



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Universidad de Granada



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

Caracterización de las proteínas LABCG1 y LABCG5 de *Leishmania*: implicación en el tráfico intracelular de hemo y en la infección de macrófagos.

Directores de Tesis:

Dr. Francisco Gamarro Conde
Dr. José María Perez Victoria Moreno de Barreda

Tutor por la Universidad de Granada

Dr. Enrique García Olivares

Memoria presentada por el Licenciada **Jenny Karina Campos Salinas** para
optar al grado de Doctor en Bioquímica y Biología Molecular

Fdo. ***Lda. Jenny Karina Campos Salinas***

Granada, Mayo de 2008

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Jenny Karina Campos Salinas
D.L.: GR.1719-2008
ISBN: 978-84-691-5190-7

D. Francisco Gamarro Conde y D. José María Pérez Victoria Moreno de Barreda, Investigadores del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

CERTIFICAN:

Que el trabajo: “**Caracterización de las proteínas LABCG1 y LABCG5 de *Leishmania*: implicación en el tráfico intracelular de hemo y en la infección de macrófagos.**” ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Bioquímica y Farmacología Molecular del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” (C.S.I.C.) de Granada, por **Dña. Jenny Karina Campos Salinas**, Licenciada en Ciencias Biológicas, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada.

En Granada, a 28 de Mayo de 2008.

Fdo. Dr. Francisco Gamarro Conde

Fdo. Dr. José M. Pérez-Victoria
Moreno de Barreda

RESUMEN

De las enfermedades causadas por protozoos parásitos, la leishmaniasis, es la que produce más muertes tras la malaria. Es una enfermedad producida por el tripanosomátido intracelular *Leishmania* frente a la que no existe un arsenal adecuado de fármacos para tratarla. Una estrategia racional para la identificación de nuevas dianas farmacológicas consiste en estudiar las diferencias bioquímicas con las células humanas que actúan como hospedadoras del parásito. Algunos de los sustratos transportados por miembros de la subfamilia ABCG/White, "half-transporters" que necesitan dimerizar para ser activos, sugieren que estas proteínas podrían ser atractivas candidatas como blancos de acción de nuevos fármacos. El trabajo realizado en la presente Tesis Doctoral ha permitido llevar a cabo la caracterización funcional de las proteínas codificadas por dos nuevos genes de la subfamilia ABCG de *Leishmania* (*LABCG1* y *LABCG5*).

Como todos los tripanosomátidos, *Leishmania* requiere un aporte exógeno de hemo para sobrevivir, dado que a diferencia del hombre, no es capaz de sintetizar este metabolito esencial. *Leishmania* puede captar el hemo procedente de dos fuentes: la hemoglobina, que es tomada por endocitosis mediada por receptor, y el hemo libre, que no se internaliza por endocitosis. Las proteínas involucradas en el tráfico de hemo, podrían ser dianas para el desarrollo de nuevos fármacos. Hemos encontrado numerosas evidencias que sugieren que *LABCG5* estaría implicado en el tráfico intracelular de hemo en *Leishmania*:

- i. La disminución de la función de *LABCG5* al sobreexpresar un mutante inactivo del transportador causa un significativo descenso del crecimiento a menos que se añada un suplemento de hemo libre o se elimine el gen mutado.
- ii. Este fenotipo dominante negativo no puede ser rescatado por la hemoglobina, un metabolito que normalmente es suficiente para proveer al parásito con la cantidad de hemo que requiere.
- iii. *LABCG5* puede ser precipitado mediante cromatografía de afinidad con hemina-agarosa, y la interacción puede ser inhibida con hemina libre.
- iv. La proteína humana con mayor homología con *LABCG5* es *ABCG2*, un conocido transportador de porfirinas.
- v. Un análisis inmunocitoquímico mediante microscopía electrónica de muestras congeladas a alta presión y criosustituidas mostró que *LABCG5* se localiza en cuerpos multivesiculares y otras vesículas asociadas. Este compartimento probablemente se corresponde con los endosomas tardíos/lisosomas hacia los que se dirige la hemoglobina endocitada.

Todo esto sugiere que el transportador *LABCG5* está involucrado en el rescate del hemo producido tras la digestión de la hemoglobina endocitada. Dado que *LABCG5* y sus homologos en *Trypanosoma brucei* y *T. cruzi* presentan un dominio transmembrana N-terminal ausente en todas las proteínas ABCG de mamíferos, la inhibición específica de esta ruta podría representar una nueva forma de controlar las infecciones causadas por estos tripanosomátidos.

Por otra parte, diversos transportadores ABCG están involucrados en la translocación de fosfolípidos incluyendo la fosfatidilserina (PS). De forma similar a lo que ocurre con las células apoptóticas, la externalización de PS es uno de los procesos que requiere el parásito para infectar al macrófago y para inhibir su

respuesta microbicida. La PS normalmente se localiza en la cara citoplasmática de la membrana plasmática, y no se conocen las bases moleculares que llevan a esta exposición de PS en la superficie del parásito. Hemos encontrado diversas evidencias que sugieren que LABCG1 estaría implicada en esta translocación de PS:

- i. La disminución de la función de LABCG1 al sobreexpresar un mutante inactivo del transportador, reduce la translocación de análogos fluorescentes de PS.
- ii. LABCG1 reconoce específicamente la PS, dado que los parásitos “dominantes negativos” para LABCG1 no tienen afectada la internalización de análogos de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y esfingomielina.
- iii. El uso de Anexina-V fluorescente ha demostrado que los parásitos dominantes negativos para LABCG1 en fase estacionaria exponen menos PS endógena en la cara externa de la membrana comparado con la línea celular control.
- iv. La menor externalización de PS en los parásitos dominantes negativos para LABCG1 se correlaciona con una menor capacidad para infectar macrófagos peritoneales de ratón.
- v. Las diferencias de infectividad entre los parásitos control y los que tienen disminuida la función de LABCG1 desaparecen al enmascarar la PS expuesta con Anexina-V.

Todos estos resultados sugieren una implicación de LABCG1 en la infectividad del parásito al estar involucrada en la exposición de PS en la cara externa de la membrana plasmática del parásito.

En conclusión, consideramos que LABCG1 y LABCG5 son dos proteínas importantes en la fisiología de *Leishmania*. LABCG5 podría jugar un papel relevante en el tráfico de hemo, un metabolito esencial para los tripanosomátidos, mientras que LABCG1 podría ser importante en la externalización de PS en *Leishmania*, lo que afectaría a la infectividad y virulencia del parásito en el hospedador mamífero.

OBJETIVOS

El protozoo parásito intracelular *Leishmania* es el agente etiológico responsable de la leishmaniasis, una enfermedad considerada por la OMS como emergente y olvidada. Es urgente encontrar nuevas dianas terapéuticas que permitan un diseño racional de fármacos, y los transportadores de la superfamilia ABC son atractivos candidatos. Por un lado, se ha demostrado experimentalmente que la actividad de estas proteínas puede contribuir al fenotipo de resistencia a fármacos en *Leishmania*. Además, muchos transportadores ABC en organismos eucariotas están implicados en importantes funciones biológicas por lo que podrían constituir nuevas dianas terapéuticas. Concretamente, algunos miembros de la **subfamilia de “half-transporters” ABCG/White** son capaces de transportar sustratos muy interesantes para *Leishmania*, como son el **hemo** (el parásito es auxotrofo para este metabolito esencial) y la **fosfatidilserina** (su exposición en la membrana del parásito se requiere para el proceso de infección del macrófago y el silenciamiento de su actividad microbicida). En el genoma de *Leishmania* hay cuatro genes ABCG, desconociéndose la función de dos de ellos.

Por lo tanto, el **objetivo fundamental** de este trabajo es estudiar el papel funcional de dos nuevas proteínas ABCG (LABCG1 y LABCG5) en el protozoo parásito *Leishmania*.

Para ello, **los objetivos específicos** serán:

1. La caracterización de dos nuevos genes de la subfamilia de transportadores ABCG de *Leishmania* : LABCG1 y LABCG5.
2. Estudio de la implicación de las proteínas que codifican en:
 - a. el tráfico intracelular de hemo;
 - b. la externalización de fosfatidilserina y la infectividad en macrófagos peritoneales;
 - c. la resistencia a fármacos.

INTRODUCCIÓN

Leishmaniasis

La Leishmaniasis es una enfermedad causada por protozoos parásitos pertenecientes al género *Leishmania* (Croft and Coombs, 2003) . Fue descrita por primera vez en 1903 en la India por Leishman, Donovan y Wright a partir de muestras obtenidas de pacientes, que presentaban diversas ulceraciones. En la actualidad, la Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que existen entre 12-14 millones de casos distribuidos en el mundo y cada año se declaran 400.000 nuevos casos (**Fig. 1**) (Revisado por (Stuart *et al.*, 2008); (www.who.int/tdr).

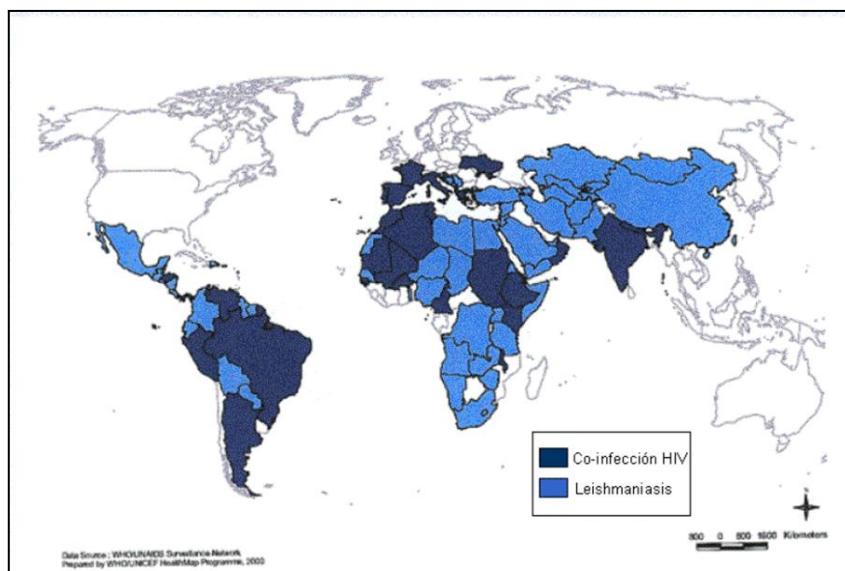


Figura 1: Mapa que muestra la distribución de la leishmaniasis en el mundo. En azul claro están representadas las regiones con leishmaniasis, en azul oscuro las regiones donde se ha observado co-infección con el virus HIV (OMS) .

Clasificación

De acuerdo al desarrollo y distribución en el tracto digestivo del vector, los parásitos del género *Leishmania*, se subdividen en dos subgéneros: el subgénero *Viannia* y el subgénero *Leishmania*. En el primero, los promastigotes se desarrollan en el intestino medio-anterior (región *Suprpylaria*) y en el segundo, los parásitos se desarrollan en el intestino posterior (región *Peripylaria*). La 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).

Manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Existen mas de 21 especies de *Leishmania* que presentan distintas manifestaciones clínicas que pueden ser agrupadas en: leishmaniasis visceral, cutánea y mucocutánea (Herwaldt, 1999; Stuart *et al.*, 2008).

Leishmaniasis visceral es también conocida como kala-azar (**Fig.2A**). Es producida predominantemente por *L. donovani* en la India, este de Asia y África, y por *L. infantum* y *L. chagasi* en la cuenca mediterránea, Asia central y América del Sur. Es la forma más severa de la enfermedad, que puede resultar mortal si no se trata. 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. En la actualidad la leishmaniasis visceral está emergiendo como una infección oportunista de gran relevancia entre enfermos de SIDA (WHO, 2008). 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 (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, 2008).

Por otra parte, la leishmaniasis mucocutánea (**Fig. 2B**), esta producida por *L. braziliensis* en América Central y del Sur, y transmitida por mosquitos del género *Lutzomyia*. Las 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.

Por último, la leishmaniasis cutánea (**Fig. 2C**) 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). 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.



Figura 2: Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis. A: Leishmaniasis visceral, B: Leishmaniasis mucocutánea y C: Leishmaniasis cutánea. (Imágenes obtenidas de www.wehi.edu.au).

Tratamiento de la enfermedad

Desde hace más de 40 años en el tratamiento de esta enfermedad se han utilizado las drogas antimoniales pentavalentes como el glucantime y el pentostan (revisado por (Santos *et al.*, 2008). Estas drogas son altamente tóxicas para el organismo generando deficiencias cardíacas y renales. Además, existen pacientes que de manera natural no responden a estas drogas, como por ejemplo, pacientes con leishmaniasis difusa. Sumado a esto, las distintas especies de *Leishmania* presentan distintos grados de susceptibilidad frente a estas drogas y se ha reportado el desarrollo de aislados resistentes, lo cual se ha convertido en un factor limitante en el tratamiento y control efectivo de esta enfermedad (Sundar, 2001; Sundar and Chatterjee, 2006). Algunas alternativas para el tratamiento de esta enfermedad lo constituyen la anfotericina B (AmBisome) (leishmaniasis cutánea y mucocutánea), el isotionato de pentamidina (leishmaniasis visceral) y algunos derivados de los imidazoles,

como alopurinol y ketoconazol (revisado por (Alvar *et al.*, 2006a; Santos *et al.*, 2008). Actualmente, en la india para el tratamiento de leishmaniasis visceral se esta utilizando una droga denominada miltefosina (hexadecilfosfocolina) (Ganguly, 2002). Esta droga es utilizada para el tratamiento en pacientes con cáncer y es el primer tratamiento oral en los pacientes que no responden al tratamiento con los antimoniales y los pacientes que presentan coinfección con HIV (Croft *et al.*, 2006; Sundar and Rai, 2002).

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).

La paromomicina es un antibiótico aminoglicósido que actúa inhibiendo la síntesis proteica. Se usa vía parenteral en casos de leishmaniasis visceral y de forma tópica para leishmaniasis cutánea (Alvar *et al.*, 2006b; Singh and Sivakumar, 2004). En cambio, el alopurinol es un análogo de purinas tóxico para el parásito puesto que interfiere con la síntesis del RNA. Se ha usado en combinación con antimoniales o anfotericina B. (Singh and Sivakumar, 2004).

Los azoles (ketoconazol, itraconazol, fluconazol) 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 and Campino, 2003).

Por último, la sitamaquina que es una 8-aminoquinoleína, análogo de la primaquina, usada desde hace 50 años para tratar la malaria (Baird and Rieckmann, 2003), y que presenta un amplio espectro de actividad antiprotozoaria (Yeates, 2002). Su mayor atractivo radica en su eficacia por vía oral (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 and Chatterjee, 2006).

La toxicidad de las drogas indicadas al igual que el incremento de la resistencia generada por estos parásitos constituye un problema importante en

el tratamiento de la enfermedad y un reto en la búsqueda de nuevos blancos de drogas. De igual importancia es conocer cuál o cuales son los mecanismos y genes involucrados en la resistencia que desarrollan estos parásitos.

Mecanismos de resistencia a fármacos en *Leishmania*.

En *Leishmania sp.* se conoce muy poco en relación con los mecanismos moleculares involucrados en la resistencia a fármacos, pero existen mecanismos potenciales que están presentes en bacterias y eucariotes superiores, que pudieran estar implicados en la generación de la resistencia en estos parásitos. Son varias los mecanismos que podrían estar implicados en este fenotipo como (**Fig.3**): sobreproducción de la proteína blanco de acción del fármaco (**1**) (Beverley *et al.*, 1984); mutaciones puntuales en la proteína blanco de acción del fármaco (Arrebola *et al.*, 1994) (**2**); el fármaco es eliminado del interior celular (Perez-Victoria *et al.*, 2003a)(**3**); el fármaco no entra al interior celular debido a modificaciones a nivel de la membrana plasmática (Ghannoum and Rice, 1999) (**4**) ; la célula posee una ruta metabólica alterna para compensar el efecto metabólico del fármaco (Papadopoulou *et al.*, 1996) (**5**); Las enzimas que convierten el fármaco a su forma activa son inhibidas (**6**) y la célula podría excretar alguna enzima al medio extracelular y degradar el fármaco (**7**) (Ghannoum and Rice, 1999). Sin embargo, no debemos descartar la posibilidad de que existan mecanismos de resistencia aún por conocer que también podrían contribuir al proceso de resistencia.

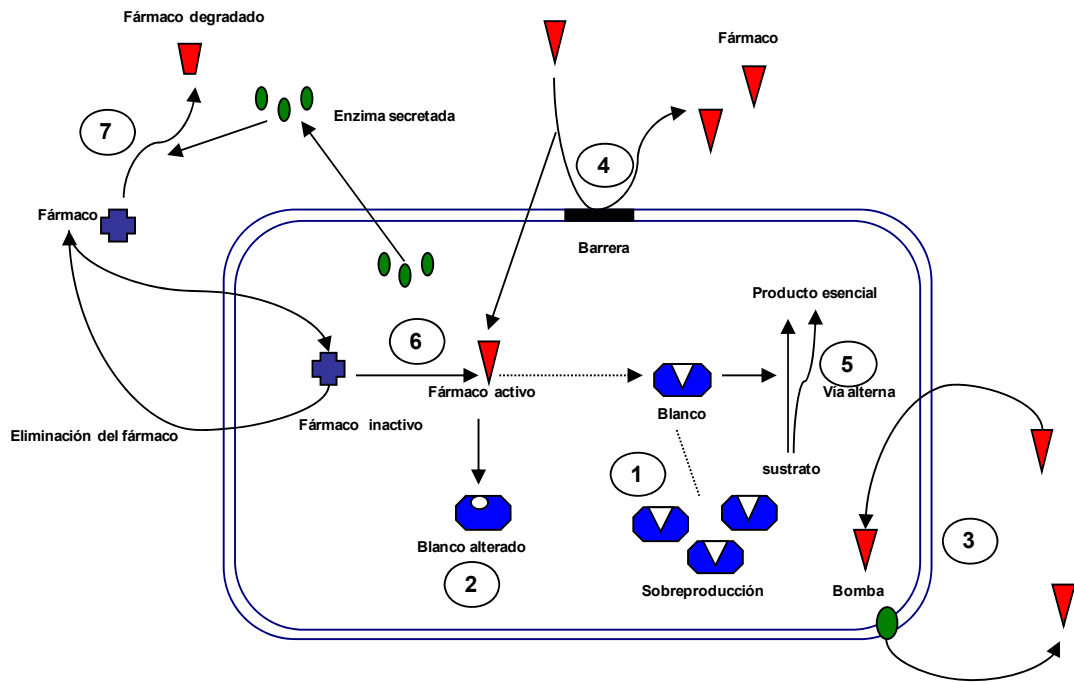


Figura 3. Algunos de los mecanismos de resistencia a fármacos que podrían darse en protozoos parásitos. Para alcanzar su blanco, el fármaco debe entrar en la célula, en ocasiones ser activado, unirse a su blanco de acción y ejercer su efecto tóxico. La inhibición de algunos de estos pasos, o el aumento de los mecanismos de reparación del daño producido, puede generar resistencia a fármacos (Tomado de Ghannoum and Rice, 1999).

Resistencia a antimoniales

El antimonio orgánico pentavalente Sb^V es el fármaco de primera línea usado en el tratamiento de la enfermedad desde hace seis décadas. Se han descrito diversos mecanismos que explican la aparición de resistencia (revisado por (Ashutosh *et al.*, 2007; Singh, 2006): i) disminución de la reducción biológica de Sb^V a Sb^{III} ; ii) una disminución 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. Recientemente, se han descrito aislados clínicos resistentes a antimoniales. Estos aislados clínicos presentaron altos niveles de tioles y este incremento no fue mediado por

amplificaciones de la enzima γ -glutamylcisteinsintetasa, pero si por la amplificación de la enzima tripanotio reductasa y el gen MRPA (Mittal *et al.*, 2007).

Resistencia a Anfotericina B.

Se sabe, que este fármaco interactúa con los esteroides (ergosterol) de la membrana plasmática de los hongos. En estudios *in vitro* se seleccionaron promastigotes de *Leishmania donovani* resistentes a este fármaco (revisado por (Bray *et al.*, 2003). En estas células resistentes no se observó eventos de amplificación de genes relacionados con PGP, pero la membrana plasmática presentaba un incremento significativo en la fluidez de la membrana debido a cambios en su composición lipídica (incluyendo el precursor del ergosterol) (Mbongo *et al.*, 1998).

Resistencia a Pentamidina

Las líneas resistentes a pentamidina se caracterizan por presentar una menor acumulación de fármaco (Mishra *et al.*, 2007). Este fármaco entra en el parásito a través de un transportador específico, denominado LmexPT1, localizado en la membrana plasmática, no existiendo modificaciones en dicho transportador como respuesta a la presión de fármaco (Bray *et al.*, 2003). Por el contrario, en las líneas resistentes, que presentan un potencial de membrana mitocondrial disminuido, el fármaco no se acumula tan rápidamente en la mitocondria, quedando libre en el citosol. Desde aquí, sería eliminado por medio de bombas activas, probablemente miembros de la familia ABC como PRP1 (Coelho *et al.*, 2003), explicándose así la menor acumulación neta de fármaco observada en estas líneas. Por lo tanto, fármacos que inhiban este flujo podrían revertir la resistencia al permitir la acumulación citosólica de pentamidina a niveles tales que conducirían a su acumulación mitocondrial (Bray *et al.*, 2003).

Resistencia a miltefosina

El primer caso de resistencia a miltefosina fue descrito por nuestro grupo en el año 2001 en una línea multirresistente (MDR) de *L. tropica* (Perez-Victoria *et al.*, 2001b). Esta línea resistente, que había sido seleccionada mediante

adaptación a concentraciones crecientes de daunomicina, contiene una amplificación y sobreexpresión de un gen con alta similitud al de la glicoproteína-P (Pgp) humana (mdr1) (Perez-Victoria *et al.*, 2006c; Perez-Victoria *et al.*, 2001b).

Por otro lado, líneas de *L. donovani* experimentalmente resistentes a miltefosina por adaptación a concentraciones crecientes del fármaco, han mostrado una acumulación reducida del fármaco (Perez-Victoria *et al.*, 2003a), debido a un defecto en la translocación del fármaco desde 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 (Perez-Victoria *et al.*, 2003b). Se ha comprobado que mutaciones puntuales en distintas posiciones para cada uno de los dos alelos de esta proteína estaban implicadas en el fenotipo de resistencia del fármaco (Perez-Victoria *et al.*, 2003b). 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 modificación en la expresión o inactivación de cualquiera de las dos proteínas que forman parte de la maquinaria de translocación de miltefosina (Perez-Victoria *et al.*, 2006a).

Biología molecular y bioquímica de *Leishmania*.

Leishmania, al igual que otras especies del orden Kinetoplástida presenta peculiaridades moleculares y bioquímicas que la diferencian del resto de organismos eucariotas. Entre las características moleculares se encuentran:

1.- Poseen 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. Estudios de microscopía electrónica han revelado una red altamente ordenada que se reparte en agrupaciones circulares y concatenadas, denominadas maxicírculos (35 kb – 50 kb) y minicírculos (0.8 kb -1.6 kb), y representan un 10-15% del DNA total del parásito (Feagin, 2000). En el mantenimiento de esta estructura participan cuatro histonas (KAP1-KAP4) (Xu

et al., 1996). En el maxicirculo se condifican las subunidades de los complejos respiratorios de la mitocondria y en los minicirculos se codifican los pequenos RNAs indispensables para la corrección del RNA (*RNA editing*).

La replicación del kinetoplasto se inicia por los minicirculos de una manera muy organizada produciendo dos kinetoplastos hijos. Durante la fase S, minicirculos individuales son liberados de una manera vectorial desde la red por la acción de una topoisomerasa II (Lukes *et al.*, 2005).

2.- Presentan transcripción policistronica, (Fig. 4) generándose unos RNAs inmaduros que contienen más de un gen, al igual que ocurre en organismos procariotas (Gonzalez *et al.* 1985; Muhich y Boothroyd, 1998).

3.- La maduración del mRNA se realiza a través de un **proceso de transplicing**, caracterizado por la adición de secuencias características en ambos extremos de cada uno de los transcritos (Clayton and Shapira, 2007). En el extremo 5' se adiciona un RNA de unos 39 a 41 nucleótidos, denominados 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 (Haile and Papadopoulou, 2007; LeBowitz *et al.*, 1993).

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* (Martinez-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” (Martinez-Calvillo *et al.*, 2004). Por otra parte, hasta el momento no se han encontrado intrones en los genes de *Leishmania* (Fig. 4).

4.- Poseen edición de RNA mitocondrial o RNA editing (Stuart and Panigrahi, 2002). Se trata de 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 (RNAg). Los RNAg están codificados principalmente por el DNA de los minicírculos, y estos poseen la información para la inserción y delección de uridinas para los sitios de edición específicos (ES) y para RNAm editados, mientras que los RNAs a corregir son codificados desde el DNA de los maxicírculos (Shapiro and Englund, 1995).

5.- *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% (Alvarez *et al.*, 1994). **Carece de condensación cromosómica en la mitosis** (Vickerman and 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 and 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 8.000, 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.

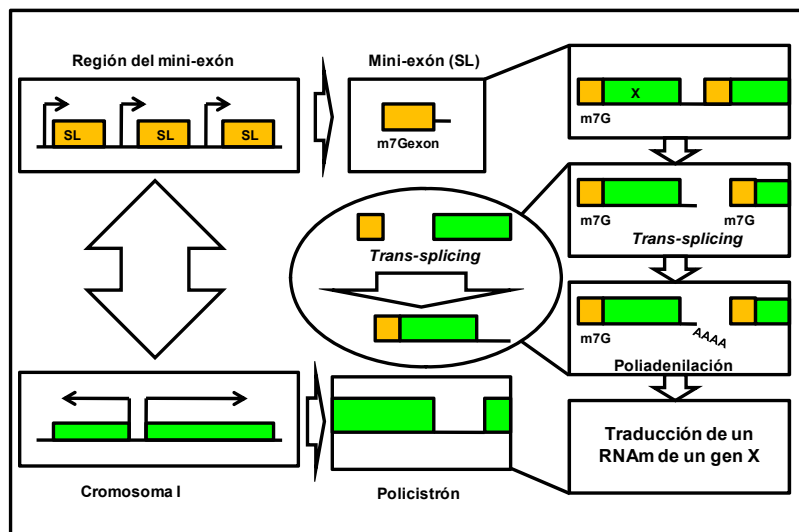


Figura 4. Acoplamiento del *trans-splicing* y la poliadenilación. Modelo que plantea que la adición del miniexón (SL) a los extremos 5' de los mRNA recluta al complejo que participa en la poliadenilación, el cual a través de un mecanismo de rastreo 3'-5' encuentra el sitio adecuado para que ocurra el corte y la adición de la cola poliA. 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 (Campbell *et al.*, 2003).

6.- 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).

7.- 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 and daRocha, 2003).

8.- *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 a 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 CO₂ 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 permite seleccionar dianas de interés para el diseño racional de fármacos (McConville *et al.*, 2007) .

9.- Poseen orgánulos característicos como el glicosoma y los acidocalcisomas. 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 electrodensos en los que se acumulan grandes cantidades de fósforo (pirofosfatos y polifosfatos) acompañados con calcio (Docampo and Moreno, 2001; Docampo *et al.*, 2005). En *Leishmania* la

acumulación de calcio se ha relacionado con la virulencia del parásito (Lu *et al.*, 1997).

10.- 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).

11.- 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 (Carter *et al.*, 2008). 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 (Beverley *et al.*, 1986; Coderre *et al.*, 1983).

12.- Otra diferencia importante entre *Leishmania* y su hospedador mamífero es la auxotrofia por el hemo. Debido a esta característica *Leishmania* debe tomar este importante metabolito desde el exterior celular. **Este punto se discutirá en el último apartado de la introducción.**

Ciclo de vida de *Leishmania*

Este protozoo presenta un ciclo de vida digenético, realizando parte de su ciclo en el tubo digestivo del hospedador invertebrado -*Phlebotomus* en el Nuevo Mundo y *Lutzomya* en el Viejo Mundo- bajo una forma flagelar denominada promastigote (**Fig. 5**). Cuando el flebótomo parasitado ingiere sangre del hospedador mamífero, inocular con su saliva los promastigotes metacíclicos presentes en la probóscide; muchos de estos parásitos son eliminados por el hospedador y otros alcanzan las células fagocíticas donde son englobados en una vacuola parasitófora (fagolisosoma) con la finalidad de eliminarlo. Dentro del macrófago, el parásito sufre un proceso de

transformación biológica que conlleva a la pérdida del flagelo y otros cambios bioquímicos, y moleculares que conllevan a las llamadas amastigotes intracelulares que le permitirán sobrevivir dentro de las células del mamífero (Beverley, 1991; Handman, 2001).

Posteriormente, los macrófagos parasitados circulantes son ingeridos por otro flebótomo en cuyo intestino se liberan los amastigotes, estas formas del parásito se transforman en la zona posterior del tubo digestivo en promastigotes procíclicos provistos de un flagelo corto, a los que se denominan nectomonadas (24 a 48 horas). Estas formas promastigotas dentro del tracto digestivo del vector sufren una serie de modificaciones morfológicas que conllevan a las formas infectivas denominadas formas metacíclicas que serán inoculadas posteriormente permitiendo al parásito cerrar el ciclo biológico (Kamhawi, 2006).

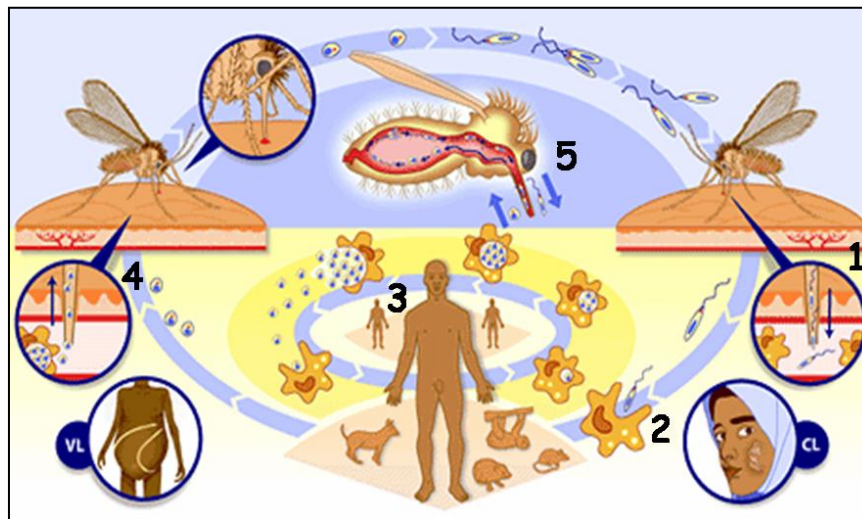


Figura 5: Ciclo de vida de *Leishmania*. Mediante la picadura del flebotomo, los promastigotes metacíclicos son inoculados en el torrente sanguíneo del hospedador vertebrado (1), donde son fagocitados por los macrófagos (2). Tras la formación del fagosoma (fagolisosoma), los amastigotes se replican dentro del macrófago, lisando finalmente la célula para ser liberados e infectar nuevos macrófagos (3). El ciclo se cierra cuando en una nueva picadura, el insecto vector ingiere macrófagos conteniendo amastigotes (4). Las formas amastigotes intracelulares vuelven a diferenciarse en promastigotes procíclicos, 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 (Tomado de www.who.int/tdr).

Establecimiento y mantenimiento 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 poseen un glicocalix que le permite resistir la lisis del complemento. La resistencia a la lisis es debida, en parte, a las moléculas de lipofosfoglicano (LPG) y a la metaloproteasa dependiente de zinc GP63, que se expresa en grandes cantidades en las membranas de los promastigotes metacíclicos (Spath *et al.*, 2000). LPG es también importante para la supervivencia de *Leishmania* en el insecto vector y recientemente se ha observado que una galectina, capaz de interactuar con azúcares como la galactosa, repetida en tándem que se expresa en el intestino de *Phlebotomus papatasi* es usada por *L. major* como receptor para la unión al intestino del insecto (Pelletier and Sato, 2002).

La vía a través de la cual *Leishmania* entra en el macrófago se denominó 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 and de Souza, 2000). En el reconocimiento e internalización del parásito también participan otros factores como: los receptores del macrófago, los de fibronectina, de la manosa-fucosa o receptores de complemento CR1 y CR3 (revisado por (Alexander *et al.*, 1999).

Recientemente, se ha demostrado que los promastigotes metacíclicos cultivados *in vitro* y que alcanzan la fase estacionaria de crecimiento exponen más fosfatidilserina (PS) en la cara externa de la membrana y que la infectividad de estos parásitos está determinada por este hecho (Tripathi and Gupta, 2003).

Papel de la fosfatidilserina en la infectividad de *Leishmania sp.*

La fosfatidilserina es un fosfolípido normalmente localizado en la cara interna de la membrana plasmática y es expuesta en exceso hacia la cara externa sólo cuando las células entran en apoptosis (Wu *et al.*, 2006). El reconocimiento de la fosfatidilserina en la cara externa de la membrana conduciría a su internalización por los fagocitos. Moreira y col., 2001 (de Freitas

Balanco *et al.*, 2001) demostraron que la interacción amastigote/macrófago dependía de la exposición en la cara externa de PS. Para ello, enmascararon los motivos de PS con anexina-V y observaron que el índice de infectividad en los amastigotes de *L.amazonensis* incubados con anexina V fue menor que el control. Luego quisieron ver si el reconocimiento por parte de los macrófagos peritoneales era mediante un receptor que reconoce ligandos de células apoptóticas. Para ello, utilizaron un anticuerpo monoclonal que reconoce un receptor redundante en la eliminación de células apoptóticas denominado receptor de fosfatidilserina (PSR) expresado en células de mamíferos como macrófagos (Fadok *et al.*, 2000). Los resultados mostraron una disminución significativa del índice de infectividad entre amastigotes preincubados con anexina V y este anticuerpo. Estos resultados indicaron que este receptor en los macrófagos puede reconocer PS sobre los amastigotes y sobre las células apoptóticas de mamíferos (de Freitas Balanco *et al.*, 2001). Este autor plantea que el proceso de apoptosis puede ser usado en *Leishmania* como una estrategia para engañar al macrófago y así facilitar su entrada a la célula creando una condición de “mimetización apoptótica” y utilizarían el receptor PSR para entrar en la célula hospedera (Wanderley *et al.*, 2006). El reconocimiento de PS conlleva a la secreción de TGF- β 1 y la producción de los RNAm de interleuquina 10 (IL-10) e inhibe la producción de óxido nítrico con la consecuente inhibición de la activación de los macrófagos (revisado por (Wanderley *et al.*, 2005).

Por otra parte, Tripathi y col., 2003 (Tripathi and Gupta, 2003) demostraron que cultivos en fase estacionaria de crecimiento exponen más PS que el control y que el índice de infectividad se ve afectado en promastigotes estacionarios que han sido pretratados con anexina-V y que este efecto no se observó sobre los promastigotes en fase logarítmica preincubados con anexina-V. Además, mostraron que una actividad “out-to in” dependiente de energía es la encargada de redistribuir los C₆-NBD en promastigotes. Y que por ejemplo esta actividad fue reducida por la presencia de fosfolípidos de cabeza larga. Estos resultados indicarían que este transportador es más afín por los lípidos de cabeza larga. Por otro lado mostraron que la actividad de redistribución “in to out” de estos análogos no es dependiente de energía y no fue inhibible por vanadato. Al final los autores sugieren que ocurre una

disminución en la actividad “out to in” dependiente de energía es la responsable de la exposición de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana de los promastigotes en fase estacionaria (Tripathi and Gupta, 2003).

Un estudio reciente ha sugerido una segunda teoría, de forma que las primeras células fagocíticas que llegan al sitio de infección son los granulocitos polimorfonucleares (PMN), seguidos de oleadas de macrófagos (Sunderkotter *et al.*, 1993). Los promastigotes de *Leishmania* serían internalizados por los PMN, sobreviviendo dentro de ellos sin poder multiplicarse ni diferenciarse como un “caballo de Troya” para entrar finalmente a su hospedero sin ser reconocido (van Zandbergen *et al.*, 2004). Estos PMN infectados serían fagocitados por los macrófagos, donde *Leishmania* se diferenciaría y proliferaría (van Zandbergen *et al.*, 2004). En años posteriores estos autores, estudiaron que los promastigotes que infectan *Leishmania* son anexina-V positivos tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo*. Demostraron que en los promastigotes metacíclicos poseen una relación anexina V similar a los promastigotes en fase estacionaria. De este cultivo en fase estacionaria separaron los promastigotes positivos para anexina de los promastigotes negativos para anexina V. Para ello, usaron experimentos TUNEL que mide la fragmentación del DNA nuclear como un parámetro de apoptosis. Encontraron, que en una población metacíclica positiva para anexina-V un 65% de la población fueron TUNEL positiva. Y un 35 % resultaron Anexina-V negativa y TUNEL negativa. Demostraron, que en la población anexina positiva aparecen una forma redondeada de promastigotes que corresponderían a “fantasma”. Este estadio “fantasma” corresponde a un estadio tardío de apoptosis que incluso ha perdido su DNA. En cambio, en la población anexina negativa había formas alargadas. Además, demostraron una correlación proporcional entre células apoptóticas/anexina-V positivas y virulencia de *Leishmania*. Posteriormente, tomaron promastigotes metacíclicos (que previamente habían demostrado que eran más virulentos que los promastigotes en fase estacionaria), y luego separaron dos poblaciones una anexina positiva (46.8 %) de forma redondeada y otra población anexina negativa de forma alargada. Purificaron los promastigotes anexina negativa con una contaminación de promastigotes anexina positiva de un 14.2 %. Los promastigotes metacíclicos con una alta relación de anexina-V produjeron un desarrollo más severo de la

enfermedad. En cambio la población anexina negativa con parásitos viables que contenían solo un 14.2% de promastigotes apoptóticos, no produjeron lesiones graves. Ratones infectados con un 100% de promastigotes apoptóticos no desarrollaron síntomas de la enfermedad. Todos estos resultados indican que se requiere una población de promastigotes apoptóticos junto con una población de promastigotes no apoptóticos para llevar a cabo el proceso de infección. Estos autores también demuestran que estos promastigotes apoptóticos inducen las señales TGF- β , pero observaron una disminución de la señal TNF- α que conyevan al silenciamiento de los macrófagos (van Zandbergen *et al.*, 2006).

Una vez que *Leishmania* entra al macrófago usando como estrategia de infección una de las dos teorías expuestas en los párrafos anteriores. Se inician los procesos que conyevan al silenciamiento de los macrófagos. 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 de los macrófagos tales como la señalización celular y la producción de enzimas hidrolíticas, citoquinas y metabolitos tóxicos (Olivier *et al.*, 2005). (**Fig. 6**).

En una etapa posterior se produce una activación alterada de ciertas funciones de los macrófagos, en particular la secreción de quimioquinas quimiotácticas (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 and Karp, 1999). Así como, diversas proteínquinasa (PTK, MAPK), factores regulatorios de la señalización celular que se encargan de fosforilar y activar otros factores de regulación como ERK1/2. La inactivación de ERK1/2 a su vez inactiva los factores de transcripción NF κ β , IRF-1 y AP-1 que a su vez son los encargados de la activación en la producción de óxido nítrico y superóxido. La desactivación de estas vías de señalización celular evita que el macrófago se active cuando recibe el estímulo del INF γ lo que conllevaría a un silenciamiento de las funciones del macrófago. Por ejemplo, no se forma el complejo activo STAT1/STAT2, y se estimula la formación del inmunoproteosoma (Olivier *et al.*, 2005).

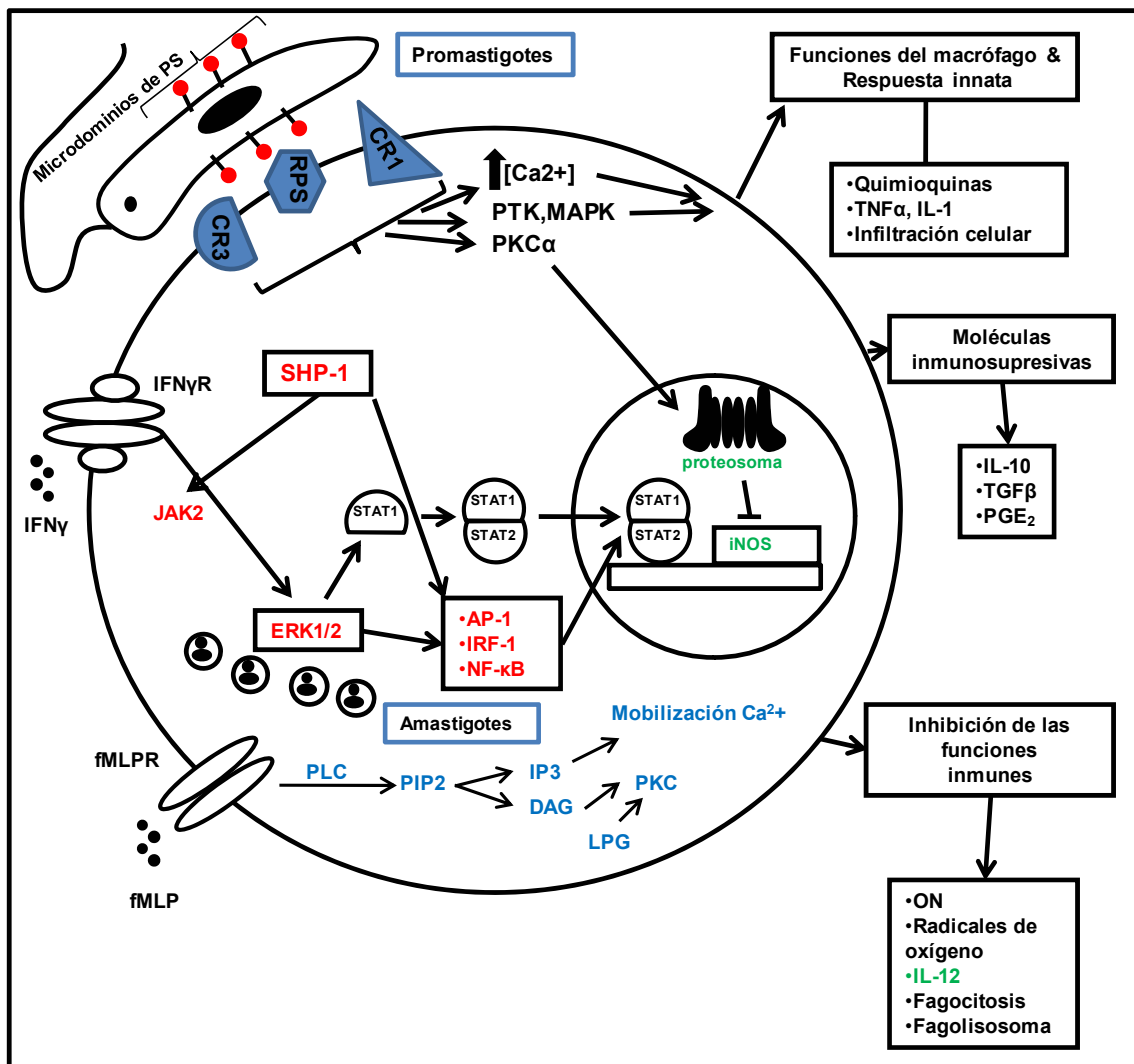


Figura 6: Eventos de señalización que conducen a la inhibición o inducción de las funciones del macrófago durante la infección en *Leishmania*. La internalización de *Leishmania* dentro del macrófago es un evento mediado por receptor y esta interacción parásito-hospedero es responsable de la rápida activación y desactivación de las señales que regulan las distintas funciones del macrófago (fagocitosis, secreción de quimioquinas y secreción de prostaglandinas). SHP-1 afecta negativamente (JAK2, MAP quinasas como ERK1/ERK2, NF- κ B, IRF-1 y AP1, marcados en rojo en la figura) inhibiendo así las funciones del macrófago inducidas por IFN- γ (óxido nítrico, producción de IL-12 y formación del inmunoproteosoma, en color verde). La degradación de STAT1/STAT2 por el proteosoma es dependiente de la quinasa PKC. Otras fosfatasa (IP3 y calcinerium) y moléculas de la superficie del parásito (LPG) alteran varios segundos mensajeros (PKC, Ca²⁺, lípidos de inositol (DAG) e inositol fosfatos, color azul) que a su vez regulan funciones fagocítica importantes del macrófago (producción de óxido nítrico y superóxido). DAG: diacilglicerol; PLC: fosfolipasa C; fMLPR: receptor formil péptido; PIP₂: fosfatidil inositol 4,5.bifosfato (Tomado de Oliver y col., 2005).

Una vez que 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 (McConville *et al.*, 2007). 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).

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.7**), 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 (Ilgoutz and McConville, 2001).

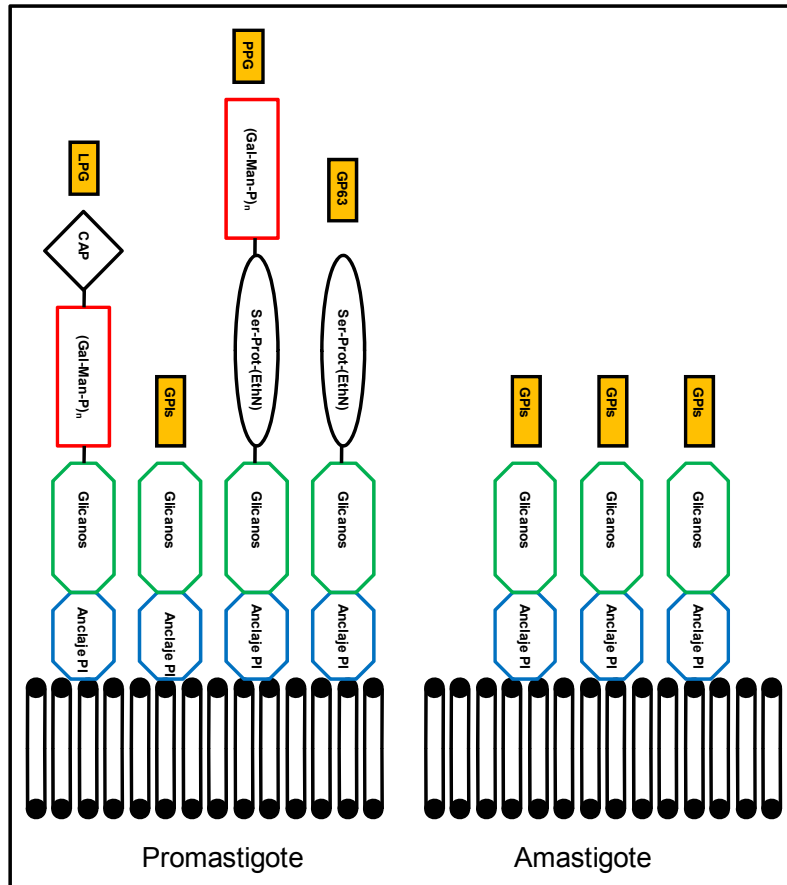


Figura 7. Superficie celular de *Leishmania*. En la fase de promastigote, la cara externa de la membrana plasmática contiene varias clases de macromoléculas ancladas a GPI: lipofosfoglicanos (LPG), glicoproteínas (tales como GP63) y proteofosfolipanos (PPG). Por debajo de estas macromoléculas se encuentra una densa capa de GPIs libres. En la fase de amastigote, los GPIs libres se mantienen mientras que la expresión de las macromoléculas ancladas a GPI disminuye notoriamente. Tomado de (Ilgoutz and McConville, 2001; Mukhopadhyay and Mandal, 2006).

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).

Los LPG son las macromoléculas más abundantes de la superficie de los promastigotes, ya que hay alrededor de 6 millones de unidades por célula, 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 and 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 and 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 and Marin Villa, 2002).

Los PPG son menos abundantes que GP63 y LPG, pero no por ello dejan de ser componentes importantes en el glicocálix 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 and 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 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. Igualmente, 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).

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 endoplasmático disperso en el citoplasma celular, un aparato de Golgi compuesto de 4-6 cisternas, un gran conjunto de vesículas ubicadas entre el retículo endoplasmático 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 and Ignatushchenko, 2001) (**Fig. 8**). Además, existe un grupo de vesículas que forman una estructura denominada, cuerpos multivesiculares (MVB) que se encuentra interconectada con los distintos orgánulos. 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).

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 and 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).

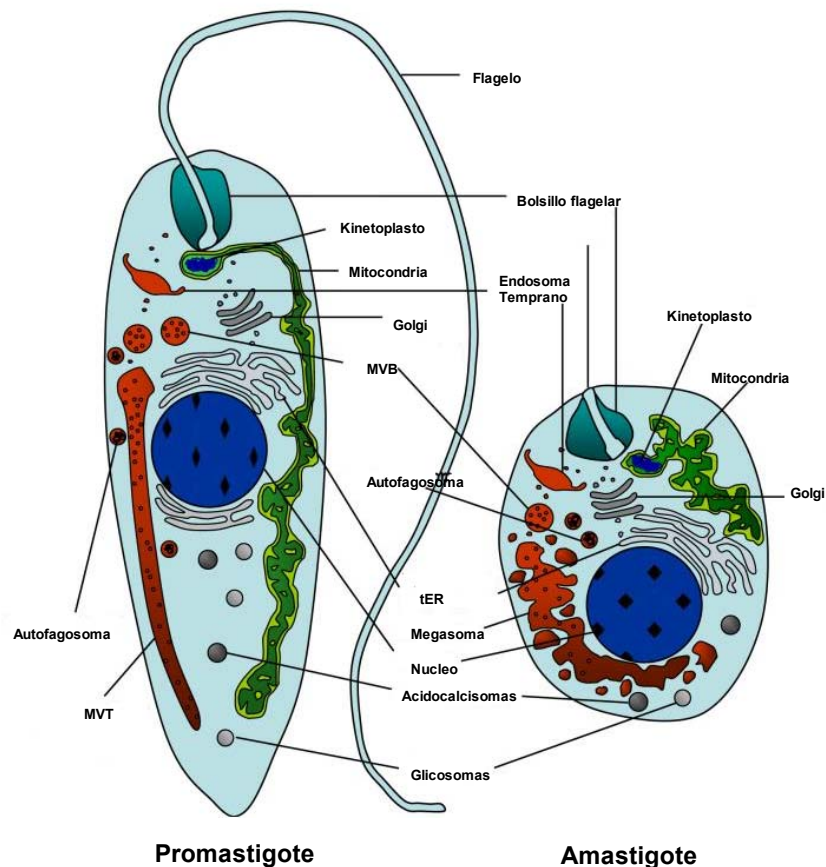


Figura 8. Representación esquemática de los orgánulos que componen las vías de tráfico vesicular en promastigotes y en amastigotes. MVT, túbulo multivesicular; MVB, cuerpos multivesiculares, tER, retículo endoplasmático. Tomada de (McConville *et al.*, 2002).

Traslocación de lípidos

La translocación de lípidos (**Fig. 9**) es un mecanismo esencial que determina la asimetría de los fosfolípidos de las membranas plasmáticas de la mayoría de las células eucariotas (revisado por (Pomorski and Menon, 2006). 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 esfingomiélna (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 (Raggers *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 and 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 and 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 and 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 and 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 and Chimini, 2001). Hasta el momento en *Leishmania* no se han caracterizado proteínas tipo *escramblasas* y un rastreo en su genoma no ha aportado ninguna secuencia homóloga con las *escramblasas* humanas. Estos hechos indican que estas proteínas no se encuentran conservadas en el genoma de este parásito.

En los últimos años, se han realizado diferentes estudios para tratar 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 and 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).

Recientemente, nuestro grupo 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 (Perez-Victoria *et al.*, 2003b; Perez-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 *flipasa* 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; van Meer *et al.*, 2008) .

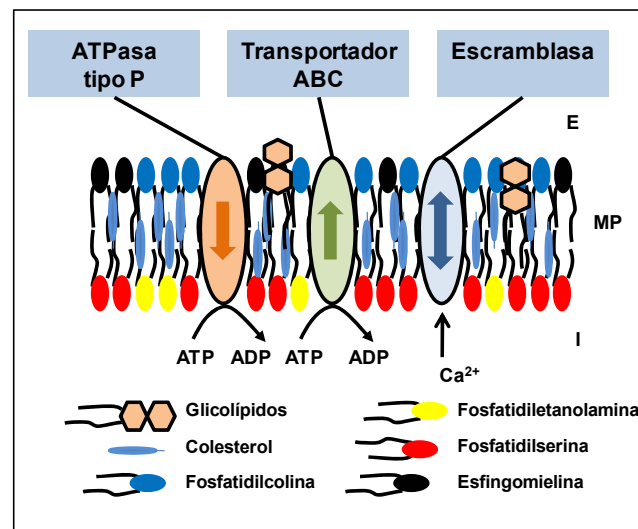


Figura 9. Translocación de fosfolípidos a través de la membrana. Las ATPasas tipo P4 translocan fosfolípidos hacia el interior (I) celular (actividad *flipasa*). Los transportadores ABC, translocan fosfolípidos en dirección al exterior (E) celular (actividad *flipasa*). Las proteínas con actividad escramblasa, 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 endoplasmático 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 and Kent, 1983). El mecanismo molecular por el que se lleva a cabo este

rápido transporte intercompartmental 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 endoplasmático 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. 10**) (Nichols, 2002).

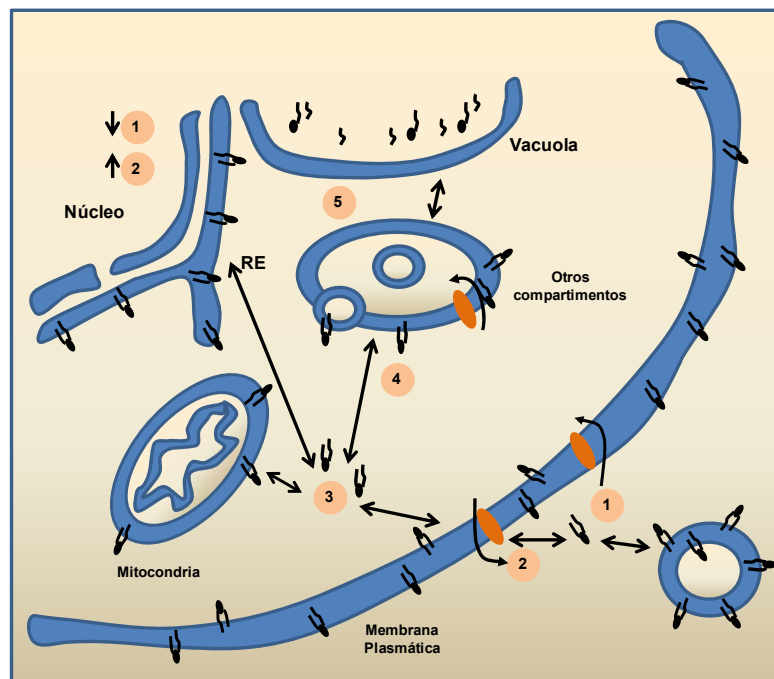


Figura 10. Esquema del tráfico de análogos de fosfolípidos en levaduras. Vía translocación (1-2), transporte intracelular (3-5). MP, membrana plasmática; RE, retículo endoplasmático (Tomado de (Nichols, 2002).

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 and Voelker, 2002).

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 endoplasmático hasta la membrana plasmática. La proximidad del retículo endoplasmático 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 endoplasmático y la membrana plasmática determinan una importante ruta de transporte de esteroides (Menon, 2002).

TRANSPORTADORES ABC.

Los transportadores ABC (*ATP Binding Cassette*) se encuentran presentes tanto en procariotes como en eucariotes y constituyen una gran familia de permeasas que transportan moléculas como: iones, aminoácidos, péptidos, antibióticos, polisacáridos, proteínas, etc (Linton and Higgins, 1998). Estas proteínas están compuestas de dos dominios transmembranales conformados por 6 α -hélices (TMDs) y dos dominios que enlazan ATP (NBDs) y se ha reportado que su función es dependiente de la hidrólisis de ATP (revisado por (Higgins, 1992).

La mayoría de los transportadores ABC bacterianos son codificados por genes organizados en operones, en cambio, en los eucariotes son codificados por un único gen. Dependiendo de la dirección de traslocación estos transportadores se clasifican en **exportadores** e **importadores**. Los tipo **importadores** se encuentran presentes sólo en los organismos procariotes y están involucrados en la captación de nutrientes, como por ejemplo: la permeasa de maltosa en *E. coli* o el sistema de transporte de oligopéptidos de

Streptococcus pneumoniae. En general, los transportadores ABC en los organismos procariotes se encuentran asociados a una proteína extracitoplasmática (SBP), localizada en el periplasma de las bacterias Gram (-) o ancladas por una región aminoterminal lipídica en la vecindad de las membranas de las bacterias Gram (+). Los transportadores tipo **exportadores** se encuentran presentes tanto en los organismos procariotes como en los organismos eucariotes. En este grupo se encuentran por ejemplo, las P-glicoproteínas que se encuentran asociadas al fenotipo de multiresistencia en células tumorales o la proteína de la fibrosis cística (CFTR) (Borges-Walmsley and Walmsley, 2001).

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 (NBD) (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. 10**) (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 **NBDs**, 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 de la familia). 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 NBD 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 NBDs 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 NBD1 de ABCR funciona como una nucleotidasa general (Biswas, 2001).

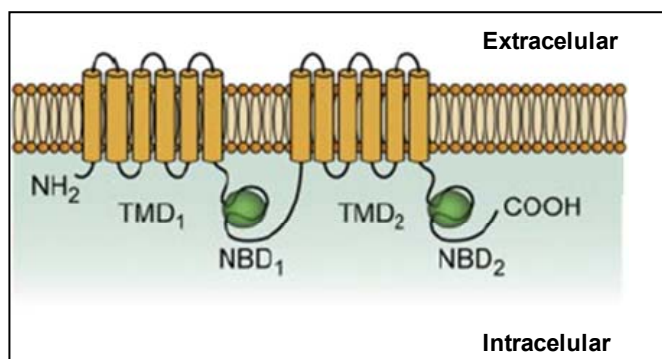


Figura 10. Organización estructural de un transportador ABC típico. Se observan los segmentos hidrofóbicos (café) insertados en la membrana y los dominios de unión a nucleótidos NBD (verde) dispuestos hacia el interior celular.

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 and Roth, 2001), si bien la estructura propuesta ha sido posteriormente considerada como un artefacto (Davidson and Chen, 2005), lo que ha llevado a los autores a retractarse de su error (Chang *et al.*, 2006).

Recientemente, se han obtenido las estructuras cristalinas de cuatro transportadores ABC. Tres de ellos son importadores: el transportador de la vitamina B12 (BtuCD) de *E. coli* (**Fig. 11C**), el transportador de metales HI1470/1 de *H. influenzae* (**Fig. 11D**) y el transportador de molibdato/ tungsteno ModBC de *A. fulgidus* (**Fig. 11B**) y un exportador denominado Sav1866 de *S. aureus* (Dawson and Locher, 2006; Hollenstein *et al.*, 2007) (**Fig. 11A**). La estructura (3 Å) de Sav1866, presenta una secuencia y características bioquímicas que lo emparentan con la 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 (NBD). Las dos subunidades presentan un giro considerable una sobre otra, con lo que tanto los TMDs como los NBD se encuentran interaccionando muy cercanos en el espacio. Los NBD 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 NBD, 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 NBD 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 NBD a los TMDs a través de interacciones no covalentes en la superficie de contacto entre los lazos intracelulares y los NBD. 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 NBD de la subunidad contraria. Esta hipótesis desafía los modelos mecánicos que sugieren que los NBD dimerizan al unirse el ATP y se disocian por completo al finalizar el ciclo de transporte (ver siguiente apartado).

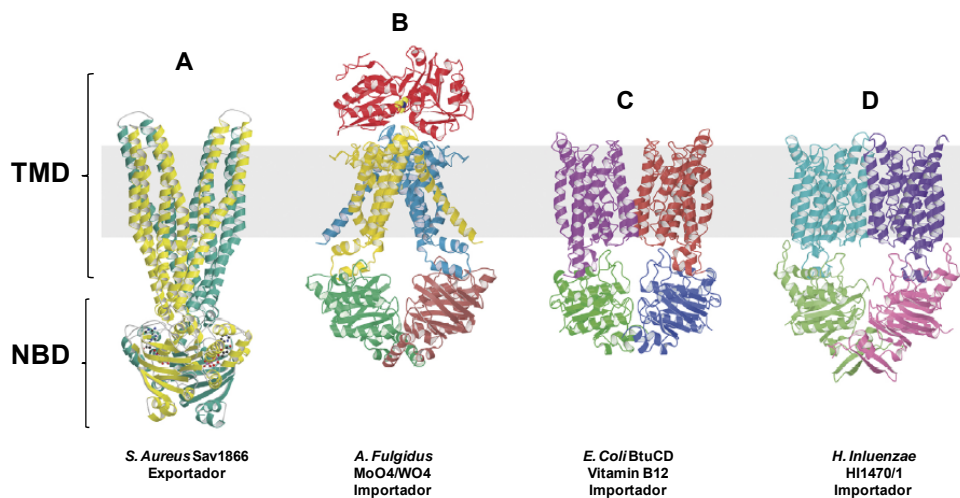


Figura 11: Representación de las estructuras cristalinas de cuatro transportadores ABC. Los TMD del exportador Sav1866 se encuentran fusionados con los NBD, sin embargo los TMD y NBD en los transportadores tipo exportadores se encuentran separados (Hollenstein *et al.*, 2007).

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 (**Fig. 12**) (Rosenberg *et al.*, 2003).

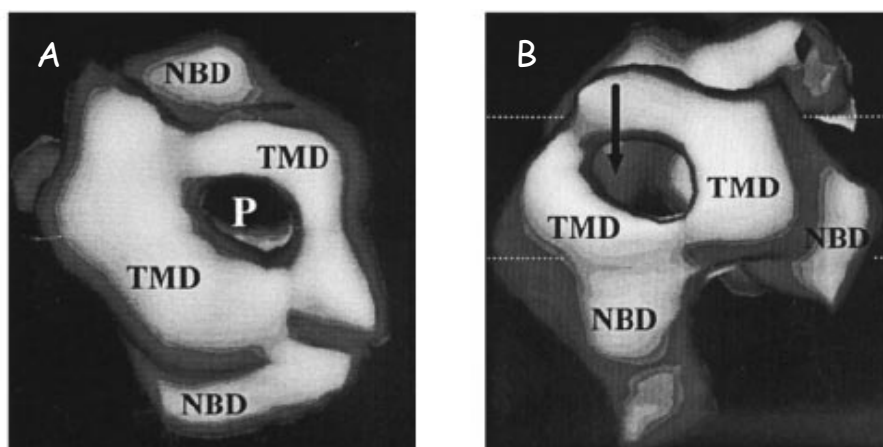


Figura 12. Representación gráfica de la estructura tridimensional de la proteína Pgp deducida a partir de los resultados de microscopía electrónica. P, poro acuoso abierto hacia la cara externa de la membrana plasmática; TMD, dominios transmembrana; NBD, lóbulos de 3 nm que probablemente corresponden 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).

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 and 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. La unión del sustrato origina un cambio conformacional en los TMDs que se transmite a los NBDs para iniciar la hidrólisis del ATP. Para ello, se requieren los dos NBDs activos, aunque existe un mecanismo catalítico alternativo por el cual un solo NBD hidroliza el ATP (revisado por (Sarkadi *et al.*, 2006). Hasta hace poco se pensaba que la hidrólisis de ATP producía cambios conformacionales en los NBDs 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 (Sauna and Ambudkar, 2007). 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 NBDs (Higgins and 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 and 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 (revisado por (Ambudkar *et al.*, 2006).

Clasificación de la familia ABC.

En la actualidad, se han reportado que en humanos están presentes 50 genes que codifican proteínas ABC. Análisis filogenéticos han clasificado estos transportadores en 7 subfamilias diferentes en base a la similitud de sus estructuras génicas y la homología de sus secuencias (Stefkova *et al.*, 2004) , [\(<http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm>\)](http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm).

En la subfamilia ABCA se encuentran presentes ABCA1, involucrado en el transporte de colesterol, PS y PC; ABCA3 transporta PC y colesterol; ABCA12 transporta glucocilceramida y ABCA4 o ABCR que transporta derivados de la vitamina A y se expresa sólo en las células fotorreceptoras de la retina.

A la subfamilia ABCB pertenece la proteína MDR3 o ABCB4 se expresa en el hígado y participa en la secreción de la fosfatidilcolina y el colesterol. La Pgp MDR1 (ABCB1), que confiere el fenotipo de multirresistencia a fármacos (MDR) en células de cáncer. 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 NBD que heterodimerizan para transportar péptidos al retículo endoplasmático, los cuales son presentados como antígenos a las moléculas HLA de clase I.

Por su parte, los miembros de la subfamilia ABCC 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 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 a fármacos. 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 son "half transporters" y presentando un único TMD y un NBD localizados en el extremo C-terminal. Pueden actuar como homodímeros u heterodímeros. Se ha descrito que transportan ácidos grasos como la acetil-CoA. Las subfamilias ABCE y ABCF contienen proteínas ABC que no son transportadoras. Tienen dominios NBD, pero no TMD.

La subfamilia ABCG contiene 6 transportadores con un NBD 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, como el colesterol. Mientras que ABCG2 (MXR, BCRP) se ha relacionado con la multirresistencia a fármacos en las células tumorales y el transporte de PS (**Tabla I**).

Transportador	Substrato	Ubicación	Enfermedad
ABCA1	Colesterol, PC, PS	Membrana plasmática	Enfermedad de Tangier, hipoalfaproteinemia
ABCA3	PC, colesterol	Querpos lamelares de los pulmones	Insuficiencia pulmonar
ABCA4	N-retilidenofostadil etanolamina	Discos fotoreceptores	Síndrome de Stargardt y degeneración macular relacionada con edad
ABCA12	Glucosilceramida	Querpos lamelares de la piel	Ictiosis arlequina
ABCB4	PC, cholesterol	Membrana de los canales biliares	Colestasis hepática
ABCD1	Acyl-Coa	Peroxisomas	Adrenoleucodistrofia asociado al cromosoma X
ABCG1	PC, SM y colesterol	Membrana plasmática	Lipidosis pulmonar
ABCG2	PS	Membrana plasmática	-
ABCG5/ G8	Stosterol, colesterol	Membrana apical	Stosterolemia y hipercolesterolemia

Tabla I: Transportadores ABC relacionados con el transporte de lípidos ((van Meer *et al.*, 2008).

Subfamilia ABCG.

Esta subfamilia contiene cinco proteínas que se caracterizan por presentar una organización de sus dominios inversa a la del resto de los transportadores ABC, con un único NBD en el extremo amino y un TMD en el extremo carboxilo (**Fig.13**).

Existen, 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.*, 2001).

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.

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 and Loomis, 2002). La primera teoría postula que el ABCG original, en el que el NBD 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 teoría 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-NBD-TMD-NBD) tras la pérdida del primer TMD y del segundo NBD. La duplicación en tándem y fusión de los genes “half-transporters” ABCG podría haber dado lugar a los transportadores completos de la subfamilia ABCG (revisado por (Kusuhara and Sugiyama, 2006; Lorkowski *et al.*, 2001).

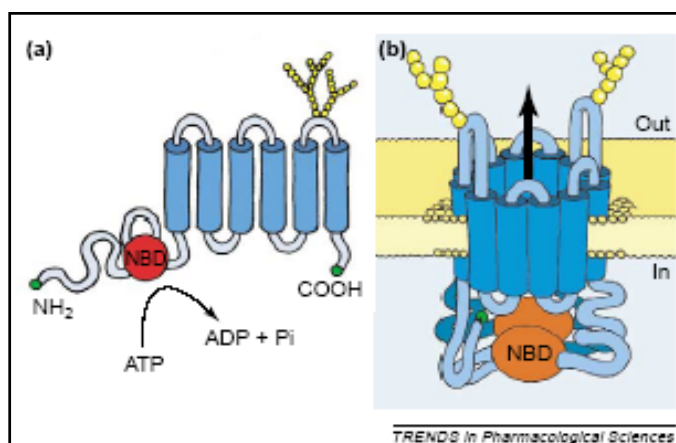


Figura 13. Organización estructural de un transportador ABCG. a) Se observa el dominio de unión a nucleótidos (NBD) (rojo) en el extremo amino, y los segmentos transmembrana (celestes) en el extremo carboxilo. b) representación topológica de un transportador ABCG que muestra su orientación en la membrana plasmática (Kusuhara and Sugiyama, 2007) .

ABCG1.

El gen ABCG1 fue clonado por primera vez apartir de una línea de macrófagos de ratones (P388D1) y de retina humana y presentó un 34% de identidad con la proteína *white* de *Drosophila* (Croop *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1996; Savary *et al.*, 1996). 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 and Oram, 2005), si bien esto no está totalmente claro.

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).

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 RXR (**Fig.14**). (Kennedy *et al.*, 2001a; Klucken *et al.*, 2000). La activación de estos receptores nucleares ocurre por la presencia de 9-cis ácido retinoico y el 22R-hidroxicolesterol-oxisterol. Se ha descrito, que ABCG1 se localiza en los compartimentos intracelulares especializados en la red trans-golgi, que ocurre vía AP3. La proteína ABCG1 posee señales de dileucina ubicados en la región N-terminal y el reconocimiento de esta señal dirigiría a

ABCG1 vía AP3. Dentro de estos compartimentos ABCG1 puede funcionar como homodímero facilitando la traslocación de fosfolípidos y colesterol hacia la membrana plasmática. Se plantea que la salida de estos lípidos depende de las proteínas ABCA1 y ABCG1. ABCG1, mediaría 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 redistribuiría el colesterol a los dominios de la superficie celular que son accesibles para su retirada por HDL (Cavelier *et al.*, 2006; Vaughan and 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.

Alternativamente, ABCG1 podría participar en el eflujo de lípidos sin la participación de la proteína ABCA1 vía ApoE. 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; Tall, 2008). Se ha especulado sobre la posible implicación de ABCG1 en el transporte de oxisteroles, y su papel protector frente a la muerte celular inducida por 7β -hidroxicolesterol (Engel *et al.*, 2007).

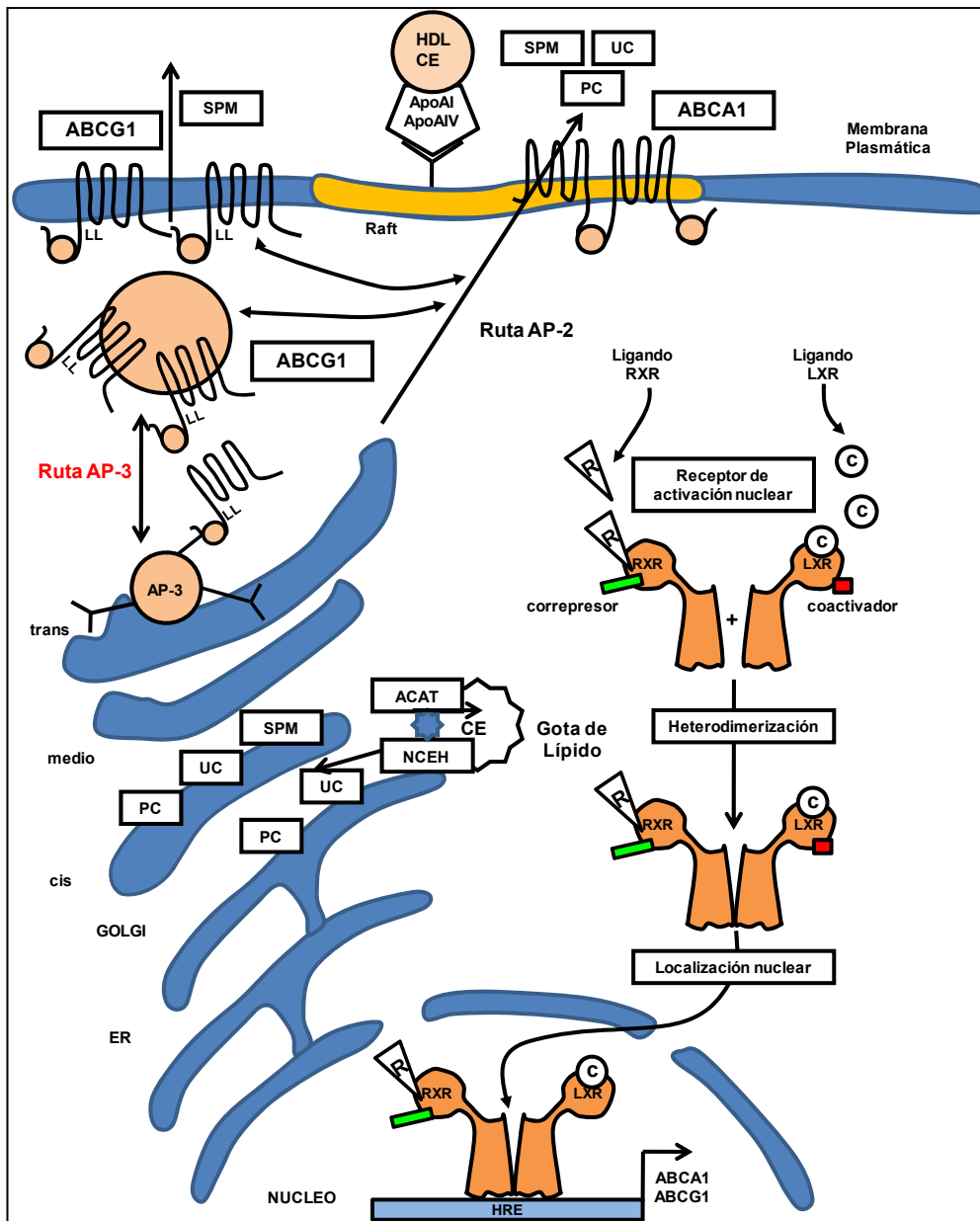


Figura 14: Implicación del ABCG1 humano en el tráfico de lípidos en los macrófagos. La captación de esteroides vía LXR/RXR causa la activación transcripcional de los genes ABCG1 y ABCA1. ABCA1 se ubica en la membrana plasmática y su ubicación es controlada por la vía AP-2. ABCG1 es llevada hacia la membrana plasmática vía AP-3 mediante transporte vesicular. ABCA1 facilita el eflujo de los lípidos desde microdominios en la membrana (Raft). C: colesterol; COP: proteína coatomero; E: Ecdisona; HRE: elemento de respuesta a la hormona; NCEH: ester colesteril neutral hidrolasa; PC: fosfatidilcolina; R: ácido retinoico; SPM: esfingomielina; TGN: transgolgi; UC: colesterol no esterificado (Schmitz *et al.*, 2001).

En *D. melanogaster* se ha descrito tres proteínas tipo ABCG1 (White, Scarlet and Brown) que son reponsables del transporte de un metabolito intermediario denominado 3-hidroxiquinurenina. Este metabolito tiene que ser llevado a unos gránulos que se encuentran en los ocelos de *D. melanogaster* y son estas proteínas las encargadas de su transporte. Si alguna de estas proteínas se encuentra mutada, el resultado será que los ocelos de *D. melanogaster* no tendrán pigmentación, resultando el fenotipo de ojos blancos (Schmitz *et al.*, 2001).

ABCG2.

El gen *ABCG2* humano consta de 16 exones y 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). 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, se ha establecido un consenso sobre la denominación de este gen, siguiendo las recomendaciones del "Human Genome Nomenclature Committee", por el cual se le denomina *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 el transporte de PS en células de carcinoma gástrico humano (Woehlecke *et al.*, 2003). Además, *ABCG2* se encuentra en muchos tejidos normales como la placenta, hígado, intestino delgado, pulmón, riñón, glándulas adrenales, endotelio y células madre. Tanto en el intestino humano como de ratón, *ABCG2* se expresa en la membrana apical de enterocitos y los glóbulos rojos inmaduros y está implicado en el eflujo de porfirinas como el hemo, desde el interior celular (**Fig. 15**) (Jonker *et al.*, 2002; Latunde-Dada *et al.*, 2006; 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).

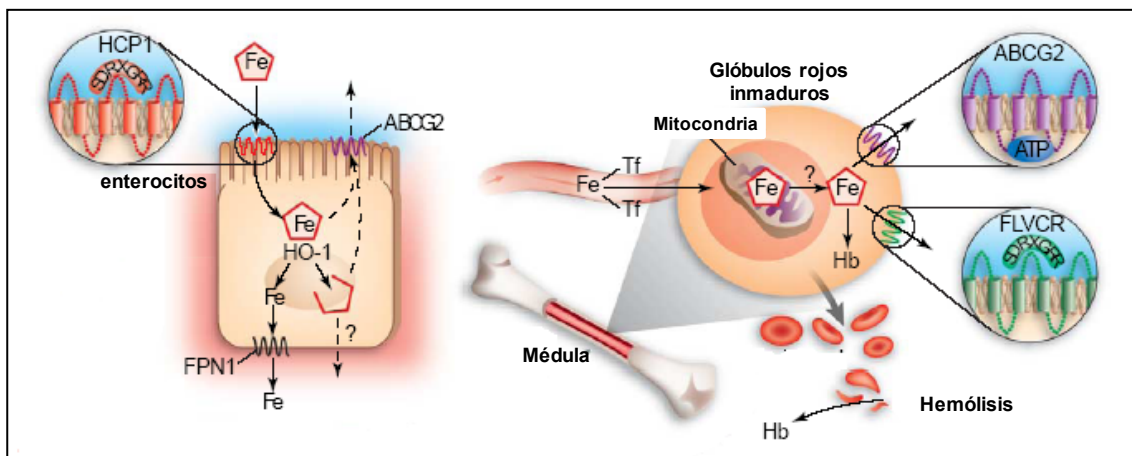


Figura 15: Transporte de hemo en enterocitos y glóbulos rojos inmaduros. En los enterocitos, HCP1 es una metaloproteína responsable de la absorción del hemo desde la dieta. Una vez en el citosol, el hemo es degradado por HO-1 liberando el hierro y porfirinas. ABCG2 se expresa en la cara apical de los enterocitos y actúa eliminando el exceso de porfirinas desde el interior celular. La ferroportina 1 (FPN1) transporta el Fe para su posterior absorción. En los eritrocitos inmaduros, ABCG2 y FLVCR previenen la acumulación de hemo que es tóxico para las células (Latunde-Dada *et al.*, 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.

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). Recientemente, ABCG2 se purificó y expresó 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.

ABCG2 interacciona con las porfirinas y compuestos derivados de éstas, y estudios recientes sugieren que el hemo es un sustrato natural de ABCG2 (Jonker *et al.*, 2002; Krishnamurthy *et al.*, 2004; Krishnamurthy *et al.*, 2007a). El feoforbido 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). También se ha descrito, que ABCG2 transporta 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).

Cambios en un único aminoácido en residuos clave de los transportadores ABC pueden alterar su capacidad de hidrolidar ATP o cambiar su especificidad por el sustrato. En el caso de ABCG2 el cambio de una lisina por una metionina en la posición 86 bloquea la hidrólisis del ATP. Esta lisina es altamente conservada y se encuentra en el Walker A del NBD. Se ha descrito que esta mutación puntual no impide las propiedades de oligomerización, permitiendo así la homodimerización u heterodimerización de los hemi-transportadores como ABCG2 (Morisaki *et al.*, 2005; Ozvegy *et al.*, 2002).

Otra importante mutación en ABCG2 es 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.

ABCG4.

La proteína ABCG4 humana esta constituida por 14 exones y basándose en su homología y similitud con ABCG1 se clonó a partir de librerías de

testículo (Annilo *et al.*, 2001; Oldfield *et al.*, 2002). 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 oxisteroles 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).

ABCG5 y ABCG8.

Los genes *ABCG5* y *ABCG8* (Berge *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001), se localizan enfrentados en sus extremos aminotermiales 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). La salida de esteroides ocurre desde las células intestinales y del hígado al conducto biliar. Una dieta normal posee entre 250 mg - 500 mg de colesterol y entre 200 mg - 400 mg de esteroides no colesterol como el sitosterol. 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 tanto de *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).

Transportadores ABC en *Leishmania*.

En la actualidad, hay cuatro subfamilias de transportadores ABC estudiadas en *Leishmania* sp.: las subfamilias ABCA, ABCB, ABCC y ABCG, las cuales siguen la misma nomenclatura que los transportadores ABC humanos con los que presentan mayor homología (revisado por (Perez-Victoria *et al.*, 2001a). Además, el análisis de las secuencias del proyecto genoma de *Leishmania*, muestra la existencia de varias secuencias que presentan homología 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. 16).

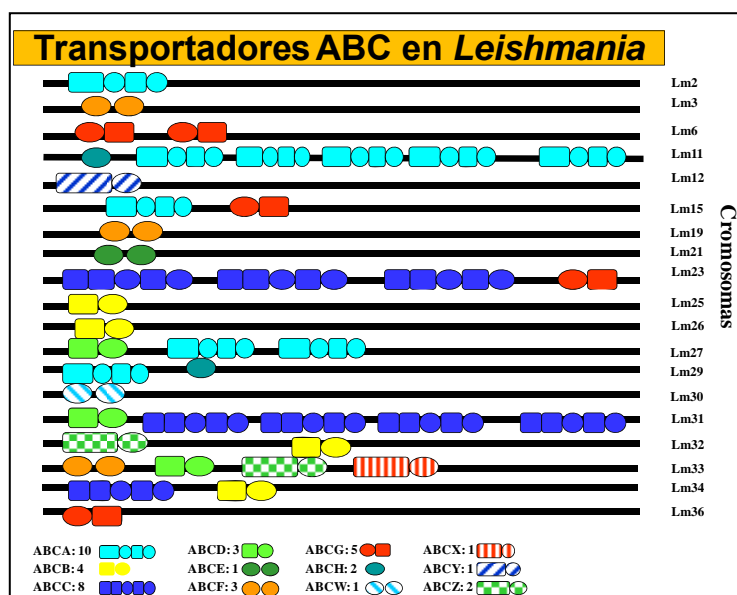


Figura 16. Localización cromosómica de los genes que codifican proteínas ABC en *Leishmania*. Los cromosomas aparecen representados por líneas horizontales. Los rectángulos indican el dominio TMD y los círculos el dominio NBD. Adaptado de Leprohon *et al.* (2006).

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. 17**). *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 (Araujo-Santos *et al.*, 2005).

Subfamilia ABCB.

En 1992 se identificó un segundo grupo de transportadores ABC en *Leishmania*, la subfamilia ABCB (**Tabla II**). 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, entre los que cabe citar al 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 endoplasmático y exportados del parásito mediante exocitosis (Dodge *et al.*, 2004).

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* contiene al menos 4 miembros más cuyos genes se distribuyen en dos *loci* en el genoma de *Leishmania* (**Tabla II**). 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).

Specie	Genes	Protein	A	Drug	Reference
<i>Leishmania tarentolae</i>	<i>ltpgpA</i>	LtPgpA	H	Arsenite Antimonio	Dey <i>y col.</i> , 1994. Legare <i>y col.</i> , 1994; Ferreira-Pinto <i>y col.</i> , 1996.
<i>Leishmania enrietti</i>	<i>lemdr1</i>	Lemdr1	V	Vinblastine	Chow <i>y col.</i> , 1993
<i>Leishmania donovani</i>	<i>ldmdr1</i>	Ldmdr1	V	Vinblastine	Chow <i>y col.</i> , 1993
<i>Leishmania amazonensis</i>	<i>lamdr1</i>	LaMDR1	DN	Daunomycine	Katakura <i>y col.</i> , 1999
<i>Leishmania tropica</i>	<i>ltrmdr1</i>	LtrMDR1	DN	Daunomycine Miltefosine	Chiquero <i>y col.</i> , 1998
<i>Leishmania major</i>	<i>dhfr-ts</i>	DHFR-TS	R	Methotrexate	Ouellette, 2001; Gourley <i>y col.</i> , 2001.
<i>Leishmania major</i> , <i>Leishmania tarentolae</i>	<i>ptr1</i>	PTR1 (HMTX) PTR1 (LTDH)	H	Methotrexate Primaquine	Luba <i>y col.</i> , 1997; Ouellette, 1993
<i>L. donovani</i>	<i>ldMT</i>	LdMT	-	Miltefosine	Pérez-Victoria, 2003
<i>L. infantum</i>	<i>abcg4</i>	LABCG4	-	Miltefosina	Castanys-Muñoz <i>y col.</i> , 2007
<i>L. infantum</i>	<i>abcg6</i>	LABCG6	-	Miltefosina Edelfosina Perifosina Aminoquinolinas	Castanys-Muñoz <i>y col.</i> , 2008 (publicación enviada)
<i>L. donovani</i>	<i>abcg6</i>	LABCG6	-	Captotecina	Dasgupta <i>y col.</i> , 2008

Tabla II. Genes implicados en el fenotipo de multiresistencia a fármacos en *Leishmania sp.*

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 (tripanotio) 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).

Subfamilia ABCG

Se han caracterizado dos transportadores ABCG en *Leishmania sp.* (Tabla II), que han sido denominados LABCG4 y LABCG6. El transportador LABCG4 confiere resistencia a miltefosina y está implicado en el transporte del análogo de fosfolípido fosfatidilcolina. Construcciones moleculares utilizando la proteína verde GFP, han indicado que su localización sería en la membrana plasmática y cerca del bolsillo flagelar del parásito (Castanys-Munoz *et al.*, 2007). Por otra parte, LABCG6 confiere resistencia a camptotecina y estudios de RT-PCR indican la sobreexpresión del RNAm para este gen tanto en el estadio promastigote como amastigote. También, en este trabajo se describe la amplificación de transcritos que codifican para LABCG4, en líneas de *Leishmania* resistentes a miltefosina (Bosedasgupta *et al.*, 2008). Recientemente, se ha descrito que la sobreexpresión de LABCG4 confiere resistencia a miltefosina, edelfosina y perifosina, así como a las aminoquinoleínas: sitamaquina, cloroquina y mefloquina. Construcciones moleculares utilizando la proteína verde GFP, han indicado que su localización sería en la membrana plasmática del parásito (Castanys-Muñoz y col., 2008; artículo enviado para su publicación).

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 implicada 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).

Tráfico de hemo

Los trypanosomatidos como *Leishmania* son auxotrofos para el hemo y necesitan tomarlo desde el exterior para suplir sus necesidades metabólicas (Pal and Joshi-Purandare, 2001; Srivastava *et al.*, 1997). A diferencia de los eucariotas superiores se ha reportado que *Leishmania* posee cinco de las ocho enzimas necesarias para la biosíntesis de hemo con excepción de la ferroquelatasa. (**Fig. 12**) (Dutta *et al.*, 2008; Sah *et al.*, 2002).

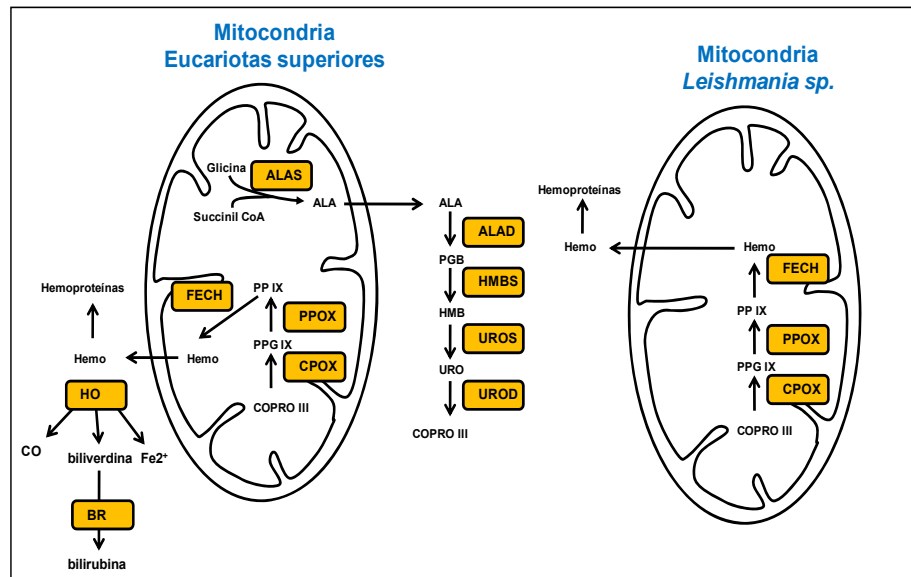


Figura 12. Biosíntesis de hemo en eucariotas superiores y *Leishmania sp.* Ala: ácido 5-amonovulinico; PBG: porfobilonogeno; HMB: hidroximetilbilano; UROIII: uroporfirinógeno III; COPRO III: Coproporfirinogeno III; PPG IX: protoporfirinogeno III; PP IX: Protoporfirina IX; CO: monóxido de carbono; ALAS: 5-aminovulinato sintetasa; ALAD: 5-amilovulinato deshidratasa; HMBS: hidroximetilbilano sintetasa; UROS: Uroporfirinógeno III sintetasa; UROD: Uroporfirinógeno descarboxilasa; CPOX: Coproporfirinógeno oxidasa; FECH: ferroquelatasa; HO: hemoxigenasa; BR: biliverdina reductasa, Tomado y adaptado de (Dutta *et al.*, 2008).

Este defecto en la síntesis de tetrapirroles se manifiesta por un requerimiento nutricional de hemo o hemoglobina (Hb) o su precursor intermedio, la protoporfirina IX (Rao *et al.*, 2005). El hemo es requerido para la síntesis de diversas hemoproteínas como son los citocromos. Por lo tanto, *Leishmania* necesita tomar este metabolito cuando esta presente en el insecto-vector o dentro del macrófago. Se ha demostrado que *L. mexicana* posee en su membrana una molécula que une hemo específicamente y que esta unión se ve aumentada en la fase logarítmica de crecimiento y disminuye en la fase estacionaria de crecimiento (Galbraith and McElrath, 1988).

Por otra parte, la obtención de Hb por parte de *Leishmania* es un proceso de endocitosis mediada por receptor. Se sabe, que la Hb se une a una hexoquinasa de 46 kDa que se encuentra ubicada en el bolsillo flagelar (Krishnamurthy *et al.*, 2005; Sengupta *et al.*, 1999). Posteriormente, la Hb es endocitada en los endosomas tempranos en un proceso mediado por Rab5, y en los endosomas tardíos por Rab7, (Singh *et al.*, 2003). También, se ha

descrito la que la presencia de Hb asociada a Rab7 no solo en los endosomas tardios sino también en los endosomas tempranos. Posteriormente, la Hb continua con esta ruta endocítica hasta alcanzar los lisosomas para su degradación (Patel *et al.*, 2008) (**Fig. 13**).

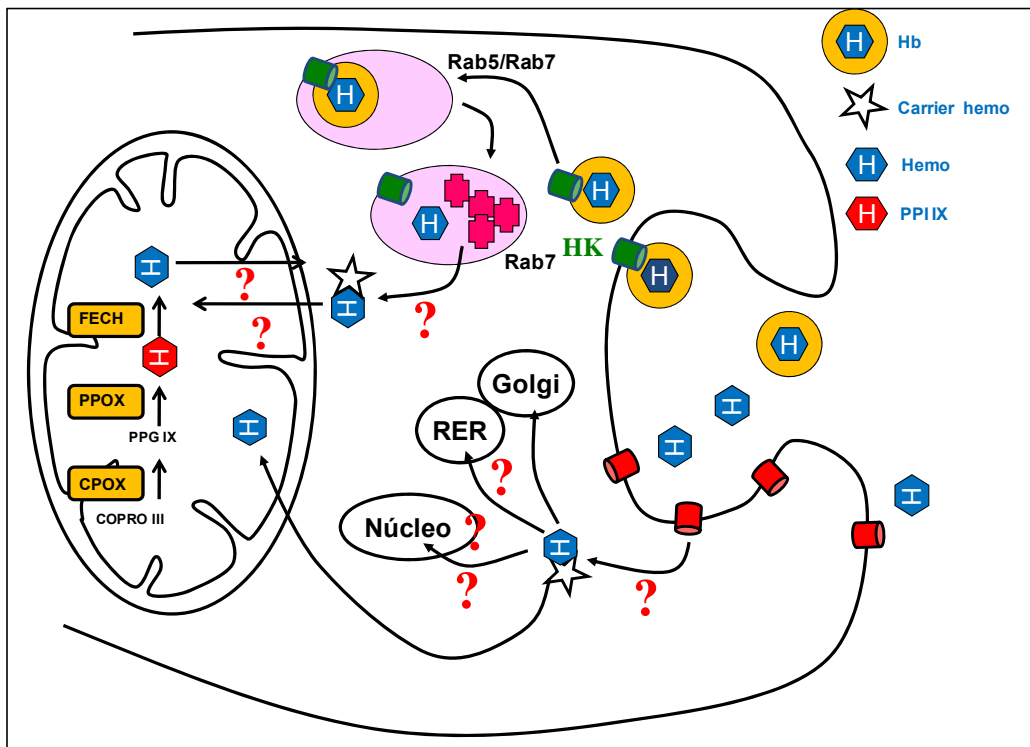


Figura 13: La obtención de hemo en el estadio promastigote de *Leishmania sp.* depende de dos vías. La primera es la degradación de Hb via Rab5/Rab7 y la segunda por la entrada de hemo libre. Los signos de interrogación indican las vías del tráfico de hemo que se desconocen en la actualidad (Galbraith and McElrath, 1988; Patel *et al.*, 2008; Sengupta *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2003).

Como se ha indicado anteriormente, la Hb (presente en el suero) puede sustituirse por hemina cuando se cultivan promastigotes de *Leishmania*. No se sabe a ciencia cierta cual es la fuente fisiológica de hemo en los amastigotes intracelulares de *Leishmania*, la Hb(Chang and Chang, 1985), o bien el hemo liberado tras la digestión de Hb y de otras hemoproteínas del hospedador en la vacuola parasitófora(Akilov *et al.*, 2007; Kelly *et al.*, 2003). En cualquier caso, el hemo libre es capaz de entrar en el parásito por un mecanismo desconocido. Compuestos que probablemente se acomplejan con el hemo en la vacuola parasitófora, fuera por tanto del parásito, presentan una extraordinaria actividad leishmanicida(Kelly *et al.*, 2003). En mamíferos, recientemente se ha descrito la

existencia de un transportador (HCP1) implicado en la entrada de hemo en el intestino (Shayeghi *et al.*, 2005). Sin embargo, no existe ningún homólogo en tripanosomátidos por lo que el receptor de *Leishmania* debe ser diferente. Se ha descrito que *Leishmania* es capaz de unir hemo mediante un receptor específico no identificado, que es modulado por la fase de crecimiento del parásito (Galbraith and McElrath, 1988). De acuerdo con este trabajo, existirían 400 sitios de unión a hemo por promastigotes estacionarios de *Leishmania*, y unos 1700 en parásitos en división. Es interesante indicar que la afinidad de estos transportadores por el hemo (Kd del orden de 0.03 nM) se aumenta 5 veces al bajar de pH 7,4 a 5,4 (Galbraith and McElrath, 1988). Este aumento de la afinidad por el hemo podría tener una importancia fisiológica en el caso de que los amastigotes intracelulares de *Leishmania* captasen el hemo liberado tras la digestión de hemoproteínas en la vacuola parasitófora, un compartimento de pH ácido. De hecho, recientemente se ha demostrado que estos amastigotes intracelulares son capaces de acumular las porfirinas sintetizadas en el macrófago (Akilov *et al.*, 2007).

En el caso de *Trypanosoma*, recientemente se ha descrito que los epimastigotes de *T. cruzi* internalizan el hemo libre de una manera mucho más rápida que la Hb, que entra por endocitosis (Lara *et al.*, 2007). Además, usando inhibidores de transportadores ABC como la ciclosporina A (CSA), los autores llegan a la conclusión de que la proteína responsable de la entrada de hemo libre pertenece a esta familia de proteínas (Lara *et al.*, 2007) aunque no se aporta ninguna prueba directa y no se conoce ningún transportador ABC en eucariotas involucrado en el importe de sustratos, es decir, el transporte en dirección TMD-NBD. No se sabe nada sobre el tráfico de porfirinas en *T. brucei*. Aunque podría pensarse que en el estadio sanguíneo este parásito no necesita el grupo hemo al no expresar citocromos mitocondriales, el papel fisiológico del hemo es mucho más amplio (Lopez-Barneo and Castellano, 2005; Tsiftoglou *et al.*, 2006), por lo que las proteínas implicadas en el transporte también podrían ser esenciales. Un ejemplo es el citocromo CYP51 (esterol 14 α -demetilasa), una enzima esencial para la síntesis de esteroides en los tres tripanosomátidos y en hongos.

Cualquiera que sea la forma en la que el hemo entra al interior del parásito, una vez en el citoplasma este metabolito (que probablemente se une a proteínas citosólicas para evitar su toxicidad) debe llegar a los distintos orgánulos donde se necesita. Aunque no es el único, un destino principal es la mitocondria, donde el grupo hemo se incorpora a proteínas de la cadena respiratoria. La entrada del hemo a la mitocondria de los parásitos podría ser por tanto una atractiva diana farmacológica, aunque como en el caso anterior, no se sabe nada sobre los transportadores que la llevan a cabo en los tripanosomátidos. En los últimos años se han descubierto algunas de las proteínas responsables de este transporte mitocondrial en células humanas. A finales de 2006 se describió que el hemi-transportador ABC humano ABCB6 se localiza en la membrana externa mitocondrial y es responsable del transporte de porfirinas precursoras del hemo al interior de la mitocondria (Krishnamurthy and Schuetz, 2006). A su vez, otro “half transporter” de la misma subfamilia, llamado ABCB10, se localizaría en la membrana mitocondrial interna, y podría estar involucrado en la salida de hemo al espacio intramembranal (Dunn *et al.*, 2007). Por otra parte, la relación de ABCB7 (ortólogo de ABCB6) y ABCB8 (ortólogo de ABCB10) con el tráfico de porfirinas también se ha sugerido, aunque su papel exacto no se conoce (Krishnamurthy *et al.*, 2007b). Estos últimos transportadores podrían estar relacionados con la homeostasis del hierro, a nivel de transporte de “clusters hierro-azufre”, también esenciales para la célula (Lill and Kispal, 2000). En tripanosomátidos existen dos proteínas de esta subfamilia ABCB: una podría ser homóloga de ABCB6-ABCB7 (alrededor de 35 % identidad y 56 % similitud) y la otra de ABCB8-ABCB10 (alrededor de 31 % identidad y 51 % similitud). Otra proteína involucrada en transporte de hemo en la mitocondria es OGC (2-oxoglutarate carrier), localizada en la membrana interna mitocondrial. Se ha sugerido que sería responsable de la entrada de porfirinas precursoras del hemo desde el espacio intermembranal hacia la matriz mitocondrial (Kabe *et al.*, 2006). Por último, ABCG2 y FLVCR también se han relacionado con tráfico de porfirinas (Krishnamurthy *et al.*, 2007b). Se localizan en la membrana plasmática y expulsan el exceso de porfirinas fuera de la célula, para evitar su toxicidad. ABCG2 es de la misma subfamilia que el transportador de *Leishmania* LABCG5, que como hemos

descrito recientemente (Campos J), es requerido para el rescate del hemo proveniente de la Hb. FLVCR no tiene homologo en tripanosomátidos.

RESULTADOS

Classification: BIOLOGICAL SCIENCES: Microbiology

A new ABC transporter is necessary for heme salvage in *Leishmania*, a pathogenic protozoan parasite auxotroph for this porphyrin.

Jenny Campos-Salinas, Santiago Castanys, Francisco Gamarro* and José M. Pérez-Victoria* .

Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”, CSIC, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avda. del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain.

* To whom correspondence may be addressed: E-mail: josepv@ipb.csic.es; gamarro@ipb.csic.es; Tel.: +34958181658/667; Fax: +34 958181632.

Manuscript information: 20 pages and 7 figures. As supplementary material, 2 pages, 7 figures and 1 table.

Abbreviations: ABC, ATP-binding cassette; Hb, hemoglobin; TMD, transmembrane domain; NBD, nucleotide-binding domain; IFI, indirect immunofluorescence; FBS, foetal bovine serum.

Abstract

Leishmaniasis, sleeping sickness and Chagas' disease threaten the life of millions of people worldwide. They are caused by protozoan parasites from the *Trypanosomatidae* family. These parasites are auxotrophs for heme, an essential molecule in aerobic organisms, due to the absence of this biosynthetic pathway. Therefore, trypanosomatids must acquire heme from the host, and proteins involved in intracellular trafficking of porphyrins are attractive candidates to become drug targets. We describe here that *Leishmania* LABCG5, a new ABC half-transporter with significant homology with the human porphyrin transporter ABCG2, is involved in intracellular heme trafficking in this parasite: i) down-regulation of LABCG5 function by overexpressing an inactive version of the transporter caused a dramatic growth arrest unless a free hemin supplement was added or the mutated gene was eliminated; ii) supplementation with hemoglobin, an upstream metabolite normally sufficient to meet parasite heme requirements, was unable to rescue the growth defect phenotype; iii) LABCG5 was precipitated by hemin-agarose, the interaction being dose-dependently inhibited by free hemin. Immunocytochemistry analysis by electron microscopy of sections from high-pressure frozen and freeze-substituted parasites showed that LABCG5 localizes to multivesicular bodies and associated vesicular network. This compartment probably corresponds to late-endosomes/lysosomes where endocytosed hemoglobin is routed. Altogether, these data strongly suggest that LABCG5 is involved in the salvage of the heme released after the breakdown of internalized hemoglobin. As LABCG5 presents an extra transmembrane domain absent in human ABCG proteins, the pharmacological targeting of this route by specific inhibitors could represent a novel approach to control infections.

Introduction

Protozoan parasites from the *Trypanosomatidae* family are responsible for devastating (but neglected) diseases that affect millions of people in developing countries (Ouellette, 2001). These diseases include leishmaniasis, sleeping sickness and Chagas' disease, produced by *Leishmania* spp., *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*, respectively. Their control is based in the use of old chemotherapeutic agents that are poorly effective and hampered by drug resistances, so there is an urgent need to develop new antiprotozoal treatments. Exploiting the biochemical differences between these pathogens and their human host is a rational strategy to identify novel pharmacological targets. One of these particularities is their auxotrophy for heme, an essential molecule in all aerobic organisms, due to the absence of its biosynthetic pathway (Opperdoes and Coombs, 2007; Trager, 1974). Therefore, trypanosomatids must acquire heme from the host, and proteins involved in porphyrin trafficking represent attractive candidates to become targets for the design of new drugs.

In the case of *Leishmania* spp., it is known that heme can be obtained, at least *in vitro*, from an external supplement of free hemin (Chang and Chang, 1985). However, it has been suggested that the physiological heme source is hemoglobin (Hb) (Chang and Chang, 1985), which is taken up through receptor mediated endocytosis (Krishnamurthy *et al.*, 2005; Sengupta *et al.*, 1999), and routed via early Rab5-containing and late Rab7-containing endosomes (Singh *et al.*, 2003). In contrast, nothing is known about how the heme released after Hb breakdown in late-endosomal/lysosomal compartment is then trafficked to the different cellular organelles where it is required. Although it was thought that hydrophobic heme molecules could passively diffuse through the biological membranes, today it is well established that its biophysical properties require the involvement of active transporters (Krishnamurthy *et al.*, 2007b). Some of them have already been characterised in prokaryotic and eukaryotic cells, and in many cases involve transporters from the ATP-binding cassette (ABC) superfamily (Koster, 2001; Krishnamurthy *et al.*, 2007b) such as mammalian ABCG2 (Jonker *et al.*, 2002), a member of the ABCG subfamily. Functional ABC transporters consist of two homologous halves, each one composed of a transmembrane domain (TMD) involved in substrate binding, and a cytosolic nucleotide binding domain (NBD), which hydrolyse ATP providing the energy required for the transport (Higgins, 1992). ABCG proteins are half-transporters with a NBD-TMD topology that requires homo/heterodimerisation to become functional. Mammal ABCG2 (BCRP/MXR/ABCP) was first

studied because of its ability to confer multidrug resistance in cancer cells (Doyle and Ross, 2003) but, during the last few years, its relationship with porphyrin transport has stimulated great interest (Krishnamurthy *et al.*, 2007b). ABCG2 protects against high toxic intracellular levels of exogenous (Jonker *et al.*, 2002) or endogenous (Krishnamurthy *et al.*, 2004) porphyrins, by pumping these compounds out of the cell. Indeed, a direct interaction between porphyrins and ABCG2 enriched membranes (Krishnamurthy *et al.*, 2004) or purified ABCG2 (Pozza *et al.*, 2006) has been recently described. In trypanosomatids, only two ABCG proteins from *Leishmania* have previously been described: LABCG4 is involved in the transport of phosphatidylcholine and confers resistance to alkyl-phospholipids (Castanys-Munoz *et al.*, 2007), whereas LABCG6 confers camptothecin resistance (Bosedasgupta *et al.*, 2008). In this paper, we describe a novel ABCG transporter from *Leishmania* that is involved in heme trafficking in this parasite by allowing the salvage of Hb-derived heme. This new transporter presents an additional TMD absent in mammalian ABCG proteins, which could be an interesting target for its specific inhibition.

Results

Molecular characterization of LABCG5 and generation of a dominant negative line overexpressing an inactive version of this transporter.

We have used human ABCG2, a known porphyrin transporter that confers multidrug resistance, as a template to identify putative analogues in the *L. major* genome database. Hydrophobicity plots analysis indicated that the product of one of the 5 ABCG genes found, named *LABCG5* (GeneDB-*L. major*, Accession Code LmJF23.0380) according to the recent classification of Leprohon *et al.* (Leprohon *et al.*, 2006), presented an unusual topology. It has an extra N-terminal transmembrane domain (TMD0) (Fig. 1) not found in any other ABCG proteins outside trypanosomatids, with the exception of ADP1 from *Saccharomyces cerevisiae* (Purnelle *et al.*, 1991) (Supporting information (SI) Appendix, Fig. 1), and it was therefore selected for functional studies. *LABCG5* codes for a 1241-amino-acid protein with a predicted molecular weight of approximately 135 kDa. There is one homologue in the *T. brucei* genome and 2 in *T. cruzi* (Leprohon *et al.*, 2006). A comparative analysis between the overlapping NBD-TMD fragment of *LABCG5* and human ABCG proteins (SI Appendix Table 1) showed a higher aminoacid similarity with ABCG2 (49.7%), and a lower one with ABCG1 (36.7%). In addition to the close similarity in the primary sequence, *LABCG5* shared two other features with human ABCG2: i) both proteins are half-transporters that require dimerisation to complete the functional NBDs (Bates *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2002) and ii) they have a putative dileucine motif (ExxxLL at positions 959-964 in *LABCG5*) (Schmitz *et al.*, 2001) (Fig. 1 and SI Appendix, Fig. 2). (Schmitz *et al.*, 2001)

We generated reagents destined to study *LABCG5* function. Immunoblotting of total *L. donovani* lysates with newly generated polyclonal antibodies to *LABCG5* revealed by Western blot a single band with an apparent molecular weight of around 135 kDa (Fig. 2A). This size suggests that, in contrast to mammalian ABCG2 (Diop and Hrycyna, 2005; Ozvegy *et al.*, 2002), *LABCG5* is not glycosylated. It is interesting to note that this high constitutive *LABCG5* expression has not been described for any other ABC transporter in *Leishmania* spp. This fact, together with the dimerisation requirement for this kind of proteins to become functional, allowed us to test a dominant negative approach to down-regulate *LABCG5* function. To do this, we first cloned *LABCG5* with its natural 5' and 3' untranslated regions and then introduced a mutation at position 625, a conserved lysine inside the Walker A motif, known to be critical for

ATP hydrolysis in ABC transporters (Ozvegy *et al.*, 2002). The resulting construction was transfected into *L. donovani* and the overexpression of LABCG5^{K/M} was verified by Western blot analysis, as shown in Fig 2B.

Dominant negative parasites for LABCG5 have a growth defect in the absence of free hemin.

During the generation of the transfected lines, we observed that parasites overexpressing mutated LABCG5^{K/M} had an important *in vitro* growth defect. To evaluate whether this phenotype was due to the involvement of LABCG5 in porphyrin trafficking, as we expected, we cultured control and LABCG5^{K/M} overexpressing parasites in medium supplemented with either 10 μ M hemin, 10 μ M Hb or without any supplement. The results confirmed that LABCG5^{K/M} overexpressing parasites grew at a much lower rate than the control line (Fig. 3A), therefore showing a real dominant negative effect. Importantly, this growth defect was rescued by the presence of free hemin, but not for heme bound to Hb (Fig. 3B and 3C). In order to verify that the growth defect observed in the dominant negative line was due to the down-regulation of LABCG5 function, we cured this line for the plasmid by continuous culture passage in the absence of plasmid drug selection pressure. The loss of LABCG5^{K/M} overexpression in this “reverted” line was confirmed by Western blot (inset in Fig 3D), and was correlated with a normal growth in the absence of any hemin supplementation (Fig. 3D).

In contrast to free hemine, Hb is taken up by endocytosis. We therefore set out to verify that the growth defect observed in the dominant negative line was not due to an endocytosis defect. Flow cytometry analysis using the endocytic markers FM 4-64 and sphingomyelin (Vida and Emr, 1995) showed that dominant negative parasites accumulate the same amount of dye as control cells (Fig. 4A and SI Appendix, Fig. 3). We have also tested exocytosis by measuring in real time the recycling of previously internalized FM 4-64, adapting a method developed in yeast (Perez-Victoria *et al.*, 2003a). No differences between control and dominant negative parasites were observed (Fig. 4B). These results ruled out a membrane trafficking delay as being responsible for the growth arrest in dominant negative parasites.

LABCG5 interacts Specifically with Heme

We further examined the relationship of LABCG5 with heme by exploring the interaction between the transporter and this putative substrate. Pull-down experiments

shown in Fig. 5A indicated that LABCG5 could be efficiently precipitated by hemin-agarose. The physical interaction between hemin-agarose and LABCG5 was dose-dependently inhibited by free hemin (Fig 5B), but not by elacridar (SI *Appendix*, Fig. 4), a well characterised inhibitor of human ABCG2 (Wiederkehr *et al.*, 2000).

Subcellular localisation of LABCG5

Indirect immunofluorescence (IFI) using specific polyclonal antibodies against LABCG5 showed that the protein was constitutively localized in vesicles between the kinetoplast and the nucleus of the parasite (Fig 6A), sometimes being closer to the flagellar pocket (SI *Appendix*, Fig. 5). The use of mitotracker showed that LABCG5 did not colocalize with mitochondria, a main heme target. The localization of the transporter did not seem to change when wild-type or mutated LABCG5 was overexpressed (Fig. 6B and 6C).

To more precisely determine the subcellular localization of LABCG5, we performed an immunocytochemistry analysis using transmission electron microscopy after sample preparation with two different methods known to maintain the ultrastructure of cells: i) cryoimmobilization at high pressure and freeze-substitution and ii) Tokuyasu cryosection (de Bruin *et al.*, 1999). LABCG5 was consistently associated with membranes of a vesicular network including membrane-enclosed structures rich in internal vesicles and/or tubules, likely of a late-endosomal/lysosomal nature (Weise *et al.*, 2000), localized between the flagellar pocket and the nucleus (Fig. 7 and SI *Appendix*, Fig. 6). In a minor percentage of cells (< 10%), overexpressed LABCG5 was detected in endoplasmic reticulum (SI *Appendix*, Fig. 6E and 6H) probably due to higher overexpression levels, as this localization was not detected in control parasites.

Other putative physiological roles of LABCG5: drug resistance and phospholipid translocation.

Overexpression of mammalian ABCG2 (Weise *et al.*, 2000) or *Leishmania* LABCG4 (Doyle and Ross, 2003) and LABCG6 ((Castanys-Munoz *et al.*, 2007) and Castanys *et al.*, manuscript in preparation) confers significant drug resistance. In addition, all these ABCG proteins are involved in phospholipid translocation ((Bosedasgupta *et al.*, 2008; Woehlecke *et al.*, 2003) and Castanys *et al.*, manuscript in preparation). We therefore investigated whether, in addition to porphyrin trafficking,

LABCG5 could also play a physiological role in the above processes. Overexpression of wild-type LABCG5 did not confer resistance to different unrelated drugs (data not shown), including some leishmanicidal agents (sitamaquine, ketoconazole miltefosine and Sb^{III}) and other known substrates of human ABCG2 (mitoxantrone). As shown by flow cytometry analysis, LABCG5 was not involved in the translocation of fluorescent phospholipids analogues (NBD-PC, NBD-PS and NBD-PE) (SI *Appendix*, Fig. 7)

Discussion

The recent finalization of the genome project of trypanosomatid parasites (Berriman *et al.*, 2005; Castanys-Munoz *et al.*, 2007; Ivens *et al.*, 2005) have shown that, as expected from their heme auxotrophy, they lack most of the enzymes involved in the heme biosynthetic pathway. The requirement for an external source of heme, a main biochemical difference with their human host, was marked as an “Achilles heel” for these parasites more than 70 years ago (El-Sayed *et al.*, 2005; Woff, 1933). Indeed, heme dependency has already been recently exploited by the development of heme-complexing xanthenes, which specifically kill intracellular *Leishmania* amastigotes in the nanomolar range (Kelly *et al.*, 2003). There is supporting evidence that the novel protein LABCG5 is involved in heme trafficking in *Leishmania*: i) LABCG5 “functional knock-down” parasites showed a high growth defect unless a free hemin supplement was added or the mutated gene was eliminated; ii) supplementation with Hb, an upstream metabolite normally sufficient to meet the parasite heme requirements, was unable to rescue the growth defect phenotype; iii) hemin-agarose pull-down assays precipitated LABCG5, the interaction being dose-dependently inhibited by free hemin; iv) the closest homologue of LABCG5 in human cells, ABCG2, is a well characterised porphyrin transporter (Jonker *et al.*, 2002; Kelly *et al.*, 2003).

It is known at least in cultured *Leishmania* promastigotes, that heme requirements can be covered by free heme or by heme bound to Hb (Krishnamurthy *et al.*, 2004). The dominant negative phenotype was rescued by the presence of free heme, but not by Hb, suggesting that LABCG5 is required for the intracellular bioavailability of heme released after Hb breakdown, but not of heme directly taken in a free form. Indeed, Hb and heme follow a different uptake route, at least in the related parasite *T. cruzi* (Chang and Chang, 1985), only the former being taken up by endocytosis. Interestingly, down-regulation of LABCG5 function did not alter this process. In *Leishmania*, it has been suggested that Hb is the physiological source of heme (Lara *et al.*, 2007). Hb is taken up through receptor mediated endocytosis (Chang and Chang, 1985; Sengupta *et al.*, 1999), and routed via early Rab5-containing and late Rab7-containing endosomes (Krishnamurthy *et al.*, 2005). LABCG5 is localized in a vesicular network that includes multivesicular structures, placed between the nucleus and the flagellar pocket. This vesicular network probably corresponds to the late-endosomes/lysosomes (Singh *et al.*, 2003) where Hb is routed. It is tempting to suggest that, at this location, LABCG5 could promote the release of newly generated heme to

the parasite cytoplasm. Interestingly, LABCG5 harbours a putative dileucine signal motif similar to the ones described in all human ABCG proteins and in the White, Brown, and Scarlet ABCG proteins from *Drosophila* (Weise *et al.*, 2000). This signal could promote the proper sorting of the protein from the Golgi apparatus to lysosomes and endosomes (Schmitz *et al.*, 2001), via its recognition by adaptor protein complexes (AP), key components of the mechanism involved in cargo selection and vesicular transport of membrane proteins (Bonifacino and Traub, 2003).

As down-regulation of LABCG5 function caused a dramatic growth defect, pharmacological targeting of this protein could represent a novel approach to control infections caused by *Leishmania* and maybe other trypanosomatids. Unlike mammalian members of the ABCG subfamily, LABCG5 and its homologues in *T. brucei* and *T. cruzi* have an extra N-terminal TMD that could help to specifically inhibit these proteins. There is a number of inhibitors of human ABCG2, including some flavonoids (Robinson and Bonifacino, 2001) and elacridar (Ahmed-Belkacem *et al.*, 2005), known to kill *Leishmania* and other trypanosomatids (de Bruin *et al.*, 1999; Tasdemir *et al.*, 2006), and a leishmanicidal effect due to LABCG5 inhibition could be a possibility. The absence of competition between elacridar and hemin for binding to LABCG5 cannot be an argument against, as elacridar also does not compete with substrates for binding to human ABCG2 (Perez-Victoria *et al.*, 2006d).

During the preparation of this manuscript, a study describing that *Leishmania* requires Rab7-mediated degradation of endocytosed Hb for their growth has been published (Pozza *et al.*, 2006). This work supports that this pathway represents an attractive potential pharmacological target that could be exploited at different levels: Hb uptake and digestion (Krishnamurthy *et al.*, 2005; Patel *et al.*, 2008), heme release to the cytoplasm after Hb degradation (this work) and, probably, heme trafficking to its target organelles.

In conclusion, the results presented here strongly suggest that the novel transporter LABCG5 is involved in the salvage of heme liberated after Hb breakdown in the endocytic pathway of *Leishmania*. Further investigation of the mechanism of LABCG5-mediated heme release from this endosomal/lysosomal network should provide important new insights on this issue. It will be also important to determine how released heme is then trafficked to the mitochondria, a process that we are currently studying and that could involve the function of ABCB transporters.

Experimental procedures

Materials

Hemin, hemin-agarose, Hb, adenosine, Nonidet P-40 and MTT were obtained from Sigma. The fluorescent phospholipid analogues 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) were from Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL, USA). FMN4-64 was from Molecular Probes. Sodium stibogluconate (Pentostam®), elacridar and sitamaquine were a kind gift from GlaxoSmith-Kline. Amphotericin B deoxycholate (Fungizone®) was obtained from E.R. Squibb and Sons (Hounslow, UK) and Miltefosine were from Zentaris (Frankfurt, Germany).

Strains, Culture Conditions, Cell transfection and MTT analysis

Promastigote forms of wild-type *L. donovani* (MHOM/ET/67/HU3), were maintained at 28 °C in the M-199 medium (Invitrogen) supplemented with 40 mM HEPES, 100 µM adenosine, and 10% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS) (Invitrogen). Promastigotes of *L. donovani* were transfected as previously described (Patel *et al.*, 2008). Drug sensitivities of parasites were determined as described (Parodi-Talice *et al.*, 2003).

DNA constructs and site-directed mutagenesis.

ABCG5 from *L. major* (GeneDB-*L. major*, Accession Code LmJF23.0380) was isolated from genomic DNA of *L. major* by PCR using sense (5'-AACTACATCCACGCATACTCG) and antisense (5'-CACAAACGCACAGGACAGAC) primers. *LABCG5* gene was cloned into the *Leishmania* expression vector (pUCNeoPlus) and sequenced. Site-directed mutagenesis to replace lysine 625 for methionine (K/M) was carried out with QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis (Stratagene, La Jolla, CA).

Generation of antibodies against LmABCG5 and western-blot analysis

Rabbit anti-LABCG5 polyclonal antibodies were produced against a recombinant peptide corresponding to positions 469-948 of LABCG5, fused to a six histidines tag. This recombinant protein was expressed in *Escherichia coli* and purified using a Ni²⁺-

NTA column. The polyclonal antiserum was obtained as previously described (Kennedy *et al.*, 2001b). Antibodies were purified by using Protein A affinity chromatography. Western-blot analysis was performed as described with a dilution of 1:1000 (to detect constitutive LABCG5) or 1:10000 (to detect overexpressed LABCG5^{K/M}) of the primary antibody.

Analysis of endocytosis/exocytosis of FM 4-64 and NBD-SM.

The uptake of the endocytosis markers FM 4-64 and NBD-SM was measured by flow cytometry as previously described (Parodi-Talice *et al.*, 2003). Time dependent exocytosis was monitored in real time adapting the method developed in yeast to measure the recycling of previously internalized FM 4-64 (Chiquero *et al.*, 1998). This styryl dye is only weakly fluorescent in an aqueous solution, but its quantum yield increases several hundred-fold when bound to lipids. It is therefore possible to measure its cell release as a decrease in fluorescence of cells that have previously internalized the dye, monitoring the process continuously in a spectrofluorimeter. Thus, a total of 20×10^6 parasites/ml were allowed to internalize FM 4-64 (2 μ M) at 28°C for 30 min. Afterwards, parasites were washed three times with cold PBS for 5 min to remove surface-bound dye and then resuspended in ice-cold HPMI buffer (20 mM HEPES, 132 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂, 5mM glucose, 1 mM CaCl₂, pH 7.25) at 200×10^6 parasites/ml. Exocytosis was initiated after adding 200 μ l of these parasites to a cuvette with 1.8 ml of HPMI at 28 °C previously placed in a thermostated (at 28 °C) and stirred turret of a SLM-Aminco 8000C spectrofluorimeter. The time dependent fluorescence decrease at 680 nm (after excitation at 515 nm), due to exocytosis of the probe, was recorded until it reached steady state.

Hemin-Agarose Pull-down Assays

Hemin-agarose pull down experiments were performed as described in Krishnamurthy *et al.* (Chiquero *et al.*, 1998). When indicated, different concentrations of free hemin or elacridar were included during the incubation of the lysed cells with the hemin-agarose.

Indirect immunofluorescence microscopy

Indirect immunofluorescence analysis was carried out as previously described (Perez-Victoria *et al.*, 2003a) with a 1:500 dilution of the anti-LABCG5 antibody. Images were

acquired with an Olympus IX81 microscopy and deconvolved using Huygens Professional from Scientific Volume Imaging (<http://www.svi.nl>).

Immunolabeling and Transmission Electron Microscopy analysis

2×10^8 log-phase wild-type or transfected promastigotes were harvested by centrifuging at $2,000 \times g$ for 15 min at 4°C . Two different methods were used to prepare samples, cryoimmobilization at high pressure and Tokuyasu cryosection, as previously described (Krishnamurthy *et al.*, 2004; Wiederkehr *et al.*, 2000). Immunolabeling was done as previously described (Perez-Victoria *et al.*, 2001b) by using a 1:500 dilution of the anti-LABCG5 antibody and 1:65 dilution of 12 nm gold-coupled IgG or protein A coupled to 10 nm diameter colloidal gold particles. Sections were observed in a JEM-1010 electron microscope (Jeol, Japan) and photographic negatives were scanned in an Artixcan 2500f (Microtek) scanner.

Analysis of fluorescent phospholipid uptake

Analysis of the translocation of fluorescent phospholipid analogues by flow cytometry were carried out as previously described (Galy *et al.*, 2006) using a Beckton Dickinson FACScan (San José, CA).

Statistical analysis

Experiments were performed three times in duplicate. Statistical significance was determined by Student's *t*-test. Significance was considered as $P < 0.05$.

Acknowledgements

We are extremely grateful to Carmen López-Iglesias (Universitat de Barcelona Serveis, Spain) for her expert technical assistance with electron microscopy experiments. We also acknowledge F. Javier Pérez-Victoria for stimulating discussions during the writing of the manuscript. This work was supported by the EU Marie Curie Research Training Network Grant MRTN-CT-2004-005330 (to F.G.), the Spanish Grants MSC-FIS PI040830 (to J.M.P.V.) and ISCIII-Red de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales (RICET) RD06/0021/0002 (to F.G.) and the European Reintegration Grant MERG-CT-2004-513607 (to J.M.P.V and F.G.). J.C.S. was recipient of a MRTN-CT-2004-005330 contract.

References

1. Ouellette, M. (2001) Biochemical and molecular mechanisms of drug resistance in parasites *Trop Med Int Health* **6**, 874-82.
2. Trager, W. (1974) in *Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas' disease*, ed. CIBAFoundationSymposium (Elsevier-Excerpta, North Holland, Amsterdam), Vol. 20, pp. 225-245.
3. Opperdoes, F. R. and Coombs, G. H. (2007) Metabolism of Leishmania: proven and predicted *Trends Parasitol* **23**, 149-58.
4. Chang, C. S. and Chang, K. P. (1985) Heme requirement and acquisition by extracellular and intracellular stages of *Leishmania mexicana amazonensis* *Mol Biochem Parasitol* **16**, 267-76.
5. Sengupta, S., *et al.* (1999) Hemoglobin endocytosis in *Leishmania* is mediated through a 46-kDa protein located in the flagellar pocket *J Biol Chem* **274**, 2758-65.
6. Krishnamurthy, G., *et al.* (2005) Hemoglobin receptor in *Leishmania* is a hexokinase located in the flagellar pocket *J Biol Chem* **280**, 5884-91.
7. Singh, S. B., *et al.* (2003) Rab5-mediated endosome-endosome fusion regulates hemoglobin endocytosis in *Leishmania donovani* *Embo J* **22**, 5712-22.
8. Krishnamurthy, P., Xie, T. and Schuetz, J. D. (2007) The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis *Pharmacol Ther* **114**, 345-58.
9. Koster, W. (2001) ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12 *Res Microbiol* **152**, 291-301.
10. Jonker, J. W., *et al.* (2002) The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15649-54.
11. Higgins, C. F. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man *Annu Rev Cell Biol* **8**, 67-113.
12. Doyle, L. A. and Ross, D. D. (2003) Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) *Oncogene* **22**, 7340-58.
13. Krishnamurthy, P., *et al.* (2004) The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme *J Biol Chem* **279**, 24218-25.
14. Pozza, A., Perez-Victoria, J. M., Sardo, A., Ahmed-Belkacem, A. and Di Pietro, A. (2006) Purification of breast cancer resistance protein ABCG2 and role of arginine-482 *Cell Mol Life Sci* **63**, 1912-22.
15. Castanys-Munoz, E., Alder-Baerens, N., Pomorski, T., Gamarro, F. and 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* **64**, 1141-53.
16. Bosedasgupta, S., Ganguly, A., Roy, A., Mukherjee, T. and Majumder, H. K. (2008) A novel ATP-binding cassette transporter, ABCG6 is involved in chemoresistance of *Leishmania* *Mol Biochem Parasitol* **158**, 176-88.
17. 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**, 1713-25.
18. Purnelle, B., Skala, J. and Goffeau, A. (1991) The product of the YCR105 gene located on the chromosome III from *Saccharomyces cerevisiae* presents homologies to ATP-dependent permeases *Yeast* **7**, 867-72.

19. Smith, P. C., *et al.* (2002) ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer *Mol Cell* **10**, 139-49.
20. Bates, S. E., *et al.* (2001) The role of half-transporters in multidrug resistance *J Bioenerg Biomembr* **33**, 503-11.
21. Schmitz, G., Langmann, T. and Heimerl, S. (2001) Role of ABCG1 and other ABCG family members in lipid metabolism *J Lipid Res* **42**, 1513-20.
22. Diop, N. K. and 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**, 5420-9.
23. Ozvegy, C., Varadi, A. and Sarkadi, B. (2002) Characterization of drug transport, ATP hydrolysis, and nucleotide trapping by the human ABCG2 multidrug transporter. Modulation of substrate specificity by a point mutation *J Biol Chem* **277**, 47980-90.
24. Vida, T. A. and Emr, S. D. (1995) A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast *J Cell Biol* **128**, 779-92.
25. Perez-Victoria, F. J., Castanys, S. and Gamarro, F. (2003) Leishmania donovani resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 2397-403.
26. Wiederkehr, A., Avaro, S., Prescianotto-Baschong, C., Haguenaer-Tsapis, R. and Riezman, H. (2000) The F-box protein Rcy1p is involved in endocytic membrane traffic and recycling out of an early endosome in *Saccharomyces cerevisiae* *J Cell Biol* **149**, 397-410.
27. de Bruin, M., Miyake, K., Litman, T., Robey, R. and Bates, S. E. (1999) Reversal of resistance by GF120918 in cell lines expressing the ABC half-transporter, MXR *Cancer Lett* **146**, 117-26.
28. Weise, F., Stierhof, Y. D., Kuhn, C., Wiese, M. and 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**, 4587-603.
29. Woehlecke, H., Pohl, A., Alder-Baerens, N., Lage, H. and Herrmann, A. (2003) Enhanced exposure of phosphatidylserine in human gastric carcinoma cells overexpressing the half-size ABC transporter BCRP (ABCG2) *Biochem J* **376**, 489-95.
30. Ivens, A. C., *et al.* (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major *Science* **309**, 436-42.
31. Berriman, M., *et al.* (2005) The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei* *Science* **309**, 416-22.
32. El-Sayed, N. M., *et al.* (2005) The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease *Science* **309**, 409-15.
33. Woff, M. (1933) Remarques sur la nutrition des Trypanosomides et des bactéries parahémotrophes le "fer actif" de baudisch. *Ann Inst Pasteur* **51**, 707-703.
34. Kelly, J. X., *et al.* (2003) Antileishmanial drug development: exploitation of parasite heme dependency *Mol Biochem Parasitol* **126**, 43-9.
35. Lara, F. A., *et al.* (2007) Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes *Biochem Biophys Res Commun* **355**, 16-22.
36. Bonifacino, J. S. and Traub, L. M. (2003) Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes *Annu Rev Biochem* **72**, 395-447.

37. Robinson, M. S. and Bonifacino, J. S. (2001) Adaptor-related proteins *Curr Opin Cell Biol* **13**, 444-53.
38. Ahmed-Belkacem, A., *et al.* (2005) Flavonoid structure-activity studies identify 6-prenylchrysin and tectochrysin as potent and specific inhibitors of breast cancer resistance protein ABCG2 *Cancer Res* **65**, 4852-60.
39. Tasdemir, D., *et al.* (2006) Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: in vitro, in vivo, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 1352-64.
40. Perez-Victoria, J. M., *et al.* (2006) 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**, 3102-10.
41. Patel, N., Singh, S. B., Basu, S. K. and Mukhopadhyay, A. (2008) *Leishmania* requires Rab7-mediated degradation of endocytosed hemoglobin for their growth *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 3980-5.
42. Parodi-Talice, A., *et al.* (2003) The overexpression of a new ABC transporter in *Leishmania* is related to phospholipid trafficking and reduced infectivity *Biochim Biophys Acta* **1612**, 195-207.
43. Kennedy, M. L., *et al.* (2001) Chemosensitization of a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line by new sesquiterpenes from *Maytenus magellanica* and *Maytenus chubutensis* *J Med Chem* **44**, 4668-76.
44. Chiquero, M. J., *et al.* (1998) Altered drug membrane permeability in a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line *Biochem Pharmacol* **55**, 131-9.
45. Perez-Victoria, J. M., *et al.* (2001) Alkyl-lysophospholipid resistance in multidrug-resistant *Leishmania tropica* and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 2468-74.
46. Galy, V., Askjaer, P., Franz, C., Lopez-Iglesias, C. and Mattaj, I. W. (2006) MEL-28, a novel nuclear-envelope and kinetochore protein essential for zygotic nuclear-envelope assembly in *C. elegans* *Curr Biol* **16**, 1748-56.

Figure Legends

Fig. 1: **Membrane topology for the half-transporter LABCG5.** The N-terminal extra transmembrane domain is marked as TMD0. The conserved Walker A and Walker B motifs and the signature sequence localized in the nucleotide binding domain (NBD) are marked as A, B and C, respectively. Arrows indicate the position of aminoacids discussed in the text: the K(625)/M mutation that inactivates the protein and the putative dileucine motif (LL(963-L964)).

Fig. 2: **Immunodetection of LABCG5 in *L. donovani* promastigotes.** A: Constitutive expression of LABCG5. Western blot analysis of total proteins from wild-type parasites incubated with preimmune serum (line 1) or antiserum against LABCG5 (line 2), at a 1:1000 dilution in both cases. B: Overexpression of mutant LABCG^{K/M}. Western blot analysis of total proteins from parasites transfected with empty vector (line 1) and LABCG^{K/M} (line 2), incubated with a further ten-fold diluted (1:10000) antiserum against LABCG5. The molecular mass standards (KDa) from Bio-Rad are indicated on the left.

Fig. 3: **Down-regulation of LABCG5 function produces a growth defect in the absence of free hemin.** Growth curves of control (transfected with empty vector), dominant negative (overexpressing LABCG^{K/M}) and reverted (dominant negative parasites incubated in the absence of plasmid drug selection pressure until LABCG^{K/M} overexpression was lost) parasites are shown. Parasites were incubated in M199 medium plus 10 % BSF with no additional supplement (A and D) or in the presence of 10 μ M hemin (B) or 10 μ M Hb (C). Inset in D: Western blot analysis of total proteins from dominant negative (line 1) and reverted (line 2) parasites.

Fig. 4: **Down-regulation of LABCG5 function does not alter endocytosis and exocytosis.** A. Endocytosis of FM 4-64 in control (filled circle) or dominant negative (empty circle) promastigotes of *L. donovani* parasites were measured by flow cytometry at the indicated times. This result is representative of two similar independent experiments performed in duplicate. B: Exocytosis of FM 4-64 in control (continuous line) and dominant negative (dotted line) parasites were analyzed by fluorescent spectrofluorimetry as described in Materials and Methods. This result is representative of two similar independent experiments.

Fig. 5: **Hemin-agarose precipitates LABCG5.** A: *In vitro* binding of LABCG5 to hemin. Whole cell lysates of wild-type *L. donovani* parasites were subjected to a “pull-down” assay with hemin-agarose, and bound LABCG5 was detected by immunoblotting with the LABCG5-specific antibody (1:1000). Line 1 corresponds to total lysate and line 2 to the hemin pull-down. B: LABCG5 precipitation after association with hemin-agarose was reduced by the addition of the indicated increasing concentration of free hemin. The molecular mass standards (KDa) from Bio-Rad are indicated on the left. These results are representative of three similar independent experiments.

Fig. 6: **Fluorescence microscopy analysis of LABCG5 localization in *L. donovani* promastigotes.** Localization of LABCG5 in control parasites (A) and in parasites overexpressing mutated (B) or wild-type (C) LABCG5 was studied by IFI. Cells were stained with anti-LABCG5 polyclonal rabbit antiserum (1:500) followed by FITC-

conjugated secondary antibody (green). Nucleus (N) and kinetoplast (K) are stained with DAPI (blue) and mitochondria (M) are stained with myotracker (red).

Fig. 7: Subcellular localization of *Leishmania* LABCG5 analyzed by immunocytochemistry and electron microscopy. Immunogold labeling of LABCG5 in Lowicryl HM20 sections of high-pressure frozen and freeze-substituted *L. donovani* promastigotes, labeled with anti-LABCG5 (1:500) and 12 nm gold-coupled IgG (A-D and F) and in ultra thin Tokuyasu cryosections of chemically fixed *L. donovani* promastigotes, labeled with protein A coupled to 10 nm diameter colloidal gold particles (E and G-I). Sections from control parasites (A) and parasites transfected with wild-type (B-E) and mutated (F-I) LABCG5 are shown. In B, C and F, the area marked in the inset is amplified. In I, arrows mark vesicles labeled with gold. f, flagellum; fp, flagellar pocket; m, mitochondria; k, kinetoplast; n, nucleus;. Bars: 500 nm (A, F-I) and 200 nm (B-E).

Figure 1

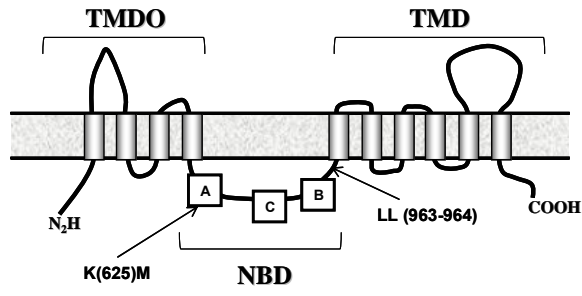


Figure 2

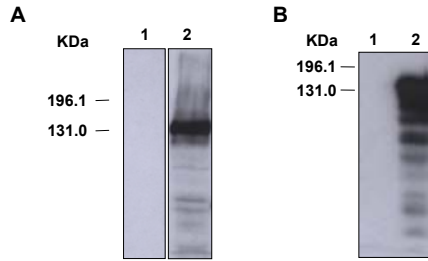


Figure 3

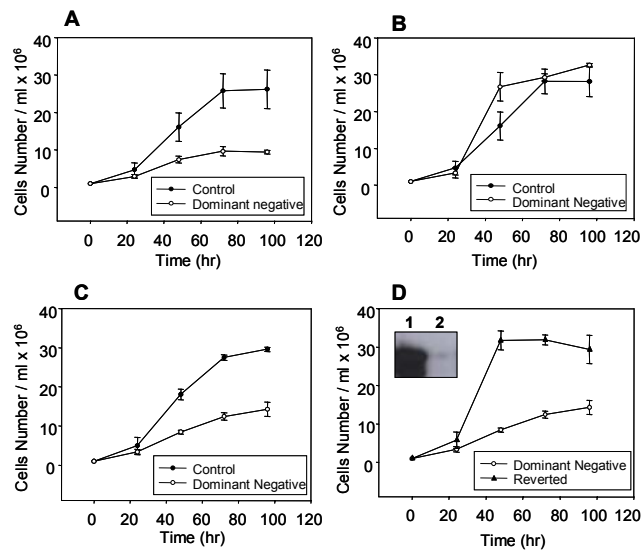


Figure 4

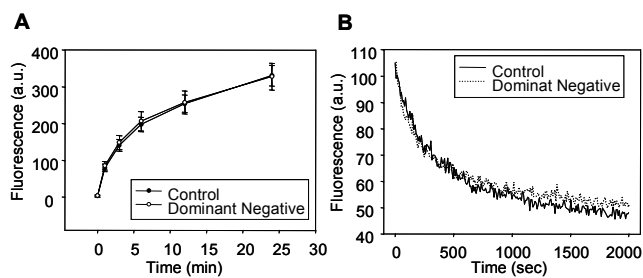


Figure 5

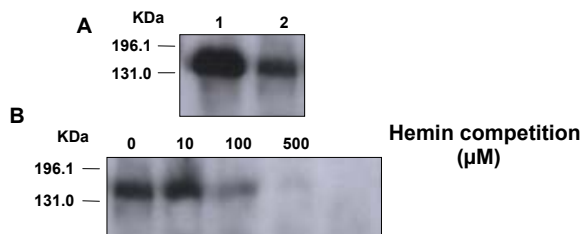


Figure 6

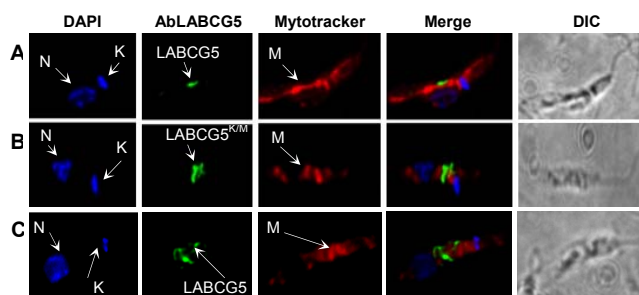
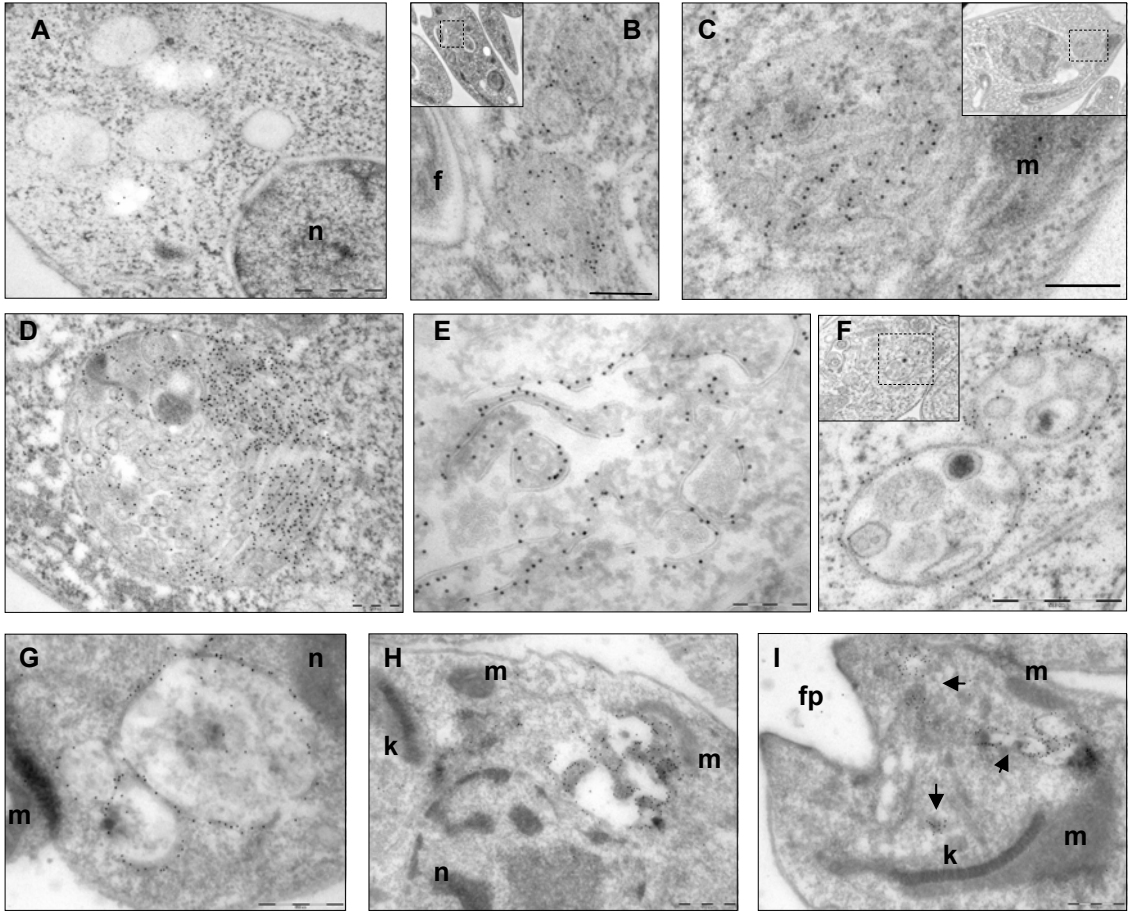


Figure 7



SUPPORTING INFORMATION APPENDIX

Table and Figure Legends

Table 1: **Homology between different ABCG proteins.** The analysis was made with Clustal W (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalw.html). GeneDB number of analysed proteins are: LABCG1 (LmjF06.0080), LABCG2 (LmjF06.0090), LABCG4 (LmjF06.0890), LABCG5 (LmjF23.0380), LABCG6 (LmjF36.2890), TbABCG08 (Tb927.8.2380), ScADP1 (P25371), HsABCG1 (P45844), HsABCG2 (AAH9408), HsABCG4 (NP_071452), HsABCG5 (AA640003), HsABCG8 (AA640004), DmWhite (P1009-1), TcABCG1 (Tc00.1047053504425.70), TcABCG2 (Tc00.1047053509331.200). Data inside the bracket represent the aminoacids similarity, defined as the sum of identity and strongly similar.

Figure 1: **Membrane topology for *S. cerevisiae* ADP1.** The N-terminal extra transmembrane domain is marked as TMD0, and, in contrast to TMD0 from LABCG2, it presents only two transmembrane segments according to TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) and TMRPres2D (<http://biophysics.biol.uoa.gr/TMRPres2D/>). The conserved motifs Walker A, Walker B and the signature sequence localized in the nucleotide binding domain (NBD) are marked as A, B and C, respectively.

Figure 2: **Alignment of putative dileucine signal in LaBCG5 and human and Drosophila ABCG proteins.** Dm, *D.melanogaster*; Hs, *H.sapiens*; L: *L.major*. Adapted from [21].

Figure 3: **Effect of the dominant negative phenotype on endocytosis of fluorescent sphingomyelin.** Control (filled bar) or dominant negative (empty bar) promastigotes of *L. donovani* parasites were incubated with NBD-SM for 30 min at 28°C. After washing and back-exchange with BSA, cell-associated fluorescence was measured by flow cytometry. Results represent means \pm SEM of at least six independent experiments.

Figure 4: **LABCG5 precipitation by hemin-agarose is not affected by elacriar.** Whole cell lysates of wild-type *L. donovani* parasites were subjected to a “pull-down” assay with hemin-agarose in the absence (left) or the presence of the indicated concentrations of the ABCG2 inhibitor elacridar. Bound LABCG5 was detected by immunoblotting with the LABCG5-specific antibody (dilution 1:1000). The molecular mass standards (KDa) from Bio-Rad are indicated on the left. These results are representative of three similar independent experiments.

Figure 5: **Fluorescence microscopy analyse of LABCG5 localization.** Localization of LABCG5 in control *L. donovani* promastigotes forms were studied by IFI. Cells were stained with anti-LABCG5 polyclonal rabbit antiserum (1:500) followed by FITC-conjugated secondary antibody (green). Pictures are a Z-projection of Z-stack. Nucleus (N) and kinetoplast (K) are stained with DAPI (blue) and mitochondria (M) are stained with mitotracker (red).

Figure 6: **Subcellular localization of *Leishmania* LABCG5 analyzed by immunocytochemistry and electron microscopy.** Immunogold labeling of LABCG5 in Lowicryl HM20 sections of high-pressure frozen and freeze-substituted *L. donovani*

promastigotes, labeled with anti-LABCG5 (1:500) and 12 nm gold-coupled IgG (A-C and F-G) and in ultrathin Tokuyasu cryosections of chemically fixed *L. donovani* promastigotes, labeled with protein A coupled to 10 nm diameter colloidal gold particles (D, E and H). Sections from control parasites (A) and parasites transfected with wild-type (B-E) and mutated (F-H) LABCG5 are shown. In D, the area marked in the inset is amplified. f, flagellum; fp, flagellar pocket; m, mitochondria; k, kinetoplast; n, nucleus; er, endoplasmic reticulum. Bars: 500 nm (A, F-I) and 200 nm (B-E).

Figure 7: Fluorescent phospholipid accumulation in *Leishmania* parasites. Promastigotes of *L. donovani* were incubated with NBD-PC (A), NBD-PE (B) or NBD-PS (C) for 30 min at 28°C. After washing and back-exchange to BSA cell-associated fluorescence was measured by Flow Cytometry. Results represent means \pm SEM of at least six independent experiments. There were not significant differences between the different lines.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Figure 1

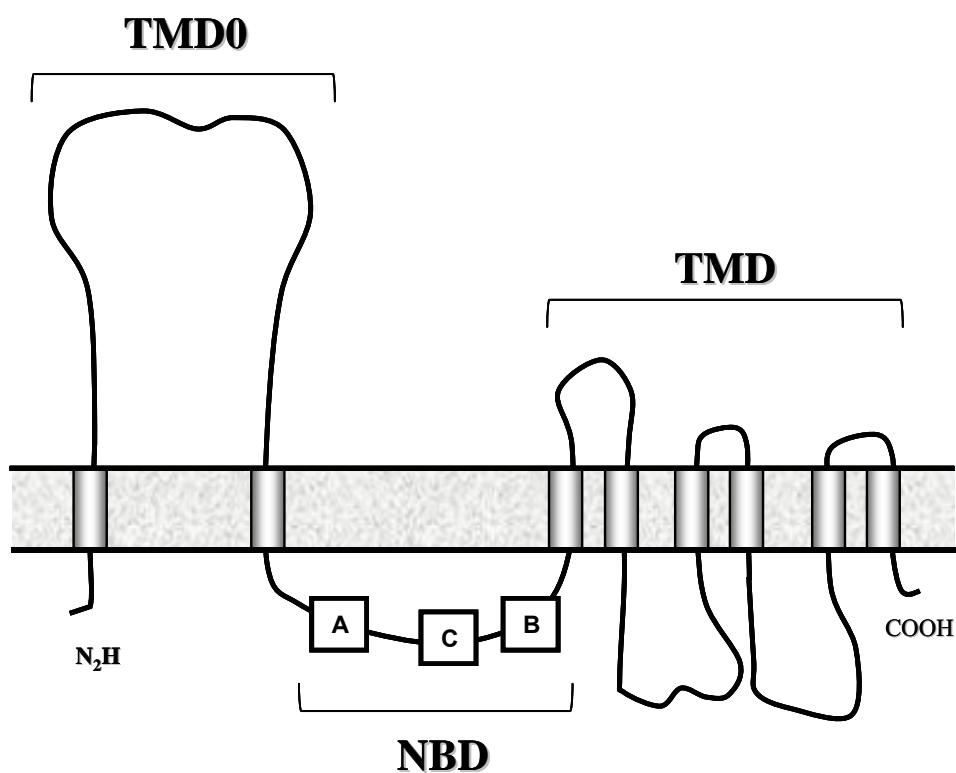


Figure 2

Protein	Putative Dileucine Signal	Accession number
HsABCG1	NH ₂ ---LTQFC IL FK---3aa-TM	P45844
HsABCG2	NH ₂ ---RSFKN LL GN---4aa-TM	Q9UNQ0
HsABCG4	NH ₂ ---ILRDT VL TH---3aa-TM	NP_071452
HsABCG5	NH ₂ ---SKLGV LL RR--15aa-TM	AAG53099
HsABCG8	NH ₂ ---QQFTT LI RR--13aa-TM	AAG40004
DmWhite	NH ₂ ---VLKEP LL VK---3aa-TM	P10090
DmBrown	NH ₂ ---IYQVY LL MV--17aa-TM	P12428
DmScarlet	NH ₂ ---RASLT LL RD---8aa-TM	P45843
LmABCG5	NH ₂ ---YEQLQ LL IS--29aa-TM	LmjF23.0380

Figure 3

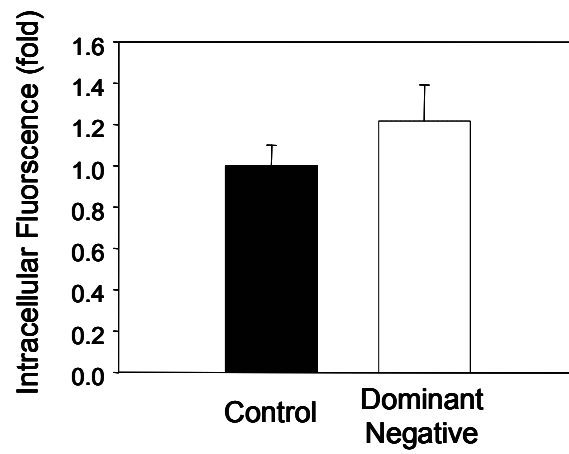


Figure 4

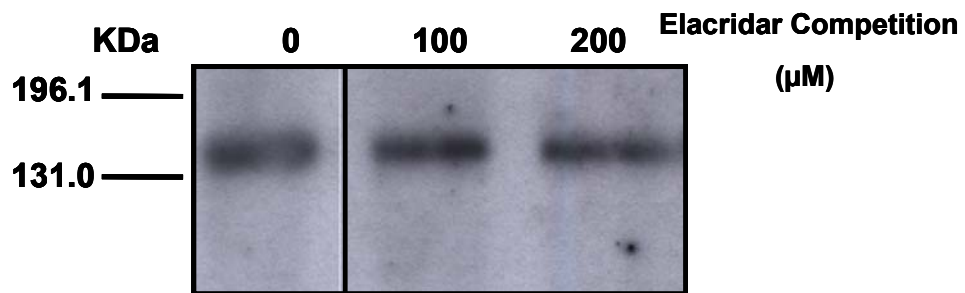


Figure 5

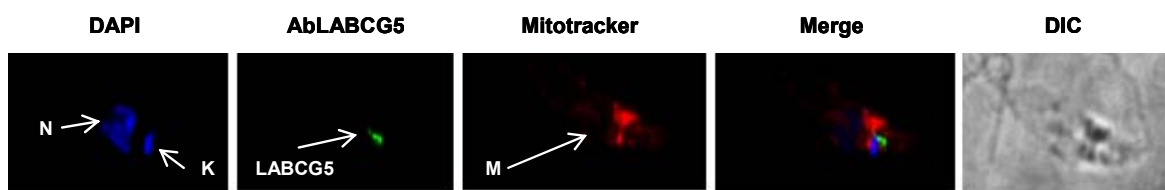


Figure 6

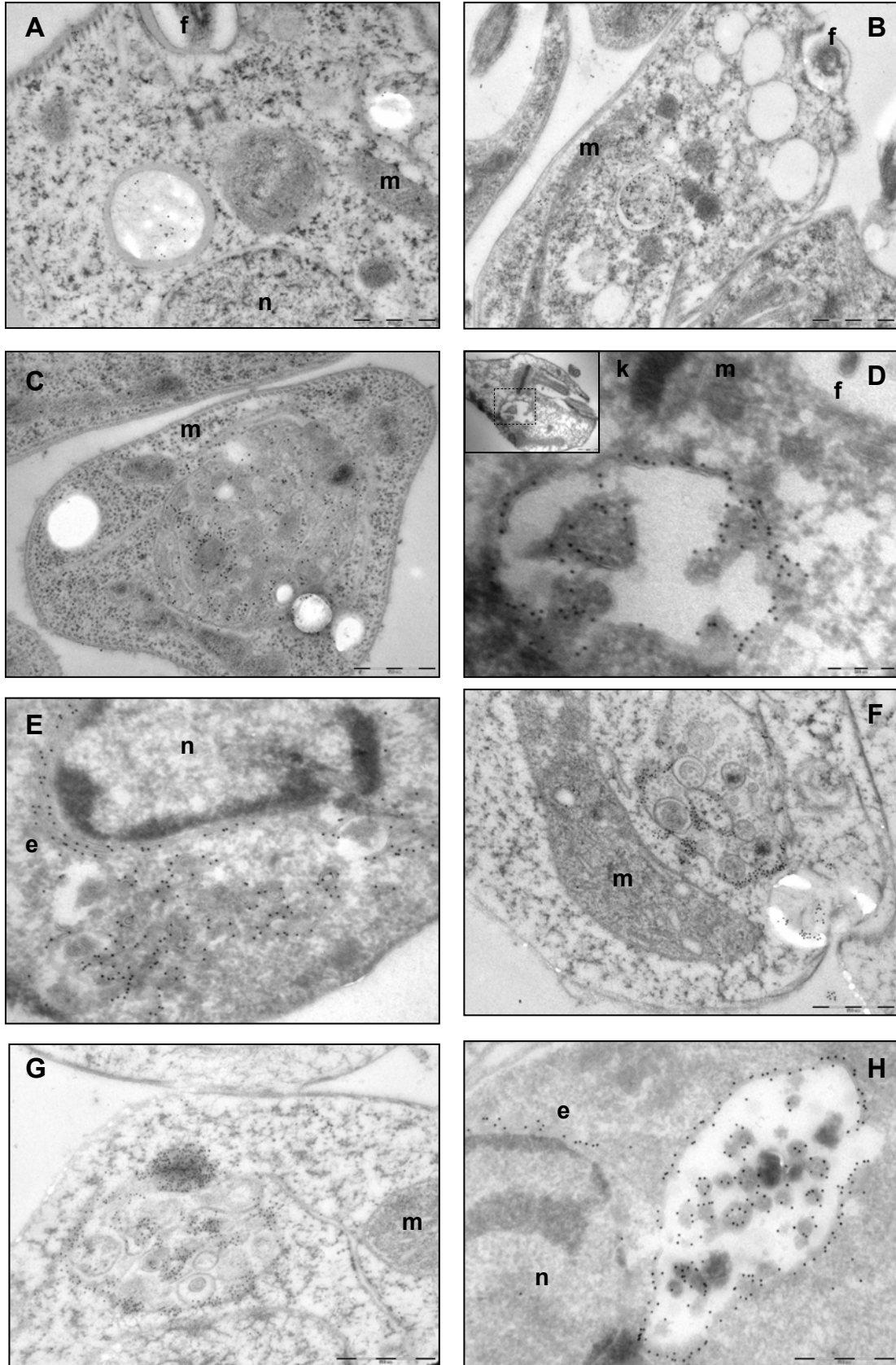


Figure 7

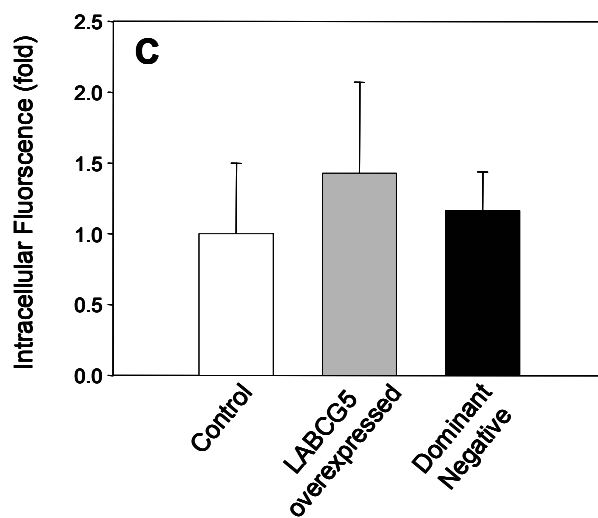
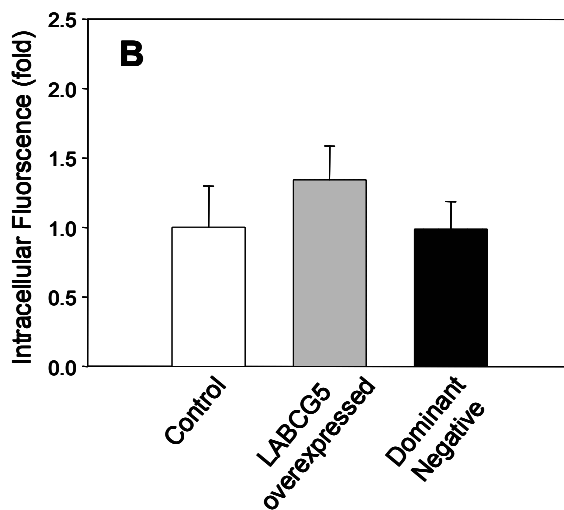
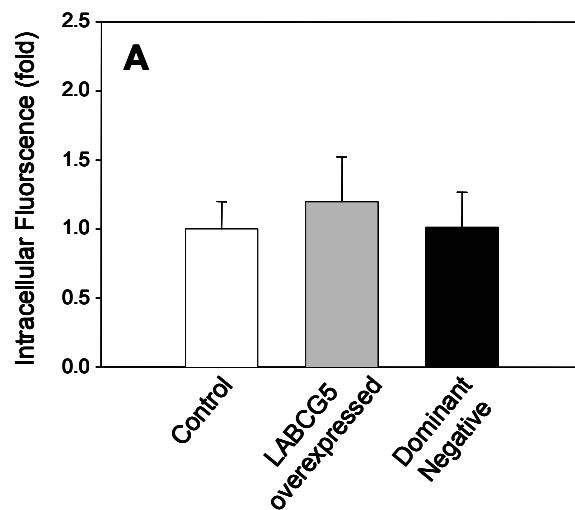


Table I

Identity/Strongly similar (Similarity)	LABC01	LABC02	LABC04	LABC05	LABC05 without TMD0	LABC06	TdABC08	SoADP1	HsABC01	HsABC02	HsABC04	HsABC05	HsABC08	DmWhite	TcABC01	TcABC02
LABC01	-															
LABC02	82.3/0.9 (83.2)	-														
LABC04	28.2/20.2 (48.4)	25.1/18.8 (43.9)	-													
LABC05	12.2/14.0 (26.6)	13.8/15.6 (29.4)	11.5/12.1 (23.6)	-												
LABC05 Without TMD0	19.70/22.44 (42.14)	18.93/20.39 (39.32)	18.68/19.74 (38.42)	55.56/0.0 (55.68)	-											
LABC06	24.1/21.4 (45.5)	21.2/19.1 (40.3)	22.0/23.0 (45.0)	14.1/12.5 (26.6)	24.47/21.64 (46.08)	-										
TdABC08	13.24/14.53 (27.8)	14.97/17.64 (32.81)	12.48/14.08 (28.56)	44.6/20.0 (64.6)	33.33/10.80 (44.13)	14.88/13.78 (28.66)	-									
SoADP1	16.15/16.90 (33.06)	16.92/18.8 (35.72)	15.01/15.01 (30.02)	21.54/19.73 (41.27)	18.99/16.29 (35.26)	19.21/14.66 (33.87)	21.93/19.42 (41.36)	-								
HsABC01	19.5/19.4 (38.9)	22.1/21.8 (43.9)	20.36/16.18 (36.54)	17.2/15.1 (32.3)	18.26/18.49 (36.75)	19.25/19.95 (39.2)	16.4/16.9 (33.3)	19.73/19.73 (39.46)	-							
HsABC02	24.6/24.6 (49.3)	22.4/22.1 (44.5)	23.18/20.18 (43.36)	14.7/13.7 (28.4)	25.0/24.72 (49.72)	27.11/25.93 (53.04)	15.7/15.1 (30.6)	19.77/15.23 (35.0)	21.49/21.09 (42.58)	-						
HsABC04	23.6/23.7 (47.3)	23.6/23.7 (47.3)	22.55/21.35 (43.9)	13.5/14.2 (27.7)	20.41/23.03 (43.44)	23.7/23.77 (47.54)	13.3/14.8 (28.1)	17.86/15.52 (34.18)	53.88/10.19 (64.07)	25.37/25.26 (51.63)	-					
HsABC05	22.3/22.9 (45.2)	22.3/22.9 (45.2)	21.28/21.14 (42.42)	13.3/13.3 (26.6)	22.08/23.07 (45.87)	23.56/25.18 (48.74)	13.4/15.4 (28.6)	16.93/15.05 (31.96)	19.24/22.57 (41.81)	24.96/27.20 (52.16)	23.99/26.09 (50.08)	-				
HsABC08	22.7/23.6 (46.3)	21.6/20.5 (42.1)	21.32/21.83 (43.15)	14.2/13.5 (27.7)	23.05/21.95 (45.0)	24.46/22.88 (47.14)	14.0/13.6 (27.6)	18.22/16.32 (34.54)	21.51/11.96 (33.46)	25.04/23.29 (48.33)	22.40/24.76 (47.18)	26.32/23.39 (49.71)	-			
DmWhite	27.34/27.45 (54.79)	25.10/22.47 (47.57)	25.19/19.75 (44.94)	13.92/14.16 (28.06)	21.09/21.75 (42.84)	25.0/22.92 (47.92)	16.45/15.07 (31.52)	18.64/16.56 (35.2)	24.82/20.05 (44.87)	27.57/23.03 (50.6)	30.48/23.08 (53.56)	26.04/24.46 (50.5)	25.96/22.98 (48.94)	-		
TcABC01	13.27/14.8 (28.07)	13.96/16.54 (30.9)	11.33/14.4 (25.73)	47.83/18.58 (62.21)	35.76/9.97 (45.75)	15.01/13.15 (26.16)	52.75/19.73 (72.48)	22.48/20.05 (42.53)	17.24/16.47 (33.71)	16.48/13.25 (29.73)	14.51/13.74 (28.25)	13.42/15.21 (28.63)	15.25/15.08 (30.33)	16.03/14.83 (30.86)	-	
TcABC02	13.02/14.89 (27.91)	14.4/17.04 (31.44)	13.60/13.28 (26.88)	47.44/18.99 (66.43)	35.71/10.14 (45.85)	15.09/13.58 (26.67)	52.42/19.29 (71.71)	22.58/20.06 (42.64)	17.68/16.74 (34.42)	16.24/13.75 (29.99)	16.03/13.90 (29.93)	13.86/14.71 (28.57)	15.17/14.83 (30.0)	15.71/15.20 (30.91)	97.78/1.02 (96.8)	-

Macrophage infection by *Leishmania* involves the function of a new ABC transporter implicated in parasite phosphatidilserine exposition.

Jenny Campos-Salinas, Santiago Castanys, José M. Pérez-Victoria* and Francisco Gamarro*

Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”, CSIC, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avda. del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain.

*To whom correspondence should be addressed at: e-mail gamarro@ipb.csic.es or josepv@ipb.csic.es; Tel.: +34958181658; Fax: +34 958181632

Abstract

Leishmaniasis is a neglected disease produced by the intracellular protozoan parasite *Leishmania*. Transient exposition of phosphatidylserine (PS) on the outer leaflet of the plasma membrane is one of the known mechanisms used by *Leishmania* amastigotes and metacyclic promastigotes to infect macrophages and to silencing its respond. However, the molecular bases of this outward PS translocation are unknown. We described supporting evidence that a new ABCG half-transporter (LABCG1) from *Leishmania* could be a first protein involved in such role. Downregulation of LABCG1 function by overexpressing an inactive version of the transporter reduced the translocation of fluorescent short-chain analogues of PS. This dominant negative phenotype is specific for the headgroup of this phospholipid, as the movement of fluorescent analogues of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine or phosphatidylsphingomyelin were not affected. In addition, Annexin-V–Alexa488 binding assays showed that LABCG1 “functional knock-down” promastigotes exposed less endogenous PS in the stationary phase than control parasites. The LABCG1-mediated defect in the externalization of PS correlated with significantly reduced infection of macrophages. These differences disappeared when most external PS was masked by preincubating the parasites with Annexin-V. Altogether, our results strongly suggest that LABCG1 function is required for the externalisation of PS in metacyclic *Leishmania* promastigotes, a process involved in macrophage infection.

Introduccion

Leishmaniasis is a fatal neglected disease caused by different species of the protozoan parasite *Leishmania* (Weise *et al.*, 2000). This parasite has a digenetic lifecycle alternating between promastigote and amastigote stages. Inside the insect vector, non infective promastigotes are transformed during metacyclogenesis to infective parasites. After the bite of the sandfly, *Leishmania* metacyclic promastigotes attach to mononuclear phagocytes (usually macrophages (MF)) and are taken up by phagocytosis. In the phagolysosomal compartment, promastigotes differentiate into replicative amastigote forms, responsible for the maintenance and propagation of the infection in the human host (Galy *et al.*, 2006). In *Leishmania* promastigote *in vitro* cultures, metacyclogenesis is produced when parasites pass from logarithmic to stationary growth phase (Parodi-Talice *et al.*, 2003).

Phosphatidylserine (PS), a structural phospholipid (PL) normally localized on the inner leaflet of the plasma membrane of eukaryotic cells (Santos *et al.*, 2008), plays a critical role in MF infection by *Leishmania*. Indeed, PS exposition on the outer leaflet of the plasma membrane of apoptotic cells (Melby, 2002) constitute the most central “eat-me” signal known so far for the MF that also “silent” its respond to avoid an inflammatory reaction (da Silva and Sacks, 1987). Exposure of PS on the surface of *Leishmania* amastigotes, in a process quoted as apoptotic mimicry, is required for the infection of new MF and for the downregulation of MF microbicidal activity (Pomorski and Menon, 2006; Schlegel and Williamson, 2001) by inhibiting MF nitric oxide production and increasing IL-10 synthesis and TGF β 1 secretion (van Zandbergen *et al.*, 2007). In addition, the well characterised higher infectivity of the stationary phase promastigotes, as compared to the log phase promastigotes, is also due to the specific exposure of PS on their surface (de Freitas Balanco *et al.*, 2001). Interestingly, it has

been recently suggested that this PS exposing promastigotes could be real apoptotic cells destined to death (Wanderley *et al.*, 2005) instead of apoptotic mimicking parasites. Their presence in the virulent inoculum, in an altruistic behavior, provides survival advantages for the viable parasites and is necessary for the development of the disease (de Freitas Balanco *et al.*, 2001).

In eukaryotic cells, lipid asymmetry is maintained due to the bi-directional transport of lipids (flip-flop) involving three protein-mediated activities (Tripathi and Gupta, 2003): i) flippase, which promotes active inward-directed lipid migration, mediated by aminophospholipid translocases (APT); ii) floppase, responsible for an active outward transport of lipids from the cytoplasmic to the exoplasmic leaflet of the plasma membrane, mediated by some ATP-binding cassette (ABC) transporters; and iii) scramblase, which equilibrates the lipids between the two layers. In apoptotic cells, PS externalization has been suggested to be due to a down-regulation of APT activity (Bratton JBC 1997), allowing scramblases to equilibrate this PL, and to a higher activity of ABC transporters such as ABCA1 (Marguet D *et al.*, Nat Cell Biol 1999). Functional ABC transporters consist in two homologous halves, each one composed of a transmembrane domain (TMD) involved in substrate binding, and a cytosolic nucleotide binding domain (NBD), which hydrolyses ATP providing the energy required for the transport (van Zandbergen *et al.*, 2006). Members of the ABCA, ABCB, ABCD and ABCG human subfamilies have been implicated in PL translocation (rev G van Meer Nature Rev 2008). For example, human ABCG2 (BCRP/MXR/ABCP), a protein first studied because its ability to confer multidrug resistance in cancer cells, is responsible for an enhanced exposure of PS at the plasma membrane of ABCG2 overexpressing cells, due to an increased PS outward transport (van Zandbergen *et al.*, 2006). ABCG proteins are half-transporters with a NBD-TMD topology that required homo/hetero-

dimerization to become functional (van Meer *et al.*, 2008). In the case of *Leishmania*, a relation with PL translocation has also been described for LABCB4 (van Meer *et al.*, 2008), LABCA1 (Woehlecke *et al.*, 2003), LABCA2 (Davidson and Maloney, 2007), LABCG4 (Perez-Victoria *et al.*, 2001b) and LABCG6 (submitted). Although, at least some of them are able to transport PS, none of them is specific for this PL. Additionally, in *Leishmania* the maintenance of plasma membrane lipid asymmetry have been associated with a P-type APT (LMT) (Parodi-Talice *et al.*, 2003). However, experiments using a knock-out *Leishmania* line for this transporter indicated that the infectivity of these parasites did not change with respect to the control parasites (Araujo-Santos *et al.*, 2005).

The aim of our work was to study the involvement of a new ABCG transporter from *Leishmania* in PS translocation and MF infection. The results show that down-regulation of LABCG1 function produces a defect in the exposition of endogenous PS in the surface of the parasite, correlating with a significant decrease in the capacity of *Leishmania* to infect MF.

Results

Molecular characterization of LABCG1 and generation of a dominant negative line overexpressing an inactive version of the protein.

Putative members of the ABCG gene subfamily of transporters were initially identified in the *L. major* genome database using the GeneDB omniBLAST server against the human ABCG2 gene. We have previously analyzed the function of three of the four genes (Castanys-Munoz *et al.*, 2007) (Campos-Salinas J., et al 2008, submitted and Castanys-Muñoz *et al.*, 2008 submitted). The fourth one, named LABCG1 according to the recent classification of Leprohon *et al.* (2006) (Perez-Victoria *et al.*, 2003b), was triplicated in tandem in chromosome 6 of *Leishmania*, whereas it was a single copy gene in *Trypanosoma brucei* and a duplicated gene in *T. cruzi* (Seifert *et al.*, 2007)). We have called these LABCG1 copies LABCG1a, b or c respectively (GeneDB-*L. major*, Accession Code LmjF06.0080; LmjF06.0090; LmjF06.0100). However, a topological analysis of the proteins coded showed that the *Leishmania* LABCG1c gene was truncated, as Walker A and several transmembrane segments were absent (**Fig 1**). LABCG1 is a ‘half-transporter’ with a single nucleotide binding domain (NBD) and a single transmembrane domain localized at C-terminus (TMD). *LABCG1* codes for a 633-758 amino-acid (a and b, respectively) protein with a predicted molecular weight of approximately 74-84 kDa. Indeed, although LABCG1a and b are almost identical, LABCG2 has an N-terminal extension (**Fig 2**). LABCG1 shares 19.5 % amino acid identity with human ABCG1, 24.6 % with human ABCG2 and 27.3 % with the White protein from *Drosophyla*.

The presence of several copies of LABCG1 difficult the analysis of its function by the generation of KO parasites. However, as LABCG1 is constitutively expressed (Castanys-Munoz *et al.*, 2007) and it is a half transporter that needs to dimerise to

become functional, we test a dominant negative approach to down-regulate LABCG1 function. To assess that, we first cloned LABCG1 with its natural 5' and 3' untranslated regions (UTRs) into the vector pUCNeoplus, obtaining pUCNeoplusLABCG1. Then, we mutated a lysine residue in the Walker A motif, known to be critical for ATP binding and/or hydrolysis in ABC transporters, to methionine (K108M) (Leprohon *et al.*, 2006). The resulting construction was renamed pUCNeoplusLABCG1^{K/M} and was transfected into *L. infantum*. The overexpression of LABCG1^{K/M} was verified by Northern blot (data not shown).

LABCG1 is implicated in endogenous PS translocation.

To study the possible role of LABCG1 in lipid transport, firstly we investigated the internalization of fluorescent short chain phospholipids analogs. Stationary *L. infantum* parasites transfected with empty vector or overexpressing LABCG1^{K/M} were incubated with NBD-PE, -PC, -PS and -SM and the cell-associated fluorescence was analyzed by flow cytometry analysis after back-exchange with BSA (**Fig.3**). Under these conditions, the accumulation of NBD-PS was significantly reduced in parasites overexpressing LABCG1^{K/M} (**Fig.3C**). In contrast, no significant differences were observed for NBD-PC, NBD-PE and NBD-SM accumulation between control and LABCG1^{K/M} overexpressing cells (**Fig. 3A, B and C**). Afterwards, we tested if this dominant negative phenotype was observed in other *Leishmania* species (*L. donovani*) after downregulation of LABCG1 function with the same strategy. The results clearly showed a similar phenotype than the observed in *L. infantum* lines (data not shown), suggesting that LABCG1 function is implicated in the outward translocation of NBD-PS. Then, we study the translocation of endogenous, long chain, PS. To assess that, control and LABCG1^{K/M} overexpressing promastigotes in the stationary growth phase were stained with Annexin V-Alexa Fluor 488, known to bind mainly PS. Quantitative analysis by

flow cytometry (**Fig. 4A and B**) determined that dominant negative parasites present a significantly reduced expression of PS (20.11% of ANNEXIN V (AN)^{positive}/ (Propidium Iodide (PI)^{negative}) in the outer leaflet of the parasites plasma membrane compared with control cells (52.68% of AN^{positive}/ PI^{negative}).

Dominant negative parasites for LABCG1 are less infective than the control cells.

As PS externalisation by the parasite is a key mediator for the infection of the MF, we evaluate whether down regulation of LABCG1 function correlated with a decreased infectivity of the dominant negative parasites. To assess that, we measured the ability of control and LABCG1^{K/M} overexpressing *L. infantum* parasites to infect mouse peritoneal MF (**Fig. 5**). The results showed that the infectivity index of dominant negative parasites were around half of the found with control cells (**Fig. 5B**). This difference were due to a reduced percentage of MF infection with respect to control cells (36.04 ± 4.3 % vs 64.7 ± 0.97 % respectively; P < 0.05) (**Fig. 5B**), and not to a difference in the mean number of intracellular amastigotes per infected MF (**Fig. 5D**). To verify that the differences in infectivity were due to the measured decrease in the PS exposure after downregulation of LABCG1 function, we repeated the infection experiments masking most of the PS in the promastigote by incubating stationary wild-type and dominant negative parasites with Annexin V (**Fig. 7**). As expected, PS masking reduced the infectivity index of control parasites in a 75 %. Interestingly, Annexin-mediated masking of PS in dominant negative parasites only slightly reduced 25 % its (lower) ability to infect peritoneal MF, reaching the same values obtained with Annexin-V treated control parasites. These results confirmed that the presence of PS in the outer leaflet of the plasma membrane of the promastigote is a key factor for their infectivity, and strongly suggest that LABCG1 function is involved in such PS externalisation.

Discussion

PS is a PL asymmetrically placed in the cytoplasmic side of the plasma membrane of eukaryotic cells (Leprohon *et al.*, 2006). One of the known mechanisms used by *Leishmania* amastigotes and metacyclic promastigotes to infect MF and inhibit its microbicidal activity is the exposition of PS on the outer leaflet of the plasma membrane (Bosedasgupta *et al.*, 2008; Ozvegy *et al.*, 2002; van Meer *et al.*, 2008; van Zandbergen *et al.*, 2006; van Zandbergen *et al.*, 2007). Although the molecular bases of this outward PS translocation in *Leishmania* are unknown, it has been suggested to be mediated by a decrease of ATP-dependent out-to-in PS movement (Wanderley *et al.*, 2006), probably by downregulation of APT function. However, there is no difference (paper Pepe 2003) or just very slightly (Tripathi 2003) in internalisation of PS analogues between log-phase promastigotes and those being in the stationary phase. In addition, KO *Leishmania* parasites for the APT LdMT shows similar infectivity and ability to develop the disease than control cells (Wanderley *et al.*, 2005). Finally, although the involvement of in-to-out movements of PL was discarded to explain PS externalisation (Tripathi 2003), the authors measured this activity at 0 °C, a temperature where the function of an ABC transporter will be silent.

In contrast, in this article we provide evidence supporting the involvement of a new ABCG half-transporter (LABCG1) from *Leishmania* in the PS exposure in the outer leaflet of the parasite plasma membrane: i) downregulation of LABCG1 function by overexpressing an inactive version of the transporter diminish the translocation of fluorescent short-chain analogues of PS (NBD-PS). This dominant negative phenotype seems to be specific for the head of the PL, as the movement of fluorescent analogues of PC, PE or SM were not affected; ii) Annexin V–Alexa 488 binding assays showed that LABCG1 “functional knock-down” promastigotes expose less endogenous PS in the

stationary phase than control parasites; iii) this LABCG1^{K/M}-mediated defect in the externalization of PS correlated with significantly reduced infection of mouse peritoneal MF; iv) the differences in the ability to infect MF between control and LABCG1^{K/M} overexpressing parasites disappeared when most external PS was masked by preincubating the parasites in the presence of Annexin-V; v) finally, LABCG1 belongs to the same subfamily than mammalian ABCG2, a well characterized PS transporter (de Freitas Balanco *et al.*, 2001). These results strongly suggest that downregulation of LABCG1 function reduces the externalization of PS required for the infection of mouse peritoneal MF. Recently, Real Time RT-PCR experiments showed that LABCG1 have a constitutive expression on both life cycle stage in *Leishmania donovani* (Tripathi and Gupta, 2003). Although not discussed in detail in this article, LABCG1 expression seems to be higher in the amastigotes form than in the log-phase promastigote forms, as expected for a protein involved in PS externalisation.

A number of lipid translocases has already been described in *Leishmania*. They include a member of the APT (ref javi) and different ABC transporters such as LABCB4/LMDR1 (Seifert *et al.*, 2007), LABCA1 (Woehlecke *et al.*, 2003), LABCA2 (Bosedasgupta *et al.*, 2008), LABCG4 (Perez-Victoria *et al.*, 2001b), LABCG6 (Castanys-Muñoz *et al.*, 2008. submitted) and LABCG1 (this work). Between them, LABCG1 seems to be the only one specific for the headgroup of the PS. Although the results here presented strongly suggest that LABCG1 is involved in PS exposition at the surface of the parasite, probably a diminished activity of one or more APT, and maybe the stimulation of putative scramblase, will be also important.

The role of the apoptotic-like PS exposition in the establishment of the infection by *Leishmania* is a topic of discussion. One possibility is that PS positive cells will not necessarily die, and use PS exposition, in an apoptotic mimicry fashion, for the MF

infection and inhibition of its microbicidal activity (Araujo-Santos *et al.*, 2005; Barcinski *et al.*, 2003; Castanys-Munoz *et al.*, 2007; Parodi-Talice *et al.*, 2003). The second possibility argues that PS positive forms are indeed apoptotic “altruist” parasites convicted to death, but required for the PS negative infective parasites to invade the host cell, in a truly cooperative system (van Zandbergen *et al.*, 2006). Although we have observed that AN+/PI- parasites in the stationary phase present the same size that the AN- ones, in contrast to the observed for *L. major* (ref PNAS), we have not determined the viability of these PS positive parasites. Anyway, in both situations, PS exposure, probably involving ABCG1 function, is the relevant phenotype for MF infection and inactivation, allowing parasite persistence in the host.

ABCG1a, 1b and 1c are organized in tandem. ABCG1c is a truncated gene, coding for a protein that only has the Walker B the signature conserved motifs, and two transmembrane segments. The dimerisation requirement for ABCG proteins to become functional, allowed us to test a dominant negative approach to down-regulate ABCG1 function. Dominant-negative inhibition of mammal ABCG2 (van Zandbergen *et al.*, 2007) and *Leishmania* ABCG5 (Campos-Salinas J. *et al.*, 2008, submitted) has also been described by the overexpression of different mutated forms of the transporters. Although the inhibition of ABCG1 function is the most probable effect of the overexpression of the inactive version of ABCG1, we cannot rule out the dominant-negative inhibition of other putative partners. Indeed, some ABCG proteins such as human ABCG5/8 (de Freitas Balanco *et al.*, 2001) and *Drosophila* White, Brown and Scarlet function as heterodimers (Laskay *et al.*, 2003). The later can even change the substrate transported as a function of the partner of the White protein (Kage *et al.*, 2002). However, as overexpression of inactive versions of ABCG3 and ABCG5 does not affect the translocation of PS (Campos-Salinas J., *et al.* 2008, submitted and

Castanys-Muñoz et al., 2008 submitted) or the infectivity of the parasites (Campos-Salinas J., et al 2008, unpublished results), and overexpression of mutated LABCG1^{K/M} does not alter the phenotype produced by LABCG4 (Wang *et al.*, 2008), LABCG5 (Campos-Salinas J., et al 2008, submitted) and LABCG6 (Castanys-Muñoz et al., 2008 submitted), it is more probable that LABCG1 does not heterodimerize with these other ABCG proteins. However, an interesting possibility could be that truncated LABCG1.c, known to be expressed at least at mRNA levels (Schmitz *et al.*, 2001), could have a dominant negative effect on LABCG1 function, which could be a novel way to regulate protein function in this parasite. Further experiments will be needed to prove this hypothesis.

In conclusion, we provide evidence about the involvement of *Leishmania* LABCG1, a novel ABCG transporter, in the PS exposure in the outer leaflet of the plasma membrane of stationary parasites and about how down-regulation of LABCG1 function reduce significantly the infectivity of mouse peritoneal MF.

Experimental procedures

Materials

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were obtained from Sigma. The fluorescent analogues 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) were from Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL, USA). Annexin V, was purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, USA) and annexin V–Alexa 488 was purchased from Molecular Probes.

Strains, cell culture, cell transfection and analysis

Promastigote forms of wild-type *L. infantum* (strain 21578, LEM 2592, Montpellier, France) and *L. donovani* (MHOM/ET/67/HU3) were maintained as described (Castanys-Munoz *et al.*, 2007; Leprohon *et al.*, 2006). Parasites were transfected as previously described (Bosedasgupta *et al.*, 2008). 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 (Araujo-Santos *et al.*, 2005). IC₅₀ was defined as the drug concentration required for half-maximal inhibition of the cellular growth rate.

DNA constructs and transformation procedures

ABCG1 from *L. major* (GeneDB-*L. major*, Accession Code LmjF06.0080) was isolated from genomic DNA of *L. major* by PCR using sense (5'-ATATCGCTGTCTCTGCGTCG) and antisense (5'-GGCAAACACACAGAGCGATG) primers. Nucleotide sequences were determined automatically as described (Parodi-Talice *et al.*, 2003). *LABCG1* gene was cloned into

the *Leishmania* expression vector (pUCNeoPlus) (Perez-Victoria *et al.*, 2003b). To obtain parasites overexpressing non-functional LABCG1, a mutation was introduced in the Walker A motif of the ATP binding domain to replace the lysine 108 for a methionine (K108M) using the QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA).

Analysis of fluorescent phospholipid uptake

Analysis of the translocation of fluorescent phospholipid analogues by flow cytometry were done as described (Kennedy *et al.*, 2001b) using a Beckton Dickinson FACScan (San José, CA), equipped with an argon laser operating at 488 nm.

Promastigote binding with Annexin-V- Alexa 488 conjugate

Leishmania promastigote forms from stationary phase were harvested in RPMI-1640 and were centrifuged at $2500 \times g$ for 10 min at 4 °C. The cells were washed with annexin V-binding buffer (100mM HEPES, 150mM NaCl, 5mM KCl, 5mM CaCl₂ and 1mM MgCl₂; pH 7.4). The washed cells were resuspended in the same buffer and incubated with annexin V–Alexa-488 (1 µg annexin V-alexa 488/ 10×10^6 cells) at 4°C for 15 min. Afterwards, the parasites were labelled with propidium iodide (1µg/µl distilled water) and the mixture incubated for 5 min at 4 °C. The cells were washed at $2500 \times g$ for 1 min at 4 °C and resuspended to a cell density of 4×10^6 cells/ml. Cellular fluorescence was quantified by scanning the emission in a Beckton Dickinson FACS scalibur and analysed by the Cell Quest Pro software application. A total of 10,000 events were harvested from each sample. The control cells were incubated in Annexin V-binding buffer alone without Annexin V–Alexa-488, under identical conditions.

In vitro infection of MF

Peritoneal MF from BALB/c mice (Charles River Ltd.) were harvested by lavage with ice-cold RPMI 1640 medium, plated at a density of 10×10^4 MF/well in RPMI-1640 medium plus 10% hiFBS in 8-well IBIDI (15 μ -Slide) and allowed to adhere for 2 hours at 37 °C in a 5% CO₂. These MF were infected at 35 °C with stationary-phase promastigotes (metacyclic) forms of control and LABCG1^{K/M} *L. infantum* parasites with or without Annexin V (2,5 μ g/ 10×10^6 promastigotes), previously washed with the RPMI-1640 free serum medium, at a ratio of 1:20 (MF: parasites) in RPMI-1640 medium supplemented with 5% hiFBS. After 4 h of infection, excess parasites were removed by washing with serum-free medium. The infected MF were further incubated in RPMI 1640 medium supplemented with 10% of hiFBS for 24h at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere to allow intracellular parasite proliferation. After the incubation period, the cultures were stained with DAPI and the infections were analyzed with images acquired with an Olympus IX81 microscopy as described (Lario *et al.*, 1997). Parasites were quantified using a cell counter of the Image J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). The photos were deconvolved using Huygens Professional from Scientific Volume Imaging (<http://www.svi.nl>). The infectivity index was calculated by multiplying the percentage of infected macrophages by the average number of amastigotes/ infected cells. The percentage of the infection was calculated by multiply the percentage of infected MF by not infected MF. The mean of amastigotes by MF was calculated by dividing the total number of amastigotes by the number of infected MF. Three independent experiments were performed with duplicates.

Statistical analysis

The statistical significance was determined by Student's *t*-test. Significance was considered as $P < 0.05$.

Acknowledgements

This work was supported by the EU Marie Curie Research Training Network Grant MRTN-CT-2004-005330 (to F.G.), the Spanish Grants MSC-FIS PI040830 (to J.M.P.V.) and SAF2006-02093 (to F.G.), ISCIII-Red de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales (RICET) RD06/0021/0002 (FG), Plan Andaluz de Investigación (Cod. BIO130). J.C.S. was recipient of a MRTN-CT-2004-005330 contract.

Figure legends

Figure 1: Membrane topology for the *Leishmania* half-transporter LABCG1a, 1b and 1c. The nucleotide binding domain (NBD) is located in the N-terminal and the transmembrane domain (TMD) is proximal to the COOH end. The membrane-spanning helices of the TMD are shown as helices passing through the lipid bilayer. The ATPase catalytic Walker A, Walker B, and the signature motifs (C) localized in the nucleotide binding domain (NBD), are showed respectively (boxes A, B and C, respectively). The KM box marks the catalytic site mutation (K(108)M) engineered into the Walker A motif. The topology model was predicted with TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) and TMRPres2D (<http://biophysics.biol.uoa.gr/TMRPres2D/>).

Figure 2: Amino acid sequences of LABCG1a and LABCG1b of *Leishmania*. Putative transmembrane segments (TMD), predicted with TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) and TMRPres2D (<http://biophysics.biol.uoa.gr/TMRPres2D/>), are underlined. Walker A and Walker B motifs are boxed and ABC family signature motifs are double-underlined.

Figure 3: C₆-NBD-PL accumulation in *Leishmania* parasites overexpressing LABCG1. Parasites were incubated with the phospholipid analogs NBD-PC (A), NBD-PE (B), NBD-PS (C) or NBD-SM (D) for 30 min at 28°C. After washing and back-exchange with BSA, cell-associated fluorescence was measured by Flow cytometry analysis. The grey histogram represents control-transfected cells, the uncoloured histogram represents those of dominant negative parasites and the dotted line represents non-labelled cells. Results are representative of three independent experiments.

Figure 4: Flow cytometry analysis of annexin V–Alexa 488 % bound to stationary phase of *Leishmania* promastigotes. A: Density plot represent the percentage of annexin V-Alexa 488 in control parasites. B: Density plot represent the % of annexin V-Alexa 488 in dominant negative parasites. Right upper quadrant represents of percentage of apoptotic cells and right down quadrant represents PS positive and not apoptotic cells Cell-associated fluorescence was measured by Flow Cytometry analysis. Results represent two independent experiments.

Figure 5: Infectivity of mouse peritoneal MF with stationary phase *Leishmania infantum* dominant negative for LABCG1 and control parasites. A: The determination of the intracellular amastigote forms was done by counting the kinetoplasts (K) of the parasites stained with DAPI as well as the nucleus of the peritoneal MF (N). The calculation was done by using the cells counter of Image J software. B: The percentage infectivity index = infectivity index of dominant negative cells)/(infectivity index of control cells) x 100. C: The percentage of the infection was determined by multiply the percentage of infected MF by 100 divided by non-infected MF. D: The mean number of amastigotes by MF was determined dividing the total number of amastigotes by total infected MF. Results represent the means ± SD of two independent experiments.

Figure 6: Infectivity Index of mouse peritoneal MF with stationary phase *Leishmania infantum* dominant negative for LABCG1 and control parasites with or without Annexin

V. The percentage infectivity index = infectivity index of treated cells/(infectivity index untreated cells) x 100. The quantification was done by using a cell counter of Image J software. The mean number of amastigotes by MF was determined dividing the total number of amastigotes by total infected MF. Results represent the means \pm SD of two independent experiments.

Bibliography

- 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.
- Barcinski, M.A., Moreira, M.E., Balanco, J.M., Wanderley, J.L., and Bonomo, A.C. (2003) The role of apoptotic mimicry in host-parasite interplay: is death the only alternative for altruistic behavior? *Kinetoplastid Biol Dis* **2**: 6.
- Bosedasgupta, S., Ganguly, A., Roy, A., Mukherjee, T., and Majumder, H.K. (2008) A novel ATP-binding cassette transporter, ABCG6 is involved in chemoresistance of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* **158**: 176-188.
- Castanys-Munoz, E., Alder-Baerens, N., Pomorski, T., Gamarro, F., and 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* **64**: 1141-1153.
- Cavazzuti, A., Paglietti, G., Hunter, W.N., Gamarro, F., Piras, S., Loriga, M., Allecca, S., Corona, P., McLuskey, K., Tulloch, L., Gibellini, F., Ferrari, S., and Costi, M.P. (2008) Discovery of potent pteridine reductase inhibitors to guide antiparasite drug development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 1448-1453.
- da Silva, R., and Sacks, D.L. (1987) Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. *Infect Immun* **55**: 2802-2806.
- Davidson, A.L., and Maloney, P.C. (2007) ABC transporters: how small machines do a big job. *Trends Microbiol* **15**: 448-455.
- de Freitas Balanco, J.M., Moreira, M.E., Bonomo, A., Bozza, P.T., Amarante-Mendes, G., Pirmez, C., and Barcinski, M.A. (2001) Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. *Curr Biol* **11**: 1870-1873.
- Kage, K., Tsukahara, S., Sugiyama, T., Asada, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T., and 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.
- Kennedy, M.L., Cortes-Selva, F., Perez-Victoria, J.M., Jimenez, I.A., Gonzalez, A.G., Munoz, O.M., Gamarro, F., Castanys, S., and Ravelo, A.G. (2001) Chemosensitization of a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line by new sesquiterpenes from *Maytenus magellanica* and *Maytenus chubutensis*. *J Med Chem* **44**: 4668-4676.
- 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.
- Laskay, T., van Zandbergen, G., and Solbach, W. (2003) Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol* **11**: 210-214.
- 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.
- Melby, P.C. (2002) Vaccination against cutaneous leishmaniasis: current status. *Am J Clin Dermatol* **3**: 557-570.

- Ozvegy, C., Varadi, A., and Sarkadi, B. (2002) Characterization of drug transport, ATP hydrolysis, and nucleotide trapping by the human ABCG2 multidrug transporter. Modulation of substrate specificity by a point mutation. *J Biol Chem* **277**: 47980-47990.
- 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. (2003) 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, 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.
- Pomorski, T., and Menon, A.K. (2006) Lipid flippases and their biological functions. *Cell Mol Life Sci* **63**: 2908-2921.
- Santos, D.O., Coutinho, C.E., Madeira, M.F., Bottino, C.G., Vieira, R.T., Nascimento, S.B., Bernardino, A., Bourguignon, S.C., Corte-Real, S., Pinho, R.T., Rodrigues, C.R., and Castro, H.C. (2008) Leishmaniasis treatment-a challenge that remains: a review. *Parasitol Res.*
- Schlegel, R.A., and Williamson, P. (2001) Phosphatidylserine, a death knell. *Cell Death Differ* **8**: 551-563.
- Schmitz, G., Langmann, T., and Heimerl, S. (2001) Role of ABCG1 and other ABCG family members in lipid metabolism. *J Lipid Res* **42**: 1513-1520.
- Seifert, K., Perez-Victoria, F.J., Stettler, M., Sanchez-Canete, M.P., Castanys, S., Gamarro, F., and Croft, S.L. (2007) Inactivation of the miltefosine transporter, LdMT, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of *Leishmania donovani* and persists in vivo. *Int J Antimicrob Agents* **30**: 229-235.
- Tripathi, A., and Gupta, C.M. (2003) Transbilayer translocation of membrane phosphatidylserine and its role in macrophage invasion in *Leishmania* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* **128**: 1-9.
- van Meer, G., Voelker, D.R., and Feigenson, G.W. (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 112-124.
- van Zandbergen, G., Bollinger, A., Wenzel, A., Kamhawi, S., Voll, R., Klinger, M., Muller, A., Holscher, C., Herrmann, M., Sacks, D., Solbach, W., and Laskay, T. (2006) *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 13837-13842.
- van Zandbergen, G., Solbach, W., and Laskay, T. (2007) Apoptosis driven infection. *Autoimmunity* **40**: 349-352.
- Wanderley, J.L., Benjamin, A., Real, F., Bonomo, A., Moreira, M.E., and Barcinski, M.A. (2005) Apoptotic mimicry: an altruistic behavior in host/*Leishmania* interplay. *Braz J Med Biol Res* **38**: 807-812.
- Wanderley, J.L., Moreira, M.E., Benjamin, A., Bonomo, A.C., and Barcinski, M.A. (2006) Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts. *J Immunol* **176**: 1834-1839.

- Wang, J., Zhang, D.W., Lei, Y., Xu, F., Cohen, J.C., Hobbs, H.H., and Xie, X.S. (2008) Purification and reconstitution of sterol transfer by native mouse ABCG5 and ABCG8. *Biochemistry* **47**: 5194-5204.
- Woehlecke, H., Pohl, A., Alder-Baerens, N., Lage, H., and 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.

Figure 1

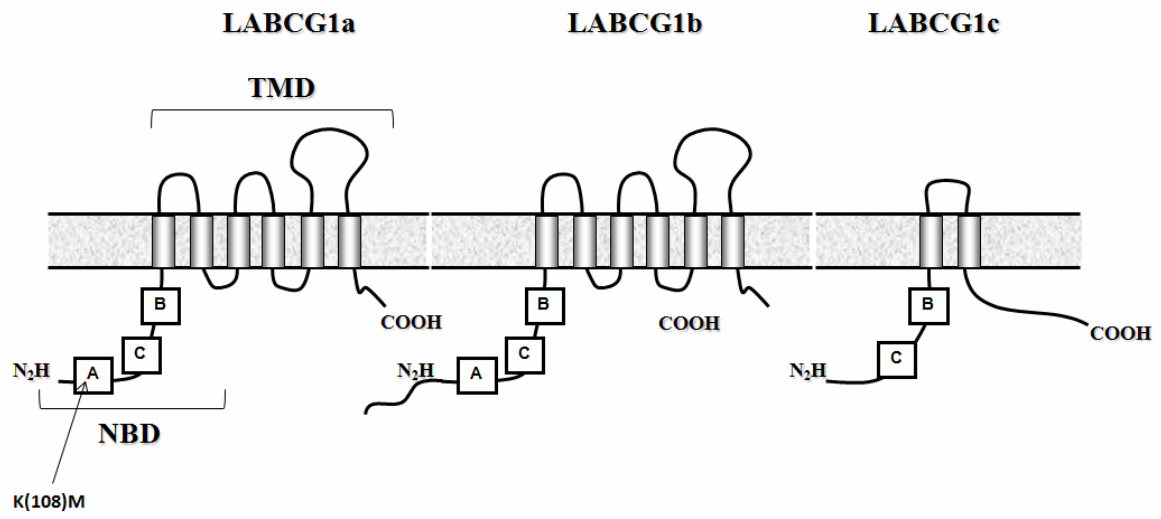


Figure 2

```
          10      20      30      40      50      60
LABCG1  -----MPPPAATRAP-----TEDTYT
LABCG2  MMPLQPSWRVLVYPSIGATTSSRAAPLSPFSAPTRIPHSPRLAPLRWGHCLS FAS SRHLS
          70      80      90      100     110     120
LABCG1  DYSFTP-----ISIDEPD-
LABCG2  SLSVTAHVTDVPTVVRTARLLKDPTGGLLCP TALSLPSTQMPRLRNPEPINCNGISIDAE DQ
          130     140     150     160     170     180
LABCG1  ---VHHQRD SGKVDSQLHG SIAEFD SSTQRA IGV PSS YSL PLS WHR LSY SVG KKR IL
LABCG2  EGT SNHGHTLSY GKVDSQLHG SIAESD SSTRRA IGV PSS YSL PLS WHR LSY SVG KKR IL
          190     200     210     220     230     240
LABCG1  CGLTGTALPGRCLAII GSSGAGH ITTFLNAICDR LASGGELRLS GRRQL GDCE FERHFRKA
LABCG2  CGLTGTALPGRCLAII GSSGAGH ITTFLNAICDR LASGGELRLS GRRQL GDCE FERHFRKA
          250     260     270     280     290     300
LABCG1  MFVAQDI IISPLSTPYDALWFLSRTRRGTSRAE TEERVQ EMLNVLRLQHCRDTKVGIPG
LABCG2  MFVAQDI IISPLSTPYDALWFLSRTRRGTSRAE TEERVQ EMLNVLRLQHCRDTKVGIPG
          310     320     330     340     350     360
LABCG1  LESGLSGGERKRC SIGIELICDLKILL DEPTSGLD SVASAKVVHLRLQLSRTGR TVIYT
LABCG2  LESGLSGGERKRC SIGIELICDLKILL DEPTSGLD SVTSAKVVHLRLQLSRTGR TVIYT
          370     380     390     400     410     420
LABCG1  IHQPTAEVLSYFDDVMLMTQGR IAYRGTMAASLDYFESIGFSCPSKYTP TDY YMWLLQDS
LABCG2  IHQPTAEVLSYFDDVMLMTQGR IAYHGTMAASLDYFESIGFSCPSKYTP TDY YMWLLQDS
          430     440     450     460     470     480
LABCG1  VTSKVLIKRWRKYLKNGPRTPHTAAVRLAKSRGESSAARFLDAYIAKFGSSPAVQLYE LT
LABCG2  VTSKVLIKRWRKYLKNGPRTPHTAAVRLAKSRGESSAARFLDAYIAKFGSSPAVQLYE LT
          490     500     510     520     530     540
LABCG1  RRTMTEISR DYLFLFSYMAQAIFFAIVVGLIFLNVRANVEGIQDRQGVLFMTVMNRAMSS
LABCG2  RRTMTEISR DYLFLFSYMAQAIFFAIVVGLIFLNVRANVEGIQDRQGVLFMTVMNRAMSS
          550     560     570     580     590     600
LABCG1  TFI MINTFNNVRAVFMREQRAGAYSPLMFFLGRSFAEFPVQILAVLVESCILYWVGLHR
LABCG2  TFI MINTFNNVRAVFMREQQAGAYSPLMFFLGRSFAEFPVQILAVLVESCILYWVGLHR
          610     620     630     640     650     660
LABCG1  HPGSFYYFGVIALLSQVATGLGFAISASCP SVVVSSALAPLVLIP LALGGLLASTDRL
LABCG2  HPGSFYYFGVIALLSQVATGLGFAISASCP SVVVSSALAGGLLASTDRL
          670     680     690     700     710     720
LABCG1  RPYWYWLKPSFMRHAYILVLRNELHNVPHIACDYRWGDGYCINQARDGRTVMRLLGFD
LABCG2  RPYWYWLKPSFMRHAYILVLRNELHNVPHIACDYRWGDGYCINQARDGRTVMRLLGFD
          730     740     750
LABCG1  GDPQSVSVYMWVSLAIMFFLLRSISVIALTVASCARTA
LABCG2  GDPQSVSVYMWVSLAIMFFLLRSISVIVLMAAREKT-
          ***** : * : *
```

Figure 3

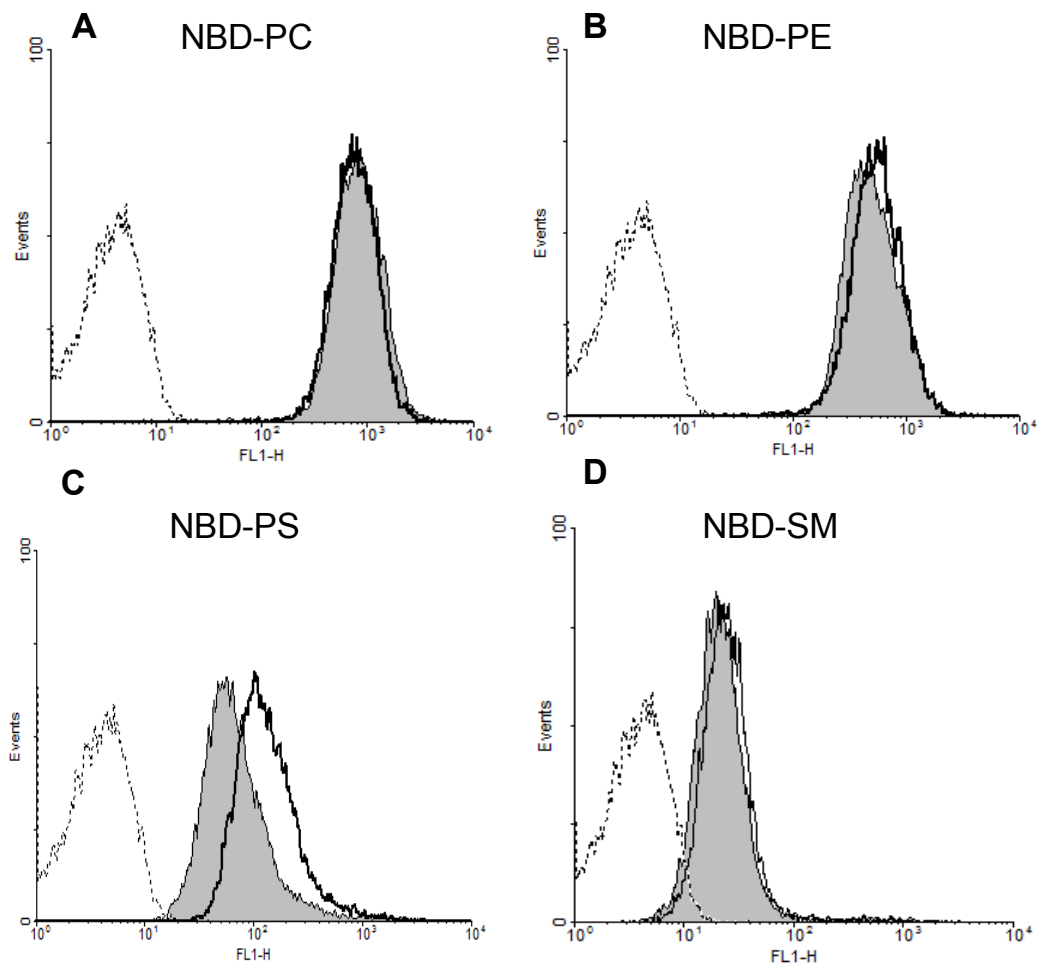


Figure 4

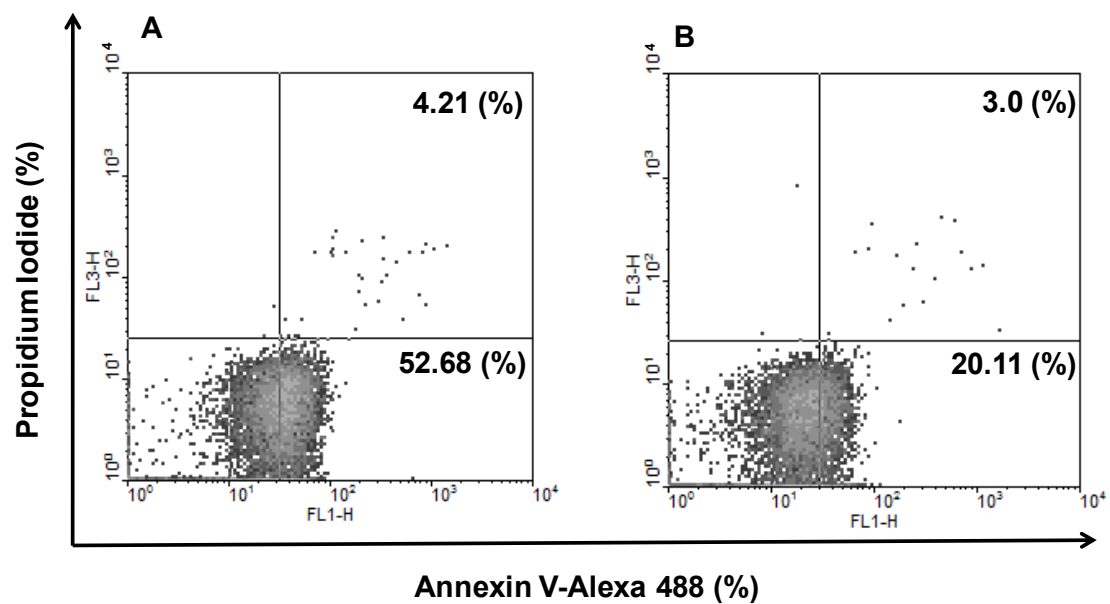
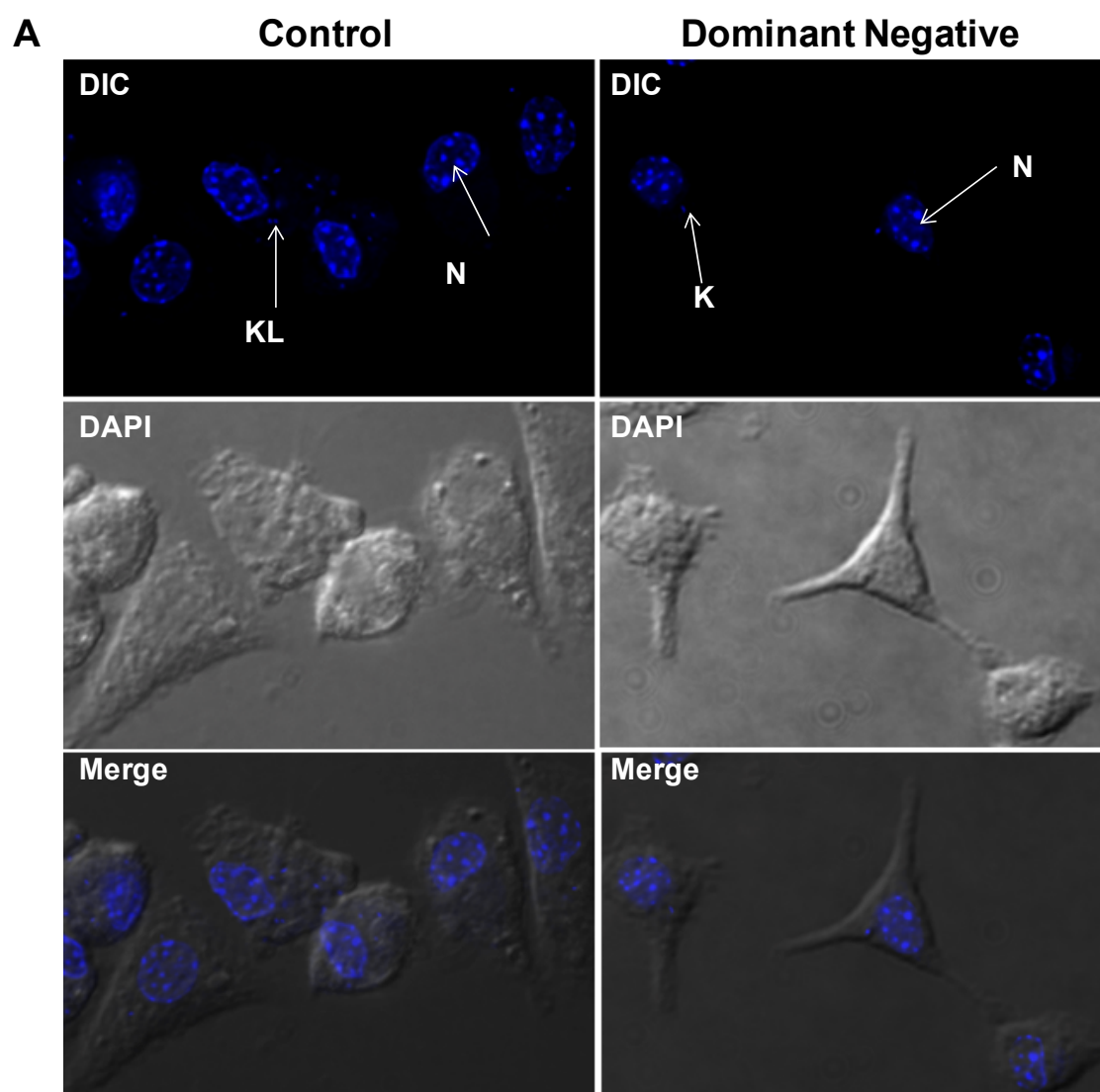
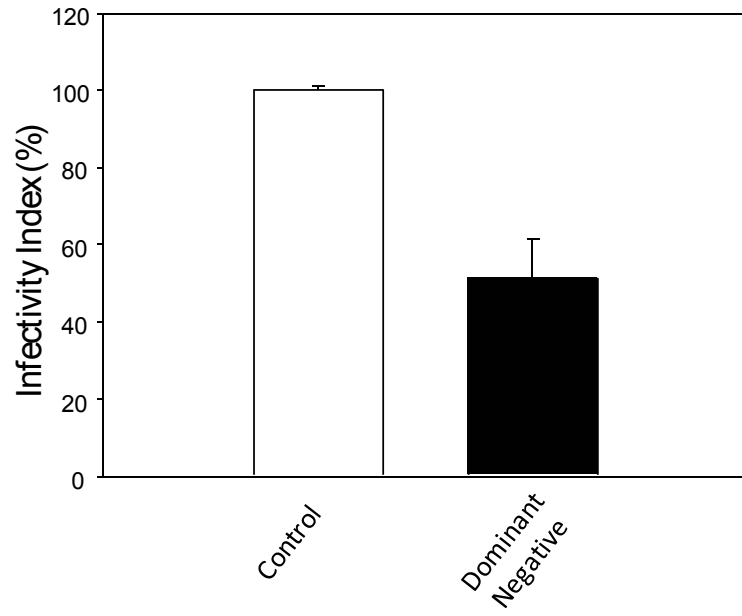


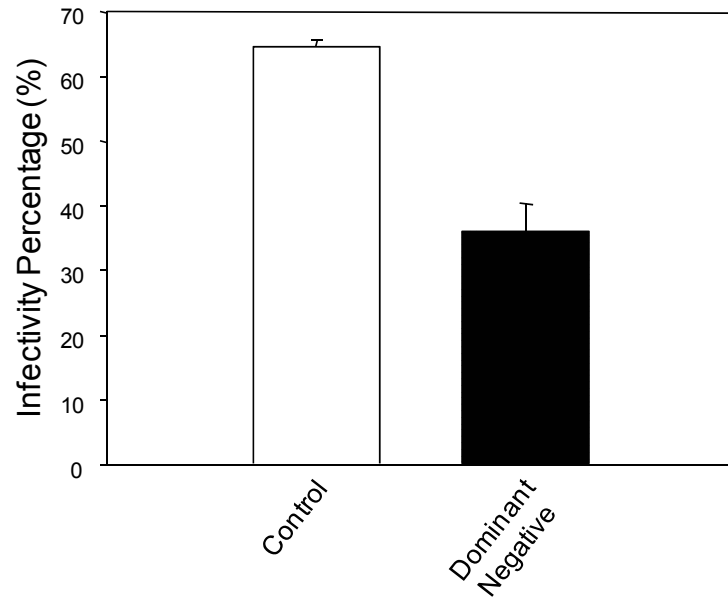
Figure 5



B



C



D

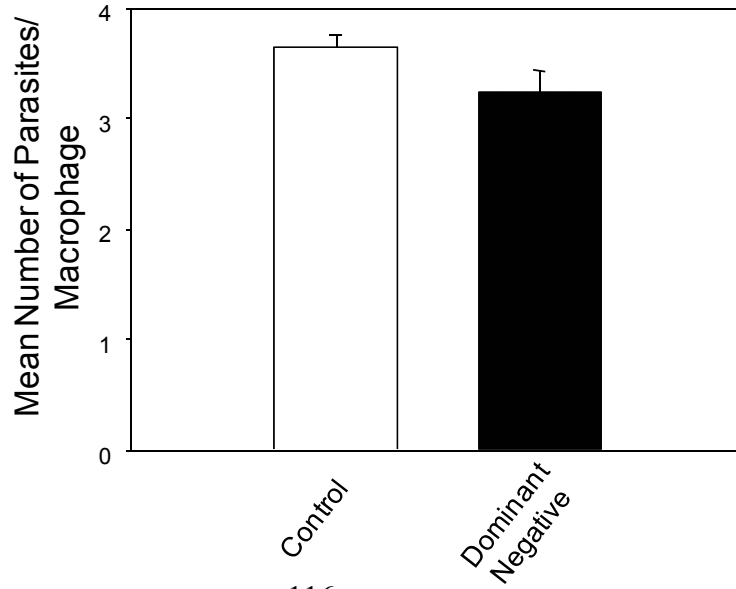
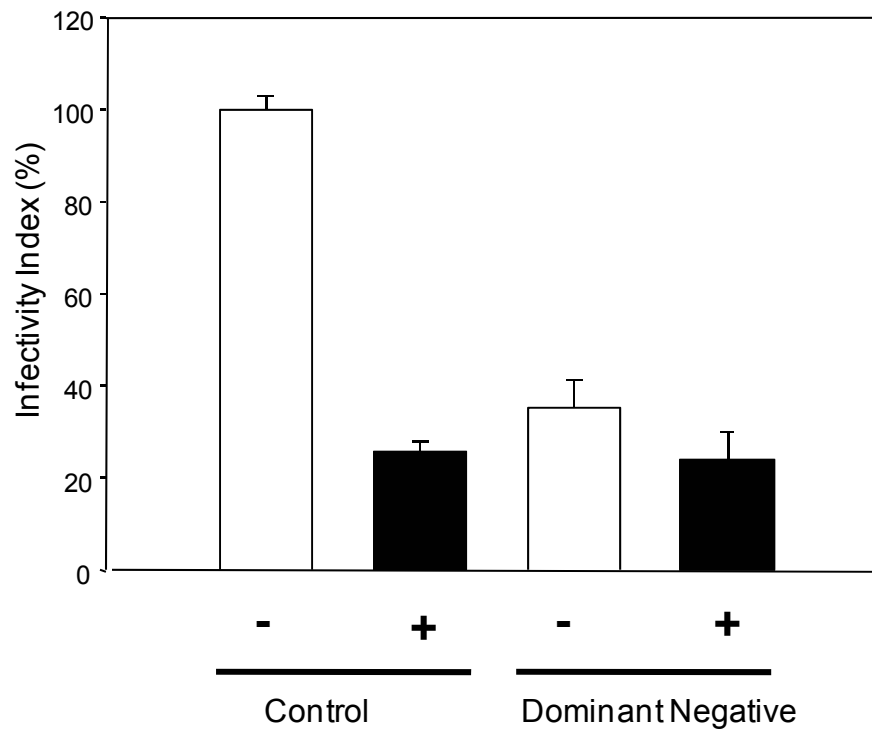


Figure 6



DISCUSION

Los protozoos parásitos son responsables de algunas de las enfermedades más comunes y devastadoras que afectan al hombre y a los animales domésticos, amenazando la vida de una tercera parte de la población mundial (Parodi-Talice *et al.*, 2003). A pesar de su grave impacto, al afectar a los habitantes de las regiones más pobres del planeta, estas enfermedades están marginadas del interés de la industria farmacéutica (Araujo-Santos *et al.*, 2003). Todavía no se dispone de una vacuna efectiva para prevenirlas y, por lo tanto, la quimioterapia sigue siendo la principal forma de lucha contra los parásitos. Aunque estos organismos poseen atractivas dianas terapéuticas gracias a sus rutas bioquímicas específicas, desafortunadamente la mayoría de los fármacos antiparasitarios llevan usándose desde hace más de cinco décadas. De hecho, según un análisis de Pecoul y col. (Cavazzuti *et al.*, 2008), de los 1233 fármacos nuevos comercializados entre 1975 y 1997, sólo 13 fueron aprobados para enfermedades tropicales. Además, muchos de estos fármacos antiparasitarios clásicos son altamente tóxicos y han dejado de ser efectivos debido al incremento en la aparición de fallo terapéutico y resistencias en los parásitos, lo que se ha convertido en un importante problema de salud pública. Entre estas enfermedades, la leishmaniasis es la que más muertes provoca tras la malaria, por lo que es una de las enfermedades “olvidadas” que se han convertido en una prioridad para la Organización Mundial de la Salud (OMS) (<http://www.who.int/en/>).

Afortunadamente, la situación actual de la quimioterapia para el tratamiento de la leishmaniasis es más prometedora de lo que lo ha sido desde hace décadas, gracias a la reciente aparición de nuevos fármacos y de nuevas formulaciones de fármacos antiguos, ya aprobados o en fase clínica de estudio. 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. En este sentido, 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 (Ouellette, 2001). Además, de factores como la variación en la

sensibilidad de cada especie de *Leishmania*, variaciones en su farmacocinética, y de variaciones en la interacción fármaco-respuesta inmune del paciente (Alvar *et al.*, 2006b), otros factores como la selección, por de mecanismos de resistencia que disminuyen la eficacia del tratamiento terapéutico juegan un papel importante en el fallo terapéutico frente a la leishmaniasis. 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®, así como frente a la leishmaniasis cutánea (Pecoul *et al.*, 1999).

Se ha demostrado experimentalmente que los transportadores pertenecientes a la familia ABC, además de otras funciones biológicas, están implicados en fenómenos de resistencia a fármacos empleados en la quimioterapia contra la leishmaniasis (revisado por (Singh *et al.*, 2006; Sundar, 2001). Así, recientemente se ha relacionado al transportador ABC MRPA con la resistencia a antimoniales pentavalentes en aislados clínicos de pacientes de India con leishmaniasis visceral (Ouellette *et al.*, 2004; Soto *et al.*, 2008).

Los transportadores ABC descritos hasta el momento en *Leishmania* forman parte de las subfamilias ABCA, ABCB, ABCC y, recientemente, ABCG (revisado por (Mittal *et al.*, 2007; Mukherjee *et al.*, 2007; Ouellette *et al.*, 1998b; Perez-Victoria *et al.*, 2001a). De estas subfamilias de transportadores, la subfamilia ABCA (LtrABCA1.1 y LtrABCA2), se ha caracterizado y determinado su implicación en el tráfico de fosfolípidos (Leprohon *et al.*, 2006), observándose como la sobreexpresión de LtrABCA2 modifica el tráfico vesicular y la infectividad del parásito (Castanys-Munoz *et al.*, 2007). En 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* caracterizados en diferentes especies de *Leishmania* y que han recibido diferentes nombres según la especie en la que se ha caracterizado (Bosedasgupta *et al.*, 2008), (Parodi-Talice *et al.*, 2003), (Araujo-Santos *et al.*, 2005), (Henderson *et al.*, 1992). Estas proteínas Pgp-MDR1 confieren un fenotipo MDR similar al observado en células tumorales de mamíferos, expulsando una gran variedad de fármacos diferentes estructural y

funcionalmente al exterior celular, aunque sin embargo se desconoce su función fisiológica. En el caso de la proteína LtrMDR1 de *L. tropica* resistente a daunomicina, la proteína confiere resistencia a los alquil-lisofosfolípidos miltefosina y edelfosina, actualmente considerados como los fármacos más prometedores en el tratamiento de la leishmaniasis, debido a un significativo eflujo de fármacos (Chow *et al.*, 1993). El tercer grupo de transportadores ABC caracterizados en *Leishmania* es la subfamilia ABCC. Los estudios funcionales realizados con diferentes transportadores de esta subfamilia han determinado su implicación en la resistencia a fármacos, siendo la proteína PGPA (MRPA), una de las más estudiadas por su relación con la resistencia a arsenito y antimoniales, debido a la translocación de estos compuestos conjugados a tripanotión al interior de una vacuola (Gueiros-Filho *et al.*, 1995).

Dentro de la subfamilia ABCG, existen diferentes transportadores de los que sólo se ha realizado la caracterización de los transportadores LABCG4 y LABCG6, cuya función está relacionada con la resistencia a fármacos y el transporte de fosfolípidos. El transportador LABCG4 se localiza en la membrana plasmática de *Leishmania* y confiere una significativa resistencia a miltefosina así como está implicado en el transporte del análogo fluorescente de fosfatidilcolina (Chiquero *et al.*, 1998). Igualmente, el transportador LABCG6 se localiza en la membrana plasmática del parásito (Castanys-Muñoz y col., 2008, artículo enviado para su publicación) y confiere resistencia a diferentes fármacos tales como camptotecina (Perez-Victoria *et al.*, 2006d), a los alquil-lisofosfolípidos miltefosina, edelfosina y perifosina, así como a las aminoquinoleínas: sitamaquina, cloroquina y mefloquina (Castanys-Muñoz y col., 2008, artículo enviado para su publicación). A pesar de los estudios realizados en algunos transportadores de la subfamilia ABCG, su función fisiológica en *Leishmania* está aún por determinar.

Una de las posibles funciones que estos transportadores pueden llevar a cabo sería su implicación 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 (Ouellette *et al.*, 1998a). 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 los transportadores LABCG4, LABCG6 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 e invasión del parásito en la célula hospedadora.

Una forma racional de buscar nuevos fármacos antiparasitarios consiste en conocer las diferencias bioquímicas entre el parásito y el hospedador humano. Un ejemplo en los parásitos tripanosomátidos sería la incapacidad de sintetizar hemo, una molécula esencial en todos los organismos aeróbicos que juega un papel primordial en gran cantidad de procesos fisiológicos como la respiración, la transcripción y traducción de genes, la diferenciación celular y la transducción de señales. La absoluta necesidad de tomar hemo de una fuente exógena ya se consideró hace más de 70 años como el “Talón de Aquiles” de los parásitos tripanosomátidos. La reciente finalización del proyecto genoma de estos parásitos (Castanys-Munoz *et al.*, 2007) ha puesto de manifiesto que esta auxotrofia para hemo se debe a que no presentan la mayoría de las enzimas necesarios para su síntesis. En *T. brucei* y *T. cruzi* está ausente toda la ruta biosintética, mientras que en *Leishmania* sólo se encuentran los 3 últimos enzimas de la ruta, de los 8 existentes en humanos .

Es interesante señalar que estos tres enzimas presentan mayor homología con los equivalentes de bacterias que con los de eucariotas (Bosedasgupta *et al.*, 2008). La presencia de ferroquelatasa en la membrana interna mitocondrial, la última enzima de la ruta que añade el Fe a la protoporfirina IX (PPIX) para formar el hemo, explica que el hemo pueda ser sustituido por PPIX cuando se cultivan *Leishmanias* (van Meer *et al.*, 2006). Las propiedades químicas del grupo hemo hacen que su entrada a las células y su tráfico intracelular no pueda ser debida a procesos de difusión, como se ha pensado clásicamente, requiriendo un aporte de energía para su translocación (Ivens *et al.*, 2005). No

se conoce como se produce el tráfico de hemo en los parásitos, y las proteínas implicadas podrían ser atractivas dianas terapéuticas.

Implicación del transportador LABCG5 en el tráfico de hemo en *Leishmania*.

Una primera parte de nuestro trabajo consistió en el estudio de la implicación del transportador LABCG5 en el tráfico de hemo en *Leishmania donovani*.

Para la búsqueda de proteínas ABCG que pudieran estar implicadas en el tráfico de hemo, usamos como modelo el ABCG2 humano, un conocido transportador de porfirinas. Los análogos putativos se buscaron en la base de datos del genoma de *L. major*. El análisis de hidrofobicidad permitió seleccionar uno de los cinco genes ABCG, al que se denominó **LABCG5** de acuerdo con la reciente clasificación de Lephron y col., 2006 (Opperdoes and Coombs, 2007). Este transportador ABCG presentaba una inusual topología al poseer un dominio N-terminal extra (TMD0), que no está presente en ningún otro tripanosomátido. En eucariotes superiores sólo se ha descrito un dominio similar en un transportador de *Saccharomyces cerevisiae*, al que se ha denominado ADP1 (Chang and Chang, 1985).

LABCG5 codifica para una proteína de 1241 aminoácidos con un peso molecular estimado de 135 KDa. Se ha descrito que hay un homólogo en *T. cruzi* y 2 en *T. brucei* (Krishnamurthy *et al.*, 2007a). El estudio comparativo entre las zonas NBD-TMD solapantes de LABCG5 y las proteínas ABCG humanas mostraron una alta similitud con la proteína ABCG2 humana (49.7%), y una baja similitud con la proteína ABCG1 humana (36.7%). Además de la similitud de secuencias entre la proteína ABCG2 humana y LABCG5, también hay que mencionar que ambas proteínas son “*half transporters*” que requieren dimerizar para ser funcionales (Leprohon *et al.*, 2006; Purnelle *et al.*, 1991), y que poseen un motivo de dileucina (ExxxLL) (Leprohon *et al.*, 2006).

Para facilitar el estudio funcional de esta proteína se obtuvo un anticuerpo policlonal a partir de una proteína recombinante correspondiente a la región NBD de la proteína. Estudios de western blot utilizando lisados totales de *L.*

donovani mostraron que esta proteína se expresa constitutivamente, con un peso molecular de 135 KDa. Este tamaño, a diferencia del ABCG2 humano, sugiere que LABCG5 no se encuentra glicosilada (Smith *et al.*, 2002). Además, es la primera vez que en *Leishmania* spp. se describe una expresión constitutiva tan alta de un transportador ABC. Este hecho junto con el requerimiento de dimerización para ser funcional, permitió el uso de la estrategia de un dominante negativo para disminuir la función de LABCG5. Para ello primero clonamos el gen LABCG5 con sus regiones UTR 5' y 3'. Posteriormente, se introdujo una mutación en la posición 625 del marco abierto de lectura y se cambió una lisina por una metionina. Se sabe, que la lisina es crítica para que ocurra la hidrólisis del ATP en los transportadores ABC sin afectar sus propiedades de oligomerización (Bates *et al.*, 2001).

Se sabe, que los promastigotes de *Leishmania* cultivados *in vitro*, poseen un requerimiento de hemo que puede ser cubierta por hemo libre o unida a hemoglobina. El fenotipo del dominante negativo fue rescatado por la presencia de hemo libre y no hemo unido a la hemoglobina. Estos resultados sugieren que la proteína LABCG5 es requerida para la obtención intracelular de hemo liberado de la degradación de la hemoglobina. En efecto, la hemoglobina y el hemo siguen diferentes rutas, como se ha descrito en *T. cruzi* (Schmitz *et al.*, 2001). En promastigotes de *Leishmania* se ha sugerido que la hemoglobina es la fuente fisiológica de hemo. En estos parásitos la hemoglobina entra al interior celular por un proceso de endocitosis mediada por un receptor (Diop and Hrycyna, 2005; Ozvegy *et al.*, 2002), vía endosomas tempranos asociados a Rab5 y posteriormente, endosomas tardíos asociados a Rab7 (Lara *et al.*, 2007). Recientemente, se ha descrito que la degradación de hemoglobina es un proceso mediado por Rab7 (**Fig.14**) (Sengupta *et al.*, 1999).

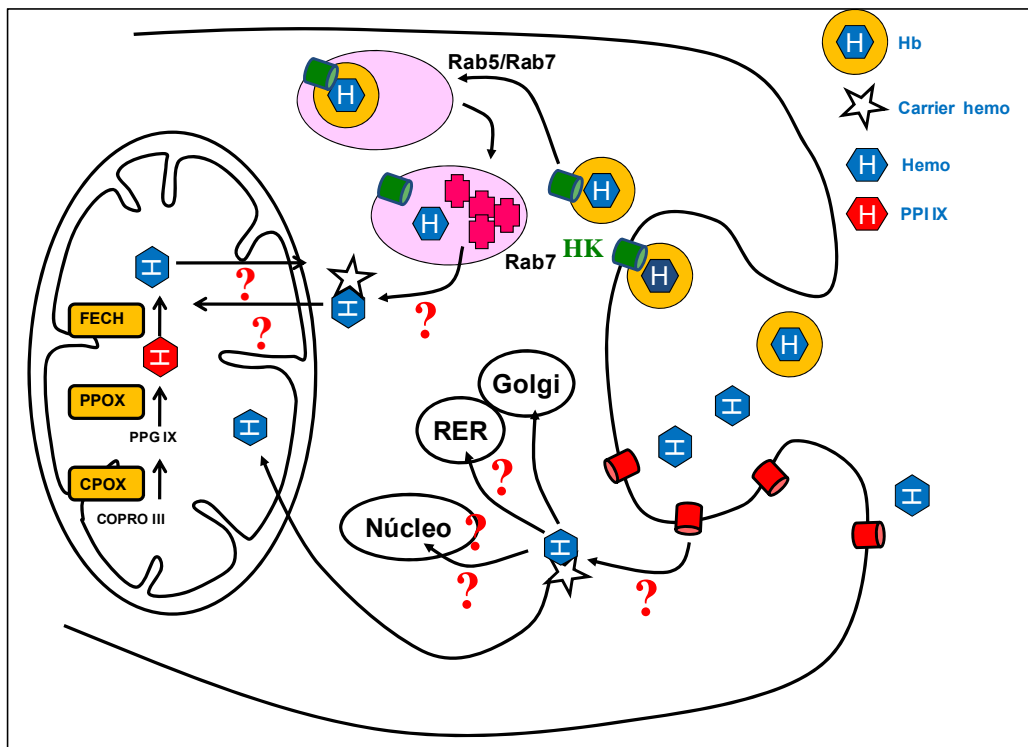


Figura 14 : La obtención de hemo en el estadio promastigote de *Leishmania sp.* depende de dos vías. La primera es la degradación de Hb via Rab5/Rab7 y la segunda por la entrada de hemo libre. Los signos de interrogación indican las vías del tráfico de hemo que se desconocen en la actualidad (Krishnamurthy *et al.*, 2005; Patel *et al.*, 2008; Sengupta *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2003).

Al mismo tiempo se verificó que este defecto en el crecimiento de la línea dominante negativa no fuese debido a un defecto en la endocitosis. Los resultados obtenidos usando dos marcadores de endocitosis (FM4-64 y esfingomielin) (Patel *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2003) mostraron que los parásitos dominantes negativos acumularon la misma cantidad de estos marcadores con respecto al control. Al mismo tiempo se evaluó si la exocitosis de esta línea celular se encontraba alterada y los resultados indicaron que tampoco es este proceso el responsable del retraso en el crecimiento de los parásitos dominantes negativos.

Son numerosas las evidencias que implican la participación de LABCG5 en el tráfico del hemo en *Leishmania*:

- i) parásitos dominantes negativos mostraron una significativa inhibición del crecimiento en medio suplementado con hemina libre ó cuando la sobreexpresión del gen fue eliminado.
- ii) al suplementar el medio con hemoglobina (metabolito suficiente para el normal crecimiento del parásito), no se obtuvo un rescate del fenotipo.
- iii) experimentos de pull down con hemina-agarosa precipitaron la proteína LABCG5; este resultado indicó que la interacción entre la hemina y este transportador está inhibida de una manera dependiente de concentraciones crecientes de hemina libre. Por último, se ha descrito que la proteína ABCG2 humana transporta porfirinas (Galbraith and McElrath, 1988; Vida and Emr, 1995) y presenta una significativa homología con la proteína LABCG5.

La proteína LABCG5 se encuentra localizada en una red vesicular que incluye estructuras multivesiculares, ubicadas entre el nucleo y el bolsillo flagelar. Esta red vesicular corresponde a la estructura endomas tardios/lisosomas (Perez-Victoria *et al.*, 2003a) que es la ruta por donde es llevada la hemoglobina para su degradación. Estos resultados sugieren, que la localización de LABCG5 podría promover la liberación al citoplasma del hemo generado a partir de la degradación de la hemoglobina. Interesantemente, LABCG5 posee una señal de dimeros de dileucina similar al descrito en todas las proteínas ABCG humanas y las proteínas White, Brown and Scarlet de *D. melanogaster* (Jonker *et al.*, 2002). Esta señal podría promover el sorting adecuado desde el aparato de Golgi vía lisosomas y endosomas (Krishnamurthy *et al.*, 2004) a través del reconocimiento del complejo adaptador denominado AP. Este complejo adaptador AP es un componente clave de los mecanismos involucrados en el transporte de las proteínas de membranas (Weise *et al.*, 2000).

Implicación del transportador LABCG1 en el proceso de infección de macrófagos peritoneales por *Leishmania*.

El siguiente objetivo de este trabajo fue el estudio de un segundo gen ABCG de *Leishmania* denominado LABCG1. Los resultados indicaron que esta proteína está involucrada en la exposición de la PS endógena hacia la cara externa de la membrana plásmática del parásito. La inactivación de LABCG1 disminuye significativamente la capacidad infectiva en la línea dominante negativa. Los factores que afectan la virulencia en *Leishmania* representan un atractivo blanco para el diseño de nuevos fármacos. Se ha demostrado que los amastigotes intracelulares de *Leishmania* invaden macrófagos no infectados al exponer PS en su superficie celular (Bonifacino and Traub, 2003; Robinson and Bonifacino, 2001; Schmitz *et al.*, 2001) y los promastigotes en la fase estacionaria de crecimiento contienen cantidades significativamente altas de PS en la cara externa de la membrana (Wanderley *et al.*, 2005).

Para la búsqueda de proteínas ABCG que pudieran estar implicadas en los procesos de infectividad en *Leishmania*, usamos también como modelo el ABCG2 humano, un transportador de PS (de Freitas Balanco *et al.*, 2001). Los análogos putativos se buscaron en la base de datos del genoma de *L. major*. El análisis de hidrofobicidad permitió seleccionar tres de los cinco genes ABCG, que se encuentra triplicados en el genoma de *Leishmania spp* y que se han denominado, LABCG1, LABCG2 y LABCG3 de acuerdo a la reciente clasificación de Lephron y col., 2006 (Wanderley *et al.*, 2006). Cabe destacar que en la base de datos de *Leishmania* LABCG3 está descrito como un pseudogen. Recientes estudios utilizando RT-PCR en tiempo real mostraron que los genes LABCG1, LABCG2 y LABCG3 se expresan constitutivamente tanto en promastigotes como en amastigotes axénicos (Tripathi and Gupta, 2003). Este hecho junto con el requerimiento de dimerización para ser funcional, permitió el uso de la estrategia de un dominante negativo para disminuir la función de LABCG1. Para ello primero clonamos el gen LABCG1 con sus regiones 5' y 3' UTR. Posteriormente, se introdujo una mutación en la posición 108 del marco abierto de lectura y se cambió una lisina por una metionina. Como se mencionó anteriormente, esta mutación inhibe la hidrólisis

de ATP, pero mantiene las propiedades de heterodimerización (Woehlecke *et al.*, 2003).

LABCG1 codifica para una proteína de 633 aminoácidos con un peso molecular estimado de 72 KDa. Se ha descrito que hay un homólogo en *T. cruzi* y 2 en *T. brucei* (Leprohon *et al.*, 2006). El estudio comparativo entre las zonas NBD-TMD de LABCG1 y las proteínas ABCG humanas mostraron una alta similitud con la proteína ABCG2 humana (49.3%), y la más baja fue con la proteína ABCG1 humana (38.9%). Sumado a esta similitud de secuencias entre la proteína ABCG2 humana y LABCG1, también hay que mencionar que ambas proteínas son “hemi-transportadores” que requieren dimerizar para ser funcionales (Bosedasgupta *et al.*, 2008; Ozvegy *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que LABCG1 está involucrado en la translocación de PS y que la inactivación de esta proteína reduce significativamente en el proceso de infección en *Leishmania*:

- i) LABCG1 pertenece a la misma subfamilia que la proteína humana ABCG2, la cual transporta PS (Leprohon *et al.*, 2006).
- ii) LABCG1 transporta el análogo de fosfolípido NBD-PS y la PS endógena.
- iii) El porcentaje de células apoptóticas en la línea dominante negativa y control fueron muy bajas, lo que indicó que los parásitos que exponen PS son viables.
- iv) La línea dominante negativa para LABCG1 mostró una significativa inhibición en el índice de infectividad con respecto a células controles.
- v) Cuando los experimentos de infecciones fueron realizados usando anexina V, el índice de infectividad en parásitos dominantes negativos no cambió. Este resultado es consistente con el hecho de que los parásitos dominantes negativos tienen afectados el proceso de externalización de PS y este es uno de los factores requeridos para que ocurra el proceso de infección en macrófagos peritoneales. Por el contrario, cuando se evaluó el índice de infectividad en parásitos que presentaban la proteína ABCG5 inactivada no se obtuvieron

diferencias en este parámetro entre la línea celular dominante negativo y el control.

La influencia de la modificación en la asimetría de la membrana sobre el parámetro de infectividad ha sido estudiada en nuestro laboratorio a través de la sobreexpresión de transportadores ABC. Hemos demostrado que líneas de *Leishmania* que sobreexpresan LABC1.1 y LABCA2 presentaban una significativa disminución en el índice de infectividad que se relacionó con la modificación del tráfico vesicular (Bates *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2002). En cambio, experimentos usando un “mutante nulo” para la aminofosfolípido translocasa de *Leishmania* (LdMT) (Woehlecke *et al.*, 2003) mostró que la falta de este transportador no cambió el índice de infectividad con respecto a los parásitos controles (Parodi-Talice *et al.*, 2003).

Esta característica, de exponer PS y recrear una condición de falsa apoptosis, parece ser muy importante en el establecimiento de *Leishmania* dentro de su hospedador (Araujo-Santos *et al.*, 2005). En este contexto, se han planteado dos explicaciones para la capacidad de *Leishmania* de exponer PS. La primera teoría plantea que la exposición de PS es parte de una muerte programada y los parásitos positivos para PS son los más infectivos, y una vez dentro del macrófago, estos deberían sobrevivir a la muerte dentro del ambiente ácido del fagolisosoma. Si por el contrario, las formas infectivas son las que no exponen PS en la cara externa de la membrana, serían las formas positivas para PS las que facilitarían la infectividad, de una manera altruista (Perez-Victoria *et al.*, 2003b). En ambas situaciones, la exposición de PS, con la consecuente inactivación del macrófago, es relevante para el fenotipo de persistencia en el hospedador por parte de *Leishmania* (Seifert *et al.*, 2007).

CONCLUSIONES

1. Se han aislado los genes *LABCG1* y *LABCG5* de *Leishmania major*, que codifican dos proteínas pertenecientes a la subfamilia de “half-transporters” ABCG/WHITE. El gen *LABCG1* se encuentra duplicado en el cromosoma 6 mientras que el gen *LABCG5* es de copia única y se localiza en el cromosoma 23.
2. El gen *LABCG5* se expresa constitutivamente y la proteína que codifica presenta una significativa homología con el transportador de porfirinas humano ABCG2. Además, *LABCG5* contiene un dominio transmembrana N-terminal ausente en todas las proteínas ABCG de mamíferos.
3. La sobreexpresión de un mutante inactivo de *LABCG5* produce un fenotipo dominante negativo caracterizado por una significativa disminución del crecimiento de los parásitos. Este fenotipo puede ser rescatado al eliminar la sobreexpresión de la proteína mutada o al suplementar con hemina libre, pero no al añadir hemo en forma de hemoglobina.
4. La proteína *LABCG5* puede ser precipitada por cromatografía de afinidad con hemina-agarosa. Esta interacción se puede interferir mediante la adición de dosis crecientes de hemina libre.
5. *LABCG5* se localiza en cuerpos multivesiculares y en otras vesículas asociadas, probablemente de naturaleza endolisosomal, entre el bolsillo flagelar y el núcleo.
6. La sobreexpresión de un mutante inactivo de *LABCG1* produce un fenotipo dominante negativo caracterizado por una disminución en la translocación de análogos fluorescentes de fosfatidilserina. *LABCG1* reconoce específicamente el grupo polar de este fosfolípido dado que los parásitos dominantes negativos para este transportador no muestran

ninguna disminución en la internalización de análogos de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina o esfingomiélin.

7. Los parásitos dominantes negativos para LABCG1 en fase estacionaria exponen menos fosfatidilserina endógena en la cara externa de la membrana con respecto a los controles.
8. La menor externalización de fosfatidilserina en los parásitos dominantes negativos para LABCG1 se correlaciona con una menor capacidad para infectar macrófagos peritoneales de ratón. Estas diferencias con los parásitos controles desaparecen al enmascarar con Anexina-V la fosfatidilserina expuesta en la superficie del parásito.
9. La sobreexpresión de LABCG1 y LABCG5 no confiere resistencia a diferentes fármacos leishmanicidas.

BIBLIOGRAFIA

- Ahmed-Belkacem, A., Pozza, A., Munoz-Martinez, F., Bates, S.E., Castanys, S., Gamarro, F., Di Pietro, A., and Perez-Victoria, J.M. (2005) Flavonoid structure-activity studies identify 6-prenylchrysin and tectochrysin as potent and specific inhibitors of breast cancer resistance protein ABCG2. *Cancer Res* **65**: 4852-4860.
- Akilov, O.E., Kosaka, S., O'Riordan, K., and Hasan, T. (2007) Parasiticidal effect of delta-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis is indirect and mediated through the killing of the host cells. *Exp Dermatol* **16**: 651-660.
- Alexander, J., Satoskar, A.R., and Russell, D.G. (1999) Leishmania species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci* **112 Pt 18**: 2993-3002.
- Alvar, J., Croft, S., and Olliaro, P. (2006a) Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Adv Parasitol* **61**: 223-274.
- Alvar, J., Yactayo, S., and Bern, C. (2006b) Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol*.
- Alvarez, F., Robello, C., and Vignali, M. (1994) Evolution of codon usage and base contents in kinetoplastid protozoans. *Mol Biol Evol* **11**: 790-802.
- Allen, J.D., Jackson, S.C., and 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., and 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.
- Ambudkar, S.V., Kim, I.W., and 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., and 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., and Allikmets, R. (2001) Human and mouse orthologs of a new ATP-binding cassette gene, ABCG4. *Cytogenet Cell Genet* **94**: 196-201.
- 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.
- Arrebola, R., Olmo, A., Reche, P., Garvey, E.P., Santi, D.V., Ruiz-Perez, L.M., and 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.
- Ashutosh, Sundar, S., and Goyal, N. (2007) Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. *J Med Microbiol* **56**: 143-153.
- Baird, J.K., and Rieckmann, K.H. (2003) Can primaquine therapy for vivax malaria be improved? *Trends Parasitol* **19**: 115-120.

- Barcinski, M.A., Moreira, M.E., Balanco, J.M., Wanderley, J.L., and Bonomo, A.C. (2003) The role of apoptotic mimicry in host-parasite interplay: is death the only alternative for altruistic behavior? *Kinetoplastid Biol Dis* **2**: 6.
- Bastien, P., Blaineau, C., and Pages, M. (1992) Molecular karyotype analysis in *Leishmania*. *Subcell Biochem* **18**: 131-187.
- Bates, P.A., Hermes, I., and Dwyer, D.M. (1989) *Leishmania donovani*: immunochemical localization and secretory mechanism of soluble acid phosphatase. *Exp Parasitol* **68**: 335-346.
- Bates, S.E., Robey, R., Miyake, K., Rao, K., Ross, D.D., and Litman, T. (2001) The role of half-transporters in multidrug resistance. *J Bioenerg Biomembr* **33**: 503-511.
- Beach, D.H., Holz, G.G., Jr., and Anekwe, G.E. (1979) Lipids of *Leishmania promastigotes*. *J Parasitol* **65**: 201-216.
- Berge, K.E., Tian, H., Graf, G.A., Yu, L., Grishin, N.V., Schultz, J., Kwiterovich, P., Shan, B., Barnes, R., and Hobbs, H.H. (2000) Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* **290**: 1771-1775.
- Berriman, M., and Ghedin, E., and Hertz-Fowler, C., and Blandin, G., and Renauld, H., and Bartholomeu, D.C., and Lennard, N.J., and Caler, E., and Hamlin, N.E., and Haas, B., and Bohme, U., and Hannick, L., and Aslett, M.A., and Shallom, J., and Marcello, L., and Hou, L., and Wickstead, B., and Alsmark, U.C., and Arrowsmith, C., and Atkin, R.J., and Barron, A.J., and Bringaud, F., and Brooks, K., and Carrington, M., and Cherevach, I., and Chillingworth, T.J., and Churcher, C., and Clark, L.N., and Corton, C.H., and Cronin, A., and Davies, R.M., and Doggett, J., and Djikeng, A., and Feldblyum, T., and Field, M.C., and Fraser, A., and Goodhead, I., and Hance, Z., and Harper, D., and Harris, B.R., and Hauser, H., and Hostetler, J., and Ivens, A., and Jagels, K., and Johnson, D., and Johnson, J., and Jones, K., and Kerhornou, A.X., and Koo, H., and Larke, N., and Landfear, S., and Larkin, C., and Leech, V., and Line, A., and Lord, A., and Macleod, A., and Mooney, P.J., and Moule, S., and Martin, D.M., and Morgan, G.W., and Mungall, K., and Norbertczak, H., and Ormond, D., and Pai, G., and Peacock, C.S., and Peterson, J., and Quail, M.A., and Rabinowitsch, E., and Rajandream, M.A., and Reitter, C., and Salzberg, S.L., and Sanders, M., and Schobel, S., and Sharp, S., and Simmonds, M., and Simpson, A.J., and Tallon, L., and Turner, C.M., and Tait, A., and Tivey, A.R., and Van Aken, S., and Walker, D., and Wanless, D., and Wang, S., and White, B., and White, O., and Whitehead, S., and Woodward, J., and Wortman, J., and Adams, M.D., and Embley, T.M., and Gull, K., and Ullu, E., and Barry, J.D., and Fairlamb, A.H., and Opperdoes, F., and Barrell, B.G., and Donelson, J.E., and Hall, N., and Fraser, C.M., and Melville, S.E., and El-Sayed, N.M. (2005) The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* **309**: 416-422.
- Beverley, S.M., Coderre, J.A., Santi, D.V., and 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., Ellenberger, T.E., and Cordingley, J.S. (1986) Primary structure of the gene encoding the bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase of *Leishmania major*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 2584-2588.
- Beverley, S.M. (1991) Gene amplification in *Leishmania*. *Annu Rev Microbiol* **45**: 417-444.

- Bevers, E.M., Comfurius, P., van Rijn, J.L., Hemker, H.C., and 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., and 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.
- Bonifacino, J.S., and Traub, L.M. (2003) Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* **72**: 395-447.
- Borges-Walmsley, M.I., and Walmsley, A.R. (2001) The structure and function of drug pumps. *Trends Microbiol* **9**: 71-79.
- Bosedasgupta, S., Ganguly, A., Roy, A., Mukherjee, T., and Majumder, H.K. (2008) A novel ATP-binding cassette transporter, ABCG6 is involved in chemoresistance of Leishmania. *Mol Biochem Parasitol* **158**: 176-188.
- Bratton, D.L., Fadok, V.A., Richter, D.A., Kailey, J.M., Guthrie, L.A., and 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.
- Bray, P.G., Barrett, M.P., Ward, S.A., and de Koning, H.P. (2003) Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends Parasitol* **19**: 232-239.
- Campbell, D.A., Thomas, S., and Sturm, N.R. (2003) Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes Infect* **5**: 1231-1240.
- Campos J, C.S., Gamarro F and Pérez-Victoria JM. *Sometido a revisión en PNAS*.
- Carter, N.S., Yates, P., Arendt, C.S., Boitz, J.M., and Ullman, B. (2008) Purine and pyrimidine metabolism in Leishmania. *Adv Exp Med Biol* **625**: 141-154.
- Castanys-Munoz, E., Alder-Baerens, N., Pomorski, T., Gamarro, F., and 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* **64**: 1141-1153.
- Cavazzuti, A., Paglietti, G., Hunter, W.N., Gamarro, F., Piras, S., Loriga, M., Allecca, S., Corona, P., McLuskey, K., Tulloch, L., Gibellini, F., Ferrari, S., and Costi, M.P. (2008) Discovery of potent pteridine reductase inhibitors to guide antiparasite drug development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 1448-1453.
- Cavelier, C., Lorenzi, I., Rohrer, L., and von Eckardstein, A. (2006) Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. *Biochim Biophys Acta* **1761**: 655-666.
- Clayton, C., and Shapira, M. (2007) Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol Biochem Parasitol* **156**: 93-101.
- Clayton, C.E. (2002) Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *Embo J* **21**: 1881-1888.
- Coderre, J.A., Beverley, S.M., Schimke, R.T., and Santi, D.V. (1983) Overproduction of a bifunctional thymidylate synthetase-dihydrofolate reductase and DNA amplification in methotrexate-resistant Leishmania tropica. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 2132-2136.
- Coelho, A.C., Beverley, S.M., and 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., and 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., and 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., 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., Seifert, K., and Yardley, V. (2006) Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res* **123**: 399-410.
- Croop, J.M., Tiller, G.E., Fletcher, J.A., Lux, M.L., Raab, E., Goldenson, D., Son, D., Arciniegas, S., and Wu, R.L. (1997) Isolation and characterization of a mammalian homolog of the Drosophila white gene. *Gene* **185**: 77-85.
- Cruz, A.K., and Tosi, L.R. (1996) Molecular biology. *Clin Dermatol* **14**: 533-540.
- Cserepes, J., Szentpetery, Z., Seres, L., Ozvegy-Laczka, C., Langmann, T., Schmitz, G., Glavinas, H., Klein, I., Homolya, L., Varadi, A., Sarkadi, B., and 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.
- Chang, C.S., and Chang, K.P. (1985) Heme requirement and acquisition by extracellular and intracellular stages of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol Biochem Parasitol* **16**: 267-276.
- Chang, G., and 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., and Chen, A.P. (2006) Retraction. *Science* **314**: 1875.
- Chen, H., Rossier, C., Lalioti, M.D., Lynn, A., Chakravarti, A., Perrin, G., and 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., and Gamarro, F. (1998) Altered drug membrane permeability in a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line. *Biochem Pharmacol* **55**: 131-139.
- Chow, L.M., Wong, A.K., Ullman, B., and 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.
- da Silva, R., and Sacks, D.L. (1987) Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania promastigote* virulence and attenuation. *Infect Immun* **55**: 2802-2806.
- Daleke, D.L., and 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., and 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., and Castanys, S. (1996) Molecular characterization of a P-glycoprotein-related *tcpgp2* gene in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* **75**: 145-157.

- Davidson, A.L., and Chen, J. (2005) Structural biology. Flipping lipids: is the third time the charm? *Science* **308**: 963-965.
- Davidson, A.L., and Maloney, P.C. (2007) ABC transporters: how small machines do a big job. *Trends Microbiol* **15**: 448-455.
- Dawson, R.J., and Locher, K.P. (2006) Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* **443**: 180-185.
- de Bruin, M., Miyake, K., Litman, T., Robey, R., and Bates, S.E. (1999) Reversal of resistance by GF120918 in cell lines expressing the ABC half-transporter, MXR. *Cancer Lett* **146**: 117-126.
- de Freitas Balanco, J.M., Moreira, M.E., Bonomo, A., Bozza, P.T., Amarante-Mendes, G., Pirmez, C., and 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., Hamon, Y., and Chimini, G. (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* **42**: 1007-1017.
- Devaux, P.F., Lopez-Montero, I., and Bryde, S. (2006) Proteins involved in lipid translocation in eukaryotic cells. *Chem Phys Lipids* **141**: 119-132.
- Diop, N.K., and 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., and Moreno, S.N. (2001) The acidocalcisome. *Mol Biochem Parasitol* **114**: 151-159.
- Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P., and 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., and 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, L.A., Yang, W., Abruzzo, L.V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A.K., and 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.
- Doyle, L.A., and Ross, D.D. (2003) Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* **22**: 7340-7358.
- Doyle, P.S., and Dwyer, D.M. (1993) Leishmania: immunochemical comparison of the secretory (extracellular) acid phosphatases from various species. *Exp Parasitol* **77**: 435-444.
- Dunn, L.L., Rahmanto, Y.S., and Richardson, D.R. (2007) Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends Cell Biol* **17**: 93-100.
- Dutta, S., Furuyama, K., Sassa, S., and Chang, K.P. (2008) Leishmania spp.: Delta-aminolevulinic acid-inducible neogenesis of porphyria by genetic complementation of incomplete heme biosynthesis pathway. *Exp Parasitol* **118**: 629-636.
- El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Bartholomeu, D.C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A.N., Ghedin, E., Worthey, E.A., Delcher, A.L., Blandin, G., Westenberger, S.J., Caler, E., Cerqueira, G.C., Branche, C., Haas, B., Anupama, A., Arner, E., Aslund, L., Attipoe, P., Bontempi, E., Bringaud, F., Burton, P., Cadag, E., Campbell, D.A., Carrington, M., Crabtree, J., Darban, H., da Silveira, J.F., de Jong, P., Edwards, K., Englund, P.T., Fazelina, G., Feldblyum, T., Ferella, M.,

- Frasch, A.C., Gull, K., Horn, D., Hou, L., Huang, Y., Kindlund, E., Klingbeil, M., Kluge, S., Koo, H., Lacerda, D., Levin, M.J., Lorenzi, H., Louie, T., Machado, C.R., McCulloch, R., McKenna, A., Mizuno, Y., Mottram, J.C., Nelson, S., Ochaya, S., Osoegawa, K., Pai, G., Parsons, M., Pentony, M., Pettersson, U., Pop, M., Ramirez, J.L., Rinta, J., Robertson, L., Salzberg, S.L., Sanchez, D.O., Seyler, A., Sharma, R., Shetty, J., Simpson, A.J., Sisk, E., Tammi, M.T., Tarleton, R., Teixeira, S., Van Aken, S., Vogt, C., Ward, P.N., Wickstead, B., Wortman, J., White, O., Fraser, C.M., Stuart, K.D., and Andersson, B. (2005) The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* **309**: 409-415.
- El Fadili, K., Messier, N., Leprohon, P., Roy, G., Guimond, C., Trudel, N., Saravia, N.G., Papadopoulou, B., Legare, D., and 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.
- Engel, T., Kannenberg, F., Fobker, M., Nofer, J.R., Bode, G., Lueken, A., Assmann, G., and 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., Bratton, D.L., Rose, D.M., Pearson, A., Ezekewitz, R.A., and Henson, P.M. (2000) A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* **405**: 85-90.
- Fadok, V.A., and 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.
- Galbraith, R.A., and McElrath, M.J. (1988) Heme binding to *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol Biochem Parasitol* **29**: 47-53.
- Galy, V., Askjaer, P., Franz, C., Lopez-Iglesias, C., and Mattaj, I.W. (2006) MEL-28, a novel nuclear-envelope and kinetochore protein essential for zygotic nuclear-envelope assembly in *C. elegans*. *Curr Biol* **16**: 1748-1756.
- Ganguly, N.K. (2002) Oral miltefosine may revolutionize treatment of visceral leishmaniasis. *TDR News* 68.
- Ghannoum, M.A., and Rice, L.B. (1999) Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* **12**: 501-517.
- Gottesman, M.M., and Pastan, I. (1993) Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* **62**: 385-427.
- 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.
- Grimaldi, G., Jr., Tesh, R.B., and McMahan-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., and 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.

- Haile, S., and Papadopoulou, B. (2007) Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol* **10**: 569-577.
- Handman, E. (2001) Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev* **14**: 229-243.
- Handman, E., and Bullen, D.V. (2002) Interaction of Leishmania with the host macrophage. *Trends Parasitol* **18**: 332-334.
- Hardwick, L.J., Velamakanni, S., and van Veen, H.W. (2007) The emerging pharmacotherapeutic significance of the breast cancer resistance protein (ABCG2). *Br J Pharmacol*.
- Henderson, D.M., Sifri, C.D., Rodgers, M., Wirth, D.F., Hendrickson, N., and 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., and Ullman, B. (1993) Molecular characterization of the ldmdr1 multidrug resistance gene from Leishmania donovani. *Mol Biochem Parasitol* **60**: 53-64.
- Henriques, C., and 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., and 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., and Linton, K.J. (2004) The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 918-926.
- Hoekstra, M., Kruijt, J.K., Van Eck, M., and 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.
- Hollenstein, K., Dawson, R.J., and Locher, K.P. (2007) Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Curr Opin Struct Biol* **17**: 412-418.
- Honjo, Y., Hrycyna, C.A., Yan, Q.W., Medina-Perez, W.Y., Robey, R.W., van de Laar, A., Litman, T., Dean, M., and 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.
- Hua, Z., Fatheddin, P., and 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., and 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., and 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., and 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., and 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., and McConville, M.J. (2001) Function and assembly of the *Leishmania* surface coat. *Int J Parasitol* **31**: 899-908.
- Ivens, A.C., and Peacock, C.S., and Worthey, E.A., and Murphy, L., and Aggarwal, G., and Berriman, M., and Sisk, E., and Rajandream, M.A., and Adlem, E., and Aert, R., and Anupama, A., and Apostolou, Z., and Attipoe, P., and Bason, N., and Bauser, C., and Beck, A., and Beverley, S.M., and Bianchetti, G., and Borzym, K., and Bothe, G., and Bruschi, C.V., and Collins, M., and Cadag, E., and Ciarloni, L., and Clayton, C., and Coulson, R.M., and Cronin, A., and Cruz, A.K., and Davies, R.M., and De Gaudenzi, J., and Dobson, D.E., and Duesterhoeft, A., and Fazelina, G., and Fosker, N., and Frasch, A.C., and Fraser, A., and Fuchs, M., and Gabel, C., and Goble, A., and Goffeau, A., and Harris, D., and Hertz-Fowler, C., and Hilbert, H., and Horn, D., and Huang, Y., and Klages, S., and Knights, A., and Kube, M., and Larke, N., and Litvin, L., and Lord, A., and Louie, T., and Marra, M., and Masuy, D., and Matthews, K., and Michaeli, S., and Mottram, J.C., and Muller-Auer, S., and Munden, H., and Nelson, S., and Norbertczak, H., and Oliver, K., and O'Neil, S., and Pentony, M., and Pohl, T.M., and Price, C., and Purnelle, B., and Quail, M.A., and Rabinowitsch, E., and Reinhardt, R., and Rieger, M., and Rinta, J., and Robben, J., and Robertson, L., and Ruiz, J.C., and Rutter, S., and Saunders, D., and Schafer, M., and Schein, J., and Schwartz, D.C., and Seeger, K., and Seyler, A., and Sharp, S., and Shin, H., and Sivam, D., and Squares, R., and Squares, S., and Tosato, V., and Vogt, C., and Volckaert, G., and Wambutt, R., and Warren, T., and Wedler, H., and Woodward, J., and Zhou, S., and Zimmermann, W., and Smith, D.F., and Blackwell, J.M., and Stuart, K.D., and Barrell, B., and Myler, P.J. (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* **309**: 436-442.
- 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., and 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.
- Kabe, Y., Ohmori, M., Shinouchi, K., Tsuboi, Y., Hirao, S., Azuma, M., Watanabe, H., Okura, I., and Handa, H. (2006) Porphyrin accumulation in mitochondria is mediated by 2-oxoglutarate carrier. *J Biol Chem* **281**: 31729-31735.
- Kage, K., Tsukahara, S., Sugiyama, T., Asada, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T., and 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.
- Kamhawi, S. (2006) Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol* **22**: 439-445.
- Kelly, J.X., Ignatushchenko, M.V., Bouwer, H.G., Peyton, D.H., Hinrichs, D.J., Winter, R.W., and Riscoe, M. (2003) Antileishmanial drug development: exploitation of parasite heme dependency. *Mol Biochem Parasitol* **126**: 43-49.
- 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., and 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.
- Kennedy, M.L., Cortes-Selva, F., Perez-Victoria, J.M., Jimenez, I.A., Gonzalez, A.G., Munoz, O.M., Gamarro, F., Castanys, S., and Ravelo, A.G. (2001b) 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-Ozcurumez, M., Liebisch, G., Kapinsky, M., Diederich, W., Drobnik, W., Dean, M., Allikmets, R., and 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., and Matsuo, M. (2006) Efflux of sphingomyelin, cholesterol, and phosphatidylcholine by ABCG1. *J Lipid Res* **47**: 1791-1802.
- Koster, W. (2001) ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Res Microbiol* **152**: 291-301.
- Krauth-Siegel, R.L., Meiering, S.K., and Schmidt, H. (2003) The parasite-specific trypanothione metabolism of trypanosoma and leishmania. *Biol Chem* **384**: 539-549.
- Krishnamurthy, G., Vikram, R., Singh, S.B., Patel, N., Agarwal, S., Mukhopadhyay, G., Basu, S.K., and Mukhopadhyay, A. (2005) Hemoglobin receptor in *Leishmania* is a hexokinase located in the flagellar pocket. *J Biol Chem* **280**: 5884-5891.
- Krishnamurthy, P., Ross, D.D., Nakanishi, T., Bailey-Dell, K., Zhou, S., Mercer, K.E., Sarkadi, B., Sorrentino, B.P., and 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., and Schuetz, J.D. (2006) Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **46**: 381-410.
- Krishnamurthy, P., Xie, T., and Schuetz, J.D. (2007a) The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis. *Pharmacol Ther*.
- Krishnamurthy, P., Xie, T., and Schuetz, J.D. (2007b) The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis. *Pharmacol Ther* **114**: 345-358.
- Kusuhara, H., and Sugiyama, Y. (2006) ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family). *Pflugers Arch*.
- Kusuhara, H., and Sugiyama, Y. (2007) ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family). *Pflugers Arch* **453**: 735-744.
- Landfear, S.M., and Ignatushchenko, M. (2001) The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* **115**: 1-17.
- Lara, F.A., Sant'anna, C., Lemos, D., Laranja, G.A., Coelho, M.G., Reis Salles, I., Michel, A., Oliveira, P.L., Cunha, E.S.N., Salmon, D., and Paes, M.C. (2007) Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochem Biophys Res Commun* **355**: 16-22.
- 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.

- Laskay, T., van Zandbergen, G., and Solbach, W. (2003) Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol* **11**: 210-214.
- Latunde-Dada, G.O., Simpson, R.J., and McKie, A.T. (2006) Recent advances in mammalian haem transport. *Trends Biochem Sci* **31**: 182-188.
- Leandro, C., and Campino, L. (2003) Leishmaniasis: efflux pumps and chemoresistance. *Int J Antimicrob Agents* **22**: 352-357.
- LeBowitz, J.H., Smith, H.Q., Rusche, L., and 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., and Patel, S.B. (2001) Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nat Genet* **27**: 79-83.
- Legare, D., Cayer, S., Singh, A.K., Richard, D., Papadopoulou, B., and Ouellette, M. (2001) ABC proteins of *Leishmania*. *J Bioenerg Biomembr* **33**: 469-474.
- 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.
- Lill, R., and Kispal, G. (2000) Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem Sci* **25**: 352-356.
- Linton, K.J., and Higgins, C.F. (1998) The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol Microbiol* **28**: 5-13.
- Lodge, R., and Descoteaux, A. (2005) Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. *Clin Immunol* **114**: 256-265.
- Loo, T.W., and Clarke, D.M. (2005) Recent progress in understanding the mechanism of P-glycoprotein-mediated drug efflux. *J Membr Biol* **206**: 173-185.
- Lopez-Barneo, J., and Castellano, A. (2005) Multiple facets of maxi-k⁺ channels: the heme connection. *J Gen Physiol* **126**: 1-5.
- Lorkowski, S., Kratz, M., Wenner, C., Schmidt, R., Weitkamp, B., Fobker, M., Reinhardt, J., Rauterberg, J., Galinski, E.A., and 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., and 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., and 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.
- Lukes, J., Hashimi, H., and Zikova, A. (2005) Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. *Curr Genet* **48**: 277-299.
- Lux, H., Heise, N., Klenner, T., Hart, D., and 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.
- Maliapaard, 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., and Schellens, J.H. (2001)

- Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res* **61**: 3458-3464.
- Martinez-Calvillo, S., Yan, S., Nguyen, D., Fox, M., Stuart, K., and Myler, P.J. (2003) Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol Cell* **11**: 1291-1299.
- Martinez-Calvillo, S., Nguyen, D., Stuart, K., and Myler, P.J. (2004) Transcription initiation and termination on *Leishmania major* chromosome 3. *Eukaryot Cell* **3**: 506-517.
- Maser, P., and Kaminsky, R. (1998) Identification of three ABC transporter genes in *Trypanosoma brucei* spp. *Parasitol Res* **84**: 106-111.
- Mbongo, N., Loiseau, P.M., Billion, M.A., and Robert-Gero, M. (1998) Mechanism of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 352-357.
- McConville, M.J., and 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., and Teasdale, R.D. (2002) Secretory pathway of trypanosomatid parasites. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 122-154; table of contents.
- McConville, M.J., de Souza, D., Saunders, E., Likic, V.A., and Naderer, T. (2007) Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania amastigotes*. *Trends Parasitol* **23**: 368-375.
- McDevitt, C.A., Collins, R.F., Conway, M., Modok, S., Storm, J., Kerr, I.D., Ford, R.C., and Callaghan, R. (2006) Purification and 3D structural analysis of oligomeric human multidrug transporter ABCG2. *Structure* **14**: 1623-1632.
- Melby, P.C. (2002) Vaccination against cutaneous leishmaniasis: current status. *Am J Clin Dermatol* **3**: 557-570.
- Menon, A.K. (2002) Introduction: lipid transport--an overview. *Semin Cell Dev Biol* **13**: 159-162.
- Michels, P.A., Hannaert, V., and Bringaud, F. (2000) Metabolic aspects of glycosomes in trypanosomatidae - new data and views. *Parasitol Today* **16**: 482-489.
- Mishra, J., Saxena, A., and Singh, S. (2007) Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. *Curr Med Chem* **14**: 1153-1169.
- Mittal, M.K., Rai, S., Ashutosh, Ravinder, Gupta, S., Sundar, S., and Goyal, N. (2007) Characterization of natural antimony resistance in *leishmania donovani* isolates. *Am J Trop Med Hyg* **76**: 681-688.
- Miyake, K., Mickley, L., Litman, T., Zhan, Z., Robey, R., Cristensen, B., Brangi, M., Greenberger, L., Dean, M., Fojo, T., and 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.
- Morisaki, K., Robey, R.W., Ozvegy-Laczka, C., Honjo, Y., Polgar, O., Steadman, K., Sarkadi, B., and Bates, S.E. (2005) Single nucleotide polymorphisms modify the transporter activity of ABCG2. *Cancer Chemother Pharmacol* **56**: 161-172.
- Mosser, D.M., and 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., and 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.
- Mukhopadhyay, S., and Mandal, C. (2006) Glycobiology of *Leishmania donovani*. *Indian J Med Res* **123**: 203-220.
- Mullin, K.A., Foth, B.J., Ilgoutz, S.C., Callaghan, J.M., Zawadzki, J.L., McFadden, G.I., and 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.
- Muskus, C.E., and Marin Villa, M. (2002) [Metacyclogenesis: a basic process in the biology of *Leishmania*]. *Biomedica* **22**: 167-177.
- 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., and 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., and 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., and 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.
- Opperdoes, F.R. (1987) Topogenesis of glycolytic enzymes in *Trypanosoma brucei*. *Biochem Soc Symp* **53**: 123-129.
- Opperdoes, F.R., and Coombs, G.H. (2007) Metabolism of *Leishmania*: proven and predicted. *Trends Parasitol* **23**: 149-158.
- Ouellette, M., Fase-Fowler, F., and 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., and 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., and Papadopoulou, B. (1998b) ABC transporters in *Leishmania* and their role in drug resistance. *Drug Resist Updat* **1**: 43-48.
- Ouellette, M. (2001) Biochemical and molecular mechanisms of drug resistance in parasites. *Trop Med Int Health* **6**: 874-882.
- Ouellette, M., Olivier, M., Sato, S., and Papadopoulou, B. (2003) [Studies on the parasite *Leishmania* in the post-genomic era]. *Med Sci (Paris)* **19**: 900-909.
- Ouellette, M., Drummel-Smith, J., and Papadopoulou, B. (2004) Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Updat* **7**: 257-266.
- Overath, P., Stierhof, Y.D., and Wiese, M. (1997) Endocytosis and secretion in trypanosomatid parasites - Tumultuous traffic in a pocket. *Trends Cell Biol* **7**: 27-33.
- Ozvegy, C., Varadi, A., and Sarkadi, B. (2002) Characterization of drug transport, ATP hydrolysis, and nucleotide trapping by the human ABCG2 multidrug transporter. Modulation of substrate specificity by a point mutation. *J Biol Chem* **277**: 47980-47990.

- Pal, J.K., and Joshi-Purandare, M. (2001) Dose-dependent differential effect of hemin on protein synthesis and cell proliferation in *Leishmania donovani* promastigotes cultured in vitro. *J Biosci* **26**: 225-231.
- Papadopoulou, B., Roy, G., Dey, S., Rosen, B.P., and Ouellette, M. (1994) Contribution of the *Leishmania* P-glycoprotein-related gene *ltppgA* to oxyanion resistance. *J Biol Chem* **269**: 11980-11986.
- Papadopoulou, B., Roy, G., Dey, S., Rosen, B.P., Olivier, M., and 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., and Breard, J. (2004) Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 852-859.
- 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.
- Patel, N., Singh, S.B., Basu, S.K., and Mukhopadhyay, A. (2008) *Leishmania* requires Rab7-mediated degradation of endocytosed hemoglobin for their growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 3980-3985.
- Pecoul, B., Chirac, P., Trouiller, P., and Pinel, J. (1999) Access to essential drugs in poor countries: a lost battle? *Jama* **281**: 361-367.
- Pelletier, I., and Sato, S. (2002) Specific recognition and cleavage of galectin-3 by *Leishmania major* through species-specific polygalactose epitope. *J Biol Chem* **277**: 17663-17670.
- Perez-Victoria, F.J., Castanys, S., and Gamarro, F. (2003a) *Leishmania donovani* resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 2397-2403.
- Perez-Victoria, F.J., Gamarro, F., Ouellette, M., and 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.
- Perez-Victoria, F.J., Sanchez-Cañete, M., Seifert, K., Croft, S.L., Sundar, S., Castanys, S., and Gamarro, F. (2006a) Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: implications for clinical use. *Drug Resistance Updates. En prensa*.
- 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.
- Perez-Victoria, F.J., Sanchez-Canete, M.P., Seifert, K., Croft, S.L., Sundar, S., Castanys, S., and Gamarro, F. (2006c) Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use. *Drug Resist Updat* **9**: 26-39.
- Perez-Victoria, J.M., Parodi-Talice, A., Torres, C., Gamarro, F., and Castanys, S. (2001a) ABC transporters in the protozoan parasite *Leishmania*. *Int Microbiol* **4**: 159-166.
- Perez-Victoria, J.M., Perez-Victoria, F.J., Parodi-Talice, A., Jimenez, I.A., Ravelo, A.G., Castanys, S., and 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.

- Perez-Victoria, J.M., Cortes-Selva, F., Parodi-Talice, A., Bavchvarov, B.I., Perez-Victoria, F.J., Munoz-Martinez, F., Maitrejean, M., Costi, M.P., Barron, D., Di Pietro, A., Castanys, S., and Gamarro, F. (2006d) 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., and Samuels, A.L. (2004) Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter. *Science* **306**: 702-704.
- 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.
- Pomorski, T., Holthuis, J.C., Herrmann, A., and van Meer, G. (2004) Tracking down lipid flippases and their biological functions. *J Cell Sci* **117**: 805-813.
- Pomorski, T., and Menon, A.K. (2006) Lipid flippases and their biological functions. *Cell Mol Life Sci* **63**: 2908-2921.
- Pozza, A., Perez-Victoria, J.M., Sardo, A., Ahmed-Belkacem, A., and Di Pietro, A. (2006) Purification of breast cancer resistance protein ABCG2 and role of arginine-482. *Cell Mol Life Sci* **63**: 1912-1922.
- Purnelle, B., Skala, J., and Goffeau, A. (1991) The product of the YCR105 gene located on the chromosome III from *Saccharomyces cerevisiae* presents homologies to ATP-dependent permeases. *Yeast* **7**: 867-872.
- Raggers, R.J., Pomorski, T., Holthuis, J.C., Kalin, N., and 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., and 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.
- Rao, A.U., Carta, L.K., Lesuisse, E., and Hamza, I. (2005) Lack of heme synthesis in a free-living eukaryote. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 4270-4275.
- Robey, R.W., Steadman, K., Polgar, O., Morisaki, K., Blayney, M., Mistry, P., and Bates, S.E. (2004) Pheophorbide a is a specific probe for ABCG2 function and inhibition. *Cancer Res* **64**: 1242-1246.
- Robinson, M.S., and Bonifacino, J.S. (2001) Adaptor-related proteins. *Curr Opin Cell Biol* **13**: 444-453.
- Rogers, M.E., Ilg, T., Nikolaev, A.V., Ferguson, M.A., and Bates, P.A. (2004) Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* **430**: 463-467.
- Rosenberg, M.F., Callaghan, R., Ford, R.C., and 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., Kamis, A.B., Callaghan, R., Higgins, C.F., and 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., and 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.

- Russo, R., Laguna, F., Lopez-Velez, R., Medrano, F.J., Rosenthal, E., Cacopardo, B., and 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.
- Sacks, D.L., Modi, G., Rowton, E., Spath, G., Epstein, L., Turco, S.J., and Beverley, S.M. (2000) The role of phosphoglycans in Leishmania-sand fly interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 406-411.
- Sah, J.F., Ito, H., Kolli, B.K., Peterson, D.A., Sassa, S., and Chang, K.P. (2002) Genetic rescue of Leishmania deficiency in porphyrin biosynthesis creates mutants suitable for analysis of cellular events in uroporphyrin and for photodynamic therapy. *J Biol Chem* **277**: 14902-14909.
- Santos, D.O., Coutinho, C.E., Madeira, M.F., Bottino, C.G., Vieira, R.T., Nascimento, S.B., Bernardino, A., Bourguignon, S.C., Corte-Real, S., Pinho, R.T., Rodrigues, C.R., and Castro, H.C. (2008) Leishmaniasis treatment-a challenge that remains: a review. *Parasitol Res.*
- Sarkadi, B., Ozvegy-Laczka, C., Nemet, K., and Varadi, A. (2004) ABCG2 -- a transporter for all seasons. *FEBS Lett* **567**: 116-120.
- Sarkadi, B., Homolya, L., Szakacs, G., and Varadi, A. (2006) Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system. *Physiol Rev* **86**: 1179-1236.
- Sauna, Z.E., and Ambudkar, S.V. (2007) About a switch: how P-glycoprotein (ABCB1) harnesses the energy of ATP binding and hydrolysis to do mechanical work. *Mol Cancer Ther* **6**: 13-23.
- Savary, S., Denizot, F., Luciani, M., Mattei, M., and 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., and 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.
- Schlegel, R.A., and Williamson, P. (2001) Phosphatidylserine, a death knell. *Cell Death Differ* **8**: 551-563.
- Schmitz, G., Langmann, T., and Heimerl, S. (2001) Role of ABCG1 and other ABCG family members in lipid metabolism. *J Lipid Res* **42**: 1513-1520.
- Seifert, K., Perez-Victoria, F.J., Stettler, M., Sanchez-Canete, M.P., Castanys, S., Gamarro, F., and Croft, S.L. (2007) Inactivation of the miltefosine transporter, LdMT, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of Leishmania donovani and persists in vivo. *Int J Antimicrob Agents* **30**: 229-235.
- Sengupta, S., Tripathi, J., Tandon, R., Raje, M., Roy, R.P., Basu, S.K., and Mukhopadhyay, A. (1999) Hemoglobin endocytosis in Leishmania is mediated through a 46-kDa protein located in the flagellar pocket. *J Biol Chem* **274**: 2758-2765.
- Shahi, S.K., Krauth-Siegel, R.L., and 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., and Englund, P.T. (1995) The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu Rev Microbiol* **49**: 117-143.
- Shayeghi, M., Latunde-Dada, G.O., Oakhill, J.S., Laftah, A.H., Takeuchi, K., Halliday, N., Khan, Y., Warley, A., McCann, F.E., Hider, R.C., Frazer, D.M., Anderson,

- G.J., Vulpe, C.D., Simpson, R.J., and McKie, A.T. (2005) Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* **122**: 789-801.
- 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., and Sundar, S. (2006) Visceral leishmaniasis (kala-azar): challenges ahead. *Indian J Med Res* **123**: 331-344.
- Singh, S., and Sivakumar, R. (2004) Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J Infect Chemother* **10**: 307-315.
- Singh, S.B., Tandon, R., Krishnamurthy, G., Vikram, R., Sharma, N., Basu, S.K., and Mukhopadhyay, A. (2003) Rab5-mediated endosome-endosome fusion regulates hemoglobin endocytosis in *Leishmania donovani*. *Embo J* **22**: 5712-5722.
- Sleight, R., and 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.
- Smith, P.C., Karpowich, N., Millen, L., Moody, J.E., Rosen, J., Thomas, P.J., and Hunt, J.F. (2002) ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol Cell* **10**: 139-149.
- Soto, J., Rea, J., Balderrama, M., Toledo, J., Soto, P., Valda, L., and Berman, J.D. (2008) Efficacy of miltefosine for Bolivian cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* **78**: 210-211.
- Spath, G.F., Epstein, L., Leader, B., Singer, S.M., Avila, H.A., Turco, S.J., and 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., and 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.
- Srivastava, P., Sharma, G.D., Kamboj, K.K., Rastogi, A.K., and Pandey, V.C. (1997) Heme metabolism in promastigotes of *Leishmania donovani*. *Mol Cell Biochem* **171**: 65-68.
- Stefkova, J., Poledne, R., and Hubacek, J.A. (2004) ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol Res* **53**: 235-243.
- Stuart, K., and Panigrahi, A.K. (2002) RNA editing: complexity and complications. *Mol Microbiol* **45**: 591-596.
- Stuart, K., Brun, R., Croft, S., Fairlamb, A., Gurtler, R.E., McKerrow, J., Reed, S., and Tarleton, R. (2008) Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest* **118**: 1301-1310.
- Sundar, S. (2001) Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health* **6**: 849-854.
- Sundar, S., and Rai, M. (2002) Advances in the treatment of leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* **15**: 593-598.
- Sundar, S., and Chatterjee, M. (2006) Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. *Indian J Med Res* **123**: 345-352.
- Sunderkotter, C., Kunz, M., Steinbrink, K., Meinardus-Hager, G., Goebeler, M., Bildau, H., and Sorg, C. (1993) Resistance of mice to experimental leishmaniasis is associated with more rapid appearance of mature macrophages in vitro and in vivo. *J Immunol* **151**: 4891-4901.

- Tall, A.R. (2008) Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high density lipoproteins. *J Intern Med* **263**: 256-273.
- Tasdemir, D., Kaiser, M., Brun, R., Yardley, V., Schmidt, T.J., Tosun, F., and Ruedi, P. (2006) Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: in vitro, in vivo, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 1352-1364.
- Teixeira, M.J., Teixeira, C.R., Andrade, B.B., Barral-Netto, M., and Barral, A. (2006) Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol* **22**: 32-40.
- Teixeira, S.M., and daRocha, W.D. (2003) Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. *Genet Mol Res* **2**: 148-158.
- Torres, C., Barreiro, L., Dallagiovanna, B., Gamarro, F., and 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., and Gamarro, F. (2004) Characterization of an ABCA-like transporter involved in vesicular trafficking in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Mol Microbiol* **54**: 632-646.
- Trager, W. (1974) Nutrition and biosynthetic capabilities of flagellates. Problems of in vitro cultivation and differentiation;. In *Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas' disease*. Vol. 20. CIBAFoundationSymposium (ed). North Holland, Amsterdam: Elsevier-Excerpta, pp. 225-245.
- Tripathi, A., and Gupta, C.M. (2003) Transbilayer translocation of membrane phosphatidylserine and its role in macrophage invasion in *Leishmania promastigotes*. *Mol Biochem Parasitol* **128**: 1-9.
- Tsiftoglou, A.S., Tsamadou, A.I., and Papadopoulou, L.C. (2006) Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: molecular, cellular, and pharmacological aspects. *Pharmacol Ther* **111**: 327-345.
- 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 Herwaarden, A.E., Wagenaar, E., Merino, G., Jonker, J.W., Rosing, H., Beijnen, J.H., and 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., and Egmond, M.R. (2006) ABC lipid transporters: extruders, flippases, or floppase activators? *FEBS Lett* **580**: 1171-1177.
- van Meer, G., Voelker, D.R., and Feigenson, G.W. (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 112-124.
- van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W., and Laskay, T. (2004) Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol* **173**: 6521-6525.
- van Zandbergen, G., Bollinger, A., Wenzel, A., Kamhawi, S., Voll, R., Klinger, M., Muller, A., Holscher, C., Herrmann, M., Sacks, D., Solbach, W., and Laskay, T. (2006) *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic

- promastigotes in the virulent inoculum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 13837-13842.
- van Zandbergen, G., Solbach, W., and Laskay, T. (2007) Apoptosis driven infection. *Autoimmunity* **40**: 349-352.
- Vaughan, A.M., and 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.
- Vickerman, K., and Preston, T.M. (1970) Spindle microtubules in the dividing nuclei of trypanosomes. *J Cell Sci* **6**: 365-383.
- Vida, T.A., and Emr, S.D. (1995) A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol* **128**: 779-792.
- 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., and Barcinski, M.A. (2005) Apoptotic mimicry: an altruistic behavior in host/Leishmania interplay. *Braz J Med Biol Res* **38**: 807-812.
- Wanderley, J.L., Moreira, M.E., Benjamin, A., Bonomo, A.C., and Barcinski, M.A. (2006) Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of Leishmania (L) amazonensis in mammalian hosts. *J Immunol* **176**: 1834-1839.
- Wang, J., Zhang, D.W., Lei, Y., Xu, F., Cohen, J.C., Hobbs, H.H., and Xie, X.S. (2008) Purification and reconstitution of sterol transfer by native mouse ABCG5 and ABCG8. *Biochemistry* **47**: 5194-5204.
- 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 U S A* **101**: 9774-9779.
- Wassef, M.K., Fioretti, T.B., and 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., and 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., and 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.
- Wiederkehr, A., Avaro, S., Prescianotto-Baschong, C., Haguenaer-Tsapis, R., and Riezman, H. (2000) The F-box protein Rcy1p is involved in endocytic membrane traffic and recycling out of an early endosome in Saccharomyces cerevisiae. *J Cell Biol* **149**: 397-410.
- Williamson, P., Bevers, E.M., Smeets, E.F., Comfurius, P., Schlegel, R.A., and 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., and 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., and 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.

- Woff, M. (1933) Remarques sur la nutrition des Trypanosomides et des bactéries parahémotrophes le “fer actif” de baudisch. *Ann Inst Pasteur* **51**: 707-703.
- Wolday, D., Berhe, N., Akuffo, H., and Britton, S. (1999) Leishmania-HIV interaction: immunopathogenic mechanisms. *Parasitol Today* **15**: 182-187.
- Wu, W.I., and Voelker, D.R. (2002) Biochemistry and genetics of interorganelle aminoglycerophospholipid transport. *Semin Cell Dev Biol* **13**: 185-195.
- Wu, Y., Tibrewal, N., and Birge, R.B. (2006) Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill. *Trends Cell Biol* **16**: 189-197.
- Xu, C.W., Hines, J.C., Engel, M.L., Russell, D.G., and Ray, D.S. (1996) Nucleus-encoded histone H1-like proteins are associated with kinetoplast DNA in the trypanosomatid *Crithidia fasciculata*. *Mol Cell Biol* **16**: 564-576.
- Xu, J., Liu, Y., Yang, Y., Bates, S., and 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., and 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.
- 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., and 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., and Schroit, A.J. (1997) Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* **89**: 1121-1132.