *et al.* (2006).

2.4.1.2. Subfamilia ABCB.

En 1992 se identificó un segundo grupo de transportadores ABC en *Leishmania*, la subfamilia ABCB (Fig. I-18). Esta subfamilia engloba transportadores con alta homología con las proteínas Pgp de mamíferos, que confieren un fenotipo de multirresistencia a fármacos (MDR) similar al encontrado en células cancerígenas. El primer gen tipo ***mdr1*** fue descrito en *L. donovani* y confería **resistencia** a vinblastina (Henderson *et al.*, 1992). Esta línea presentaba un fenotipo MDR, con resistencia cruzada a puromicina y daunomicina, mostraba una menor acumulación intracelular de puromicina y tenía una amplificación en forma de elemento extracromosómico circular con una copia de un gen de tipo *mdr1* (*ldmdr1*), que también estaba sobreexpresado (Hendrickson *et al.*, 1993). La transfección de este gen en parásitos salvajes reproducía el fenotipo MDR.

Posteriormente, se identificaron genes homólogos en otras especies, como es el caso del gen ***ltrmdr1*** de *L. tropica*, que confería un fenotipo MDR a fármacos (Chiquero *et al.*, 1998). Un estudio reciente sobre el gen ***lemdr1*** de *Leishmania enriettii* propone que la proteína se localiza en **compartimentos endocíticos**, y que los sustratos de LeMDR1 son bombeados al interior del aparato de Golgi y retículo endoplásmico y exportados del parásito mediante exocitosis (Dodge *et al.*, 2004).

2.4.1.3. Subfamilia ABCC.

En 1990 se identificó el primer gen codificante para una proteína ABC en *Leishmania*, al cual se denominó ***pgpA*** (Ouellette *et al.*, 1990). Inicialmente, este gen se incluyó en la subfamilia ABCB ya que presentaba un 22% de identidad con la Pgp de mamíferos; sin embargo, dos años más tarde se descubrió una proteína de mamíferos relacionada con multirresistencia (MRP1) con la que la PGPA presentaba una identidad del 33% (Cole *et al.*, 1992), quedando incluida en la subfamilia ABCC. La subfamilia ABCC de *Leishmania* contenía al menos 4 miembros más cuyos genes se distribuyen en dos *loci* en el genoma de *Leishmania* (Fig. I-18). Los genes *pgpB* y *pgpC* ligados a *pgpA* se encuentran en el cromosoma 23, mientras que los genes *pgpD* y *pgpE* están en el cromosoma 31 (Ouellette *et al.*, 1998a). Al cabo de cierto tiempo se descubrió otro miembro de la subfamilia ABCC, al que se denominó PRP1, que confería resistencia cruzada a pentamidina y antimonio (Coelho *et al.*, 2003). Actualmente se sabe que existen 8

miembros de la subfamilia ABCC distribuidos en los cromosomas 23, 31 y 34 (Leprohon *et al.*, 2006).

PGPA ha sido la proteína más estudiada de esta subfamilia debido a que se ha encontrado formando parte de un **elemento extracromosómico**, el círculo H, amplificado en cepas de *Leishmania* resistentes a arsenito, antimonio trivalente o antimonio pentavalente (Ouellette *et al.*, 1998a). Experimentos de transfección con el gen *pgpA* demostraron que este transportador es capaz de conferir **resistencia** a antimonio y arsenito; sin embargo, los niveles de resistencia obtenidos fueron variables según la especie de *Leishmania* transfectada, no alcanzando nunca los niveles observados en cepas mutantes seleccionadas por presión de fármacos (Papadopoulou *et al.*, 1994). Por otra parte, los parásitos mutantes nulos para PGPA fueron más sensibles a arsenito y antimonio (Papadopoulou *et al.*, 1996), apoyando la hipótesis de que este transportador está involucrado en la resistencia a oxianiones en *Leishmania*, probablemente secuestrando los metales conjugados con tiol (trypanotion) en vesículas cercanas al bolsillo flagelar (Legare *et al.*, 2001).

Recientemente se ha visto que PgpA también puede conferir resistencia a antimonio en la forma amastigota intracelular del parásito (El Fadili *et al.*, 2005). Estudios realizados en aislados clínicos de *L. donovani*, han detectado la sobreexpresión de proteínas ABC, probablemente de la subfamilia ABCC, si bien esta no parece ser la única causa de la resistencia (Singh, 2006).

2.4.2. Transportadores ABC en *Trypanosoma*.

Los principales estudios sobre transportadores ABC en este género son los realizados por nuestro grupo sobre *T. cruzi*, donde se han caracterizado tres genes que codifican para proteínas ABC. El primero de ellos fue **Tcpgp2** (Dallagiovanna *et al.*, 1994), del que se deduce una secuencia aminoacídica que presenta alta homología con proteínas de la familia MRP de mamíferos, aunque parece no estar involucrada en fenómenos de resistencia a fármacos (Dallagiovanna *et al.*, 1996). El segundo transportador ABC descrito en *T. cruzi* también pertenece a la familia MRP y se denominó **Tcpgp1**. Este transportador está truncado en el extremo 3' debido a la inserción de un retrotransposón de tipo no-LTR L1TC. La proteína carece del segundo dominio de unión a nucleótidos y parece no ser funcional (Torres *et al.*, 1999).

Recientemente, se ha caracterizado el gen **TcABC1**, que codifica una proteína con alta homología con las de la subfamilia ABCA de otros eucariotas incluyendo *Leishmania*. TCABC1 se localiza en bolsillo flagelar y estructuras relacionadas con el tráfico vesicular. La mayor acumulación del marcador de endocitosis FM4-64 y de un análogo de esfingomiélin sugiere que tiene cierta implicación en procesos de **exocitosis** y **endocitosis**. El uso de marcadores enzimáticos para cuantificar el proceso de exocitosis determinó que los parásitos transfectados con *TcABC1* poseen una actividad exocítica superior a la de los controles. También se ha sugerido su posible función en el proceso de diferenciación a formas tripomastigotes (Torres *et al.*, 2004).

En *Trypanosoma brucei*, el empleo de oligonucleótidos degenerados correspondientes a regiones conservadas de los transportadores ABC y usando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, se amplificaron tres segmentos diferentes pertenecientes a tres genes distintos llamados **Tbabc1**, **Tbabc2** y **Tbabc3**. Mientras que TBABC3 no mostraba homología con ninguna de las proteínas ABC conocidas hasta el momento, TBABC1 y TBABC2 presentaban alta homología con la PGPA de *L. tarentolae* y *L. donovani* (Maser and Kaminsky, 1998). Estos genes no se encuentran amplificados en la cepa resistente al fármaco arsenical melarsoprol, aunque parásitos transfectados con *Tbabc1* sí adquieren distintos niveles de resistencia (Shahi *et al.*, 2002).

3. TRÁFICO DE LÍPIDOS.

Las membranas biológicas definen los límites de las células y orgánulos. La bicapa lipídica de la membrana es una **estructura dinámica** que contiene la maquinaria de señalización y transporte necesaria para la comunicación entre el medio externo y el espacio que encierra. Muchos sistemas de membranas tienen la capacidad de liberar o incorporar vesículas por fusión. Estos fenómenos de movimientos de membranas sustentan el tráfico intracelular y la secreción de lípidos o proteínas, procesos que juegan un importante papel en el crecimiento y proliferación celular. Los mecanismos moleculares por los que se lleva a cabo el movimiento de membranas han sido durante la última década y continúan siendo objeto de estudio, sobre todo en los aspectos que se

relacionan con el estudio de proteínas de membrana, su síntesis, translocación, inserción en la membrana diana y transporte o retención en orgánulos intracelulares específicos. Sin embargo, es necesario el análisis a nivel molecular del tráfico de lípidos, su organización en las células, ensamblaje en las membranas, desplazamiento entre las distintas organelas intracelulares y su organización formando dominios. Aunque en un principio se haya discutido y considerado la función celular de los lípidos como meros componentes estructurales de las membranas biológicas, hoy conocemos que tanto la organización como la composición lipídica de una membrana poseen importantes consecuencias funcionales para éstas (Menon, 2002).

Tanto la composición como la distribución o el movimiento de los lípidos en las membranas biológicas son el resultado de numerosas actividades de proteínas que comprenden la translocación de lípidos a través de las bicapas, el transporte entre organelas y la formación de dominios lipídicos. Estas proteínas, entre las que se encuentran varios transportadores ABC, presentan además funciones y localizaciones específicas que determinan los diversos compartimentos de las membranas y, por tanto, tienen influencia en numerosos procesos celulares como dirigir la localización y el transporte de proteínas, procesos de vesicularización y procesos de señalización celular (revisado por Pomorski y Menon, 2006).

La **translocación de lípidos** (Fig. I-19) es un mecanismo esencial en muchos procesos celulares incluyendo la propagación de membranas, N-glicosilación de proteínas, o el eflujo e internalización de lípidos. El ejemplo más claro de que el transporte de lípidos vía translocación determina su distribución en las membranas, es la consabida asimetría de los fosfolípidos de las membranas plasmáticas de la mayoría de las células eucariotas. En ellas, los aminofosfolípidos fosfatidilserina (PS) y fosfatidiletanolamina (PE), se concentran en la cara interna de la bicapa lipídica que forma la membrana plasmática, mientras que los fosfolípidos derivados de colina, fosfatidilcolina (PC) y esfingomielinina (SM) se ubican preferentemente en la cara externa. Esta observación se realizó por primera vez en la membrana de eritrocitos en la década de los 70 (revisado por Raggars *et al.*, 2000) y se estableció el concepto de la **asimetría lipídica** como una propiedad general de las membranas plasmáticas. Los primeros modelos proponían que esta asimetría era resultado de un equilibrio entre el movimiento espontáneo de lípidos a través de la bicapa e interacciones específicas de los aminofosfolípidos con proteínas internas del citoesqueleto. Más tarde, estos modelos se reemplazaron por otros que planteaban la existencia de proteínas integrales de

membrana que actuaban como translocadores de lípidos entre las dos caras de la membrana. Además, pronto se hizo evidente que la distribución asimétrica de los fosfolípidos en la membrana no era una propiedad estable, sino que podía alterarse en respuesta a determinadas situaciones, siendo por tanto **dinámica** y **regulada**. De todo ello se concluyó que la bicapa lipídica no era una estructura pasiva que albergaba proteínas funcionalmente activas, para llegar al concepto de que los lípidos que la componen, así como sus propiedades físicas juegan papeles importantes en procesos celulares.

La pérdida de asimetría se debe a la aparición de **PS** en la superficie celular, la cual ocurre bajo determinadas situaciones como puede ser la activación celular y por lo tanto se traduce en importantes funciones de señalización y reconocimiento (revisado por Zwaal y Schroit, 1997). La primera observación de este fenómeno se realizó sobre plaquetas, donde la exposición de PS activa la superficie celular para que se ensamblen los complejos de proteasas involucrados en la coagulación sanguínea (Bever *et al.*, 1982; Bever *et al.*, 1983). Después, se ha demostrado que la pérdida de la asimetría y la exposición de PS en la cara externa de la membrana plasmática se requiere para la fagocitosis de cuerpos apoptóticos por parte de macrófagos y fibroblastos (Fadok y Chimini, 2001). El movimiento de lípidos a través de la membrana que resulta en exposición de PS, también se ha demostrado en otros tipos celulares como linfocitos, células endoteliales, eritrocitos y células tumorales (revisado por Pomorski y Menon, 2006). También en *Leishmania* se ha demostrado cómo la exposición de PS en la cara externa de la membrana está involucrada en la infección por amastigotes y en la inhibición de la actividad leishmanicida del macrófago (de Freitas Balanco *et al.*, 2001) y como promastigotes en fase estacionaria infectiva presentan un mayor grado de externalización de PS que promastigotes en fase logarítmica de crecimiento en la que no son infectivos (Tripathi y Gupta, 2003).

Se ha propuesto que la externalización de PS es el resultado de un balance, regulado por los niveles de Ca^{2+} intracelulares, entre la actividad **aminofosfolípido translocasa** y otra actividad, la **escramblasa**, que no depende de ATP y que realiza un transporte bidireccional de fosfolípidos (Williamson *et al.*, 1995). Bratton *et al.* (1997) demostraron que la exposición de PS en la etapa temprana de la apoptosis es consecuencia de una activación de la **escramblasa** y una concomitante inhibición de la aminofosfolípido translocasa. Se ha propuesto que los **transportadores ABC** pueden

jugar un papel facilitador de la fagocitosis durante este proceso mediante la distribución transversal y lateral de los lípidos de la membrana (Fadok y Chimini, 2001).

En los últimos años, se han sucedido los estudios en los que se ha tratado de identificar a la(s) proteína(s) encargada(s) de llevar a cabo esta actividad aminofosfolípido translocasa, que ha sido descrita en una gran variedad de tipos celulares (revisado por Daleke y Lyles, 2000; Daleke, 2007). Estudios recientes llevados a cabo en levaduras han reforzado la idea de que **ATPasas tipo-P** participan de manera directa en el transporte de aminofosfolípidos. En levaduras, la familia de ATPasas P4 consta de cinco miembros, con funciones solapantes *in vivo*: Drs2p, Dnf1p, Dnf2p, Dnf3p, Neo1p (Hua *et al.*, 2002). Dnf1p y Dnf2p se localizan principalmente en la membrana plasmática, y la pérdida de estas dos proteínas altera la translocación de análogos fluorescentes de PS, PE y PC a través de la membrana plasmática hacia el interior, y produce una exposición incrementada de PE endógena en la superficie celular (Pomorski *et al.*, 2003). Además, membranas purificadas de la red de vesículas del trans-Golgi (TGN) en cepas a las que les faltan las proteínas Dnf y que contienen una Drs2p sensible a la temperatura, son incapaces de translocar el análogo de PS de la cara luminal a la cara citosólica una vez que se las cambia a dicha temperatura restrictiva (Natarajan *et al.*, 2004). Estos últimos hallazgos proporcionaron la mayor evidencia hasta la fecha de que las ATPasas P4 tienen una función en el **transporte lipídico**. Dnf3p colocaliza con Drs2p en TGN (Hua *et al.*, 2002), mientras que Neo1p está asociado con el sistema de endosomas (Wicky *et al.*, 2004). Drs2p y Dnf3p ayudarían a producir la asimetría de aminofosfolípidos en membranas en ruta hacia la superficie celular, posiblemente a nivel del Golgi (Alder-Baerens *et al.*, 2006).

Recientemente, se ha descrito en *L. donovani* una proteína perteneciente a la familia de las ATPasas tipo P4 (LdMT) capaz de translocar análogos de fosfolípidos hacia la cara interna de la membrana plasmática, y cuyo defecto inhibe la internalización de los análogos de fosfolípidos, confiriendo en los parásitos resistencia al alquil-fosfolípido miltefosina (Pérez-Victoria *et al.*, 2003b; Pérez-Victoria *et al.*, 2006b).

Por otro lado, se conoce muy poco sobre cómo la PC se mantiene preferentemente en la cara externa de la membrana. Es posible que este fosfolípido permanezca fuera sólo como consecuencia de requerimientos estructurales impuestos por el mantenimiento activo de los aminofosfolípidos en la cara interna. Otra posibilidad es la

existencia de actividades transportadoras. Estudios con eritrocitos han demostrado la existencia de una *flpasa* capaz de facilitar la migración de lípidos a través de la bicapa en dirección opuesta a la aminofosfolípido translocasa (Connor *et al.*, 1992). Esta actividad mostró ser más inespecífica en cuanto al tipo de fosfolípido y dependiente de temperatura y ATP. Ambas actividades parecen operar independientemente ya que se ha demostrado que el movimiento de aminofosfolípidos hacia el interior no afecta a la velocidad de movimiento hacia el exterior. Varias proteínas ABC son las responsables de esta actividad transportadora (Connor *et al.*, 1992; revisado por Devaux *et al.*, 2006).

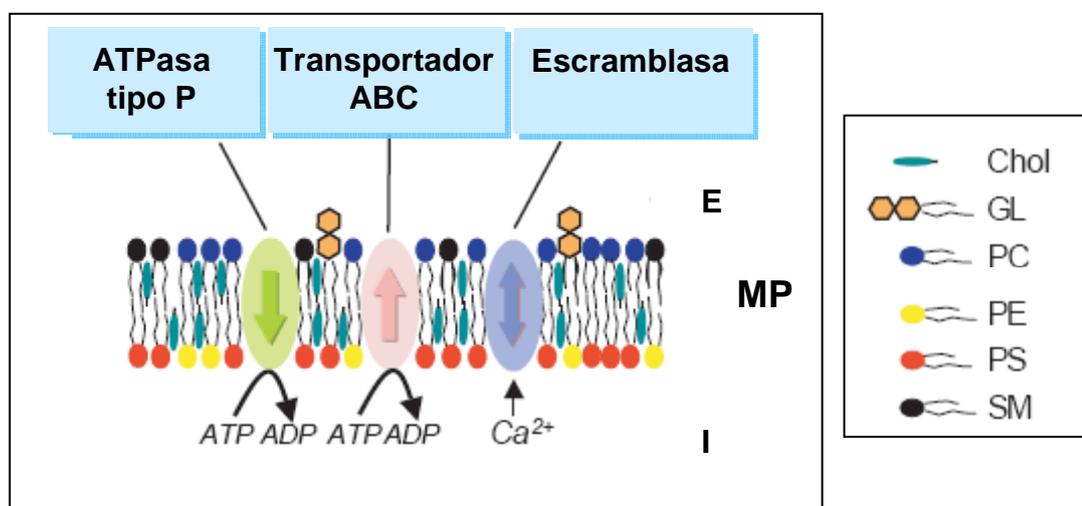


Figura I-19. Translocación de fosfolípidos a través de la membrana. Las ATPasas tipo P4 translocan fosfolípidos hacia el interior (I) celular (actividad *flipasa*). Los transportadores ABC, translocan fosfolípidos en dirección al exterior (E) celular (actividad *flpasa*). Las proteínas con actividad escramblasa, translocan fosfolípidos en ambos sentidos. Tomado de (Pomorski *et al.*, 2004)

Por su parte, el **tráfico intracelular de fosfolípidos** difiere bastante del transporte intracelular de proteínas a través del tráfico vesicular (revisado por Menon, 2002). Por ejemplo, se sabe que el paso de PE de nueva síntesis desde la cara citoplasmática del retículo endoplásmico hasta la membrana plasmática de fibroblastos ocurre en menos de dos minutos, mientras que la secreción proteica en las mismas células tarda más de diez minutos (Sleight y Kent, 1983). El mecanismo molecular por el que se lleva a cabo este rápido transporte intercompartimental de PE y otros fosfolípidos aún no está claro. Recientemente, se ha observado cómo, tras la internalización de análogos fluorescentes de fosfolípidos a través de la actividad *flipasa* de la membrana plasmática de levaduras a 2°C, éstos se distribuyen en mitocondrias, envuelta nuclear, retículo endoplásmico y

otras organelas intracelulares. Dado que este transporte ocurre a 2°C, temperatura a la que los procesos de tráfico vesicular están inhibidos, se concluye que el tráfico de lípidos entre los compartimentos intracelulares es independiente de intercambios vesiculares, sugiriéndose un posible papel de las proteínas de transferencia de fosfolípidos entre los distintos orgánulos, lo que se sustenta al observar una diferente distribución subcelular de los diferentes análogos (Fig. I-20) (Nichols, 2002). Esta implicación de proteínas en la transferencia de fosfolípidos entre los distintos orgánulos intracelulares se ha demostrado en levaduras, donde se han descrito dos isoformas de la enzima fosfatidilserina descarboxilasa (PSD), que convierten la PS en PE, y que se sitúan una en la cara interna de la membrana de la mitocondria y la otra en vesículas tardías de la ruta de secreción. El tráfico de PS desde el RE hasta la PSD mitocondrial requiere la presencia de sitios de contacto entre el RE y la mitocondria. Por su parte, el traslado de PS desde el RE hasta las vesículas tardías de la ruta de secreción requiere a la quinasa Stt4p, y un homólogo de la proteína de transferencia de fosfolípidos Sec14p (Wu y Voelker, 2002).

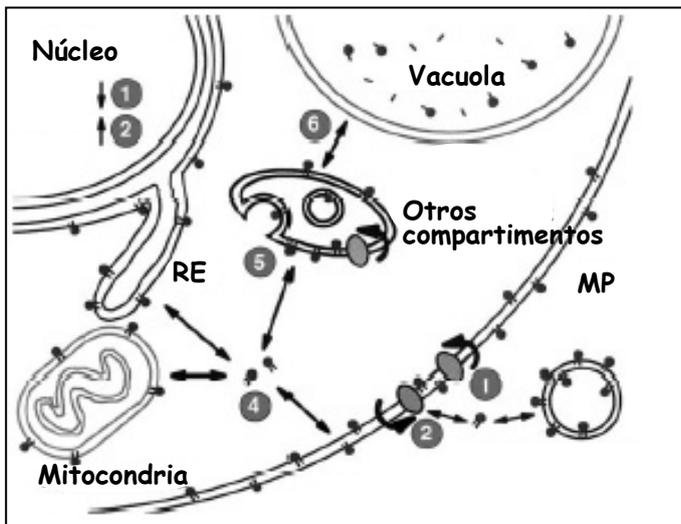


Figura I-20. Esquema del tráfico de análogos de fosfolípidos en levaduras. Vía translocación (1-2), transporte intracelular (4-6). MP, membrana plasmática; RE, retículo endoplasmático.

Por último, la **organización lateral de lípidos**, especialmente colesterol y esfingolípidos, en microdominios de membrana juega un importante papel tanto sobre la distribución de proteínas como sobre la regulación de interacciones proteína-proteína en las membranas y sobre funciones de señalización celular. El tráfico intracelular de esteroides ha sido objeto de gran número de estudios, sobre todo en relación a su internalización vía endocitosis mediada por el receptor para LDL. Un menor número de

estudios se han dirigido hacia el análisis del tráfico intracelular de colesterol desde el retículo endoplásmico hasta la membrana plasmática. La proximidad del retículo endoplásmico a la membrana plasmática de la mayoría de los tipos celulares y el que se hayan encontrado esos sitios de contacto de fosfolípidos sugieren que los contactos entre el retículo endoplásmico y la membrana plasmática determinan una importante ruta de transporte de esteroides (Menon, 2002).

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

La leishmaniasis constituye, junto con otras enfermedades parasitarias, un grave problema de salud pública a nivel mundial. El incremento global de la enfermedad con la aparición de nuevas zonas endémicas, junto con la falta de control, hace necesaria y urgente la búsqueda de nuevas estrategias de lucha frente a esta enfermedad parasitaria. La quimioterapia es, por ahora, la única forma de control eficaz de esta enfermedad. No obstante, la frecuente aparición de fallo terapéutico, así como el aumento en los casos de resistencia a los fármacos empleados en las zonas endémicas, son factores adicionales que dificultan el control de la enfermedad. Se ha demostrado experimentalmente que, en ciertos casos, el fenotipo de resistencia a fármacos en *Leishmania* guarda relación con la actividad de las proteínas transportadoras ABC. Los transportadores ABC constituyen una de las familias de proteínas más numerosas que se conocen en toda la escala biológica. Sus miembros se encuentran muy conservados a lo largo de la escala evolutiva, desde organismos procariotas hasta eucariotas, estando implicados en numerosos procesos celulares. Se trata de proteínas de membrana que utilizan la energía procedente de la hidrólisis del ATP para transportar una gran variedad de compuestos a través de la membrana. En *Leishmania* se ha descrito que las proteínas pertenecientes a las subfamilias ABCA, ABCB y ABCC están implicadas en la resistencia a fármacos y/o en el tráfico vesicular. Hasta el momento no se habían caracterizado miembros de la subfamilia ABCG presentes en el genoma de *Leishmania*. En mamíferos, los miembros de esta subfamilia están implicados en el transporte de fosfolípidos, esteroides y en la resistencia a fármacos. En nuestro laboratorio estamos interesados en conocer la posible implicación de las proteínas ABCG en el transporte de lípidos en el parásito, al objeto de estudiar su relación con la biología del parásito, interacción con la célula huésped y contribución a la resistencia a fármacos de naturaleza lipídica como son los alquil-fosfolípidos

En el presente trabajo nos planteamos, como objetivo general, la identificación y posterior caracterización molecular y funcional de transportadores pertenecientes a la subfamilia ABCG de *L. infantum*. Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

Objetivos

1. Aislamiento y caracterización molecular de nuevos genes de la subfamilia ABCG de *L. infantum*.
2. Estudio de la expresión y localización subcelular de las proteínas de dicha subfamilia.
3. Implicación de estas proteínas en el transporte de fosfolípidos y su posible contribución al fenotipo de resistencia a fármacos en el parásito.

MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES.

1.1. Líneas celulares.

1.1.1. Parásitos.

Leishmania infantum

Cepa MHOM/ES/1993/BCN-99 cedida por las Dras. Monserrat Gallego y Monserrat Portús, Unidad de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona.

1.1.2. Bacterias.

Todas las cepas corresponden a la especie *Escherichia coli*.

- **DH5 α** : *supE44* Δ *lacU169* (ϕ 80*lacZ* Δ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* (GibcoBRL).
- **XL1-BLUE**: *recA1* *gyrA46* *thi* *supE44* *hsdR17* *relA1*, *lac*⁻, F' [*proAB*⁺, *lac*^Q, *lacZ* Δ M15, Tn10(*tet*^f)].
- **M15[pREP4]**: *Nal*^s *Str*^s *rit*^s *lac*⁻ *ara*⁻ *gal* *mtf* F⁻ *recA*⁺ *uvr*⁺. (Qiagen).
- **TOP10**: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *deoR* *araD139* Δ (*ara-leu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* (*Str*^R) *endA1* *nupG* (Invitrogen).
- **XL10-GOLD®**: Tet^R Δ (*mcrA*)183 Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1* *supE44* *thi-1* *recA-1* *gyrA96* *relA1* *lac* Hte [F' *proAB* *lac*^f *Z* Δ M15 Tn10 (Tet^R) Amy Cam^R]^a (Stratagene).

1.1.3. Levaduras.

Todas las cepas corresponden a la especie *Saccharomyces cerevisiae* cedidas por el Dr. Thomas Pomorski, Instituto de Biología/Biofísica, Universidad Humboldt, Berlín.

- **EHY227**: (*MAT* α *sec6-4* *TPI1::SUC::TRP1* *ura3-52* *his3- Δ 200* *leu2-3-112* *trp1-1*). Mutante de las vías secretoras tardías. A una temperatura restrictiva, el tráfico

vesicular a la superficie celular está inhibido, lo que permite la acumulación de vesículas de secreción (Harsay and Schekman, 2002).

●**TPY143 (*sec6-4Δdrs2Δdnf3 PMA1-HA*)**. EHY227 *Δdrs2Δdnf3 PMA1-HA*. Derivada de la anterior mediante delección de los genes *drs2* y *dnf3*, además tiene la proteína endógena Pma1p marcada con un epítipo HA en el extremo amino terminal (Alder-Baerens *et al.*, 2006).

●**US50-18C**. (*MAT α* PDR1-3, *ura3*, *his1*). Cepa que contiene la mutación de ganancia de función *pdr1-3*, que permite altos niveles de expresión de los transportadores ABC de levaduras Pdr5p, Snq2p, Yor1p (Balzi *et al.*, 1987; Decottignies *et al.*, 1998).

●**AD18**. (*Δyor1::hisG*, *Δsnq2::hisG*, *Δpdr5::hisG*, *Δpdr10::hisG*, *Δycf1::hisG*, *Δpdr3::hisG*, *Δpdr15::hisG*). Cepa a la que se le han delecionado los transportadores ABC Yor1p, Snq2p, Pdr5p, Pdr10p, Ycf1p, Pdr15p y el factor de transcripción Pdr3p. (Decottignies *et al.*, 1998).

1.2. Medios de cultivo.

1.2.1. Para *Leishmania infantum*.

RPMI 1640 modificado al 20% de SBF.

Se compone de 8,32 g de RPMI 1640 (Gibco); 4,75 g de HEPES; 1,6 g de bicarbonato sódico; 100 ml de solución de aminoácidos orgánicos y azúcares (SAAA) 10X; 0,2 ml de vitaminas (1000X) en 800 ml de H₂O, ajustándose el pH a 7,2 y esterilizándose por filtración. Se suplementa con suero bovino fetal (SBF) (Invitrogen) al 20%, inactivado por calor a 56°C durante 30 min.

Solución de aminoácidos, azúcares y ácidos orgánicos (SAA 10X).

Compuesta por arginina 4,4 mg/ml, cistina 0,8 mg/ml, glutamato 2,5 mg/ml, glutamina 16,4 mg/ml, prolina 69 mg/ml, L-ornitina 1 mg/ml, glucosa 7 mg/ml, fructosa 4 mg/ml, malato 6,7 mg/ml, α -cetoglutarato 3,7 mg/ml, fumarato 0,55 mg/ml y succinato 0,6 mg/ml.

Solución de vitaminas 100X.

Compuesta por pantotenato cálcico 1 mg/ml, cloruro de colina 1 mg/ml, ácido fólico 1 mg/ml, clorhidrato de piridoxal 1 mg/ml, clorhidrato de tiamina 1 mg/ml, l-inositol 20 mg/ml, nicotinamida 1 mg/ml y riboflavina 0,1 mg/ml.

Geneticina (G-418) (Gibco).

Inhibidor de la síntesis de proteínas. Se utilizó como antibiótico de selección de los parásitos transfectados con los vectores que contenían el gen de la neomicina fosfotransferasa. Se utilizó en un rango de concentraciones desde 5 hasta 500 µg/ml.

Medio de congelación.

RPMI modificado al 20% de SBF con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO).

1.2.2. Para bacterias.

LB líquido.

Este medio contiene 10 g de bacto triptona, 10 g de NaCl y 5 g de extracto de levadura en 1 l de agua bidestilada, pH 7,5. Autoclavar.

LB agar.

Bacto Agar al 1,5% en LB líquido. Esterilizar en autoclave.

SOC.

2% triptona, 0,5% extracto de levadura, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM. Autoclavar.

Medio de congelación.

15% de glicerol en LB.

1.2.3. Para levaduras.

Medio SD.

Medio completo, compuesto por 1,7 g de base nitrogenada para levaduras (YNB), 5 g (NH₄)₂SO₄, 55 mg adenina-SO₄, 55 mg L-tirosina; 55 mg uracilo en 900 ml de agua bidestilada. Autoclavar y añadir 100 ml de dextrosa 20%, 10 ml de solución de aminoácidos estéril.

Medio –URA.

Este medio de selección contiene los mismos componentes que el anterior, a excepción del uracilo, que se elimina.

SD agar.

Medio SD con un 20% de agar.

-URA agar.

Medio -URA con un 20% de agar.

Solución de aminoácidos (100X).

Esta solución contiene 200 mg de L-arginina, 100 mg L-histidina, 600 mg L-isoleucina, 600 mg L-leucina, 400 mg L-lisina, 100 mg L-metionina, 600 mg L-fenilalanina, 500 mg L-treonina, 400 mg de L-triptófano. Se disuelve en 100 ml de agua bidestilada a 37° C y se esteriliza por filtración.

Solución de plaqueo.

Esta solución contiene 90 ml de PEG 400 al 45%; 10 ml de acetato de litio 1 M; 1 ml de Tris-HCl 1 M pH 7,5; 1 ml de EDTA 0,1 M. Esterilizado por filtración.

1.3. Tampones y soluciones.

1.3.1. Reactivos generales.

TAE 10X: Tris 0,4 M, EDTA 10 mM, ácido acético glacial 11,42 ml para 1l. Utilizado para electroforesis de DNA.

Solución de carga para DNA 6X: azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%, glicerol 30%.

Tampón TE (pH 7,4): Tris-HCl 10 mM pH 7,4; EDTA 1 mM.

Tampón HPMI: NaCl 132 mM, KCl 3,5 mM; MgCl₂ 0,5 mM; CaCl₂ 1 mM; glucosa 5 mM y Hepes 20 mM a pH 7,25. Utilizado en experimentos de acumulación de análogos de fosfolípidos.

Tampón HBS: NaCl 137 mM; KCl 5 mM; Na₂HPO₄ 7 mM; glucosa 6 mM y Hepes 21 mM a pH 7,4. Utilizado en experimentos de transfección.

Tampón fosfato salino (PBS): NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 1,8 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; pH 7,4.

Tampón SSC 20X: NaCl 3 M; citrato sódico 0,3 M pH 7,2.

Tampón hipotónico: 5 mM Tris-HCl, 100 μM PMSF, pH 7,4. Utilizado en ensayos de microscopía.

1.3.2. Para electroforesis de RNA.

Formamida desionizada: Roche.

Formaldehído: Panreac.

Tampón MNE 50X: ácido 4-morfolino propanosulfónico 0,2 M, acetato sódico 50 mM, EDTA 10 mM pH 7,0.

Tampón de migración: MNE 5X, formaldehído al 6%

Solución de carga: MNE 5X, formamida desionizada al 64% y formaldehído al 8%.

1.3.3. Para *Southern blot*.

Solución de depurinización: HCl 0,25M.

Solución de desnaturalización: NaOH 0,5 M.

Solución de neutralización: Tris-HCl 0,7 M pH 7,4; NaCl 1,5 M.

Solución de transferencia: SSC 20X.

1.3.4. Para *Northern blot*.

Solución de desnaturalización: NaOH 50 mM.

Solución de neutralización: Tris-HCl 0,1 M pH 7,5.

Solución de transferencia: SSC 20X

1.3.5. Soluciones de hibridación.

DNAss (Esperma de salmón): 10 mg/ml en agua. Se calentó a 95° C durante 10 min.

Denhardt's 50X: Albúmina bovina (BSA) 1%, ficoll 1%, polivinilpirrolidona 1%.

Solución de hibridación: SSC 6X, Denhardt's 5X, SDS 0,2%, DNAss 100 μg/ml desnaturalizado. Esta solución se empleó para la hibridación de *Southern blots*.

Tampón SSPE 20X: NaCl 3 M, NaH₂PO₄ 0,2 M, EDTA 0,02 M.

Solución de hibridación con formamida: SSPE 5X, formamida al 50%, Denhardt's 5X, SDS 0,5%, 100 µg/ml DNAss. Esta solución se empleó para la hibridación de *Northern blots*.

Soluciones de lavado: Para *Southern blots*: SSC 2X + SDS 0,1%.

Para *Northern blots*: SSPE 2X + SDS 0,1%; SSPE 1X + SDS 0,1%; SSPE 0,1X + SDS 0,1%.

Soluciones de deshibridación de filtros:

Southern blots: Solución 1: NaOH 0,4 M, incubar 30 min a 45° C. Solución 2: SSC 0,1 M; Tris-HCl 0,2 M; SDS 0,1%;.

Northern blots: Tris-HCl 5 mM, pH8; EDTA 2 mM pH 8; Denhardt's 0,1X.

1.3.6. Soluciones para electroforesis de proteínas.

Tampón de lisis (Urea Cracking Buffer): NaH₂PO₄ 10 mM, β-mercaptoetanol 1%, SDS 1%, urea 5 M, pH 7,0.

Tampón de muestra 2X: 1,25 ml de tampón concentrador, 0,3 g SDS, 20% glicerol, 10% β-mercaptoetanol, 0,2% azul de bromofenol, completando hasta 5 ml con urea 8 M.

Tampón de corrida 10X: Tris-HCl 0,25 M, glicina 1,92 M, SDS 1%, pH 8,3. Filtrado.

Acrilamida-bisacrilamida: Bio-Rad.

Tampón separador: Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; SDS 0,4 %. Filtrado.

Tampón concentrador: Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; SDS 0,4%. Filtrado.

Persulfato de amonio: 100 mg/ml en agua. Filtrado.

N,N,N',N'-tetrametiletilenediamina (TEMED): Bio-Rad.

Azul de Coomassie: Azul de Coomassie 0,2%; ácido acético 10%; metanol 25%.

Solución de desteñido: Metanol 40%, ácido acético 10%.

1.3.7. Soluciones para *Western blot* e inmunodetección.

Solución de bloqueo: BSA 1%, Tween-20 0,05% en PBS 1X o leche desnatada en polvo al 5% en PBS.

Solución de inmunodetección: BSA 0,1%, Tween-20 0,1% en PBS.

Tampón de transferencia: Tris base 25 mM, glicina 192 mM y 10% metanol.

Tampón fosfatasa: Tris-HCl 0,1 M pH 9,5; NaCl 0,1M; MgCl₂ 5mM.

Solución de revelado: 10 ml de tampón fosfatasa, 50 µl de azul de nitrotetrazolio (NBT, 100 mg/ml), 37,5 µl 5-bromo-4-cloro 3 indolil fosfato (BCIP, 50 mg/ml).

Rojo de Ponceau: Rojo de Ponceau-S 0,5%; ácido acético 1%.

ECL-Plus®: Sistema de detección de *Western blot*. GE Healthcare.

1.3.8. Soluciones para purificación de proteínas recombinantes.

1.3.8.1. Condiciones nativas.

Tampón de lisis: 50 mM NaH₂PO₄, pH 8; 300 mM NaCl.

1.3.8.2. Condiciones desnaturizantes.

Tampones de lisis:

Solución A: 6 M hidrocloreuro de guanidina; 0,1 M NaH₂PO₄; 0,01 M Tris-HCl, pH 8.

Solución B: 8 M urea; 0,1 M NaH₂PO₄; 0,01 M Tris-HCl, pH 8.

Tampón de lavado:

Solución C: 8 M urea; 0,1 M NaH₂PO₄; 0,01 M Tris-HCl, pH 6,3.

Tampones de elución:

Solución D: 8 M urea; 0,1 M NaH₂PO₄; 0,01 M Tris-HCl, pH 5,9.

Solución E: 8 M urea; 0,1 M NaH₂PO₄; 0,01 M Tris-HCl, pH 4,5.

1.3.9. Soluciones para purificación de los anticuerpos.

Tampón de lavado 1: Tris-HCl 10 mM, pH 7,5.

Tampón de lavado 2: NaCl 500 mM; Tris HCl 10 mM pH 7,5.

Tampón de elución: Glicina 100 mM pH 2,5.

Tampón neutralizante: Tris 10 mM, pH 8,8.

1.3.10. Soluciones para fraccionamiento subcelular de levaduras.

Solución de lavado: NaN₃ 20 mM.

Tampón de pre-esferoblastos: Tris-HCl 200 mM pH 8; EDTA 20mM, 1% β -mercapto etanol, NaN_3 20 mM.

Tampón esferoblastos: Sorbitol 1,4 M; Kpi 50 mM pH 7,2; NaN_3 20 mM; zimoliasa 0,15 mg/ml.

Tampón de lisis: Sorbitol 0,8 M; Tris-HCl 50 mM pH 7,5; EDTA 1 mM, PMSF 1 mM.

Tampón de gradiente: Sorbitol 0,8 M; Hepes-KOH 10 mM pH 7,2; EDTA 1 mM.

Tampón Kpi: KH_2PO_4 1 M, pH 4,2; K_2HPO_4 , pH 9. Mezclar ambas soluciones hasta obtener un pH de 7,2.

Mezcla de inhibidores de proteasas (1000x): Apoproteína 1 mg/ml; leupeptina 1 mg/ml; pepstatina 1 mg/ml; antipaína 5 mg/ml; benzamidina 157 mg/ml.

1.3.11. Soluciones para estudios funcionales en vesículas secretoras de levaduras.

Tampón de lisis: Sorbitol 0,8 M; trietanolamina 10 mM, EGTA 1 mM, inhibidores de proteasas pH 7,2.

Tampón de K-glutamato: Glutamato potásico 120 mM; KCl 15 mM; NaCl 5 mM; MgCl_2 3 mM; EGTA 2 mM; Hepes-KOH 20 mM; pH 7,2.

Sistema de regeneración de ATP. Fosfocreatina 10 mM; creatina fosfoquinasa 25 U/ml.

Solución de ATP: ATP 20 mM en buffer de K-glutamato.

1.4. Vectores plasmídicos.

1.4.1. Vectores de clonaje.

- **pGEM-T (Promega):** vector que posee residuos de desoxitimidina en los extremos 3'. Diseñado para el subclonado y secuenciación de fragmentos de DNA amplificados por PCR.

1.4.2. Vectores de expresión.

Los vectores de expresión para *Leishmania* fueron cedidos por el Dr. S.M. Beverley, Departamento de Microbiología Molecular, Facultad de Medicina, Washington. El vector de expresión en levaduras pYEXTF-HC fue cedido por el Dr. K. Holz, Departamento de Microbiología y Genética, Instituto de Biotecnología, Berlín.

- **pX**: vector de expresión para *Leishmania* (LeBowitz *et al.*, 1990), construido a partir de secuencias de la región R de *L. major* (DNA circular extracromosómico de 30 Kb). En este vector se ha sustituido el gen de la DHFR-TS por el gen *neo* que codifica para la neomicina fosfotransferasa que confiere resistencia a geneticina (G418).

- **pXG-'GFP+**: vector de expresión para *Leishmania* derivado de pXG-GFP+ (Ha *et al.*, 1996), que permite crear proteínas de fusión, marcadas con GFP en el extremo carboxilo.

- **pXG-GFP2+**: este vector es una variante de pXG-GFP+ (Ha *et al.*, 1996), que permite crear proteínas de fusión, marcadas con GFP en el extremo amino.

- **pYEXTF-HC**: vector de expresión inducible en levaduras que incorpora un promotor inducible por CuSO₄. Este vector permite crear proteínas de fusión con un epítipo FLAG (DYKDDDDK) en el extremo amino y una cola de 6 histidinas en el extremo carboxilo. (Holz *et al.*, 2002).

- **pQE-30** (Qiagen): vector utilizado para la expresión en *E. coli* de polipéptidos como proteínas fusionadas a 6 histidinas en el extremo amino terminal.

1.5. Oligonucleótidos.

1.5.1. Para secuenciación de *LiABCG4*

NOMBRE	SECUENCIA (5'→3')
LiABCG4-1	CAGCGTCTAGCTGTGTTTCG (Sentido, -817 pb)
LiABCG4-2	TGAAGGTCTACGTATGCGTG (Antisentido, +4223 pb)
LiABCG4-3	CATCAGCGTACACCACC (Sentido, -389 pb)
LiABCG4-4	GAGCAGGTGTGCAGATG (Antisentido, +3585 pb)
LiABCG4-5	GGTAAGACAACGCTAATGG (Sentido +278 pb)
LiABCG4-6	GATCGGCTGATGGTTCTC (Antisentido, +2114 pb)
LiABCG4-7	GTCATAACGCTGACGGAC (Sentido, +1037 pb)
LiABCG4-8	CGGTGAAAGTGGATCATG (Antisentido, +1480 pb)

1.5.2. Para clonaje de *LiABCG4*.

NOMBRE	SECUENCIA (5'→3')
LiABCG4-5'	caggatccAGTGTCTGCACCATCG (Sentido, -768 pb)
LiABCG4-3'	caactagtCAATGGCAACACACGAC (Antisentido, +4097 pb)
NBS-5'	GAGAACCTGACCTATCAG (Sentido, +161 pb)
NBS-3'	CAGCTGCGACAGGATTTTC (Antisentido, +948 pb)
Ac-5'	ctggatccATCGAGTACTTTGCCTC (Sentido, +858 pb)
Ac-3'	ctaagcttGCGCCCGTAGAAGTTGCC (Antisentido, +1173 pb)
LiABCG4gfp-C5'	gtggatccAGGCACACGCGCACGATG (Sentido, -17 pb)
LiABCG4gfp-C3'	gagatatcCGACCGGTACTTGCGCGG (Antisentido, +2224pb)

LiABCG4gfp-N5'	ctgcggccgcAGGCACACGCGCACGATG (Sentido, -17 pb)
LiABCG4gfp-N3'	cggatccTTACGACCGGTACTTGCGC (Sentido, +2227 pb)
LiABCG4y2-5'	cacaggatccGGGGGGCAAGTTGATCAAAC (Sentido, +3pb)
LiABCG4y2-3'	cacagcggccgcCGACCGGTACTTGCGCG (Antisentido, +2224pb)

1.5.3. Para mutagénesis de *LiABCG4*.

NOMBRE	SECUENCIA (5'→3')
MUT1a	GGGCctCTGGCGCGGGTA t GACAACGCTAATGGGCGCAATC (Sentido)
MUT1b	GATTGCGCCATTAGCGTTGTC a TACCCGCGCCAGAA g GGCCCC (Antisentido)

1.5.4. Para secuenciación de *LiABCG6*.

NOMBRE	SECUENCIA (5'→3')
LiABCG6-1	GTCGCTCTGGACATACTTGC (Sentido, -764 pb)
LiABCG6-2	CATTGGCAGAGAACATCTGC (Antisentido, +3723 pb)
LiABCG6-3	CACTCTTGGCACTAGCG (Sentido, -294 pb)
LiABCG6-4	AACACGAGACGGTGCTG (Antisentido, +2411 pb)
LiABCG6-5	AGCTATGTGACCGTCGAG (Sentido +395 pb)
LiABCG6-6	GAAATGTGCTTGATCCAGC (Antisentido, +1762 pb)

1.5.5. Para clonaje de *LiABCG6*.

NOMBRE	SECUENCIA (5'→3')
NBS-5'	GCTGACGAAGGTGACAC (Sentido, +163 pb)
NBS-3'	GATCTCGGCAAGAACTG (Antisentido, +836 pb)
LiABCG4gfp-C5'	ctagatctCTTCCCCTCAGTGGACCG (Sentido, -2 pb)
LiABCG4gfp-C3'	cacccgggATGTCTTCTCCAGCGCCAC (Antisentido, +2003pb)
LiABCG4gfp-N5'	gaagatctCGATGTCTTCTCCAGCGCC (Sentido, -2 pb)
LiABCG4gfp-N3'	cagcggccgcTCACTTCCCCTCAGTGGACC (Sentido, +2007 pb)
LiABCG4y2-5'	cacaagatctTCTTCTCCAGCGCCACC (Sentido, +3pb)
LiABCG4y2-3'	cacagcggccgcCCTTCCCCTCAGTGGACCG(Antisentido,+2003pb)

Los oligonucleótidos empleados tanto para secuenciación como para el clonaje, se sintetizaron en el “Servicio de Síntesis de Oligonucleótidos” del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” (CSIC), Granada. Los oligonucleótidos para mutagénesis se encargaron a Sigma-Genosys. Las letras minúsculas corresponden a secuencias no presentes en el DNA genómico, que fueron agregadas para introducir sitios de restricción. En el caso de los oligonucleótidos para mutagénesis, las letras minúsculas representan el lugar en el que se han introducido las mutaciones (C→T); (A→T). En rojo se destaca la mutación del Walker A. Los números indican la posición del primer nucleótido del oligonucleótido con respecto al ATG iniciador de los genes *LiABCG4* o *LiABCG6*.

1.5.6. Oligonucleótidos comerciales.

Además de los oligonucleótidos que aparecen en las tablas, para secuenciación se utilizaron los oligonucleótidos universales comerciales SP6, T3 y T7 de Promega.

1.6. Reactivos.

1.6.1. Reactivos de biología molecular.

5-bromo-4-cloro-3-indol-β-galactopiranosido (X-Gal): Roche. Solución 20 mg/ml en dimetilformamida.

Agarosa: Pronadisa.

Ampicilina: Sigma. Solución 100 mg/ml en agua.

Bromuro de etidio: Sigma.

Desoxinucleótidos: de Roche.

Desoxicitidina-5'-trifosfato (α -³²P dCTP): (3000 Ci/mmol) fue suministrada por GE Healthcare.

Dietilpirocarbonato (DEPC): Sigma

Enzimas de restricción: de Roche, Fermentas, NewEngland BioLabs.

Estreptomina: Sigma. Solución 50 mg/ml en agua.

Filtros nylon Hybond-N®: Membranas optimizadas para *Southern* y *Northern blots*, de GE Healthcare.

Fenol. Sigma.

Formaldehído: Panreac.

Formamida desionizada: Roche.

Fosfatasa alcalina: Roche.

Isopropil-β-D-tiogalacto-piranosido (IPTG): Roche. Solución 0.5 M en agua.

Kanamicina: Sigma. Solución 25 mg/ml en agua.

Lisozima. Solución 20 mg/ml. Sigma.

Marcadores de peso molecular: lambda DNA/HindIII, phi174 DNA/HaeIII: Promega. **RNA ladder:** Marcador de peso molecular para RNA. Invitrogen.

Matriz de níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA). Ni-NTA agarosa: Para la purificación de proteínas recombinantes. Quiagen.

Perfectprep Gel Cleanup®: Kit de limpieza de DNA. Eppendorf.

Perfectprep Plasmid Mini®: Kit de extracción de DNA plasmídico a pequeña escala. Eppendorf

Perfectprep Plasmid Maxi®: Kit de purificación de DNA plasmídico a gran escala. Eppendorf.

PureGene™: Kit de aislamiento de DNA genómico. Genra Systems.

QuickChange® II XL site-directed mutagenesis kit. Kit para realizar mutagenesis dirigida *in vitro*. Stratagene.

Random primed DNA labeling kit. Permite el marcaje de DNA con sondas radiactivas. Roche

Sephadex G-50 (GE-Healthcare). Para purificar las sondas radiactivas.

T4 DNA ligasa: Invitrogen.

TripleMaster® PCR System. Kit para amplificar fragmentos de DNA por la reacción en cadena de la polimerasa. Eppendorf.

TRIzol® reagent. Reactivo para el aislamiento de RNA total. Invitrogen.

1.6.2. Reactivos para el análisis de proteínas.

Acrilamida bis-acrilamida. Roche.

β-mercapto-etanol. Merk.

Bio-Rad Protein Assay: Para medir la concentración de proteínas. Bio-Rad.

N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED): Bio-Rad.

Persulfato amónico: Sigma.

Precision Plus Protein prestained standards (all blue): Bio-Rad.

Precision Plus Protein prestained standards (dual color) : Bio-Rad

Kaleidoscope prestained standards: Bio-Rad.

1.6.3. Reactivos para el análisis inmunológico.

Acetona: Merck.

Adyuvante incompleto de Freund: Sigma

Adyuvante completo de Freund: Sigma.

Albúmina de suero bovino (BSA): Sigma.

Anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina o con FITC: Sigma.

Anticuerpo policlonal anti-GFP de conejo: Molecular probes.

Anticuerpo policlonal anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa: Dako.

Membranas de transferencia Immobilon-P (PVDF): Membranas de poli (difluoruro de vinilideno), optimizadas para *Western blot*. Millipore.

Para-formaldehído: Merck

Para-nitrofenilfosfato (pNPP): Solución 1 M en PBS. Sigma.

Poli-L-Lisina. Para inmuno fluorescencia.

Reactivos ECL™ plus Western blotting detection system: Para la detección en *Western blot*. GE Healthcare.

Rojo Ponceau-S: Sigma

Tween-20: Merck.

Vectashield: Laboratorios Vecta. Para microscopía de fluorescencia.

1.6.4. Reactivos para el estudio funcional de las proteínas ABCG de *L. infantum*.

Azida: Sigma.

Bromuro de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium] (MTT): Sigma. Stock 5 mg/ml en PBS y filtrado. Se almacena a 4 °C hasta un máximo de 2 semanas.

Diisopropilfluorofato (DFP): Sigma. Se disolvió en isopropanol a una concentración 1 M.

Dimetilsulfóxido (DMSO): Sigma.

Ecoscint™ H: Líquido de centelleo empleado para medir la radiactividad asociada a las células.

Edelfosina: Calbiochem.

Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF): Sigma. Se disolvió en isopropanol a una concentración 100 µg/ml.

FM4-64. Marcador de endocitosis. Molecular probes.

G418 (Sulfato de neomicina o geneticina): Gibco. Solución stock 20 mg/ml en RPMI modificado.

Triton X-100: Panreac.

Miltefosina: Zentaris.

[¹⁴C]miltefosina (hexadecilfosfocolina) : Sintetizada por Amersham.

C₆-NBD-fosfolípidos: Estos compuestos son análogos de lípidos de cadena corta; poseen un grupo nitro-benzo-diazol que hace que los compuestos sean fluorescentes. Se utilizaron análogos fluorescentes de fosfatidilcolina (C₆-NBD-PC), fosfatidiletanolamina (C₆-NBD-PE), fosfatidilserina (C₆-NBD-PS) y esfingomiolina (C₆-NBD-SM). Avanti Polar Lipids.

Perifosina: Zentaris.

1.6.5. Reactivos para la expresión heteróloga de LiABCG4 y LiABCG6 en levaduras y para los estudios de funcionalidad.

1,6-bis-maleimidohexano (BMH): Pierce, Rockford, IL.

Acetato de litio: Sigma.

Albúmina libre de lípidos : Sigma

Anticuerpo monoclonal de ratón anti-Dpm1p. Anticuerpo frente a la dolicol-fosfato-manosa sintasa de *S. cerevisiae*, localizada en la membrana del RE. Molecular probes.

Anticuerpo policlonal de conejo anti-Sso2p. Anticuerpo frente al homólogo de syntaxina Sso2p, proteína implicada en la fusión de vesículas secretoras localizada en la membrana plasmática. Cedido por S. Keränen (Biotechnology and Food Research, Espoo, Finlandia).

Anticuerpo policlonal de conejo anti-Tgl2p. Anticuerpo frente a Tgl2p, proteína implicada en la degradación de lípidos en levaduras. Sirve como marcador del Golgi tardío. Cedido por J. Holthuis (Universidad de Utrecht, Holanda).

Anticuerpo policlonal de conejo anti-Vac8p. Anticuerpo que detecta la proteína de la membrana de la vacuola, Vac8p. Cedido por M. Veit (Free University Berlin, Alemania).

Anticuerpo policlonal de conejo anti-HA: Santa Cruz Biotechnology.

Anticuerpo monoclonal de ratón anti-HA: Boehringer-Mannheim.

Anticuerpo monoclonal de ratón anti-FLAG: Sigma.

Anticuerpo monoclonal de ratón anti-His: Sigma.

Anticuerpos anti-IgG de conejo y ratón conjugados con peroxidasa. Bio-Rad.

ATP 1mM: Roche.

Creatina fosfoquinasa: Calbiochem.

CuSO₄: Empleado para inducir la expresión en el sistema heterólogo. Sigma.

Ditiotreitol (DTT): Roche.

Dynabeads® unidas a proteína G: Dynal Biotech.

Fosfocreatina: Sigma.

Nicodenz®: Empleado para fraccionamientos subcelulares en gradiente. Nycomed Pharma AS (Oslo, Noruega).

Polietilenglicol (PEG): Sigma.

Sigma-Aldrich: Todos los reactivos necesarios para preparar el medio de crecimiento: YNB, (NH₄)₂SO₄, adenine-SO₄, L-tirosina, uracilo, dextrosa, L-arginina, L-

histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-treonina, L-triptófano.

2. MÉTODOS.

2.1. Cultivo y manipulación de *L. infantum*.

2.1.1. Cultivo *in vitro*.

Los promastigotes de *Leishmania* se cultivaron *in vitro* a 28 °C en medio RPMI 1640 modificado, como describe (Jackson *et al.*, 1986) y suplementado con 20% de SBF inactivado. El mantenimiento de los parásitos en cultivo se realizó mediante pases continuados durante no más de un mes. Cada uno de estos pases consistía en la resiembra de 4 millones de parásitos en fase logarítmica tardía por ml de medio fresco. Se utilizaron frascos estériles de 25 ml.

2.1.2. Criopreservación y congelación.

Las células se conservaron en congeladores a -80 °C o bien inmersas en nitrógeno líquido. Para ello se tomaron alícuotas de 3 ml de parásitos en fase logarítmica de crecimiento, se centrifugaron, se resuspendieron en 1 ml de medio de congelación (RPMI modificado con 20% de suero y 10% DMSO) y se depositaron en viales de congelación que se llevaron a -80 °C.

La descongelación de parásitos se llevó a cabo de un modo rápido, introduciendo los viales en un baño a 37 °C. Posteriormente, estos parásitos fueron centrifugados a 2000 g durante 5 minutos para eliminar los restos de DMSO, y el sedimento celular se resuspendió en 3 ml de medio de cultivo para iniciar su crecimiento a 28 °C.

2.1.3. Recuento de parásitos.

En los experimentos que requieren recuento celular, se utilizó un contador celular *Coulter Counter* modelo Z1, diluyendo 100 μl del cultivo de parásitos, previamente homogeneizado en 9,9 ml de medio isotón II (Coulter).

2.1.4. Transfección por electroporación.

La transfección es una técnica que consiste en la introducción de material genético extraño en células eucariotas. En nuestro caso, el proceso se llevó a cabo mediante electroporación (Kapler *et al.*, 1990) sobre los promastigotes de *L. infantum* en fase logarítmica tardía de crecimiento. Los parásitos se lavaron 2 veces con PBS estéril y una vez con HBS estéril. Tras el último lavado se resuspenden en HBS a una concentración de $50 \times 10^7/\text{ml}$; 400 μl de esta suspensión se mezclan con 50 μg de DNA plasmídico y se incubó durante 10 min en hielo. La transfección se realizó mediante electroporación en el sistema ECM 600® de BTX, utilizando como condiciones 450 voltios, 800 μF y 13 ohms. Tras la electroporación, los parásitos se incubaron 10 min en hielo y se transfirieron a 4 ml de medio RPMI modificado con 20% SBF inactivado, incubándose a 28 °C. A las 24 horas se les añadió el fármaco de selección; para la geneticina (G418) se empleó una concentración inicial de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Tras sucesivos pases en presencia de concentraciones crecientes de fármaco, los parásitos transfectados fueron finalmente mantenidos a una concentración máxima de 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de G418.

2.1.5. Determinación de la concentración inhibitoria 50 de crecimiento (Ensayos de MTT).

La Concentración Inhibitoria 50 (IC_{50}) se define como la concentración de fármaco que inhibe en un 50% el crecimiento de los parásitos cuando el cultivo en ausencia de fármaco alcanza la fase logarítmica tardía de crecimiento (Ellenberger y Beverley, 1989). A partir de los ensayos de MTT, el porcentaje de crecimiento se calculó dividiendo la absorbancia a una determinada concentración de fármaco entre la absorbancia de las células control crecidas en ausencia de fármaco. Con ello se obtuvo una curva de crecimiento de la que se extrapola la concentración de fármaco que redujo al 50% el crecimiento de los parásitos.

El método se basa en la capacidad de las deshidrogenasas de convertir el sustrato bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolio (MTT), soluble y amarillo, en el producto formazán, insoluble y de color púrpura. La cantidad de producto formado depende del número de células y de la viabilidad de las mismas, y se cuantifica espectrofotométricamente tras solubilizar los cristales de formazán con SDS (Mosmann, 1983). Para realizar el ensayo, se sembraron 300.000 parásitos/pocillo en un volumen final de 100 μ l de RPMI 20% SBF en placa de microtitulación de 96 pocillos, y se incubó durante 72h a 28 °C en presencia de distintas concentraciones de fármaco, por duplicado. A continuación, se añadieron 10 μ l de MTT (5 mg/ml), y se incubó 4h a 28 °C para permitir la formación de los cristales. Finalmente, los cristales de formazán se disolvieron añadiendo 90 μ l de SDS 20% e incubando en oscuridad a 37 °C durante 16 h. La reducción del MTT se determinó leyendo la DO₅₄₀ en un lector de ELISA.

2.2. Cultivo y manipulación de bacterias.

2.2.1. Cultivo de bacterias.

Los cultivos líquidos de bacterias se hicieron en medio LB a 37 °C y agitación constante en presencia del antibiótico de selección. Las bacterias también fueron cultivadas en medio semisólido, en placas de petri con LB agar, a 37 °C. Los stocks de bacterias se conservaron a -80 °C en medio LB suplementado con glicerol al 15%.

2.2.2. Preparación de células competentes por choque térmico y transformación.

Se crecieron 5ml de bacterias durante 16 horas en medio líquido con agitación a 37 °C. Se inoculó 1ml del pre-cultivo en 200 ml de LB, continuando su crecimiento hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,375. Se enfriaron en hielo durante 10-15 min y se centrifugaron durante 7 min a 3500 g a 4 °C. Una vez eliminado el sobrenadante, se resuspendieron las células en 1/5 del volumen inicial de MgCl₂ 0,1 M estéril frío, incubando la suspensión en hielo 15-20 min. Se volvió a centrifugar (7 min, 3500 g, 4 °C) y se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 1/50 del volumen inicial de CaCl₂ 0,1 M estéril frío y se incubaron en hielo durante una hora. A esa suspensión se añadió glicerol

100% hasta obtener una concentración final del 15% y se alicuotearon en 200 μ l en tubos eppendorf enfriados previamente. Las células se pueden guardar a -80 °C hasta su uso.

Para la transformación, se descongeló una alícuota de células competentes, a las que se añadió la mezcla de ligación de DNA. A continuación se realizó un choque térmico, para lo que se incubaron las bacterias durante 30 min en hielo, 45 s a 42 °C y 2 min en hielo. A la mezcla se añadieron 300 μ l de LB y se incubó una hora a 37 °C en agitación. Una alícuota de la mezcla se plaqueó en el correspondiente medio de selección y se incubó a 37 °C durante 14-16 h.

2.3. Cultivo y manipulación de levaduras.

2.3.1. Cultivo de levaduras.

Los cultivos líquidos de levaduras se hicieron en medio SD o –URA, en agitación a 27 °C o 38 °C, según se requiriera. Las levaduras también se cultivaron en medio semisólido, en placas de petri con medio SD o –URA agar, a 27 °C. Los stocks de levaduras se conservaron a -80 °C en el medio de selección suplementado con glicerol al 25%.

2.3.2. Transformación de levaduras.

Para la transformación de levaduras se emplearon 2 ml de cultivo a una DO_{600} de 2 que se centrifugaron durante 2 min a 1.000 g. Al sedimento se añadieron 10 μ l de esperma de salmón (10 mg/ml) y 2 μ g del DNA a transformar. Tras agitar enérgicamente, se añadieron 500 μ l de la solución de plaqueo junto con 20 μ l de DTT 1 M. Se incubó 14-16 h a temperatura ambiente, se centrifugó y el sedimento se resuspendió en 100 μ l del medio de selección, pasándose a una placa de petri con el medio sólido de selección. Se incubó a 27 °C durante 3-5 días.

2.3.3. Ensayos de sensibilidad a fármacos en levaduras.

Para determinar la sensibilidad a fármacos, se llevaron a cabo ensayos de crecimiento en placa. Estas se prepararon con el medio de selección adecuado (-URA agar), 50 μ M CuSO₄ y un gradiente del fármaco, que aumenta de izquierda a derecha. Las levaduras se dejan crecer en medio líquido toda la noche, hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 2. Posteriormente, se realizan dos diluciones seriadas 1/5, y se plaquean 5 μ l de cada cepa unas 6 veces a lo largo de la placa.

2.4. Aislamiento de ácidos nucleicos.

2.4.1. Aislamiento de DNA genómico de *L. infantum*.

Se realizó siguiendo el protocolo descrito en el Kit "Puregene DNA isolation" de Gentra, partiendo de 150 millones de parásitos. El DNA se resuspendió en agua bidestilada y se determinó su concentración mediante espectrofotometría (1 DO₂₆₀ DNA doble hebra= 50 μ g/ml).

2.4.2. Aislamiento de DNA plasmídico.

Para las extracciones de DNA plasmídico a pequeña escala (2-3 ml de cultivo bacteriano) se utilizó el Kit "Perfectprep® Plasmid Mini" de Eppendorf. Este método permite de forma rápida el aislamiento de pequeñas cantidades de DNA plasmídico en condiciones óptimas para realizar su tratamiento posterior (uso de enzimas de restricción, ligaciones, subclonado, marcaje radiactivo, secuenciación, etc.). El procedimiento se basa en el método de la lisis alcalina y precipitación con una solución de acetato potásico. El sobrenadante es pasado por una resina, lavado y eluido con un tampón Tris-HCl 10 mM pH 8,5. Para extracciones a mayor escala se siguió el protocolo del Kit "Perfectprep® Plasmid Maxi" (Eppendorf), partiendo de 500 ml de cultivo bacteriano.

2.4.3. Aislamiento de RNA total de *L. infantum*.

El aislamiento de RNA se llevó a cabo utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen) que se basa en el método de (Chomczynski y Sacchi, 1987). En el caso de *L. infantum*, 20×10^7 parásitos fueron resuspendidos en 1 ml de Trizol e incubados 5 min a temperatura ambiente (TA). Finalizado este tiempo, se añadieron 200 μ l de cloroformo, se agitó vigorosamente el tubo durante 15 segundos, y se incubó 2-3 min a TA. Tras una centrifugación en microfuga de 15 min a 12.000 rpm a 4 °C, se agregó a la fase acuosa 0,5 ml de isopropanol, incubándose 10 min a TA. Tras una nueva centrifugación de 10 min a 4 °C y a 12.000 rpm en microfuga, el sobrenadante fue descartado y el sedimento, correspondiente al RNA total, se lavó con etanol al 75% y se resuspendió en agua tratada con DEPC. La concentración del RNA obtenido se determinó mediante espectrofotometría, midiendo su absorbancia a 260 nm (1 DO = 40 μ g/ml).

2.5. Tratamiento enzimático de los ácidos nucleicos.

2.5.1. Digestión del DNA con enzimas de restricción.

Las enzimas fueron empleadas de acuerdo con las recomendaciones de la casa comercial. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 30 μ l empleando de 1 a 10 U de enzima por μ g de DNA a digerir, incubándose dos horas a la temperatura recomendada. Las enzimas se inactivaron de acuerdo con las condiciones recomendadas por la casa comercial.

2.5.2. Reacción de ligación.

Las reacciones de ligación de fragmentos de DNA se realizaron con la enzima T4 DNA ligasa (1U/ μ g de DNA), procedente del bacteriófago T4. El volumen final fue de 10 μ l en el tampón suministrado por la casa comercial, utilizando por lo general relaciones molares inserto: vector de 3:1. Generalmente, la reacción se realizó durante 16 horas a 16 °C, aunque las condiciones de reacción se optimizaron para cada construcción.

La mezcla resultado de la ligación se utilizó para transformar bacterias de *E. coli* competentes. Los transformantes positivos se seleccionaron mediante aislamiento, análisis de restricción del plásmido de resistencia y secuenciación.

2.5.3. Tratamiento con fosfatasa alcalina.

Esta enzima hidroliza el grupo fosfato en el extremo 5' del DNA. La ligasa necesita este grupo para la reacción de ligamiento, por lo que el tratamiento de los vectores de clonado con esta enzima disminuye la posibilidad de religamiento de los vectores abiertos. La reacción se realizó agregando 1 U de enzima a las digestiones con endonucleasas e incubando 30 min a 37 °C.

2.5.4. Marcaje radiactivo del DNA.

Se utilizó el procedimiento de "Random Primed" (Feinberg y Vogelstein, 1983) para marcar moléculas de DNA con [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP. Esta técnica se basa en la utilización de una mezcla de hexanucleótidos que actúan como cebadores para la síntesis de DNA por el fragmento Klenow de la DNA Polimerasa I de *E. coli*. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 30 μl con una concentración de DNA de 20 a 50 ng, 50 μCi de [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP y 2 U de polimerasa Klenow, siguiendo el protocolo de la casa comercial (Roche). Las sondas marcadas se purificaron mediante cromatografía en columnas de 1 ml de Sephadex G-50 (GE healthcare). El DNA marcado se resuspendió en un volumen final de 100 μl de agua bidestilada. Se emplearon 10 μl para medir el número de desintegraciones por minuto (dpm) en un contador de centelleo.

2.5.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se empleó la mezcla de DNA polimerasas termoestables suministradas con el kit "Triple Master® PCR System" de Eppendorf. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μl , en una mezcla de 20 pmol de cada cebador, 400 μM de cada desoxinucleótido, 10-100 ng de DNA molde, 0,1 volúmenes de tampón PCR "High Affinity" 10X y 1-5 U de polimerasa. Las condiciones de la PCR y el número de ciclos de amplificación se ajustaron para cada experimento.

2.5.6. Secuenciación del DNA.

La secuenciación de DNA se realizó por el método de terminación de cadena por dideoxinucleótidos descrito por (Sanger *et al.*, 1977). El método se basa en la

interrupción de la síntesis de DNA por una polimerasa mediante la incorporación de un dideoxinucleótido que detiene la elongación de la cadena a partir de un cebador, por no tener un extremo 3'-OH al cual añadir el siguiente nucleótido trifosfato. La secuenciación se realizó con un secuenciador automático *3100 Genetic Analyser* (Applied Biosystems) utilizando el kit "AmpliTaQDyeDeoxy terminador Cycle Sequencing" (Perkin Elmer) y utilizando la optimización llevada a cabo en nuestro Instituto por A. Lario (Lario *et al.*, 1997). Los cebadores utilizados fueron los universales (SP6, T3, T7), así como los oligonucleótidos sintéticos descritos anteriormente.

2.5.7. Mutagénesis dirigida.

Para obtener una mutación puntual en un plásmido, se utilizó el protocolo recogido en el kit de mutagénesis *Quick Change® XL-Site-Directed* (Stratagene). Se emplean un par de oligonucleótidos, que incluyen dicha mutación, complementarios entre sí y se realiza una reacción de PCR con la enzima *Pfu Ultra High Fidelity DNA Polimerasa* dando como resultado dos hebras completas y complementarias del plásmido amplificado. Después de eliminar el DNA de partida en una reacción de digestión con la enzima *DpnI*, que hidroliza el DNA metilado, se transformaron bacterias con el producto de la amplificación. Finalmente, se chequeó mediante digestión con enzimas de restricción y por secuenciación la existencia de la mutación en el plásmido obtenido de las bacterias transformadas.

2.6. Electroforesis y transferencia de ácidos nucleicos.

2.6.1. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

Mediante esta técnica, los fragmentos de DNA pueden separarse según su tamaño y posteriormente ser transferidos a membranas o bien purificados a partir del gel. Se utilizaron geles de agarosa de porcentaje entre 0,8 y 1,5 %, según los tamaños a separar, preparados en tampón TAE 1X y realizándose la separación a 5 V/cm. Las muestras se cargaron en los geles con tampón de carga. El DNA se visualizó tiñendo los geles con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio y observándolos bajo luz ultravioleta. Como marcadores de tamaño molecular se emplearon el DNA del fago lambda cortado con *Hind III* y el DNA del fago phiX174 digerido con *Hae III* (0,1 µg por pocillo).

2.6.2. Purificación del DNA incluido en agarosa.

Los fragmentos de DNA se aislaron utilizando el Kit comercial *Perfectprep® Gel Cleanup* (Eppendorf) siguiendo el protocolo de la casa comercial. El fragmento de agarosa fue disuelto en el tampón de unión proporcionado en el kit a 55 °C durante 10 min, y el DNA se retuvo en una membrana de fibra de vidrio. La membrana, que contiene el DNA se lavó con una solución de etanol para eliminar impurezas y finalmente el DNA se eluyó con agua.

2.6.3. Electroforesis de RNA en geles desnaturalizantes.

La separación del RNA se realizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes. Las muestras se prepararon en una solución 8% de formaldehído, 50% formamida y MNE 5X y se desnaturalizaron 15 min a 65 °C; antes de cargarlas en el gel se les añadió bromuro de etidio y tampón de carga. Los geles fueron de agarosa al 1%, 6% de formaldehído y MNE 5X, desarrollándose la electroforesis en tampón 6% formaldehído y MNE 5X.

2.6.4. Transferencia de DNA mediante *Southern blot*.

El DNA separado mediante electroforesis en geles de agarosa fue transferido a membranas de nylon Hybond-N® de GE-Healthcare según la técnica descrita por Southern (1974). Los geles fueron tratados 10 min con HCl 0,25 M para depurinizar el DNA y facilitar su hidrólisis; posteriormente fueron tratados con solución desnaturalizante durante 30 min, y con solución neutralizante durante el mismo tiempo. La transferencia se realizó durante toda la noche por capilaridad en tampón SSC 20X. Finalizada la transferencia, los filtros se lavaron en SSC 2X y, una vez secos, el DNA fue unido covalentemente por irradiación con luz ultravioleta a 250 nm durante 3 min.

2.6.5. Transferencia de RNA mediante *Northern blot*.

En este caso, el RNA separado en geles de agarosa-formaldehído se desnaturalizó durante 15 min en NaOH 50 mM y se renaturalizó durante 30 min en Tris-HCl 0,1 M pH 7,5. La transferencia a filtros y el fijado del RNA a los mismos se realizó igual que en la técnica de *Southern blot*.

2.6.6. Hibridación de ácidos nucleicos con sondas radiactivas.

Los filtros procedentes de la transferencia de DNA fueron preincubados en bolsa a 65 °C durante 1 hora y con agitación suave, en la solución de hibridación (0,2 ml/cm² de filtro) sin sonda. Posteriormente, se hibridaron durante 16 horas, a 65 °C y agitación suave, con un volumen de solución de hibridación de 0,05 ml/ cm² de filtro, en presencia de la sonda marcada radiactivamente (10⁶ dpm/ml) previamente desnaturalizada (10 min a 95 °C y 2 minutos en hielo). En el caso de filtros con RNA, la hibridación se realizó a 42 °C en una solución con 50% de formamida con 6x10⁶ dpm/ml de solución de hibridación. Para el *Southern blot*, los lavados se llevaron a cabo en SSC 2x/SDS 0,1%, a 65 °C; para el *Northern blot* los lavados se llevaron a cabo en SSPE 2x/SDS 0,1%, 15 min a 42 °C; en SSPE 1X/SDS 0,1%, 30 min a 42 °C; y en SSPE 0,1X/SDS 0,1% 15 min a TA. Una vez lavados, los filtros se expusieron a una película autorradiográfica a -80 °C, utilizando pantallas amplificadoras, o bien pantallas de almacenamiento de GE Healthcare.

Deshibridación de filtros de DNA y RNA.

Los filtros de DNA marcados con sonda radiactiva se deshibridaron lavándolos con una solución de NaOH 0,4 M a 45 °C durante 30 min, y posteriormente 15 min a 45 °C con una mezcla de SSC 0,1M/ Tris 0,2 M/ SDS 0,1%.

Los filtros de RNA marcados con sonda radiactiva se deshibridaron lavándolos durante 1-2 horas a 65 °C en una solución Tris 5 mM/ EDTA 2 mM/ Denhardt's 0,1X.

2.7. Técnicas de obtención y análisis de proteínas.

2.7.1. Obtención de proteínas totales de *L. infantum*.

En general, los parásitos fueron recogidos durante la fase logarítmica tardía de crecimiento (20-25x10⁶ parásitos/ml), aunque pudo variar en función del experimento realizado. Los parásitos fueron lavados 3 veces con PBS y se resuspendieron en tampón de lisis a una concentración de 4x10⁸/ml de tampón. Las muestras se incubaron 30 min a 37 °C y posteriormente se añadió un volumen del tampón de muestra 2X para cargar

geles de poliacrilamida a razón de 25 μ l de la mezcla por pocillo, equivalentes a las proteínas totales de 5 millones de promastigotes.

2.7.2. Cuantificación de proteínas.

La concentración de proteínas se determinó utilizando el método colorimétrico de Bradford (1976), en el que se basa el kit *Bio-Rad Protein Assay*. Este método consiste en la cuantificación de la unión del colorante Azul de Coomassie a las proteínas de la muestra, medida por espectrofotometría. Para obtener los valores de concentración a partir de la DO, se realizó previamente una curva patrón con los valores de DO₅₉₀ obtenidos a partir de concentraciones crecientes de albúmina.

2.7.3. Electroforesis de proteínas en geles SDS-PAGE.

La separación de proteínas en función de su tamaño se realizó mediante la técnica de electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida y SDS (SDS-PAGE), según el método de Laemmli (1970). La separación electroforética se realizó en geles discontinuos, compuestos por un gel superior (concentrador) preparado al 3-4,5% de acrilamida/bisacrilamida y pH 6,8, y un gel inferior (separador) al 10-14% y pH 8,8. Los porcentajes de acrilamida se eligieron en función del tamaño de las proteínas de interés a separar. La electroforesis se llevó a cabo en minigeles empleando la cubeta del sistema *mini-PROTEAN* de Bio-Rad, a 20-25 mA/gel. Como marcador de peso molecular se utilizaron los standards preteñidos de Bio-Rad. La fijación y visualización de las proteínas se realizó mediante tinción con una solución de Azul de Coomassie R-250 al 0,2% en 40% de metanol y 10% ácido acético durante media hora y posterior decoloración en 40% de metanol y 10% de ácido acético.

2.7.4. Transferencia de proteínas a membrana (*Western blot*).

Las proteínas separadas por electroforesis en geles de acrilamida se transfirieron a membranas de PVDF *Immobilion-P* de Millipore. Para ello, una vez finalizada la electroforesis, los geles se sumergieron en el tampón de transferencia durante 15 min. Las membranas de PVDF del tamaño del gel se prepararon humedeciéndolas en metanol absoluto durante 15 segundos, posteriormente se sumergieron en agua bidestilada 2 min y finalmente en tampón de transferencia 5 min. El sándwich de

transferencia se montó colocando la membrana junto al gel y ambos entre papeles *Whatman* humedecidos en dicho tampón. La transferencia húmeda se realizó en un aparato *Mini Trans-Blot Cell* de Bio-Rad durante 1 hora a un voltaje máximo de 25 V y un amperaje máximo de 100 mA. Finalizada la transferencia, las membranas se tiñeron con una solución 0,5 % Rojo Ponceau, 1% ácido acético en agua para visualizar las proteínas y determinar la eficiencia de la transferencia, destiñéndose con agua bidestilada. Seguidamente, la membrana se bloqueó en una solución de leche desnatada 5% en PBS durante 14 h a 4 °C, como paso previo a la inmunodetección de las proteínas transferidas.

2.7.5. Obtención de proteína recombinante de bacterias transformadas.

Las células de *E. coli* (M15) se transformaron con el plásmido de expresión LiAc-pQE30, cuyo producto de expresión, el péptido recombinante LiABCG4-Ac, está bajo el control del represor *lac* el cual se inhibe por la adición de IPTG. Una colonia aislada de bacterias transformadas se cultivó en 10 ml de LB durante toda la noche en presencia de 100 µg/ml de ampicilina y 25 µg/ml de kanamicina a 37 °C con agitación. Este cultivo se transfirió a 500 ml de LB incubándose a 37 °C con agitación hasta una DO₆₀₀ de 0,6, momento en el que se indujo la expresión de la proteína añadiendo al cultivo IPTG a distintas concentraciones (0,5 y 1 mM) incubándose durante 4 h a 37 °C. El cultivo se centrifugó durante 10 min a 4.000 g y, tras lavarlo 3 veces con PBS, se resuspendió en tampón de lisis para condiciones nativas suplementado con 1 mg/ml de lisozima, incubando 30 min a temperatura ambiente. Se realizó un chequeo de solubilidad de la proteína inducida, para lo cual las células se lisaron mediante 2 pulsos de sonicación de 30 seg. Tras una centrifugación en microfuga de 35 min a 10.000 g, se separaron los sobrenadantes y los sedimentos, que se resuspendieron en tampón de lisis. Una alícuota de cada uno de ellos se calentó 10 min a 95 °C, se centrifugó 2 min y se cargó en geles de poliacrilamida.

2.7.6. Cromatografía de afinidad con Ni²⁺-NTA.

El vector pQE-30 permite producir proteína recombinante fusionada con un extremo de 6 histidinas. La proteína fue purificada por cromatografía de afinidad utilizando como soporte sólido Ni²⁺-ácido nitrilotetra-acético (Ni-NTA) (Quiagen). En nuestro caso se empleó la purificación en *batch* bajo condiciones desnaturizantes. El sedimento de

proteínas insolubles fue resuspendido en Tampón A (hidrocloruro de guanidina 6M, fosfato sódico 0,1 M, Tris-HCl 0,01 M pH 8). Se incubó en agitación 1 hora a temperatura ambiente. Se agregó la resina Ni-NTA que previamente había sido equilibrada con tampón A. La mezcla de proteínas y resina se incubó 45 min a temperatura ambiente con agitación constante. Posteriormente se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón A, 5 volúmenes de tampón B (urea 8 M, fosfato de sodio 0,1 M, Tris-HCl 0,01 M pH 8), 5 volúmenes de tampón C (tampón B a pH 6,3), 5 volúmenes de tampón D (tampón B, ajustando el pH a 5,9) y 5 volúmenes de tampón E (tampón B con pH 4,5). Los sobrenadantes de cada eluido se recuperaron y se chequearon en geles de poliacrilamida.

2.8. Técnicas inmunológicas.

2.8.1. Obtención de anticuerpos policlonales de conejo.

Para la obtención de anticuerpos contra las proteínas recombinantes se utilizaron conejos de la cepa New Zealand White. Previamente a su inmunización, se tomó una muestra de suero preinmune para su utilización como control en los ensayos posteriores. Se realizaron inmunizaciones por vía subcutánea, de acuerdo al siguiente protocolo. La primera inmunización se realizó con 150 µg de proteína en 500 µl de PBS con un mismo volumen de Adyuvante Completo de Freund (Sigma), mezclándose hasta lograr una emulsión homogénea. La emulsión se inyectó por vía subcutánea en tres sitios diferentes. Dos semanas después se realizó la segunda inmunización con igual cantidad de proteína pero esta vez con un volumen de Adyuvante Incompleto de Freund (Sigma), siguiéndose el mismo procedimiento que en la primera. Tres inoculaciones más fueron practicadas espaciadas dos semanas y durante las cuales se extrajo sangre del conejo para medirse los títulos de anticuerpos mediante la técnica de ELISA. Finalmente, a los 15 días de la última inoculación, se realizó la sangría final. Los sueros se obtuvieron incubando las muestras de sangre durante dos horas a temperatura ambiente, 20 min a 37 °C, y posteriormente en hielo varias horas para permitir la formación del coágulo. Tras centrifugar durante 10 min a 2500 g, el sobrenadante fue recuperado almacenándose a 4 °C con 0,02% de azida sódica o a -80 °C.

2.8.2. Titulación de los anticuerpos.

Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos. Se aplicó a cada pocillo 0,5 µg de proteína en un volumen de 200 µl de ácido bórico 100 mM pH 9,5, incubándose 5 h a 37 °C. Posteriormente, las placas se lavaron tres veces con PBS/ 1% Tween-20 (PBS-T) y se bloquearon durante la noche a 4 °C con 200 µl por pocillo de una solución de PBS-T con 5 µg/ml de BSA. Las placas se lavaron tres veces con 200 µl de PBS-T y posteriormente se agregaron 200 µl de las diferentes diluciones del suero preinmune e inmune en PBS-T, incubándose una hora a 37 °C. Los pocillos se lavaron con PBS-T y se agregaron 100 µl del anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma) en una dilución 1/5.000 incubándose una hora a 37 °C. Las placas se lavaron nuevamente y se revelaron con 200 µl de para-nitrofenil fosfato (1mg/ml) en una solución de dietanolamina 100 mM pH 9,5 MgCl₂ 0,5 mM durante 10 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo añadiendo 50 µl por pocillo de EDTA 0,5 M pH 8, midiéndose la DO₄₀₅ en un lector de placas Titertek.

2.8.3. Detección con anticuerpos de proteínas transferidas a membranas.

Las membranas de PVDF, obtenidas tras la transferencia de proteínas, se incubaron a temperatura ambiente, durante una hora, con el suero inmune diluido (o anticuerpo comercial correspondiente) 1/5.000 en tampón de bloqueo (1% BSA en PBS 1X) con un 0,05% de Tween-20. Tras 3 lavados de 5 min con tampón de bloqueo, se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina (1/5.000) durante 30 min. Después de 2 lavados, la membrana fue revelada en tampón fosfatasa con los sustratos NBT y BCIP. También se utilizó anticuerpo secundario anti- IgG de conejo conjugado a peroxidasa, incubándolo bajo las mismas condiciones que el anterior y utilizando para el revelado los sustratos ECL Plus™.

2.8.4. Purificación de los anticuerpos.

Realizamos la purificación mediante adaptación de un protocolo descrito con anterioridad (Lane, 1988), utilizando proteína recombinante adherida a membranas de PVDF. Para ello, se indujo la expresión de proteína recombinante y se realizó electroforesis del extracto total de proteínas bacterianas inducidas en gel SDS-PAGE. El gel se transfirió a una membrana de PVDF y, tras teñir con rojo Ponceau para visualizar

las proteínas, se cortó la parte de membrana correspondiente a la proteína recombinante. La membrana se incubó durante 12 horas, a 4°C, con el suero diluido 1:10 en Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; se lavó la membrana con 10 volúmenes de Tris-HCl 10 mM pH 7,5. Los anticuerpos se eluyeron con tampón glicina 100 mM pH 2,5. El eluido se recogió sobre Tris 10 mM pH 8,8 para neutralizar la solución resultante y se analizó el título de anticuerpos mediante ELISA. Las muestras se guardaron a 4 °C con un 0,02% de azida sódica.

2.8.5. Inmunofluorescencia indirecta.

Los parásitos se lavaron 4 veces con PBS 1X a 4 °C y se resuspendieron en PBS 1X a una concentración de 2×10^6 parásitos/ml. Se utilizaron portaobjetos provistos con 10 círculos de 6 mm de diámetro (BioMérieux), sobre los que se depositaron 20 μ l de polilisina durante 20 min para facilitar la adhesión de los parásitos. Posteriormente, se depositaron 20 μ l de la suspensión de parásitos por círculo, dejándose secar completamente a temperatura ambiente y almacenándose a -20 °C hasta su utilización.

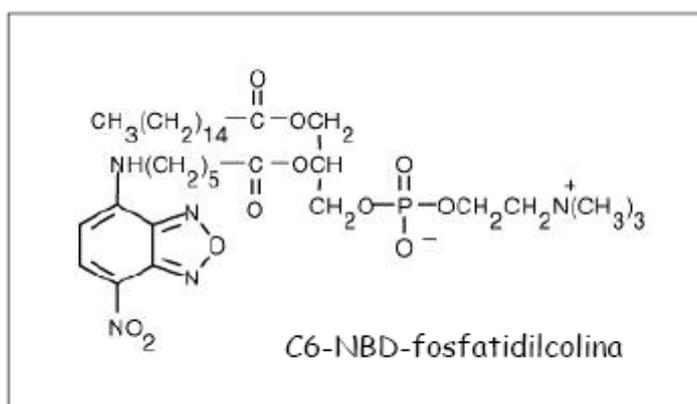
Para su fijación, los portaobjetos con parásitos fueron incubados 5 min con etanol absoluto a -20 °C y 8 min con acetona a -20 °C. Para la inmunofluorescencia, las preparaciones fueron incubadas con los sueros preinmune e inmune diluidos en tampón IFI (PBS/0,1% BSA) durante 1 h a 37 °C en cámara húmeda. Se lavaron 3 veces en tampón IFI y se incubaron con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a fluoresceína (Sigma), diluido 1/5000 en tampón IFI 1h a 37 °C en cámara húmeda. Los portaobjetos se lavaron 3 veces en tampón IFI y se dejaron secar protegidos de la luz.

El montaje se hizo con Vectashield (Vecta Laboratories Inc.) Se utilizó el microscopio de fluorescencia Zeiss Axiophot (Germany) con un objetivo planar Neofluor 100X usando un filtro FITC.

2.9. Técnicas para el estudio funcional de los transportadores ABCG de *L. infantum*.

2.9.1. Marcaje de parásitos con análogos fluorescentes de fosfolípidos.

Los análogos de fosfolípidos empleados para estudiar la posible implicación de LiABCG4 en el transporte de lípidos en el parásito fueron análogos de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y esfingomiolina marcados con el grupo fluorescente nitrobenzoxadiaxol en un ácido graso de cadena corta (n=6) situado en posición 2 de la molécula de glicerol (Ver figura. Ejemplo C₆-NBD-fosfatidilcolina, C₆-NBD-PC).



Cantidades apropiadas de los análogos palmitoil-(nitrobenzoxadiaxol-hexanoil)-PC (C₆-NBD-PC), C₆-NBD-PE, C₆-NBD-PS, C₆-NBD-SM (Avanti Polar Lipids) disueltos en cloroformo/ metanol (1:1) se depositaron en un tubo de cristal de fondo cónico, se desecaron bajo atmósfera de nitrógeno, se resuspendieron en unas gotas de etanol absoluto y se diluyeron hasta la concentración adecuada (10 μM) en tampón HPMI.

Los ensayos de acumulación de análogos de fosfolípidos se realizaron tomando los parásitos en fase logarítmica de crecimiento. Se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en tampón HPMI/ 0.3% BSA con PMSF 500 μM o DFP 5 mM a una concentración de 5 x10⁶ parásitos/ml, incubándose a 28 °C durante 30 min. Una vez finalizada dicha preincubación, se añadió un volumen con una concentración 2X del fosfolípido correspondiente en HPMI/ 0.3% BSA 500 μM de PMSF o DFP 5 mM. La concentración de fosfolípidos empleada fue de 2 μM para el caso de C₆-NBD-PC, C₆-

NBD-PE, C₆-NBD-SM y de 5 μM para C₆-NBD-PS. Los parásitos fueron incubados con los análogos de fosfolípidos durante 30 min a 28 °C. Tras la incubación, se realizaron dos lavados con PBS + 0.3% BSA en frío, se resuspendió cada muestra en PBS frío y se dejó en hielo.

En nuestro laboratorio se había descrito anteriormente que, en presencia de PMSF, la hidrólisis de C₆-NBD-PC llegaba hasta un 42%, mientras que para el resto de los análogos era menos severa (en torno al 8%) (Araújo-Santos *et al.*, 2003). En presencia de DFP, la hidrólisis de C₆-NBD-PC se reducía hasta un 18% incluso después de incubar 30 min a 28 °C, mientras que para C₆-NBD-PE, -PS y -SM, la hidrólisis era menor de un 8%. También habíamos establecido que las diferencias en la acumulación de los análogos de fosfolípidos no se debían a su conversión metabólica en la cara externa de la membrana (Araújo-Santos *et al.*, 2003).

Las medidas de fluorescencia se realizaron en un citómetro de flujo Becton Dickinson (Mountain View, CA) provisto de un láser de argón de 488 nm de longitud de onda. El análisis de los datos se llevó a cabo determinando la fluorescencia debida a la acumulación de los compuestos utilizados, medida como canales de fluorescencia media en FL1 (515-545 nm). Se establecieron regiones tras analizar la muestra utilizando los parámetros de dispersión frontal (*forward scatter* o FSC) y dispersión lateral (*side scatter* o SSC) y se analizaron 10.000 sucesos en las mismas, que se representaron en forma de histogramas. Se utilizó el programa Cell Quest para el análisis de los datos.

2.9.2. Marcaje de parásitos con miltefosina radiactiva.

Se utilizó miltefosina marcada radiactivamente con ¹⁴C. La internalización y el eflujo de [¹⁴C]miltefosina se midió según lo descrito por (Perez-Victoria *et al.*, 2003a). Para la internalización, los parásitos (2x10⁷ parásitos /ml) se incubaron en medio de cultivo con 0,09 μCi de [¹⁴C]miltefosina (2,5 μM). A tiempos determinados (30, 60, 120, 240 min) se extrajeron alícuotas del cultivo y se colocaron en hielo. Se lavaron con PBS/ BSA 1% para eliminar la fracción del fármaco que quedara en la cara externa de la membrana plasmática. Tras lavar nuevamente con PBS, los sedimentos celulares se resuspendieron en Triton X-100 al 1%. La radiactividad asociada se determinó en 4 ml de líquido de centelleo usando el contador de centelleo 1209 *Rackbeta Liquid*

Scintillation Counter (LKB-Wallac). Se midió la concentración de proteínas, expresándose los resultados en pmol/mg.

Para la determinación del eflujo, se incubaron 2×10^7 promastigotes en medio de cultivo con $0,36 \mu\text{Ci ml}^{-1}$ de [^{14}C]miltefosina ($10 \mu\text{M}$) durante 30 min a $28 \text{ }^\circ\text{C}$. Después de este tiempo, los parásitos se lavaron y se resuspendieron en medio fresco con 3% BSA. El eflujo se inició a $28 \text{ }^\circ\text{C}$, y la cantidad de radioactividad retenida en los parásitos se midió al cabo de una hora. Las muestras se procesaron como se ha descrito en el párrafo anterior.

2.9.3. Microscopía de fluorescencia.

Los parásitos se tomaron en la fase logarítmica de crecimiento y se lavaron tres veces con PBS frío. Las imágenes se adquirieron con un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axiophot (Oberkochen, Germany). Las imágenes se capturaron con una cámara SPOT (Diagnostic Instruments, Inc.) y se analizaron usando el software Adobe Photoshop 7.0.

Con el fin de diferenciar la membrana plasmática del resto de los orgánulos intracelulares, los parásitos se incubaron en tampón hipotónico (Tris-HCl 5 mM, PMSF 100 μM , pH 7.4) durante 30 min en hielo y se homogenizaron con suavidad, lo que permitió la formación de “fantasmas” celulares sin flagelo que mantienen la estructura microtubular asociada a la membrana plasmática del parásito (Mandal *et al.*, 1997).

2.10. Técnicas para el estudio funcional en levaduras de las proteínas ABCG de *L. infantum*.

2.10.1. Fraccionamiento subcelular en gradiente de sacarosa.

Las levaduras se inocularon en un litro del medio de selección con $50 \mu\text{M}$ CuSO_4 y se crecieron durante 14-16 h a $27 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta una DO_{600} de 0,5. Las células se centrifugaron a $1000 g$ y se lavaron con NaN_3 20 mM. El sedimento celular se resuspendió en 50 ml de tampón de pre-esferoblastos y se incubó a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 min. Posteriormente, se centrifugó a $700 g$, 5 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ y el sedimento celular se resuspendió en 50 ml de tampón de esferoblastos con zimoliasa 0,15 mg/ml, incubándose 40 min a $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Los

esferoblastos obtenidos se enfriaron en hielo y se recogieron a 1500 g, 5 min a 4°C. El sedimento obtenido se resuspendió en 20 ml de tampón de lisis con PMSF 1 mM y una mezcla de inhibidores de proteasas. Los esferoblastos se lisaron empleando un homogenizador, y el lisado resultante se centrifugó a 500 g, 5 min a 4 °C. El sobrenadante se recogió en un colchón de sacarosa al 60% centrifugando a 100.000 g 1 h a 4 °C. El sedimento enriquecido en membranas se colocó en la parte superior de un gradiente discontinuo de sacarosa (0,5 ml 60%; 1 ml 40%; 1 ml 37%; 1,5 ml 34%; 2 ml 32 %; 2ml 29%; 1,5 ml 27%; 1,5 ml 22% (p/p)). Tras la centrifugación a 130.000 g durante 16-18 h a 4 °C en ultracentrífuga Beckman con rotor SW4ITi, se recogieron 20 fracciones de 0,6 ml. Volúmenes idénticos de cada fracción se sometieron a inmunodetección empleando anticuerpos frente a distintos organelos celulares.

2.10.2. Preparación y fraccionamiento de vesículas secretoras de levaduras.

Las cepas *Sec6-4* se inocularon en un litro de medio de selección con 50 μ M CuSO₄ y se crecieron durante 14-16 h a 27 °C hasta una DO₆₀₀ de 0,5. La mitad del cultivo se cambió a 38 °C para permitir la acumulación de vesículas secretoras (VS), y la otra mitad se creció a 27 °C. Las células empleadas para los experimentos de fraccionamiento subcelular fueron hechas esferoblastos y luego lisadas en tampón de lisis usando un homogenizador como se describió por Harsay y Scheckman (2002). Las células usadas para los experimentos de translocación de lípidos se lisaron mediante agitación circular vibratoria de 30 s, 20 veces, con perlas de vidrio (425-600 μ m) en tampón de lisis frío. Los lisados se sometieron a centrifugación diferencial (500 g durante 10 min, 13.000 g durante 20 min) para eliminar la mayor parte de los núcleos, vacuolas, mitocondrias y membrana plasmática. Las membranas enriquecidas en vesículas secretoras se recogieron por ultracentrifugación (100.000 g, 90 min, 4 °C) en un colchón de sacarosa al 60% (p/p). Para los estudios de **fraccionamiento**, las membranas se recogieron en un colchón de Nycodenz 60% (p/p), se resuspendieron en 1,5 ml de tampón de lisis, se ajustaron al 30% (p/p) de Nycodenz y se cargaron en la parte inferior de un gradiente lineal de 11 ml de Nycodenz 12-22% (p/p)/ sorbitol 0,8 M. Tras la centrifugación a 100.000 g durante 16 h a 4 °C en una ultracentrífuga Beckman con rotor SW4ITi, se recogieron 20 fracciones de 0,6 ml desde la parte superior. Volúmenes idénticos de cada fracción se sometieron a inmunodetección.

Para los estudios de **translocación de lípidos**, las membranas se resuspendieron en tampón K-glutamato con un 20% de glicerol y se almacenaron a -80 °C.

2.10.3. Inmuno-afinidad de las vesículas secretoras.

La inmuno-afinidad de las vesículas secretoras se realizó usando Dynabeads® magnéticas unidas a proteína G (DynaL Biotech.) cargadas con anticuerpo anti-HA monoclonal de ratón 12CA5 (Boehringer) según se ha descrito por Alder-Baerens *et al* (2006). Para cada inmuno-afinidad, se prepararon 500 µl de reacción en tampón de lisis con 200 µl de Dynabeads unidas al anticuerpo anti-HA, 5 mg/ml de BSA y 100 µl de las fracciones seleccionadas del gradiente de Nycodenz. Como control de la especificidad del procedimiento de inmuno-afinidad, se preparó una reacción con Dynabeads unidas al anticuerpo preincubadas a 4 °C durante 1 h con 200 µg de péptido sintético correspondiente al epítipo HA (YPYDVPDYA). Las reacciones se incubaron en agitación suave durante 2h a 4 °C. Las Dynabeads se separaron de los sobrenadantes y se lavaron 2h en tampón de lisis con 5 mg/ml de BSA dos veces, y 30 min más en tampón de lisis. Las membranas de los sobrenadantes se recogieron por ultracentrifugación. Tanto las Dynabeads como los sedimentos membranosos se resuspendieron en 100 µl de tampón de carga y se sometieron a inmunodetección.

2.10.4. Entrecruzamiento químico.

Las membranas enriquecidas en vesículas secretoras obtenidas en el punto 2.10.2 se incubaron durante 2 horas en hielo con 1,6-bis-maleimidohexano (BMH) a una concentración final de 0,2 mM. Los productos obtenidos se analizaron en geles de poliacrilamida y se sometieron a inmunodetección utilizando el anticuerpo policlonal anti-FLAG.

2.10.5. Análisis del transporte de análogos de fosfolípidos en vesículas secretoras.

Los stocks de análogos fluorescentes de fosfolípidos se prepararon en DMSO (1mM). Los ensayos de translocación se realizaron como se describe por Alder-Baerens *et al*. (2006). Las membranas enriquecidas en vesículas secretoras se diluyeron a 1,5 µmol/ml

de fosfolípido en tampón K-glutamato con un sistema de regeneración de ATP (fosfocreatina 10 mM; creatina fosfoquinasa 25 U/ml). Los ensayos de translocación se llevaron a cabo en tubos de vidrio a 25 °C mezclando 300 µl de suspensión de membrana con 3 µl de la suspensión de C₆-NBD-fosfolípido en presencia y ausencia de 1 mM de ATP. A intervalos de tiempo determinados, se tomaron alícuotas de 10 µl y se mezclaron con 90 µl de tampón K-glutamato frío y 90 µl de buffer K-glutamato con 4% (p/v) de BSA libre de lípidos. Las reacciones se mantuvieron 10 min en hielo, y se diluyeron con 100 µl de tampón K-glutamato frío. La fluorescencia se midió a 540 nm (excitación, 470nm; ancho de ventana, 4nm; resolución, 1 s) antes y después de la adición de 0,5% de Triton X-100. La fluorescencia de cada muestra se midió a 25 °C usando microcubetas de cuarzo y un espectrofluorímetro Aminco Bowman Serie 2 (SLM Instruments, Rochester, NY). La porción accesible de lípidos fluorescentes se calculó como $P_{ext} = [1 - (F_{BSA} / F_{tampón})] / [1 - 0.55] * 100$, donde F_{BSA} es la fluorescencia (normalizada a la fluorescencia tras la adición de Triton X-100) de las membranas después de la extracción con BSA, $F_{tampón}$ es la fluorescencia (normalizada a la fluorescencia tras la adición de Triton X-100) de las membranas en tampón sin BSA, P_{ext} es la proporción de lípido marcado que se extrae con BSA, y el rendimiento de los lípidos fluorescentes unidos a BSA es 0,55 comparado con un valor de 1 para los lípidos fluorescentes asociados a membrana (Alder-Baerens *et al.*, 2006). El procedimiento de tratamiento con BSA fue suficiente para extraer >90% de los C₆-NBD-lípidos asociados a membrana a tiempo cero (10 min después de la adición de la muestra). Esta cantidad se consideró del 100% para las medidas cinéticas.

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. AISLAMIENTO DE GENES TIPO ABCG DE *L. INFANTUM*.

1.1. Aislamiento de los genes *LiABCG4* y *LiABCG6*.

Los posibles miembros de la subfamilia ABCG de transportadores se han identificado en la base de datos del genoma de *Leishmania*, inicialmente de *L. major* y, posteriormente, de *L. infantum*, usando el servidor GeneDB omniBLAST y empleando para el análisis el gen ABCG2 humano. Se localizaron en ambas especies 3 genes en los cromosomas 15, 23 y 36, y un gen repetido en tándem en el cromosoma 6. La identidad de estos genes entre ambas especies es aproximadamente del 95% a nivel de secuencia nucleotídica, y del 92% a nivel de secuencia proteica. Los resultados que se obtuvieron han sido corroborados por una clasificación de las proteínas ABC de *Leishmania* publicada recientemente (Leprohon *et al.*, 2006). En esta tesis doctoral nos centramos en la caracterización de los genes tipo ABCG situados en los cromosomas 15 y 36 de *L. infantum*.

Para realizar el aislamiento de estos genes, se utilizaron las bases de datos disponibles del genoma de *Leishmania* para diseñar oligonucleótidos aguas arriba y abajo del marco abierto de lectura. Utilizando el DNA genómico de *L. infantum* como molde y, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), pudimos aislar un fragmento de 4223 pb del cromosoma 15, que se clonó en el vector pGEM-T y posteriormente se secuenció. El fragmento contenía la totalidad de la secuencia codificante de un gen ABCG, además de 822 y 1175 pb de secuencias no codificantes en los extremos 5' y 3', respectivamente. El gen aislado se denominó *LiABCG4* (GeneDB-*Leishmania infantum*, código de acceso LinJ15.0940), de acuerdo con la nomenclatura sugerida por Leprohon *et al.* (2006).

En el caso del gen situado en el cromosoma 36, utilizando el DNA genómico de *L. infantum* como molde y, mediante PCR, pudimos aislar un fragmento de 3723 pb que se clonó en el vector pGEM-T y posteriormente se secuenció. El fragmento contenía la

totalidad de la secuencia codificante de un gen ABCG, además de 766 y 950 pb de secuencias no codificantes. El gen aislado se denominó *LiABCG6* (GeneDB-*Leishmania infantum*, código de acceso LinJ36.3580), de acuerdo con la nomenclatura sugerida por Leprohon *et al.* (2006).

1.2. Análisis de la secuencia y análisis predictivo de la estructura de las proteínas *LiABCG4* y *LiABCG6*.

A partir de la secuencia de los genes *LiABCG4* y *LiABCG6* se pudieron deducir sus secuencias aminoacídicas. El gen *LiABCG4* codifica una proteína de 741 aminoácidos, con un peso molecular estimado de 83 kDa. El gen *LiABCG6* codifica una proteína de 668 aminoácidos, con un peso molecular estimado de 72,8 kDa. Ambas proteínas presentan todas las características típicas de un transportador ABC *half-transporter*, con un único dominio de unión a ATP hidrofílico (NBS; *nucleotide binding site*) situado en el extremo amino, y un dominio transmembrana, con seis segmentos transmembrana hidrofóbicos. En la región hidrofílica se encuentran las zonas más conservadas de los transportadores ABC: los motivos Walker A, Walker B y el sello de la familia ABC (Fig. R-1). Las zonas características de un transportador ABC se pudieron identificar utilizando el servidor de Biología Molecular ExPASy (<http://us.expasy.org/>) para análisis de secuencias.

LiABCG4	
	1 MGGQVDQTHKPSVGTPTVLGILPTAWVTPQAKSNAEDAKVPALSRAVNF
NBS	52 TWENLTYQVPVEDKDGNIYKTLNLSGCAKGGRLAIM GPSGAGKTTLM Walker A
	103 GAITGKLFNATARQEGCCFMNNIYQQRYSYVCQDDIVMGKDTPREAI
	155 YFSARLRLGLDSETARRRVADVLQRLSLTKCQDITLIGIPILKG VSGGER KRA S
	208 NIGTELVTNPF VMLLDE PTTGLDSVNAVVRVQLLQDLAKNDMRTVIATVHSP Walker B
	260 SSELFDFDLLLLAKGHVIYHGPTADSIEYFASLGYDVPPrTNPTEYFMNLL
313 QLPEEILSQLWLAWEDYVMSDAANDNPCLTPVTGVITLDDYLEEQLELKG	
TMD	365 NFCLQFSELFKRSMYLRDPGNFYGR SVQTLFFAIFIGLFFNQLN QQGV TM1
	418 QDRLGAL YITLMNNLFGAAMNGIAAFP PERAVFLQEQANDAYNAYTYFLAKN TM2
	470 MAEL PWQILFPTVFDLIAYFMIH FHRSA FFVHWFILVLLANLGYSFGLMFA TM3 TM4
	522 TFFKQSQ AAFAMVPLILLPLFIVAGL FANTDRLYPYVWVWLNYSFPRHAYLGV TM5
	575 FTNEFERLTVICDPVTPLCTFPDGGQAVIEYMGFQGWYHWQTF VALILYQIGL
	627 RFIGATSLY YQGRQRRGKLFVKNLRNRFASPRAIASARSNDELSDVQSTLV TM6
	678 GSIATPSNAYSTGVPSPVNNPENHQPIWDGESERATLALPDTPVTYVESVVD
	730 VKDMKPRKYSZ

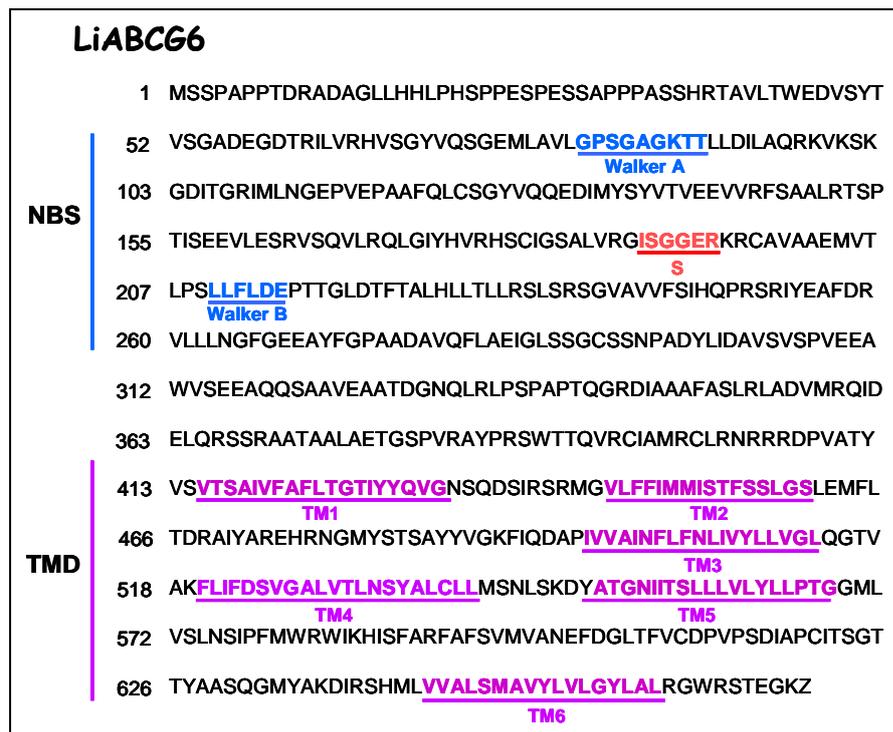


Figura R-1. Secuencias de las proteínas LiABCG4 y LiABCG6 de *L. infantum*. Se indican el sello de la familia (rojo), los motivos Walker A y B (azul) y los posibles segmentos transmembrana (violeta). Igualmente, se indican dominios probables de la proteína: dominio transmembrana (TMD, violeta) y dominio de unión a nucleótidos (NBS, azul).

El análisis de la secuencia de la proteína mediante el algoritmo de Kyte-Doolittle (1982) nos permitió conocer el perfil de hidrofobicidad de la misma (Fig. R-2) y deducir la topología probable de este transportador. Como puede observarse en la figura, se deduce una región hidrofílica en el extremo amino, correspondiente al NBS, en la que se encuentran las secuencias consenso de los transportadores ABC, y una región hidrofóbica compuesta de 6 segmentos transmembrana, correspondiente al dominio transmembrana (TMD). Los segmentos transmembrana quinto y sexto se encuentran más separados entre sí, lo que nos hace pensar en la existencia de un lazo extracelular más largo entre esos dos segmentos.

Resultados

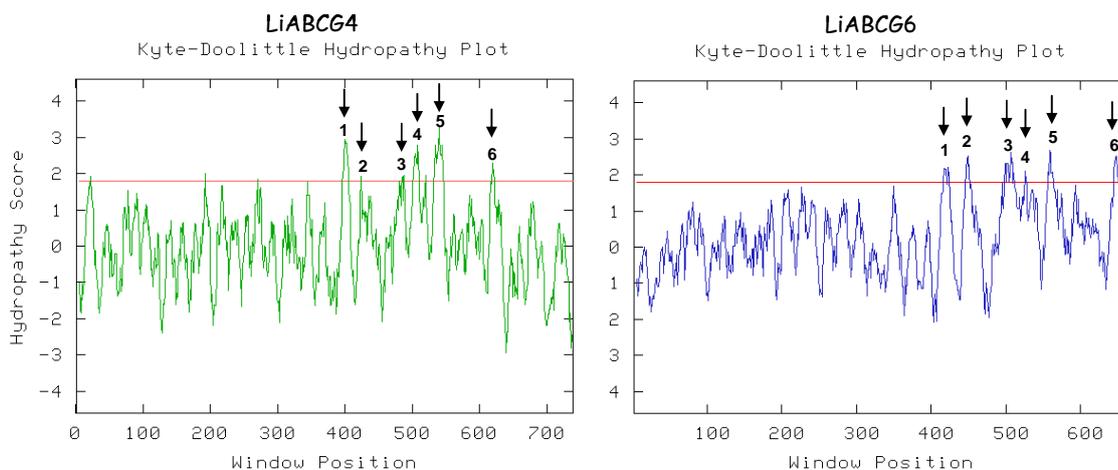


Figura R-2. Perfil de hidrofobicidad de las proteínas LiABCG4 y LiABCG6. Se empleó el método descrito por Kyte y Doolittle (1982) para el análisis de los posibles segmentos transmembrana de proteínas. Se empleó una ventana de 11 aminoácidos para el análisis de hidrofobicidad. Los seis segmentos transmembranas reconocidos se indican con flechas y números.

Una vez conocida la secuencia de la proteína, realizamos una búsqueda de homologías mediante el programa Blastp (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/simsearch_blast.pl) con otras proteínas utilizando los bancos de datos del GenBank y SwissProt. La proteína presentó una mayor identidad con los miembros ya descritos de la subfamilia de transportadores ABCG. En la figura R-3 se muestra el alineamiento de las proteínas LiABCG4 y LiABCG6 de *L. infantum* con algunas proteínas ABCG humanas, así como con la proteína WHITE de *Drosophila melanogaster* y la ADP1 De *Saccharomyces cerevisiae*.

El alineamiento de la secuencia de las distintas proteínas ABCG descritas nos permitió determinar que la identidad de **LiABCG4** es del 22,4% respecto a ABCG2 humana; 25,7% con la proteína ABCG1 humana; 26,4% con la proteína WHITE de *D. melanogaster*, y 20% con ADP1 de *S. cerevisiae*. Para el caso de **LiABCG6**, la identidad es del 24,1 % respecto a ABCG2 humana; 21,2 % con la proteína ABCG1 humana; 23,8 % con la proteína WHITE de *D. melanogaster*, y 25,7 % con la proteína ADP1 de *S. cerevisiae* (Tabla R-1). La región más conservada, el NBS, mostró una identidad del 50% con el NBS de las proteínas ABCG1 y ABCG2 humanas.

		*	20	*	40	*	60	*																																																															
ABCG1_HUMA	:	-----							:	-																																																													
ABCG2_HUMA	:	-----							:	-																																																													
WHITE_DROM	:	-----							:	-																																																													
ADP1_YEAST	:	MGSHRRYLYYSILSFLLLS	CVLAKQDKTPFF	EFGTSSKNSRLTAQDKG	NDTCPFCFNMLPIFECKQFS	:			70																																																														
LiABCG4	:	-----							:	-																																																													
LiABCG6	:	-----							:	-																																																													
		80	*	100	*	120	*	140																																																															
ABCG1_HUMA	:	-----							:	-																																																													
ABCG2_HUMA	:	-----							:	-																																																													
WHITE_DROM	:	-----							:	-																																																													
ADP1_YEAST	:	ECNSYTGRC	ECIEGFAGDDCSLPL	CGGLSPDES	GNKDRPIRAQNDT	CHCDNGWGGINCDVCQ	EDFVCD	AF	140																																																														
LiABCG4	:	-----							:	-																																																													
LiABCG6	:	-----							:	-																																																													
		160	*	180	*	200	*																																																																
ABCG1_HUMA	:	-----							:	-																																																													
ABCG2_HUMA	:	-----							:	-																																																													
WHITE_DROM	:	-----							:	-																																																													
ADP1_YEAST	:	MPDPSIKGT	CYKNGMIVDKV	FSGCNVTNEKIL	QILNGKIPQIT	FACDKPNQECNFQ	FWIDQLESFY	CGLS	210																																																														
LiABCG4	:	-----							:	-																																																													
LiABCG6	:	-----							:	-																																																													
		220	*	240	*	260	*	280																																																															
ABCG1_HUMA	:	-----						MAAFSVG	:	7																																																													
ABCG2_HUMA	:	-----							:	-																																																													
WHITE_DROM	:	-----						MGQEDQELLIRGGSKHPSAEHLN	:	23																																																													
ADP1_YEAST	:	DCAFEYDLEQNT	SHYKCN	DVQCKV	PDVLCGAKG	SIDISDFLTETIK	GGDFSCDLETRQCK	FSEPSMN	280																																																														
LiABCG4	:	-----							:	-																																																													
LiABCG6	:	-----							:	-																																																													
		300	*	320	*	340	*																																																																
ABCG1_HUMA	:	TAMNASSYSAEMTEPKS	VCVSVDE	VSSNMEATETDLLNGHLK	V	DN	NL	TEAQRFS	SLPRRAAVNIEFRD	77																																																													
ABCG2_HUMA	:	-----MSSSNVEVFI							PV	SQ	NTNGFPATV	SN	DL	KAFTEGAVLSFH	NICY	44																																																							
WHITE_DROM	:	NGDSGAASQSCINQ	GFQAKNYG	TLLP	SP	PEDSGSG	QLAEN	LY	A	WHNMDIFGAVNQ	PGSGWRQLVN	93																																																											
ADP1_YEAST	:	DLILTVFGDPYITL	KCESGECVHYSEI	PGYKSP	SKDPTV	SWQGL	V	L	ALTAVM	V	L	LFTFATFYISK	SPL	350																																																									
LiABCG4	:	-----MGGQVDQ							THKPSV	GTPTVLAGIL	P	T	AWVTP	P	QAKSNAEDAKV	P	ALSR	AVN	51																																																				
LiABCG6	:	-----MSSPAPPT							DRADAGLLHHL	PHSP	PE	SP	ESSAPP	PASSHR	TAVLT	44																																																							
		360	*	380	*	400	*	420																																																															
ABCG1_HUMA	:	LSYSVPEGP	WWRKKG	-----			YK	TL	KGIS	SKFNS	SETVA	:	111																																																										
ABCG2_HUMA	:	-RVK	LKSGFLPCRKP	-----			VE	KE	IL	SN	INGIMKPG	-LNA	77																																																										
WHITE_DROM	:	RTRGL	FCNERHIPAP	-----			RK	HL	L	KN	VCCVAY	PC	ELLA	127																																																									
ADP1_YEAST	:	FRNGL	GSSKSPIRLP	DEDAVNN	FLQ	NEDDTL	ATLS	FENIT	YSVPS	INSDG	VEETV	LN	ETS	GIVKPG	QLA	420																																																							
LiABCG4	:	TWEN	LYQVPVEDKDG	-----			NV	IY	K	TL	FL	N	LS	CAKGR	VLA	89																																																							
LiABCG6	:	-WED	VSYTVSGADEGD	-----			TR	L	V	R	H	V	S	YVQ	S	CE	NLA	78																																																					
		440	*	460	*	480	*																																																																
ABCG1_HUMA	:	IMG	P	S	G	A	G	K	T	L	M	N	I	L	A	G	Y	R	E	T	---	G	M	K	A	V	L	I	N	G	L	R	D	L	R	C	F	R	K	V	S	C	Y	T	M	Q	D	D	M	L	P	H	L	T	V	Q	E	A	M	M	V	S	:	177							
ABCG2_HUMA	:	I	L	G	P	T	G	G	K	S	S	L	D	V	L	A	A	R	K	D	P	---	S	G	L	S	G	D	V	L	I	N	G	A	P	R	P	A	N	-	F	K	C	N	S	G	Y	V	Q	D	D	V	M	G	T	L	T	V	R	E	N	L	Q	F	S	:	143				
WHITE_DROM	:	V	M	G	S	S	G	A	G	K	T	T	L	L	N	A	L	A	F	R	S	P	Q	I	Q	V	S	P	S	G	M	R	L	L	N	G	Q	P	V	D	A	K	E	M	Q	A	R	C	A	Y	V	Q	D	D	L	F	I	G	S	L	T	A	R	E	H	L	I	F	Q	:	197
ADP1_YEAST	:	I	M	G	S	G	A	G	K	T	T	L	L	D	I	L	A	M	K	R	K	T	---	G	H	V	S	G	S	I	K	V	N	G	I	S	M	D	R	K	S	F	S	K	I	I	G	F	V	D	Q	D	D	L	L	P	T	L	T	V	F	E	T	V	L	N	S	:	487		
LiABCG4	:	I	M	G	P	S	G	A	G	K	T	T	L	L	G	A	T	T	G	L	F	N	-	A	T	A	R	Q	E	G	C	C	F	M	N	N	I	Y	Q	R	-	Y	K	R	L	V	S	Y	V	Q	D	D	I	V	M	G	K	D	I	P	R	E	A	L	Y	F	S	:	157		
LiABCG6	:	V	L	G	P	S	G	A	G	K	T	T	L	L	I	L	A	Q	R	K	V	K	S	K	-	G	D	I	T	R	I	M	L	N	C	E	P	V	E	P	A	A	F	Q	L	C	S	G	Y	V	Q	Q	E	D	I	M	Y	S	V	T	V	E	V	V	R	F	S	:	147		

Resultados

```

                    500          *          520          *          540          *          560
ABC1_HUMA : AHLKLE--KDEGRREMVEILTALGLLSCANTRTGS-----LSGGQRKRLATALELVNNEPVMFFDEP : 239
ABC2_HUMA : AALRLATMTNHEKNERINRVIEELGLDKVADSKVGT-QFTRGVSGGERKRTSIGMELITDPSILSLEDEP : 212
WHITE_DROM : AMVRMPRHLYRQRVARVDQVIQELSLSKCQHTIIGVPGRVKGLSGGERKRLAFASALTDPELLICDEP : 267
ADP1_YEAST : ALLRLPKALSFEAKKARVYKVLLEIRIIDIKDRIICGN-EFDRGISGCEKRRVSIACELVTSPLVFLFDEP : 556
LiABC4 : ARLRLGLD--SETARRRVADVLQRLESLTKCQDTILGIPGILKGVSGGERKRIANIGTELVTNRFVMLLEDEP : 225
LiABC6 : AALRTSPTTISEEVLESRSVQVLRQLGIYHVRHSCIGS-ALVRGISGGERKRCAVAAEMVTLPSLLFLEDEP : 216

                    *          580          *          600          *          620          *
ABC1_HUMA : TSGLDSASCFOVVSIMKGLA-QGCRSITCTIHQPSAKLFLFDFDQLYVLS-QQCVRKVCNLPVPLRLD : 307
ABC2_HUMA : TTGLDSSANAVLLLLKRMSS-KQRTIIFSIHQPRYSIFKLFDSLTLLA-SGRMLPHGPAQEAALGYFESA : 280
WHITE_DROM : TSGLDSFTAHSVVQVLLKLS-QKQKTVILTIHQPSSELFELFDKILLMA-ERVAFLGTPSEAVDFFSYV : 335
ADP1_YEAST : TSGLDASNANNVIECLVRLSSDYNRTLVLVSIHQPRSNIFVYLFDKLVLLS-KGEMVYSGNAKVFSEFLRNE : 625
LiABC4 : TTGLDSVNAVVRGQLLQDLAKNDMRTVIATVHSPSSSELFDFDLDLLLA-KGHVIYHPTADSTHEYFAST : 294
LiABC6 : TTGLDTFTALHLLTLRLSLS-RSGVAVVFSIHQPRSRIYEAFDRVLLLNFGCEEAYFGPAADAVQFLAEL : 285

                    640          *          660          *          680          *          700
ABC1_HUMA : GLNCPYHNPADFVMEVASG----- : 327
ABC2_HUMA : GYHCEAYNPPADFFLDIING----- : 300
WHITE_DROM : GAQCPTNYNPADFYVQVLAVVP----- : 357
ADP1_YEAST : GYICPDNYNIADYLLDITFEAGPQKRRRIRNISDLEAGTDTNDIDNTIHTTFTSSDGTQREWAHLAA : 695
LiABC4 : GYDVPVRTNPTEYFMNLQLP----- : 315
LiABC6 : CLSSGCSSNPADYLLIDAVSVS-----P----- : 307

                    *          720          *          740          *          760          *
ABC1_HUMA : -----EYGDQNSRLVRAVREGMCDSDHKRDLGGDAEVNPFVLRHPSEEDSSSME : 376
ABC2_HUMA : --DSTAVALNREEDFKATEIIEPSKQDKPLIEKLAIIYVNSSFYKETKAEHLQSGGKKKKITVFKETS : 368
WHITE_DROM : -----G---REIESRDRIAKICDNFAISKVARDMEQLLATKNLEKPLEQPENG : 402
ADP1_YEAST : HRDEIRSLRDEEDVEGTDGRGATEIDLNTKLLHDKYKDSVYYAELSQEIEEVLSEGDEESNVLNGDLP : 765
LiABC4 : -----E--EILSQLWLAWEDYVMSDAANDNPCLTPVTGVIITLTDYLEEQLLEK : 362
LiABC6 : -VEEAWVSEEAQQAAVEAATDGNQLRLPSPAPTQGRDIAAFAFSLRLADVMRQIDELQRSSRAATAALA : 376

                    780          *          800          *          820          *          840
ABC1_HUMA : G----CHSEFASCLTFCILFKRIFLSIMRDSVLTHLRITSHIGIGLIGLIVLGIENETKKVLSNSGFL : 442
ABC2_HUMA : -----YTTSFCHQLRWVSKRSFKNLLGNPQASIAQIIVTVVLGLVIGATYFGLKNDSTGIGNRAVVL : 430
WHITE_DROM : -----YTKATWFMQFRVWLWRSWLSVLRKPELLVKVRLIQTMTVALIIGLIFLGGQLTQVGMNINAI : 466
ADP1_YEAST : TG----QOSAGFLQOLSILNSRSFKNMRYRNPKLLGNYLTLILLSLFLGTYYNVSNDISGFQNRMLFL : 830
LiABC4 : G-----AN--FCLQFSELFKRSWRMYLDRDPGNFYGRSVQLFFAFIFLGLFFFNQLNQQGVQDRLEAL : 423
LiABC6 : ETGSPVRAVPRSWTTOVRCIAMECLNRRRDPVATVYVSVTSAIVFAFLTGTIYYQVGNQSQDSLRSRMVL : 446

                    *          860          *          880          *          900          *
ABC1_HUMA : FFSMLFLMFAALMPTVLTMPLEMGVFLREHLNYWVSLKAYYLAKTMADVP-FQIMFPVAYCSIVYWMTSQ : 511
ABC2_HUMA : FELTTNQCRS-SVSAVELFVVEKLFRIHEYISGYRVSSYFLGKLSDDLPMRMLPSLIIFTCIVYFMLGL : 499
WHITE_DROM : FLFLTNMTFQNVFATINVTSELPVFMREARSRLRCDTYFLGKTAELP-LFLTVPVFTALAYPMIGL : 535
ADP1_YEAST : FFILTYFGFV-TFTGLSSVALERILFKERSNNYSPLAYYYSKIMSEVVPLRVVPPILLLSLVYVPMTGL : 899
LiABC4 : YITLMNNLFGAAMNGIAAPPRAVFLQEQANDAYNAYTYFLAKNMAELP-WQILFPTVFDLLEYFMHIF : 492
LiABC6 : FFLMMISTFS-SLGSLEMLTDRAIYAREHRNGMISTSAVYVYKGFQDAP-TVVAINFLFNLLVYLLVGL : 514

                    920          *          940          *          960          *          980
ABC1_HUMA : PSDAVRVLFAALGTMTSLVAQSLGILLIGAASSTLQVATFVGPVTAIPVLLFSG-FFVSDTLP-TYLQW : 579
ABC2_HUMA : KPKADAFVMMFTLMMVAYSASSMALAIAAGQSVSVATLMTICFVMMIFSG-LLVNLTTIA-SWLSW : 567
WHITE_DROM : RAGVLHFFENCLAVTLVANVSTSFGYLISCASSSTSMALSVGPPVILPFLFSG-FFLNSGSP-VYLKW : 603
ADP1_YEAST : NMKDNAFKCIGLILFNLGISLELITIGIIFEDLNNSIILSVLVLLGSLFSG-LFNTKNITNVAFKY : 968
LiABC4 : HRSAGAFVHWFLVLLANLGYSFGLMFATFFKQSQAAAFVPLIILPLFVAG-LFANTDRY-PYVWV : 560
LiABC6 : QGTVAKLLIFDSVGAIVTLNSYALCLLMSNLSKDYATGNITSLLLMLYLPTFGMLVSLNSLP-FMWRW : 583

```

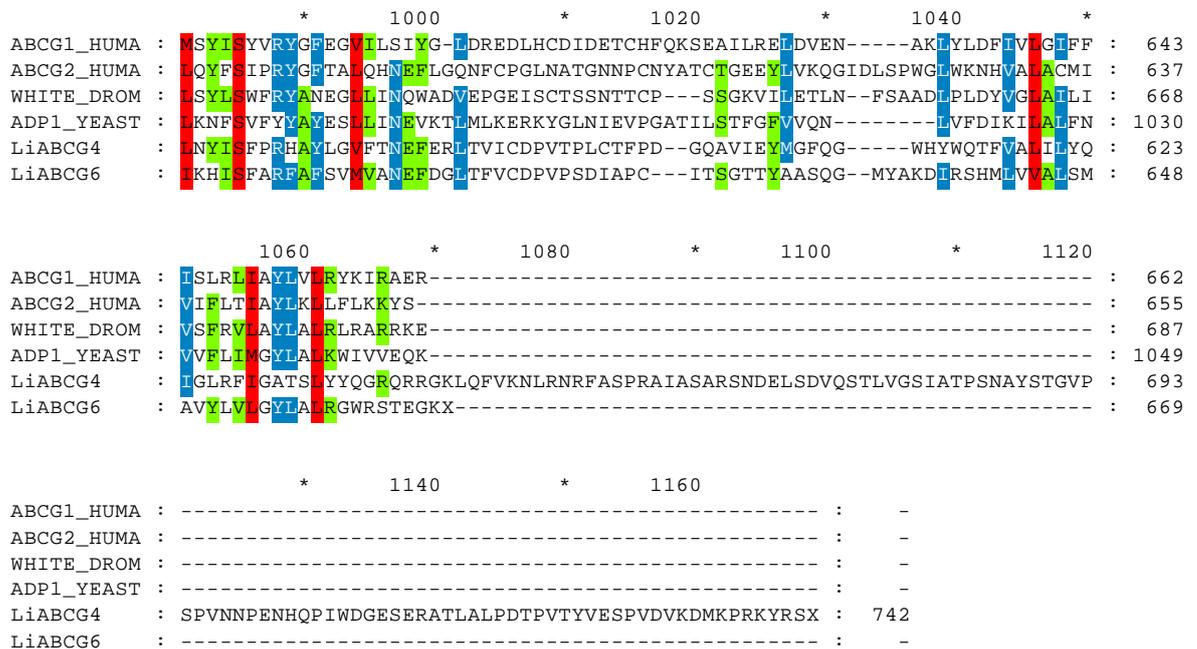


Figura R-3. Alineamiento de LiABC G4 y LiABC G6 con distintas proteínas ABCG. Las secuencias aminoacídicas de los genes de *L. infantum* se alinearon con algunos miembros de la subfamilia ABCG como son las proteínas ABCG2 y ABCG1 humanas, WHITE de *D. melanogaster*, y ADP1 de *S. cerevisiae*. Se empleó el programa para alineamiento múltiple Clustal W. En rojo están marcados los aminoácidos conservados en todas las secuencias mostradas, en azul los conservados en el 80%, y en verde en el 60%. Los números del margen derecho indican los residuos de cada secuencia. Los grupos de conservación considerados fueron: DE, ST, KR, FY, LIVM.

	LiABC G6	hABC G2	hABC G1	yADP1	WHITE
LiABC G4	21,4	22,4	25,7	19,7	24,6
LiABC G6		24,1	21,2	25,7	23,8
hABC G2			22,2	27,6	26,1
hABC G1				19,1	28,1
yADP1					22,9

Tabla R-1. Porcentajes de identidad entre distintos transportadores de la subfamilia ABCG. Los valores de identidad se obtuvieron al realizar el alineamiento de las diferentes secuencias proteicas con el programa CLUSTALW.

2. ORGANIZACIÓN GENÓMICA DE LOS GENES *LiABCG4* Y *LiABCG6*.

2.1. Caracterización de la subfamilia ABCG en *Leishmania*.

Como se ha indicado anteriormente, para identificar los posibles miembros de la subfamilia ABCG de *Leishmania* se llevó a cabo un análisis de las secuencias del banco de datos del proyecto genoma de *L. major* y *L. infantum* que presentaran mayor homología con el gen ABCG2 humano. Posteriormente nos ceñimos concretamente al análisis de las secuencias del banco de datos de *L. infantum*. Mediante este análisis identificamos 5 secuencias que corresponden a genes que codifican para posibles transportadores ABC de la subfamilia ABCG. Estos genes se localizan en los cromosomas 6, 15, 23 y 36 de *L. infantum* (Fig. R-4). Estos datos han sido recientemente corroborados por Leprohon *et al.* (2006).

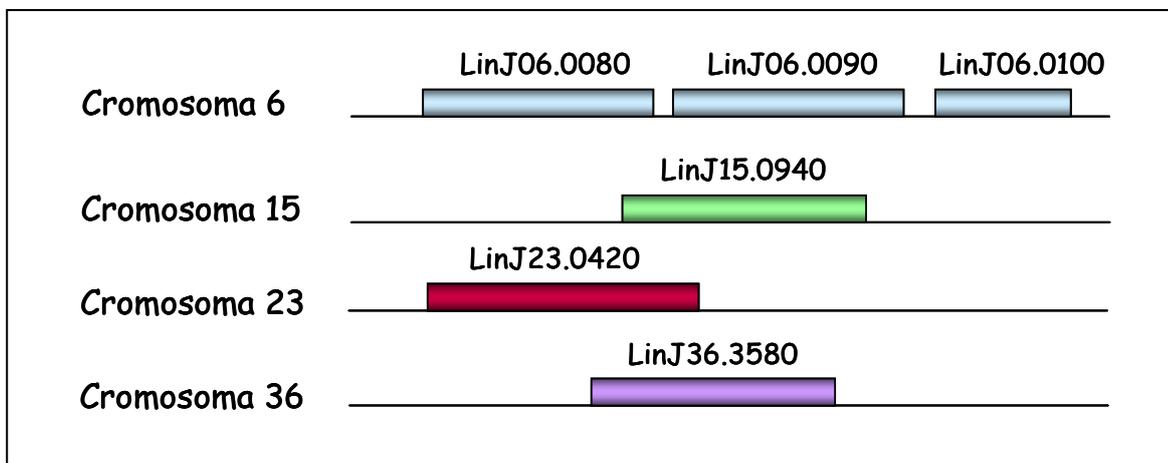


Figura R-4. Genes ABCG según el proyecto genoma de *L. infantum*. Se encontraron 3 secuencias (LinJ06.0080, LinJ06.0090, LinJ06.0100) pertenecientes a posibles genes ABCG en el cromosoma 6 de *L. infantum*, una secuencia (LinJ15.0940) en el cromosoma 15, una en el cromosoma 23 (LinJ23.0420), y otra en el 36 (LinJ36.3580).

En el locus del cromosoma 6 observamos la existencia de dos secuencias dispuestas en tándem (LinJ06.0080, LinJ06.0090), correspondientes a posibles genes ABCG, que presentan alta identidad de secuencia nucleotídica entre sí (92%), con *LiABCG4* (58%) y *LiABCG6* (46%). Aparece otra secuencia (LinJ06.0100), de menor longitud, con menor

identidad de secuencia con las que la preceden (52%), y que carece de la secuencia correspondiente al dominio NBS, por lo que podría tratarse de un pseudogén.

En el cromosoma 23 encontramos otra secuencia (LinJ23.0420), correspondiente a lo que parece ser otro gen de la subfamilia ABCG de *L. infantum* y presenta una identidad del 30% con LiABCG4 y LiABCG36.

2.2. Organización genómica de *LiABCG4* y *LiABCG6*.

Para conocer la organización genómica de los genes *LiABCG4* y *LiABCG6*, una vez conocida su secuencia, digerimos el DNA del parásito con diferentes enzimas de restricción. Tras la electroforesis en geles de agarosa al 0,8%, el DNA fue transferido a membranas de nylon e hibridado con sondas específicas de cada gen (región correspondiente al NBS). Utilizamos enzimas de restricción que no cortasen dentro de la sonda. Como se puede observar en la figura R-5, los perfiles obtenidos sugieren que tanto *LiABCG4* como *LiABCG6* son genes de copia única, tal y como cabría esperar tras el análisis efectuado del proyecto genoma de *Leishmania*.

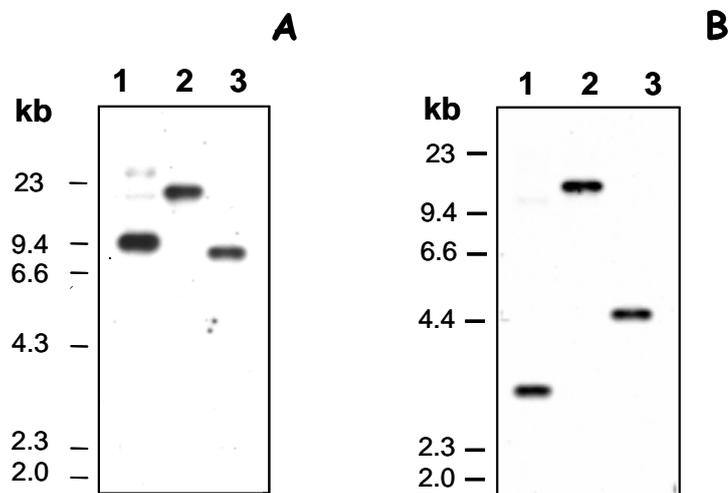


Figura R-5. Organización genómica de *LiABCG4* y *LiABCG6*. Southern blot genómico de los genes *LiABCG4* (A) y *LiABCG6* (B). Se digirieron 4 μ g de DNA con distintas enzimas de restricción. Las enzimas utilizadas fueron: 1, *KpnI*; 2, *NotI*; 3, *EagI*. Ninguna presenta sitios de corte en la sonda NBS. El marcador de peso molecular corresponde al DNA del fago λ digerido con *HindIII*.

RESULTADOS I: LiABCG4

3. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES FRENTE A LA PROTEÍNA LiABCG4.

3.1. Obtención de péptido recombinante para inmunización.

Para obtener anticuerpos policlonales específicos frente a LiABCG4 se eligió una parte de la proteína comprendida entre los aminoácidos 307 y 411, la cual presentaba mayor divergencia a nivel de secuencia con respecto a las otras proteínas analizadas (Fig. R-6). Cabría esperar cierta hidrosolubilidad del péptido en base a los análisis efectuados sobre el perfil de hidrofobicidad para LiABCG4 (Fig. R-2).

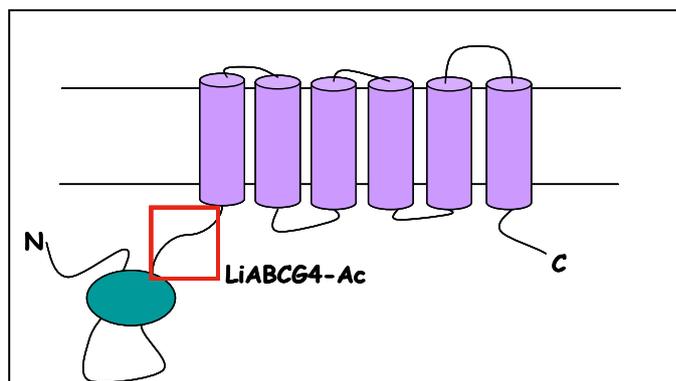


Figura R-6. Esquema de la proteína LiABCG4 mostrando la localización de la zona frente a la que se dirige el anticuerpo policlonal anti-LiABCG4 (enmarcada en rojo).

La secuencia que codifica para esta región de la proteína se amplificó mediante PCR usando dos oligonucleótidos específicos a los que se introdujeron dianas para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III (Ac-5' y Ac-3', ver tabla de "Materiales y Métodos"). El fragmento amplificado, de 314 pb, se clonó en el vector pGEM-T y se secuenció para confirmar que se había amplificado correctamente. A continuación, dicho fragmento se extrajo utilizando las dianas *Bam*HI y *Hind*III, con las que se clonó en el vector de expresión pQE30. Este vector es inducible por IPTG e incorpora, en el extremo amino, una cola de polihistidinas al péptido para facilitar su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad en columnas de Ni²⁺.

El plásmido resultante, denominado LiAc-pQE30, se utilizó para transformar bacterias de la cepa M15. Se comprobó la expresión del péptido recombinante en varias colonias inducidas por IPTG. Se optimizaron las condiciones para inducir la expresión del péptido

a gran escala, según las cuales una colonia de células transformadas se cultivó en 10 ml de LB con ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (25 µg/ml) a 37 °C en agitación durante toda la noche. Este cultivo se transfirió a 500 ml de LB y se incubó a 37 °C con agitación hasta obtener una DO_{600} de 0,6; finalmente se incubó 4 horas en presencia de IPTG 1 mM para inducir la expresión del péptido. A continuación, el cultivo se centrifugó durante 20 min a 4.000 g y, tras lavar el sedimento 3 veces con PBS, se congeló a -20 °C durante una noche. Al descongelar, se resuspendió en 5 ml del tampón de lisis empleado para la purificación en condiciones nativas, suplementado con 1 mg/ml de lisozima y 1 mM de PMSF, incubándose 30 min a temperatura ambiente. Como se puede observar (Fig. R-7) las bacterias inducidas sobreexpresaban un péptido de 13 kDa.

Una vez establecidas las condiciones de expresión del péptido, se comprobó la solubilidad del mismo tras romper las bacterias mediante sonicación (3 pulsos de 20 segundos) y centrifugar a 10.000 g durante 30 min, lo que nos permitió separar la fracción soluble de las proteínas (sobrenadante) y la fracción insoluble (sedimento). El estudio de ambas fracciones mediante geles de poliacrilamida permitió concluir que el péptido, con un peso molecular estimado de 13 kDa, se encontraba mayoritariamente en la fracción insoluble, por lo que realizamos su purificación en condiciones desnaturizantes. El péptido fue purificado mediante cromatografía de afinidad y su pureza se analizó mediante SDS-PAGE.

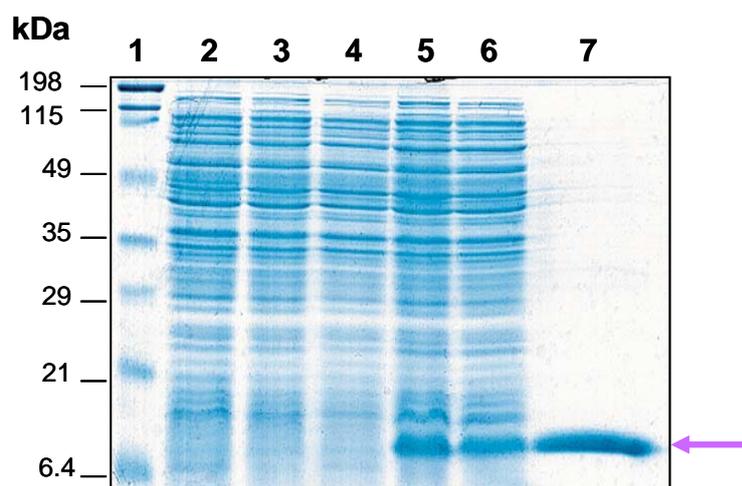


Figura R-7. Sobreexpresión y purificación del péptido recombinante LiABCG4-Ac. Análisis electroforético de extractos proteicos en gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomasie. Carriles: 1. Marcador de peso molecular; 2. Bacterias transformadas con el vector vacío, sin inducir; 3. Bacterias transformadas con el vector vacío, inducidas a 1 mM de IPTG; 4. Bacterias transformadas con LiAc-pQE30, sin inducir; 5. Bacterias transformadas con LiAc-pQE30, inducidas a 0,5 mM de IPTG; 6. Bacterias transformadas con LiAc-pQE30, inducidas a 1 mM de IPTG; 7. Péptido purificado (pH 4,5). El péptido purificado se indica con una flecha.

3.2. Purificación del péptido recombinante LiABCG4-Ac.

Debido a la insolubilidad de la proteína recombinante obtenida, realizamos la purificación de la misma mediante cromatografía de afinidad en columna de níquel, siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial del vector (Quiagen) para proteínas recombinantes insolubles o incluidas en cuerpos de inclusión. El protocolo se basa en la desnaturalización de las proteínas con un tampón que contiene hidrocloreuro de guanidina 6 M. A continuación, las proteínas solubles desnaturalizadas se separan mediante centrifugación y se incuban con la resina. Finalmente, la proteína recombinante se eluye con un tampón de urea 8 M y en gradiente de pH (8-4,5). La elución del péptido recombinante se produjo a pH 4,5 (Fig. R-7).

3.3. Obtención y titulación del suero inmune frente a LiABCG4.

Se cuantificó la concentración del péptido purificado, con el que se inmunizó un conejo de la cepa New Zealand White mediante 4 inoculaciones periódicas de 150 µg de péptido por vía subcutánea. A partir de la segunda inoculación, se procedió a la obtención de suero inmune, cuyo título de anticuerpos se determinó mediante la técnica de ELISA. Este título, tras la última inoculación, resultó ser mayor de 1/800.000 con respecto al suero preinmune extraído antes de comenzar la inmunización.

4. OBTENCIÓN DE PARÁSITOS TRANSFECTADOS CON EL GEN *LiABCG4*.

4.1. Clonaje del gen *LiABCG4* en el vector de expresión.

Para obtener parásitos que sobreexpresaran la proteína LiABCG4 realizamos el clonaje del gen *LiABCG4*, junto a las secuencias no codificantes en 5' y 3', en el vector de expresión pX (LeBowitz *et al.*, 1990). Este vector, específico para *Leishmania*, contiene el gen de la neomicina fosfotransferasa (NEO). Con la construcción *LiABCG4*-

pX, se transfectaron promastigotes de *L. infantum* y se seleccionaron con concentraciones crecientes de G418, a fin de sobreexpresar la proteína.

Los pasos de clonaje que se llevaron a cabo fueron los siguientes (Fig R-8): 1) Amplificación por PCR de la secuencia del gen *LiABCG4* clonado en pGEM-T, empleando los oligos LiABCG4-5' y LiABCG4-3' descritos en Materiales y Métodos, que nos permitieron añadir dianas *Bam*HI y *Spe*I, en 5' y 3' de la secuencia, respectivamente. Este fragmento, de 4.042 pb, se clonó en pGEM-T. 2) Digestión de la construcción obtenida en el paso anterior con las enzimas *Bam*HI y *Spe*I y clonaje del fragmento liberado en el vector pX, previamente digerido con *Bam*HI y *Xba*I. El plásmido resultante, denominado *LiABCG4*-pX, contenía el gen *LiABCG4* completo, flanqueado por 762 nucleótidos de la región 5' no codificante y 1051 nucleótidos de la región 3' no codificante clonados en el vector pX.

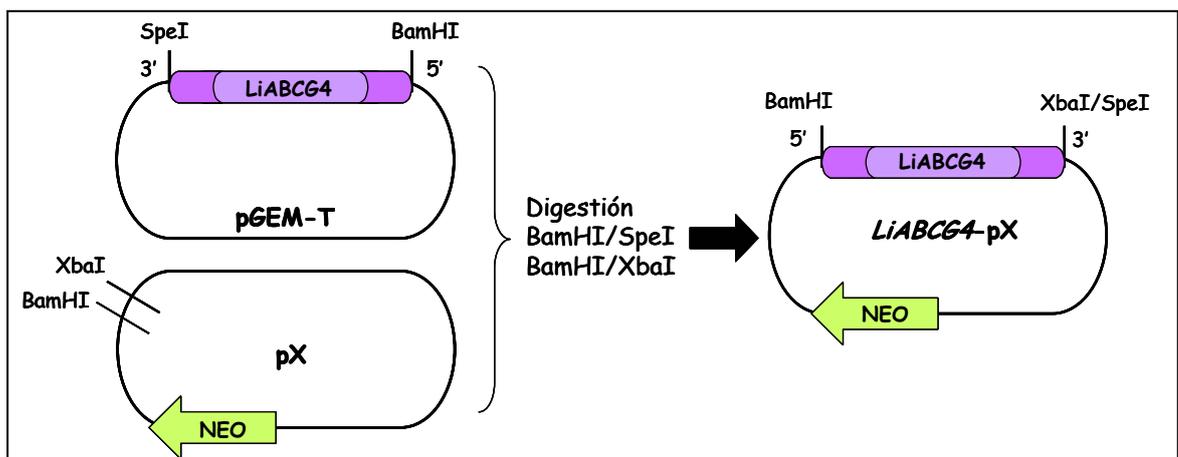


Figura R-8. Clonaje del gen *LiABCG4* en el vector de expresión para *Leishmania* pX. La secuencia codificante de *LiABCG4* (violeta) junto con las secuencias flanqueantes no codificantes (morado) se clonaron en el vector pX, obteniéndose el plásmido *LiABCG4*-pX.

4.2. Transfección de *L. infantum*.

Se transfectaron promastigotes de *L. infantum*, en fase estacionaria de crecimiento, con 100 μ g del plásmido *LiABCG*-pX, así como con el vector pX vacío que fue utilizado como control. Tras pases sucesivos a concentraciones crecientes de fármaco (25, 50, 100, 200, 500 μ g/ml), los parásitos transfectados se seleccionaron y finalmente, tras 45 días de cultivo, se adaptaron a una concentración de 500 μ g/ml de geneticina (G418).

4.3. Caracterización genómica de los parásitos transfectados con el gen *LiABCG4*.

Se comprobó la presencia del DNA extracromosómico circular en los parásitos transfectados. Para ello, se realizó un *Southern blot* de su DNA total y, posteriormente, se hibridó con una sonda específica para *LiABCG4* obtenida por digestión de *LiABCG4*-pX con *HindIII*. El DNA genómico de los parásitos transfectados se digirió con una combinación de enzimas (*Bam*HI-*Sac*II) que cortara la construcción plasmídica en fragmentos de tamaño conocido, uno de los cuales (2,7 Kb) hibridaría con la sonda. Tras la hibridación, fue posible diferenciar la banda episomal de la banda correspondiente al gen en el genoma de *L. infantum* (Fig. R-9), y cuantificar las señales de hibridación correspondientes a ambos genes. La relación obtenida entre las densidades ópticas de cada una de las bandas resultantes del revelado de la hibridación del *Southern blot*, da un resultado de unas 50 copias más de *LiABCG4* en los transfectantes.

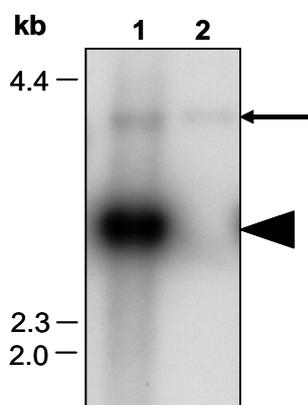


Figura R-9. Análisis por *Southern blot* del DNA genómico de los parásitos transfectados con *LiABCG4*. La digestión fue realizada con las enzimas *Bam*HI/*Sac*II. Carriles: 1. DNA genómico de los parásitos transfectados con *LiABCG4*-pX. 2. DNA genómico de los transfectantes control. Se señalan las bandas correspondientes a la copia genómica (flecha superior) y la banda del DNA episomal (flecha inferior). El marcador de peso molecular corresponde al DNA del fago λ digerido con *Hind*III.

4.4. Análisis de la expresión de *LiABCG4* en los parásitos transfectados.

4.4.1. Mediante *Northern blot*.

La sobreexpresión de los transcritos correspondientes a *LiABCG4* se estudió mediante *Northern blot* (Fig. R-10) en los que se utilizó RNA total de promastigotes de los parásitos transfectados con el gen y sus controles de transfección en fase logarítmica de crecimiento. Las muestras, con 20 μ g de RNA total, se sometieron a electroforesis en geles de agarosa-formaldehído, se transfirieron a membranas de nylon y se hibridaron con la sonda específica para *LiABCG4*. En los parásitos transfectados con *LiABCG4* se sobreexpresan dos transcritos. La diferencia de tamaño se debería posiblemente a la existencia de distintos sitios de adición del mini-exón y/o poliadenilación. Los parásitos controles mostraban niveles de expresión muy bajos, siendo necesaria una sobreexposición para detectar los transcritos.

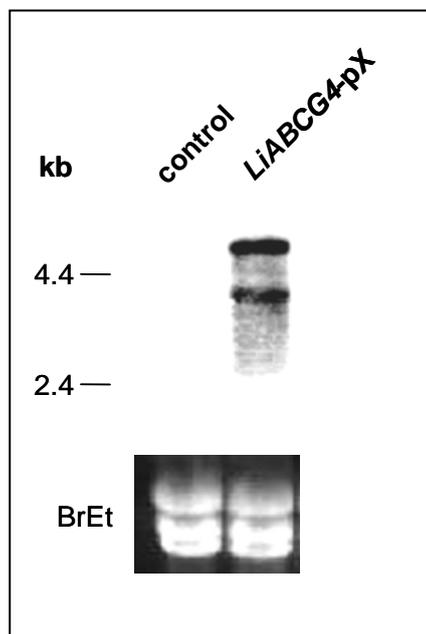


Figura R-10. Sobreexpresión del gen *LiABCG4* en los parásitos transfectados. *Northern blot* con RNA total procedente de los parásitos transfectados. Tras la electroforesis y la transferencia a membranas de nylon, el RNA se hibridó con la sonda específica para *LiABCG4*, obtenida mediante digestión de *LiABCG4*-pX con *Hind*III. En el primer carril se encuentran los parásitos transfectados con el plásmido control; en el segundo carril, los parásitos transfectados con la construcción *LiABCG4*-pX. En el panel inferior se muestra el gel de RNA teñido con bromuro de etidio. Como marcador de peso molecular se utilizó el *RNA ladder* de Invitrogen.

4.4.2. Inmunodetección mediante *Western blot*.

La expresión de LiABCG4 se analizó en el estadio promastigote de parásitos transfectados con *LiABCG4* y sus controles. Proteínas totales, correspondientes a 7 millones de parásitos de un cultivo en fase logarítmica de crecimiento, se separaron en geles de poliacrilamida al 12%. Posteriormente, se transfirieron a membranas de PVDF (fluoruro de polivinilideno) sobre las que se realizó la inmunodetección, utilizando el suero inmune anti-LiABCG4 diluido 1/5.000 en la solución de inmunodetección. Como anticuerpo secundario se empleó anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina y se reveló con los sustratos de dicha enzima. Aparece una banda del tamaño esperado (83 kDa) para la proteína LiABCG4, y de mayor intensidad en el caso de los parásitos transfectados con *LiABCG4* (Fig. R-11B). Sin embargo, el anticuerpo resultó inespecífico cuando se trató de detectar la proteína y determinar su localización mediante inmunofluorescencia indirecta. Nos planteamos realizar la purificación de los anticuerpos mediante afinidad sobre el péptido recombinante adsorbido a un soporte sólido y posterior elución, según el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Se midió de nuevo el título de anticuerpos de la elución obtenida y, tras la electroforesis en geles de poliacrilamida y transferencia a membranas, se realizó la inmunodetección de la proteína, sin que mejoraran los resultados. Igualmente, el anticuerpo purificado tampoco permitió la localización de la proteína mediante inmunofluorescencia indirecta.

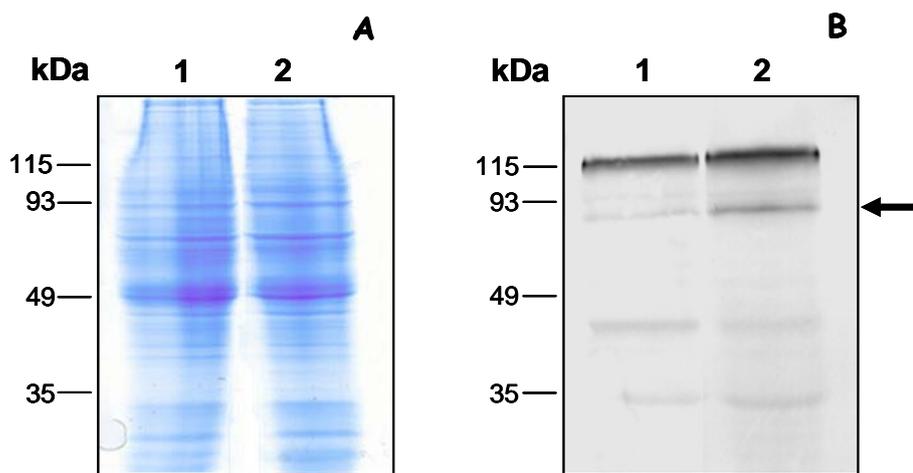


Figura R-11. Análisis de la expresión de LiABCG4 mediante *Western blot*. A) Gel teñido con azul de coomassie. B) Incubación con suero inmune diluido 1/5.000 en solución de inmunodetección. 1. Proteínas totales de los parásitos control. 2. Proteínas totales de los parásitos transfectados con *LiABCG4*. El marcador de peso molecular de proteínas utilizado fue el *broad-range* de BioRad. La flecha indica una proteína de unos 83 kDa sobreexpresado en los parásitos transfectados con *LiABCG4*.

4.5. Obtención de parásitos que sobreexpresan la proteína LiABCG4 mutada.

A partir de la construcción *LiABCG4-pX* y utilizando el protocolo del kit de mutagénesis *Quick Change® XL Site-Directed* (Stratagene) se obtuvo la construcción *LiABCG4/mut-pX*. Mediante digestión se comprobó que *LiABCG4/mut-pX* contenía la mutación puntual (C→T), introducida en la posición 279 de la secuencia codificante, que inactiva una de las dianas *Apal* del gen sin modificar la secuencia aminoacídica. Del mismo modo, mediante secuenciación se comprobó que *LiABCG4/mut-pX* contenía la mutación puntual (A→ T), introducida en la posición 293 de la secuencia codificante de *LiABCG4*. Esta mutación conlleva un cambio K98M, del motivo Walker A del NBS. Se sabe que esta mutación provoca una pérdida de función en la proteína ABCG2 humana y otras proteínas ABC, por impedir la hidrólisis de la molécula de ATP, si bien no su unión (Ozvegy *et al.*, 2001). Una vez transfectados los promastigotes de *L. infantum* con la construcción *LiABCG4/mut-pX*, se seleccionaron hasta una concentración final de 500 µg/ml de G418. Mediante *Northern blot*, se observaron niveles de expresión similares a los obtenidos para el gen nativo *LiABCG4* (Fig. R-14).

5. LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA LiABCG4 EN *L. INFANTUM*.

5.1. Obtención de parásitos que sobreexpresan LiABCG4 fusionada a GFP.

Para el estudio de la localización subcelular de LiABCG4, a falta de un anticuerpo policlonal específico que reconociera la proteína mediante inmunofluorescencia indirecta, creamos quimeras de la proteína fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP). Para ello empleamos los vectores pXG-GFP+2 y pXG-'GFP+, que nos permitían obtener la proteína LiABCG4 fusionada a GFP en el extremo amino y carboxilo, respectivamente (Ha *et al.*, 1996).

Resultados

Para sobreexpresar la proteína fusionada con GFP en el extremo amino, se amplificó mediante PCR el marco abierto de lectura de *LiABCG4* empleando los oligos LiABCG4gfp-N5' y LiABCG4gfp-N3' (Materiales y Métodos), que añaden sitios de corte para *NotI* y *BamHI*. El fragmento obtenido, previo subclonaje en pGEM-T, se liberó por digestión y se clonó en el vector pXG-GFP+2, obteniéndose la construcción *GFP-LiABCG4* (Fig. R-12).

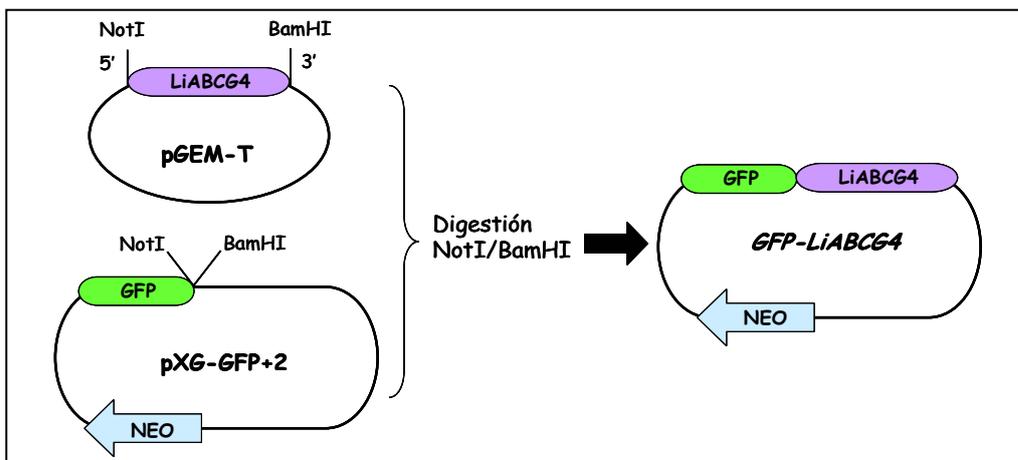


Figura R-12. Clonaje del gen *LiABCG4* en el vector de expresión para *Leishmania* pXG-GFP+2. La secuencia codificante de *LiABCG4* (violeta) se clonó en el vector pXG-GFP+2 que incorpora la secuencia de GFP (verde), obteniéndose la construcción *GFP-LiABCG4*.

Para sobreexpresar la proteína fusionada a GFP en el extremo carboxilo, se amplificó el marco abierto de lectura de *LiABCG4* (sin STOP) mediante PCR. Para ello se emplearon los oligos LiABCG4gfp-C5' y LiABCG4gfp-C3' (Materiales y Métodos), que añaden sitios de corte para *BamHI* y *EcoRV*. El producto de PCR, previo subclonaje en pGEM-T, se clonó en el vector pXG-GFP+, obteniéndose la construcción *LiABCG4-GFP* (Fig. R-13).

La corrección y exactitud de ambas construcciones se comprobó mediante patrones de restricción, así como por secuenciación. Una vez transfectadas las formas promastigotas de *L. infantum* con las construcciones anteriores, junto con el vector pXG-GFP+, que produce la proteína GFP y que se utilizó como control, se seleccionaron hasta una concentración final de 100 μ g/ml de G418. Posteriormente, se detectaron los niveles de expresión mediante *Northern* y *Western blot*.

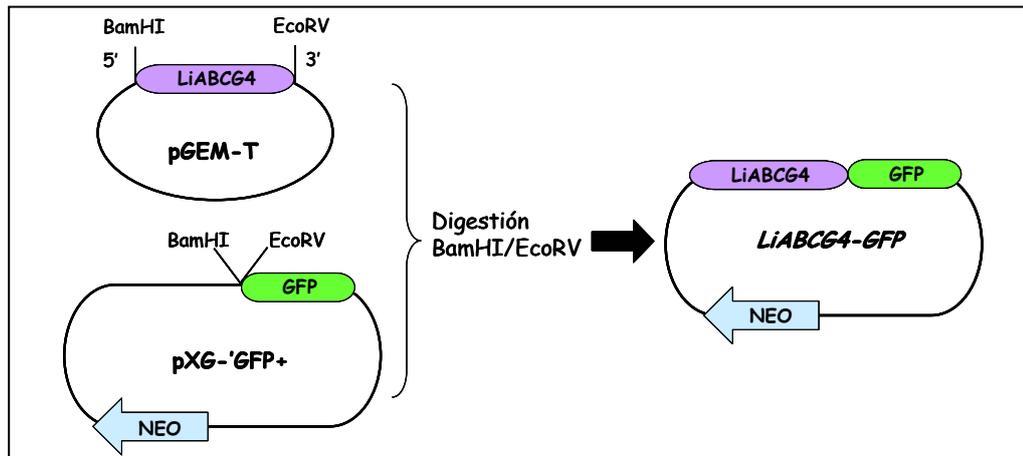


Figura R-13. Clonaje del gen *LiABCG4* en el vector de expresión para *Leishmania* pXG-GFP+. La secuencia codificante de *LiABCG4* (violeta) se clonó en el vector pXG-GFP+ que incorpora la secuencia de GFP (verde), obteniéndose la construcción *LiABCG4-GFP*.

El análisis mediante *Northern blot*, utilizando la sonda específica frente a *LiABCG4*, muestra la sobreexpresión de un transcrito de aproximadamente 2,9 kb, que corresponde a los marcos abiertos de lectura de *LiABCG4* junto con *GFP*, en los parásitos transfectados con la construcción *GFP-LiABCG4*. Las diferencias de tamaño observadas entre los transcritos de *LiABCG4*-pX y *GFP-LiABCG4* se deben a la ausencia de las regiones no codificantes (UTRs) en la última construcción, así como a la presencia de sitios de trans-splicing localizados en el vector pXG-GFP+2, flanqueando al gen en 5' y 3' (Fig. R-14).

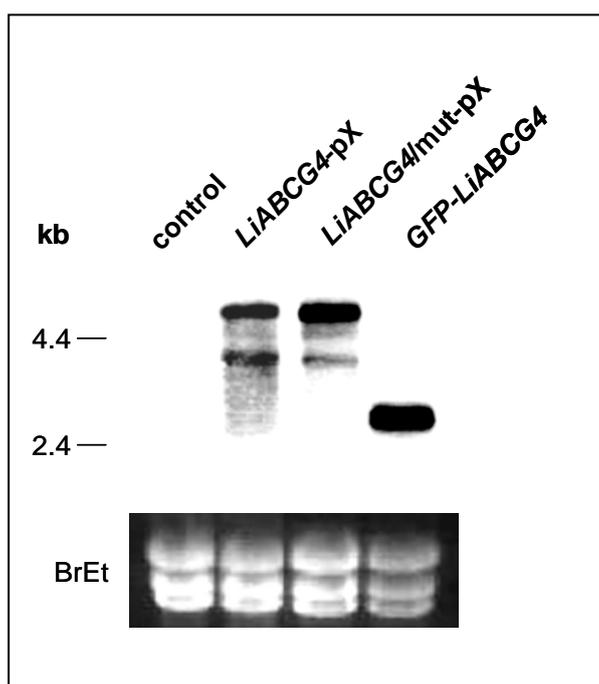


Figura R-14. Sobreexpresión del gen *LiABCG4* en los parásitos transfectados.

Northern blot con RNA total procedente de los parásitos transfectados. Tras la electroforesis y la transferencia a membranas de nylon, el RNA se hibridó con la sonda específica para *LiABCG4*, obtenida mediante digestión de *LiABCG4*-pX con *HindIII*. En el primer carril se encuentra el RNA de los parásitos transfectados con el plásmido control (pX); en el segundo carril, el RNA de los parásitos transfectados con el plásmido *LiABCG4*-pX. El tercer carril corresponde al RNA de los parásitos transfectados con la construcción *LiABCG4*/mut-pX, que contiene la versión mutada del gen. El cuarto carril incluye el RNA de los parásitos transfectados con la construcción *GFP-LiABCG4*. Como marcador de peso molecular se utilizó el RNA ladder de Invitrogen. El panel inferior muestra el RNA ribosómico teñido con bromuro de etidio.

Resultados

La expresión de la proteína LiABCG4 fusionada a GFP se analizó mediante *Western blot*. Para ello, se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida (10%) de las proteínas totales procedentes de 7 millones de parásitos en fase logarítmica de crecimiento. Los geles se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con anticuerpo policlonal anti-GFP diluido 1/7.500. Posteriormente, se utilizó un segundo anticuerpo anti-IgG conjugado con peroxidasa y se reveló con el sustrato ECL™ plus. Podemos observar una banda del tamaño esperado (unos 113 kDa) correspondiente a la proteína LiABCG4 fusionada a GFP (Fig. R-15). Como control se utilizaron parásitos que sobreexpresan la proteína GFP (30kDa).

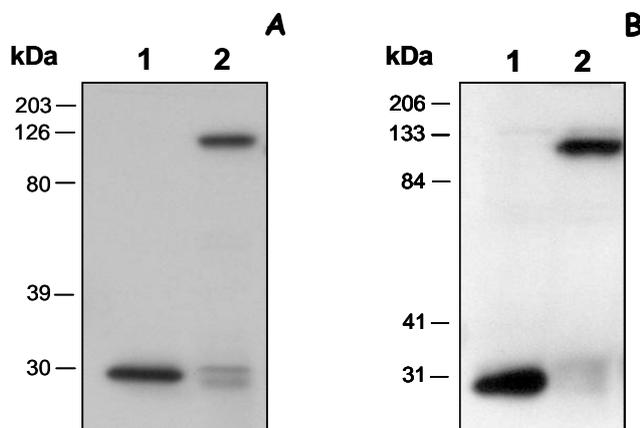


Figura R-15. Análisis, mediante *Western blot*, de la proteína LiABCG4 fusionada a GFP. 1. Parásitos control que sobreexpresan la proteína GFP. 2. Parásitos transfectados (A) con la construcción *GFP-LiABCG4*, que sobreexpresan la proteína LiABCG4 marcada con GFP en el extremo amino, y (B) con la construcción *LiABCG4-GFP*, que sobreexpresan la proteína LiABCG4 marcada con GFP en el extremo carboxilo. El marcador de peso molecular fue el *Kaleidoscope standards* de Bio-Rad.

Al igual que se ha descrito en el apartado 4.5, a partir de la construcción *GFP-LiABCG4*, se obtuvo una versión mutada de la proteína marcada con GFP (*GFP-LiABCG4/mut*), lo que nos permitiría determinar su localización. Mediante *Western blot* pudimos determinar que el tamaño de la proteína era el esperado (unos 113 kDa), y que los niveles de expresión son similares a los de la proteína salvaje marcada con GFP en el extremo amino (Fig. R-16).

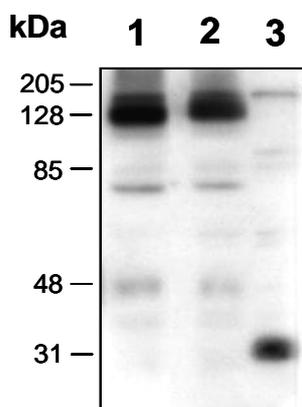


Figura R-16. Análisis de la proteína LiABCG4 mutada fusionada a GFP mediante *Western blot*. 1. Parásitos transfectados con *GFP-LiABCG4* mutado. 2. Parásitos transfectados con la construcción *GFP-LiABCG4*. 3. Parásitos control que sobreexpresan la proteína GFP. Marcador de peso molecular *Kaleidoscope standards* (Bio-Rad).

5.2. Localización de la proteína LiABCG4.

Los estudios de localización de la proteína se realizaron sobre formas promastigotas de *Leishmania* transfectadas con las construcciones *GFP-LiABCG4* y *LiABCG4-GFP* mediante microscopía de fluorescencia. La observación de las muestras al microscopio óptico de fluorescencia demostró que la proteína se localizaba principalmente en la membrana plasmática (MP) de los parásitos y en las proximidades del bolsillo flagelar, considerado el único sitio de endocitosis y exocitosis, así como el principal punto de adición de proteínas a la membrana (Landfear e Ignatushchenko, 2001) (Fig. R-17).

Para corroborar esta localización, los parásitos se incubaron en tampón hipotónico durante 30 min, y se homogenizaron suavemente, lo que permite la formación de “fantasmas” celulares sin flagelo que mantienen la estructura microtubular asociada a la membrana plasmática. La observación de estos “fantasmas” mediante microscopía de fluorescencia confirmó la localización de la proteína en la membrana plasmática (Fig. R-17).

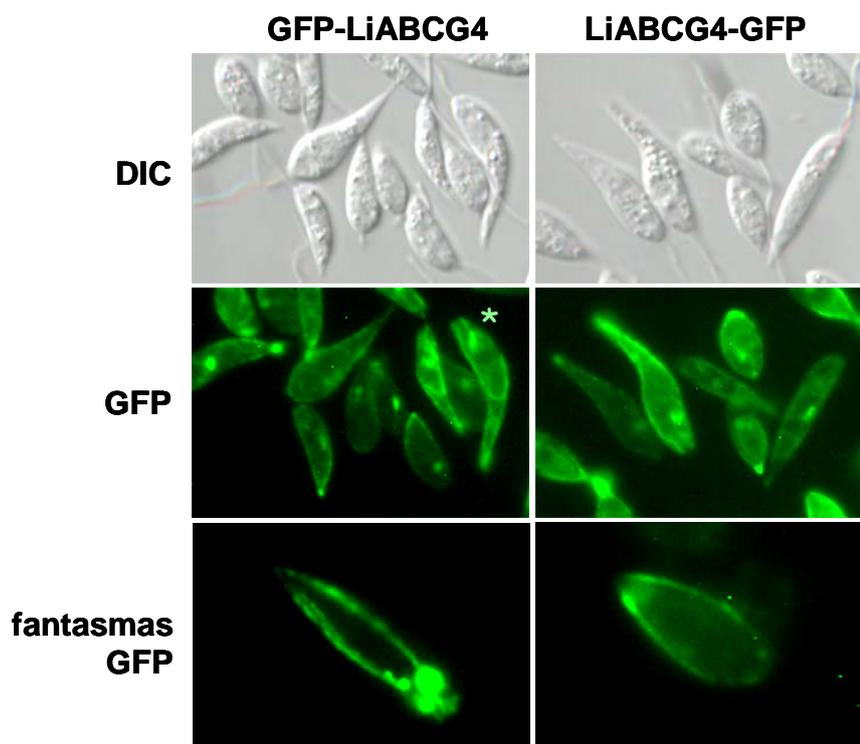


Figura R-17. Análisis de la localización de LiABCG4 mediante microscopía de fluorescencia. Imágenes de microscopía de formas promastigotas de *L. infantum* que sobreexpresan la proteína LiABCG4 fusionada a GFP en su extremo amino (*GFP-LiABCG4*) o en su extremo carboxilo (*LiABCG4-GFP*). Paneles superiores: imágenes de contraste diferencial de interferencia (DIC). Paneles centrales: las imágenes de fluorescencia muestran que la fluorescencia asociada a GFP se localiza predominantemente en la membrana plasmática y próxima al bolsillo flagelar (*). Paneles inferiores: imágenes de fluorescencia de “fantasmas” sin flagelo obtenidos por choque hipotónico; la fluorescencia asociada a GFP sigue localizándose en la membrana plasmática.

El resultado de los estudios de microscopía de fluorescencia desarrollados sobre parásitos transfectados con la construcción *GFP-LiABCG4/mut*, que sobreexpresan la proteína LiABCG4 mutada fusionada a GFP, demostró que la proteína se localiza mayoritariamente en estructuras internas. La proteína mutada presenta una localización subcelular alterada con respecto a la proteína LiABCG4 nativa. Como se había descrito previamente para la proteína ABCG2 humana (Henriksen *et al.*, 2005b), la mutación en el residuo de lisina del Walker A parece tener un efecto importante sobre la correcta localización de LiABCG4 (Fig. R-18).

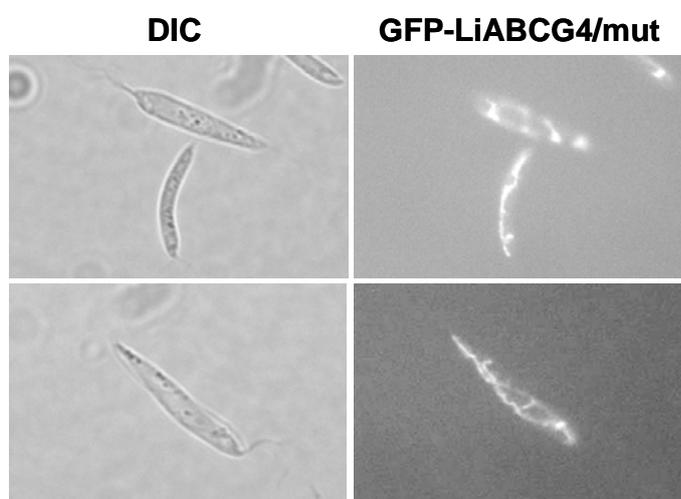


Figura R-18. Análisis de la localización de LiABCG4/mut mediante microscopía de fluorescencia. Imágenes de microscopía de formas promastigotas de *L. infantum* que sobreexpresan la proteína LiABCG4 mutada fusionada a GFP en su extremo amino (*GFP-LiABCG4/mut*). Izquierda: imágenes de contraste diferencial de interferencia (DIC). Derecha: las imágenes muestran que la fluorescencia asociada a GFP se localiza predominantemente en estructuras internas.

6. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA LiABCG4.

6.1. Caracterización en *L. infantum*.

6.1.1. Estudios de internalización de análogos de fosfolípidos.

Con el fin de estudiar la posible implicación de LiABCG4 en el transporte de lípidos, estudiamos la incorporación e internalización de análogos fluorescentes de fosfolípidos

en parásitos controles y transfectados con el gen *LiABCG4*. Estos análogos de cadena corta son fluorescentes por la unión de un grupo NBD (nitro-benzoxa-diazol) al fosfolípido. Concretamente, C₆-NBD-fosfatidilcolina (C₆-NBD-PC), C₆-NBD-fosfatidiletanolamina (C₆-NBD-PE), C₆-NBD-fosfatidilserina (C₆-NBD-PS) y C₆-NBD-esfingomielina (C₆-NBD-SM). Los protocolos descritos para estos ensayos (Bosch *et al.*, 1997; Hanson y Nichols, 2001) se basan en permitir la acumulación del análogo lipídico durante un período de tiempo, tras el cual se elimina la fluorescencia asociada a la cara externa de la membrana mediante extracción con albúmina. La albúmina extrae los fosfolípidos asociados a la cara externa debido a su alta afinidad con estas moléculas.

En la figura R-19 se puede observar que la acumulación de análogos de PE, PS y SM no presentó diferencias significativas entre los parásitos control (histograma gris) y los parásitos transfectados con el gen *LiABCG4* (histograma sin relleno). Los niveles de fluorescencia relativa entre parásitos control y transfectados con *LiABCG4* fueron de $1,09 \pm 0,17$ para C₆-NBD-PE; $1,06 \pm 0,07$ para C₆-NBD-PS; y $1,18 \pm 0,16$ para C₆-NBD-SM, n=4. En el caso del análogo de PC, la acumulación de los parásitos que sobreexpresan *LiABCG4* fue unas dos veces menor que las de los parásitos control ($2,26 \pm 0,25$ para C₆-NBD-PC, n=4 $p < 0,005$).

De acuerdo con trabajos anteriores (Pérez-Victoria *et al.*, 2003a; Pérez-Victoria *et al.*, 2006b), la acumulación de C₆-NBD-PC y -PE es más eficiente que la de C₆-NBD-PS y -SM.

Igualmente, se realizaron ensayos de acumulación del marcador de endocitosis FM4-64, sin que se observaran diferencias entre los parásitos control y los que sobreexpresan *LiABCG4*.

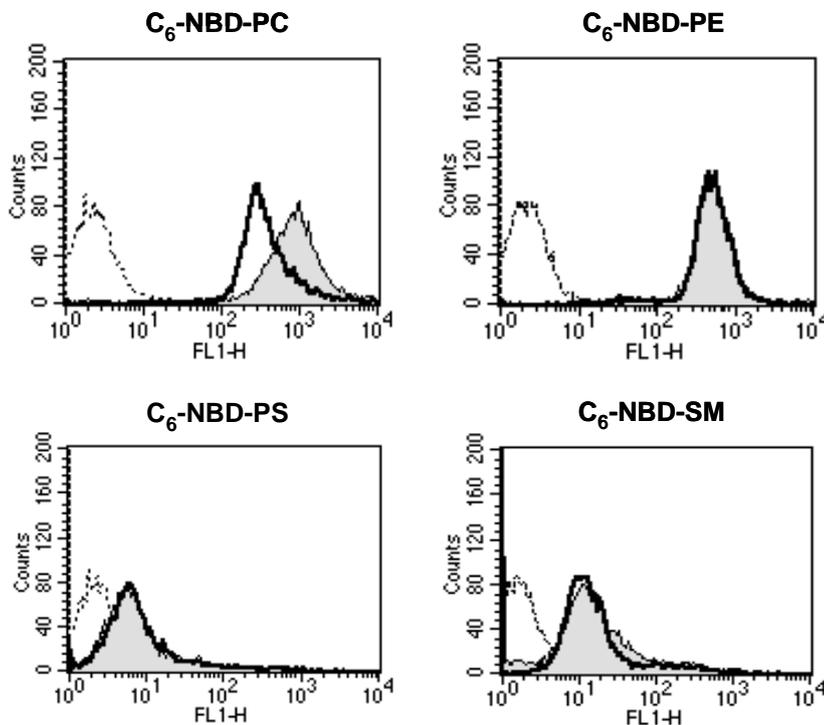


Figura R-19. Acumulación de análogos de fosfolípidos en parásitos que sobreexpresan LiABCG4. Tras un período de 30 min de acumulación de los análogos fluorescentes de fosfolípidos a 28 °C, se analizó la fluorescencia mediante citometría de flujo en un FACScan (Beckton-Dickinson). Se muestran los histogramas de acumulación de los parásitos transfectados con el plásmido control (histograma gris); parásitos transfectados con *LiABCG4* (histograma sin colorear); parásitos sin marcar (histograma discontinuo). Histogramas representativos de 4 experimentos independientes.

Para inhibir la degradación de los análogos de fosfolípidos utilizamos PMSF (Fig. R-20). Como se había descrito previamente (Araújo-Santos *et al.*, 2003), DFP es más eficaz como inhibidor, pero las diferencias obtenidas con PMSF se mantenían al utilizar DFP (Fig. R-20).

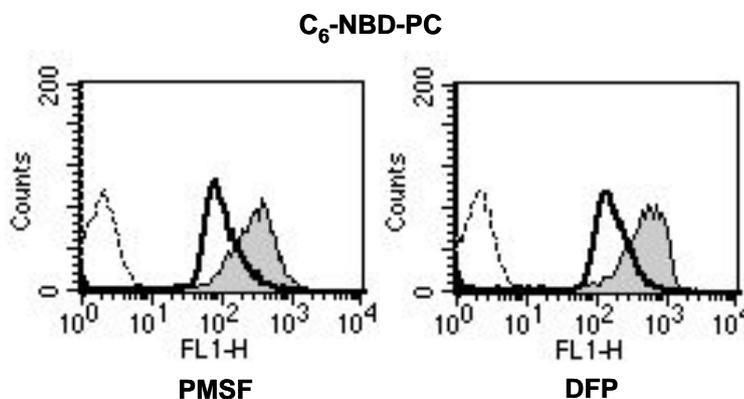


Figura R-20. Acumulación de C₆-NBD-PC en parásitos que sobreexpresan LiABCG4. Histogramas de acumulación de C₆-NBD-PC en los parásitos transfectados con el plásmido control (gris); parásitos transfectados con *LiABCG4* (histograma sin colorear); parásitos sin marcar (histograma discontinuo). La acumulación se llevó a cabo en presencia de los inhibidores PMSF y DFP, respectivamente.

La diferencia de acumulación de C₆-NBD-PC entre controles y parásitos que sobreexpresan LiABCG4 no se observó en el caso de los transfectantes que sobreexpresan la proteína LiABCG4 mutada (Fig. R-21).

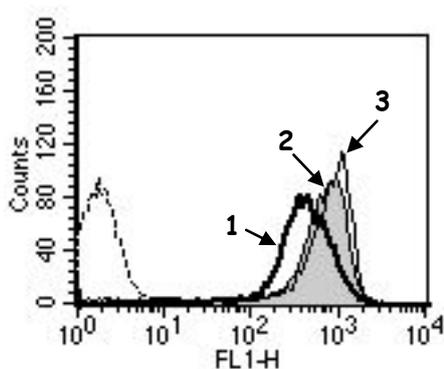


Figura R-21. Acumulación de C₆-NBD-PC en parásitos que sobreexpresan la proteína LiABCG4 mutada. Se muestran los histogramas de acumulación de C₆-NBD-PC en los parásitos que sobreexpresan LiABCG4 (1), en parásitos control de transfección (2) y en parásitos que sobreexpresan LiABCG4 mutada (3).

6.1.2. Ensayos de resistencia a fármacos.

Para comprobar si la sobreexpresión de LiABCG4 confiere resistencia frente a la acción de determinados fármacos, como se ha descrito para otras proteínas ABC en *Leishmania*, se realizaron estudios de viabilidad celular en presencia de diferentes compuestos. Estos ensayos nos permitieron determinar los valores de IC₅₀ que tienen los parásitos transfectados con respecto a sus controles para cada uno de los compuestos empleados.

Los compuestos analizados fueron análogos de fosfolípidos con acción leishmanicida, como la miltefosina, edelfosina y perifosina. Igualmente, se analizaron compuestos sustratos de transportadores ABCG (mitoxantrona y daunomicina), así como otros agentes leishmanicidas (sitamaquina y ketoconazol).

Los **alquil-fosfolípidos** miltefosina, edelfosina y perifosina son análogos de fosfatidilcolina de cadena corta y representan un grupo de agentes leishmanicidas bastante prometedores (Fig. R-22). La miltefosina (Impavido®) es el primer compuesto que ha sido eficaz por vía oral frente a la leishmaniasis visceral y cutánea. Puesto que la sobreexpresión de LiABCG4 conlleva una menor acumulación de análogos de fosfolípidos, quisimos estudiar si la sobreexpresión de LiABCG4 podría modificar la sensibilidad de *L. infantum* frente a estos análogos. Los resultados obtenidos en los estudios de viabilidad mostraron unos valores de IC₅₀ superiores en el caso de los

parásitos transfectados con *LiABCG4* con respecto a sus controles de transfección (Tabla R-2).

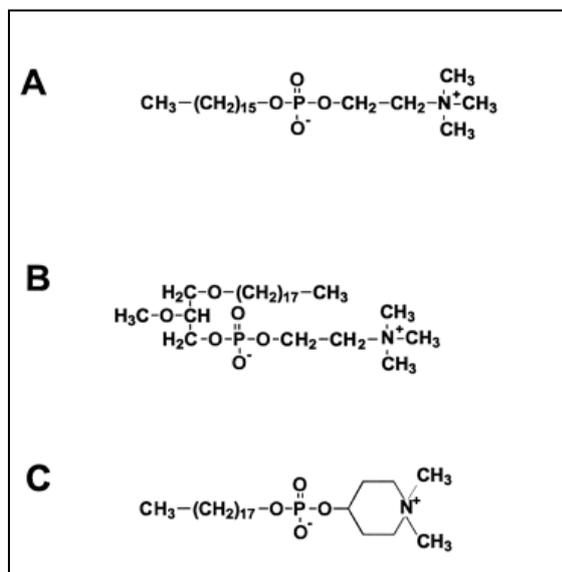


Figura R-22. Estructura de los alquil-fosfolípidos. (A) Miltefosina. (B) Edelfosina. (C) Perifosina.

Entre los compuestos que son sustratos de transportadores ABC ensayamos la **mitoxantrona** y la **daunomicina**, por ser sustratos conocidos de la proteína ABCG2 humana. En ambos casos, no se apreciaron diferencias en los valores de IC₅₀ tanto de los parásitos control como de los transfectantes (Tabla R-2).

Finalmente, se ensayaron otros compuestos con acción leishmanicida, como el **ketoconazol** y la **sitamaquina**. El ketoconazol es un inhibidor de la ruta de síntesis de esteroides en *Leishmania* (Beach *et al.*, 1988). La sitamaquina es una aminoquinoleína con actividad leishmanicida, actualmente en desarrollo por Glaxo-Smithkline (Yeates, 2002) que se encuentra en estudios de fase clínica II en India frente al tratamiento de la leishmaniasis visceral. Para el caso del ketoconazol no se observaron diferencias significativas entre parásitos transfectados y controles, mientras que con la sitamaquina se observó una disminución en la sensibilidad de los parásitos transfectados con respecto a los controles de transfección (Tabla R-2).

	CONTROL	LiABCG4	LiABCG4/mut	LiABCG4-GFP	GFP-LiABCG4	IR
MILTEFOSINA	7,0 ± 0,6	14,2 ± 1,1	6,9 ± 0,7	6,5 ± 0,4	14,6 ± 0,2	2,2*
EDELFOFINA	4,3 ± 0,6	8,0 ± 1,0	4,4 ± 0,1	3,7 ± 0,6	7,9 ± 0,9	1,9*
PERIFOSINA	2,1 ± 0,5	4,2 ± 0,6	2,2 ± 0,1	2,0 ± 0,3	4,5 ± 0,8	2,0*
SITAMAQUINA	13,0 ± 0,9	22,9 ± 3,4	N/D	N/D	N/D	1,8*
KETOCONAZOL	16,3 ± 1,3	19,3 ± 2,0	N/D	N/D	N/D	1,2
MITOXANTRONA	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	N/D	N/D	N/D	1,3
DAUNOMICINA	4,4 ± 1,1	4,3 ± 1,1	N/D	N/D	N/D	1

Tabla R-2. Estudio de resistencia a fármacos en parásitos transfectados con LiABCG4. Los parásitos se cultivaron durante 72 h en presencia de distintas concentraciones de los compuestos según lo descrito en “Materiales y Métodos”. La IC₅₀ se determinó calculando la concentración de cada compuesto (μM) que inhibe en un 50% el crecimiento de los parásitos. Se presentan las medias obtenidas de seis experimentos realizados por duplicado con las desviaciones estándar correspondientes. Las diferencias significativas con los parásitos control se calcularon mediante el test de la *t* de Student, *p<0,001. El Índice de Resistencia (IR) se calculó dividiendo la IC₅₀ de los parásitos que sobreexpresan LiABCG4 entre la de sus controles de transfección.

La funcionalidad de la proteína **LiABCG4 mutagenizada**, así como de la proteína fusionada a GFP, se comprobó mediante estos ensayos de viabilidad, empleando los fármacos frente a los que se habían visto diferencias más significativas (miltefosina, edelfosina y perifosina). Los parásitos transfectados con LiABCG4 mutada mostraron los mismos niveles de sensibilidad a los alquil-fosfolípidos que los controles de transfección (Tabla R-2).

En el caso de la proteína **LiABCG4 marcada con GFP** en el extremo carboxilo, no se observaron diferencias en los niveles de sensibilidad con respecto al control de transfección. Para los parásitos que sobreexpresan LiABCG4 fusionada a GFP en el extremo amino, los valores de IC₅₀ fueron similares a los de aquellos que sobreexpresan LiABCG4 sin marcar (Tabla R-2).

Estos resultados nos permiten deducir en primer lugar que la GFP en el extremo carboxilo está inactivando la funcionalidad de la proteína, mientras que el marcaje en el extremo amino no interfiere con la funcionalidad. Por otra parte, la proteína LiABCG4 mutada era inactiva, si bien sus niveles de expresión eran similares a los de la proteína salvaje. La mutación en la lisina del Walker A no sólo inactiva al transportador, sino que altera su distribución subcelular.

6.1.3. Ensayos de acumulación y eflujo de miltefosina radiactiva.

Para corroborar el hecho de que LiABCG4 pudiera reconocer a los análogos de alquil-fosfolípidos como posibles sustratos, se midió la acumulación intracelular de miltefosina. Al medio de cultivo se le adicionó [^{14}C]miltefosina y se incubaron los parásitos a 28 °C. A diferentes intervalos de tiempo, se centrifugaron las células, se lavaron con PBS/BSA para eliminar la miltefosina de la membrana y se midió la radioactividad asociada. Los parásitos control acumulan rápidamente [^{14}C]miltefosina, saturándose en unas 6 h. Por el contrario, los parásitos que sobreexpresan LiABCG4 mostraban una menor acumulación de [^{14}C]miltefosina a cualquier intervalo de tiempo, y la tasa inicial de transporte era la mitad de la de los parásitos control. Estos datos apuntan hacia un incremento del transporte hacia fuera de [^{14}C]miltefosina a través de la MP de la célula, posiblemente mediado por LiABCG4 (Fig. R-23).

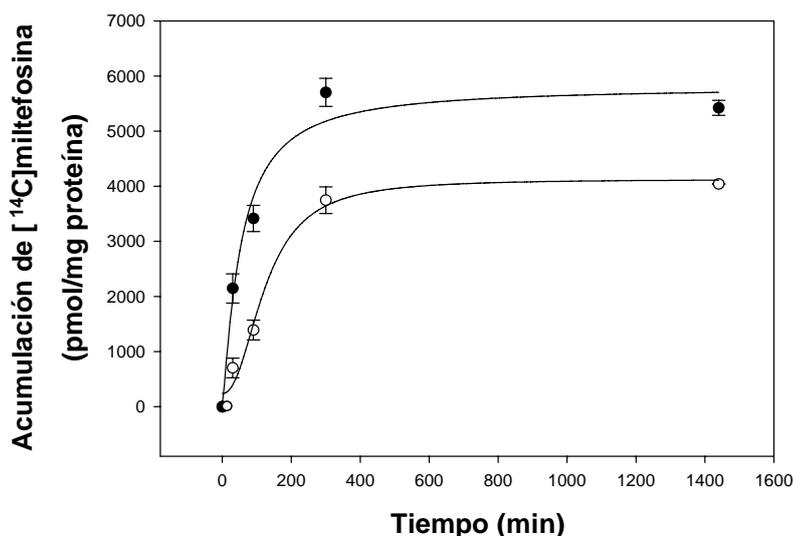


Figura R-23. Acumulación de [^{14}C]miltefosina en parásitos que sobreexpresan LiABCG4. Los parásitos control (círculos negros) y los que sobreexpresan LiABCG4 (círculos blancos) se incubaron con [^{14}C]miltefosina como se ha descrito en Materiales y Métodos. A distintos intervalos de tiempo, los parásitos se enfriaron en hielo y se lavaron en PBS frío con 10 mg ml $^{-1}$ de BSA. La radioactividad asociada a las células se cuantificó y se normalizó según la concentración de proteínas, expresándose en pmol/mg. Los datos representados corresponden a la media junto con las desviaciones estándar de determinaciones por duplicado en un experimento representativo de tres experimentos independientes. * $p < 0.01$.

Para corroborar esta hipótesis, se realizaron ensayos de eflujo de [^{14}C]miltefosina. Para ello, los parásitos se cargaron con [^{14}C]miltefosina y, posteriormente, se incubaron en medio fresco sin fármaco durante 60 min. Al cabo de este tiempo, un 60% y un 40%

de la [^{14}C]miltefosina inicial acumulada seguía retenida en los parásitos control y en los que sobreexpresan LiABCG4, respectivamente (Fig. R-24).

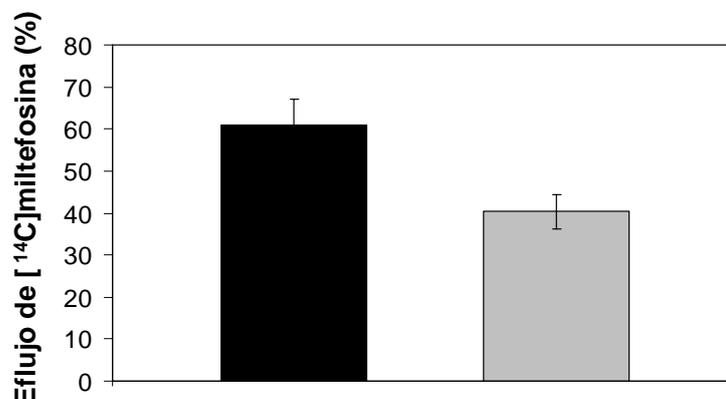


Figura R-24. Eflujo de miltefosina en parásitos que sobreexpresan LiABCG4. Los parásitos control (negro) y los que sobreexpresan LiABCG4 (gris) se pre-incubaron con [^{14}C]miltefosina a 28 °C como se ha descrito en Materiales y Métodos. La radioactividad retenida se midió al cabo de 60 min. Los datos están expresados como el porcentaje de la cantidad inicial de [^{14}C]miltefosina incorporada y representan la media con las desviaciones estándar de tres experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado. La significancia de las diferencias con los parásitos control se determinó mediante el test de la *t* Student, * $p < 0.01$.

6.2. Expresión heteróloga de la proteína LiABCG4 en levaduras.

6.2.1. Clonaje en los vectores de expresión.

Para la expresión heteróloga en levaduras, el gen *LiABCG4* se clonó en el vector multicopia pYEXTF-HC (Holz *et al.*, 2002). Este plásmido incorpora un promotor inducible por Cu^{2+} , CUP1, así como el marcador URA, que nos permite seleccionar las levaduras transformadas con el plásmido por crecimiento en un medio carente de uracilo. El vector incorpora, además, la secuencia correspondiente al epítipo FLAG y a 6 histidinas, lo que permite tener la proteína marcada con FLAG en el extremo amino y con una cola de histidinas en el extremo carboxilo.

Para el clonaje, la secuencia correspondiente al gen *LiABCG4* se amplificó sin los codones de inicio y STOP, usando los oligos LiABCG4y2-5' y LiABCG4y2-3' (Materiales y Métodos), que añaden sitios de corte para *Bam*HI y *Not*I, respectivamente. El fragmento obtenido, previo subclonaje en pGEM-T, se liberó por digestión y se clonó en el vector

pYEXTF-HC. La construcción resultante, denominada *LiABCG4*-pYEX, se empleó para transformar levaduras (Fig. R-25)

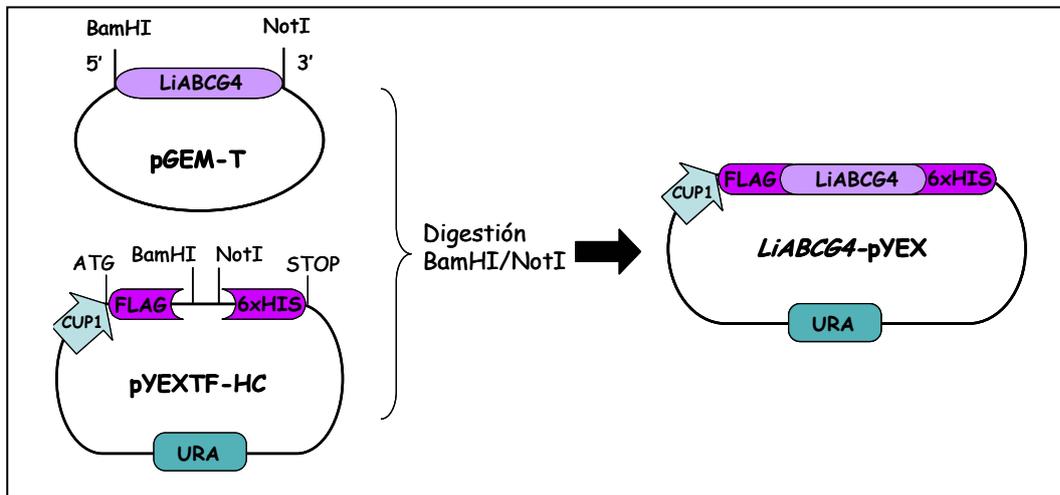


Figura R-25. Clonaje del gen *LiABCG4* en el vector de expresión de levaduras pYEXTF-HC. La secuencia codificante de *LiABCG4* (violeta) se clonó en el vector pYEXTF-HC, que incorpora un promotor inducible (celeste) así como la secuencia correspondiente al epítipo FLAG y una cola de 6 histidinas (morado).

6.2.2. Expresión y localización de *LiABCG4*.

La cepa elegida para expresar *LiABCG4* fue *sec6-4Δdrs2Δdnf3*, un mutante de las vías secretoras tardías que crece normalmente a 27 °C, pero cuyo crecimiento cesa a 38 °C para pasar a acumular grandes cantidades de vesículas secretoras. Además, esta cepa tiene deletionadas dos ATPasas P4, Dnf3p y Drs2p. El resultado es que se obtienen vesículas secretoras deficientes en el transporte de fosfolípidos (C₆-NBD-PC, -PE y -PS) dependiente de ATP, desde la cara luminal a la cara citosólica (Alder-Baerens *et al.*, 2006). Además, la principal ATPasa de membrana endógena, Pma1p, ha sido marcada con un epítipo HA en su extremo amino, lo que permitiría el aislamiento de las vesículas mediante inmuno-afinidad. De localizarse en las vesículas secretoras, *LiABCG4* se insertaría en la membrana con los dominios NBS hacia el exterior (Fig. R-26). En conjunto, esto nos proporcionaría un sistema de expresión de gran utilidad para el análisis de actividades de transporte hacia la cara luminal de las vesículas.

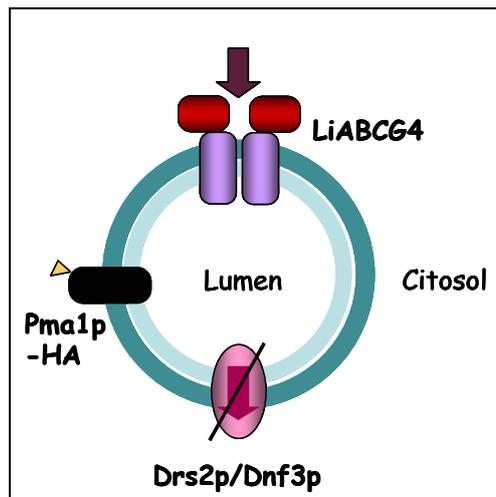


Figura R-26. Esquema de las vesículas secretoras *sec6-4Δdrs2Δdnf3*+LiABCG4. Las vesículas secretoras procedentes de la cepa *sec6-4Δdrs2Δdnf3* tienen deletionadas dos ATPasas P4, Drs2p y Dnf3p, implicadas en el transporte de fosfolípidos (C₆-NBD-PC, -PE y -PS) desde la cara luminal a la cara citosólica. En las vesículas se localiza la principal ATPasa de membrana, Pma1p, marcada con un epítipo HA, lo que permitirá el aislamiento de las vesículas por inmunofluorescencia. LiABCG4, de localizarse en estas vesículas, lo haría con sus dominios NBS (en rojo) hacia el exterior. Las flechas indican la dirección del transporte

La construcción *LiABCG4*-pYEX o el vector vacío se usaron para transformar *S. cerevisiae sec6-4Δdrs2Δdnf3*. La **expresión de LiABCG4** se comprobó mediante *Western blot*. Las células se crecieron hasta una DO₆₀₀ de 0,2 y, posteriormente, se indujo la expresión de la proteína por adición de CuSO₄ 100 μM durante 4 horas. Las células se centrifugaron, se resuspendieron en PBS con PMSF 500 μM y se lisaron por agitación vigorosa con perlas de vidrio. El sobrenadante del lisado se corrió en un gel de proteínas al 10%, se transfirió a membranas de PVDF y se hibridó con un anticuerpo anti-His diluido 1/5.000. Se empleó un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, lo que nos permitía revelar con el sustrato ECL™ plus. En las muestras inducidas con CuSO₄, se obtenía una banda de unos 85 kDa, correspondiente a la proteína doblemente marcada. Esta banda no se observaba en las muestras que no habían sido inducidas, ni en aquellas correspondientes a células transformadas con el vector vacío (Fig. R-27)

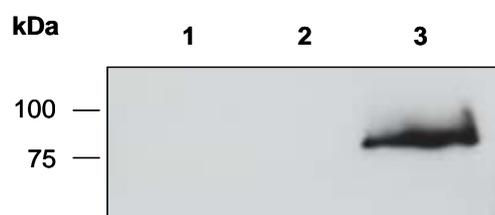


Figura R-27. Análisis, mediante *Western blot*, de la expresión de LiABCG4 en levaduras. *S.cerevisiae*, cepa *sec6-4Δdrs2Δdnf3*, transformada con el vector pYEXTF-HC (1); células transformadas con *LiABCG4*/pYEX sin inducir (2) e inducidas con CuSO₄ 100 μM (3). Las células se crecieron en el medio de selección a 27 °C. La membrana se reveló con anticuerpo anti-His. A la izquierda se indica la posición de los marcadores (*Precision plus protein standards* de Bio-Rad).

Para los ensayos de **localización**, las levaduras se crecieron a 27 °C en presencia de 50 µM CuSO₄ para inducir el promotor CUP1, y se sometieron a fraccionamiento subcelular como se ha descrito en Materiales y Métodos. Las distintas fracciones obtenidas se analizaron mediante *Western blot*. El fraccionamiento de las membranas en gradiente de sacarosa reveló que LiABCG4 colocaliza con los marcadores específicos del retículo endoplasmático (RE) (Dpm1p) y MP (Sso2p) (Fig. R-28).

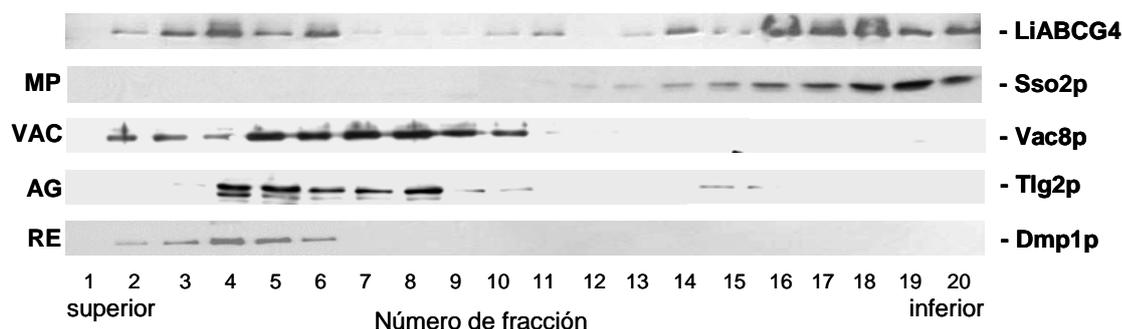


Figura R-28. Localización de LiABCG4 en *S.cerevisiae*. A partir de *S.cerevisiae sec6-4Δdrs2Δdnf3* que sobreexpresa la proteína LiABCG4 doblemente marcada, se obtuvo, por ultracentrifugación a 100.000 g, un sedimento que se sometió a fraccionamiento subcelular en gradiente de sacarosa. Las distintas fracciones del gradiente se analizaron por *Western blot*, utilizando anticuerpos específicos frente a marcadores de los distintos orgánulos. Sso2p, marcador de MP; Vac8p, marcador de vacuola; Tlg2p, marcador del aparato de Golgi tardío; Dmp1p, marcador del retículo endoplasmático. MP, membrana plasmática; VAC, vacuola; AG, aparato de Golgi; RE, retículo endoplasmático.

6.2.3. Expresión de LiABCG4 en vesículas secretoras.

El siguiente paso fue determinar si la proteína LiABCG4 podía detectarse en vesículas secretoras. Para esto, se crecieron las células *sec6-4Δdrs2Δdnf3* a 27 °C con 50 µM CuSO₄ y, posteriormente, se cambiaron a 38 °C durante 90 min para permitir la acumulación de vesículas. Las células se lisaron y se sometieron a centrifugación diferencial a 500 g y a 13.000 g para eliminar la mayoría del RE, núcleos, vacuolas, mitocondrias y MP. Seguidamente, mediante centrifugación a 100.000 g, se recogió un sedimento enriquecido en vesículas secretoras, que se analizó por fraccionamiento en gradiente de Nycodenz®. Mediante análisis por *Western blot* se determinó que el perfil de fraccionamiento de LiABCG4 en gradientes de células crecidas a 38 °C era claramente distinto del de aquellas que habían sido crecidas a 27 °C. Concretamente, en el gradiente de 38 °C, la mayor parte de la proteína LiABCG4 migraba a una fracción de menor

densidad que contenía la máxima expresión de la ATPasa mayoritaria de la MP, Pma1p (Fig. R-29). Además, el gradiente de 38 °C contenía más cantidad de LiABCG4 y Pma1p que el gradiente de 27 °C.

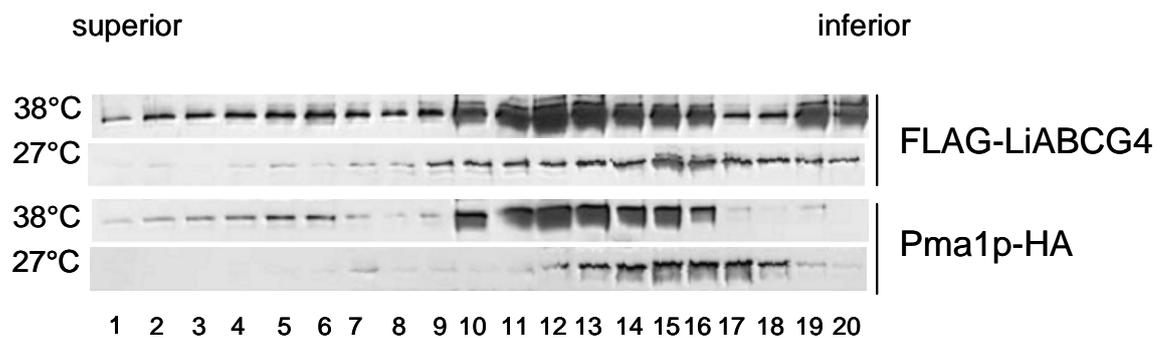


Figura R-29. Gradiente de las vesículas secretoras de levaduras que sobreexpresan LiABCG4. Las fracciones enriquecidas en vesículas secretoras se obtuvieron a partir de células *sec6-4Δdrs2Δdnf3* que sobreexpresan LiABCG4, crecidas a 38 °C y 27 °C, sometidas a centrifugación diferencial, cargadas en la parte inferior de un gradiente lineal de Nycodenz/sorbitol y llevadas al equilibrio por centrifugación. Las fracciones resultantes se recogieron desde la parte superior, y se analizaron mediante *Western blot*. Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-HA para detectar la proteína Pma1p marcada con HA, y anticuerpo policlonal anti-Flag para detectar la proteína LiABCG4.

Para verificar la presencia de LiABCG4 en estas vesículas, se aislaron, mediante inmuno-afinidad, aquellas que contenían Pma1p de las fracciones mayoritarias (11-13) del gradiente de 38 °C (Fig. R-29). Se pudo aislar en torno al 20 % de Pma1p-HA y LiABCGA presente en las fracciones, usando perlas magnéticas unidas a proteína G (Dynabeads®) cargadas con anticuerpo anti-HA, que reconoce el extremo marcado con HA de Pma1p (Fig. R-30). La preincubación de las perlas con un péptido que corresponde al epítipo HA, bloquea de manera eficiente la unión a éstas de las vesículas que contienen Pma1p-HA y LiABCG4, lo que demuestra la especificidad del procedimiento de inmuno-afinidad. Estos resultados corroboran la incorporación de LiABCG4 a las vesículas secretoras.

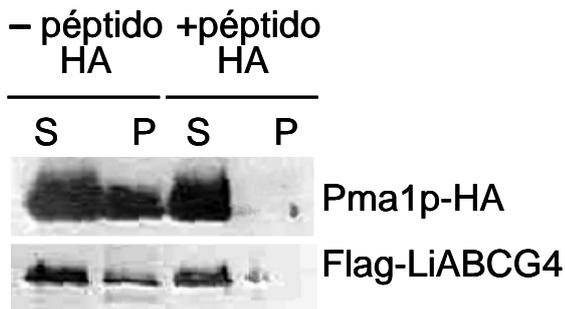


Figura R-30. Aislamiento mediante inmuno-afinidad de las vesículas secretoras. Las vesículas que contenían Pma1p-HA se aislaron por inmuno-afinidad, utilizando anticuerpos anti-HA unidos a Dynabeads-proteína G. En una de las reacciones, las perlas se incubaron con un péptido correspondiente al epítipo HA, para controlar la especificidad del proceso de inmuno-afinidad (+péptido HA). Las fracciones unidas a las perlas (P) o presentes en el sobrenadante (S) se analizaron mediante inmunodetección utilizando anticuerpos contra Pma1p-HA y LiABCG4-Flag.

Para evaluar la capacidad de dimerización de LiABCG4, se llevó a cabo un ensayo de entrecruzamiento químico. Las fracciones enriquecidas en vesículas secretoras, obtenidas a partir de células *sec6-4Δdrs2Δdnf3* crecidas a 38 °C, se trataron con 1,6-bis-maleimidohexano (BMH). Mediante análisis por *Western blot*, usando anticuerpos anti-FLAG, se detectó una banda proteica de 170 kDa, tamaño coincidente con el del posible dímero de LiABCG4 (Fig. R-31).

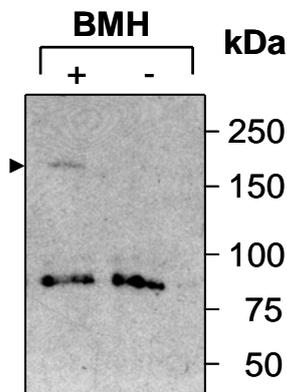


Figura R-31. Análisis de entrecruzamiento químico en vesículas secretoras. Las vesículas secretoras obtenidas tras crecer las células *sec6-4Δdrs2Δdnf3* a 38 °C se sometieron a tratamiento con y sin BMH. Los productos del entrecruzamiento químico se analizaron mediante *Western blot*, utilizando anticuerpos policlonales frente al epítipo FLAG. La banda de alto tamaño molecular que aparece tras el tratamiento con BMH (indicada por una punta de flecha) indica la posible dimerización de LiABCG4. La posición de los marcadores se indica a la derecha (*Precision plus protein standards* de Bio-Rad).

6.2.4. Transporte de lípidos mediado por LiABCG4 en vesículas secretoras.

Seguidamente, se analizó el transporte dependiente de ATP de análogos de fosfolípidos en células *sec6-4Δdrs2Δdnf3* transformadas con *LiABCG4/pYEX* crecidas a 38 °C, para lo que se utilizó un ensayo de extracción con BSA. Con este fin, las fracciones enriquecidas en vesículas secretoras se marcaron con análogos fluorescentes de fosfolípidos (C₆-NBD-PC, -PE, -PS, -SM) y se incubaron a 25 °C en presencia o

ausencia de ATP (Fig. R-32). A distintos intervalos de tiempo se tomaron dos alícuotas de cada muestra y se mezclaron con un tampón con BSA libre de lípidos para extraer los análogos de fosfolípidos de la cara citosólica de la membrana, o con tampón sin BSA. La extracción de los C₆-NBD-PL con BSA produce un descenso en la fluorescencia total de la muestra, puesto que el lípido marcado con C₆-NBD unido a BSA tiene 1,8 veces menos fluorescencia que el que está unido a la membrana. Así, la cantidad de sonda fluorescente extraíble por BSA puede determinarse sin separar físicamente las vesículas del BSA, simplemente midiendo la reducción en la emisión de la fluorescencia, lo cual permite calcular el porcentaje de lípido marcado con C₆-NBD en la cara citosólica (Alder-Baerens *et al.*, 2006).

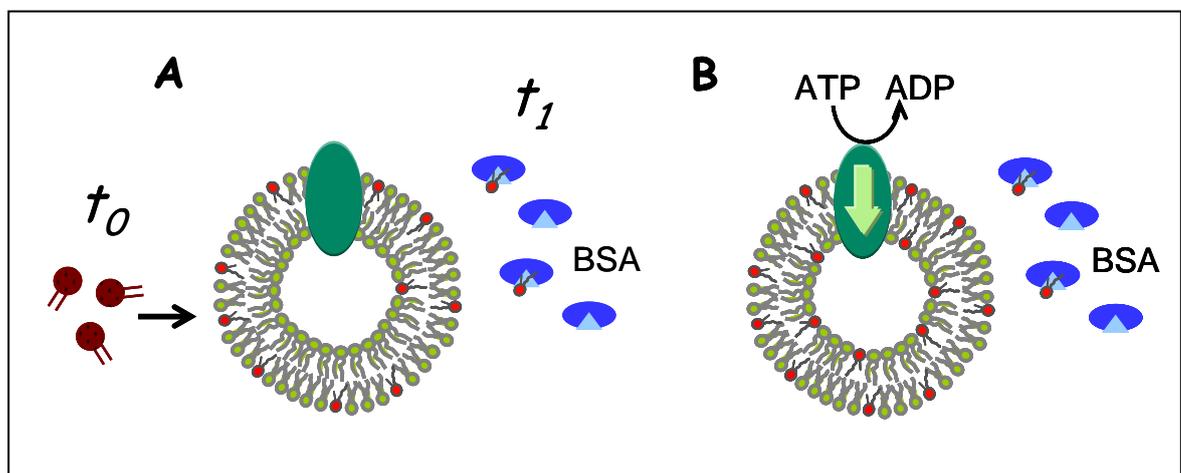


Figura R-32. Esquema representativo del transporte de lípidos en vesículas secretoras mediado por LiABCG4. (A) Las vesículas se incuban con los análogos de fosfolípidos y BSA en ausencia de ATP. C₆-NBD-PC se mueve lentamente de la cara citosólica a la cara luminal. **(B)** En presencia de ATP, C₆-NBD-PC desaparece con mayor velocidad de la cara citosólica. Se puede medir la reducción de fluorescencia en el medio. Figura cedida por el Dr. T. Pomorski.

C₆-NBD-PC incubado con vesículas secretoras y en ausencia de ATP alcanzó en 2 horas una distribución 80:20 entre la cara citosólica y luminal. En presencia de ATP, C₆-NBD-PC desaparecía con mayor velocidad de la cara citosólica, alcanzando una distribución 70:30 en 2 horas. El movimiento entre las bicapas de C₆-NBD-PE, -PS y -SM permanecía inalterado por el ATP (Fig. R-33A). El transporte específico del derivado de PC se inhibía por vanadato y no estaba presente en membranas aisladas de *sec6-4 Δdrs2Δdnf3* transformadas con el vector vacío crecidas a 38 °C (Fig.R-33B). En conjunto, estos resultados sugieren que LiABCG4 está implicado en el transporte de PC desde la cara citosólica a la cara exoplásmica de la membrana.

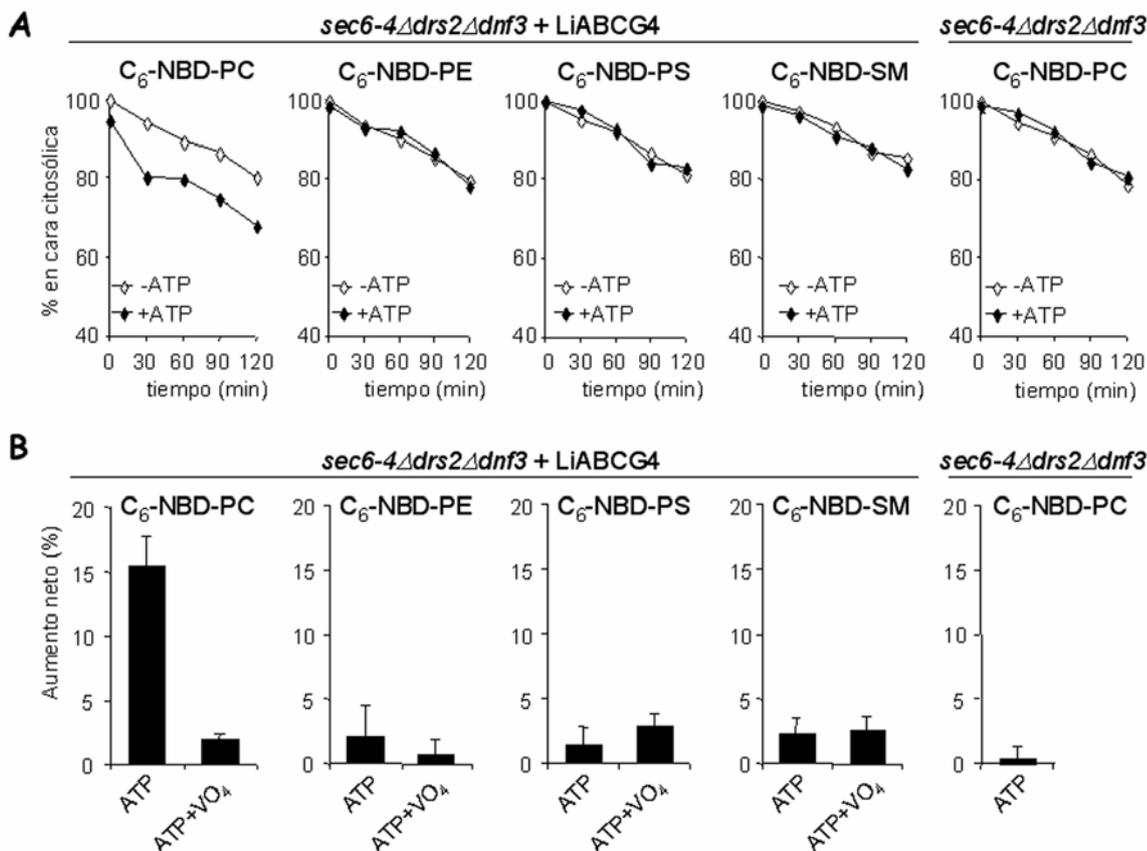


Figura R-33. Transporte de fosfolípidos en vesículas secretoras mediado por LiABCG4. (A) Las vesículas secretoras se obtuvieron a partir de levaduras *sec6-4Δdrs2Δdnf3* que sobreexpresaban LiABCG4. Se marcaron con C₆-NBD-PC, -PE, -PS y -SM y se incubaron a 25 °C con o sin ATP. A los tiempos indicados, mediante extracción con albúmina libre de lípidos, se determinó la fracción de lípidos fluorescentes localizados en la cara citosólica, como se describe en Materiales y Métodos. Los datos que se muestran corresponden a un experimento representativo de dos independientes. **(B)** El nivel de transporte de lípidos dependiente de ATP desde la cara citosólica a la luminal se calculó restando la cantidad accesible de lípido fluorescente en membranas incubadas durante 20 min a 25 °C sin ATP al de membranas incubadas con ATP, y se expresó como el aumento neto en el porcentaje en la cara luminal. Donde se indica, se añadió vanadato 100 μM (VO₄) a las muestras que contenían ATP. Los datos que se muestran son la media junto con las desviaciones estándar de dos experimentos independientes.

6.2.5. Sensibilidad a alquil-fosfolípidos en levaduras que sobreexpresan LiABCG4.

Se probó la sensibilidad a alquil-fosfolípidos (miltefosina y perifosina) de las levaduras transformadas con *LiABCG4/pYEX*, comparadas con aquellas transformadas con el vector vacío *pYEX*. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de crecimiento en placa con un gradiente de fármaco. La cepa parental *sec6-4Δdrs2Δdnf3* era sensible a miltefosina (Fig.

R-34A), mientras que las células transformadas con la construcción *LiABCG4/pYEX* demostraron ser ligeramente más resistentes a este fármaco.

Además, se estudió el efecto de la expresión de *LiABCG4* en la cepa de *S. cerevisiae* AD18, en relación con la sensibilidad a alquil-fosfolípidos. La cepa AD18 tiene siete transportadores ABC deletionados, y era sensible a miltefosina y perifosina (Fig.R-33B). El fenotipo de resistencia conferido por *LiABCG4* fue similar al de la cepa parental US50-18C, que tiene altos niveles de expresión de los transportadores ABC de levaduras *Pdr5p*, *Snq2p* y *Yor1p*. Estos datos corroborarían el hecho de que *LiABCG4* transporte análogos de fosfolípidos.

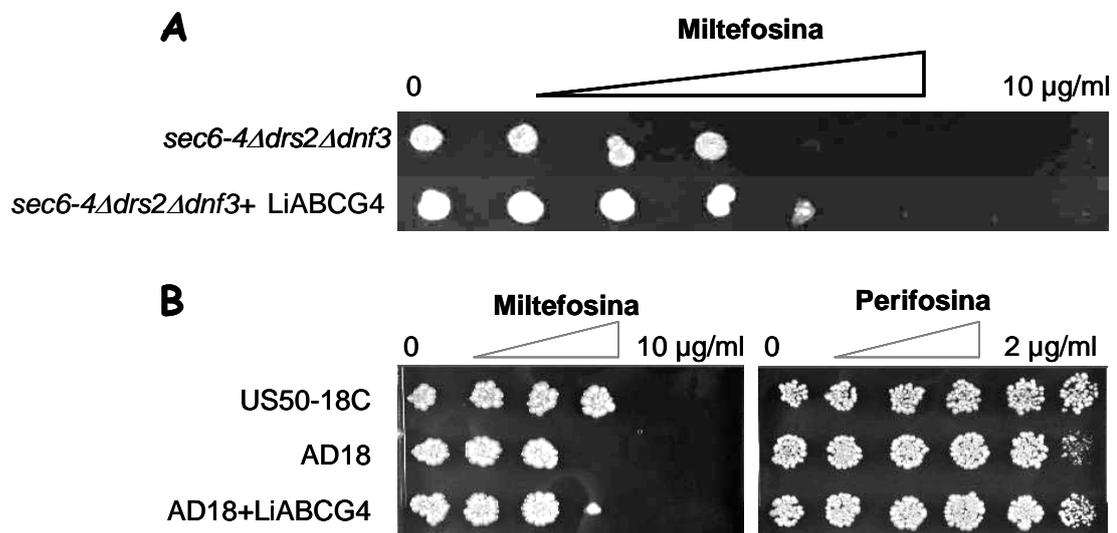


Figura R-34. Sensibilidad a alquil-fosfolípidos en levaduras que sobreexpresan *LiABCG4*. Las cepas *sec6-4Δdrs2Δdnf3* (**A**), US50-18C y AD18 (**B**) se transformaron con el vector vacío o con la construcción *LiABCG4/pYEX*. Se crecieron en placas con un gradiente creciente de miltefosina o perifosina en el medio de selección y 50 µM CuSO₄. Las placas se incubaron 3 días a 30 °C. Se muestra un resultado representativo de tres ensayos independientes.

RESULTADOS II: LiABCG6

8. LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA LiABCG6.

8.1. Obtención de parásitos que sobreexpresan LiABCG6 fusionada a GFP.

Para el estudio de la proteína LiABCG6 nos centramos, en primer lugar, en su localización subcelular. Puesto que carecíamos de un anticuerpo específico que reconociera la proteína mediante inmunofluorescencia indirecta, creamos quimeras de LiABCG6 fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP). Para ello empleamos los vectores pXG-GFP+2 y pGEM-T, que nos permitían obtener la proteína LiABCG6 fusionada a GFP en el extremo amino y carboxilo, respectivamente (Ha *et al.*, 1996).

Para sobreexpresar LiABCG6 fusionada a GFP en el extremo amino, se amplificó mediante PCR el marco abierto de lectura de *LiABCG6* empleando los oligos LiABCG6gfp-N5' y LiABCG6gfp-N3' (Materiales y Métodos), que añaden sitios de corte para *Bgl*II y *Not*I. El fragmento obtenido, previo subclonaje en pGEM-T, se liberó por digestión y se clonó en el vector pXG-GFP+2, obteniéndose la construcción *GFP-LiABCG6* (Fig. R-35).

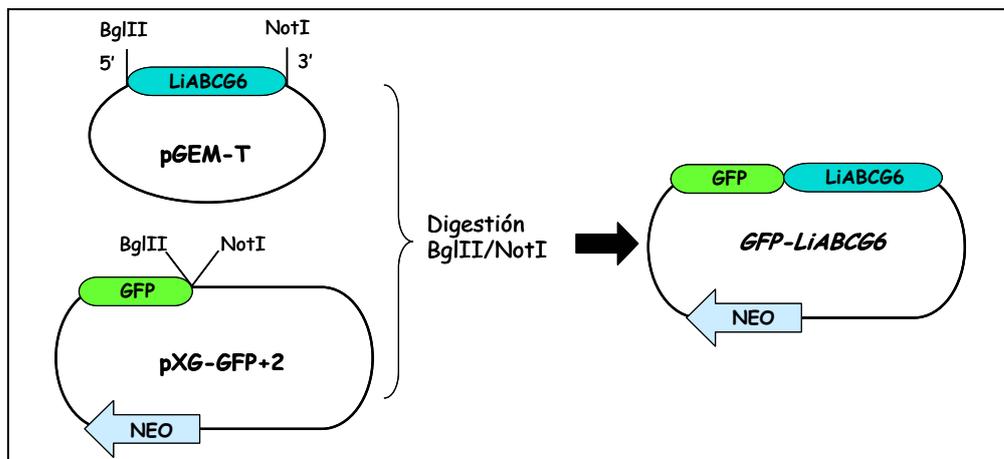


Figura R-35. Clonaje del gen *LiABCG6* en el vector de expresión para *Leishmania* pXG-GFP+2. La secuencia codificante de *LiABCG6* (turquesa) se clonó en el vector pXG-GFP+2 que incorpora la secuencia de GFP (verde), obteniéndose la construcción *GFP-LiABCG6*.

Para sobreexpresar la proteína fusionada a GFP en el extremo carboxilo, se amplificó el marco abierto de lectura de *LiABCG6* (sin codón de STOP) mediante PCR. Para ello se emplearon los oligos LiABCG6gfp-C5' y LiABCG6gfp-C3' (Materiales y Métodos), que añaden sitios de corte para *Bgl*II y *Sma*I. El producto de PCR, previo subclonaje en pGEM-T, se clonó en el vector pXG-'GFP+', obteniéndose la construcción *LiABCG6-GFP* (Fig. R-36).

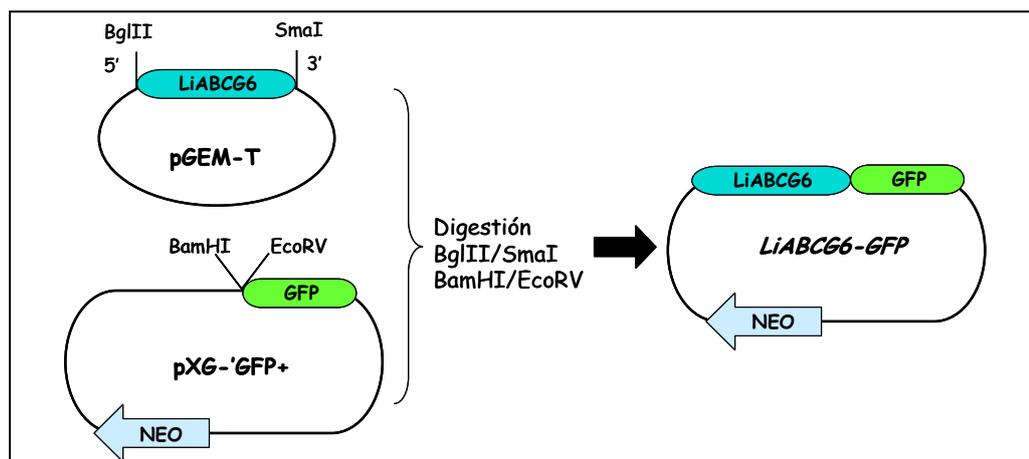


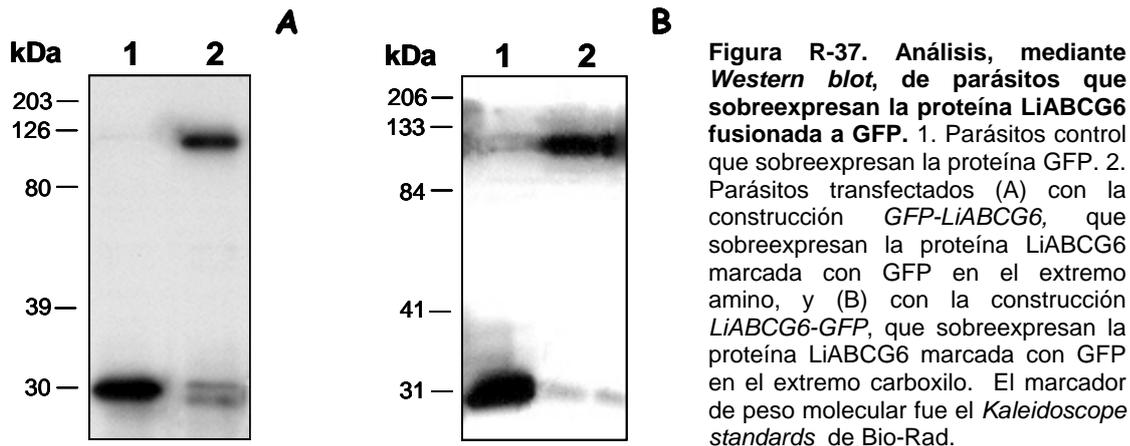
Figura R-36. Clonaje del gen *LiABCG6* en el vector de expresión para *Leishmania* pXG-'GFP+'. La secuencia codificante de *LiABCG6* (turquesa) se clonó en el vector pXG-'GFP+' que incorpora la secuencia de GFP (verde), obteniéndose la construcción *LiABCG6-GFP*.

La corrección y exactitud de ambas construcciones se comprobó mediante patrones de restricción, así como por secuenciación. Las formas promastigotas de *L. infantum* se transfectaron con las construcciones anteriores, así como con el vector pXG-GFP+ que produce la proteína GFP y que se utilizó como control. Los transfectantes se seleccionaron hasta una concentración final de 100 µg/ml de G418 y, posteriormente, se llevó a cabo la detección de los transcritos y las proteínas mediante *Northern* y *Western blot*.

El análisis por *Northern blot*, utilizando una sonda específica frente a *LiABCG6* muestra la sobreexpresión de un transcrito de aproximadamente 2,5 kb, que corresponde a los marcos abiertos de lectura de *LiABCG6* junto con *GFP*, en los parásitos transfectados con la construcción *GFP-LiABCG6* (Fig. R-40).

La expresión de la proteína *LiABCG6* fusionada a GFP se analizó mediante *Western blot*, incubando las membranas con el anticuerpo policlonal anti-GFP diluido 1/7.500.

Posteriormente, se utilizó un segundo anticuerpo anti-IgG conjugado con peroxidasa y se reveló con el sustrato ECL™ plus. Podemos observar una banda del tamaño esperado (unos 103 kDa) correspondiente a la proteína LiABCG6 fusionada a GFP (Fig. R-37). Como control se utilizaron parásitos que sobreexpresan la proteína GFP (30kDa).



8.2. Localización de la proteína LiABCG6 en *L. infantum*.

Los estudios de localización de LiABCG6 se realizaron sobre formas promastigotas transfectadas con las construcciones *GFP-LiABCG6* y *LiABCG6-GFP* mediante microscopía de fluorescencia. La observación de las muestras al microscopio óptico de fluorescencia determinó una diferente localización de la proteína en función del extremo al que estuviera fusionada la GFP (Fig. R-38).

En el caso de los parásitos transfectados con *GFP-LiABCG6*, la proteína se localiza principalmente en la MP de los parásitos. Esta localización se corroboró creando “fantasmas” celulares como se describió en el apartado 5.2; la observación de estos “fantasmas” mediante microscopía de fluorescencia confirmó la localización de la proteína en la MP (Fig. R-38).

En el caso de los parásitos transfectados con *LiABCG6-GFP*, la proteína se localiza exclusivamente en el MVT, considerado como un compartimento lisosomal tardío (Mullin *et al.*, 2001) (Fig. R-38).

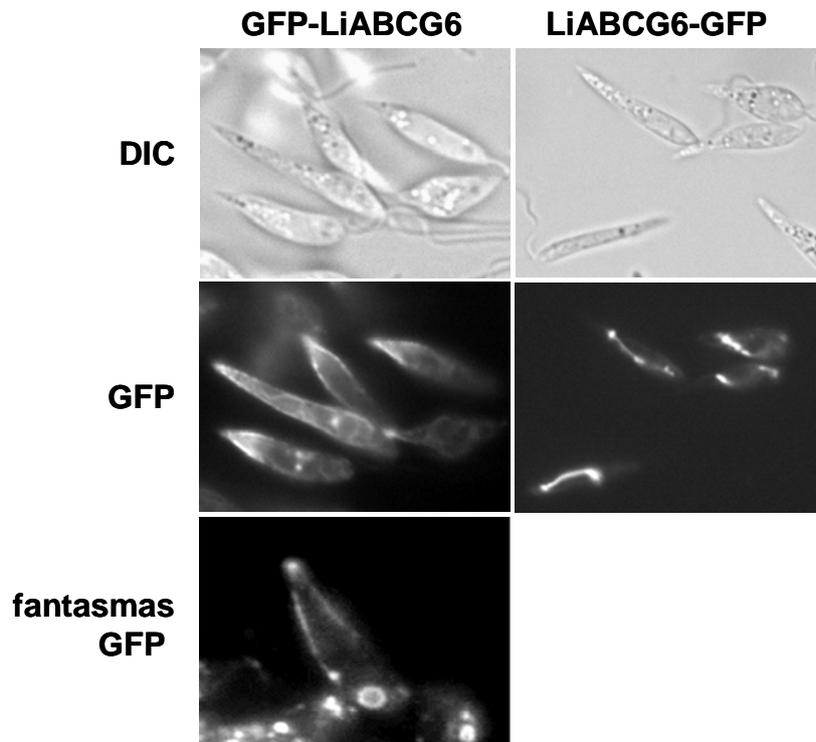


Figura R-38. Análisis de la localización de LiABC6 mediante microscopía de fluorescencia. Imágenes de microscopía de formas promastigotas de *L. infantum* que sobreexpresan la proteína LiABC6 fusionada a GFP en su extremo amino (GFP-LiABC6) o en su extremo carboxilo (LiABC6-GFP). Paneles superiores: imágenes de contraste diferencial de interferencia (DIC). Paneles centrales: la imagen izquierda muestra que la fluorescencia asociada a GFP se localiza predominantemente en la membrana plasmática; la imagen derecha muestra que la fluorescencia asociada a GFP se localiza en el MVT. Panel inferior: imagen de fluorescencia de "fantasmas" sin flagelo obtenidos por choque hipotónico; la fluorescencia asociada a GFP se localiza en la membrana plasmática.

9. OBTENCIÓN DE PARÁSITOS TRANSFECTADOS CON EL GEN *LiABC6*.

9.1. Clonaje en el vector de expresión.

Debido a las dificultades que presentó el clonaje del gen *LiABC6* en distintos vectores de expresión para *Leishmania*, se eligió una estrategia alternativa en la que aprovechamos la construcción *GFP-LiABC6* para obtener un vector que permitiera la sobreexpresión de *LiABC6* no fusionado. Los pasos a seguir fueron (Fig. R-39): 1) La construcción *GFP-LiABC6* se digirió con las enzimas *NcoI/BglII*, con lo que se eliminaba la secuencia correspondiente a GFP, pero también parte del gen NEO. 2) Al digerir el

vector pX con *NcoI*/*Bam*HI, extraíamos la secuencia necesaria para reponer el gen NEO. 3) La construcción resultante, *LiABCG6*-pXG2, contenía la secuencia codificante completa del gen *LiABCG6*, de 2007 pb, y nos permitiría sobreexpresar la proteína LiABCG6 sin fusión a GFP (Fig. R-39). Con esta construcción se transfectaron formas promastigotas de *L. infantum* y se llevó a cabo una selección con concentraciones crecientes de G418, hasta 100 µg/ml, a fin de sobreexpresar la proteína.

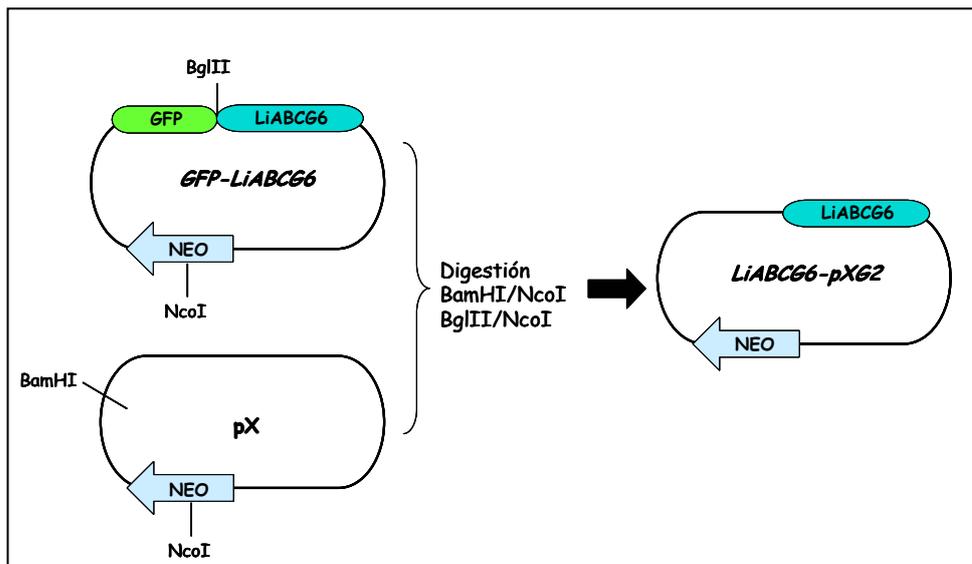


Figura R-39. Obtención del vector de expresión para *LiABCG6*. Se aprovechó la construcción *GFP-LiABCG6* y por eliminación de la secuencia para GFP, se obtuvo un vector que permitiera la sobreexpresión de la proteína LiABCG6.

9.2. Análisis de la expresión de *LiABCG6* en los parásitos transfectados mediante *Northern blot*.

La sobreexpresión de los transcritos correspondientes a *LiABCG6* se estudió mediante *Northern blot* (Fig. R-40) utilizando RNA total tanto de los parásitos transfectados con el gen como de su control de transfección en fase logarítmica de crecimiento. Se incluyó, como control positivo, el RNA de los parásitos transfectados con la construcción *GFP-LiABCG6*. Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de agarosa-formaldehído, se transfirieron a membranas de nylon y se hibridaron con la sonda específica para *LiABCG6*. Se observó una banda del tamaño esperado (2,7 kb) en el carril de los parásitos transfectados con la construcción *GFP-LiABCG6*. En el caso del

RNA de los parásitos transfectados con la construcción *LiABCG6*-pXG2, aparecen dos transcritos con un tamaño superior al esperado. La expresión es mayor en el caso de los transfectantes con *GFP-LiABCG6*.

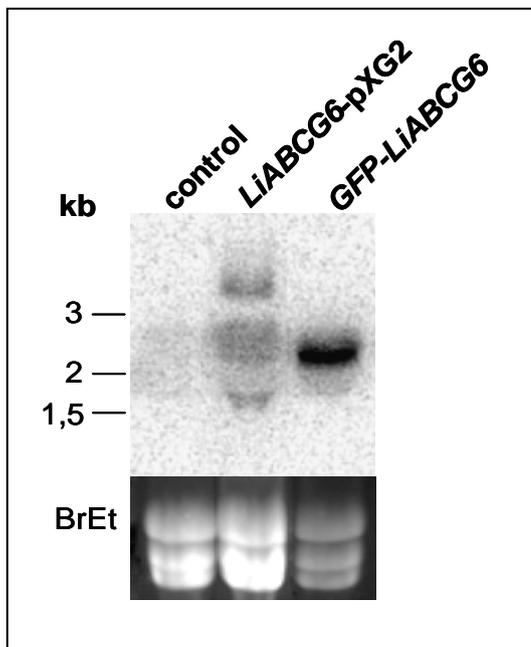


Figura R-40. Sobreexpresión del gen *LiABCG6* en los parásitos transfectados. Northern blot con RNA total procedente de los parásitos transfectados. Tras la electroforesis y la transferencia a membranas de nylon, el RNA se hibridó con la sonda específica para *LiABCG6*, obtenida mediante digestión de *LiABCG6*-pGEMT con *HindIII/BglII*. En el primer carril se encuentra el RNA de los parásitos transfectados con el plásmido control; en el segundo carril, el RNA de los parásitos transfectados con el plásmido *LiABCG6*-pXG2. Finalmente, en el tercer carril se encuentra el RNA de los parásitos transfectados con *GFP-LiABCG6*. En el panel inferior se muestra el gel de RNA teñido con bromuro de etidio. Como marcador de peso molecular se utilizó el *RNA ladder* de Invitrogen.

10. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA *LiABCG6*.

10.1. Caracterización en *L. infantum*.

10.1.1. Estudios de internalización de análogos de fosfolípidos.

Con el fin de estudiar la posible implicación de *LiABCG6* en el transporte de lípidos, estudiamos la incorporación e internalización de análogos fluorescentes de fosfolípidos en los parásitos control y transfectados con el gen *LiABCG6*, según se describió en el apartado 6.1.

Resultados

En la figura R-41 puede observarse que la acumulación de análogos de SM no presentó diferencias entre los parásitos control (histograma gris) y los parásitos transfectados con el gen *LiABCG6* (histograma sin relleno). En el caso de la acumulación de los análogos de PC, PE y PS, la acumulación de los parásitos transfectados con el gen *LiABCG6* era significativamente menor que la de los parásitos control. Los niveles de fluorescencia relativa entre parásitos control y transfectados con *LiABCG6* fueron de $1,80 \pm 0,09$ para C₆-NBD-PC; $1,58 \pm 0,19$ para C₆-NBD-PE; $1,42 \pm 0,02$ para C₆-NBD-PS; y $0,98 \pm 0,03$ para C₆-NBD-SM, $n=4$ $p < 0,005$.

Igualmente, se realizaron ensayos de acumulación del marcador de endocitosis FM4-64, sin que se observaran diferencias entre los parásitos control y los que sobreexpresan *LiABCG6*.

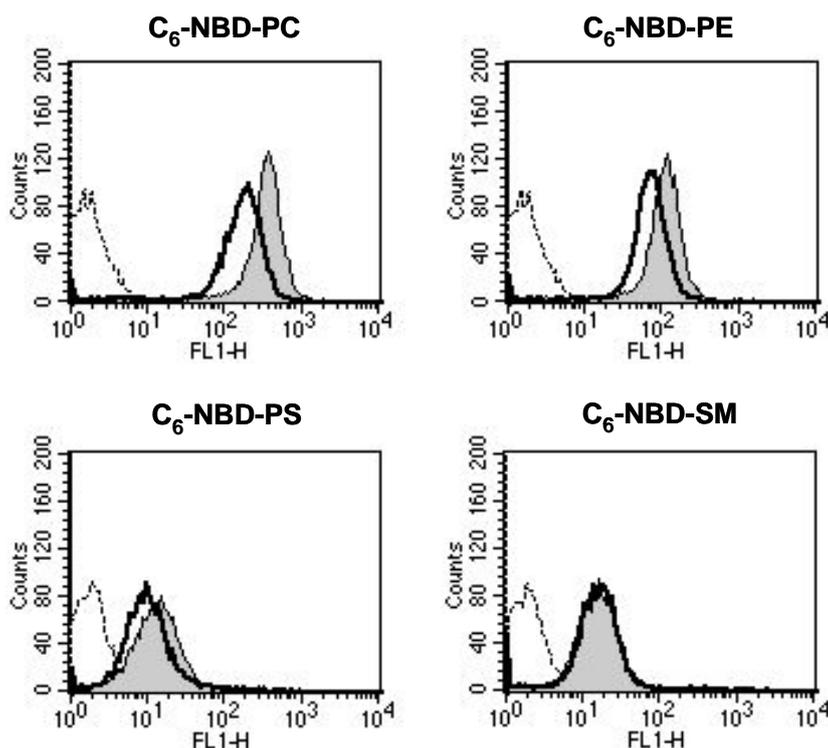


Figura R-41. Acumulación de análogos de fosfolípidos en parásitos que sobreexpresan *LiABCG6*. Tras un período de acumulación de los análogos fluorescentes de fosfolípidos a 28 °C, se analizó la fluorescencia mediante citometría de flujo en un FACScan (Beckton-Dickinson). Se muestran los histogramas de acumulación de los parásitos transfectados con el plásmido control (gris); parásitos transfectados con *LiABCG6* (histograma sin colorear); parásitos sin marcar (histograma discontinuo). Histogramas representativos de 4 experimentos independientes.

10.1.2. Ensayos de resistencia a fármacos.

Para comprobar si la sobreexpresión de LiABCG6 confiere resistencia frente a la acción de determinados fármacos, como se ha descrito para algunos transportadores ABC en *Leishmania*, se realizaron estudios de viabilidad celular en presencia de diferentes compuestos. Estos ensayos nos permitieron determinar los valores de IC₅₀ que tienen los parásitos transfectados con respecto a sus controles para cada uno de los compuestos empleados.

Los compuestos analizados fueron, al igual que en el caso de LiABCG4, análogos de fosfolípidos con acción leishmanicida, como la miltefosina, edelfosina y perifosina, azoles como el ketoconazol, y la 8-aminoquinoleína sitamaquina.

La funcionalidad de la proteína LiABCG6 fusionada a GFP se comprobó mediante estos ensayos de viabilidad, empleando los fármacos frente a los que había diferencias más significativas (miltefosina, edelfosina y perifosina). En el caso de la proteína LiABCG6 marcada con GFP en el extremo carboxilo, no se apreciaron diferencias en los niveles de sensibilidad con respecto al control de transfección. Para los parásitos que sobreexpresan LiABCG6 marcada con GFP en el extremo amino, los valores de IC₅₀ fueron similares a los de aquellos que sobreexpresan LiABCG6 sin marcar (Tabla R-3). Estos resultados nos permiten deducir que, al igual que sucedía con la proteína LiABCG4, el marcaje en el extremo amino no interfiere con la funcionalidad; del mismo modo, el marcaje en el extremo carboxilo inactiva la funcionalidad de la proteína, mientras que, en el caso de LiABCG6, altera además su correcta localización.

	CONTROL	LiABCG6	LiABCG6-GFP	GFP-LiABCG6	IR
MILTEFOSINA	6,0 ± 0,7	12,9 ± 1,5	5,6 ± 0,6	13,6 ± 1,2	2,2*
EDELFOFINA	4,8 ± 0,6	11,3 ± 0,2	4,8 ± 0,9	12,9 ± 0,5	2,4*
PERIFOSINA	3,8 ± 0,6	11 ± 1	4,2 ± 0,2	12,2 ± 0,7	2,8*
SITAMAQUINA	7,4 ± 0,6	14,4 ± 0,8	N/D	N/D	1,9*
KETOCONAZOL	20,4 ± 0,9	21,3 ± 1,1	N/D	N/D	1

Tabla R-3. Estudio de resistencia a fármacos en parásitos transfectados con LiABCG6. Los parásitos se cultivaron durante 72 h en presencia de distintas concentraciones de los compuestos según lo descrito en "Materiales y Métodos". La IC₅₀ se determinó calculando la concentración de cada compuesto (μM) que inhibe en un 50% el crecimiento de los parásitos. Se presentan las medias obtenidas de seis experimentos realizados por duplicado con las desviaciones estándar correspondientes. Las diferencias significativas con los parásitos control se calcularon mediante el test de la *t* de Student, **p*<0,001. El Índice de Resistencia (IR) se calculó dividiendo la IC₅₀ de los parásitos que sobreexpresan LiABCG6 entre la de sus controles de transfección.

10.1.3. Ensayos de acumulación de miltefosina radiactiva.

Para corroborar el hecho de que LiABCG6 pudiera tener a los análogos de alquil-fosfolípidos como posibles sustratos, se midió la acumulación intracelular de miltefosina. Al medio de cultivo se le adicionó [^{14}C]miltefosina, y se incubaron los parásitos a 28 °C. Al cabo de 30 min, se centrifugaron las células, se lavaron con PBS/BSA para eliminar la miltefosina de la membrana y se midió la radioactividad asociada. Los parásitos que sobreexpresan LiABCG6 acumulan un 75% de la radioactividad total acumulada por los parásitos control (Fig. R-42).

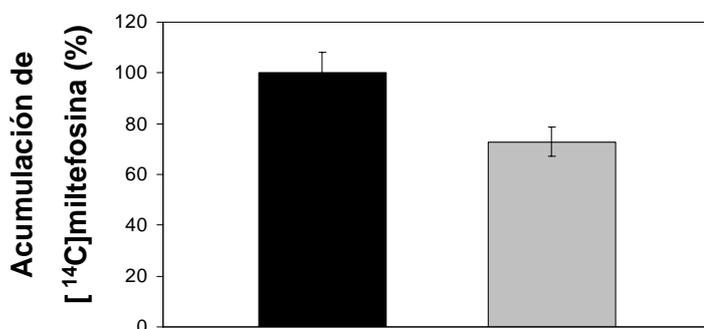


Figura R-42. Acumulación de [^{14}C]miltefosina en parásitos que sobreexpresan LiABCG6. Los parásitos control (negro) y los que sobreexpresan LiABCG6 (gris) se incubaron con [^{14}C]miltefosina a 28 °C como se ha descrito en Materiales y Métodos. Al cabo de 30 min, los parásitos se mantuvieron en hielo y se lavaron en PBS frío con 10 mg ml $^{-1}$ de BSA. La radioactividad asociada a las células se cuantificó y se normalizó según la concentración de proteínas. Los datos están expresados como el porcentaje de la cantidad inicial de [^{14}C]miltefosina incorporada y representan la media junto con la desviación estándar de cuatro experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado. La significancia de las diferencias con los parásitos control se determinó mediante el test de la *t* de Student * $p < 0.01$.

10.2. Expresión heteróloga del gen *LiABCG6* en levaduras.

10.2.1. Clonaje en el vector de expresión.

Para la expresión heteróloga en levaduras, el gen *LiABCG6* se clonó en el vector multicopia pYEXTF-HC (Holz *et al.*, 2002), descrito en el apartado 7.1.

Para el clonaje, la secuencia correspondiente al gen *LiABCG6* se amplificó sin los codones de inicio y STOP, usando los oligos LiABCG6y2-5' y LiABCG6y2-3' (Materiales y Métodos), que añaden sitios de corte para *Bgl*II y *Not*I, respectivamente. El fragmento

obtenido, previo subclonaje en pGEM-T, se liberó por digestión y se clonó en el vector pYEXTF-HC. La construcción resultante, denominada *LiABCG6*-pYEX, se empleó para transformar levaduras (Fig. R-43)

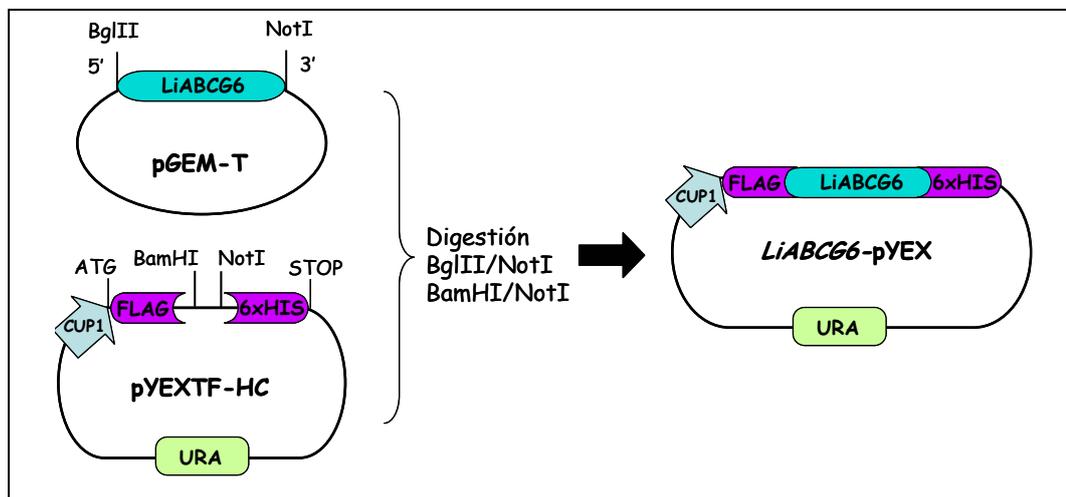


Figura R-43. Clonaje del gen *LiABCG6* en el vector de expresión de levaduras pYEXTF-HC. La secuencia codificante de *LiABCG6* (turquesa) se clonó en el vector pYEXTF-HC, que incorpora un promotor inducible (celestre) así como la secuencia correspondiente al epítipo FLAG y una cola de 6 histidinas (morado).

10.2.2. Expresión y localización de *LiABCG6*.

La cepa elegida para expresar *LiABCG6* fue la AD18, a la cual le han sido deletados siete transportadores ABC. Esta cepa se transformó con la construcción *LiABCG6*-pYEX o con el vector vacío, y la expresión de *LiABCG6* se comprobó mediante *Western blot*. Las células se crecieron hasta una DO_{600} de 0,2 y, posteriormente, se indujo la expresión de la proteína por adición de $CuSO_4$ 100 μM durante 4 horas. Las células se lisaron y el sobrenadante obtenido se corrió en un gel de proteínas al 10%, se transfirió a membranas de PVDF y se hibridó con un anticuerpo anti-FLAG diluido 1/5.000. Se empleó un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, lo que nos permitía revelar con el sustrato ECL™ plus. En las muestras inducidas con $CuSO_4$, se obtenía una banda de unos 75 kDa, correspondiente a la proteína doblemente marcada. Esta banda no se observaba en las muestras que no habían sido inducidas, ni en aquellas correspondientes a células transformadas con el vector vacío (Fig. R-44)

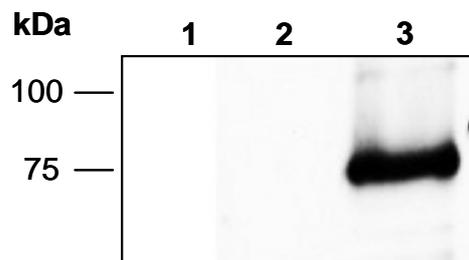


Figura R-44. Análisis, mediante Western blot, de la expresión de LiABCG6 en levaduras. *S.cerevisiae*, cepa AD18, transformada con el vector pYEXTF-HC (1); células transformadas con *LiABCG6*-pYEX sin inducir (2) e inducidas con CuSO_4 100 μM (3). Las células se crecieron en el medio de selección (-URA) a 27 °C. El *Western* se reveló con anticuerpo anti-Flag. A la izquierda se indica la posición de los marcadores (*Precision plus protein standards* de Bio-Rad).

Para los ensayos de localización, las levaduras se crecieron a 27 °C en presencia de 50 μM CuSO_4 para inducir el promotor CUP1, y se sometieron a fraccionamiento subcelular como se ha descrito en Materiales y Métodos. Las distintas fracciones obtenidas se analizaron mediante *Western blot*. El fraccionamiento de las membranas en gradiente de sacarosa reveló que LiABCG6 colocaliza con los marcadores específicos del Golgi tardío (Tgl2p) y MP (Sso2p), si bien existe cierta colocalización con el marcador específico de vacuola (Vac8p) (Fig. R-45).

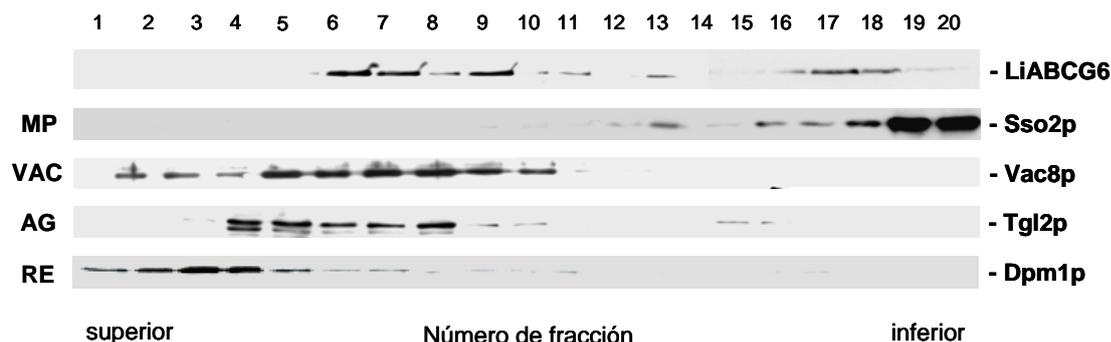


Figura R-45. Localización de LiABCG6 en *S.cerevisiae*. A partir de *S.cerevisiae* AD18, que sobreexpresa la proteína LiABCG6 doblemente marcada, se obtuvo, por ultracentrifugación a 100.000 g, un sedimento que se sometió a fraccionamiento subcelular en gradiente de sacarosa. Las distintas fracciones del gradiente se analizaron por *Western blot*, utilizando anticuerpos específicos frente a marcadores de los distintos orgánulos. Sso2p, marcador de membrana plasmática; Vac8p, marcador de vacuola; Tgl2p, marcador del aparato de Golgi tardío; Dpm1p, marcador del retículo endoplasmático. MP, membrana plasmática; VAC, vacuola; AG, aparato de Golgi; RE, retículo endoplasmático.

10.2.3. Sensibilidad a alquil-fosfolípidos en levaduras que sobreexpresan *LiABCG6*.

Se probó la sensibilidad a alquil-fosfolípidos (edelfosina y perifosina) de las levaduras transformadas con *LiABCG6*-pYEX, comparadas con aquellas transformadas con el vector vacío pYEX. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de crecimiento en placa con un gradiente de fármaco. La cepa parental AD18 era sensible a edelfosina y perifosina (Fig. R-46), mientras que las células transformadas con la construcción *LiABCG6*-pYEX demostraron ser ligeramente más resistentes a este fármaco. Estos datos parecen corroborar el hecho de que *LiABCG6* transporta análogos de fosfolípidos.

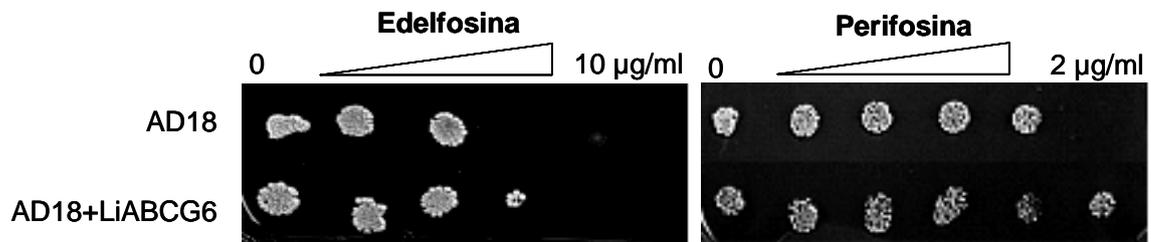


Figura R-46. Sensibilidad a alquil-fosfolípidos en levaduras que sobreexpresan *LiABCG6*. La cepa AD18 se transformó con el vector vacío o con la construcción *LiABCG6*-pYEX. Se crecieron en placas con un gradiente de edelfosina o perifosina en el medio de selección y 50 µM CuSO₄. Las placas se incubaron 3 días a 30 °C. Se muestra un resultado representativo de tres ensayos independientes.

DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

1. SITUACIÓN ACTUAL DE LA LEISHMANIASIS.

Según la Organización Mundial de la Salud, la leishmaniasis es la segunda enfermedad parasitaria en importancia, por detrás únicamente de la malaria, con un total de 350 millones de personas en riesgo de padecer la enfermedad. Su prevalencia mundial es de unos 12 millones de casos. Los datos referentes a la incidencia y prevalencia de la enfermedad son escasos, puesto que sólo 33 de los países en los que la enfermedad es endémica proporcionan notificación oficial de la infección.

Existe un aumento preocupante del número de casos en varias áreas del mundo, como sucede con la leishmaniasis cutánea en Brasil, Kabul (Afganistán) y Aleppo (Siria). Este aumento está relacionado con el **desarrollo económico**, así como con **cambios medioambientales** y de comportamiento que aumentan la exposición a los mosquitos vectores: nuevos asentamientos, deforestación, migración masiva de las zonas rurales a las urbanas, urbanización rápida y con falta de planificación, construcción de nuevos embalses, nuevos planes de riego, etc. Más recientemente, la leishmaniasis se ha convertido en una infección oportunista en personas con **HIV**, y cada vez es mayor el número de casos de **coinfección**. Factores de riesgo individual, como la malnutrición y un sistema inmune deprimido, son de gran importancia en el desarrollo de esta enfermedad parasitaria (Cattand, 2006).

La leishmaniasis continúa, por lo tanto, siendo una **enfermedad desatendida, embebida en la pobreza**, y sus víctimas se encuentran entre los más pobres del planeta. En la India, país que posee una alta tasa de leishmaniasis, el 88% de los pacientes tienen una renta diaria inferior a los \$2, un ambiente socio-económico y un nivel educacional bajos y suelen vivir en áreas rurales remotas o en suburbios pobres.

La pobreza está asociada con una nutrición deficiente y otras enfermedades infecciosas que aumentan el riesgo de que una persona, una vez infectada, desarrolle las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis. La falta de acceso a la asistencia sanitaria produce retrasos en un diagnóstico apropiado, así como en el tratamiento, y un aumento en la mortalidad y morbilidad, especialmente en las mujeres. El diagnóstico de

la leishmaniasis y el tratamiento son extremadamente caros, y las familias se ven obligadas a vender sus pertenencias y pedir préstamos para poder pagar el tratamiento, lo que lleva a un mayor empobrecimiento que refuerza el **círculo vicioso enfermedad-pobreza**. Las inversiones públicas en el tratamiento y control de la enfermedad disminuirían la carga total de la leishmaniasis y ayudarían a aliviar la pobreza (Alvar *et al.*, 2006b).

Todo lo anterior supone un alto impacto humano, social y económico por lo que su control supone un gran reto para la comunidad científica y la salud pública internacional (http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_parasitic/en/index3.html).

Hasta el momento no existen vacunas efectivas frente a las diferentes manifestaciones de la leishmaniasis. El **control de la enfermedad** se ve dificultado, en primer lugar, por factores medioambientales que aumentan el riesgo de padecerla. Por otra parte, las medidas de control del insecto vector o de los reservorios (insecticidas, mosquiteras empañadas en insecticida) serían útiles, pero no pueden aplicarse sobre todos los grupos epidemiológicos y requieren tanto infraestructuras como una vigilancia que no están al alcance de muchos de los países endémicos. En cuanto a la **quimioterapia**, junto a los antimoniales pentavalentes, cada vez menos recomendados por su falta de eficacia y efectos secundarios, existen una serie de fármacos más eficaces como la anfotericina B liposomal o la miltefosina que, junto con otros fármacos como la paromomicina y la sitamaquina (en fase clínica II) constituyen la única herramienta de lucha frente a esta enfermedad parasitaria. Sin embargo, el coste de algunos de los fármacos actuales limita su empleo en muchas zonas endémicas, por lo que se requieren estrategias y acuerdos para reducir el coste del tratamiento. Como problema añadido, el uso irregular de ciertos fármacos junto con tratamientos incompletos no hacen sino incrementar la tolerancia de los parásitos a los fármacos (Singh *et al.*, 2006).

El mayor problema que presentan los fármacos usados frente a la leishmaniasis es la creciente aparición de fallo terapéutico, sobre todo frente a los antimoniales pentavalentes, debido a factores/mecanismos tanto del parásito como del hospedador. El caso más alarmante de fallo terapéutico aparece en la región de Bihar (India), donde aproximadamente el 60% de los casos de leishmaniasis visceral no responden al tratamiento con antimoniales (Sundar, 2001). En ocasiones, este fallo terapéutico se debe a la adquisición, por parte del parásito, de mecanismos de resistencias que

disminuyen la eficacia del tratamiento terapéutico. Estas resistencias se han observado experimentalmente incluso para la miltefosina, primer fármaco activo por vía oral frente a la leishmaniasis visceral (con una eficacia terapéutica del 96%) y recientemente comercializada en India bajo el nombre de Impávido®. Se ha demostrado experimentalmente que los transportadores pertenecientes a la familia ABC están implicados en fenómenos de resistencia a fármacos empleados en la quimioterapia contra la leishmaniasis (revisado por Ouellette *et al.*, 1998b; Ouellette *et al.*, 2004). Recientemente se ha relacionado al transportador ABC MRPA con la resistencia a antimoniales pentavalentes en aislados clínicos de pacientes de India con leishmaniasis visceral (Mittal *et al.*, 2007; Mukherjee *et al.*, 2007)

2. TRANSPORTADORES ABC EN *LEISHMANIA*.

Los transportadores ABC descritos hasta el momento en *Leishmania* forman parte de las subfamilias ABCA, ABCB y ABCC (revisado por Leprohon *et al.*, 2006; Pérez-Victoria *et al.*, 2001a). El primer grupo de transportadores ABC de *Leishmania* pertenece a la **subfamilia ABCA**, e incluye dos miembros, LtrABCA1.1 y LtrABCA2, ambos implicados en el tráfico de fosfolípidos. La función de LtrABCA1.1 está relacionada con la translocación de lípidos a través de la membrana plasmática de *L. tropica* (Parodi-Talice *et al.*, 2003), mientras que LtrABCA2 está implicado en el tráfico de fosfolípidos, lo que podría modificar el tráfico vesicular y la infectividad del parásito (Araújo-Santos *et al.*, 2005). Dentro de la **subfamilia ABCB** se incluyen proteínas que presentan una alta homología con la glicoproteína-P (Pgp) de mamíferos, que son los productos de los genes tipo *mdr1* descritos para varias especies como *L. donovani* (Henderson *et al.*, 1992), *lemdr1* de *L. enrietti* (Chow *et al.*, 1993), *lamdr1* de *L. amazonensis* (Gueiros-Filho *et al.*, 1995) y *ltrmdr1* de *L. tropica* (Chiquero *et al.*, 1998). Las proteínas codificadas por estos genes confieren un fenotipo MDR similar al observado en células tumorales de mamíferos, expulsando una gran variedad de fármacos al exterior celular, como lo hace la Pgp de mamíferos, si bien se desconoce su función fisiológica. En el caso de la LtrMDR1 de una cepa de *L. tropica* resistente a daunomicina, la proteína confiere resistencia a miltefosina y edelfosina, debido a un incremento en el eflujo de los

fármacos (Pérez-Victoria *et al.*, 2006c). El tercer grupo de transportadores ABC conocidos en *Leishmania*, la **subfamilia ABCC**, también está implicado en la resistencia a fármacos. El miembro más estudiado es el que codifica para la PGPA (MRPA), una proteína estrechamente relacionada con MRP1 de mamíferos y que confiere resistencia a arsenito y antimoniales mediante translocación de estos compuestos conjugados a tripanotión al interior de una vacuola (Ouellette *et al.*, 1998a).

En el genoma de *Leishmania* existen secuencias que codifican para proteínas ABC aún no caracterizadas, y puesto que esta familia de proteínas se encuentra muy conservada a lo largo de la escala evolutiva, cabía esperar que se identificaran otras proteínas ABC en *Leishmania* similares a las ya descritas en otros eucariotas. Teniendo en cuenta lo anterior, este trabajo se ha centrado en la caracterización de dos miembros de la **subfamilia ABCG** de transportadores ABC de *Leishmania* cuyos homólogos en mamíferos están siendo ampliamente estudiados debido a que se les ha relacionado con procesos biológicos de gran importancia. Así, la proteína **ABCG1** funciona como homodímero o heterodímero (probablemente con ABCG4) y está implicada en el transporte de colesterol a las lipoproteínas de alta densidad (Klucken *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004). **ABCG5** y **ABCG8**, que tienen altos niveles de expresión en las células epiteliales del intestino y actúan como un heterodímero (Graf *et al.*, 2003), están relacionadas con el transporte de esteroides de plantas y colesterol hacia la bilis (Langheim *et al.*, 2005). Niveles altos de **ABCG2** en varias líneas de células cancerígenas producen resistencia a fármacos antitumorales (Ross *et al.*, 1999). Se ha barajado la posibilidad de que los lípidos endógenos y derivados lipídicos puedan ser los sustratos naturales de ABCG2 (revisado por Sarkadi *et al.*, 2004). Recientemente se ha identificado un transportador tipo ABCG en *Arabidopsis*, implicado en la secreción de cera a la cutícula (Pighin *et al.*, 2004). La implicación de los miembros de la subfamilia ABCG en el transporte lipídico nos hizo pensar que estos nuevos transportadores tipo ABCG de *Leishmania* podrían conferir resistencia a fármacos de naturaleza lipídica, o bien actuar determinando la distribución de los lípidos de la membrana plasmática del parásito.

Por otra parte, las proteínas ABCG habían sido descritas hasta ahora sólo en organismos eucariotas superiores. En *S. cerevisiae* existe una proteína ADP1, que, tanto por topología como por similitud de secuencia, es candidata a ser proteína tipo ABCG. La presencia de secuencias ABCG en los protozoos parásitos *Leishmania* y

Trypanosoma, demuestra que esta subfamilia está más extendida y conservada en la escala evolutiva de lo que se había pronosticado hasta el momento, por lo que cabe esperar que, en breve, se describan nuevos miembros.

Recientemente se ha publicado una clasificación completa de las proteínas ABC en *Leishmania*, en la que se estima que existe un total de 42 proteínas ABC pertenecientes a todas las subfamilias conocidas, lo que supone un número considerablemente elevado si se compara con otros tripanosomátidos, como *T. cruzi* y *T. brucei*, cuyo genoma codifica 28 y 22 proteínas ABCs, respectivamente (Leprohon *et al.*, 2006). Esta variación en el número de genes ABCs entre los tres organismos parece ser debida a la expansión de los genes ABCA, ABCC y ABCG, muchos de los cuales procederían de la duplicación génica producida en *Leishmania* tras la separación de la línea de *Trypanosoma*, así como a la pérdida de algunos genes ABC en *T. brucei*, al tener lugar eventos de especiación dentro de los tripanosomátidos.

2.1. Caracterización molecular de la subfamilia ABCG de *L. infantum*.

Los posibles miembros de la subfamilia ABCG en *Leishmania* se identificaron en la base de datos del proyecto genoma de *Leishmania* usando el servidor GeneDB omniBLAST frente al gen ABCG2 humano (<http://www.genedb.org/genedb/linfantum/>). Se encontraron tres genes localizados en los cromosomas 15, 23 y 36, y dos genes repetidos en tándem en el cromosoma 6 (Fig. R-4). En este trabajo nos centramos en la caracterización de los genes tipo ABCG situados en los cromosomas 15 y 36, a los que denominamos *LiABCG4* y *LiABCG6*, de acuerdo con la nomenclatura sugerida por Leprohon *et al.* (2006). En el cromosoma 6 se localizan dos genes muy cercanos y repetidos en tándem, existiendo la divergencia de secuencia en los extremos amino y carboxilo de la proteína. En el mismo cromosoma, aparece otra secuencia de menor longitud y con menor identidad con las dos anteriores, que carece de la secuencia correspondiente al NBS, por lo que podría tratarse de un pseudogén. A diferencia con el resto de los otros genes ABCG, el gen localizado en el cromosoma 23 presenta un dominio transmembrana adicional en el extremo amino terminal no descrito en ningún otro organismo. Los miembros de otras familias génicas ABC de *Leishmania* también se

localizan en diferentes cromosomas. Como ejemplo, los genes de la subfamilia ABCC que se localizan en los cromosomas 23 y 33 del parásito (Legare *et al.*, 1994), y los genes de la subfamilia ABCA, que se localizan en los cromosomas 27, 15, 11 y 2 (Parodi-Talice *et al.*, 2003; revisado por Leprohon *et al.*, 2006)

El análisis comparativo de las secuencias de los genes *LiABCG4* y *LiABCG6* con bases de datos de secuencias de ácidos nucleicos mostró que las mayores significancias de alineamiento fueron para los genes ABCG ya identificados, tanto de humanos, como de *Drosophila*.

El análisis de *Southern blots* de digestiones de DNA genómico de *L. infantum* y posterior hibridación con las sondas específicas para *LiABCG4* y *LiABCG6*, permitió corroborar que, en el genoma de *L. infantum*, sólo existe **una copia genómica** de éstos, como cabría esperar tras el análisis realizado del proyecto genoma de *Leishmania*. En otros transportadores ABC de *Leishmania*, como es el caso de *LtrABC1* en *L. tropica*, los genes aparecen duplicados en tándem. La duplicación génica es un fenómeno frecuente en parásitos como *Leishmania*, en los que existen muchos ejemplos de familias de genes con múltiples copias. En muchos organismos, la repetición en tándem de un gen puede reflejar la necesidad de grandes cantidades de su producto, lo que no parece ser el caso de *LiABCG4* ni *LiABCG6*.

Cabe destacar que la identidad a nivel de secuencia entre los distintos miembros de la subfamilia ABCG, es inferior a lo descrito para otras subfamilias de transportadores ABC. Las secuencias correspondientes a los NBS son las que presentan mayor homología entre los genes ABC y las sondas diseñadas frente a ese dominio suelen reconocer a los miembros de una misma subfamilia. De hecho, se ha descrito que este tipo de sondas reconocen en *Leishmania* a los miembros de las subfamilias ABCA y ABCC (Parodi-Talice *et al.*, 2003); sin embargo, las sondas dirigidas frente a los NBS tanto de *LiABCG4* como *LiABCG6* únicamente reconocen el gen frente al que han sido diseñadas.

2.2. Análisis de la secuencia aminoacídica de LiABCG4 y LiABCG6.

La secuenciación completa de los genes *LiABCG4* y *LiABCG6* nos permitió deducir la secuencia de aminoácidos de las proteínas para las que codifican. Cuando realizamos estudios comparativos entre estas proteínas y las existentes en bases de datos, observamos que presentaban la mayor significancia de alineamiento con los miembros ya descritos de la subfamilia ABCG de transportadores ABC. Esta identidad nos hizo clasificar las proteínas LiABCG4 y LiABCG6 como miembros de la subfamilia ABCG de transportadores.

Las proteínas codificadas por *LiABCG4* y *LiABCG6* presentan todas las características típicas de un “half-transporter”, donde podemos encontrar un único dominio de unión a ATP hidrofílico (NBS), localizado en el extremo amino de la proteína, y un dominio de transmembrana hidrofóbico (TMD), situado en el extremo carboxilo (Fig. I-16). En la región hidrofílica se incluyen las zonas más conservadas de los transportadores ABC, como son los motivos Walker A y Walker B y el sello de la familia ABC. El tamaño de ambas proteínas es similar al de otras ABCGs de eucariotas superiores, si bien LiABCG4 presenta un extremo carboxilo ligeramente mayor, en el que no se han detectado secuencias o motivos conservados, ni homología con otros ABCGs. El **análisis de hidrofobicidad** de la secuencia de ambas nos permitió distinguir la presencia de 6 segmentos transmembrana, encontrándose el quinto segmento separado del sexto por un lazo extracelular de mayor tamaño que el resto, lo que es común para transportadores de la subfamilia ABCG (revisado por Lorkowski *et al.*, 2002).

En ambas proteínas también encontramos 9 residuos de **cisteína**; para LiABCG4 hay 5 cisteínas situadas en el NBS, 2 en la región de unión del NBS con TMD y otras dos en el último lazo extracelular del quinto transmembrana con el sexto transmembrana. Para el caso de LiABCG6 la distribución es similar, con 4 residuos de cisteína situados en el NBS, 2 en la región de unión del NBS con TMD, uno en el cuarto segmento transmembrana y 2 en el último lazo extracelular del quinto transmembrana con el sexto. Se podría sugerir la participación de esos residuos de cisteína en la formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares, al igual que se ha descrito para la proteína ABCG2 humana donde existen tres cisteínas extracitoplasmáticas, localizadas en el lazo entre el quinto y el sexto transmembrana. De esas tres cisteínas, una está implicada en la formación de un puente disulfuro intermolecular que no es esencial para la expresión

de la proteína ni su funcionalidad. Las otras dos cisteínas formarían puentes disulfuros intramoleculares que son críticos para el reconocimiento del sustrato. (Henriksen *et al.*, 2005a)

A lo largo de la secuencia aminoacídica de LiABCG4, utilizando la base de datos PROSITE, aparecen motivos característicos de modificaciones de proteínas, como pueden ser sitios de N-glicosilación en el NBS y sitios de fosforilación por proteína-quinasa C y caseína-quinasa II en posiciones cercanas al NBS y en el último lazo extracelular entre segmentos transmembrana. Igualmente, están presentes residuos para posible miristoilación y un sitio de unión de fosfopanteteína. En el caso de LiABCG6 aparecen: un sitio de N- glicosilación en el TMD, entre el cuarto y quinto segmento transmembrana; sitios de fosforilación por proteína-quinasa C y caseína quinasa II en el NBS, así como entre el primer lazo extracelular entre segmentos transmembrana; igualmente, aparecen residuos para una posible miristoilación.

La **N-glicosilación** es una modificación post-traducciona que se ha descrito en algunas proteínas ABC de mamíferos. En la Pgp se han descrito sitios de N-glicosilación en los bucles excitoplasmáticos, tanto extracelulares como luminales (Higgins, 1992). En la proteína MDR1 humana, la porción glicosilada representa 30 kDa del peso total de la proteína. La proteína ABCG2 humana está glicosilada, si bien este hecho no es esencial para la expresión, el tráfico a la membrana plasmática o su actividad de transporte (Diop y Hrycyna, 2005). Tanto ABCG5 como ABCG8 están glicosiladas en el lazo que une el quinto y sexto dominio transmembrana (Graf *et al.*, 2002). Por el contrario, la proteína ABCG1 humana no parece estar glicosilada (Kobayashi *et al.*, 2006). Sin embargo, no se ha descrito la existencia de sitios de N-glicosilación en las proteínas ABC tipo MRP y MDR que se conocen en *Leishmania*. En el caso de LiABCG4 y LiABCG6, ninguno de los sitios de N-glicosilación se encuentra en los bucles excitoplasmáticos; por otro lado, si los sitios identificados fueran realmente utilizados para la adición de cadenas de azúcar, dichas modificaciones post-traduccionales cambiarían la masa molecular de la proteína y, por tanto, su migración electroforética. Puesto que, en los resultados obtenidos en el presente trabajo, no se han detectado diferencias significativas entre el tamaño teórico de la proteína y el tamaño revelado en los estudios de *Western blot*, pensamos que esta modificación no ha tenido lugar para LiABCG4 o LiABCG6 de *Leishmania*.

Para algunas proteínas ABC se ha demostrado que la **fosforilación** puede regular su actividad. En el caso de Pgp, la región de unión entre las dos mitades de la proteína, o región *linker*, es potencialmente fosforilable y se ha visto que la fosforilación de esta región puede regular la interacción de ciertos fármacos con la proteína (Szabo *et al.*, 1997). Sin embargo, en otros estudios no se han extraído conclusiones claras sobre la implicación funcional de la fosforilación (Germann *et al.*, 1995). En el caso de la proteína ABCA1, se vio que es fosforilada *in vitro* por PKA, y que la activación de esta quinasa aumenta la actividad transportadora de aniones de ABCA1, lo que sugiere que sería fosforilada *in vivo* (Becq *et al.*, 1997). No se ha descrito fosforilación para el caso de las proteínas ABCG humanas. Sería interesante determinar si la fosforilación juega un papel en la regulación de la función de las proteínas LiABCG4 y LiABCG6, lo que se desconoce hasta ahora para todas las proteínas ABC descritas en *Leishmania*.

3. EXPRESIÓN DE LOS GENES *LiABCG4* Y *LiABCG6* EN *L. INFANTUM*.

3.1. Sobreexpresión de los genes *LiABCG4* y *LiABCG6*.

Para iniciar los estudios funcionales decidimos sobreexpresar las proteínas en un sistema homólogo, estrategia comúnmente empleada en estudios realizados sobre proteínas ABC en diversos organismos. Las formas promastigotas de *L. infantum* transfectadas con los genes *LiABCG4* y *LiABCG6* presentaban una sobreexpresión significativa de ambos genes. Los parásitos control (transfectados con el plásmido vacío) mostraban niveles bajos de expresión de estos genes. Estos niveles bajos de mRNA pueden deberse a una tasa de transcripción baja, o a una alta inestabilidad del mRNA. Cabe destacar que, para otros genes ABC de *Leishmania*, los niveles de expresión de sus transcritos son también bajos, y su detección es dificultosa cuando se emplean técnicas convencionales de *Northern blot* (Araújo-Santos *et al.*, 2005; Chiquero *et al.*, 1998; Gamarro *et al.*, 1994; Legare *et al.*, 1994; Parodi-Talice *et al.*, 2003).

Para el caso de *LiABCG4*, las construcciones plasmídicas con las que se transfectaron los parásitos contenían la secuencia correspondiente a *LiABCG4* o el gen

mutado en la posición 293 (mutación que produce el cambio de la lisina del Walker A por una metionina, lo que inactiva la actividad ATPasa de la proteína), flanqueados en 5' y 3' por secuencias UTRs. Se siguió esta estrategia puesto que se sabe que las regiones no codificantes naturales suelen determinar la eficiencia de la expresión y la estabilidad del mRNA en *Leishmania*. Un ejemplo está reflejado en los estudios previos realizados en nuestro laboratorio con otro gen ABC (Parodi-Talice *et al.*, 2003). Los parásitos transfectados tanto con el gen *LiABCG4* como con la versión mutada, presentaban dos transcritos específicos de diferente tamaño, lo que podría deberse a la existencia de distintos sitios de adición del mini-exón y poliadenilación. Los niveles de expresión de los parásitos transfectados con la versión mutada del gen son similares a los de aquellos transfectados con *LiABCG4*. En el caso de los parásitos transfectados con la construcción *GFP-LiABCG4*, aparece un transcrito de tamaño inferior a los obtenidos con la construcción que contiene las secuencias UTRs. Las diferencias de tamaño entre los transcritos de *LiABCG4-pX* y *GFP-LiABCG4* se deberían a la ausencia de las secuencias UTRs en la segunda construcción, así como a la presencia de sitios de *trans-splicing* en el vector pXG-GFP+2, flaqueando al gen en 5' y 3'.

Para sobreexpresar ***LiABCG6***, se partió de la construcción *GFP-LiABCG6* y posteriormente se eliminó la secuencia correspondiente a GFP. La construcción plasmídica resultante, con la que se transfectaron los parásitos, contenía la secuencia codificante del gen, desde el codón de inicio al de terminación. Los niveles de expresión son inferiores al compararlos con el gen fusionado a GFP, pero fueron suficientes para observar un fenotipo.

Estudios recientes realizados mediante *microarrays* de DNA, no han observado diferencias en los perfiles de expresión de estos genes ABCG entre las formas promastigotas y amastigotas de *Leishmania* (Leprohon *et al.*, 2006). Sin embargo, las tasas de expresión a nivel de proteínas entre los diferentes estadios del parásito no guardan siempre relación directa con las tasas de expresión a nivel de mRNA. Por lo tanto, quedaría por dilucidar los valores reales de expresión.

3.2. Localización de LiABCG4 y LiABCG6.

Para estudiar la localización de la proteína **LiABCG4** en *Leishmania*, en primer lugar se intentó obtener un anticuerpo policlonal frente a una región específica de la proteína. El alineamiento de las distintas proteínas ABCG encontradas nos permitió determinar que la mayor variabilidad de secuencia se encuentra en la zona que une el NBS con el TMD, el denominado péptido *linker* (Fig. R-6). Esta característica nos sirvió para diseñar un anticuerpo frente esta región específica de LiABCG4, con el que se llevaron a cabo estudios de inmunodetección e inmunolocalización. Por desgracia, si bien el anticuerpo reconocía el péptido frente al que se había generado, resultó inespecífico a la hora de detectar la proteína mediante inmunofluorescencia indirecta.

El siguiente paso para estudiar la localización de la proteína fue la creación de quimeras que nos permitieran tener la proteína fusionada a GFP en su extremo carboxilo o amino. La adición de GFP u otros péptidos puede alterar la localización de proteínas ABCG y su funcionalidad (Gelissen *et al.*, 2006; Graf *et al.*, 2002; Vaughan y Oram, 2005), por lo que se decidió obtener las dos quimeras, con GFP en uno u otro extremo. La observación, mediante microscopía de fluorescencia, de los parásitos transfectados con las construcciones *GFP-LiABCG4* y *LiABCG4-GFP*, nos permitió determinar que la proteína, en ambos casos, se localiza mayoritariamente en la membrana plasmática, y asociada al bolsillo flagelar. El bolsillo flagelar está considerado como el único sitio de endo y exocitosis de los parásitos, así como el principal punto de adición de proteínas a la membrana (revisado por Landfear e Ignatushchenko, 2001). La localización de la proteína en el bolsillo flagelar puede tratarse de una localización secundaria, o bien ser un reflejo del tráfico vesicular.

Estudios funcionales posteriores determinaron que la proteína LiABCG4-GFP no era funcional, si bien GFP-LiABCG4 mostraba un fenotipo similar al de la proteína salvaje.

Por otro lado, el cambio de una lisina a metionina en el Walker A altera no sólo la funcionalidad de la proteína, sino también su correcta localización. Como ya se había descrito anteriormente para la proteína ABCG2 humana, la presencia de un NBS funcional es necesaria para el tráfico de la proteína hacia la membrana plasmática (Henriksen *et al.*, 2005b). En el caso de ABCG1, también se describió que la presencia de un NBS funcional era necesaria para la localización de la proteína en la membrana, puesto que la mutación de una glicina esencial del Walker A impedía la llegada de la proteína a la membrana (Vaughan y Oram, 2005). Sin embargo, el cambio de la lisina del Walker A por metionina no altera la localización en la membrana de ABCG1, lo que

sugeriría que la unión de ATP y/o hidrólisis no es esencial para la expresión en la membrana plasmática (Kobayashi *et al.*, 2006). Recientemente se ha descrito que el cambio de la lisina del Walker A por leucina en cualquiera de los NBS de la proteína MRP1 altera de manera significativa la estructura terciaria de la proteína (Buyse *et al.*, 2006).

En el caso de **LiABCG6**, los parásitos transfectados con las construcciones *GFP-LiABCG6* y *LiABCG6-GFP* observados mediante microscopía de fluorescencia, mostraron diferencias respecto a la localización de la proteína. Mientras que la proteína marcada en el extremo amino se localiza principalmente en la membrana plasmática, la proteína marcada con GFP en el extremo carboxilo se localiza en la red de microtúbulos del parásito correspondiente al MVT, considerado como un compartimento lisosomal tardío (Mullin *et al.*, 2001). Se ha descrito que algunas proteínas de membrana de la ruta secretora de *Leishmania* son dirigidas al MVT y degradadas, en especial en parásitos en fase tardía de crecimiento (Dodge *et al.*, 2004). En nuestro caso, se realizó un seguimiento de los parásitos en las distintas fases de crecimiento y se determinó que *LiABCG6-GFP* se encontraba en el MVT, independientemente de la fase del parásito. Nos inclinamos a pensar que esa localización es debida a que la proteína no alcanza su localización normal en la membrana plasmática, bien porque no sea capaz de formar dímeros, o bien porque la presencia de GFP en el extremo carboxilo afecte al correcto plegamiento de la proteína. El codón de terminación en *LiABCG6* está situado inmediatamente a continuación del sexto segmento transmembrana, por lo que es posible que la adición de la proteína GFP en este extremo interfiera con el plegamiento de la proteína *LiABCG6*.

Previamente, se había descrito que la proteína humana ABCG1 fusionada a GFP no alcanzaba la membrana plasmática de los fibroblastos, localizándose únicamente en la región perinuclear (Venkateswaran *et al.*, 2000). Anteriormente se había descrito que proteínas de la ruta secretora de *S. cerevisiae* marcadas con GFP en el extremo amino terminaban localizadas de manera errónea en la vacuola (Kunze *et al.*, 1999). Estudios recientes han demostrado que las proteínas ABCG1 y ABCG2 humanas marcadas con GFP en el extremo amino se localizan correctamente en la membrana plasmática (Engel *et al.*, 2006).

Puesto que, en ensayos funcionales posteriores, el fenotipo de la proteína *GFP-LiABCG6* coincidía con el de la proteína sin marcar, nos inclinamos a pensar que la localización en membrana plasmática es la localización natural de la proteína *LiABCG6*.

La localización de LiABCG4 y LiABCG6 difiere de las de otros transportadores ABC de *Leishmania*, como es LtrABCA2, que se localiza principalmente en la estructura túbulovesicular MVT (Araújo-Santos *et al.*, 2005). Sin embargo, otros transportadores como LtrABC1.1 de *L. tropica* y TcABC1 de *T. cruzi* se localizan en membrana plasmática y bolsillo flagelar (Parodi-Talice *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2004). Por otra parte, la proteína ABCG2 humana se localiza en la membrana plasmática de las células (Maliepaard *et al.*, 2001). Otros transportadores ABCG, como son ABCG1, ABCG5 y ABCG8 también se localizan en la membrana plasmática de macrófagos y hepatocitos, respectivamente (Graf *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2006). Además, en plantas se ha descrito un transportador tipo ABCG localizado en la membrana plasmática de las células epidérmicas, e implicado en el transporte de cera a la cutícula de la planta (Pighin *et al.*, 2004). La localización de LiABCG4 y LiABCG6 en la membrana plasmática indicaría una posible implicación de las proteínas en las funciones atribuidas a otros ABCG en relación al tráfico de lípidos.

4. ESTUDIOS FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS LiABCG4 Y LiABCG6 DE *L. INFANTUM*.

4.1. Caracterización en *L. infantum*.

4.1.1. Implicación en el transporte de lípidos.

Actualmente se sabe que existe un gran número de transportadores ABC involucrados en procesos de transporte de lípidos (Tabla I-1). Es más, actualmente se defiende que una de las principales funciones fisiológicas de los transportadores ABC sería el transporte y la homeostasis lipídica (revisado por Takahashi *et al.*, 2005). En la última década se ha demostrado que muchas de las enfermedades hereditarias relacionadas con el metabolismo de lípidos están producidas por mutaciones en transportadores ABC (revisado por Borst *et al.*, 2000; Pohl *et al.*, 2005; Stefkova *et al.*, 2004; van Meer *et al.*, 2006).

Dentro de los transportadores ABC implicados en el transporte de lípidos encontramos la proteína **ABCB1** (MDR1, Pgp), implicada en el fenotipo de resistencia a

fármacos y con gran afinidad por lípidos y compuestos lipofílicos. ABCB4 media el transporte de PC a través de la membrana del canalículo biliar durante la formación de la bilis (revisado por Pohl *et al.*, 2005). Varios miembros de la subfamilia **ABCA** están específicamente relacionados con el transporte de lípidos en células de mamíferos. La proteína ABCA1 humana participa en el eflujo de fosfolípidos y colesterol a través de la membrana plasmática (revisado por Schmitz *et al.*, 2001), y se ha sugerido un papel para ABCA1 en el metabolismo de lipoproteínas (revisado por Takahashi *et al.*, 2005). Otros transportadores de la subfamilia ABCA están implicados en el transporte y metabolismo de distintos lípidos en las células. En el caso de la subfamilia **ABCG**, varios de sus miembros están implicados en el transporte de esteroides y fosfolípidos en células de mamíferos. **ABCG1** transporta fosfolípidos y esteroides fuera de los macrófagos (Klucken *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2006). **ABCG2** podría tener una función en el transporte de esteroides (Janvilisri *et al.*, 2003). **ABCG5** y **ABCG8** funcionan como heterodímeros obligados para promover la translocación de esteroides hacia la bilis (Graf *et al.*, 2002; Graf *et al.*, 2003), y mutaciones en cualquiera de ellos producen sitosterolemia, una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por una gran acumulación de esteroides en el plasma.

Por otro lado, la sobreexpresión de ciertas proteínas ABC en *Leishmania* se ha asociado con el tráfico de fosfolípidos, como es el caso de los transportadores de la subfamilia ABCA de *Leishmania*, LtrABC1.1 y LtrABCA2, implicados en el tráfico de fosfolípidos en *L. tropica* (Araújo-Santos *et al.*, 2005; Parodi-Talice *et al.*, 2003). El transportador ABCB1 de *Leishmania* (LtrMDR1) reduce la acumulación de un análogo fluorescente de la PC y está implicado en la resistencia y translocación de alquil-fosfolípidos (Pérez-Victoria *et al.*, 2001b; Pérez-Victoria *et al.*, 2006c).

En estudios anteriores (Araújo-Santos *et al.*, 2003) se había visto que la ruta mayoritaria de internalización de análogos de fosfolípidos (C₆-NBD-PC, -PE y -PS) en *Leishmania* estaba mediada por un transporte rápido dependiente de proteínas y ATP, pero no endocitosis, lo que sugirió la presencia de un transportador de lípidos en la membrana plasmática de *Leishmania*. Por el contrario, la internalización de C₆-NBD-SM es muy baja, aunque dependiente de endocitosis, y no está acoplada a un mecanismo de translocación dependiente de proteínas o ATP. La naturaleza de ese transportador se describió tras un rescate funcional sobre parásitos resistentes a miltefosina, empleando una librería genómica, en la que se identificó la translocasa lipídica LdMT (Pérez-Victoria

et al., 2003b; Pérez-Victoria *et al.*, 2006b). LdMT pertenece a la subfamilia de las aminofosfolípido translocasas de las ATPasas tipo P, y es necesaria para la entrada intracelular no sólo de alquil-fosfolípidos, sino también de los análogos fluorescentes de PC, PE y PS. Mutaciones en LdMT bloquean la internalización de los análogos de fosfolípidos, confiriendo a los parásitos resistencia a alquil-fosfolípidos, entre ellos miltefosina (Pérez-Victoria *et al.*, 2003b)

Transportadores de la subfamilia ABCG de mamíferos están implicados en la translocación de fosfolípidos al exterior celular. Así, por ejemplo, ABCG1 está implicado en el eflujo de esfingomiélin y fosfatidilcolina, y ABCG2 en la extrusión de fosfatidilserina (Kobayashi *et al.*, 2006; Woehlecke *et al.*, 2003).

Empleando análogos fluorescentes de fosfolípidos comprobamos que los parásitos que sobreexpresan **LiABCG4** presentan una menor acumulación de C₆-NBD-PC con respecto a los parásitos control; sin embargo, no se observaron diferencias en la acumulación del resto de análogos fluorescentes de PE, PS y SM testados. En el caso de **LiABCG6**, los parásitos que sobreexpresan la proteína presentan una menor acumulación de análogos de PC, PE y PS con respecto a los parásitos control; en este caso tampoco se observaron diferencias en la acumulación de SM. La reducción en la acumulación de C₆-NBD-PC (en el caso de LiABCG4), y de C₆-NBD-PC, -PE y -PS (para LiABCG6) fue comparable a la descrita para otros transportadores ABC de *Leishmania*, tales como LtrMDR1, LtrABC1.1 y LtrABCA2 (Araújo-Santos *et al.*, 2005; Parodi-Talice *et al.*, 2003; Pérez-Victoria *et al.*, 2001b). Puesto que tanto LiABCG4 como LiABCG6 se localizan en la MP y bolsillo flagelar de *Leishmania*, estas proteínas podrían regular la acumulación de los análogos de fosfolípidos vía endo/exocitosis. Sin embargo, no se observaron diferencias en la acumulación del marcador de endocitosis FM4-64 entre los controles y los parásitos transfectados con *LiABCG4* o *LiABCG6*.

Para comprobar que estas diferencias en la acumulación se debían a la proteína en sí, realizamos los mismos experimentos con parásitos que sobreexpresan LiABCG4 mutada e inactiva. En este caso, los parásitos que sobreexpresan esta proteína mostraron los mismos niveles de acumulación que sus controles, por lo que pudimos afirmar que la menor internalización del análogo de PC se debe a la actividad específica de LiABCG4. Además, estos resultados sugieren que la generación de una mutación en la lisina del Walker A conlleva una pérdida de funcionalidad de la proteína, así como un cambio en su localización, de forma similar a lo que se había descrito para el caso de la proteína ABCG2 humana (Henriksen *et al.*, 2005b).

En conjunto, estos resultados sugieren que ambos transportadores ABCG de *Leishmania* están implicados en el transporte hacia el exterior celular de los análogos de fosfolípidos.

4.1.2. Sensibilidad a fármacos.

Inicialmente, los transportadores ABC en mamíferos se conocían por su capacidad de conferir resistencia a fármacos en células tumorales; sin embargo, posteriormente y con la caracterización de nuevas subfamilias de transportadores, se han asociado a diferentes funciones fisiológicas. En el caso de parásitos, y más específicamente de *Leishmania*, la sobreexpresión de transportadores ABC también se ha relacionado con el desarrollo de resistencia a fármacos (Ouellette *et al.*, 2004; Pérez-Victoria *et al.*, 2006c).

En base a estos antecedentes, quisimos comprobar si la sobreexpresión de LiABCG4 o LiABCG6 podría modificar la sensibilidad de los parásitos frente a determinados compuestos. Previamente se había descrito que una línea de *L. tropica* resistente a daunomicina, que sobreexpresaba la proteína Pgp (codificada por el gen *Ltrmdr1*), confería resistencia a los alquilfosfolípidos miltefosina y edelfosina (Pérez-Victoria *et al.*, 2001b; Pérez-Victoria *et al.*, 2006c). La actividad antiproliferativa de la miltefosina y edelfosina frente a *Leishmania* había sido descrita con anterioridad (Santa-Rita *et al.*, 2004) y, más recientemente para perifosina (Cabrera-Serra *et al.*, 2007). Dado que estos compuestos son análogos de fosfolípidos, podrían ser sustratos potenciales de las proteínas LiABCG4 y LiABCG6, por lo que se ensayó la viabilidad de los parásitos frente a los **alquil-fosfolípidos** miltefosina, edelfosina y perifosina. En nuestros estudios se apreció que, mientras que las formas promastigotas que expresaban la versión mutada de la proteína LiABCG4 mostraban niveles de sensibilidad similares a los controles, aquellos que sobreexpresan LiABCG4 o LiABCG6 presentaban una sensibilidad reducida frente a estos alquil-fosfolípidos. La menor sensibilidad se mantiene en el caso de las proteínas fusionadas a GFP en su extremo amino, pero no así en las que incorporan la GFP en el extremo carboxilo. La funcionalidad de las versiones fusionadas a GFP corroboraría la de las proteínas LiABCG4 y LiABCG6, así como su localización. Estos resultados apoyarían la posible implicación de estas proteínas en el tráfico de análogos de alquil-fosfolípidos. Sin embargo, otros genes ABC de *Leishmania*, pertenecientes a la subfamilia ABCA, no confieren resistencia a alquil-fosfolípidos aunque sí están implicados en el transporte de análogos de fosfolípidos. En su momento

se especuló que las diferencias entre los enlaces éter de los alquil-fosfolípidos y los enlaces éster de los análogos fluorescentes de fosfolípidos podrían ser responsables de la falta de resistencia (Parodi-Talice *et al.*, 2003)

En cualquier caso, los alquil-fosfolípidos no parecen ser los mejores sustratos para los transportadores ABC. En el caso de una cepa de *L. tropica* resistente a daunomicina que expresa altos niveles de Pgp, los índices de resistencia a alquil-lisofosfolípos se encuentran entre 7 y 9, mientras que los de resistencia a daunomicina son mayores de 100 (Pérez-Victoria *et al.*, 2001b). Estudios realizados con la Pgp humana habían descrito que la resistencia a miltefosina, en el caso de células que expresaban MDR1, era menos pronunciada que la resistencia a otros sustratos de Pgp. (Rybczynska *et al.*, 2001a). Esto podría ser debido a que la miltefosina y otros análogos lipídicos interaccionarían con Pgp de manera distinta a como lo hacen otros sustratos. En la Pgp existen dos sitios de unión a fármacos. Parece probable que el sitio de unión de las moléculas lipídicas solaparía con esos dos sitios de unión, y que podría estar, en ausencia de fármacos, ocupado por lípidos de membrana (Eckford y Sharom, 2006). Además, los alquil-fosfolípidos no entrarían en la célula por difusión, sino quizás por transporte activo mediado por aminofosfolípido translocasas, como sucede en el caso de *Leishmania* (Pérez-Victoria *et al.*, 2003b), o bien mediante endocitosis como se propone para células tumorales (van der Luit *et al.*, 2002), lo que provocaría que la tasa de eflujo mediada por Pgp fuera menor.

La **sitamaquina** es un fármaco actualmente en desarrollo por GlaxoSmithkline (en fase clínica II en India) para su uso potencial en el tratamiento de la leishmaniasis visceral (Yeates, 2002). Considerando que otras quinolinas interaccionan con transportadores ABC (Riffkin *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2005), nos interesó probar si la sitamaquina se encontraba entre los posibles sustratos de estos transportadores ABCG. Los resultados obtenidos muestran una menor sensibilidad a sitamaquina en el caso de los parásitos que sobreexpresan LiABCG4 o LiABCG6. En el futuro sería interesante ampliar el estudio a otras quinolinas, con el fin de averiguar si interaccionarían con los transportadores ABCG de *Leishmania*

El **ketoconazol** es un fármaco antifúngico utilizado en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea (revisado por Singh y Sivakumar, 2004). Varios trabajos demuestran que la actividad de la proteína Pgp humana es inhibida por el ketoconazol (Kageyama *et al.*, 2005; Takano *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2002). Los azoles constituyen

un grupo de fármacos de gran importancia en el tratamiento de infecciones por *Candida spp.*, si bien la aparición de resistencias constituye un gran problema (Powderly, 1994). Entre los mecanismos de resistencia se encuentra la sobreexpresión de los transportadores ABC Cdr1p y Cdr2p (Schuetzer-Muehlbauer *et al.*, 2003; White *et al.*, 2002). Puesto que los azoles son sustratos de transportadores ABC, quisimos probar si el ketoconazol interaccionaba con las proteínas LiABCG4 y LiABCG6. En las condiciones en las que se desarrolló nuestro ensayo, no observamos diferencias en la sensibilidad a este fármaco entre transfectantes y controles, lo que indica que los azoles, al menos el ketoconazol, no se encontrarían entre los sustratos de estos transportadores tipo ABCG de *Leishmania*.

Igualmente, se ensayaron otros fármacos empleados en la terapia anticancerígena, como la mitoxantrona y daunomicina, que han sido descritos como sustratos de la proteína ABCG2 humana (Honjo *et al.*, 2001). En nuestros ensayos no se apreciaron diferencias de sensibilidad entre los controles y los parásitos transfectados con *LiABCG4*.

4.1.3. Acumulación y eflujo de miltefosina radiactiva.

Dado que *LiABCG4* y *LiABCG6* conferirían resistencia a alquil-fosfolípidos posiblemente por incremento en el eflujo del fármaco, realizamos un ensayo de acumulación de miltefosina radiactiva, puesto a punto en nuestro laboratorio con anterioridad (Pérez-Victoria *et al.*, 2003a). Los parásitos que sobreexpresaban *LiABCG4* y *LiABCG6* mostraban una menor acumulación de [¹⁴C]miltefosina. Mediante un ensayo de eflujo se observó que, al menos en el caso de *LiABCG4*, esta menor acumulación era debida a un mayor eflujo del compuesto radiactivo. Recientemente se ha demostrado que la resistencia a miltefosina mediada por *LtrMDR1* de *Leishmania* es debida a un aumento en el eflujo del fármaco, lo que conlleva una reducción en la acumulación (Pérez-Victoria *et al.*, 2006c). Cabe esperar que la proteína *LiABCG4* de *Leishmania* contribuya al fenotipo de resistencia a través de un incremento en el eflujo de alquil-fosfolípidos.

4.2. Expresión heteróloga de las proteínas LiABCG4 y LiABCG6 en levaduras.

4.2.1. Expresión y localización de LiABCG4 y LiABCG6.

Con el fin de profundizar en el estudio de las funciones de estas dos proteínas de la subfamilia ABCG de *Leishmania*, nos propusimos expresarlas en un sistema heterólogo con el cual se obtuvieran altos niveles de expresión y se pudiera evitar el concurso de otras proteínas que interfirieran con el proceso a estudiar.

Un método para expresar proteínas de membrana de forma funcional es la utilización de sistemas de **baculovirus-células de insecto**, que permiten obtener grandes cantidades de proteínas en la membrana en condiciones funcionales óptimas para el estudio de su mecanismo de acción, naturaleza de los sustratos, inhibidores específicos y vías de regulación de un gran número de transportadores ABC (Bakos *et al.*, 1998; Sarkadi *et al.*, 1992). Este sistema de expresión heteróloga se utilizó para caracterizar la función de la proteína ABCG2 humana y estudiar su posible homodimerización (Ozvegy *et al.*, 2001), así como la capacidad de reconocimiento de sustrato en las distintas variantes de la proteína (Ozvegy-Laczka *et al.*, 2005). Las proteínas ABCG1 y ABCG4 también han sido expresadas en células de insecto, a fin de llevar a cabo su caracterización bioquímica y estudiar su posible heterodimerización (Cserepes *et al.*, 2004). Más recientemente, se ha descrito la co-expresión de ABCG5 y ABCG8 en células de insecto, lo que proporciona nuevos aspectos en la caracterización bioquímica y funcional de estas proteínas transportadoras (Muller *et al.*, 2006).

Para el estudio de los transportadores ABCG se han empleado además otros sistemas de expresión. Así, la proteína ABCG2 humana se expresó de manera funcional en *Lactococcus lactis*, determinándose la posible implicación de ABCG2 en el transporte de esteroides (Janvilisri *et al.*, 2003). Por otra parte, más recientemente se ha descrito la expresión de las proteínas ABCG5 y ABCG8 de ratón en *Pichia pastoris* (Wang *et al.*, 2006).

Para el estudio de las proteínas tipo ABCG de *Leishmania*, nos planteamos utilizar levaduras como sistema de expresión. *S. cerevisiae* es un organismo modelo ampliamente utilizado por una serie de ventajas: su genoma está secuenciado, es fácil de manipular genéticamente y las condiciones de cultivo son sencillas y económicas. En nuestro caso, se trata de un modelo de especial importancia, puesto que varios

transportadores ABC se han expresado de manera funcional en levaduras (Mao y Scarborough, 1997; Raymond *et al.*, 1994; Ruetz *et al.*, 1996). *S. cerevisiae* contiene un gran número de transportadores ABC, por lo que se han desarrollado cepas con los principales transportadores delecionados, a fin de conseguir un entorno apto, con la mínima redundancia de función, para el estudio funcional de otros transportadores ABC (Decottignies *et al.*, 1998). Por otro lado, existe un sistema de expresión que aprovecha el mutante sensible a temperatura *sec 6-4*, que es defectivo en el paso final de la ruta secretora, concretamente en la fusión de las vesículas a la membrana plasmática. Este mutante acumula, a una temperatura dada, grandes cantidades de vesículas secretoras que contienen proteínas de membrana recién sintetizadas, incluso aquellas exógenas producidas a partir de plásmidos de expresión. Este sistema se empleó con anterioridad para expresar de forma funcional la glicoproteína-P (Ruetz y Gros, 1994; Ruetz, 1998) y, más recientemente, para la expresión del transportador Ycf1p (factor de tolerancia al cadmio) de *S. cerevisiae* (Guedry *et al.*, 2003). Si a este mutante *sec 6-4* se le delecionan dos ATPasas tipo-P (Dnf3p y Drs2p), se obtienen vesículas secretoras deficientes en el transporte dependiente de ATP de análogos fluorescentes de PC, PE y PS desde la cara luminal a la cara citosólica. Estas vesículas proporcionarían el entorno ideal para analizar actividades de transporte hacia la cara luminal y, por lo tanto, para el estudio de posibles flipasas dependientes de ATP (Alder-Baerens *et al.*, 2006) y, en nuestro caso, para el estudio funcional de los transportadores de la subfamilia ABCG de *Leishmania*.

El vector empleado para la expresión en levaduras fue pYEXTF-HC (Holz *et al.*, 2002). Mediante *Western blot*, utilizando los anticuerpos adecuados, se pudo determinar la expresión de las proteínas LiABCG4 y LiABCG6 en levaduras. Para determinar la localización se realizó un fraccionamiento subcelular en gradiente discontinuo de sacarosa. Así se pudo apreciar que tanto LiABCG4 como LiABCG6 co-localizaban con el marcador de membrana plasmática. LiABCG4 aparece también en retículo, y LiABCG6, en vacuola. La localización de LiABCG4 en el retículo endoplasmático podría representar una parte de la proteína que no se ha plegado correctamente y queda retenida en el RE para su posterior degradación (Plemper y Wolf, 1999). Ciertas proteínas de membrana son internalizadas por la vía endocítica y son dirigidas a la vacuola para ser degradadas (Horak, 2003), lo que podría explicar la localización de LiABCG6 en este orgánulo.

La expresión de LiABCG4 y LiABCG6 en la cepa AD18, que tiene varios transportadores ABC delecionados, reduce ligeramente la sensibilidad de estas células a

los alquil-fosfolípidos, lo que corroboraría el hecho de que ambas proteínas pudieran tener a los análogos de aquil-fosfolípidos como sustratos potenciales.

En cualquier caso, parece que existe una baja eficiencia de transporte para los análogos de fosfolípidos. En trabajos anteriores se observó que los transportadores ABC de levaduras Yor1p y Pdr5p estaban implicados en el transporte de análogos fluorescentes de fosfatidiletanolamina. Sin embargo, los estudios realizados sobre levaduras con uno u otro transportador delecionado, muestran únicamente un aumento del 13% en la acumulación del análogo fluorescente de PE (Decottignies *et al.*, 1998). Esto podría deberse al hecho de que los análogos de fosfolípidos no entran en las levaduras por difusión, como otros sustratos, sino por transporte activo, lo que provocaría una menor eficiencia en la eliminación al exterior por parte de los transportadores ABC; sin contar con que posiblemente tendrían que competir con los fosfolípidos de membrana (Rybczynska *et al.*, 2001b).

4.2.2. Expresión de LiABCG4 en vesículas secretoras.

La construcción *LiABCG4-pYEX* se utilizó para transformar la cepa *sec6-4Δdrs2Δdnf3*. Como se ha citado anteriormente, se trata de un mutante de las vías secretoras tardías cuyo crecimiento cesa a 38 °C y acumulan vesículas secretoras que carecen de la actividad de transporte de fosfolípidos dependiente de ATP (Alder-Baerens *et al.*, 2006). Esto nos proporcionaba un sistema de expresión de gran utilidad para el estudio de la actividad de transporte de LiABCG4.

Una vez que se comprobó que las vesículas secretoras aisladas de la cepa *sec6-4Δdrs2Δdnf3* transformadas con *LiABCG4-pYEX* contenían la proteína LiABCG4, se procedió al aislamiento por inmuno-afinidad de estas vesículas. Con ellas se comprobó, mediante entrecruzamiento químico, la capacidad de dimerización de LiABCG4. Si bien este ensayo proporcionó indicios de la formación de un dímero, serían necesarios experimentos adicionales, como co-inmunoprecipitación usando dos versiones de la proteína LiABCG4 marcada con epítomos distintos, para obtener más datos acerca de la dimerización de LiABCG4. En cualquier caso, nuestros resultados no excluyen que LiABCG4 pueda dimerizar con otros miembros de la subfamilia ABCG de *Leishmania* para formar heterodímeros con distinta especificidad de sustrato, tal como sucede en el caso de las proteínas ABCG de *D. melanogaster*. Los productos de los genes *white* y *brown* interaccionan para formar un transportador específico de guanina, mientras que

los productos de *white* y *scarlet* forman un transportador de triptófano (Mackenzie *et al.*, 1999).

4.2.3. Transporte de lípidos mediado por LiABCG4 en vesículas secretoras.

Para estudiar la actividad de transporte mediada por LiABCG4 de *Leishmania* en estas vesículas secretoras de levaduras, se procedió a realizar un ensayo de extracción con BSA de los análogos fluorescentes de fosfolípidos (Natarajan *et al.*, 2004). Este ensayo presenta la ventaja de poder medir el descenso en la emisión de fluorescencia sin necesidad de separar físicamente las vesículas del BSA, puesto que los análogos fluorescentes de fosfolípidos unidos a BSA tienen dos veces menos fluorescencia que los unidos a membrana (Kubelt *et al.*, 2002). Se observó que las vesículas secretoras que contenían LiABCG4 mostraban una actividad de transporte específica para el análogo fluorescente de PC, desde la cara citosólica a la cara luminal de la membrana de la vesícula; dicha actividad era dependiente de ATP, sensible a vanadato, y no se detectaba en vesículas aisladas de *sec6-4Δdrs2Δdnf3* transformadas con el vector vacío. Era de esperar que en esas vesículas secretoras se encontraran presentes transportadores ABC localizados en la membrana de levaduras, como Yor1p y Pdr5p, pero probablemente la actividad de esos transportadores sería demasiado baja como para ser detectada. Tal y como se había visto en trabajos anteriores, la delección de los transportadores Yor1p y Pdr5p únicamente producía un incremento del 13% en la acumulación del análogo de PE, y se requería una sobreexpresión de los mismos para estudiar su función (Decottignies *et al.*, 1998). Todo esto apunta hacia una posible función de LiABCG4 en el transporte hacia fuera de PC desde la cara citosólica a la cara exoplásmica de la membrana plasmática.

En general, estos datos corroboran el hecho de que LiABCG4 estaría implicado en el transporte de fosfolípidos, reconociendo de manera específica PC y derivados de alquil-fosfolípidos.

Sería interesante expresar LiABCG6 en esta cepa *sec6-4Δdrs2Δdnf3* a fin de ver su localización en vesículas secretoras y profundizar en su posible implicación en el transporte de análogos de fosfolípidos.

6. PERSPECTIVAS.

En general, los datos presentados sugieren que las proteínas LiABCG4 y LiABCG6 actuarían como transportadores de fosfolípidos. La reconstitución de estos transportadores en vesículas unilamelares gigantes permitiría en un futuro estudiar su capacidad de translocar fosfolípidos y lípidos no modificados. En cualquier caso, la función fisiológica de estos dos transportadores en *Leishmania* está por determinar. Una posibilidad sería que estuvieran implicados en la regulación de la distribución lipídica entre la cara citosólica y la cara externa de la membrana plasmática. Las membranas plasmáticas de las células eucariotas presentan una distribución asimétrica, con los aminofosfolípidos PE y PS en la cara citosólica, mientras que PC, SM y los glicolípidos se encuentran predominantemente en la cara externa. Esta asimetría se mantiene como resultado de la acción de translocasas dependientes de ATP. Es verosímil pensar que el transporte hacia la cara citosólica de PC, PE y PS, mediado por LdMT, pueda estar acompañado por un transporte hacia fuera de esos fosfolípidos, llevado a cabo por LiABCG4, LiABCG6 y otros transportadores ABC, manteniéndose así la asimetría de la membrana. Esta regulación dinámica de la distribución lipídica a través de la membrana podría ser de gran importancia para la interacción del parásito con la célula hospedadora así como para la invasión de la misma.

Los genes *LiABCG4* y *LiABCG6* de *Leishmania* codifican transportadores ABCG implicados en el transporte hacia el exterior de la célula de análogos de fosfolípidos y alquil-fosfolípidos. Estos resultados podrían ser de importancia clínica, puesto que la miltefosina está considerada como un fármaco leishmanicida prometedor y cabría la posibilidad de que estos transportadores contribuyeran, junto con otros transportadores ABC, al fenotipo de resistencia a fármacos. Este hecho determina la necesidad de profundizar en el estudio de las proteínas ABCG de *Leishmania* y obtener inhibidores específicos que permitan dilucidar su contribución a la resistencia a fármacos.

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. Se han caracterizado los genes *LiABCG4* y *LiABCG6* de *Leishmania infantum*, que codifican dos proteínas homólogas a los miembros de la subfamilia ABCG de mamíferos. Ambos genes son de copia única y se localizan en los cromosomas 15 y 36, respectivamente.
2. Los dos genes presentan bajas tasas de expresión, y sus proteínas fusionadas con GFP en el extremo amino terminal se localizan preferentemente en la membrana plasmática y bolsillo flagelar del parásito.
3. Los parásitos que sobreexpresan la proteína LiABCG4 muestran una menor acumulación del análogo fluorescente de fosfatidilcolina, mientras que aquellos que sobreexpresan LiABCG6 muestran una menor acumulación de los análogos fluorescentes de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina. Del mismo modo, la sobreexpresión de estas proteínas produce una menor acumulación de miltefosina radiactiva. Todos estos resultados sugieren que estas proteínas pueden estar implicadas en el transporte de fosfolípidos y alquil-fosfolípidos.
4. Los parásitos que sobreexpresan LiABCG4 o LiABCG6 adquieren una resistencia significativa a los análogos de alquil-fosfolípidos miltefosina, edelfosina y perifosina, así como a la aminoquinoleína sitamaquina.
5. En las vesículas secretoras de levaduras que expresan LiABCG4 se produce un transporte del análogo fluorescente de fosfatidilcolina hacia el lumen en un proceso dependiente de ATP.
6. Las cepas de levaduras que sobreexpresan LiABCG4 o LiABCG6 muestran una menor sensibilidad frente a los análogos de alquil-fosfolípidos, lo que apoyaría el hecho de que los alquil-fosfolípidos puedan ser sustratos de estas proteínas.

BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

ABC Proteins: From Bacteria to Man. Holland I.B., Cole S., Kuchler K. Y Higgins C.F.. Londres, 2003

Alder-Baerens, N., Lisman, Q., Luong, L., Pomorski, T., y Holthuis, J.C. (2006). Loss of p4 ATPases *drs2p* and *dnf3p* disrupts aminophospholipid transport and asymmetry in yeast post-Golgi secretory vesicles. *Mol Biol Cell* **17**: 1632-1642.

Alexander, J., Satoskar, A.R., y Russell, D.G. (1999). *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci* **112 Pt 18**: 2993-3002.

Allen, J.D., Jackson, S.C., y Schinkel, A.H. (2002). A mutation hot spot in the Bcrp1 (*Abcg2*) multidrug transporter in mouse cell lines selected for Doxorubicin resistance. *Cancer Res* **62**: 2294-2299.

Allikmets, R., Schriml, L.M., Hutchinson, A., Romano-Spica, V., y Dean, M. (1998). A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res* **58**: 5337-5339.

Alvar, J., Croft, S., y Olliaro, P. (2006a). Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Adv Parasitol* **61**: 223-274.

Alvar, J., Yactayo, S., y Bern, C. (2006b). Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol.*

Álvarez, F., Robello, C., y Vignali, M. (1994). Evolution of codon usage and base contents in kinetoplastid protozoans. *Mol Biol Evol* **11**: 790-802.

Ambudkar, S.V., Kimchi-Sarfaty, C., Sauna, Z.E., y Gottesman, M.M. (2003). P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* **22**: 7468-7485.

Ambudkar, S.V., Kim, I.W., y Sauna, Z.E. (2006). The power of the pump: mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1). *Eur J Pharm Sci* **27**: 392-400.

Anjard, C., y Loomis, W.F. (2002). Evolutionary analyses of ABC transporters of *Dictyostelium discoideum*. *Eukaryot Cell* **1**: 643-652.

Annilo, T., Tammur, J., Hutchinson, A., Rzhetsky, A., Dean, M., y Allikmets, R. (2001) Human and mouse orthologs of a new ATP-binding cassette gene, ABCG4. *Cytogenet Cell Genet* **94**: 196-201.

Araújo-Santos, J.M., Gamarro, F., Castanys, S., Herrmann, A., y Pomorski, T. (2003). Rapid transport of phospholipids across the plasma membrane of *Leishmania infantum*. *Biochem Biophys Res Commun* **306**: 250-255.

Araújo-Santos, J.M., Parodi-Talice, A., Castanys, S., y Gamarro, F. (2005). The overexpression of an intracellular ABCA-like transporter alters phospholipid trafficking in *Leishmania*. *Biochem Biophys Res Commun* **330**: 349-355.

Arrebola, R., Olmo, A., Reche, P., Garvey, E.P., Santi, D.V., Ruiz-Perez, L.M., y Gonzalez-Pacanowska, D. (1994). Isolation and characterization of a mutant dihydrofolate reductase-thymidylate synthase from methotrexate-resistant *Leishmania* cells. *J Biol Chem* **269**: 10590-10596.

Awasthi, A., Mathur, R.K., y Saha, B. (2004). Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res* **119**: 238-258.

Baird, J.K., y Rieckmann, K.H. (2003). Can primaquine therapy for vivax malaria be improved? *Trends Parasitol* **19**: 115-120.

Bakos, E., Evers, R., Szakacs, G., Tusnady, G.E., Welker, E., Szabo, K., de Haas, M., van Deemter, L., Borst, P., Varadi, A., y Sarkadi, B. (1998). Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain. *J Biol Chem* **273**: 32167-32175.

Balana-Fouce, R., Reguera, R.M., Cubria, J.C., y Ordonez, D. (1998). The pharmacology of leishmaniasis. *Gen Pharmacol* **30**: 435-443.

Balzi, E., Chen, W., Ulaszewski, S., Capieaux, E., y Goffeau, A. (1987). The multidrug resistance gene PDR1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **262**: 16871-16879.

Basselín, M., Denise, H., Coombs, G.H., y Barrett, M.P. (2002). Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 3731-3738.

Bastien, P., Blaineau, C., y Pages, M. (1992). Molecular karyotype analysis in *Leishmania*. *Subcell Biochem* **18**: 131-187.

Bates, P.A., Hermes, I., y Dwyer, D.M. (1989). *Leishmania donovani*: immunochemical localization and secretory mechanism of soluble acid phosphatase. *Exp Parasitol* **68**: 335-346.

Beach, D.H., Holz, G.G., Jr., y Anekwe, G.E. (1979). Lipids of *Leishmania* promastigotes. *J Parasitol* **65**: 201-216.

Beach, D.H., Goad, L.J., y Holz, G.G., Jr. (1988). Effects of antimycotic azoles on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* **31**: 149-162.

Becq, F., Hamon, Y., Bajetto, A., Gola, M., Verrier, B., y Chimini, G. (1997). ABC1, an ATP binding cassette transporter required for phagocytosis of apoptotic cells,

generates a regulated anion flux after expression in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem* **272**: 2695-2699.

Berge, K.E., Tian, H., Graf, G.A., Yu, L., Grishin, N.V., Schultz, J., Kwiterovich, P., Shan, B., Barnes, R., y Hobbs, H.H. (2000). Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* **290**: 1771-1775.

Bern, C., Adler-Moore, J., Berenguer, J., Boelaert, M., den Boer, M., Davidson, R.N., Figueras, C., Gradoni, L., Kafetzis, D.A., Ritmeijer, K., Rosenthal, E., Royce, C., Russo, R., Sundar, S., y Alvar, J. (2006). Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis* **43**: 917-924.

Beverley, S.M., Coderre, J.A., Santi, D.V., y Schimke, R.T. (1984). Unstable DNA amplifications in methotrexate-resistant *Leishmania* consist of extrachromosomal circles which relocalize during stabilization. *Cell* **38**: 431-439.

Beverley, S.M., y Turco, S.J. (1998). Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite *Leishmania*. *Trends Microbiol* **6**: 35-40.

Bevers, E.M., Comfurius, P., van Rijn, J.L., Hemker, H.C., y Zwaal, R.F. (1982). Generation of prothrombin-converting activity and the exposure of phosphatidylserine at the outer surface of platelets. *Eur J Biochem* **122**: 429-436.

Bevers, E.M., Comfurius, P., y Zwaal, R.F. (1983). Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation. *Biochim Biophys Acta* **736**: 57-66.

Biswas, E.E. (2001). Nucleotide binding domain 1 of the human retinal ABC transporter functions as a general ribonucleotidase. *Biochemistry* **40**: 8181-8187.

Borst, P., Zelcer, N., y van Helvoort, A. (2000). ABC transporters in lipid transport. *Biochim Biophys Acta* **1486**: 128-144.

Bosch, I., Dunussi-Joannopoulos, K., Wu, R.L., Furlong, S.T., y Croop, J. (1997). Phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine behave as substrates of the human MDR1 P-glycoprotein. *Biochemistry* **36**: 5685-5694.

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**: 248-254.

Bratton, D.L., Fadok, V.A., Richter, D.A., Kailey, J.M., Guthrie, L.A., y Henson, P.M. (1997). Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* **272**: 26159-26165.

Breedveld, P., Beijnen, J.H., y Schellens, J.H. (2006). Use of P-glycoprotein and BCRP inhibitors to improve oral bioavailability and CNS penetration of anticancer drugs. *Trends Pharmacol Sci* **27**: 17-24.

Buyse, F., Hou, Y.X., Vigano, C., Zhao, Q., Ruyschaert, J.M., y Chang, X.B. (2006). Replacement of the positively charged Walker A lysine residue with a hydrophobic leucine residue and conformational alterations caused by this mutation in MRP1 impair ATP binding and hydrolysis. *Biochem J* **397**: 121-130.

Cabrera-Serra, M.G., Lorenzo-Morales, J., Romero, M., Valladares, B., y Pinero, J.E. (2007). In vitro activity of perifosine: a novel alkylphospholipid against the promastigote stage of *Leishmania* species. *Parasitol Res* **100**: 1155-1157.

Campbell, D.A., Thomas, S., y Sturm, N.R. (2003). Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes Infect* **5**: 1231-1240.

Cattand, P., Desjeux P., Guzmán M.G., Jannin, J., Kroeger A., Medici A., Musgrove P., Nathan M.B., Shaw A., y Schofield C. J. (2006). Tropical diseases lacking adequate control measures: dengue, leishmaniasis and african trypanosomiasis. *Disease control in developing countries (2nd Edition)*: 451-466. Oxford University Press, New York .

Cavelier, C., Lorenzi, I., Rohrer, L., y von Eckardstein, A. (2006). Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. *Biochim Biophys Acta* **1761**: 655-666.

Cervenak, J., Andrikovics, H., Ozvegy-Laczka, C., Tordai, A., Nemet, K., Varadi, A., y Sarkadi, B. (2006). The role of the human ABCG2 multidrug transporter and its variants in cancer therapy and toxicology. *Cancer Lett* **234**: 62-72.

Chang, G., y Roth, C.B. (2001). Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science* **293**: 1793-1800.

Chang, G., Roth, C.B., Reyes, C.L., Pornillos, O., Chen, Y.J., y Chen, A.P. (2006). Retraction. *Science* **314**: 1875.

Chang, K.P., Fong, D., y Bray R.S. (1985). Biology of *Leishmania* and leishmaniasis. *Leishmaniasis*.1:1-30. Chang/Bray (ed.) Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam,

Chen, H., Rossier, C., Lalioti, M.D., Lynn, A., Chakravarti, A., Perrin, G., y Antonarakis, S.E. (1996). Cloning of the cDNA for a human homologue of the *Drosophila white* gene and mapping to chromosome 21q22.3. *Am J Hum Genet* **59**: 66-75.

Chiquero, M.J., Perez-Victoria, J.M., O'Valle, F., Gonzalez-Ros, J.M., del Moral, R.G., Ferragut, J.A., Castanys, S., y Gamarro, F. (1998). Altered drug membrane

permeability in a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line. *Biochem Pharmacol* **55**: 131-139.

Chomczynski, P., y Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-159.

Chow, L.M., Wong, A.K., Ullman, B., y Wirth, D.F. (1993). Cloning and functional analysis of an extrachromosomally amplified multidrug resistance-like gene in *Leishmania enriettii*. *Mol Biochem Parasitol* **60**: 195-208.

Cisternino, S., Mercier, C., Bourasset, F., Roux, F., y Scherrmann, J.M. (2004). Expression, up-regulation, and transport activity of the multidrug-resistance protein Abcg2 at the mouse blood-brain barrier. *Cancer Res* **64**: 3296-3301.

Clayton, C.E. (2002). Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *Embo J* **21**: 1881-1888.

Coelho, A.C., Beverley, S.M., y Cotrim, P.C. (2003). Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* **130**: 83-90.

Cole, S.P., Bhardwaj, G., Gerlach, J.H., Mackie, J.E., Grant, C.E., Almquist, K.C., Stewart, A.J., Kurz, E.U., Duncan, A.M., y Deeley, R.G. (1992). Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* **258**: 1650-1654.

Connor, J., Pak, C.H., Zwaal, R.F., y Schroit, A.J. (1992). Bidirectional transbilayer movement of phospholipid analogs in human red blood cells. Evidence for an ATP-dependent and protein-mediated process. *J Biol Chem* **267**: 19412-19417.

Croft, S.L., Barrett, M.P., y Urbina, J.A. (2005). Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends Parasitol* **21**: 508-512.

Croft, S.L., Seifert, K., y Yardley, V. (2006a). Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res* **123**: 399-410.

Croft, S.L., Sundar, S., y Fairlamb, A.H. (2006b). Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* **19**: 111-126.

Croop, J.M., Tiller, G.E., Fletcher, J.A., Lux, M.L., Raab, E., Goldenson, D., Son, D., Arciniegas, S., y Wu, R.L. (1997). Isolation and characterization of a mammalian homolog of the *Drosophila white* gene. *Gene* **185**: 77-85.

Cruz, A.K., y Tosi, L.R. (1996). Molecular biology. *Clin Dermatol* **14**: 533-540.

Cruz, I., Nieto, J., Moreno, J., Canavate, C., Desjeux, P., y Alvar, J. (2006). *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res* **123**: 357-388.

Cserepes, J., Szentpetery, Z., Seres, L., Ozvegy-Laczka, C., Langmann, T., Schmitz, G., Glavinas, H., Klein, I., Homolya, L., Varadi, A., Sarkadi, B., y Elkind, N.B. (2004). Functional expression and characterization of the human ABCG1 and ABCG4 proteins: indications for heterodimerization. *Biochem Biophys Res Commun* **320**: 860-867.

Cunningham, A.C. (2002). Parasitic adaptive mechanisms in infection by *leishmania*. *Exp Mol Pathol* **72**: 132-141.

Daleke, D.L., y Lyles, J.V. (2000). Identification and purification of aminophospholipid flippases. *Biochim Biophys Acta* **1486**: 108-127.

Daleke, D.L. (2007) Phospholipid flippases. *J Biol Chem* **282**: 821-825.

Dallagiovanna, B., Castanys, S., y Gamarro, F. (1994). *Trypanosoma cruzi*: sequence of the ATP-binding site of a P-glycoprotein gene. *Exp Parasitol* **79**: 63-67.

Dallagiovanna, B., Gamarro, F., y Castanys, S. (1996). Molecular characterization of a P-glycoprotein-related tcpgp2 gene in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* **75**: 145-157.

Davidson, A.L., y Chen, J. (2005). Structural biology. Flipping lipids: is the third time the charm? *Science* **308**: 963-965.

Dawson, R.J., y Locher, K.P. (2006). Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* **443**: 180-185.

de Almeida, M.C., Vilhena, V., Barral, A., y Barral-Netto, M. (2003). *Leishmanial* infection: analysis of its first steps. A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **98**: 861-870.

de Freitas Balanco, J.M., Moreira, M.E., Bonomo, A., Bozza, P.T., Amarante-Mendes, G., Pirmez, C., y Barcinski, M.A. (2001). Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. *Curr Biol* **11**: 1870-1873.

de Souza, W. (2005). Microscopy and cytochemistry of the biogenesis of the parasitophorous vacuole. *Histochem Cell Biol* **123**: 1-18.

Dean, M. (2006). Genetics of ATP-binding cassette transporters. *Methods Enzymol* **400**: 409-422.

Dean, M., Hamon, Y., y Chimini, G. (2001a). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* **42**: 1007-1017.

Dean, M., Rzhetsky, A., y Allikmets, R. (2001b). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* **11**: 1156-1166.

- Decottignies, A., Grant, A.M., Nichols, J.W., de Wet, H., McIntosh, D.B., y Goffeau, A. (1998).** ATPase and multidrug transport activities of the overexpressed yeast ABC protein Yor1p. *J Biol Chem* **273**: 12612-12622.
- Decuypere, S., Rijal, S., Yardley, V., De Doncker, S., Laurent, T., Khanal, B., Chappuis, F., y Dujardin, J.C. (2005).** Gene expression analysis of the mechanism of natural Sb(V) resistance in *Leishmania donovani* isolates from Nepal. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 4616-4621.
- Denkers, E.Y., y Butcher, B.A. (2005).** Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. *Trends Parasitol* **21**: 35-41.
- Descoteaux, A., y Turco, S.J. (1999).** Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim Biophys Acta* **1455**: 341-352.
- Desjeux, P. (2004).** Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **27**: 305-318.
- Devaux, P.F., Lopez-Montero, I., y Bryde, S. (2006).** Proteins involved in lipid translocation in eukaryotic cells. *Chem Phys Lipids* **141**: 119-132.
- Diop, N.K., e Hrycyna, C.A. (2005).** N-Linked glycosylation of the human ABC transporter ABCG2 on asparagine 596 is not essential for expression, transport activity, or trafficking to the plasma membrane. *Biochemistry* **44**: 5420-5429.
- Docampo, R., y Moreno, S.N. (2001).** The acidocalcisome. *Mol Biochem Parasitol* **114**: 151-159.
- Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P., y Moreno, S.N. (2005).** Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nat Rev Microbiol* **3**: 251-261.
- Dodge, M.A., Waller, R.F., Chow, L.M., Zaman, M.M., Cotton, L.M., McConville, M.J., y Wirth, D.F. (2004).** Localization and activity of multidrug resistance protein 1 in the secretory pathway of *Leishmania* parasites. *Mol Microbiol* **51**: 1563-1575.
- Doyle, P.S., y Dwyer, D.M. (1993).** *Leishmania*: immunochemical comparison of the secretory (extracellular) acid phosphatases from various species. *Exp Parasitol* **77**: 435-444.
- Doyle, L.A., Yang, W., Abruzzo, L.V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A.K., y Ross, D.D. (1998).** A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 15665-15670.
- Dube, A., Singh, N., Sundar, S., y Singh, N. (2005).** Refractoriness to the treatment of sodium stibogluconate in Indian kala-azar field isolates persist in in vitro and in vivo experimental models. *Parasitol Res* **96**: 216-223.

Eckford, P.D., y Sharom, F.J. (2006). P-glycoprotein (ABCB1) interacts directly with lipid-based anti-cancer drugs and platelet-activating factors. *Biochem Cell Biol* **84**: 1022-1033.

Ejendal, K.F., Diop, N.K., Schweiger, L.C., e Hrycyna, C.A. (2006). The nature of amino acid 482 of human ABCG2 affects substrate transport and ATP hydrolysis but not substrate binding. *Protein Sci* **15**: 1597-1607.

El Fadili, K., Messier, N., Leprohon, P., Roy, G., Guimond, C., Trudel, N., Saravia, N.G., Papadopoulou, B., Legare, D., y Ouellette, M. (2005). Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in *Leishmania infantum* axenic and intracellular amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 1988-1993.

Ellenberger, T.E., y Beverley, S.M. (1989). Multiple drug resistance and conservative amplification of the H region in *Leishmania major*. *J Biol Chem* **264**: 15094-15103.

Engel, T., Bode, G., Lueken, A., Knop, M., Kannenberg, F., Nofer, J.R., Assmann, G., y Seedorf, U. (2006). Expression and functional characterization of ABCG1 splice variant ABCG1(666). *FEBS Lett* **580**: 4551-4559.

Engel, T., Kannenberg, F., Fobker, M., Nofer, J.R., Bode, G., Lueken, A., Assmann, G., y Seedorf, U. (2007). Expression of ATP binding cassette-transporter ABCG1 prevents cell death by transporting cytotoxic 7beta-hydroxycholesterol. *FEBS Lett* **581**: 1673-1680.

Fadok, V.A., y Chimini, G. (2001). The phagocytosis of apoptotic cells. *Semin Immunol* **13**: 365-372.

Feagin, J.E. (2000) Mitochondrial genome diversity in parasites. *Int J Parasitol* **30**: 371-390.

Feinberg, A.P., y Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132**: 6-13.

Gadsby, D.C., Vergani, P., y Csanady, L. (2006). The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* **440**: 477-483.

Gamarro, F., Chiquero, M.J., Amador, M.V., Legare, D., Ouellette, M., y Castanys, S. (1994). P-glycoprotein overexpression in methotrexate-resistant *Leishmania tropica*. *Biochem Pharmacol* **47**: 1939-1947.

Ganguly, N.K. (2002). Oral miltefosine may revolutionize treatment of visceral leishmaniasis. *TDR News* **68**.

Gelissen, I.C., Harris, M., Rye, K.A., Quinn, C., Brown, A.J., Kockx, M., Cartland, S., Packianathan, M., Kritharides, L., y Jessup, W. (2006). ABCA1 and ABCG1

synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**: 534-540.

Germann, U.A., Chambers, T.C., Ambudkar, S.V., Pastan, I., y Gottesman, M.M. (1995). Effects of phosphorylation of P-glycoprotein on multidrug resistance. *J Bioenerg Biomembr* **27**: 53-61.

Gottesman, M.M., y Pastan, I. (1993). Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* **62**: 385-427.

Graf, G.A., Li, W.P., Gerard, R.D., Gelissen, I., White, A., Cohen, J.C., y Hobbs, H.H. (2002). Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface. *J Clin Invest* **110**: 659-669.

Graf, G.A., Yu, L., Li, W.P., Gerard, R., Tuma, P.L., Cohen, J.C., y Hobbs, H.H. (2003). ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. *J Biol Chem* **278**: 48275-48282.

Gregory, D.J., y Olivier, M. (2005). Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. *Parasitology* **130 Suppl**: S27-35.

Grimaldi, G., Jr., Tesh, R.B., y 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.

Gueiros-Filho, F.J., Viola, J.P., Gomes, F.C., Farina, M., Lins, U., Bertho, A.L., Wirth, D.F., y Lopes, U.G. (1995). *Leishmania amazonensis*: multidrug resistance in vinblastine-resistant promastigotes is associated with rhodamine 123 efflux, DNA amplification, and RNA overexpression of a *Leishmania* *mdr1* gene. *Exp Parasitol* **81**: 480-490.

Guedry, O., Lazard, M., Delort, F., Dauplais, M., Grigoras, I., Blanquet, S., y Plateau, P. (2003). Ycf1p-dependent Hg(II) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **270**: 2486-2496.

Ha, D.S., Schwarz, J.K., Turco, S.J., y Beverley, S.M. (1996). Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* **77**: 57-64.

Handman, E., y Bullen, D.V. (2002). Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol* **18**: 332-334.

Hanson, P.K., y Nichols, J.W. (2001). Energy-dependent flip of fluorescence-labeled phospholipids is regulated by nutrient starvation and transcription factors, PDR1 and PDR3. *J Biol Chem* **276**: 9861-9867.

Hardwick, L.J., Velamakanni, S., y van Veen, H.W. (2007). The emerging pharmacotherapeutic significance of the breast cancer resistance protein (ABCG2). *Br J Pharmacol*.

Harsay, E., y Schekman, R. (2002). A subset of yeast vacuolar protein sorting mutants is blocked in one branch of the exocytic pathway. *J Cell Biol* **156**: 271-285.

Henderson, D.M., Sifri, C.D., Rodgers, M., Wirth, D.F., Hendrickson, N., y Ullman, B. (1992). Multidrug resistance in *Leishmania donovani* is conferred by amplification of a gene homologous to the mammalian mdr1 gene. *Mol Cell Biol* **12**: 2855-2865.

Hendrickson, N., Sifri, C.D., Henderson, D.M., Allen, T., Wirth, D.F., y Ullman, B. (1993). Molecular characterization of the *ldmdr1* multidrug resistance gene from *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* **60**: 53-64.

Henriksen, U., Fog, J.U., Litman, T., y Gether, U. (2005). Identification of intra- and intermolecular disulfide bridges in the multidrug resistance transporter ABCG2. *J Biol Chem* **280**: 36926-36934.

Henriksen, U., Gether, U., y Litman, T. (2005). Effect of Walker A mutation (K86M) on oligomerization and surface targeting of the multidrug resistance transporter ABCG2. *J Cell Sci* **118**: 1417-1426.

Henriques, C., y de Souza, W. (2000). Redistribution of plasma-membrane surface molecules during formation of the *Leishmania amazonensis*-containing parasitophorous vacuole. *Parasitol Res* **86**: 215-225.

Herwaldt, B.L. (1999) Leishmaniasis. *Lancet* **354**: 1191-1199.

Higgins, C.F., Hiles, I.D., Salmond, G.P., Gill, D.R., Downie, J.A., Evans, I.J., Holland, I.B., Gray, L., Buckel, S.D., Bell, A.W., et al. (1986). A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* **323**: 448-450.

Higgins, C.F. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **8**: 67-113.

Higgins, C.F. (2001). ABC transporters: physiology, structure and mechanism-an overview. *Res Microbiol* **152**: 205-210.

Higgins, C.F., y Linton, K.J. (2004). The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 918-926.

Hirst, S.I., y Stapley, L.A. (2000). Parasitology: the dawn of a new millennium. *Parasitol Today* **16**: 1-3.

Hoekstra, M., Kruijt, J.K., Van Eck, M., y Van Berkel, T.J. (2003). Specific gene expression of ATP-binding cassette transporters and nuclear hormone receptors in rat liver parenchymal, endothelial, and Kupffer cells. *J Biol Chem* **278**: 25448-25453.

Holz, C., Hesse, O., Bolotina, N., Stahl, U., y Lang, C. (2002). A micro-scale process for high-throughput expression of cDNAs in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr Purif* **25**: 372-378.

Honjo, Y., Hrycyna, C.A., Yan, Q.W., Medina-Perez, W.Y., Robey, R.W., van de Laar, A., Litman, T., Dean, M., y Bates, S.E. (2001). Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells. *Cancer Res* **61**: 6635-6639.

Horak, J. (2003). The role of ubiquitin in down-regulation and intracellular sorting of membrane proteins: insights from yeast. *Biochim Biophys Acta* **1614**: 139-155.

Houghton, P.J., Germain, G.S., Harwood, F.C., Schuetz, J.D., Stewart, C.F., Buchdunger, E., y Traxler, P. (2004). Imatinib mesylate is a potent inhibitor of the ABCG2 (BCRP) transporter and reverses resistance to topotecan and SN-38 in vitro. *Cancer Res* **64**: 2333-2337.

Hua, Z., Fatheddin, P., y Graham, T.R. (2002). An essential subfamily of Drs2p-related P-type ATPases is required for protein trafficking between Golgi complex and endosomal/vacuolar system. *Mol Biol Cell* **13**: 3162-3177.

Hummel, H.S., Gillespie, R.D., y Swindle, J. (2000). Mutational analysis of 3' splice site selection during trans-splicing. *J Biol Chem* **275**: 35522-35531.

Hyde, S.C., Emsley, P., Hartshorn, M.J., Mimmack, M.M., Gileadi, U., Pearce, S.R., Gallagher, M.P., Gill, D.R., Hubbard, R.E., y Higgins, C.F. (1990). Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* **346**: 362-365.

Ilg, T., Handman, E., y Stierhof, Y.D. (1999). Proteophosphoglycans from *Leishmania* promastigotes and amastigotes. *Biochem Soc Trans* **27**: 518-525.

Ilgoutz, S.C., Mullin, K.A., Southwell, B.R., y McConville, M.J. (1999). Glycosylphosphatidylinositol biosynthetic enzymes are localized to a stable tubular subcompartment of the endoplasmic reticulum in *Leishmania mexicana*. *Embo J* **18**: 3643-3654.

Ilgoutz, S.C., y McConville, M.J. (2001). Function and assembly of the *Leishmania* surface coat. *Int J Parasitol* **31**: 899-908.

Imai, Y., Asada, S., Tsukahara, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T., y Sugimoto, Y. (2003). Breast cancer resistance protein exports sulfated estrogens but not free estrogens. *Mol Pharmacol* **64**: 610-618.

Ivens, A.C., y Peacock, C.S., y Worthey, E.A., y Murphy, L., y Aggarwal, G., y Berriman, M., y Sisk, E., y Rajandream, M.A., y Adlem, E., y Aert, R., y Anupama, A., y Apostolou, Z., y Attipoe, P., y Bason, N., y Bauser, C., y Beck, A., y Beverley, S.M., y Bianchetti, G., y Borzym, K., y Bothe, G., y Bruschi, C.V., y Collins, M., y Cadag, E., y Ciarloni, L., y Clayton, C., y Coulson, R.M., y Cronin, A., y Cruz, A.K., y Davies, R.M., y De Gaudenzi, J., y Dobson, D.E., y Duesterhoeft, A., y Fazelina, G., y Fosker, N., y Frasc, A.C., y Fraser, A., y Fuchs, M., y Gabel, C., y Goble, A., y Goffeau, A., y Harris, D., y Hertz-Fowler, C., y Hilbert, H., y Horn, D., y Huang, Y., y Klages, S., y Knights, A., y Kube, M., y Larke, N., y Litvin, L., y Lord, A., y Louie, T., y Marra, M., y Masuy, D., y Matthews, K., y Michaeli, S., y Mottram, J.C., y Muller-Auer, S., y Munden, H., y Nelson, S., y Norbertczak, H., y Oliver, K., y O'Neil, S., y Pentony, M., y Pohl, T.M., y Price, C., y Purnelle, B., y Quail, M.A., y Rabinowitsch, E., y Reinhardt, R., y Rieger, M., y Rinta, J., y Robben, J., y Robertson, L., y Ruiz, J.C., y Rutter, S., y Saunders, D., y Schafer, M., y Schein, J., y Schwartz, D.C., y Seeger, K., y Seyler, A., y Sharp, S., y Shin, H., y Sivam, D., y Squares, R., y Squares, S., y Tosato, V., y Vogt, C., y Volckaert, G., y Wambutt, R., y Warren, T., y Wedler, H., y Woodward, J., y Zhou, S., y Zimmermann, W., y Smith, D.F., y Blackwell, J.M., y Stuart, K.D., y Barrell, B., y Myler, P.J. (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* **309**: 436-442.

Jackson, P.R., Lawrie, J.M., Stiteler, J.M., Hawkins, D.W., Wohlhieter, J.A., y Rowton, E.D. (1986). Detection and characterization of *Leishmania* species and strains from mammals and vectors by hybridization and restriction endonuclease digestion of kinetoplast DNA. *Vet Parasitol* **20**: 195-215.

Janvilisri, T., Venter, H., Shahi, S., Reuter, G., Balakrishnan, L., y van Veen, H.W. (2003). Sterol transport by the human breast cancer resistance protein (ABCG2) expressed in *Lactococcus lactis*. *J Biol Chem* **278**: 20645-20651.

Janvilisri, T., Shahi, S., Venter, H., Balakrishnan, L., y van Veen, H.W. (2005) Arginine-482 is not essential for transport of antibiotics, primary bile acids and unconjugated sterols by the human breast cancer resistance protein (ABCG2). *Biochem J* **385**: 419-426.

Jonker, J.W., Buitelaar, M., Wagenaar, E., Van Der Valk, M.A., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., Plosch, T., Kuipers, F., Elferink, R.P., Rosing, H., Beijnen, J.H., y

Schinkel, A.H. (2002). The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 15649-15654.

Jonker, J.W., Merino, G., Musters, S., van Herwaarden, A.E., Bolscher, E., Wagenaar, E., Mesman, E., Dale, T.C., y Schinkel, A.H. (2005). The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. *Nat Med* **11**: 127-129.

Kage, K., Tsukahara, S., Sugiyama, T., Asada, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T., y Sugimoto, Y. (2002). Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization. *Int J Cancer* **97**: 626-630.

Kageyama, M., Namiki, H., Fukushima, H., Ito, Y., Shibata, N., y Takada, K. (2005). In vivo effects of cyclosporin A and ketoconazole on the pharmacokinetics of representative substrates for P-glycoprotein and cytochrome P450 (CYP) 3A in rats. *Biol Pharm Bull* **28**: 316-322.

Kamhawi, S., Ramalho-Ortigao, M., Pham, V.M., Kumar, S., Lawyer, P.G., Turco, S.J., Barillas-Mury, C., Sacks, D.L., y Valenzuela, J.G. (2004). A role for insect galectins in parasite survival. *Cell* **119**: 329-341.

Kane, M.M., y Mosser, D.M. (2000) *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Curr Opin Hematol* **7**: 26-31.

Kapler, G.M., Coburn, C.M., y Beverley, S.M. (1990). Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. *Mol Cell Biol* **10**: 1084-1094.

Kennedy, M.A., Venkateswaran, A., Tarr, P.T., Xenarios, I., Kudoh, J., Shimizu, N., and Edwards, P.A. (2001a). Characterization of the human ABCG1 gene: liver X receptor activates an internal promoter that produces a novel transcript encoding an alternative form of the protein. *J Biol Chem* **276**: 39438-39447.

Kennedy, M.A., Barrera, G.C., Nakamura, K., Baldan, A., Tarr, P., Fishbein, M.C., Frank, J., Francone, O.L., y Edwards, P.A. (2005). ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab* **1**: 121-131.

Klucken, J., Buchler, C., Orso, E., Kaminski, W.E., Porsch-Ozcurumez, M., Liebisch, G., Kapinsky, M., Diederich, W., Drobnik, W., Dean, M., Allikmets, R., y Schmitz, G. (2000). ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila white* gene,

is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 817-822.

Kobayashi, A., Takanezawa, Y., Hirata, T., Shimizu, Y., Misasa, K., Kioka, N., Arai, H., Ueda, K., y Matsuo, M. (2006). Efflux of sphingomyelin, cholesterol, and phosphatidylcholine by ABCG1. *J Lipid Res* **47**: 1791-1802.

Krauth-Siegel, R.L., Meiering, S.K., y Schmidt, H. (2003). The parasite-specific trypanothione metabolism of *trypanosoma* and *leishmania*. *Biol Chem* **384**: 539-549.

Krishnamurthy, P., Ross, D.D., Nakanishi, T., Bailey-Dell, K., Zhou, S., Mercer, K.E., Sarkadi, B., Sorrentino, B.P., y Schuetz, J.D. (2004). The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J Biol Chem* **279**: 24218-24225.

Krishnamurthy, P., y Schuetz, J.D. (2005). The ABC transporter Abcg2/Bcrp: role in hypoxia mediated survival. *Biometals* **18**: 349-358.

Krishnamurthy, P., y Schuetz, J.D. (2006). Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **46**: 381-410.

Krishnamurthy, P., Xie, T., y Schuetz, J.D. (2007). The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis. *Pharmacol Ther.*

Kubelt, J., Menon, A.K., Muller, P., y Herrmann, A. (2002). Transbilayer movement of fluorescent phospholipid analogues in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **41**: 5605-5612.

Kunze, I.I., Hensel, G., Adler, K., Bernard, J., Neubohn, B., Nilsson, C., Stoltenburg, R., Kohlwein, S.D., y Kunze, G. (1999). The green fluorescent protein targets secretory proteins to the yeast vacuole. *Biochim Biophys Acta* **1410**: 287-298.

Kusuhara, H., y Sugiyama, Y. (2007). ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family). *Pflugers Arch* **453**: 735-744.

Kyte, J., y Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol* **157**: 105-132.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Landfear, S.M., e Ignatushchenko, M. (2001). The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* **115**: 1-17.

Lane, D. (1988). Antibodies: a laboratory manual: 498-499. *Cold Spring Harbor Laboratory*. Ed. Harlow.

Langheim, S., Yu, L., von Bergmann, K., Lutjohann, D., Xu, F., Hobbs, H.H., y Cohen, J.C. (2005). ABCG5 and ABCG8 require MDR2 for secretion of cholesterol into bile. *J Lipid Res* **46**: 1732-1738.

Lario, A., Gonzalez, A., y Dorado, G. (1997). Automated laser-induced fluorescence DNA sequencing: equalizing signal-to-noise ratios significantly enhances overall performance. *Anal Biochem* **247**: 30-33.

Leandro, C., y Campino, L. (2003). Leishmaniasis: efflux pumps and chemoresistance. *Int J Antimicrob Agents* **22**: 352-357.

LeBowitz, J.H., Coburn, C.M., McMahon-Pratt, D., y Beverley, S.M. (1990). Development of a stable *Leishmania* expression vector and application to the study of parasite surface antigen genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 9736-9740.

LeBowitz, J.H., Smith, H.Q., Rusche, L., y Beverley, S.M. (1993). Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes Dev* **7**: 996-1007.

Lee, M.H., Lu, K., Hazard, S., Yu, H., Shulenin, S., Hidaka, H., Kojima, H., Allikmets, R., Sakuma, N., Pegoraro, R., Srivastava, A.K., Salen, G., Dean, M., y Patel, S.B. (2001). Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nat Genet* **27**: 79-83.

Legare, D., Hetteema, E., y Ouellette, M. (1994). The P-glycoprotein-related gene family in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* **68**: 81-91.

Legare, D., Cayer, S., Singh, A.K., Richard, D., Papadopoulou, B., y Ouellette, M. (2001). ABC proteins of *Leishmania*. *J Bioenerg Biomembr* **33**: 469-474.

Leprohon, P., Legare, D., Girard, I., Papadopoulou, B., y Ouellette, M. (2006). Modulation of *Leishmania* ABC protein gene expression through life stages and among drug-resistant parasites. *Eukaryot Cell* **5**: 1713-1725.

Linton, K.J., y Higgins, C.F. (1998). The Escherichia coli ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol Microbiol* **28**: 5-13.

Lira, R., Sundar, S., Makharia, A., Kenney, R., Gam, A., Saraiva, E., y Sacks, D. (1999). Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. *J Infect Dis* **180**: 564-567.

Lodge, R., y Descoteaux, A. (2005). Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. *Clin Immunol* **114**: 256-265.

Loo, T.W., y Clarke, D.M. (2005). Recent progress in understanding the mechanism of P-glycoprotein-mediated drug efflux. *J Membr Biol* **206**: 173-185.

Lorkowski, S. y Cullen, P. (2002). ABCG subfamily of human ATP-binding cassette proteins. *Pure Appl. Chem* **74** (11):2057-2081.

Lorkowski, S., Kratz, M., Wenner, C., Schmidt, R., Weitkamp, B., Fobker, M., Reinhardt, J., Rauterberg, J., Galinski, E.A., y Cullen, P. (2001). Expression of the ATP-binding cassette transporter gene ABCG1 (ABC8) in Tangier disease. *Biochem Biophys Res Commun* **283**: 821-830.

Lu, H.G., Zhong, L., Chang, K.P., y 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**: 9464-9473.

Lu, K., Lee, M.H., Hazard, S., Brooks-Wilson, A., Hidaka, H., Kojima, H., Ose, L., Stalenhoef, A.F., Mietinnen, T., Bjorkhem, I., Bruckert, E., Pandya, A., Brewer, H.B., Jr., Salen, G., Dean, M., Srivastava, A., y Patel, S.B. (2001). Two genes that map to the STSL locus cause sitosterolemia: genomic structure and spectrum of mutations involving sterolin-1 and sterolin-2, encoded by ABCG5 and ABCG8, respectively. *Am J Hum Genet* **69**: 278-290.

Lux, H., Heise, N., Klenner, T., Hart, D., y Opperdoes, F.R. (2000). Ether-lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether-lipid analogues in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* **111**: 1-14.

Mackenzie, S.M., Brooker, M.R., Gill, T.R., Cox, G.B., Howells, A.J., y Ewart, G.D. (1999). Mutations in the *white* gene of *Drosophila melanogaster* affecting ABC transporters that determine eye colouration. *Biochim Biophys Acta* **1419**: 173-185.

Maliepaard, M., Scheffer, G.L., Faneyte, I.F., van Gastelen, M.A., Pijnenborg, A.C., Schinkel, A.H., van De Vijver, M.J., Scheper, R.J., y Schellens, J.H. (2001). Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res* **61**: 3458-3464.

Mandal, D., Mukherjee, T., Sarkar, S., Majumdar, S., y Bhaduri, A. (1997). The plasma-membrane Ca²⁺-ATPase of *Leishmania donovani* is an extrusion pump for Ca²⁺. *Biochem J* **322** (Pt 1): 251-257.

Mao, Q., y Scarborough, G.A. (1997). Purification of functional human P-glycoprotein expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1327**: 107-118.

Martínez-Calvillo, S., Yan, S., Nguyen, D., Fox, M., Stuart, K., y Myler, P.J. (2003). Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol Cell* **11**: 1291-1299.

- Martínez-Calvillo, S., Nguyen, D., Stuart, K., y Myler, P.J. (2004).** Transcription initiation and termination on *Leishmania major* chromosome 3. *Eukaryot Cell* **3**: 506-517.
- Maser, P., y Kaminsky, R. (1998).** Identification of three ABC transporter genes in *Trypanosoma brucei* spp. *Parasitol Res* **84**: 106-111.
- McConville, M.J., y Homans, S.W. (1992).** Identification of the defect in lipophosphoglycan biosynthesis in a non-pathogenic strain of *Leishmania major*. *J Biol Chem* **267**: 5855-5861.
- McConville, M.J., Mullin, K.A., Ilgoutz, S.C., y Teasdale, R.D. (2002).** Secretory pathway of trypanosomatid parasites. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 122-154; table of contents.
- McDevitt, C.A., Collins, R.F., Conway, M., Modok, S., Storm, J., Kerr, I.D., Ford, R.C., y Callaghan, R. (2006).** Purification and 3D structural analysis of oligomeric human multidrug transporter ABCG2. *Structure* **14**: 1623-1632.
- Menon, A.K. (2002).** Introduction: lipid transport--an overview. *Semin Cell Dev Biol* **13**: 159-162.
- Michels, P.A., Hannaert, V., y Bringaud, F. (2000).** Metabolic aspects of glycosomes in trypanosomatidae - new data and views. *Parasitol Today* **16**: 482-489.
- Mittal, M.K., Rai, S., Ashutosh, Ravinder, Gupta, S., Sundar, S., y Goyal, N. (2007)** Characterization of natural antimony resistance in *Leishmania donovani* isolates. *Am J Trop Med Hyg* **76**: 681-688.
- Miwa, M., Tsukahara, S., Ishikawa, E., Asada, S., Imai, Y., y Sugimoto, Y. (2003).** Single amino acid substitutions in the transmembrane domains of breast cancer resistance protein (BCRP) alter cross resistance patterns in transfectants. *Int J Cancer* **107**: 757-763.
- Miyake, K., Mickley, L., Litman, T., Zhan, Z., Robey, R., Cristensen, B., Brangi, M., Greenberger, L., Dean, M., Fojo, T., y Bates, S.E. (1999).** Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transporter genes. *Cancer Res* **59**: 8-13.
- Moddaber, F. (1993).** Leishmaniasis. Special programme for research and training in tropical diseases. *Tropical Disease Research (TDR) Progress 1991-1992*. TDR Eleventh Programme Report. UNDP/World Bank/WHO.
- Mosmann, T. (1983).** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**: 55-63.
- Mosser, D.M., y Karp, C.L. (1999).** Receptor mediated subversion of macrophage cytokine production by intracellular pathogens. *Curr Opin Immunol* **11**: 406-411.

Mukherjee, A., Padmanabhan, P.K., Singh, S., Roy, G., Girard, I., Chatterjee, M., Ouellette, M., y Madhubala, R. (2007). Role of ABC transporter MRPA, gamma-glutamylcysteine synthetase and ornithine decarboxylase in natural antimony-resistant isolates of *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother* **59**: 204-211.

Muller, M., Klein, I., Kopacsi, S., Remaley, A.T., Rajnavolgyi, E., Sarkadi, B., y Varadi, A. (2006). Co-expression of human ABCG5 and ABCG8 in insect cells generates an androstan stimulated membrane ATPase activity. *FEBS Lett* **580**: 6139-6144.

Mullin, K.A., Foth, B.J., Ilgoutz, S.C., Callaghan, J.M., Zawadzki, J.L., McFadden, G.I., y McConville, M.J. (2001). Regulated degradation of an endoplasmic reticulum membrane protein in a tubular lysosome in *Leishmania mexicana*. *Mol Biol Cell* **12**: 2364-2377.

Murray, H.W., Berman, J.D., Davies, C.R., y Saravia, N.G. (2005). Advances in leishmaniasis. *Lancet* **366**: 1561-1577.

Muskus, C.E., y Marin Villa, M. (2002). [Metacyclogenesis: a basic process in the biology of *Leishmania*]. *Biomedica* **22**: 167-177.

Nakamura, Y., Oka, M., Soda, H., Shiozawa, K., Yoshikawa, M., Itoh, A., Ikegami, Y., Tsurutani, J., Nakatomi, K., Kitazaki, T., Doi, S., Yoshida, H., y Kohno, S. (2005). Gefitinib ("Iressa", ZD1839), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, reverses breast cancer resistance protein/ABCG2-mediated drug resistance. *Cancer Res* **65**: 1541-1546.

Natarajan, P., Wang, J., Hua, Z., y Graham, T.R. (2004). Drs2p-coupled aminophospholipid translocase activity in yeast Golgi membranes and relationship to in vivo function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 10614-10619.

Nichols, J.W. (2002). Internalization and trafficking of fluorescent-labeled phospholipids in yeast. *Semin Cell Dev Biol* **13**: 179-184.

Oldfield, S., Lowry, C., Ruddick, J., y Lightman, S. (2002). ABCG4: a novel human white family ABC-transporter expressed in the brain and eye. *Biochim Biophys Acta* **1591**: 175-179.

Olivier, M., Badaro, R., Medrano, F.J., y Moreno, J. (2003). The pathogenesis of Leishmania/HIV co-infection: cellular and immunological mechanisms. *Ann Trop Med Parasitol* **97 Suppl 1**: 79-98.

Olivier, M., Gregory, D.J., y Forget, G. (2005). Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev* **18**: 293-305.

- Oppendoes, F.R. (1987).** Topogenesis of glycolytic enzymes in *Trypanosoma brucei*. *Biochem Soc Symp* **53**: 123-129.
- Ouellette, M., Fase-Fowler, F., y Borst, P. (1990).** The amplified H circle of methotrexate-resistant *Leishmania tarentolae* contains a novel P-glycoprotein gene. *Embo J* **9**: 1027-1033.
- Ouellette, M., Haimeur, A., Grondin, K., Legare, D., y Papadopoulou, B. (1998a).** Amplification of ABC transporter gene *pgpA* and of other heavy metal resistance genes in *Leishmania tarentolae* and their study by gene transfection and gene disruption. *Methods Enzymol* **292**: 182-193.
- Ouellette, M., Legare, D., Haimeur, A., Grondin, K., Roy, G., Brochu, C., y Papadopoulou, B. (1998b).** ABC transporters in *Leishmania* and their role in drug resistance. *Drug Resist Updat* **1**: 43-48.
- Ouellette, M., Olivier, M., Sato, S., y Papadopoulou, B. (2003).** [Studies on the parasite *Leishmania* in the post-genomic era]. *Med Sci (Paris)* **19**: 900-909.
- Ouellette, M., Drummelsmith, J., y Papadopoulou, B. (2004).** Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Updat* **7**: 257-266.
- Overath, P., Stierhof, Y. y Wiese M. (1997).** Endocytosis and secretion in trypanosomatid parasites-tumultuous traffic in a pocket. *Trends Cell Biol* **7**: 27-33.
- Ozvegy, C., Litman, T., Szakacs, G., Nagy, Z., Bates, S., Varadi, A., y Sarkadi, B. (2001).** Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. *Biochem Biophys Res Commun* **285**: 111-117.
- Ozvegy-Laczka, C., Koblos, G., Sarkadi, B., y Varadi, A. (2005).** Single amino acid (482) variants of the ABCG2 multidrug transporter: major differences in transport capacity and substrate recognition. *Biochim Biophys Acta* **1668**: 53-63.
- Papadopoulou, B., Roy, G., y Ouellette, M. (1992).** A novel antifolate resistance gene on the amplified H circle of *Leishmania*. *Embo J* **11**: 3601-3608.
- Papadopoulou, B., Roy, G., Dey, S., Rosen, B.P., y Ouellette, M. (1994).** Contribution of the *Leishmania* P-glycoprotein-related gene *ltpgpA* to oxyanion resistance. *J Biol Chem* **269**: 11980-11986.
- Papadopoulou, B., Roy, G., Dey, S., Rosen, B.P., Olivier, M., y Ouellette, M. (1996).** Gene disruption of the P-glycoprotein related gene *pgpa* of *Leishmania tarentolae*. *Biochem Biophys Res Commun* **224**: 772-778.
- Paris, C., Loiseau, P.M., Bories, C., y Breard, J. (2004).** Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 852-859.

Parodi-Talice, A., Araújo, J.M., Torres, C., Pérez-Victoria, J.M., Gamarro, F., y Castanys, S. (2003). The overexpression of a new ABC transporter in *Leishmania* is related to phospholipid trafficking and reduced infectivity. *Biochim Biophys Acta* **1612**: 195-207.

Pérez-Victoria, J.M., Parodi-Talice, A., Torres, C., Gamarro, F., y Castanys, S. (2001a). ABC transporters in the protozoan parasite *Leishmania*. *Int Microbiol* **4**: 159-166.

Pérez-Victoria, J.M., Pérez-Victoria, F.J., Parodi-Talice, A., Jiménez, I.A., Ravelo, A.G., Castanys, S., y Gamarro, F. (2001b). Alkyl-lysophospholipid resistance in multidrug-resistant *Leishmania tropica* and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 2468-2474.

Pérez-Victoria, F.J., Castanys, S., y Gamarro, F. (2003a). *Leishmania donovani* resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 2397-2403.

Pérez-Victoria, F.J., Gamarro, F., Ouellette, M., y Castanys, S. (2003b). Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. *J Biol Chem* **278**: 49965-49971.

Pérez-Victoria, F.J., P. Sánchez-Cañete, M., Seifert, K., Croft, S.L., Sundar, S., Castanys, S., y Gamarro, F. (2006a). Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: implications for clinical use. *Drug Resistance Updates* **9**: 26-39.

Pérez-Victoria, F.J., Sánchez-Cañete, M.P., Castanys, S., y Gamarro, F. (2006b). Phospholipid translocation and miltefosine potency require both *L. donovani* miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in *Leishmania* parasites. *J Biol Chem* **281**: 23766-23775.

Pérez-Victoria, J.M., Cortes-Selva, F., Parodi-Talice, A., Bavchvarov, B.I., Perez-Victoria, F.J., Munoz-Martínez, F., Maitrejean, M., Costi, M.P., Barron, D., Di Pietro, A., Castanys, S., y Gamarro, F. (2006c). Combination of suboptimal doses of inhibitors targeting different domains of LtrMDR1 efficiently overcomes resistance of *Leishmania* spp. to Miltefosine by inhibiting drug efflux. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 3102-3110.

Pighin, J.A., Zheng, H., Balakshin, L.J., Goodman, I.P., Western, T.L., Jetter, R., Kunst, L., y Samuels, A.L. (2004). Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter. *Science* **306**: 702-704.

Plemper, R.K., y Wolf, D.H. (1999). Endoplasmic reticulum degradation. Reverse protein transport and its end in the proteasome. *Mol Biol Rep* **26**: 125-130.

Pohl, A., Devaux, P.F., y Herrmann, A. (2005). Function of prokaryotic and eukaryotic ABC proteins in lipid transport. *Biochim Biophys Acta* **1733**: 29-52.

Pomorski, T., Lombardi, R., Riezman, H., Devaux, P.F., van Meer, G., y Holthuis, J.C. (2003). Drs2p-related P-type ATPases Dnf1p and Dnf2p are required for phospholipid translocation across the yeast plasma membrane and serve a role in endocytosis. *Mol Biol Cell* **14**: 1240-1254.

Pomorski, T., Holthuis, J.C., Herrmann, A., y van Meer, G. (2004). Tracking down lipid flippases and their biological functions. *J Cell Sci* **117**: 805-813.

Pomorski, T., y Menon, A.K. (2006). Lipid flippases and their biological functions. *Cell Mol Life Sci* **63**: 2908-2921.

Powderly, W.G. (1994). Resistant candidiasis. *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**: 925-929.

Pozza, A., Perez-Victoria, J.M., Sardo, A., Ahmed-Belkacem, A., y Di Pietro, A. (2006). Purification of breast cancer resistance protein ABCG2 and role of arginine-482. *Cell Mol Life Sci* **63**: 1912-1922.

Raggers, R.J., Pomorski, T., Holthuis, J.C., Kalin, N., y van Meer, G. (2000). Lipid traffic: the ABC of transbilayer movement. *Traffic* **1**: 226-234.

Randak, C., Neth, P., Auerswald, E.A., Assfalg-Machleidt, I., Roscher, A.A., Hadorn, H.B., y Machleidt, W. (1996). A recombinant polypeptide model of the second predicted nucleotide binding fold of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a GTP-binding protein. *FEBS Lett* **398**: 97-100.

Raymond, M., Ruetz, S., Thomas, D.Y., y Gros, P. (1994). Functional expression of P-glycoprotein in *Saccharomyces cerevisiae* confers cellular resistance to the immunosuppressive and antifungal agent FK520. *Mol Cell Biol* **14**: 277-286.

Riffkin, C.D., Chung, R., Wall, D.M., Zalcborg, J.R., Cowman, A.F., Foley, M., y Tilley, L. (1996). Modulation of the function of human MDR1 P-glycoprotein by the antimalarial drug mefloquine. *Biochem Pharmacol* **52**: 1545-1552.

Rijal, S., Yardley, V., Chappuis, F., Decuyper, S., Khanal, B., Singh, R., Boelaert, M., De Doncker, S., Croft, S., and Dujardin, J.C. (2007). Antimonial treatment of visceral leishmaniasis: are current in vitro susceptibility assays adequate for prognosis of in vivo therapy outcome? *Microbes Infect* **9**: 529-535.

Robey, R.W., Steadman, K., Polgar, O., Morisaki, K., Blayney, M., Mistry, P., y Bates, S.E. (2004). Pheophorbide a is a specific probe for ABCG2 function and inhibition. *Cancer Res* **64**: 1242-1246.

Rogers, M.E., Ilg, T., Nikolaev, A.V., Ferguson, M.A., y Bates, P.A. (2004). Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* **430**: 463-467.

Rojas, R., Valderrama, L., Valderrama, M., Varona, M.X., Ouellette, M., y Saravia, N.G. (2006). Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. *J Infect Dis* **193**: 1375-1383.

Rosenberg, M.F., Callaghan, R., Ford, R.C., y Higgins, C.F. (1997). Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis. *J Biol Chem* **272**: 10685-10694.

Rosenberg, M.F., Velarde, G., Ford, R.C., Martin, C., Berridge, G., Kerr, I.D., Callaghan, R., Schmidlin, A., Wooding, C., Linton, K.J., y Higgins, C.F. (2001). Repacking of the transmembrane domains of P-glycoprotein during the transport ATPase cycle. *Embo J* **20**: 5615-5625.

Rosenberg, M.F., Kamis, A.B., Callaghan, R., Higgins, C.F., y Ford, R.C. (2003). Three-dimensional structures of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein demonstrate major conformational changes in the transmembrane domains upon nucleotide binding. *J Biol Chem* **278**: 8294-8299.

Rosenberg, M.F., Callaghan, R., Modok, S., Higgins, C.F., y Ford, R.C. (2005). Three-dimensional structure of P-glycoprotein: the transmembrane regions adopt an asymmetric configuration in the nucleotide-bound state. *J Biol Chem* **280**: 2857-2862.

Ross, D.D., Yang, W., Abruzzo, L.V., Dalton, W.S., Schneider, E., Lage, H., Dietel, M., Greenberger, L., Cole, S.P., y Doyle, L.A. (1999). Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines. *J Natl Cancer Inst* **91**: 429-433.

Ruetz, S., y Gros, P. (1994). Functional expression of P-glycoproteins in secretory vesicles. *J Biol Chem* **269**: 12277-12284.

Ruetz, S., Brault, M., Kast, C., Hemenway, C., Heitman, J., Grant, C.E., Cole, S.P., Deeley, R.G., y Gros, P. (1996). Functional expression of the multidrug resistance-associated protein in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **271**: 4154-4160.

Ruetz, S. (1998). Yeast secretory vesicle system for expression and functional characterization of P-glycoproteins. *Methods Enzymol* **292**: 382-396.

Russell, D.G., Xu, S. y Chakraborty, P (1992). Intracellular trafficking and the parasitophorous vacuole of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. *J Cell Sci* **103**:(Pt 4), 1193-210.

- Russo, R., Laguna, F., Lopez-Velez, R., Medrano, F.J., Rosenthal, E., Cacopardo, B., y Nigro, L. (2003). Visceral leishmaniasis in those infected with HIV: clinical aspects and other opportunistic infections. *Ann Trop Med Parasitol* **97 Suppl 1**: 99-105.
- Rybczynska, M., Liu, R., Lu, P., Sharom, F.J., Steinfels, E., Pietro, A.D., Spitaler, M., Grunicke, H., y Hofmann, J. (2001a). MDR1 causes resistance to the antitumour drug miltefosine. *Br J Cancer* **84**: 1405-1411.
- Rybczynska, M., Spitaler, M., Knebel, N.G., Boeck, G., Grunicke, H., y Hofmann, J. (2001b). Effects of miltefosine on various biochemical parameters in a panel of tumor cell lines with different sensitivities. *Biochem Pharmacol* **62**: 765-772.
- Sacks, D.L., Modi, G., Rowton, E., Spath, G., Epstein, L., Turco, S.J., y Beverley, S.M. (2000). The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 406-411.
- Sanger, F., Nicklen, S., y Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Santa-Rita, R.M., Henriques-Pons, A., Barbosa, H.S., y de Castro, S.L. (2004). Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. *J Antimicrob Chemother* **54**: 704-710.
- Sarkadi, B., Price, E.M., Boucher, R.C., Germann, U.A., y Scarborough, G.A. (1992). Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase. *J Biol Chem* **267**: 4854-4858.
- Sarkadi, B., Ozvegy-Laczka, C., Nemet, K., y Varadi, A. (2004). ABCG2 - a transporter for all seasons. *FEBS Lett* **567**: 116-120.
- Savary, S., Denizot, F., Luciani, M., Mattei, M., y Chimini, G. (1996). Molecular cloning of a mammalian ABC transporter homologous to *Drosophila white* gene. *Mamm Genome* **7**: 673-676.
- Schaible, U.E., Schlesinger, P.H., Steinberg, T.H., Mangel, W.F., Kobayashi, T., y Russell, D.G. (1999). Parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana* acquire macromolecules from the host cell cytosol via two independent routes. *J Cell Sci* **112 (Pt 5)**: 681-693.
- Schmitz, G., Langmann, T., y Heimerl, S. (2001). Role of ABCG1 and other ABCG family members in lipid metabolism. *J Lipid Res* **42**: 1513-1520.
- Schuetzer-Muehlbauer, M., Willinger, B., Egner, R., Ecker, G., y Kuchler, K. (2003). Reversal of antifungal resistance mediated by ABC efflux pumps from *Candida albicans* functionally expressed in yeast. *Int J Antimicrob Agents* **22**: 291-300.

Shahi, S.K., Krauth-Siegel, R.L., y Clayton, C.E. (2002). Overexpression of the putative thiol conjugate transporter TbMRPA causes melarsoprol resistance in *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol* **43**: 1129-1138.

Shapiro, T.A., y Englund, P.T. (1995). The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu Rev Microbiol* **49**: 117-143.

Singh, S., y Sivakumar, R. (2004). Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J Infect Chemother* **10**: 307-315.

Singh, N. (2006) Drug resistance mechanisms in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Indian J Med Res* **123**: 411-422.

Singh, R.K., Pandey, H.P., y Sundar, S. (2006). Visceral leishmaniasis (kala-azar): challenges ahead. *Indian J Med Res* **123**: 331-344.

Sinha, P.K., Pandey, K., y Bhattacharya, S.K. (2005). Diagnosis & management of *Leishmania*/HIV co-infection. *Indian J Med Res* **121**: 407-414.

Sleight, R., y Kent, C. (1983). Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis in mammalian cells. III. Effects of alterations in the phospholipid compositions of Chinese hamster ovary and LM cells on the activity and distribution of CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *J Biol Chem* **258**: 836-839.

Southern, E.M. (1974). An improved method for transferring nucleotides from electrophoresis strips to thin layers of ion-exchange cellulose. *Anal Biochem* **62**: 317-318.

Spath, G.F., Epstein, L., Leader, B., Singer, S.M., Avila, H.A., Turco, S.J., y Beverley, S.M. (2000). Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 9258-9263.

Spath, G.F., Garraway, L.A., Turco, S.J., y Beverley, S.M. (2003). The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 9536-9541.

Staud, F., y Pavek, P. (2005). Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Int J Biochem Cell Biol* **37**: 720-725.

Stefkova, J., Poledne, R., y Hubacek, J.A. (2004). ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol Res* **53**: 235-243.

Stuart, K., y Panigrahi, A.K. (2002). RNA editing: complexity and complications. *Mol Microbiol* **45**: 591-596.

Sundar, S. (2001). Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health* **6**: 849-854.

- Sundar, S., y Rai, M. (2002).** Advances in the treatment of leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* **15**: 593-598.
- Sundar, S., Mehta, H., Suresh, A.V., Singh, S.P., Rai, M., y Murray, H.W. (2004).** Amphotericin B treatment for Indian visceral leishmaniasis: conventional versus lipid formulations. *Clin Infect Dis* **38**: 377-383.
- Sundar, S., y Chatterjee, M. (2006).** Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. *Indian J Med Res* **123**: 345-352.
- Suzuki, M., Suzuki, H., Sugimoto, Y., y Sugiyama, Y. (2003).** ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. *J Biol Chem* **278**: 22644-22649.
- Szabo, K., Bakos, E., Welker, E., Muller, M., Goodfellow, H.R., Higgins, C.F., Varadi, A., y Sarkadi, B. (1997).** Phosphorylation site mutations in the human multidrug transporter modulate its drug-stimulated ATPase activity. *J Biol Chem* **272**: 23165-23171.
- Takahashi, K., Kimura, Y., Nagata, K., Yamamoto, A., Matsuo, M., y Ueda, K. (2005).** ABC proteins: key molecules for lipid homeostasis. *Med Mol Morphol* **38**: 2-12.
- Takano, M., Hasegawa, R., Fukuda, T., Yumoto, R., Nagai, J., y Murakami, T. (1998).** Interaction with P-glycoprotein and transport of erythromycin, midazolam and ketoconazole in Caco-2 cells. *Eur J Pharmacol* **358**: 289-294.
- Teixeira, S.M., y daRocha, W.D. (2003).** Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. *Genet Mol Res* **2**: 148-158.
- Teixeira, M.J., Teixeira, C.R., Andrade, B.B., Barral-Netto, M., y Barral, A. (2006).** Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol* **22**: 32-40.
- Torres, C., Barreiro, L., Dallagiovanna, B., Gamarro, F., y Castanys, S. (1999).** Characterization of a new ATP-binding cassette transporter in *Trypanosoma cruzi* associated to a L1Tc retrotransposon. *Biochim Biophys Acta* **1489**: 428-432.
- Torres, C., Perez-Victoria, F.J., Parodi-Talice, A., Castanys, S., y Gamarro, F. (2004).** Characterization of an ABCA-like transporter involved in vesicular trafficking in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Mol Microbiol* **54**: 632-646.
- Tripathi, A., y Gupta, C.M. (2003).** Transbilayer translocation of membrane phosphatidylserine and its role in macrophage invasion in *Leishmania* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* **128**: 1-9.
- Ullu, E., Matthews, K.R., y Tschudi, C. (1993).** Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts. *Mol Cell Biol* **13**: 720-725.
- Urbina, J.A. (1997).** Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. *Parasitology* **114 Suppl**: S91-99.

Urbina, J.A. (2006). Mechanisms of action of lysophospholipid analogues against trypanosomatid parasites. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **100 Suppl 1**: S9-S16.

van der Luit, A.H., Budde, M., Ruurs, P., Verheij, M., and van Blitterswijk, W.J. (2002). Alkyl-lysophospholipid accumulates in lipid rafts and induces apoptosis via raft-dependent endocytosis and inhibition of phosphatidylcholine synthesis. *J Biol Chem* **277**: 39541-39547.

van Herwaarden, A.E., Wagenaar, E., Karnekamp, B., Merino, G., Jonker, J.W., y Schinkel, A.H. (2006). Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) reduces systemic exposure of the dietary carcinogens aflatoxin B1, IQ and Trp-P-1 but also mediates their secretion into breast milk. *Carcinogenesis* **27**: 123-130.

van Herwaarden, A.E., Wagenaar, E., Merino, G., Jonker, J.W., Rosing, H., Beijnen, J.H., y Schinkel, A.H. (2007). Multidrug transporter ABCG2/breast cancer resistance protein secretes riboflavin (vitamin B2) into milk. *Mol Cell Biol* **27**: 1247-1253.

van Meer, G., Halter, D., Sprong, H., Somerharju, P., y Egmond, M.R. (2006). ABC lipid transporters: extruders, flippases, or floppase activators? *FEBS Lett* **580**: 1171-1177.

van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W., y Laskay, T. (2004). Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol* **173**: 6521-6525.

Vaughan, A.M., y Oram, J.F. (2005). ABCG1 redistributes cell cholesterol to domains removable by high density lipoprotein but not by lipid-depleted apolipoproteins. *J Biol Chem* **280**: 30150-30157.

Venkateswaran, A., Laffitte, B.A., Joseph, S.B., Mak, P.A., Wilpitz, D.C., Edwards, P.A., y Tontonoz, P. (2000). Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 12097-12102.

Vercesi, A.E., Rodrigues, C.O., Catisti, R., y Docampo, R. (2000). Presence of a Na(+)/H(+) exchanger in acidocalcisomes of *Leishmania donovani* and their alkalization by anti-leishmanial drugs. *FEBS Lett* **473**: 203-206.

Vergnes, B., Gourbal, B., Girard, I., Sundar, S., Drummelsmith, J., y Ouellette, M. (2006). A Proteomic screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. *Mol Cell Proteomics*.

Vickerman, K., y Preston, T.M. (1970). Spindle microtubules in the dividing nuclei of trypanosomes. *J Cell Sci* **6**: 365-383.

- Volk, E.L., Farley, K.M., Wu, Y., Li, F., Robey, R.W., y Schneider, E. (2002).** Overexpression of wild-type breast cancer resistance protein mediates methotrexate resistance. *Cancer Res* **62**: 5035-5040.
- Volk, E.L., y Schneider, E. (2003).** Wild-type breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) is a methotrexate polyglutamate transporter. *Cancer Res* **63**: 5538-5543.
- Walton, B.C. (1989).** Leishmaniasis. A worldwide problem. *Int J Dermatol* **28**: 305-307.
- Wanderley, J.L., Benjamin, A., Real, F., Bonomo, A., Moreira, M.E., y Barcinski, M.A. (2005).** Apoptotic mimicry: an altruistic behavior in host/*Leishmania* interplay. *Braz J Med Biol Res* **38**: 807-812.
- Wang, E.J., Lew, K., Casciano, C.N., Clement, R.P., y Johnson, W.W. (2002)** Interaction of common azole antifungals with P glycoprotein. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 160-165.
- Wang, N., Lan, D., Chen, W., Matsuura, F., y Tall, A.R. (2004).** ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 9774-9779.
- Wang, Z., Stalcup, L.D., Harvey, B.J., Weber, J., Chloupkova, M., Dumont, M.E., Dean, M., y Urbatsch, I.L. (2006).** Purification and ATP hydrolysis of the putative cholesterol transporters ABCG5 and ABCG8. *Biochemistry* **45**: 9929-9939.
- Wassef, M.K., Fioretti, T.B., y Dwyer, D.M. (1985).** Lipid analyses of isolated surface membranes of *Leishmania donovani* promastigotes. *Lipids* **20**: 108-115.
- Wasunna, M.K., Rashid, J.R., Mbui, J., Kirigi, G., Kinoti, D., Lodenyo, H., Felton, J.M., Sabin, A.J., Albert, M.J., y Horton, J. (2005).** A phase II dose-increasing study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. *Am J Trop Med Hyg* **73**: 871-876.
- Weise, F., Stierhof, Y.D., Kuhn, C., Wiese, M., y Overath, P. (2000).** Distribution of GPI-anchored proteins in the protozoan parasite *Leishmania*, based on an improved ultrastructural description using high-pressure frozen cells. *J Cell Sci* **113 Pt 24**: 4587-4603.
- White, T.C., Holleman, S., Dy, F., Mirels, L.F., y Stevens, D.A. (2002).** Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 1704-1713.
- Wicky, S., Schwarz, H., y Singer-Kruger, B. (2004).** Molecular interactions of yeast Neo1p, an essential member of the Drs2 family of aminophospholipid translocases, and

its role in membrane trafficking within the endomembrane system. *Mol Cell Biol* **24**: 7402-7418.

Williamson, P., Bevers, E.M., Smeets, E.F., Comfurius, P., Schlegel, R.A., y Zwaal, R.F. (1995). Continuous analysis of the mechanism of activated transbilayer lipid movement in platelets. *Biochemistry* **34**: 10448-10455.

Wincker, P., Ravel, C., Blaineau, C., Pages, M., Jauffret, Y., Dedet, J.P., y Bastien, P. (1996). The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Acids Res* **24**: 1688-1694.

Woehlecke, H., Pohl, A., Alder-Baerens, N., Lage, H., y Herrmann, A. (2003). Enhanced exposure of phosphatidylserine in human gastric carcinoma cells overexpressing the half-size ABC transporter BCRP (ABCG2). *Biochem J* **376**: 489-495.

Wolday, D., Berhe, N., Akuffo, H., y Britton, S. (1999). *Leishmania*-HIV interaction: immunopathogenic mechanisms. *Parasitol Today* **15**: 182-187.

Wu, W.I., y Voelker, D.R. (2002). Biochemistry and genetics of interorganelle aminoglycerophospholipid transport. *Semin Cell Dev Biol* **13**: 185-195.

Wu, C.P., Klokouzas, A., Hladky, S.B., Ambudkar, S.V., y Barrand, M.A. (2005). Interactions of mefloquine with ABC proteins, MRP1 (ABCC1) and MRP4 (ABCC4) that are present in human red cell membranes. *Biochem Pharmacol* **70**: 500-510.

Xu, J., Liu, Y., Yang, Y., Bates, S., y Zhang, J.T. (2004). Characterization of oligomeric human half-ABC transporter ATP-binding cassette G2. *J Biol Chem* **279**: 19781-19789.

Yao, C., Donelson, J.E., y Wilson, M.E. (2003). The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol Biochem Parasitol* **132**: 1-16.

Yeates, C. (2002). Sitamaquine (GlaxoSmithKline/Walter Reed Army Institute). *Curr Opin Investig Drugs* **3**: 1446-1452.

Zaman, G.J., Lankelma, J., van Tellingen, O., Beijnen, J., Dekker, H., Paulusma, C., Oude Elferink, R.P., Baas, F., y Borst, P. (1995). Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 7690-7694.

Zhang, J.T. (2001). The multi-structural feature of the multidrug resistance gene product P-glycoprotein: implications for its mechanism of action (hypothesis). *Mol Membr Biol* **18**: 145-152.

Zhou, D., Hardt, W.D., y Galan, J.E. (1999). *Salmonella typhimurium* encodes a putative iron transport system within the centisome 63 pathogenicity island. *Infect Immun* **67**: 1974-1981.

Zwaal, R.F., y Schroit, A.J. (1997). Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* **89**: 1121-1132.

APÉNDICE

A novel ATP-binding cassette transporter from *Leishmania* is involved in transport of phosphatidylcholine analogues and resistance to alkyl-phospholipids

Esther Castanys-Muñoz,¹ Nele Alder-Baerens,²
Thomas Pomorski,^{2**} Francisco Gamarro^{1†} and
Santiago Castanys^{1*†}

¹Instituto de Parasitología y Biomedicina 'López-Neyra',
C.S.I.C., Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud,
Avda. del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada,
Spain.

²Institute of Biology/Biophysics, Humboldt University of
Berlin, Invalidenstr., 42, 10115 Berlin, Germany.

Summary

ATP-binding cassette (ABC) transporters represent an important family of membrane proteins involved in drug resistance and other biological activities. The present work reports the characterization of the first ABC subfamily G (ABCG)-like transporter, LiABCG4, in the protozoan parasite *Leishmania*. LiABCG4 localized mainly to the parasite plasma membrane. Overexpression of this half-transporter reduced the accumulation of phosphatidylcholine analogues and conferred resistance to alkyl-phospholipids. Likewise, when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*, the protein localized to the yeast plasma membrane and conferred resistance to alkyl-phospholipids. Post-Golgi secretory vesicles isolated from a LiABCG4-overexpressing yeast mutant contained the leishmanial ABC transporter and exhibited ATP-dependent, vanadate-sensitive transport of phosphatidylcholine analogues from the cytosolic to the luminal leaflet of the vesicle membrane. Cross-linking showed dimerization of LiABCG4. These results suggest that LiABCG4 is involved in the active transport of phosphatidylcholine and resistance to alkyl-phospholipids in *Leishmania*.

Introduction

Leishmania is a pathogenic, kinetoplastid, protozoan parasite, responsible for leishmaniasis, a widespread disease that cause a range of diseases in man varying from cutaneous self-healing lesions to visceral disease, fatal if left untreated (Croft *et al.*, 2006). Leishmaniasis is one of the neglected diseases included in the World Health Organization's list of the top guns of antimicrobial resistance (<http://www.who.int/infectious-disease-report/2000/ch4.htm>). Around 350 million people are at risk of infection, with an estimated annual incidence of 2 million, and around 70 000 deaths per year (Murray *et al.*, 2005). In the absence of effective vaccines against the parasite, disease control is primarily based on chemotherapy treatment, especially on pentavalent antimonials, but resistance and toxicity are constant problems that limit their use (Croft and Coombs, 2003). The current situation for the chemotherapy of leishmaniasis has been considerably improved with the development of miltefosine (hexadecylphosphocholine) (Berman, 2005), and newer formulations of existing drugs, as liposomal amphotericin B. However, resistance against miltefosine and alkyl-glycerophospholipid has recently been described due to mutations of a P-type ATPase from the aminophospholipid translocase subfamily (Perez-Victoria *et al.*, 2003a) as well as overexpression of membrane proteins such as ATP-binding cassette (ABC) proteins (Perez-Victoria *et al.*, 2001).

ATP-binding cassette transporters are members of a family of membrane proteins that mediate the ATP-driven unidirectional transport of a variety of molecules across biological membranes (Higgins, 1992). Substrates include sugars, amino acids, peptides, proteins, metals (in)organic ions, toxins and chemotherapeutic drugs. The essential structural requirements for an active ABC transporter seem to be two hydrophobic domains, each containing five to eight transmembrane helices, and two ATP-binding domains necessary for ATP hydrolysis. ABC proteins can be organized either as full transporters containing two transmembrane domains and two nucleotide-binding domains (full-size ABC transporter), or as half-transporters containing only one of each domain encoded

Accepted 1 February, 2007. For correspondence. *E-mail castanys@ipb.csic.es; Tel. (+34) 958181666; Fax (+34) 958181632 or **E-mail thomas.pomorski@rz.hu-berlin.de; Tel. (+49) 30 20938326; Fax (+49) 30 20938585. †S. Castanys and F. Gamarro are equal senior investigators in this study.

© 2007 The Authors
Journal compilation © 2007 Blackwell Publishing Ltd

2 E. Castanys-Muñoz et al.

on the same molecule. Half-transporters are thought to require dimerization to constitute functional transporters (Krishnamurthy and Schuetz, 2006).

First hints for a role of some ABC family members in the transport of lipids across cellular membranes came from the finding that phosphatidylcholine (PC) secretion into mouse bile required ABCB4 (Smit *et al.*, 1993) and that this liver transporter enhanced transport of newly synthesized PC to the surface of transgenic fibroblasts (Smith *et al.*, 1994). A closely related human ABC transporter, ABCB1, and its functional counterparts in *Saccharomyces cerevisiae*, translocate various short-chain lipid analogues to the outer leaflet of the plasma membrane (PM) (van Helvoort *et al.*, 1996; Decottignies *et al.*, 1998) and the overexpression of these transporters causes endogenous aminophospholipids to accumulate at the cell surface (Pomorski *et al.*, 2003).

Similarly, members of the ABCG subfamily have been associated with cellular lipid transport and homeostasis (Pohl *et al.*, 2005; van Meer *et al.*, 2006). Members of this subfamily have the characteristics of half-transporters and are unique in their domain architecture, as they contain a single nucleotide-binding domain, located at the N-terminus, and a single transmembrane domain, located at the C-terminus. ABCG5 and ABCG8, which are highly expressed in epithelial cells of the intestine and probably act as a heterodimer (Graf *et al.*, 2003), have been linked to the efflux of plant sterols and cholesterol into bile (Langheim *et al.*, 2005), while ABCG1 and ABCG4 are held responsible for transport of cholesterol onto high-density lipoprotein particles (Klucken *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004). Elevated levels of ABCG2 results in resistance of various cancer cell lines to antitumour drugs, including mitoxantrone, topotecan, daunorubicin, doxorubicin and bisantrene (Ross *et al.*, 1999). It is also thought that endogenous lipids and lipids derivatives might be naturally substrates of ABCG2 (Sarkadi *et al.*, 2004). Recently, an ABCG-like subfamily member in *Arabidopsis* has been described to be involved in wax secretion on the stem surface (Pighin *et al.*, 2004).

The completion of the *Leishmania* genome sequence (Ivens *et al.*, 2005) has permitted the elaboration of a complete inventory of the ABC proteins found in *Leishmania*, a total of 42 proteins belonging to all subfamilies (from ABCA to ABCH) found in eukaryotes (Leprohon *et al.*, 2006). To date, only ABC transporters related to the human ABCB, ABCC and ABCA subfamilies have been described in *Leishmania* (Parodi-Talice *et al.*, 2003; Ouellette *et al.*, 2004; Araujo-Santos *et al.*, 2005; Perez-Victoria *et al.*, 2006a). In this work, we report the characterization of *LiABCG4* gene in *Leishmania infantum*, which encodes an ABCG-like transporter localized in the PM of the parasite. *LiABCG4* appears to have PC, alkyl-glycerophosphocholine and miltefosine as potential

substrates, and seems to be responsible for their active outward transport from the cytoplasmic to the exoplasmic leaflet of the parasite PM.

Results

Molecular characterization and expression analysis of LiABCG4

Putative members of the ABCG gene subfamily of transporters have been identified in the *L. infantum* genome database using the GeneDB omniBLAST server against the human ABCG2 gene. One tandem repeated gene has been found in chromosome 6; three more are localized in chromosomes 15, 23 and 36. The results obtained are further corroborated by a recently published classification of *Leishmania* ABC proteins (Leprohon *et al.*, 2006). The present work focuses on the characterization of the ABCG-like gene from chromosome 15, named *LiABCG4* according to the classification of Leprohon *et al.* (2006). *LiABCG4* (GenDB-*L. infantum*, Accession Code Lin J15.0940) codes for a 741-amino-acid protein with a predicted molecular weight of approximately 83 kDa. Sequences database search using the FASTA algorithm showed that *LiABCG4* matches with the ABCG/white subfamily of transporters. *LiABCG4* shares 25.7% amino acid identity with human ABCG1, 22.4% with human ABCG2, 26.4% with the *Drosophila white* gene and 20% with ADP1 from yeast. The nucleotide-binding domain (the most conserved regions of these proteins) of *LiABCG4* was found to have 50% identity with ABCG1 and ABCG2. Hydrophobicity plots of *LiABCG4* showed a structure similar to other ABCG subfamily proteins. Analysis of the deduced amino acid sequence and prediction of the secondary structure indicated that *LiABCG4* is a 'half-transporter', with a single nucleotide-binding domain, localized at the N-terminus of the protein, and a single transmembrane domain. To study functional aspects of the *LiABCG4* transporter, *Leishmania* parasites overexpressing *LiABCG4* were obtained. *LiABCG4* was transfected into *L. infantum* using specific *Leishmania* expression plasmids containing the natural 5' and 3' non-coding regions of *LiABCG4*, as it is known that untranslated regions (UTRs) usually determine the expression efficiency or stability of mRNA in *Leishmania*. To obtain parasites overexpressing non-functional *LiABCG4*, a lysine residue in the Walker A motif of the ATP-binding domain was mutated to methionine (K98M). The resulting construction was renamed *LiABCG4/mut-pX*. Northern blot analysis showed similar expression level of a major transcript of more than 4.4 kb in parasites transfected both with the *LiABCG4-pX* or *LiABCG4/mut-pX* constructs (Fig. S1), but parasites transfected with the empty vector (mock) showed low expression levels and an overexposure is required to detect the transcript (data not shown).

3

4

5

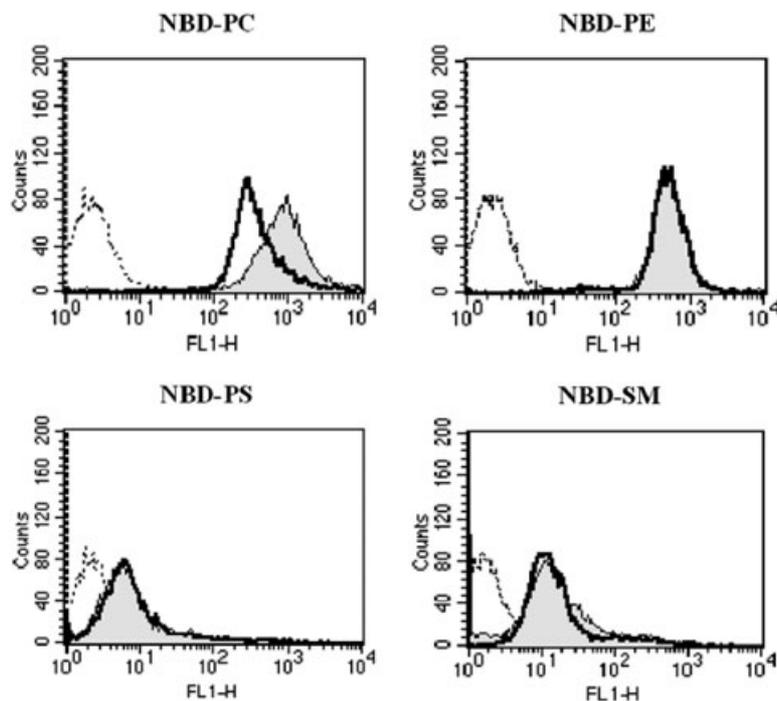


Fig. 1. Fluorescent phospholipid accumulation in *Leishmania* parasites. Parasites were incubated with NBD-PC, NBD-PE, NBD-PS or NBD-SM for 30 min at 28°C. After washing, cell-associated fluorescence was measured by flow cytometry. A representative histogram is shown for each NBD-lipid. The grey histogram represents mock-transfected cells, the uncoloured histogram represents those of *LiABCG4*-transfected parasites and the dotted line represents non-labelled cells. Data for the *LiABCG4*/mut construct have been omitted, as its histogram is overlapped with the mock one.

12

Fluorescent phospholipid uptake in parasites overexpressing *LiABCG4*

To study the possible role of *LiABCG4* in lipid transport, we investigated the internalization of fluorescent phospholipids. Parasites were incubated with 1-Palmitoyl-2-[6-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]hexanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (NBD-PC), -phosphoethanolamine (NBD-PE), -phosphoserine (NBD-PS) and 6-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino-hexanoyl-sphingosine-1-phosphocholine (NBD-sphingomyelin; NBD-SM) for 30 min at 28°C and the cell-associated fluorescence was analysed by flow cytometry. To block the catabolism of NBD-lipids, phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) was added. Under these conditions, the accumulation of the NBD-PC was significantly lower (2.26 ± 0.25 for NBD-PC, $n = 4$, $P < 0.005$) in *LiABCG4*-overexpressing cells when compared with mock-transfected parasites (Fig. 1). No significant differences were observed for NBD-PE, NBD-PS and NBD-SM between control and *LiABCG4*-overexpressing cells (ratios of accumulated NBD-lipids between control and *LiABCG4*-expressing cells were 1.09 ± 0.17 for NBD-PE, $n = 4$; 1.06 ± 0.07 for NBD-PS, $n = 4$; and 1.18 ± 0.16 for NBD-SM, $n = 4$). Similar results were obtained when lipid internalization experiments were performed in the presence of diisopropylfluorophosphate (DFP), a more efficient inhibitor of NBD-lipid catabolism (Araujo-Santos *et al.*, 2003). Moreover, promastigotes overexpressing the mutated form of *LiABCG4*(K98M) showed similar behaviour as control parasites (data not shown). In addition, no differences were observed

between mock- and *LiABCG4*-transfected parasites in the uptake of FM4-64, an endocytic marker, which allowed visualization of membrane traffic from the PM and the flagellar pocket to the multivesicular network (data not shown). Taken together, these results suggest that the activity of *LiABCG4* affects specifically the accumulation of NBD-PC by an enhanced outward transport of this lipid across the PM.

Drug sensitivity profiles of *Leishmania* overexpressing *LiABCG4*

As some ABC transporters are involved in drug resistance in *Leishmania*, we tested whether *LiABCG4* overexpression could confer resistance to various drugs. Different unrelated drugs were tested including some antileishmanial agents (sitamaquine and ketoconazole), alkyl-phospholipid analogues (miltefosine, edelfosine and perifosine), and other known substrates of ABCG transporters such as mitoxantrone and daunomycin (Table 1). Parasites overexpressing *LiABCG4* were about twofold more resistant than the mock-transfected parasites to miltefosine, edelfosine and perifosine, indicating that alkyl-phospholipid analogues are possible substrates for *LiABCG4*. Overexpression of *LiABCG4* conferred resistance also to the quinoline sitamaquine but did not affect the susceptibility to ketoconazole, mitoxantrone and daunomycin. Promastigotes overexpressing the mutated form of *LiABCG4*(K98M) showed similar behaviour as mock-transfected parasites.

Table 1. Drug-resistance profile in *L. infantum* promastigotes overexpressing LiABCG4.

	Mock	LiABCG4	LiABCG4/mut	GFP-LiABCG4	RI
Miltefosine	7.0 ± 0.6	14.2 ± 1.1	6.9 ± 0.7	14.6 ± 0.2	2.2*
Edelfosine	4.3 ± 0.6	8.0 ± 1	4.4 ± 0.1	7.9 ± 0.9	1.9*
Perifosine	2.1 ± 0.5	4.2 ± 0.6	2.2 ± 0.1	4.5 ± 0.8	2.0*
Sitamaquine	13.0 ± 0.9	22.9 ± 3.4	N/D	N/D	1.8*
Ketoconazole	16.3 ± 1.3	19.3 ± 2.0	N/D	N/D	1.2
Mitoxantrone	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	N/D	N/D	1.3
Daunomycin	4.4 ± 1.1	4.3 ± 1.1	N/D	N/D	1

Parasites were grown as described under *Experimental procedures* for 72 h at 28°C in the presence of increasing concentrations of drugs. Subsequently, cell viability was determined using a MTT-based assay. Results are expressed as the drug concentration (μM) necessary to inhibit the parasites growth by 50% (IC50). Data are the means ± SD of six independent experiments. Significant differences compared with parasites harbouring the pX control vector were determined by Student's *t*-test (**P* < 0.001). Resistance index (RI) was calculated by dividing IC50 of LiABCG4-overexpressing parasites by that of mock-transfected parasites. N/D, non-determined.

Miltefosine accumulation and efflux in *Leishmania* promastigotes overexpressing LiABCG4

To corroborate that LiABCG4 would recognize alkyl-phospholipid analogues as possible substrates, the intracellular accumulation of miltefosine from the medium was measured. ¹⁴C-labelled miltefosine was added to the culture medium and parasites incubated at 28°C. At different time points, cells were separated from the medium by centrifugation, and the cell-associated radioactivity was determined. As shown in Fig. 2A, mock-transfected parasites rapidly accumulated [¹⁴C]-miltefosine reaching saturation in about 6 h. In contrast, parasites overexpressing LiABCG4 displayed a reduction in [¹⁴C]-miltefosine accumulation at any time point measured, and the initial transport rate was reduced by twofold compared with control mock-transfected parasites, consistent with an enhanced outward transport of miltefosine across the PM, probably due to LiABCG4. In fact, when parasites were loaded with [¹⁴C]-miltefosine and then incubated in drug-free medium for 60 min, a 60% and 40% of the initial accumulated drug were retained in mock- and LiABCG4-transfected parasites respectively (Fig. 2B).

Localization of LiABCG4 in *Leishmania* promastigotes

To determine the subcellular localization of LiABCG4, green fluorescent protein (GFP) chimeras were created, using the pXG-GFP+2 and pXG-GFP+ vectors, which allowed us to obtain N- and C-terminus tagged versions of the protein. Expression was determined by Northern and Western blots techniques (Figs S1 and Fig. 3A). During the selection process of chimeras, high levels of expression were achieved even with the minimum concentration of selectable drug (25 μg ml⁻¹) (data not shown).

Localization studies of GFP-LiABCG4- and LiABCG4-GFP-transfected promastigotes by fluorescence microscopy demonstrated that the protein was, in both cases, mainly localized at the PM of the parasites, and associated

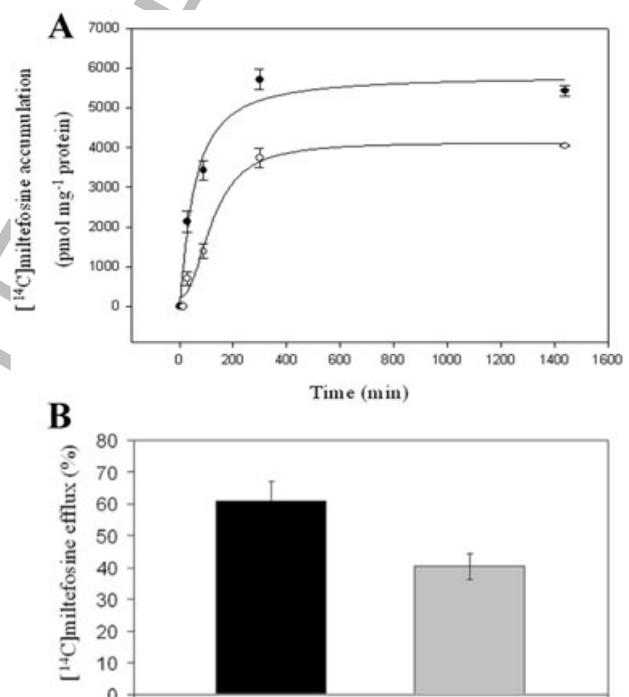


Fig. 2. A. Miltefosine accumulation in *Leishmania* parasites. Mock (filled circles) and LiABCG4-overexpressing promastigotes (open circles) were incubated with [¹⁴C]-miltefosine as described under *Experimental procedures*. At various time points, parasites were chilled on ice and washed with cold PBS containing 10 mg ml⁻¹ BSA. Radioactivity associated with the cells was quantified and normalized to the protein concentration. The data are the means ± SD of duplicate determinations in a representative experiment out of three independent experiments.

B. Miltefosine efflux in *Leishmania* parasites. Mock (black bars) and LiABCG4-overexpressing promastigotes (grey bars) were incubated with [¹⁴C]-miltefosine at 28°C, washed and incubated for 60 min at 28°C in medium containing 10 mg ml⁻¹ BSA to extract miltefosine localized on the cell surface. Then, the radioactivity retained in parasites was measured. The data are expressed as percentage of the initial amount of [¹⁴C]-miltefosine incorporated (in pmol mg⁻¹) and represent the means ± SD from duplicate determinations of three independent experiments. Significant differences compared with parasites harbouring the pX control vector were determined by Student's *t*-test (**P* < 0.01).

6

13

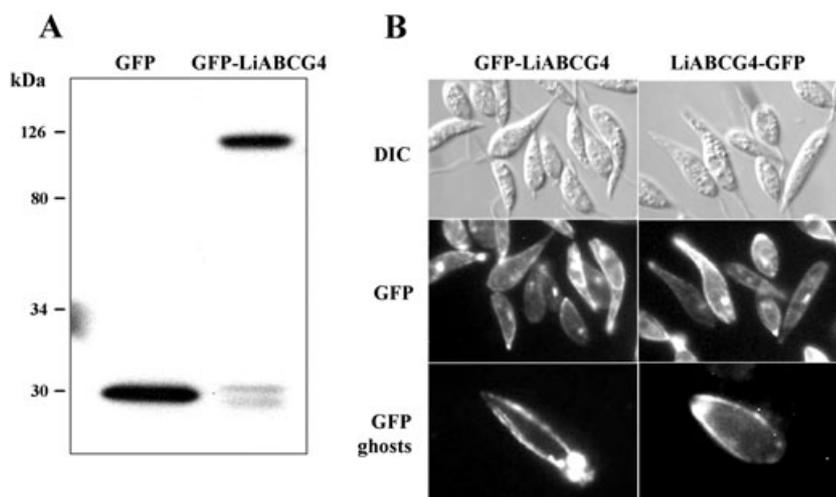


Fig. 3. Localization of LiABCG4 in *Leishmania* parasites.

A. Western blot analysis of GFP mock-transfected parasites and GFP-LiABCG4-expressing parasites. The blots were stained with anti-GFP antibody. The positions of the pre-stained markers are indicated on the left.

B. Fluorescence microscopy analysis of *L. infantum* promastigotes overexpressing LiABCG4 tagged with GFP fusions at N-terminus (GFP-LiABCG4) or C-terminus (LiABCG4-GFP). Top: differential interference contrast images (DIC). Central: fluorescence images showing GFP fluorescence predominately at the PM and the flagellar pocket. Bottom: fluorescence images of deflagellated ghosts prepared by hypotonic shock; GFP fluorescence is still associated with the PM.

with the flagellar pocket (Fig. 3B). This localization was supported by obtaining 'ghost' parasites in which the protein could still be observed at the PM. Functional studies revealed that LiABCG4 tagged with GFP at the C-terminus was not functional. On the contrary, tagging at the N-terminus did not interfere with function, as parasites overexpressing LiABCG4 displayed a similar level of resistance to miltefosine, edelfosine and perifosine as parasites expressing untagged LiABCG4 (Table 1).

Heterologous expression and localization of LiABCG4 in *S. cerevisiae* *sec6-4Δdrs2Δdnf3*

For heterologous expression of LiABCG4 in *S. cerevisiae*, the *LiABCG4* gene was cloned into a yeast expression vector under the control of the Cu²⁺-inducible *CUP1* promoter and tagged with FLAG at the N-terminus and 6xHis at the C-terminus. The resulting construct or the vector alone was used to transform the late secretory mutant *sec6-4Δdrs2Δdnf3*. This mutant grows like wild-type cells at 27°C, but growth ceases at 38°C and the cells accumulate large amounts of secretory vesicles (SVs) that lack an ATP-dependent phospholipid transport activity (Alder-Baerens *et al.*, 2006), thereby providing an extremely valuable expression system for functional analysis of candidate ATP-dependent lipid flippases from other eukaryotes.

The expression of the dual-tagged LiABCG4 was investigated by immunoblotting of crude membrane extracts. Using either His or FLAG antibodies, a band of approximately 85 kDa, corresponding to the heterologous dual-tagged transporter, was detected in samples from Cu²⁺-induced cells harbouring *LiABCG4*/pYEX but not from cells harbouring the pYEX control vector or grown in the absence of CuSO₄ (Fig. 4A and data not shown). Fractionation of membranes on a sucrose gradient revealed that the bulk of the dual-tagged LiABCG4 colocalizes with

markers for endoplasmic reticulum (ER) (Dpm1p) and PM (Sso2p) (Fig. 4B).

Expression of LiABCG4 reduced slightly the sensitivity of cells to alkyl-phospholipids (miltefosine, edelfosine and perifosine) further supporting our conclusion that LiABCG4 functions as a pump for alkyl-phospholipid analogues (Fig. S2).

Expression of LiABCG4 in SVs of yeast cells

Next, we determined whether overexpressed LiABCG4 could be detected in accumulated SVs. To this end, *sec6-4Δdrs2Δdnf3* cells were grown at 27°C, shifted to 38°C for 90 min, lysed and then subjected to differential centrifugation including a 500 g and a 13 000 g spin to remove most of the ER, nuclei, vacuoles, mitochondria and PM. Next, a high-speed (100 000 g) membrane pellet enriched in SVs was collected and analysed by fractionation on a Nycodenz gradient. Western blot analysis revealed that the fractionation profile of LiABCG4 in gradients of 38°C-shifted cells clearly differed from that of 27°C-grown cells: specifically, in the gradient from 38°C-shifted cells, the bulk of LiABCG4 migrated to a lower-density region containing the peak of the major PM ATPase, Pma1p (Fig. 5A). Moreover, the 38°C gradient contained significantly more LiABCG4 and Pma1p than the 27°C gradient. These findings indicate that the yeast mutant accumulates at 38°C large amounts of SVs containing LiABCG4.

To further verify the presence of LiABCG4 in these vesicles, we immunisolated Pma1p-containing membranes from the 38°C gradient peak fractions (11–13 of the Nycodenz gradient in Fig. 5A). Using protein G-coupled magnetic beads loaded with antibody recognizing the HA-tagged N-terminus of Pma1p, we could isolate about 20% of Pma1p-HA and LiABCG4 present in the peak fractions (Fig. 5B). Pre-incubation of beads with

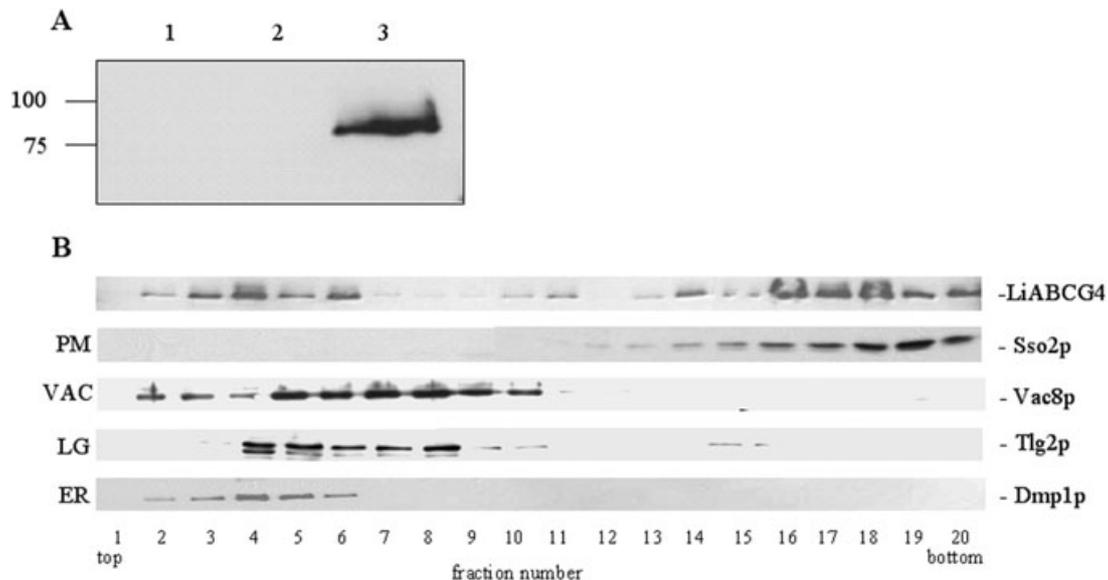


Fig. 4. Expression and localization of LiABCG4 in *S. cerevisiae*.

A. Immunoblots containing equal amounts of total-protein extracts prepared from *S. cerevisiae* strain *sec6-4Δdrs2Δdnf3* transformed with a control vector (pYEX; lane 1) or a vector containing the *LiABCG4* gene (*LiABCG4/pYEX*; lanes 2 and 3). Cells were grown at 27°C in selective SD medium containing 0 or 100 μM CuSO₄ (lane 2 and lane 3 respectively). Blots were stained with anti-His antibody. The positions of the pre-stained markers are indicated on the left.

B. Sucrose gradient fractionation of membranes. A high-speed membrane pellet (100 000 g) prepared from *sec6-4Δdrs2Δdnf3* cells expressing dual-tagged LiABCG4 was fractionated on a sucrose density gradient. Gradient fractions were assayed by immunoblotting using antibodies against several organellar markers. An anti-His antibody was used to detect dual-tagged LiABCG4. PM, plasma membrane; VAC, vacuolar membrane; LG, late Golgi; ER, endoplasmic reticulum.

a peptide corresponding to the HA epitope efficiently blocked the binding of Pma1p and LiABCG4-containing membranes to the beads, demonstrating the specificity of the immunoisolation procedure. These results are consistent with incorporation of LiABCG4 into SVs.

To evaluate the ability of LiABCG4 to dimerize, we performed chemical cross-linking experiments as an indirect method for assessing dimerization. Treatment of SV-enriched membranes from 38°C-shifted *sec6-4Δdrs2Δdnf3* with 1,6-bis-maleimidohexane (BMH) produced a high-molecular-weight protein (~170 kDa) detected with anti-FLAG antibodies, suggesting that LiABCG4 forms a dimer (Fig. 5C).

LiABCG4-mediated lipid transport in SVs

Secretory vesicle-enriched membranes from 38°C-shifted *sec6-4Δdrs2Δdnf3* cells expressing LiABCG4 were next analysed for ATP-dependent NBD-lipid transport activity using a bovine serum albumin (BSA) back-extraction assay. To this end, membranes were labelled with NBD-lipids and incubated at 25°C in the presence or absence of ATP. At regularly time points, two aliquots of each sample were taken and mixed with buffer containing fatty acid-free BSA to extract NBD-lipids from the cytosolic leaflet or buffer without BSA. Extraction of NBD-lipids by BSA causes a decrease in the total fluorescence of the

sample because NBD-lipid bound to BSA has a 1.8-fold lower quantum yield than membrane-bound NBD-lipid. Thus, the amount of BSA-extractable probe can be determined without physical separation of vesicles from BSA by measuring the reduction in NBD fluorescence emission (Alder-Baerens *et al.*, 2006). The extent of fluorescence reduction can then be used to calculate the percentage of NBD-lipid in the cytosolic leaflet. NBD-PC incubated with SV-enriched membranes in the absence of ATP slowly moved from the cytosolic to the luminal leaflet reaching a 80:20 distribution in 2 h. In the presence of ATP, NBD-PC disappeared more rapidly from the cytosolic leaflet leading to a 70:30 distribution in 2 h whereas transbilayer movement of NBD-PE, -PS and -SM was unaffected by ATP (Fig. 6A). The PC-specific transport activity was inhibited by vanadate (Fig. 6B) and was absent in membranes isolated from 38°C-shifted *sec6-4Δdrs2Δdnf3* cells with the vector alone lacking *LiABCG4*. Taken together, these results support a role of LiABCG4 in the outward directed transport of PC from the cytosolic leaflet to the exoplasmic membrane leaflet.

Discussion

Transporters of the human ABCG subfamily are important contributors to cellular lipid homeostasis and have been implicated in the development of drug resistance. In this

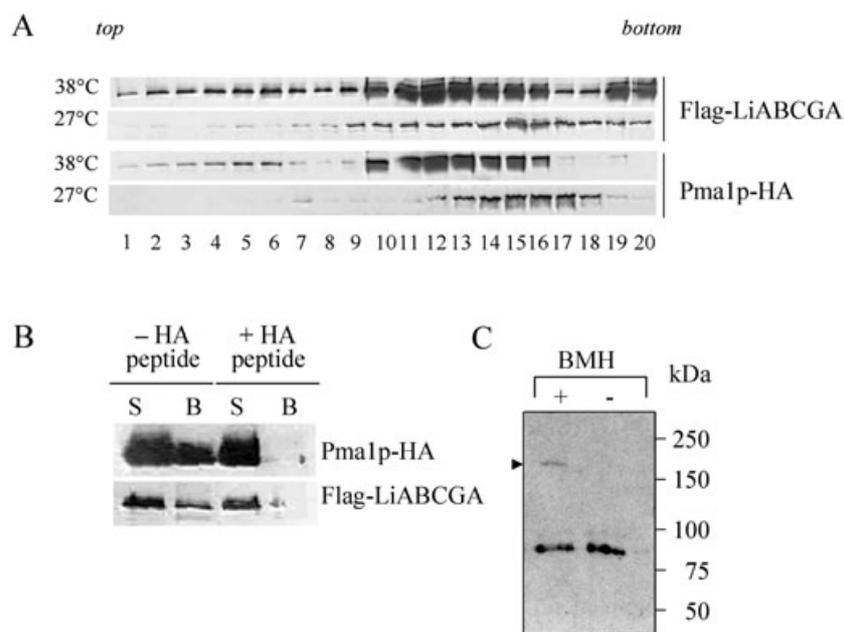


Fig. 5. Expression of LiABCG4 in SVs of *S. cerevisiae*.

A. Gradient fractionation of SVs accumulated in *S. cerevisiae* strain *sec6-4Δdrs2Δdnf3*. Membranes enriched in SVs were prepared from temperature-shifted (38°C) and non-shifted (27°C) cells expressing LiABCG4 by differential centrifugation, loaded on the bottoms of a linear Nycodenz/sorbitol gradient and then floated to equilibrium by centrifugation. Fractions were collected from the top and analysed by immunoblotting. Immunoblots were stained with a monoclonal antibody against the HA epitope to detect HA-tagged Pma1p and with polyclonal antibodies against the FLAG epitope to detect Flag/6xHis-tagged LiABCG4. The density profiles were similar for both gradients (not shown). **B.** Aliquots from the Pma1p-containing peak fractions (11–13) of the temperature-shifted *sec6-4Δdrs2Δdnf3* Nycodenz gradient were used to immunisolate Pma1p-containing vesicles with anti-HA monoclonal antibodies (α HA) bound to Dynabeads protein G. In one reaction, the beads were pre-incubated with a peptide corresponding to the HA epitope to control for the specificity of the immunisolation procedure (+HA peptide). Membranes bound to the beads (B) or collected from the supernatant (S) were analysed by immunoblotting using antibodies against HA-tagged Pma1p and Flag/6xHis-tagged LiABCG4. **C.** SV-enriched membranes from 38°C-shifted *sec6-4Δdrs2Δdnf3* cells were or were not treated with BMH. The cross-linked products were analysed by immunoblotting using polyclonal antibodies against the FLAG epitope. Dimerization of LiABCG4 is suggested by a high-molecular-weight band detected following exposure to BMH (arrowhead). The positions of the pre-stained markers are indicated on the right. Experiments were performed several times with at least two independent membrane preparations, and representative blots are shown.

report we provide first evidence for the subcellular localization and lipid transport properties of the ABCG-like half-transporter LiABCG4 in the protozoan parasite *L. infantum*.

Incubation of parasites with fluorescent phospholipid analogues (PC, PE, PS and SM) served as a first approach to explore the role of LiABCG4 in lipid transport. We could demonstrate that *LiABCG4*-overexpressing parasites accumulated significantly less NBD-PC compared with control cells. The reduction in NBD-PC accumulation observed for LiABCG4 was comparable to that of other *Leishmania* ABC transporters, such as LtrABCA2, LtrABC1.1 and LtrMDR1 (Perez-Victoria *et al.*, 2001; Parodi-Talice *et al.*, 2003; Araujo-Santos *et al.*, 2005). On the contrary, no differences in accumulation were observed for parasites labelled with the aminoglycerophospholipid analogues NBD-PE and -PS or the sphingolipid analogue NBD-SM. Given the localization of LiABCG4 in PM and flagellar pocket of *Leishmania*, the protein could regulate the accumulation of NBD-PC via

endo-/exocytosis. However, we did not observe differences in uptake of the endocytic marker FM4-64 between mock- and LiABCG4-transfected parasite, indicating that overexpression of LiABCG4 unlikely affects NBD-PC accumulation by endo- or exocytosis. Therefore, the simplest explanation for these results is an enhanced outward transport of NBD-PC across the PM by LiABCG4.

Further evidence for a role of LiABCG4 in the outward directed transport of PC was provided by heterologous expression in a *S. cerevisiae* *sec6-4* mutant strain deleted in two P-type ATPases (Dnf3p and Drs2p). Because SVs isolated from this yeast mutant lack an ATP-dependent transport activity for NBD-PC, -PE and -PS, and from the luminal to the cytosolic leaflet (Alder-Baerens *et al.*, 2006), they provide ideal material for analysing outward-directed transport activities towards the luminal leaflet. We found that SVs isolated from the *LiABCG4*-overexpressing yeast mutant contained substantial amounts of the leishmanial ABC transporter and displayed an ATP-dependent, vanadate-sensitive transport

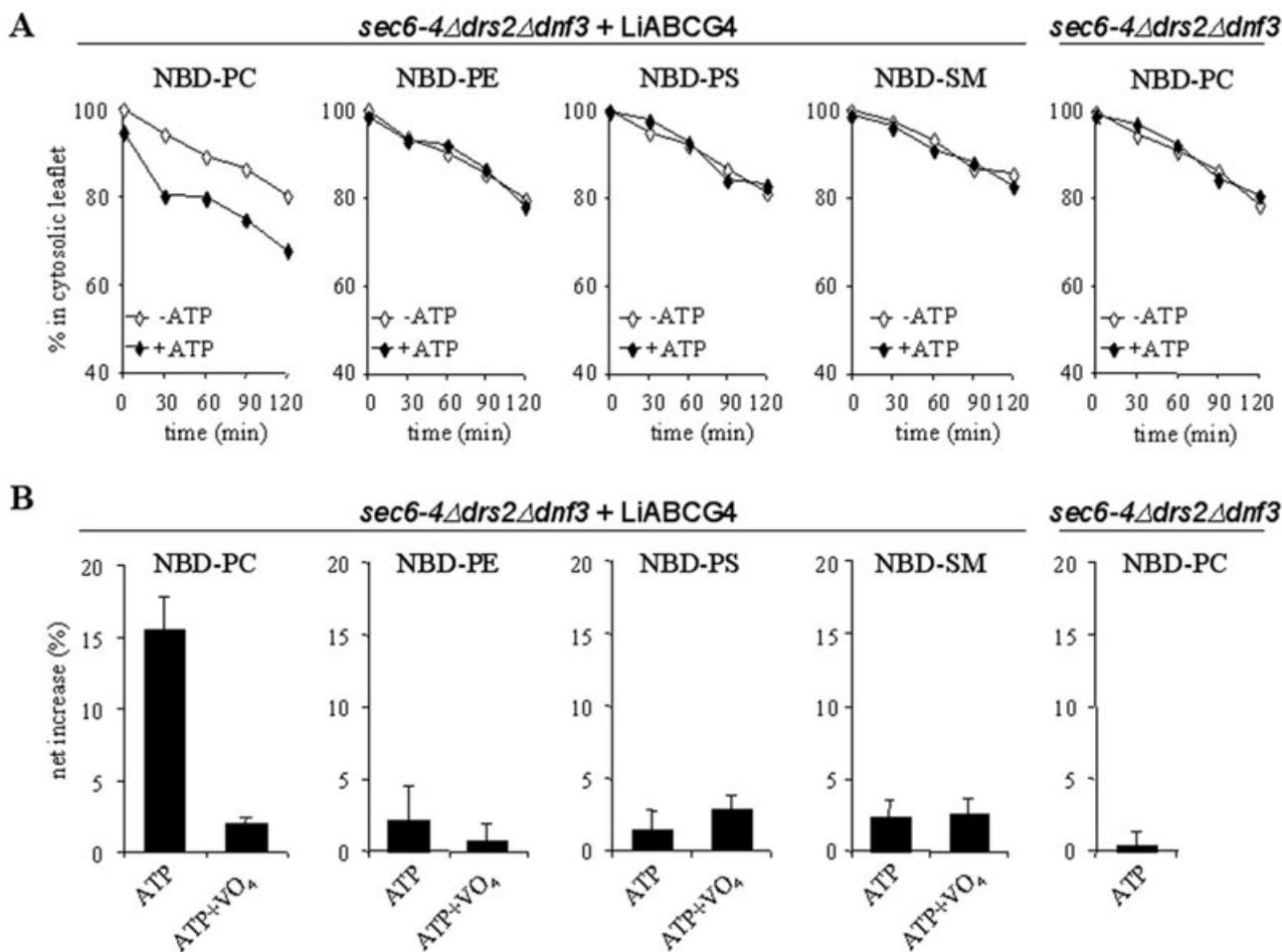


Fig. 6. LiABCG4-mediated lipid transport in SVs.

A. SV-enriched membranes were prepared from 38°C-shifted *sec6-4Δdrs2Δdnf3* cells transformed with a vector containing the *LiABCG4* gene or a control vector, labelled with NBD-lipids and incubated at 25°C with or without ATP. At times indicated, the fraction of fluorescent lipid localized in the cytosolic leaflet was determined by back-extraction using defatted BSA as described in *Experimental procedures*. Data shown are from a single experiment representative of two independent experiments.

B. The level of ATP-dependent lipid transport from the cytosolic to luminal leaflet was calculated by subtracting the accessible pool of fluorescent lipid in membranes incubated for 20 min at 25°C without ATP from that in ATP-incubated membranes and expressed as the net increase in the percentage of luminal leaflet. When indicated, vanadate (100 μM) was supplemented to the ATP-containing samples. Data shown are the means ± SD of two independent experiments.

activity specific for NBD-PC from the cytosolic to the luminal leaflet of the vesicle membrane.

As overexpression of ABC transporters has been involved in the development of drug resistance in *Leishmania* (Ouellette *et al.*, 2004; Perez-Victoria *et al.*, 2006a), we determined whether LiABCG4 could confer resistance to different compounds, especially antileishmanial agents and the alkyl-phospholipids. Parasites overexpressing LiABCG4 were resistant to the alkyl-glycerophosphocholine edelfosine and to the alkyl-phosphocholine derivatives miltefosine and perifosine. Likewise, *S. cerevisiae* strains expressing LiABCG4 were resistant to these compounds. These alkyl-phospholipids are structurally similar to the ester lipid NBD-PC suggesting that LiABCG4 confers resistance to these compounds

by ATP-dependent drug extrusion. In agreement with this, parasites overexpressing LiABCG4 showed a significantly reduced level of [¹⁴C]-miltefosine accumulation due to an increased outward transport.

Altogether, the data presented in this article suggest that LiABCG4 functions as a lipid transporter specifically recognizing PC and alkylphosphocholine derivatives. As LiABCG4 is a 'half-transporter' with a single nucleotide-binding domain localized at the N-terminus of the protein, the above results suggest that the protein acts as a homodimer. Consistent with this notion, chemical cross-linking of SV-enriched membranes revealed a cross-linked product that in size corresponds to a dimer. However, additional experiments as co-immunoprecipitation using two different epitope-tagged versions of LiABCG4 would

be needed to provide further insights into protein dimerization. Our results do not preclude that LiABCG4 might also dimerize with other members of the ABCG subfamily in *Leishmania* to form heterodimers with potentially distinct substrate specificities.

Altogether, the data presented in this article suggest that LiABCG4 functions as a lipid transporter specifically recognizing PC and alkylphosphocholine derivatives. Other members of the ABC transporter family have also been identified in *Leishmania* as mediators of phospholipid outward transport. *Leishmania* ABCB1-like transporter conferred resistance to alkyl-phospholipids and reduced the accumulation of a fluorescent lipid analogue of PC (Perez-Victoria *et al.*, 2001; 2006a). LtrABCA1.1 and LtrABCA2, two *Leishmania* ABC transporters related to the human ABCA family, did not confer resistance to alkyl-phospholipids, but are both involved in phospholipid trafficking. LtrABCA1.1 has a role in lipid movements across the PM of the protozoan parasite *Leishmania tropica* (Parodi-Talice *et al.*, 2003) whereas LtrABCA2 is involved in phospholipid trafficking, which could be modifying the vesicular trafficking and the infectivity of the parasite (Araujo-Santos *et al.*, 2005). Thus, LiABCG4 seems to belong to a class of ABC lipid transporters of a rather broad specificity, recognizing short-chain PC, alkyl-glycerophosphocholine and derivatives. However, whether LiABCG4 translocates natural long-chain PC remains to be established. Clearly, functional reconstitution into proteoliposomes and transport measurements with long-chain lipids might resemble the system of choice to adequately address its lipid transport activity and specificity. As the technology required for purifying and reconstituting polytopic integral membrane proteins is well established for yeast, the heterologous expression system described here offers an attractive route for further analysis of the transport function of LiABCG4 and other closely related members of the ABCG subfamily in *Leishmania*. Attempts to do this are underway.

A genetic screen for parasites resistant to miltefosine has previously identified the inward directed lipid translocase LdMT (Perez-Victoria *et al.*, 2003a; 2006b). The LdMT ATPase belongs to the P4 subfamily of P-type ATPases and is required for the rapid intracellular uptake not only of alkylphosphocholine drugs but of PC, PE and PS fluorescent analogues as well. Thus, LiABCG4 might regulate LdMT ATPase activity or substrate specificity. However, this possibility is unlikely as LiABCG4-overexpressing parasites display only a decrease in NBD-PC accumulation but not in PE and PS. Moreover, an enhanced efflux of miltefosine was observed for LiABCG4-overexpressing parasites.

The physiological role of LiABCG4 remains to be established. One possibility is that LiABCG4 is involved in the regulation of the lipid distribution between the inner

and outer PM leaflets. Eukaryotic PMs generally display asymmetric lipid distributions with the aminophospholipids PS and PE concentrated in the cytosolic leaflet, while PC, SM and glycolipids are predominantly found in the outer leaflet. This asymmetric lipid arrangement is thought to come about as a result of the concerted action of various ATP-driven transporters or translocases. Conceivably, a selective P-type ATPase-dependent transport of PC, PE and PS to the cytosolic leaflet by LdMT, concurrent with a specific outward movement of PC by LiABCG4, could lead to a steady-state segregation of aminophospholipids and PC across the PM. Such dynamic regulation of the transbilayer lipid distribution across the PM might be important for the interaction with and/or invasion of parasites into host cells.

In summary, we have identified and characterized *LiABCG4* gene in *L. infantum*, which encodes a new ABCG-like transporter required for the active outward transport of PC, alkyl-glycerophosphocholine and phosphocholine derivatives as potential substrates. These findings could be of clinical relevance, considering that miltefosine is the most promising antileishmanial drug and the possibility that LiABCG4, together with other ABC transporters and the P-type ATPase LdMT, contributes to the miltefosine resistance phenotype in *Leishmania*.

Experimental procedures

Materials

Miltefosine and perifosine were from Zentaris (Frankfurt, Germany). Edelfosine was purchased from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Hexadecylphospho[1,2-ethylene-¹⁴C]choline ([¹⁴C]-miltefosine; 1.33 MBq mmol⁻¹) was synthesized by Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, UK). The fluorescent lipids NBD-PC, NBD-PE, NBD-PS and NBD-SM were from Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL, USA).

Cell cultures

Promastigotes of *L. infantum* (strain MHOM/ES/1993/BCN-99) were grown *in vitro* at 28°C in modified RPMI-1640 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum (Invitrogen) as previously described (Jackson *et al.*, 1986). The yeast mutant *sec6-4Δdrs2Δdnf3* PMA1-HA (TPY143) was derived from the strain EHY227 (*MATα sec6-4 TPI1::SUC2::TRP1 ura3-52 his3-Δ200 leu2-3-112 trp1-1*) and has been described elsewhere (Alder-Baerens *et al.*, 2006). In this strain, endogenous Pma1p is tagged at its N-terminus with one copy of the haemagglutinin (HA) epitope. Unless indicated otherwise, cells were grown at 27°C to mid-logarithmic phase (0.5–1.0 OD₆₀₀) in synthetic dextrose (SD) medium.

DNA constructs and transformation procedures

ABCG4 from *L. infantum* (*LiABCG4*) (GenDB-*L. infantum* Accession Code Lin J15.0940) was isolated from genomic

DNA of *L. infantum* by PCR using sense (5'-CAGGATCCA GTGTCTGCACCATCG) and antisense (5'-CAACTAGTCA ATGGCAACACACGAC) primers. Nucleotide sequences were determined automatically as described (Lario *et al.*, 1997). For homologous expression in parasites, *LiABCG4* gene was cloned into the *Leishmania* expression vector (pX) (LeBowitz *et al.*, 1990), obtaining the construct named *LiABCG4*-pX. To obtain parasites overexpressing non-functional *LiABCG4*, a mutation was introduced in the Walker A motif of the ATP-binding domain at the 293 nucleotide (K98M) using QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis (Stratagene, La Jolla, CA). The resulting plasmid was sequenced and renamed *LiABCG4*/mut-pX. The vectors pXG-GFP+2/and pXG-GFP+ were used to create *LiABCG4* versions with GFP fusions at N- and C-terminus respectively (Ha *et al.*, 1996). For the N-terminus tagged version, *LiABCG4* open reading frame (ORF) was amplified by PCR using sense (5'-CTGCGGCCGCAGGCACACGCGCACGA TG bearing the NotI site) and antisense (5'-CGGATCCT TACGACCGTACTTGCGC containing the BamHI site) primers. For the C-terminus tagged version, *LiABCG4* ORF was amplified by PCR using sense (5'-GTGGATCCAGG CACACGCGCACGATG bearing the BamHI site) and antisense (5'-GAGATATCCGACCGGTACTTGCGCGG containing the EcoRV site) primers.

For heterologous expression in yeast, *LiABCG4* gene was cloned into a multicopy plasmid, pYEXTF-HC (provided by K. Holz) behind the regulated CUP1 promoter and tagged with FLAG at the N-terminus and 6xHis at the C-terminus. *LiABCG4* was amplified without the initial and STOP codons using sense (5'-CACAGGATCCGGGGGCAAGTT GATCAAAC bearing the BamHI site) and antisense (5'-CACAGCGGCCGCCGACCGGTACTTGCGCG bearing the NotI site) primers. The resulting plasmid was named as *LiABCG4*/pYEX and used to transform yeast cells.

Cell transformation and analysis

Promastigotes of *L. infantum* were transfected with the different constructs, and selected for G-418 resistance as previously described (Perez-Victoria *et al.*, 2003a). Drug sensitivities of parasites were determined using a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasodium bromide (MTT)-based assay as previously described (Kennedy *et al.*, 2001). IC₅₀ was defined as the drug concentration required for half-maximal inhibition of the cellular growth rate.

Yeast cells were transformed with by the lithium acetate method and selected by uracil prototrophy. Single colonies were propagated in selective medium (SD medium lacking uracil) containing 100 µM CuSO₄ (to induce CUP1 promoter) at 27°C to midlog phase, screened by Western blot for *LiABCG4* expression, subjected to subcellular fractionation (Pomorski *et al.*, 2003) and used to prepare SVs (Alder-Baerens *et al.*, 2006). Immunoblots were probed with different antibodies: a monoclonal antibody against Dpm1p (Molecular Probes, Eugene, OR), polyclonal antibodies against the Sso2p (S. Keränen, Biotechnology and Food Research, Espoo, Finland), Tlg2p (J. Holthuis, Utrecht University, the Netherlands), Vac8p (M. Veit, Free University Berlin, Germany), HA epitope (Santa Cruz Biotechnology, CA), and a monoclonal antibody against FLAG epitope

(Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies were from Bio-Rad (Hercules, CA). Blots were developed using ECL (Amersham, Little Chalfont, UK).

Nucleic acids blotting

Total RNA was extracted from promastigotes of *L. infantum* with Trizol reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen) and electrophoresis was performed on denaturing gels containing formaldehyde and transferred to Hybond-N nylon membranes (Amersham) by standard methods (Sambrook *et al.*, 1989). Filters were hybridized with [α -³²P]-dCTP random-primed labelled probes prepared from gel-isolated DNA fragments using the Perfectprep Gel Cleanup kit (Eppendorf). A specific probe was obtained after HindIII digestion of the *LiABCG4*-pX construct.

Analysis of fluorescent phospholipid uptake and endocytosis

Parasites (10⁷ ml⁻¹) were incubated in HPMI buffer (20 mM HEPES, 132 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂, 5 mM glucose, 1 mM CaCl₂, pH 7.25) supplemented with 0.3% (w/v) BSA for 30 min at 28°C, and labelled with 2 µM NBD-PC, 2 µM NBD-PE, 2 µM NBD-SM or 5 µM NBD-PS for 30 min at 28°C. HPMI was supplemented with either 500 µM PMSF or 5 mM DFP to block the catabolism of NBD-lipids (Araujo-Santos *et al.*, 2003). Parasites were washed twice in ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) before analysis by flow cytometry using a Beckton Dickinson FACScan (San José, CA) equipped with an argon laser operating at 488 nm. To compare the uptake of NBD-lipids with that of the endocytic marker FM4-64 (Molecular Probes), parasites (5 × 10⁷ ml⁻¹) were incubated for 30 min at 28°C with 5 µM FM4-64 as previously described (Perez-Victoria *et al.*, 2003b).

Determination of miltefosine accumulation and efflux

The internalization and efflux of [¹⁴C]-miltefosine were measured as previously described (Perez-Victoria *et al.*, 2003b). For internalization, *L. infantum* promastigotes (2 × 10⁷) were incubated in culture medium with 0.09 µCi ml⁻¹ [¹⁴C]-miltefosine (2.5 µM) at 28°C. At various time intervals, 1 ml aliquots were removed and placed on ice. After washing with PBS containing 10 mg ml⁻¹ BSA to allow the removal of the drug fraction bound to the outer leaflet of the PM, followed by a second PBS wash, the cell pellet was re-suspended in Triton X-100 and both protein concentration and cell-associated radioactivity were determined.

For efflux determination, *L. infantum* promastigotes (2 × 10⁷) were labelled in culture medium with 0.36 µCi ml⁻¹ [¹⁴C]-miltefosine (10 µM) for 30 min at 28°C. After incubating for 30 min, parasites were washed and re-suspended in fresh medium containing 10 mg ml⁻¹ BSA. After 60 min at 28°C, the amount of radioactivity retained in parasites was measured.

Fluorescence microscopy

For localization of the *LiABCG4*-GFP chimeras, live parasites were pelleted, washed three times in PBS, attached to

poly L-lysine-coated coverslips, and images were acquired with a Zeiss Axiophot microscope (Oberkochen, Germany) equipped with a SPOT camera (Diagnostic Instruments). In order to differentiate the PM from intracellular organelles, parasites were incubated in hypotonic buffer (5 mM Tris-HCl, 100 μ M PMSF, pH 7.4) for 30 min on ice and gently homogenized resulting in the formation of deflagellated ghosts that preserve the microtubular structure associated with the parasite PM (Mandal *et al.*, 1997). Expression of tagged LiABCG4 was verified by Western blot analysis using polyclonal anti-GFP antibodies (1:7500) (Molecular Probes), and a HRP-conjugated secondary goat anti-rabbit (1:5000).

Preparation of SVs from yeast and analysis of fluorescent lipid transport

Preparation of SVs from yeast, immunisolations of Pma1p-HA-containing SVs and lipid translocation experiments were performed as described previously (Alder-Baerens *et al.*, 2006). For fractionation studies, cleared lysates adjusted to 30% (w/w) Nycodenz were loaded at the bottom of an 11 ml linear 12–22% (w/w) Nycodenz/0.8 M sorbitol gradient and centrifuged at 100 000 *g* for 16 h in a Beckman SW41Ti rotor. Then, 0.6 ml fractions were collected from the top and equal volumes per fraction were subjected to immunoblotting. For chemical cross-linking, SV-enriched membranes were incubated for 2 h on ice with BMH (Pierce, Rockford, IL) at 0.2 mM final concentration. Cross-linked products were analysed by SDS-PAGE (with 4–12% polyacrylamide) and immunoblotting.

Acknowledgements

We thank Monserrat Gallego and Monserrat Portús for the *L. infantum* strain BCN-99; Stephen M. Beverley for pX, pXG-GFP+2/and pXG-GFP+ vectors; Zentaris for providing miltefosine, perifosine and [¹⁴C]-miltefosine; and our laboratory colleagues Begoña Correa, Susanne Hanisch, Chris Tina Höfer and Hanka Paulitschke for excellent technical assistance. This work was supported by EU Marie Research Training Network Grant MRTN-CT-2004-005330 (to F.G. and T.P.), by the Spanish Grants SAF-2003-04200-C02-01, Plan Andaluz de Investigación (Cod. CVI-130), Acción Integrada Hispano-Alemana (HA2003-0166)/Deutscher Akademischer Austauschdienst fellowship (to S.C. and T.P.), the Deutsche Forschungsgemeinschaft GRK 1121 (to T.P.), the Schering Foundation (to N.A.-B), and a F.P.U. fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia (to E.C.-M.).

References

Alder-Baerens, N., Lisman, Q., Luong, L., Pomorski, T., and Holthuis, J.C. (2006) Loss of p4 ATPases *drs2p* and *dnf3p* disrupts aminophospholipid transport and asymmetry in yeast post-Golgi secretory vesicles. *Mol Biol Cell* **17**: 1632–1642.

Araujo-Santos, J.M., Gamarro, F., Castanys, S., Herrmann, A., and Pomorski, T. (2003) Rapid transport of phospholipids across the plasma membrane of *Leishmania infantum*. *Biochem Biophys Res Commun* **306**: 250–255.

Araujo-Santos, J.M., Parodi-Talice, A., Castanys, S., and Gamarro, F. (2005) The overexpression of an intracellular ABCA-like transporter alters phospholipid trafficking in *Leishmania*. *Biochem Biophys Res Commun* **330**: 349–355.

Berman, J. (2005) Recent developments in leishmaniasis: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Curr Infect Dis Rep* **7**: 33–38.

Croft, S.L., and Coombs, G.H. (2003) Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol* **19**: 502–508.

Croft, S.L., Sundar, S., and Fairlamb, A.H. (2006) Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* **19**: 111–126.

Decottignies, A., Grant, A.M., Nichols, J.W., de Wet, H., McIntosh, D.B., and Goffeau, A. (1998) ATPase and multidrug transport activities of the overexpressed yeast ABC protein Yor1p. *J Biol Chem* **273**: 12612–12622.

Graf, G.A., Yu, L., Li, W.P., Gerard, R., Tuma, P.L., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. (2003) ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. *J Biol Chem* **278**: 48275–48282.

Ha, D.S., Schwarz, J.K., Turco, S.J., and Beverley, S.M. (1996) Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* **77**: 57–64.

van Helvoort, A., Smith, A.J., Sprong, H., Fritzsche, I., Schinkel, A.H., Borst, P., and van Meer, G. (1996) MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell* **87**: 507–517.

Higgins, C.F. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **8**: 67–113.

Ivens, A.C., Peacock, C.S., Worthey, E.A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., *et al.* (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* **309**: 436–442.

Jackson, P.R., Lawrie, J.M., Stiteler, J.M., Hawkins, D.W., Wohlhieter, J.A., and Rowan, E.D. (1986) Detection and characterization of *Leishmania* species and strains from mammals and vectors by hybridization and restriction endonuclease digestion of kinetoplast DNA. *Vet Parasitol* **20**: 195–215.

Kennedy, M.L., Cortes-Selva, F., Perez-Victoria, J.M., Jimenez, I.A., Gonzalez, A.G., Munoz, O.M., *et al.* (2001) Chemosensitization of a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line by new sesquiterpenes from *Maytenus magellanica* and *Maytenus chubutensis*. *J Med Chem* **44**: 4668–4676.

Klucken, J., Buchler, C., Orso, E., Kaminski, W.E., Porsch-Ozcuremez, M., Liebisch, G., *et al.* (2000) ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila white* gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 817–822.

Krishnamurthy, P., and Schuetz, J.D. (2006) Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **46**: 381–410.

Langheim, S., Yu, L., von Bergmann, K., Lutjohann, D., Xu, F., Hobbs, H.H., and Cohen, J.C. (2005) ABCG5 and ABCG8 require MDR2 for secretion of cholesterol into bile. *J Lipid Res* **46**: 1732–1738.

Lario, A., Gonzalez, A., and Dorado, G. (1997) Automated laser-induced fluorescence DNA sequencing: equalizing

- signal-to-noise ratios significantly enhances overall performance. *Anal Biochem* **247**: 30–33.
- LeBowitz, J.H., Coburn, C.M., McMahon-Pratt, D., and Beverley, S.M. (1990) Development of a stable *Leishmania* expression vector and application to the study of parasite surface antigen genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 9736–9740.
- Leprohon, P., Legare, D., Girard, I., Papadopoulou, B., and Ouellette, M. (2006) Modulation of *Leishmania* ABC protein gene expression through life stages and among drug-resistant parasites. *Eukaryot Cell* **5**: 1713–1725.
- Mandal, D., Mukherjee, T., Sarkar, S., Majumdar, S., and Bhaduri, A. (1997) The plasma-membrane Ca²⁺-ATPase of *Leishmania donovani* is an extrusion pump for Ca²⁺. *Biochem J* **322** (Part 1): 251–257.
- van Meer, G., Halter, D., Sprong, H., Somerharju, P., and Egmond, M.R. (2006) ABC lipid transporters: extruders, flippases, or floppase activators? *FEBS Lett* **580**: 1171–1177.
- Murray, H.W., Berman, J.D., Davies, C.R., and Saravia, N.G. (2005) Advances in leishmaniasis. *Lancet* **366**: 1561–1577.
- Ouellette, M., Drummel-Smith, J., and Papadopoulou, B. (2004) Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Updat* **7**: 257–266.
- Parodi-Talice, A., Araujo, J.M., Torres, C., Perez-Victoria, J.M., Gamarro, F., and Castanys, S. (2003) The overexpression of a new ABC transporter in *Leishmania* is related to phospholipid trafficking and reduced infectivity. *Biochim Biophys Acta* **1612**: 195–207.
- Perez-Victoria, F.J., Gamarro, F., Ouellette, M., and Castanys, S. (2003a) Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. *J Biol Chem* **278**: 49965–49971.
- Perez-Victoria, F.J., Castanys, S., and Gamarro, F. (2003b) *Leishmania donovani* resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 2397–2403.
- Perez-Victoria, J.M., Perez-Victoria, F.J., Parodi-Talice, A., Jimenez, I.A., Ravelo, A.G., Castanys, S., and Gamarro, F. (2001) Alkyl-lysophospholipid resistance in multidrug-resistant *Leishmania tropica* and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 2468–2474.
- Perez-Victoria, J.M., Cortes-Selva, F., Parodi-Talice, A., Bavchvarov, B.I., Perez-Victoria, F.J., Munoz-Martinez, F., et al. (2006a) Combination of suboptimal doses of inhibitors targeting different domains of LtrMDR1 efficiently overcomes resistance of *Leishmania* spp. to Miltefosine by inhibiting drug efflux. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 3102–3110.
- Perez-Victoria, F.J., Sanchez-Canete, M.P., Castanys, S., and Gamarro, F. (2006b) Phospholipid translocation and miltefosine potency require both *L. donovani* miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in *Leishmania* parasites. *J Biol Chem* **281**: 23766–23775.
- Pighin, J.A., Zheng, H., Balakshin, L.J., Goodman, I.P., Western, T.L., Jetter, R., et al. (2004) Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter. *Science* **306**: 702–704.
- Pohl, A., Devaux, P.F., and Herrmann, A. (2005) Function of prokaryotic and eukaryotic ABC proteins in lipid transport. *Biochim Biophys Acta* **1733**: 29–52.
- Pomorski, T., Lombardi, R., Riezman, H., Devaux, P.F., van Meer, G., and Holthuis, J.C. (2003) Drs2p-related P-type ATPases Dnf1p and Dnf2p are required for phospholipid translocation across the yeast plasma membrane and serve a role in endocytosis. *Mol Biol Cell* **14**: 1240–1254.
- Ross, D.D., Yang, W., Abruzzo, L.V., Dalton, W.S., Schneider, E., Lage, H., et al. (1999) Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines. *J Natl Cancer Inst* **91**: 429–433.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarkadi, B., Ozvegy-Laczka, C., Nemet, K., and Varadi, A. (2004) ABCG2 – a transporter for all seasons. *FEBS Lett* **567**: 116–120.
- Smit, J.J., Schinkel, A.H., Oude Elferink, R.P., Groen, A.K., Wagenaar, E., van Deemter, L., et al. (1993) Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* **75**: 451–462.
- Smith, A.J., Timmermans-Hereijgers, J.L., Roelofsen, B., Wirtz, K.W., van Blitterswijk, W.J., Smit, J.J., et al. (1994) The human MDR3 P-glycoprotein promotes translocation of phosphatidylcholine through the plasma membrane of fibroblasts from transgenic mice. *FEBS Lett* **354**: 263–266.
- Wang, N., Lan, D., Chen, W., Matsuura, F., and Tall, A.R. (2004) ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 9774–9779.

Supplementary material

The following supplementary material is available for this article online:

Fig. S1. Characterization of LiABCG4 mRNA expression in *Leishmania* parasites. Northern blot analysis of total RNA from mock-, LiABCG4-Px-, LiABCG4/mut- and GFP-LiABCG4-transfected parasites hybridized with the specific probe for LiABCG4. Numbers at the left indicate the position of molecular mass markers in kilo base pairs. The lower panel shows the ethidium bromide (EtBr) staining for monitoring the quantities of RNA. Different transcript lengths may be due to the existence of different sites for mini-exon or poly A addition. Length differences between LiABCG4-pX and GFP-LiABCG4 transcripts are due to the absence of LiABCG4 UTRs in the latter construction and the presence of trans-splicing sites located in the pXG-GFP+2 vector, 5' and 3' sequences flanking the gene. In trypanosomatids, the mini-exon addition determines the polyadenylation site of the 3' UTR in the upstream gene.

Fig. S2. Alkyl-phospholipid sensitivity of *S. cerevisiae* cells expressing LiABCG4. *S. cerevisiae* strains *sec6-4Δdrs2Δdnf3*, US50-18C and AD18 transformed with a control vector or a vector containing the LiABCG4 gene (LiABCG4) were spotted onto selective SD medium containing 50 μM CuSO₄ and a gradient of miltefosine or perifosine, increasing from left to right. Plates were scanned after 3 days

11

of incubation at 30°C. A representative result of several independent experiments is shown. The yeast strains US50-18C (*MAT α* *PDR1-3*, *ura3*, *his1*) overexpressing numerous yeast ABC transporters, and AD18 (Δ *yor1::hisG*, Δ *snq2::hisG*, Δ *pdr5::hisG*, Δ *pdr10::hisG*, Δ *ycf1::hisG*, Δ *pdr3::hisG*,

Δ *pdr15::hisG*) lacking seven major ABC transporters, have been described elsewhere (Decottignies *et al.*, 1998).

This material is available as part of the online article from <http://www.blackwell-synergy.com>

UNCORRECTED PROOF

