



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

**IMPLICACIONES BIOLÓGICAS DE LA BIOSÍNTESIS DE
ESTEROLES EN TRIPANOSOMÁTIDOS**

GUIOMAR PÉREZ MORENO

Tesis Doctoral

Septiembre 2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Guiomar Pérez Moreno
D.L.: GR. 3477-2009
ISBN: 978-84-692-5864-4

IMPLICACIONES BIOLÓGICAS DE LA BIOSÍNTESIS DE ESTEROLES EN TRIPANOSOMÁTIDOS

Memoria presentada por la Licenciada
Guiomar Pérez Moreno para optar al
grado de Doctora en Biología.

Granada, Septiembre de 2009

Guiomar Pérez Moreno

Esta tesis ha sido realizada en el Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” (C.S.I.C.) bajo la dirección de los Doctores Dolores González Pacanowska y Luis Miguel Ruiz Pérez, Profesora de Investigación y Científico Titular, respectivamente, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Dolores González Pacanowska

Profesora de investigación

Luis Miguel Ruiz Pérez

Científico Titular

Agradecimientos

Mi agradecimiento infinito a Lola y a Luis Miguel por haber confiado en mí desde el primer día y haberme dado la oportunidad de hacer esta tesis. Porque han sido esenciales en mi formación profesional y personal.

Al ministerio de Educación y Ciencia por subvencionar esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio Aurora, Cristina R., Antonio V., Fernando, Cristina B., Paula, Jana, Eliseo, Alex y, muy especialmente, a Carlos y a Víctor por su ayuda incondicional en todo momento.

A todos los compañeros con los que he trabajado estos años porque han hecho que me sienta como en casa, sobre todo en el P2. Ha sido un verdadero placer.

A mis amigos, por todos los momentos compartidos, por hacerme reír en los malos ratos y por cuidarme siempre: Andreína, Carlos, Estévez, Asun, Víctor, Ana, Esther, Auro, Elena, Barqui y Rocío.

Y por supuesto, a mis padres y a mi hermana, porque son necesarios en mi vida y porque sin ellos no podría haberlo conseguido. Estos últimos meses han sido una muestra del amor más profundo. No sé que hubiera sido sin mi Evita...

Gracias por todo... Gracias por tanto...

A mis padres y a mi hermana

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. <i>Trypanosoma brucei</i>	2
1.2. <i>Leishmania spp.</i>	6
1.3. Aspectos específicos de la biología molecular y la bioquímica de los tripanosomátidos.....	9
1.4. Biosíntesis de isoprenoides y su importancia biológica.	15
1.5. Metabolismo de esteroides en la familia <i>Trypanosomatidae</i>	18
1.6. Inhibidores de la biosíntesis de isoprenoides.....	22
1.7. Papel de los esteroides en los procesos de endocitosis.....	24
1.8. Implicación de los esteroides en la polaridad y el crecimiento celular.....	27
1.9. Localización subcelular de la ruta de biosíntesis de esteroides.....	28
1.10. Características generales de la escualeno sintasa, la escualeno epoxidasa y la 24 esterol metiltransferasa.	30
2. OBJETIVOS.....	37
3. RESULTADOS.....	41
3.1. ANEXO I: Intracellular location of the early steps of the isoprenoid biosynthetic pathway in the trypanosomatids <i>Leishmania major</i> and <i>Trypanosoma brucei</i>	41
3.2. ANEXO II: Squalene synthesis is required for cell proliferation in both procyclic and bloodstream forms in <i>Trypanosoma brucei</i>	51
3.3. Squalene epoxidase and alkyl sterol biosynthesis are required for correct cytokinesis and cell morphology in <i>Trypanosoma brucei</i>	89
4. DISCUSIÓN.....	141
4.1. Papel de la síntesis de esteroides en la proliferación, morfología y ciclo celular en formas procíclicas de <i>Trypanosoma brucei</i>	144
4.2. Papel de la síntesis de esteroides en la proliferación, morfología y ciclo celular en formas sanguíneas de <i>Trypanosoma brucei</i>	150

4.3. La biosíntesis de esteroides es esencial en las formas procíclicas y sanguíneas de <i>Trypanosoma brucei</i>	155
4.4. La biosíntesis de esteroides en tripanosomátidos implica la participación de varios orgánulos.....	157
4.5. La mevalonato kinasa puede participar en los defectos celulares observados durante el silenciamiento génico de la peroxina 2.....	162
5. CONCLUSIONES.....	167
6. BIBLIOGRAFÍA.....	171

ABREVIATURAS

- AdoMet.** S-adenosil-L-metionina
- ATP.** Adenosina trifosfato
- BLA.** Blastidina
- BF.** Forma sanguínea
- CoA.** Coenzima A
- CSM.** Marcador citosólico
- DAPI.** Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
- DIC.** Contraste diferencial
- DMSO.** Dimetil sulfóxido
- DNA.** Ácido desoxirribonucleico
- DOX.** Doxiciclina
- FBS.** Suero bovino fetal
- FITC.** Fluoresceína
- FPP.** Farnesil pirofosfato
- FPPS.** Farnesil difosfato sintasa
- GC-MS.** Cromatografía de gases y espectrometría de masas
- GPP.** Geranil pirofosfato
- HAT.** Tripanosomiasis africana humana
- HDL.** Lipoproteínas de alta densidad
- HMG-CoA.** 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA
- HMGR.** 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa
- HMGS.** 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa
- HPLC.** Cromatografía líquida de alta afinidad
- HYG.** Higromicina
- IBE.** Inhibidor de la biosíntesis de esteroides
- IC50.** Dosis inhibitoria de crecimiento 50
- IgG.** Inmunoglobulina G
- IPP.** Isopentenil pirofosfato.
- kb.** Kilobase.
- kDa.** Kilodalton.
- KO.** *knock-out*

LC. Leishmaniasis cutánea
LDL. Lipoproteínas de baja densidad
LPDS. Suero bovino fetal deslipidado
LV. Leishmaniasis visceral
mg. Miligramo
mL. Mililitro
mM. Milimolar
MVA. Mevalonato
MVAK. Mevalonato kinasa
mRNA. Ácido ribonucleico mensajero
μCi. Microcurio
μg. Microgramo
μl. Microlitro
μM. Micromolar
NADPH. Nicotiamida adenina dinucleótido fosfato
PAC. Puromicina
PBS. Tampón fosfato salino
pb. Pares de bases
PCR. Reacción en cadena de la DNA polimerasa
PEX2. peroxina 2
PF. Forma procíclica
pI. Punto Isoeléctrico
PPi. Difosfato
RNA. Ácido ribonucleico
RNA. RNA de interferencia
SBF. Suero bovino fetal
SDS. Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE. Electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida
SMT. $\Delta^{24-(25)}$ -esterol metiltransferasa
spp. Especies
SQE. Escualeno epoxidasa
SQS. Escualeno sintasa
TLC. Cromatografía en capa fina

tRNA. RNA de transferencia

UTR. Región no traducida

VIH. Virus de inmunodeficiencia humana

VSG. Glicoproteína variable de superficie

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

Trypanosoma brucei, *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* spp. son protozoos parásitos pertenecientes a la familia *Trypanosomatidae*, cuyos genomas han sido recientemente secuenciados en su totalidad (Berriman et al., 2005; El-Sayed et al., 2005a; Ivens et al., 2005). La familia *Trypanosomatidae* pertenece al orden Kinetoplástida y se caracteriza por la presencia de una región donde se concentra el DNA mitocondrial, denominado kinetoplasto, que se localiza en la única mitocondria alargada que presentan estos organismos. Aunque los patógenos pertenecientes al grupo de los tripanosomátidos presentan una organización genómica y estructuras celulares similares y todos están sometidos a cambios morfológicos durante sus ciclos de vida, las distintas especies causan enfermedades humanas diversas y son transmitidas por insectos vectores diferentes. Las enfermedades humanas causadas por los tripanosomátidos son la tripanosomiasis africana o enfermedad del sueño, causada por *Trypanosoma brucei*; la enfermedad de Chagas cuya infección es causada por *Trypanosoma cruzi*, y varias formas de leishmaniasis ocasionadas por especies del género *Leishmania*. Más de medio billón de personas, localizadas principalmente en áreas tropicales y subtropicales del mundo, están en riesgo de contraer estas enfermedades y se estima que más de 20 millones de individuos están infectados por los agentes que las causan dando lugar a más de 100.000 muertes al año.

La biología celular de los tres tripanosomátidos citados, conocidos como “TriTryps”, es muy parecida. Todos son protozoos móviles con un único flagelo que emana del bolsillo flagelar localizado en la parte posterior del parásito y donde tienen lugar los procesos de endocitosis. Contienen orgánulos denominados glicosomas donde ocurre la glicolisis, la membrana celular contiene moléculas específicas para cada patógeno que son esenciales para la supervivencia y se dividen asexualmente, aunque se ha visto recombinación sexual para *T. brucei*, se ha deducido para *T. cruzi* y se ha descrito en algunos casos para *Leishmania*.

Por otro lado, cada patógeno utiliza distintas estrategias para evadir el sistema inmune del hospedador. En este sentido cabe resaltar que *T. brucei* es el único

tripanosomátido extracelular y que habita en el torrente sanguíneo gracias a un cambio periódico de sus proteínas de superficie (VSG), que le permite evadir la respuesta antigénica del hospedador. *T. cruzi* y *Leishmania*, en cambio, son intracelulares e invaden células y tejidos expresando una compleja variedad de antígenos de superficie en el interior de la célula siendo, incluso, capaces de inhibir los mecanismos de defensa del hospedador como es el caso de la especie *L. major*, que altera la función de los macrófagos que infecta para poder sobrevivir a la respuesta intracelular (El-Sayed et al., 2005b).

El conocimiento de diferencias a nivel genético, molecular y celular puede proveer nuevas estrategias para el desarrollo de vacunas, fármacos y nuevas técnicas de diagnóstico ya que los tratamientos actuales distan mucho de ser los idóneos. No existen vacunas ni tratamientos profilácticos para estas afecciones y los pocos fármacos de los que se dispone son poco efectivos y altamente tóxicos, habiéndose descrito casos de cepas resistentes (Barrett et al., 2003).

El descubrimiento en tripanosomátidos de una serie de peculiaridades tales como la transcripción policistronica, el mecanismo de *trans-splicing*, la edición exhaustiva del RNA mitocondrial, la presencia de orgánulos de copia única, su polarizado mecanismo de endocitosis y exocitosis o la variación antigénica en *T. brucei*, los ha convertido en interesantes modelos de estudio para diferentes procesos biológicos. De hecho, existen ejemplos de fenómenos descritos inicialmente en tripanosomátidos tales como la edición de RNA mitocondrial (Stuart et al., 2005) y el *trans-splicing* de mRNA (Nilsen, 1995) que han sido posteriormente confirmados en organismos eucariotas superiores (Horiuchi and Aigaki, 2006; Nishikura, 2006).

1.1. *Trypanosoma brucei*.

Trypanosoma brucei es el agente causante de la enfermedad del sueño o tripanosomiasis africana en humanos y el nagana en ganado. Las dos subespecies que causan la enfermedad en humanos son *T. brucei rhodesiense* (este y sur de África) y *T. brucei gambiense* (oeste y centro de África), mientras que la ganadería se ve muy afectada en África subsahariana por *T. brucei brucei*. Según la Organización Mundial de

la Salud existen entre 300.000 y 500.000 casos por año de tripanosomiasis africana (HAT).

Trypanosoma brucei posee un ciclo de vida digenético ya que presenta dos estadios proliferativos, uno en el insecto vector y otro en el hospedador vertebrado mamífero. Su ciclo de vida es pleomórfico, presenta distintas formas de desarrollo las cuales implican cambios en la estructura celular, reorganización del DNA mitocondrial que forma el kinetoplasto y modificaciones del metabolismo energético. Una vez que los parásitos son ingeridos por la mosca tsetse (perteneciente al género *Glossina*), las formas tripomastigotes se multiplican por fisión binaria en el intestino del insecto, migran a la porción anterior del tubo digestivo transformándose en las formas epimastigotes e invaden las glándulas salivares donde sufren otro cambio morfológico transformándose en tripomastigotes metacíclicos. Estas formas del parásito, que son las infectivas, son inoculadas en el hospedador vertebrado mediante la picadura de la mosca. Una vez en el torrente sanguíneo, los tripomastigotes se propagan rápidamente dentro del huésped y finalmente migran al fluido cerebrospinal. En el torrente sanguíneo se distinguen dos formas predominantemente: una forma alargada altamente proliferativa denominada *slender* y una forma no proliferativa y rechoncha que se denomina *stumpy*. Esta última pasa al insecto vector tras ingerir la sangre del mamífero infectado completándose así el ciclo de vida (Figura 1.1).

Las dos subespecies que producen la enfermedad del sueño, *T. brucei gambiense* y *T. brucei rhodesiense*, presentan manifestaciones clínicas específicas (Fevre et al., 2006). Algunos de los síntomas de la enfermedad son malestar, falta de energía y fiebres intermitentes. Los ganglios linfáticos y el bazo pueden inflamarse, siendo estos síntomas tempranos más agudos en la infección por *T. b. rhodesiense*. En el curso de la enfermedad también aparece anemia y dolores de cabeza y articulaciones. Con el tiempo, surgen desórdenes neurológicos y endocrinos. (WHO/TDR 2004, <http://www.who.int/tdr/diseases/tryp/diseaseinfo.htm>). Una característica importante de esta etapa es la alteración del ciclo del sueño, síntoma que da nombre a la enfermedad.

A diferencia de otros protozoos parásitos como *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania major*, la forma infectiva de *T. brucei* se multiplica extracelularmente en el torrente sanguíneo del hospedador mamífero y, por tanto, está expuesto a la respuesta inmune de dicho hospedador. Un mecanismo básico en la capacidad del parásito para eludir la

respuesta inmune es la denominada variación antigénica en la cual juegan un papel esencial las proteínas variables de superficie (VSG) ((Pays et al., 2004) que recubren al parásito formando una densa capa. La expresión secuencial de genes que codifican estas glicoproteínas produce poblaciones de parásitos antigénicamente diferentes, permitiendo la supervivencia en el hospedador. Así, el parásito puede establecer infecciones crónicas en base al cambio reiterado de su cubierta de VSGs y provocar una inmunosupresión general asociada con la enfermedad.

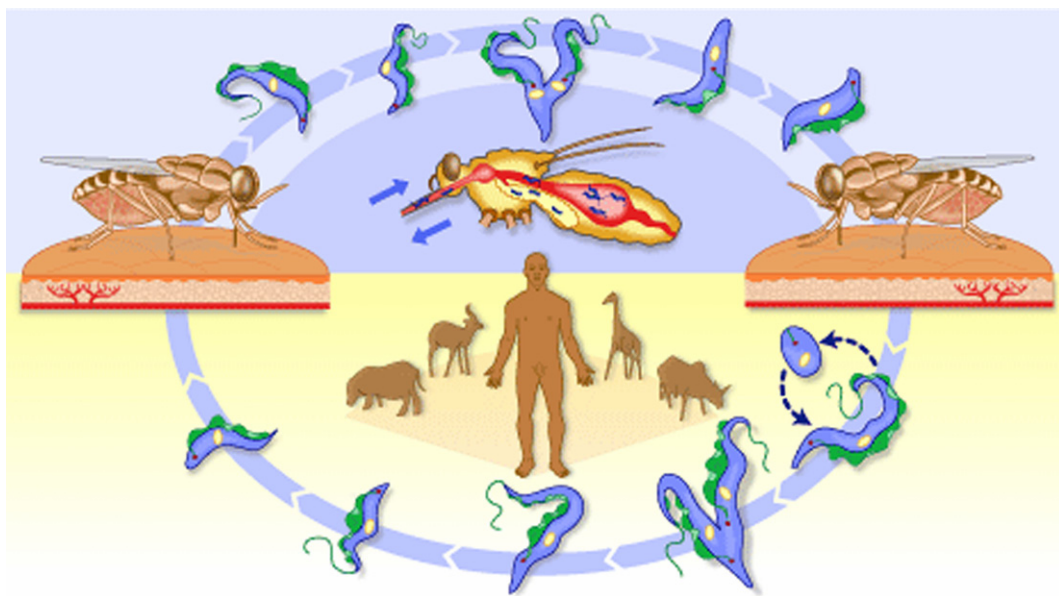


Figura 1.1. Ciclo de vida de *Trypanosoma brucei*. Tripomastigotes metacíclicos infectivos (1). Tripomastigotes sanguíneos de la forma “slender” (2). Diferenciación de la forma “slender” (3), pasando por una forma intermedia (4), a la forma “stumpy” (5) la cual se encuentra fisiológicamente adaptada para la vida en el insecto vector (6). Tripomastigotes de la forma procíclica (7) comenzando una proliferación mediante fisión binaria (8). Forma epimastigote en la parte anterior del tracto intestinal (9). Formas metacíclicas en las glándulas salivares (10) (TDR/Wellcome Trust).

La mayoría de fármacos utilizados actualmente para tratar las enfermedades producidas por tripanosomátidos fueron desarrollados hace más de 20 años y presentan problemas de toxicidad y de efectividad y el inconveniente de que la administración en algunos casos es parenteral y muy prolongada. La quimioterapia utilizada depende de la fase de la enfermedad en que se encuentre el paciente pero los tratamientos actuales no son eficaces y presentan efectos secundarios (Garcia et al., 2006). Los fármacos usados

en la primera etapa son más efectivos, por lo que un diagnóstico temprano proporciona una mayor probabilidad de cura. El éxito de los tratamientos dirigidos contra la segunda fase depende de que el fármaco pueda atravesar la barrera hematoencefálica y en este caso los fármacos disponibles son muy tóxicos y difíciles de administrar.

Se dispone de cuatro fármacos para el tratamiento de la enfermedad del sueño. La suramina y la pentamidina (Pentacarinat, Sanofi-Aventis) se usan en el tratamiento de la primera fase de la enfermedad como consecuencia de la infección por *T.b. rhodesiense* y *T.b. gambiense*, respectivamente. Ambos fármacos tienen el inconveniente de que se administran de forma parenteral, aunque la eficacia es alta y los efectos secundarios no son muy severos.

En la fase tardía se administra melarsoprol (*T.b. rhodesiense* y *T.b. gambiense*) con los inconvenientes de que se administra vía intravenosa y produce efectos secundarios muy graves que pueden ser mortales para el paciente, además de que el número de tratamientos fallidos ha incrementado drásticamente debido a la aparición de resistencias (Brun et al., 2001). En el caso de pacientes que no responden al tratamiento con melarsoprol se usa la eflornitina (sólo en casos de infección por *T. b. gambiense*), que es un inhibidor de la ornitina descarboxilasa. La baja toxicidad de la eflornitina comparada con el melarsoprol, la ha situado como el tratamiento de primera elección (Chappuis et al., 2005). Sin embargo, las dificultades encontradas en la administración, la dosis y los periodos prolongados del tratamiento (21-35 días), unidos a que se administra por vía parenteral, convierte a la eflornitina en un fármaco de elevado coste y de difícil administración.

En los últimos 21 años no se ha registrado ningún compuesto para el tratamiento de la enfermedad del sueño aunque actualmente hay un fármaco de administración oral que se encuentra en ensayos clínicos (DB-289), un pro-fármaco cuya forma activa es efectiva en etapas tempranas de la enfermedad (Ansede et al., 2004). La necesidad de atravesar la barrera hematoencefálica es la principal dificultad para el desarrollo de fármacos eficaces contra la fase tardía de HAT.

La tripanosomiasis africana no sólo supone un grave problema de salud pública debido al elevado número de muertes que produce cada año, sino que también constituye

un serio problema para los países africanos que la padecen impidiendo su desarrollo económico. La necesidad de encontrar nuevos tratamientos para combatir la enfermedad es crucial para el resurgimiento socioeconómico de estos países puesto que los fármacos disponibles actualmente son escasos, hay casos de resistencias y existen problemas de toxicidad que limitan su administración.

1.2. *Leishmania* spp.

Los protozoos flagelados del género *Leishmania* son transmitidos por un flebotomo y causan diferentes formas clínicas de leishmaniasis: leishmaniasis cutánea, leishmaniasis mucocutánea y leishmaniasis visceral o kala-azar que puede ser fatal sin tratamiento. Las leishmaniasis aparecen en regiones tropicales y subtropicales de 88 países de diversos contextos geográficos, con una prevalencia mundial de 12 millones de enfermos y se cree que la incidencia oscila entre 1.5-2 millones de nuevos casos por año para la leishmaniasis cutánea y 500.000 nuevos casos para la leishmaniasis visceral (<http://www.who.int/tdr/svc/diseases/leishmaniasis>). La población en riesgo se eleva a 350 millones de personas (Desjeux, 2004; Alvar et al., 2006). Actualmente cobra especial interés el hecho de que no todas las personas infectadas por *Leishmania* manifiestan la enfermedad, y algunas sólo la desarrollan en condiciones de inmunosupresión. En este sentido, presenta gran importancia la coinfección de *Leishmania*-VIH, la cual está emergiendo, especialmente en el sur de Europa, donde un 25-70% de los casos de leishmaniasis visceral están relacionados con la infección (Herwaldt, 1999; Desjeux and Alvar, 2003).

La epidemiología de la leishmaniasis es muy diversa, con 20 especies de *Leishmania* que son patógenas para el hombre, y 30 especies pertenecientes al género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y al género *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo que están implicadas en la transmisión de la enfermedad. Dependiendo de la especie de *Leishmania* que este vector transmite, así como del sistema inmune del hospedador, tienen lugar diferentes tipos de leishmaniasis: leishmaniasis visceral (kala-azar) que causa una infección sistémica mortal en el 90% de los casos sin tratar (Herwaldt, 1999); leishmaniasis cutánea que produce úlceras permanentes en la piel; y leishmaniasis mucocutánea que ocasiona una destrucción total o parcial de las mucosas de la boca, la

nariz y los tejidos circundantes que puede ser fatal en caso de que se produzca una infección bacteriana o una obstrucción nasogástrica (Herwaldt, 1999).

Leishmania también presenta un ciclo de vida digenético que alterna entre un hospedador invertebrado y uno vertebrado donde se desarrolla intracelularmente. Los hospedadores infectados pueden ser humanos, animales salvajes y animales domésticos. Cuando un flebotomo parasitado pica a un vertebrado, inocula con su saliva los promastigotes. Una vez que el parásito entra en contacto con los capilares cutáneos del hospedador vertebrado, los macrófagos lo fagocitan y lo engloban en una vacuola parasitófora donde liberan hidrolasas lisosomales y derivados metabólicos del oxígeno para tratar de eliminarlo. *Leishmania* neutraliza esta respuesta mediante la expresión en su superficie celular de moléculas específicas que inactivan las hidrolasas y reducen la actividad del macrófago (Descoteaux and Turco, 1999). De la eficacia de la respuesta inmune y la virulencia de este protozoo depende la progresión de la leishmaniasis. Si sobrevive el parásito, los monocitos parasitados circulantes son ingeridos por otro flebotomo, en cuyo intestino se liberan los amastigotes que recuperan la forma de promastigotes. Tras varios días, alcanzan la capacidad infectiva en la proximidad de la probóscide del insecto, quedando así dispuestos para ser inoculados de nuevo y cerrar el ciclo de vida (Figura 2.2).

La quimioterapia empleada para combatir la enfermedad consiste en la administración de antimoniales pentavalentes (Pentostán, Neostibosán y Glucantime), anfotericina B y su formulación lipídica Ambisome®, y pentamidina. La necesidad de someter al paciente a una administración parenteral del fármaco durante 28 días, la variable eficacia frente a leishmaniasis visceral y cutánea, su elevado coste, así como la emergente resistencia a los fármacos, comprometen su uso en gran medida especialmente en el tratamiento de la leishmaniasis visceral en la India debido a la aparición de resistencias (Olliaro et al., 2005). El antibiótico anfotericina B ha sido probado con una alta eficacia frente a la leishmaniasis visceral resistente a antimoniales, sin embargo, su elevada toxicidad y la necesidad de una perfusión intravenosa lenta durante al menos cuatro horas, dificulta su éxito como tratamiento. Una alternativa eficaz es la formulación de anfotericina B asociada a lípidos Ambisome®, que reduce enormemente los efectos colaterales ya que presenta una vida media más prolongada, permitiendo una mejor captación del compuesto por los macrófagos (Sundar et al.,

2003), aunque de nuevo, el elevado coste limita su uso (Bern et al., 2006). La miltefosina, un derivado fosfolípido, es el primer tratamiento oral para la LV (Bhattacharya et al., 2007) y efectivo contra la LC (Soto and Berman, 2006), el cual se registró en la India en 2002, aunque su uso debe ser limitado porque es potencialmente teratogénico. La paramomicina, un aminoglicósido, se registró en la India en 2006 y es eficaz como tratamiento tópico en la LC y de forma parenteral en la LV (Armijos et al., 2004; Sundar et al., 2007).

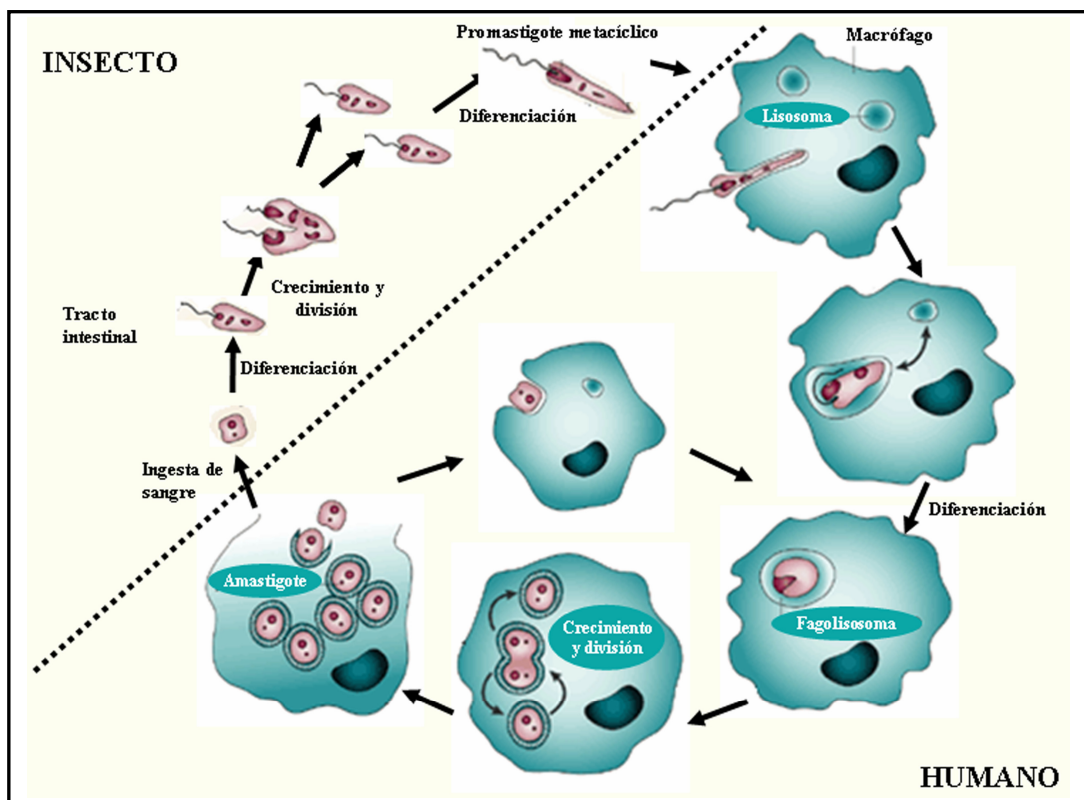


Figura 1.2. Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

Aunque se está trabajando en el desarrollo de vacunas contra la leishmaniasis aún no se dispone de una vacuna eficaz. Además el tratamiento utilizado ofrece resultados variables, una alta toxicidad y un elevado coste. Estas circunstancias junto al hecho de que el parásito ha desarrollado resistencias frente a los fármacos habituales han fomentado, como en el caso de otras enfermedades producidas por tripanosomátidos, la búsqueda de nuevas estrategias para combatir la enfermedad.

1.3. Aspectos específicos de la biología molecular y la bioquímica de los tripanosomátidos.

Los tripanosomátidos presentan una serie de peculiaridades moleculares y bioquímicas que los diferencian del resto de organismos eucariotas:

- Presentan un DNA mitocondrial que aparece agrupado formando una red llamada **kinetoplasto**, compuesta por miles de círculos concatenados que constituyen el 10-15 % del DNA total del parásito. Estos círculos de DNA se pueden dividir en maxicírculos, de los cuales existen varias docenas y su tamaño varía entre 20 y 40 kb en la mayoría de las especies, y minicírculos, de los cuales existen varios miles y su tamaño oscila entre 0.5 y 2.5 kb aunque en algunas especies pueden ser mayores. Los maxicírculos codifican RNAs ribosomales y transferentes, así como proteínas que son necesarias para procesos bioenergéticos mitocondriales como es el caso de los citocromos. En los minicírculos se codifican moléculas de RNA guías que actúan en la edición de los transcritos de RNA mensajeros de los maxicírculos (Shapiro and Englund, 1995).

- Otra característica de los tripanosomátidos es la regulación de la expresión génica, la cual difiere extraordinariamente de los mecanismos de regulación encontrados en levaduras o células de mamíferos (Clayton, 2002; Landfear, 2003). No poseen un control estricto a nivel transcripcional (un promotor para cada gen) y no se han descritos promotores de RNA polimerasa II, con la excepción del promotor del *spliced-leader* (Gilinger and Bellofatto, 2001). La transcripción es policistronica y requiere una maquinaria altamente procesiva y activa para poder transcribir varios genes a la vez en una misma molécula de RNA (Bates et al., 2000; Clayton, 2002). El pre-RNA policistronico es procesado mediante *trans-splicing* en el extremo 5' y sufre una poliadenilación en el extremo 3' estando ambos eventos acoplados (Matthews et al., 1994).

- La mayoría de los RNA mensajeros mitocondriales precisan que tenga lugar un proceso denominado **edición de RNA mitocondrial** o **RNA editing**. El *RNA editing* es un procesamiento post-transcripcional mediante el cual se producen inserciones y eliminaciones de nucleótidos de uracilo. Los precursores de RNA mensajero pueden ser

remodelados por la inserción y la eliminación de uridilatos para crear codones de iniciación y terminación, por lo que las secuencias que codifican proteínas pueden ser traducidas (Stuart et al., 2005). Los pre-RNA mensajeros son codificados en los maxicírculos del kinetoplasto mientras que en los minicírculos codifican los RNAs guía que especifican la edición de los RNA mensajeros. En *T. brucei* se conocen aproximadamente 50 maxicírculos idénticos de 22 kb y del orden de 10000 minicírculos heterogéneos de 1 kb, donde cada uno codifica tres o cuatro RNAs guía por lo que existen más de 1200 RNAs guía diferentes. En este proceso está implicado además de los RNAs guía un complejo multiproteico denominado editosoma el cual cataliza los diferentes pasos que componen el mecanismo de edición (Stuart et al., 2005).

- Los tripanosomátidos presentan unos orgánulos denominados **glicosomas**, observados por primera vez en *T. brucei* (Opperdoes and Borst, 1977), donde se concentran varios sistemas metabólicos importantes. Estos orgánulos se incluyen dentro de la familia de los peroxisomas junto con los microcuerpos en levaduras; los glioxisomas en plantas y ciertos microorganismos; y los propiamente dichos peroxisomas, aunque al principio existiera alguna duda por la ausencia de catalasa en los tripanosomátidos patógenos de mamíferos. De hecho la biogénesis de los glicosomas es parecida a la de los peroxisomas donde participan proteínas homólogas, las peroxinas (Moyersoen et al., 2004). Estos orgánulos presentan una bicapa de fosfolípidos única que engloba una matriz electrodensa de proteínas. En ellos se encuentran principalmente enzimas de la ruta de la glucólisis que catalizan la fermentación aeróbica de glucosa a succinato, como es el caso de la forma sanguínea de *T. brucei*, donde estas enzimas suponen el 90 % del contenido total de proteínas en el glicosoma. Además, se pueden encontrar enzimas implicadas en la ruta de la pentosa fosfato, en la β -oxidación de ácidos grasos, en el salvamento de purinas, en la ruta de síntesis de pirimidinas así como en la biosíntesis de éter-lípidos y escualeno. Como se puede apreciar, los glicosomas de los kinetoplástidos comparten funciones metabólicas con los peroxisomas de otros organismos, pero tienen la peculiaridad de concentrar la ruta glucolítica así como de algunas reacciones del metabolismo de carbohidratos. Esta organización subcelular del metabolismo parece tener importantes consecuencias para estos organismos. La compartimentación de las enzimas en el glicosoma parece ser crucial para la supervivencia de los tripanosomas en un medio rico en glucosa ya que la relocalización de varias proteínas glicosomales al citosol en varios mutantes deficientes de peroxinas,

que dificultan la biogénesis del glicosoma, induce muerte celular en ambos estadios del parásito (Furuya et al., 2002; Guerra-Giraldez et al., 2002; Moyersoén et al., 2003; Krazy and Michels, 2006). Esta compartimentación también permite a estos organismos superar cortos periodos de anaerobiosis aunque no los capacita para la síntesis de una cantidad suficiente de ATP para mantener la proliferación. Posiblemente, la concentración de las rutas del metabolismo de carbohidratos en los glicosomas permite a los parásitos adaptarse rápidamente a nuevas condiciones nutricionales durante la diferenciación de una forma a la siguiente del ciclo de vida. Esto tiene lugar mediante la degradación de un número de glicosomas a través de la autofagia, a la vez que se sintetizan nuevos orgánulos con un diferente contenido enzimático. Esta capacidad dependiente de glicosomas para sufrir una rápida y eficiente adaptación metabólica pudo jugar un importante papel en la capacidad adaptativa a una gran cantidad de hospedadores diferentes (Michels et al., 2006).

- Los tripanosomátidos dependen de las fuentes de carbono presentes en el huésped para su **metabolismo energético**. Los parásitos en las formas presentes en el insecto vector utilizan el catabolismo de aminoácidos como fuente de energía con una preferencia por la L-prolina, aunque *T. cruzi* puede utilizar también D-prolina y L-histidina. Los promastigotes de las especies de *Leishmania* expresan diferentes enzimas para metabolizar disacáridos, presumiblemente como una adaptación para aprovechar los nutrientes encontrados en el insecto vector. Cabe destacar que las formas del insecto vector utilizan los aminoácidos del huésped para producir energía pero sorprendentemente, en el caso de *T. brucei* y *T. cruzi*, consumen preferiblemente glucosa cuando en el medio hay glucosa y aminoácidos en exceso (Bringaud et al., 2006). Las formas intracelulares en el hospedador vertebrado utilizan las fuentes de carbono mayoritarias en el orgánulo que habitan: los amastigotes de *T. cruzi* que residen en el citoplasma celular tienen rápido acceso a los azúcares y desarrollan un metabolismo basado en la glucosa; en el caso de los amastigotes de *Leishmania* que proliferan en los lisosomas de los macrófagos prefieren los ácidos grasos como fuente energética, aunque también degradan glucosa para obtener energía (Berman et al., 1987; Bringaud et al., 2006). La forma sanguínea *long-slender* que prolifera en el torrente sanguíneo del hospedador, presenta un metabolismo energético bastante simple ya que la principal fuente de energía procede de la degradación de glucosa a piruvato mediante la glucólisis (Hannaert et al., 2003). Además de la glucosa, es capaz de utilizar fructosa, manosa y glicerol, los cuales en

condiciones de aerobiosis son convertidos a piruvato que es excretado al medio como producto final de la glucolisis (Hellemond et al., 2005). La glucolisis está organizada de manera que las siete primeras enzimas de la ruta están compartimentadas en los glicosomas mientras que las tres últimas enzimas se encuentran en el citosol. La forma procíclica de *T. brucei* muestra tres principales diferencias con la forma sanguínea alargada: la fosfoglicerato quinasa se localiza en el citosol y, por tanto, el 3-fosfoglicerato es sintetizado en el citosol; los glicosomas contienen dos quinasa adicionales que transforman el fosfoenolpiruvato en oxalacetato (fosfoenolpiruvato carboxiquinasa) o piruvato (piruvato fosfato diquinasa) (Michels et al., 2006); y por último este piruvato se localiza en un punto de ramificación metabólico produciendo varios productos finales, como acetato, L-alanina, y L-lactato. El acetato es el principal producto de desecho producido por la mitocondria de todos los tripanosomátidos (Bringaud et al., 2006).

- Los “Tritryps” presentan algunas diferencias en el **metabolismo de aminoácidos**. Los transportadores de aminoácidos constituyen una de las familias más grandes de permeasas en estos parásitos. Esto es consistente con la ausencia en estos parásitos de rutas biosintéticas de aminoácidos esenciales en humanos, por lo que precisan de una fuente exógena de prolina como fuente de energía (excepto en la forma sanguínea de *T. brucei*), de glutamina para varias rutas biosintéticas, de cisteína como una fuente adicional de azufre, y de tirosina para la síntesis de proteínas. La mayoría de las enzimas de la clásica ruta de oxidación de aminoácidos aromáticos están ausentes, aunque genes para la transaminación y reducción al derivado aromático de lactato correspondiente han sido identificados en todas las especies, pero la función de esta ruta aún no se conoce (Berriman et al., 2005). En la infección causada por *T. brucei*, la secreción de estos aminoácidos aromáticos (El Sawalhy and Seed, 1998) y su presencia en el sistema nervioso central producen alteraciones neurológicas asociadas con la enfermedad del sueño en humanos (Gazit et al., 2003). La degradación de los aminoácidos hasta acetyl-CoA tiene lugar en la mitocondria. En el caso de la leucina, se convierte en hidroximetilglutaril-CoA (HMGCoA) que puede ser incorporado directamente a la ruta de biosíntesis de isoprenoides (Ginger et al., 2001), o puede ser degradado hasta acetyl-CoA y acetoacetato por acción de una liasa presente en *T. brucei* y *T. cruzi*, pero aparentemente ausente en *L. major* (Berriman et al., 2005).

- Otra característica destacable que presentan los tripanosomátidos es que no son capaces de llevar a cabo la **síntesis *de novo* de purinas**, por lo que dependen absolutamente de la incorporación de purinas preformadas presentes en sus hospedadores mediante una ruta de recuperación de purinas. Esta observación viene reforzada por el hecho de que nueve de los diez genes requeridos para sintetizar inosina monofosfato (IMP) *de novo* no están presentes en el genoma. El único gen que se ha encontrado es el que codifica la adenilsuccinato liasa, que convierte IMP en AMP en la ruta de recuperación de purinas. Los nucleósidos o nucleobases purínicos presentes en el hospedador son utilizados como fuente de purinas por el parásito. Esta incorporación es mediada por transportadores de nucleósidos o nucleobases localizados en la membrana plasmática del parásito, los cuales proporcionan rutas de penetración específicas de sustrato (Landfear et al., 2004). En cambio, estos parásitos protozoos obtienen la fuente de pirimidinas mediante la *síntesis de novo*.

- La mayoría de los organismos contienen concentraciones milimolares de poliaminas implicadas en el crecimiento celular y en la diferenciación; y de glutatión implicado en la defensa frente a estrés oxidativo además de otros papeles esenciales para la célula. Sin embargo, los tripanosomátidos contienen **tripanotión** en vez de glutatión, sintetizado a partir de espermidina y glutatión, que junto con la tripanotión reductasa y el sistema peroxidasa dependiente de tripanotión tienen un papel esencial en la defensa frente a estrés oxidativo, el mantenimiento de un adecuado balance redox intracelular, la síntesis de desoxirribonucleótidos y en la resistencia frente a compuestos antimoniales trivalentes. La biosíntesis de poliaminas ha sido propuesta como una buena diana para tratamientos quimioterapéuticos frente a enfermedades proliferativas entre las que se encuentra la tripanosomiasis africana. En este último caso, se utiliza el fármaco difluorometilornitina el cual tiene como diana la ornitina descarboxilasa que cataliza el primer paso de síntesis del glutatión (Fairlamb, 2003). Al carecer los tripanosomátidos de catalasa y peroxidasas dependientes de selenio, dependen excepcionalmente de las peroxidasas dependientes de tripanotión para la eliminación de los peróxidos (Berriman et al., 2005).

- El ciclo celular de *Trypanosoma brucei* presenta una serie de peculiaridades debido a que existe una serie de orgánulos únicos que deben duplicarse y a que el kinetoplasto y el DNA nuclear se replican de forma independiente. La replicación del

DNA del kinetoplasto comienza antes que la del núcleo. El proceso tiene una duración corta y se completa justo antes de que termine la fase S. Tras finalizar la fase S, el núcleo replicado entra en mitosis y, en el caso de las formas procíclicas, uno de los núcleos se sitúa entre los dos kinetoplastos. La citocinesis comienza a continuación para generar dos células hijas. La progresión del ciclo celular está controlada por quinasas dependientes de ciclina al igual que en el resto de las células eucariotas aunque la existencia de “checkpoints” moleculares que controlan la progresión ordenada y precisa del ciclo está por confirmar (Hammarton, 2007). *T. brucei* tiene 11 pares diploides de cromosomas (1-6 Mb), varios cromosomas de tamaño intermedio (200-900 Kb) y aproximadamente 100 minicromosomas (50-150 Kb) además de los maxi y minicírculos del DNA mitocondrial. La mitosis tiene lugar sin que haya una condensación cromosómica evidente. La citocinesis tiene lugar mediante la generación de un surco de división que sigue una trayectoria helicoidal a lo largo de un eje longitudinal de la célula. Las distintas fases del ciclo celular y la progresión del mismo en *T. brucei* se muestra en la figura 1.3.

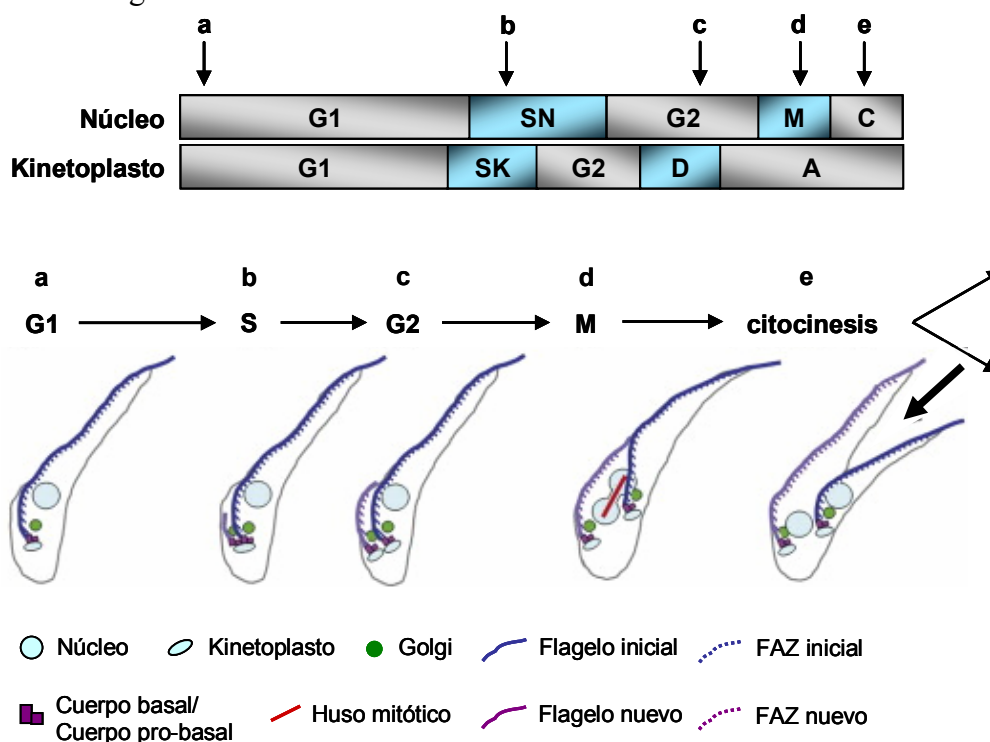


Figura 1.3. Ciclo celular de la forma procíclica de *Trypanosoma brucei*. A) El ciclo celular de *T. brucei* se separa en dos componentes, uno nuclear y otro del kinetoplasto. La replicación del kinetoplasto (SK) se inicia antes de la fase S nuclear, es considerablemente más corta y consecuentemente la segregación del kinetoplasto (D) ocurre antes de comenzar la mitosis nuclear (M). La fase denominada A en el ciclo del kinetoplasto se refiere a una fase durante la cual tiene lugar un movimiento de los cuerpos basales a otra posición del parásito. B) Representación esquemática de las células en las diferentes fases del ciclo celular.

- Los tripanosomas contienen **ergosterol y esteroides 24-alkilados** como principales esteroides, al igual que plantas y hongos (Goad et al., 1984; Urbina, 1997). Esto contrasta con la situación de mamíferos donde el colesterol es el único esteroide presente. El ergosterol y el colesterol tienen una estructura diferente y hay algunos aspectos particulares de su biosíntesis que ofrecen la posibilidad de desarrollar inhibidores específicos.

1.4. Biosíntesis de isoprenoides y su importancia biológica.

La biosíntesis de isoprenoides es una de las rutas metabólicas más complejas de las células eucariotas siendo uno de los productos finales en mamíferos el colesterol. El colesterol juega un papel fundamental en la regulación de la permeabilidad y la fluidez de las membranas celulares además de ser precursor de lipoproteínas, ácidos biliares, la vitamina D y hormonas esteroideas. Esta ruta da lugar a una serie de intermediarios que intervienen en multitud de procesos celulares esenciales: en la síntesis de isopentenil adenina que está presente en algunos tRNAs; en la formación del grupo dolicol que participa en las glucosilaciones de proteínas y lípidos; intervienen también en la formación del grupo hemo; en la síntesis de la ubiquinona que es un componente fundamental de la cadena transportadora de electrones; e intervienen en modificaciones postraduccionales mediante isoprenilación (adición de grupos farnesilo y geranilo) de proteínas que están implicadas en multitud de procesos celulares (Gelb et al., 1998), entre las que destacan la proteína ras, las proteínas G heterotriméricas y la lámina nuclear (Saxena et al., 2008).

El colesterol se forma a partir del acetil-CoA en un proceso que se desarrolla en varias fases. En primer lugar se condensan tres unidades de acetato para formar un intermediario de seis carbonos, el mevalonato. La primera reacción, catalizada por la tiolasa, consiste en la condensación de dos moléculas de acetil-CoA, para formar acetoacetil-CoA. A continuación, éste reacciona con otra molécula de acetil-CoA, produciendo así el 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), mediante la acción de la HMG-CoA sintasa. Finalmente la enzima HMG-CoA reductasa, dependiente de NADPH, reduce al HMG-CoA hasta mevalonato (Cabrera et al., 1986; Chappell et al., 1995; Bach et al., 1999). La HMG-CoA reductasa es una enzima limitante en el proceso

de control de la velocidad de la biosíntesis de colesterol en mamíferos siendo la enzima más estrictamente regulada de la ruta.

A continuación, se produce una conversión del mevalonato en unidades de isopreno activadas y seis unidades isopreno de 5 carbonos polimerizan para formar la estructura lineal de 30 carbonos del escualeno. Para ello, el mevalonato sufre una serie de reacciones hasta convertirse en isopentenil difosfato, que se transforma en su isómero dimetilalil difosfato. Ambas moléculas, de cinco carbonos cada una, se condensan y producen geranyl difosfato, que reacciona con otra molécula de isopentenil difosfato generándose el farnesil difosfato. Las dos reacciones son catalizadas por la enzima farnesil difosfato sintasa (FPPS). Finalmente se produce la condensación de dos moléculas de farnesil difosfato, mediante la acción de la escualeno sintasa (SQS) dando lugar a escualeno. El geranyl difosfato y el farnesil difosfato también participan en la síntesis de otros derivados isoprenoides, que como ya se ha mencionado, son fundamentales para la viabilidad celular.

Finalmente, la ciclación del escualeno forma los cuatro anillos del núcleo esteroide y una serie de cambios adicionales (oxidaciones, eliminación o migración de grupos metilo) conduce a la formación del producto final, el colesterol. En esta parte de la ruta es donde se ponen de manifiesto las diferencias encontradas entre la ruta de biosíntesis de esteroides de mamíferos y de tripanosomátidos. El escualeno sufre un proceso de ciclación para dar lugar a lanosterol que, tras varias transformaciones, entre las que se incluyen la pérdida de tres grupos metilo, se transforma en colesterol en células de mamífero. Sin embargo, en tripanosomátidos el lanosterol sigue una ruta diferente, ya que además de ser desmetilado en posición 4 y 14, es metilado en posición 24. La desmetilación en posición 14 es catalizada por la C14 α -desmetilasa, enzima dependiente del citocromo P-450. La metilación en posición 24 está catalizada por la enzima $\Delta^{24,25}$ esterol metiltransferasa (SMT), que es dependiente de S-adenosil-L-metionina (AdoMet), y es característica de tripanosomátidos, hongos y plantas. Por este motivo constituye un blanco atractivo para el diseño de fármacos contra enfermedades protozoarias y fúngicas. El resultado en tripanosomátidos es la formación de ergosterol y esteroides 24-alquilados como esteroides mayoritarios (Figura 1.4).

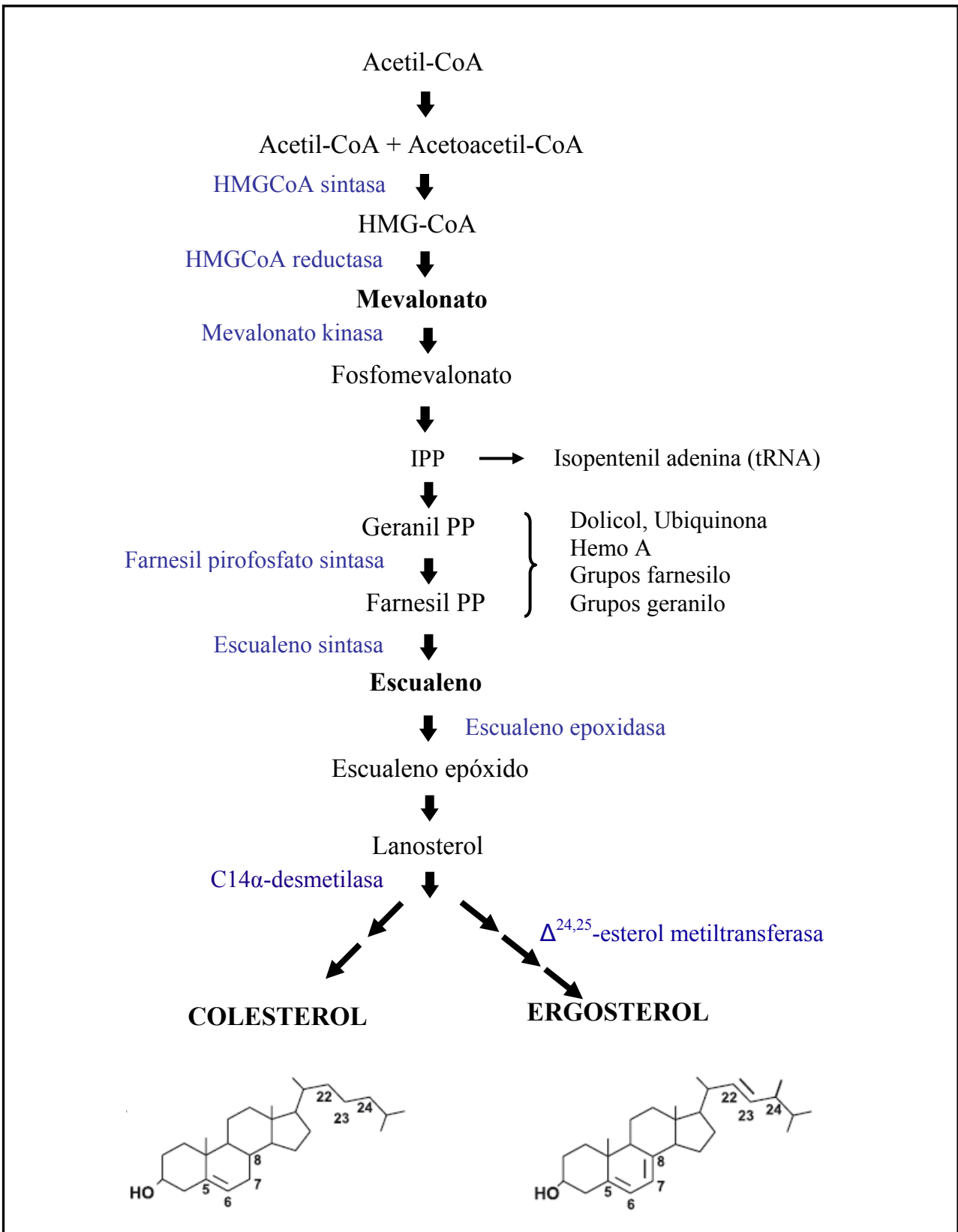


Figura 1.4. Ruta de biosíntesis de isoprenoides.

1.5. Metabolismo de esteroides en la familia Trypanosomatidae

Los tripanosomas durante su ciclo de vida experimentan distintos cambios ambientales en respuesta a los cuales se adaptan modificando su morfología, metabolismo energético y lipídico. Los lípidos cumplen una gran variedad de funciones en diversos organismos; son una forma de almacenamiento de energía, cumplen funciones metabólicas y son el principal constituyente de las membranas biológicas. De igual manera ciertos lípidos sirven de cofactores, detergentes, transportadores, hormonas, mensajeros intracelulares y extracelulares, pigmentos y anclajes de proteínas de membrana.

En relación con la composición de esteroides los tripanosomas presentan una serie de características particulares. Los esteroides mayoritarios son los de tipo $\Delta^{5,7}$ -esteroides y pertenecen al grupo C28-ergosta o el C29-estigmasta (Figura 2.5). *Leishmania* posee principalmente esteroides de tipo ergosta de 28 átomos de carbono, aunque también están presentes pero en menor proporción los esteroides de tipo estigmasta de C29. El esteroide mayoritario en promastigotes de *Leishmania tropica*, *L. donovani*, *L. mexicana* y *L. amazonensis* es el ergosta-5,7,24(24¹)-trienol, mientras que en *L. major* es el ergosta-7,24(24¹)-dienol. El ergosterol (ergosta-5,7,22-trienol) también se encuentra en cantidades significativas. Los promastigotes de *Leishmania* también contienen esteroides de C29 como el estigmasta-5,7,22-trienol, que suelen comprender alrededor de un 5 % del contenido total (Roberts et al., 2003). Sin embargo, en amastigotes de *L. major* la cantidad de estigmasteroides es más significativa, representando el 20 % de los esteroides endógenos (Roberts et al., 2003). Estudios de la biosíntesis de esteroides en varias especies de *Leishmania* (Ginger et al., 1999; Ginger et al., 2000) han demostrado que la leucina es la principal fuente de carbono utilizada para la biosíntesis *de novo*. El acetato y otros sustratos que producen acetil-CoA (glucosa, alanina, serina, isoleucina) se incorporan pobremente a los esteroides, aunque son usados eficientemente para la síntesis de residuos de ácidos grasos que forman triacilglicéridos y fosfolípidos. La incubación de promastigotes de *L. mexicana* con [U-¹⁴C] leucina demostró que el esqueleto de la leucina se incorpora directamente en la síntesis de isoprenoides, sin convertirse en acetil-CoA como ocurre en animales y plantas (Ginger et al., 2001). El catabolismo de la

leucina genera HMG-CoA, que es reducido a mevalonato para incorporarse a los esteroides, contribuyendo así a la economía metabólica celular.

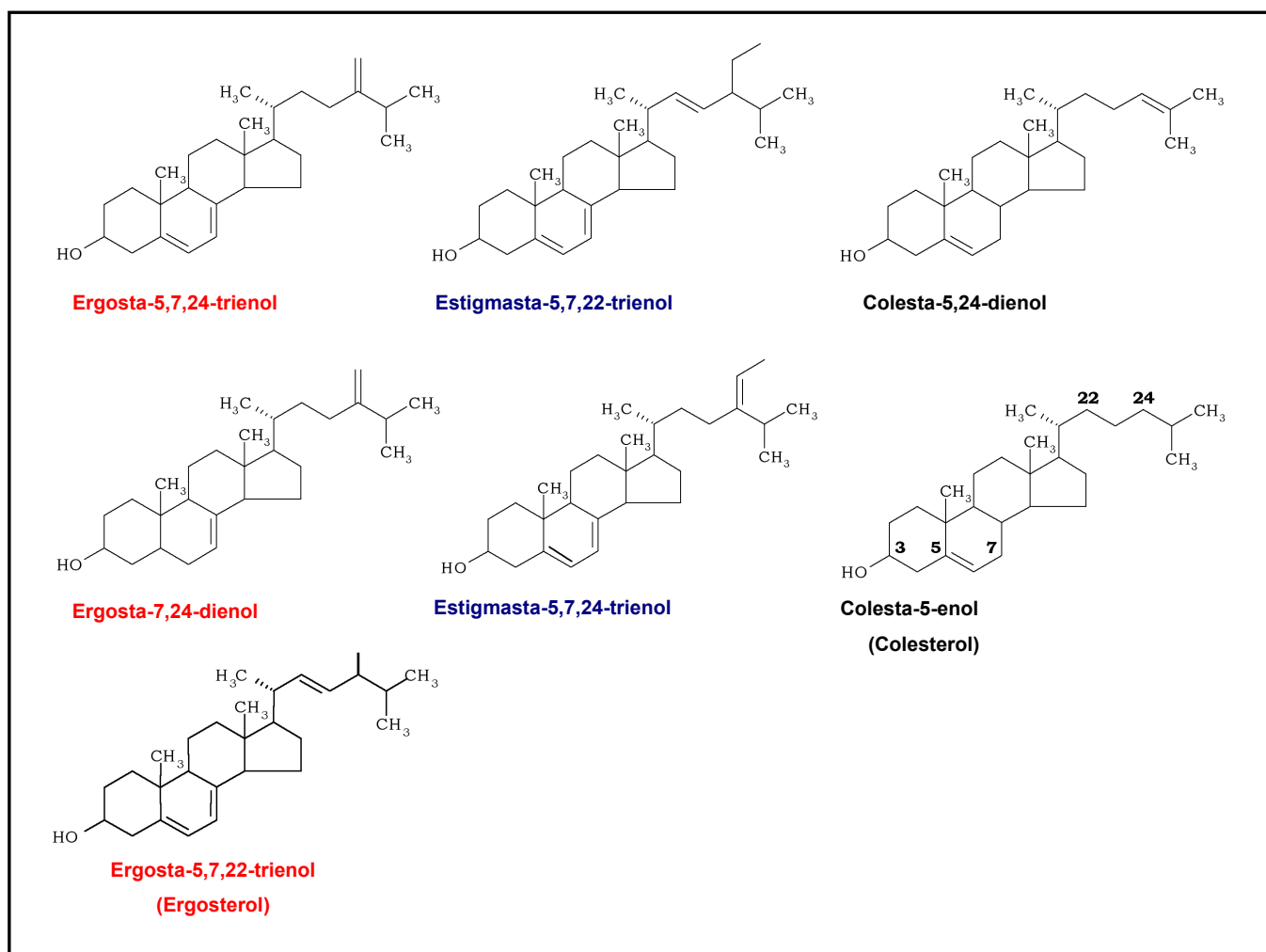


Figura 1.5. Estructura de los principales esteroides.

Los epimastigotes de *T. cruzi* contienen ergosterol y ergosta-5,7-dienol, los cuales representan más del 40% del total de esteroides (Korn et al., 1969; Beach et al., 1986). Las formas amastigotes de *T. cruzi* se diferencian de los promastigotes ya que en vez de producir $\Delta^{5,7}$ -esteroides, sintetizan ergosta-7,24(24¹)-dienol y ergosta-7-enol, lo que sugiere la ausencia de actividad Δ^5 y Δ^{22} desaturasa (Liendo et al., 1999). Además de los esteroides de C28 y C29, *Leishmania* spp. y *T. cruzi* contienen colesterol que oscila aproximadamente entre un 10-50 % del total de esteroides. Este colesterol proviene del hospedador animal o del suero presente en el medio de cultivo (Goad et al., 1984; Beach et al., 1986; Liendo et al., 1999). Sin embargo, el colesterol exógeno no es capaz de satisfacer los requerimientos celulares y un alto contenido del mismo en las membranas

del parásito se relaciona con pérdida de viabilidad. En cualquier caso, los tripanosomátidos necesitan sintetizar sus propios esteroides debido al importante papel que juegan tanto en el metabolismo celular como en el mantenimiento de las propiedades físico-químicas de las membranas.

La **forma procíclica de *T. brucei*** también es flexible en cuanto a sus requerimientos de esteroides. Estos parásitos son capaces de captarlos del medio y también son capaces de sintetizarlos *de novo* a partir de mevalonato (Coppens and Courtoy, 1995; Coppens et al., 1995b). Estudios demuestran que los procíclicos son capaces de regular la síntesis endógena de lípidos y que la presencia de lípidos exógenos tiene un efecto regulador sobre la maquinaria biosintética de los isoprenoides. Por otro lado, la estatina sinvinolina, un inhibidor específico de la HMG-CoA reductasa, afecta el crecimiento de los procíclicos en cultivo y disminuye también la incorporación de [¹⁴C] acetato a esteroides, además de generar cambios morfológicos, paro en la citocinesis y alteraciones en la estructura de la mitocondria y el kinetoplasto. Estos efectos se potencian al crecer los parásitos en un suero carente de lipoproteínas (Coppens et al., 1995a). Los esteroides mayoritarios de formas procíclicas cultivadas en presencia de suero son el colesterol (60%), el ergosterol (un 14% del total) y el colest-5,7,24-trienol (15%) aunque también se detectan el 5-dehidroepisterol y el zimosterol (Gros et al., 2006).

Por el contrario, las **formas sanguíneas de *T. brucei*** se diferencian del resto de los tripanosomas en que presentan casi exclusivamente colesterol. A pesar de la aparente ausencia de síntesis de ergosterol *de novo* en las formas sanguíneas de *T. brucei*, se ha detectado actividad HMG-CoA reductasa (Coppens et al., 1995a) y actividad esteroil metiltransferasa (Gros et al., 2006). Como productos de la síntesis del mevalonato se generan isoprenoides, dolicol y ubiquinona, los cuales también han sido detectados en las formas sanguíneas del parásito (Low et al., 1991). La baja concentración en el plasma de dolicol, ésteres y derivados del fosfato (141 nM en total (Elmberger et al., 1988)), sugiere que las formas sanguíneas de *T. brucei* deben poseer la capacidad de sintetizar *de novo* el dolicol (Low et al., 1991). Por otro lado, se ha demostrado la esencialidad del dolicol en las formas sanguíneas a través del uso del inhibidor tunicamicina, evidenciando que el dolicol es un intermediario esencial necesario para la transferencia de las cadenas de oligosacáridos a residuos de asparragina para la síntesis

de glicoproteínas en *T. brucei* (Strickler and Patton, 1980). Este proceso involucra a una manosiltransferasa dolicol-dependiente localizada en el retículo endoplasmático rugoso, como ya se ha visto en las células de mamíferos (Prado-Figueroa et al., 1994). Se han hecho numerosos experimentos que sugieren que las formas sanguíneas del tripanosoma africano son auxótrofos para lípidos y requieren, entre otros componentes del suero, lipoproteínas que contienen colesterol, ésteres de colesterol y fosfolípidos (Coppens et al., 1987; Coppens et al., 1995a). Sin embargo, en el estudio de Low y col., al analizar la naturaleza de los derivados poliisoprenoides en *T. brucei* formados a partir de mevalonato radiactivo, mediante HPLC, cromatografía en capa fina y espectrometría de masas, se determinó que el producto marcado predominante de la ruta del mevalonato era el colesterol (Low et al., 1991). Dado que no se ha establecido si el colesterol detectado es de procedencia exógena, existe la posibilidad de que las formas sanguíneas de *T. brucei* sean capaces de sintetizar colesterol. Se ha postulado también que puedan sintetizar esteroides de tipo ergosta en cantidades traza esenciales para la viabilidad celular (Gros et al., 2006).

Para conseguir los lípidos del hospedador los tripanosomas endocitan LDL (lipoproteínas de baja densidad) mayoritariamente y HDL (lipoproteínas de alta densidad) en menor proporción a través del bolsillo flagelar, como se ha demostrado en condiciones fisiológicas. (Coppens et al., 1987; Gillett and Owen, 1992; Lorenz et al., 1995). Hay evidencias de que *T. brucei* pueda presentar un receptor que participa en el transporte de las principales lipoproteínas (Green et al., 2003). Una vez que las LDL han entrado a la célula a través del receptor se produce la degradación de la lipoproteína liberando fosfolípidos y ésteres del colesterol para satisfacer los requerimientos del parásito.

Todas estas observaciones sugieren que los tripanosomátidos pueden adquirir esteroides de forma exógena y endógena, que presentan capacidades adaptativas para sobrevivir en diferentes entornos y mecanismos reguladores que garantizan la homeostasis de esteroides.

1.6. Inhibidores de la biosíntesis de isoprenoides.

Dada la importancia de la ruta de biosíntesis de isoprenoides, existe un gran número de inhibidores específicos que actúan a varios niveles de la ruta. Algunos de ellos han sido utilizados ampliamente como antifúngicos y antiprotozoarios:

- La HMG-CoA reductasa es inhibida por las **estatinas**, que son ampliamente utilizadas como agentes hipocolesterolémicos en humanos. Estos compuestos son análogos estructurales del HMG-CoA, por lo que inhiben de forma competitiva a la enzima. Se ha demostrado en un modelo murino de la enfermedad de Chagas que el tratamiento combinado con lovastatina (inhibidor de la HMG-CoA reductasa) y azoles elimina los parásitos circulantes y tiene un efecto protector (Urbina et al., 1993).

- Los **bisfosfonatos**, análogos no hidrolizables del PPi, se acumulan selectivamente en los tripanosomátidos (se acumulan en los acidocalcisomas) y pueden inhibir enzimas esenciales del parásito involucradas en la síntesis de isoprenoides como la farnesil difosfato sintetasa (FPPS) (Martin et al., 1999; Montalvetti et al., 2001; Ortiz-Gomez et al., 2006) y la escualeno sintasa (SQS) (Urbina, 2002; Song et al., 2009). Se ha demostrado que los N-alkil-bisfosfonatos, inhibidores específicos de la FPPS, que son ampliamente usados en los tratamientos de enfermedades óseas (Hillner, 2000; Rodan and Martin, 2000), tienen una potente y selectiva actividad frente a *T. cruzi*, tanto *in vitro* como *in vivo* (Garzoni et al., 2004a; Garzoni et al., 2004b). Aunque se ha reportado que el pamidronato puede inducir cura parasitológica radical en un modelo murino de leishmaniasis cutánea (Rodriguez et al., 2002) no se consiguieron curas parasitológicas completas en un estudio con risedronato en un modelo murino de enfermedad de Chagas aguda (Garzoni et al., 2004b), hecho probablemente debido al carácter diseminado de la infección, las propiedades farmacocinéticas del compuesto y el corto periodo del tratamiento usado (7 días). Así, aunque los bisfosfonatos, cuyo uso está aprobado en humanos, parecen compuestos prometedores como antiparasitarios, su desarrollo requiere nuevas formulaciones de los compuestos existentes con propiedades farmacocinéticas más adecuadas.

- Otro grupo prometedor de IBEs son las **quinuclidinas**, inhibidores de la escualeno sintasa (SQS). La SQS cataliza el primer paso específico para la síntesis de esteroides y ha sido objeto de un gran número de estudios como potencial blanco de agentes hipocolesterolémicos, que tendrían significativas ventajas sobre las estatinas actualmente disponibles (Menys and Durrington, 2003). Esta enzima ha sido recientemente validada químicamente como blanco quimioterapéutico en *T. cruzi* y *L. mexicana*, usando el inhibidor (BPQ-OH) (Urbina, 2002). Su selectiva actividad antiparasítica *in vitro* e *in vivo* es probablemente debida a la capacidad de las células del hospedador de compensar la reducción de la síntesis del colesterol mediante el aumento de la expresión de receptores LDL para incrementar el aporte de esteroides del medio exógeno (Goldstein and Brown, 2001). Mientras que en el caso de los tripanosomátidos, la síntesis de sus esteroides endógenos es necesaria y el ergosterol y sus análogos aparentemente no pueden ser sustituidos por los esteroides del hospedador. Dado que algunos tipos de inhibidores de la SQS presentan toxicidad en animales, seguramente debido a alteraciones en la producción de hormonas sexuales, para su uso en clínica como antiparasitarios se requiere el desarrollo de compuestos que inhiban selectivamente la enzima de *Trypanosoma* (Sealey-Cardona et al., 2007).

- Estudios en la última década han demostrado que nuevos **derivados triazólicos**, inhibidores de la 14 α -desmetilasa en hongos y levaduras como D0870 y posaconazol (SCH 56592), son capaces de inducir cura parasitológica radical en modelos murinos de enfermedad de Chagas, tanto aguda como crónica (Urbina, 2002; Urbina and Docampo, 2003), siendo capaces de curar infecciones crónicas de este parásito en animales. Más aún, estos compuestos son activos contra cepas de *T. cruzi* resistentes a nifurtimox y/o benznidazol, incluso en condiciones de inmunosupresión (Urbina and Docampo, 2003). La actividad tripanocida *in vivo* de estos compuestos ha sido atribuida a su potente y selectiva actividad contra el parásito, así como a sus propiedades farmacocinéticas. Frente a los distintos tipos de leishmaniasis la respuesta terapéutica es variable y depende del agente etiológico que la produzca. Así, el ketoconazol es efectivo para el tratamiento de algunas leishmaniasis cutáneas, pero no para la leishmaniasis visceral. En *T. brucei* los azoles demostraron un claro efecto inhibitor dependiente de la dosis, tanto en formas procíclicas como en formas sanguíneas (Lepesheva et al., 2007). Estos resultados en los parásitos sanguíneos indican que la reacción catalizada por la 14 α -

desmetilasa puede ser esencial para la forma clínicamente relevante del parásito apoyando la idea de que puedan sintetizar esteroides con funciones señalizadoras y hormonales (steroid signaling) o que tengan la capacidad de sintetizar colesterol de novo.

- En definitiva, los inhibidores de la 14 α -desmetilasa son compuestos muy prometedores para el tratamiento de la enfermedad de Chagas y también se ha sugerido la posibilidad de su uso frente a la enfermedad del sueño (Lepesheva et al., 2008; Chen et al., 2009; Konkle et al., 2009; Kraus et al., 2009).

- Los **azasteroides** son otro grupo de inhibidores que bloquean la actividad de la 24-esterol metiltransferasa. Tienen la capacidad de inhibir *in vitro* la proliferación de especies de *Leishmania*, de *T. cruzi* y formas sanguíneas y procíclicas de *T. brucei* (Nes, 2000; Lorente et al., 2004; Gros et al., 2006) aunque su modo de acción en estos últimos no está del todo claro ya que las formas sanguíneas de *Trypanosoma brucei* carecen de 24-esterol esteroides (Nes, 2000).

1.7. Papel de los esteroides en los procesos de endocitosis.

La endocitosis es un proceso a través del cual la célula adquiere nutrientes extracelulares, regula la dinámica de sus membranas y responde a estímulos extracelulares mediante la regulación o el reciclaje de receptores y transportadores. La endocitosis es un proceso altamente regulado y se conoce bien la implicación de determinados factores proteicos. En la última década han aparecido evidencias de que los lípidos también juegan un papel importante en los pasos de internalización (Corvera et al., 1999; Schmidt et al., 1999; Friant et al., 2000; Zanolari et al., 2000). Los esteroides, localizados mayoritariamente en la membrana plasmática, también intervienen en los procesos endocíticos. Uno de los procesos en los que interviene el colesterol en células de mamífero es en la reorganización de la actina que se produce durante los procesos de macropinocitosis (Grimmer et al., 2002). Si se elimina el colesterol de la membrana plasmática se generan deficiencias en la endocitosis (Kwik et al., 2003). En células eucariotas el colesterol es también necesario para la mayoría de las rutas de internalización. Al extraer el colesterol de la membrana plasmática se produce el bloqueo de la endocitosis de la transferrina, cuya internalización tiene lugar mediante

vesículas revestidas de clatrina con la consecuente acumulación de sus receptores en la superficie celular (Subtil et al., 1999), lo que demuestra que el colesterol participa en la endocitosis mediada por clatrina.

Se han generado varias cepas de levadura, mutantes para determinados genes *erg*, implicados en la biosíntesis de esteroides. Algunos de estos mutantes *ergΔ* acumulan precursores de esteroides en estructuras de membrana y presentan defectos en los procesos de endocitosis.

La endocitosis ha sido estudiada con cierto detalle en *Trypanosoma brucei* dada su importancia en la ingesta de nutrientes extracelulares y la evasión de la respuesta inmune. Los kinetoplastos han desarrollado una estructura celular donde se realiza la endocitosis y la exocitosis, el bolsillo flagelar, que es una pequeña invaginación en la base del flagelo altamente especializada. El aparato endocítico de tripanosomas está polarizado, localizándose en la parte posterior del parásito, entre el núcleo y el bolsillo flagelar, y está formado por el aparato de Golgi, endosomas, lisosomas y retículo endoplásmico, localizándose todas las estructuras endocíticas y exocíticas en la región posterior. Los progresos en el conocimiento de los compartimentos endosomales de *T. brucei* se deben al desarrollo de anticuerpos generados frente a marcadores específicos (Field et al., 1998; Jeffries et al., 2001; Alexander et al., 2002; Pal et al., 2002) y su aplicación en microscopía de alta resolución e inmunomicroscopía electrónica (Grünfelder et al., 2002; Grünfelder et al., 2003; Engstler et al., 2004). En *T. brucei* el tráfico vesicular mediado por clatrina es el mecanismo principal para transportar lípidos y proteínas a través de los orgánulos endosomales (Kirchhausen, 2000) mientras que la caveolina parece estar ausente del genoma. La endocitosis tiene lugar en el bolsillo flagelar a través de las vesículas revestidas de clatrina de clase I (135 nm) (CCV I). Tras la internalización, estas vesículas pierden la clatrina y se fusionan con estructuras vesiculares denominadas endosomas tempranos (EE). De los endosomas tempranos y de reciclaje (RE) se desprenden unas vesículas revestidas de clatrina de 50-60 nm (CCV II), que se dirigen a endosomas tardíos (LE) y/o al lisosoma (L). Finalmente, el contenido de los endosomas de reciclaje se libera mediante exocitosis a través de la fusión con la membrana del bolsillo flagelar (Grünfelder et al., 2003; Engstler et al., 2004; Overath and Engstler, 2004) (Figura 1.7.2). Estudios ultraestructurales han puesto de manifiesto vesículas revestidas de clatrina en las formas

sanguíneas pero no en las formas procíclicas (Shapiro and Webster, 1989; Webster and Shapiro, 1990), aunque hay datos recientes que confirman la presencia de clatrina en los procíclicos pero en niveles muy reducidos (Morgan et al., 2001).

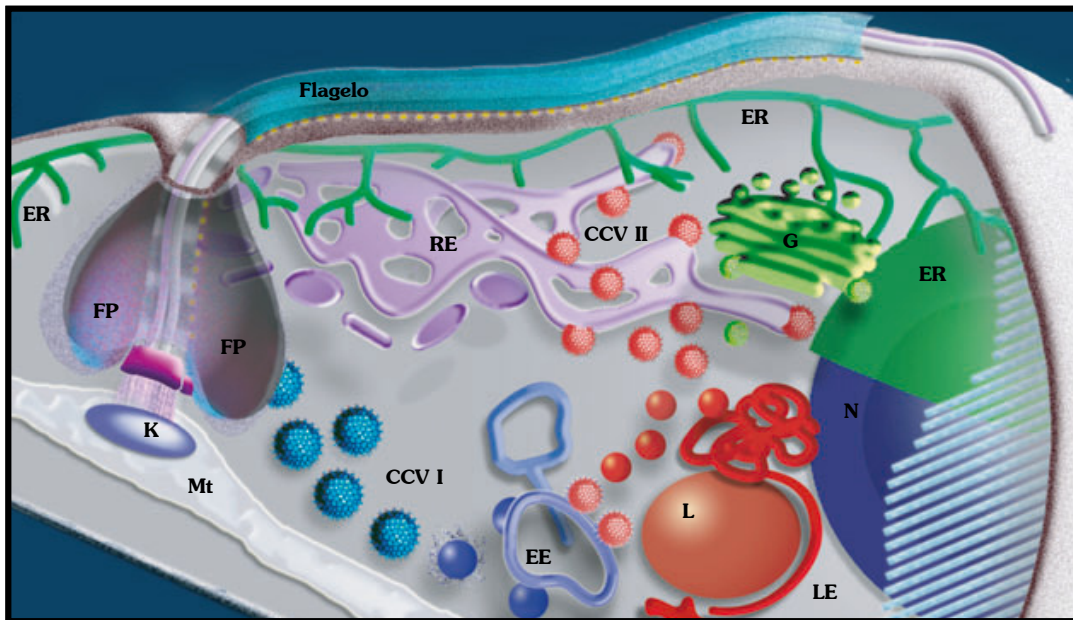


Figura 1.7.2. Esquema de la parte posterior de *T. brucei*. CCV I, vesículas revestidas de clatrina clase I; CCV II, vesículas revestidas de clatrina clase II; FP, bolsillo flagelar; EE, endosomas tempranos; LE, endosomas tardíos; RE, endosomas de reciclaje; L, lisosoma; ER, retículo endoplásmico; G, complejo de Golgi; N, núcleo; K, kinetoplasto; Mt, mitocondria. Adaptado de Engstler et al. (Engstler et al., 2004).

Una característica común de los tripanosomátidos es la alternancia entre dos hospedadores, lo que implica un proceso de diferenciación para adaptarse mejor al nuevo entorno. En esta diferenciación se produce una amplia reestructuración de las proteínas de superficie externas y de los glicoconjugados, y este cambio en la composición celular depende de la expresión diferencial de genes y de un sistema de tráfico de proteínas eficiente. En *T. brucei*, la velocidad de endocitosis es 10 veces superior en formas sanguíneas que en formas procíclicas, debido a la elevada tasa de recambio de la membrana plasmática para evadir el sistema inmune del hospedador. Otros procesos importantes para los parásitos que requieren la participación de la endocitosis son la ingesta de hierro a través de receptores para la transferrina y la adquisición de lipoproteínas LDL a través de sus receptores moleculares.

1.8. Implicación de los esteroides en la polaridad y el crecimiento celular.

Los esteroides tienen múltiples funciones relacionadas con la polaridad y el ciclo celular. La asociación de determinadas proteínas con microdominios de membrana, como se ha mencionado, permite la compartimentación funcional de las membranas y se cree que puede jugar un papel clave en la transducción de señales, la polarización, la migración, la supervivencia y el crecimiento celular (Hager et al., 2006; Hancock, 2006). Hace dos décadas se demostró que se requiere colesterol para el crecimiento de las células cancerosas (Brown et al., 1973) y hallazgos más recientes han relacionado estos efectos con cambios en los “lipid rafts” demostrando que niveles elevados de colesterol circulante aumentan el contenido de colesterol en estos microdominios de membrana lo que promueve el crecimiento de tumores y reduce la apoptosis celular (Zhuang et al., 2005; Hager et al., 2006). De varios estudios se ha deducido que las estatinas disminuyen el riesgo de desarrollar varios tipos de cáncer (Demierre et al., 2005), además de bloquear el crecimiento e inducir la apoptosis en cultivos de células cancerosas *in vitro* (Marcelli et al., 1998; Denoyelle et al., 2003; Ukomadu and Dutta, 2003; Zhong et al., 2003; Muck et al., 2004; Khanzada et al., 2006; Li et al., 2006). Los efectos de las estatinas como antitumorales han sido atribuidos a la inhibición de mecanismos post-traduccionales (Xia et al., 2001; Andela et al., 2003; Demierre et al., 2005; Sebti, 2005), pero no se puede descartar que sean debidos a la reducción del producto final de la ruta, el colesterol. La escualeno sintasa (SQS) es la enzima que cataliza la primera reacción específica de la síntesis de esteroides y se ha visto que en el cáncer de próstata los andrógenos estimulan su expresión, canalizando los intermediarios de la ruta del mevalonato hacia la síntesis de colesterol que se asocia a los “rafts”. La reducción de los niveles de colesterol mediante la inhibición de la SQS atenúa la proliferación de las células cancerosas e induce la muerte celular (Brusselmans et al., 2007). Estos resultados se suman a otros estudios donde al extraer colesterol de los “rafts” se induce la muerte celular de células cancerosas *in vitro* e *in vivo*; y al contrario, cuando se añade colesterol exógeno se promueve el crecimiento celular (Zhuang et al., 2005; Li et al., 2006), destacando la importancia del colesterol y los microdominios de membrana en las alteraciones del ciclo celular.

En relación con su papel en la polaridad celular en plantas, se ha demostrado recientemente que alteraciones derivadas de la depleción de esteroides son una consecuencia de alteraciones de la endocitosis que surgen como resultado del defecto en la composición de esteroides concretos. Así, por ejemplo, en *Arabidopsis*, la polaridad de determinadas proteínas (PIN2) que debe ocurrir tras la citocinesis se encuentra perturbada tras la modificación de la homeostasis de determinados esteroides. Un adecuado equilibrio de esteroides sería fundamental cuando se requieren procesos de endocitosis diferencial como es el caso de la asimetría de proteínas que es necesaria tras la citocinesis (Men et al., 2008).

Finalmente, existen evidencias de una relación entre el metabolismo de lípidos y autofagia. Así, la depleción de colesterol mediante estatinas o ciclodextrinas en células de mamífero induce autofagia y este proceso depende de la ruta de la fosfatidil inositol 3-quinasa (Cheng et al., 2006). Por otra parte, muy recientemente se ha demostrado una relación directa entre autofagia y el metabolismo lipídico ya que la autofagia parece actuar modulando la acumulación intracelular de lípidos. Los acúmulos lipídicos y las vacuolas autofágicas se asocian durante el estrés nutricional y la inhibición de la autofagia incrementa la cantidad de triglicéridos y vesículas lipídicas, compuestas también de colesterol, tanto *in vitro* como *in vivo* (Singh et al., 2009). En tripanosomátidos la aparición de estructuras con apariencia de autofagosomas ha sido descrita tras el tratamiento con inhibidores de la biosíntesis de esteroides (Rodrigues et al., 2002) lo que sugiere interacciones entre la autofagia y el metabolismo de esteroides también en estos organismos.

1.9. Localización subcelular de la ruta de biosíntesis de esteroides.

Durante los últimos años numerosos estudios han demostrado el papel central de los peroxisomas en la biosíntesis de isoprenoides. Estos trabajos establecen que la mayoría de las enzimas implicadas en el tramo de la ruta previa al escualeno de la síntesis de esteroides, incluyendo a la HMG-CoA reductasa (Keller et al., 1985), la mevalonato quinasa (Biardi et al., 1994), la fosfomevalonato quinasa (Olivier et al., 1999), la mevalonato difosfato descarboxilasa (Biardi and Krisans, 1996), la isopentenil difosfato isomerasa (Paton et al., 1997) y la farnesil difosfato sintasa (Krisans et al.,

1994; Gupta et al., 1999), podrían estar localizadas, si no en su mayoría, principalmente, en dichos orgánulos en células de mamífero. Sin embargo, una serie de trabajos más recientes descartan la localización peroxisomal tanto de la mevalonato kinasa (Hogenboom et al., 2004b) como de la fosfomevalonato kinasa (Hogenboom et al., 2004a), sugiriendo que se trata de enzimas predominantemente citosólicas, utilizando en esta ocasión estudios de fraccionamiento celular y permeabilización con digitonina, así como inmunofluorescencia e inmunomicroscopía electrónica en células humanas.

La localización de la ruta de biosíntesis de esteroides en tripanosomátidos es poco conocida. La HMG-CoA reductasa ha sido descrita como una enzima de matriz mitocondrial en *Leishmania major* y *Trypanosoma cruzi* (Pena-Díaz et al., 2004), lo que estaría de acuerdo con el establecimiento de la leucina como sustrato mayoritario para la síntesis de esteroides en *Leishmania* (Ginger et al., 2001). Este hecho supondría un ahorro de energía importante para la célula, al igual que ocurre en tejidos animales, plantas y hongos. La farnesil difosfato sintasa ha sido descrita en el citosol de *L. major*, *T. brucei* y *T. cruzi* (Ortiz-Gómez et al., 2006; Ferella et al., 2008).

En cuanto a la localización de enzimas como SQS y SMT en *T. cruzi* y *L. mexicana*, Urbina y col. (Urbina et al., 2002), utilizando técnicas de fraccionamiento subcelular, observaron una distribución dual entre el glicosoma y la mitocondria dependiente de la fase de crecimiento del cultivo. En células de levaduras, se ha encontrado a la enzima SMT casi exclusivamente en partículas lipídicas (Zinser et al., 1993). De hecho se ha observado que una cepa mutante en la producción de cuerpos lipídicos, presenta defectos en la formación de ergosterol (Sorger et al., 2004). Se sabe que en *L. major*, la SMT se localiza entre el retículo endoplasmático y vesículas de tipo endocítico (Jiménez-Jiménez et al., 2008) aportando evidencias de la participación de la SMT en procesos de endocitosis en tripanosomátidos.

En definitiva, estudios sobre la localización de la biosíntesis de esteroides, de la distribución de intermediarios de la ruta y cómo se transportan estos compuestos a nivel intracelular tienen una elevada trascendencia para la comprensión del papel biológico de los esteroides en la familia *Trypanosomatidae*. La información obtenida ayudará en el diseño de nuevos fármacos para el tratamiento de enfermedades protozoarias.

1.10. Características generales de la escualeno sintasa, la escualeno epoxidasa y la 24-esterol metiltransferasa.

- La **escualeno sintasa** (SQS: farnesil-difosfato farnesil-transferasa, EC 2.5.1.21) cataliza la condensación cabeza-cabeza de dos moléculas de farnesil difosfato (FPP) para formar escualeno. La reacción se produce en dos pasos distintos, involucrando ambos la formación de intermediarios carbocatiónicos. En la primera mitad de la reacción, dos moléculas de FPP reaccionan para formar pre-escualeno difosfato (PSQPP). En la segunda mitad, el PSQPP sufre heterólisis, isomerización y reducción con NADPH para formar el escualeno (Thompson et al., 1998) (Fig. 2.10.1).

El FPP está situado en un punto de bifurcación de la ruta biosintética de isoprenoides. Su conversión a escualeno a través de la acción de la SQS representa el primer paso comprometido en la formación del colesterol y el punto de transición de la ruta de intermediarios hidrofílicos a hidrofóbicos. La conversión de FPP a escualeno constituye, por tanto, un blanco atractivo para inhibir selectivamente la formación de esteroides sin interferir con la producción de poli-isoprenoides no esteroideos, que juegan un papel importante en la regulación del crecimiento celular y el metabolismo (Thompson et al., 1998).

En células de mamíferos, la condensación de FPP a escualeno representa una reacción enzimática que es crucial para la producción de esteroides, síntesis de hormonas esteroideas, vitamina D, ácidos biliares y lipoproteínas. Adicionalmente, el FPP es el precursor de varios compuestos, incluyendo el dolicol, el hemo A, la cadena lateral de la ubiquinona, y el residuo de isoprenoide de proteínas preniladas (Soltis et al., 1995), además de los sesquiterpenoides y las fitoalexinas de plantas que actúan como defensa contra el ataque de patógenos (Kribii et al., 1997). Dado que el paso enzimático catalizado por la SQS tiene lugar justo después de la bifurcación de la ruta, la inhibición de esta enzima no debería afectar a la producción de metabolitos no esteroideos, los cuales juegan papeles importantes en la viabilidad y proliferación celular, lo que supone una ventaja frente a los inhibidores de la HMGR.

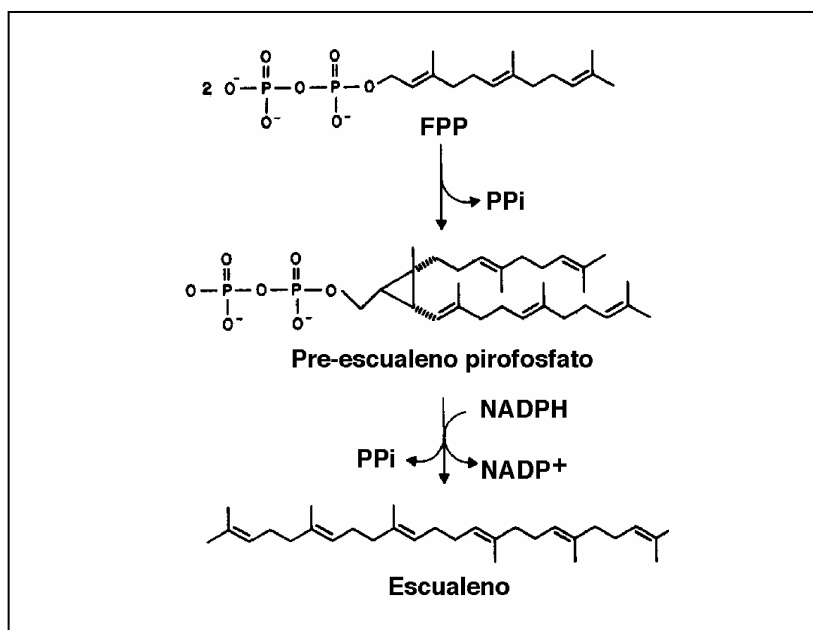


Figura 1.10.1. Reacción que cataliza la enzima escualeno sintasa (SQS)

- La enzima **escualeno epoxidasa** (SQE: EC 1.14.99.7) de mamíferos, también denominada escualeno monooxigenasa, es una proteína de 64 kDa que cataliza la oxidación del escualeno para formar 2,3-óxido de escualeno el cual posteriormente sufre un proceso de ciclación por otra enzima para producir lanosterol (Figura 2.10.2). En mamíferos la escualeno epoxidasa es una enzima de membrana del retículo endoplasmático y, al igual que la SQS, posee un papel importante en la síntesis de esteroides esenciales (Laden et al., 2000).

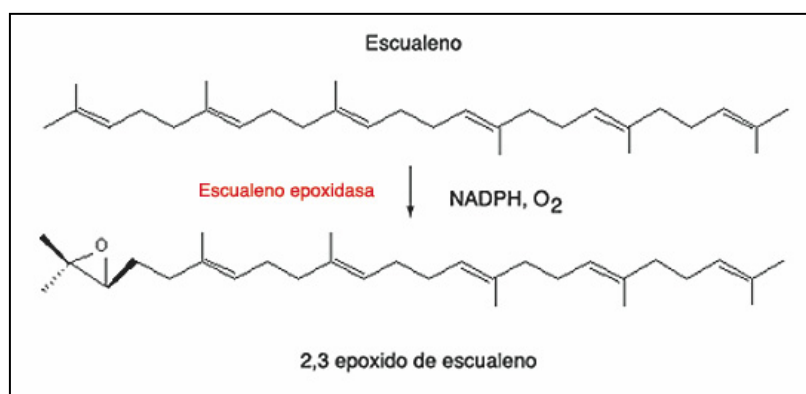


Figura 1.10.2. Reacción que cataliza la enzima escualeno epoxidasa.

A pesar de que la enzima humana fue identificada a inicios de los 70 (Yamamoto and Bloch, 1970; Ono and Bloch, 1975) su caracterización no fue posible hasta mediados de los años 90, que fue cuando se llevaron a cabo una serie de estudios bioquímicos utilizando preparaciones obtenidas a partir de fracciones subcelulares de la línea celular hepática humana HepG2 (Hidaka et al., 1990; Sakakibara et al., 1995). En el año 1995 se obtuvo la primera secuencia de la SQE de hepatocitos de rata y, posteriormente, se clonaron la SQE de ratón y la humana (Hata et al., 1995; Laden et al., 2000). Es de destacar que se han identificado diferencias entre las SQEs de mamíferos en relación con su sensibilidad a inhibidores, lo que sugiere que existen diferencias entre las enzimas de distintas especies que pueden ser explotadas en el diseño de inhibidores específicos (Gotteland et al., 1998).

La importancia del papel de la escualeno epoxidasa en la biosíntesis y regulación de los niveles de colesterol en mamíferos es manifiesta. Se sabe que se encuentra regulada a nivel transcripcional como respuesta a los niveles de esterol presentes en el medio. La adición de colesterol a células en cultivo disminuye los niveles de mRNA de la escualeno epoxidasa y por consiguiente la actividad de la enzima, lo que genera una acumulación de escualeno en las células (Nakamura et al., 1996). Estudios de expresión mediante microarrays, demostraron que la expresión de las enzimas HMG-CoA reductasa y SQE se encuentra coordinada y disminuye en fibroblastos tras añadir suero rico en lipoproteínas al medio (Iyer et al., 1999).

- La $\Delta^{24,25}$ -**esterol metiltransferasa** (SMT: EC 2.1.1.43) es la enzima responsable de la adición del grupo metilo o etilo en la posición 24 (Figura 2.10.3). Esta enzima está presente en hongos, levaduras, plantas y protozoarios mientras que no se encuentra en células de mamíferos. El grupo metilo proveniente de la s-adenosil-L-metionina en posición 24 del núcleo esteroide, constituye una de las principales diferencias estructurales entre el colesterol y el ergosterol y convierte a la SMT en un blanco atractivo para el desarrollo de inhibidores selectivos. Los criterios de clasificación de las SMTs se basan en la similitud entre las secuencias de aminoácidos y en el grado de metilación de la posición 24 del núcleo esteroide que llevan a cabo estas enzimas (Bouvier-Nave et al., 1998). La familia *smt1* reúne a las enzimas que introducen el primer grupo metilo y reconocen al cicloartenol como sustrato natural. La familia *smt2* agrupa a las SMTs capaces de catalizar la segunda metilación, para dar lugar a etil

esteroles, utilizando como sustrato preferente el 24-metilen-lofenol (Bouvier-Nave et al., 1998).

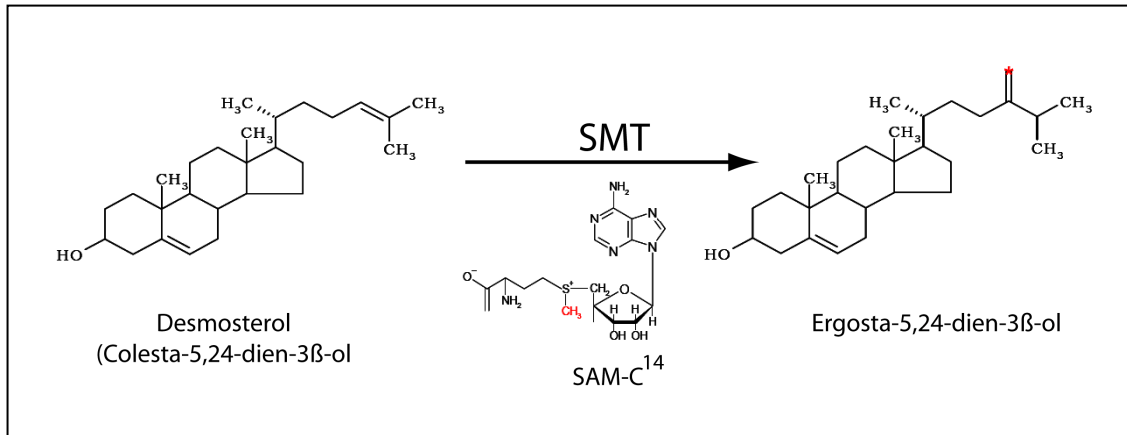


Figura 1.10.3. Reacción que cataliza la $\Delta^{24,25}$ -esterol metiltransferasa

En tripanosomátidos existen esteroides tanto metilados como etilados en posición 24. Se ha caracterizado la SMT de *Trypanosoma brucei* (Zhou et al., 2006), cuyo sustrato preferencial es el zimosterol y los productos de reacción producidos son una mezcla de esteroides C24-monoalquilados y, de forma inusual, esteroides doble C24-alquilados, un tipo de esteroide característico de plantas.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Las enfermedades protozoarias constituyen en la actualidad un importante problema de salud pública a nivel mundial. *Trypanosoma brucei* es el agente causal de la enfermedad del sueño y constituye un paradigma en el estudio de la biología y genética de parásitos protozoos de la familia Trypanosomatidae. A pesar de la elevada incidencia e impacto económico y social de estas enfermedades, el número de fármacos disponibles para el tratamiento es reducido y existen problemas de toxicidad y resistencias.

La ruta de biosíntesis de esteroides en tripanosomátidos constituye un atractivo conjunto de dianas de acción farmacológica y compuestos inhibidores de la misma han demostrado su eficacia en la interrupción del crecimiento de distintos protozoos patógenos. A pesar de que se han identificado varios compuestos prometedores, que actúan interfiriendo con el contenido o metabolismo de esteroides, no se conoce con precisión cuales son las consecuencias de la interrupción de la síntesis endógena y como el parásito mantiene la homeostasis intracelular de estos compuestos. Por otra parte, *Trypanosoma brucei* presenta un ciclo de vida digenético; la forma sanguínea del hospedador vertebrado es dependiente de la incorporación de colesterol exógeno para su supervivencia y no presenta cantidades significativas de esteroides de síntesis endógena, mientras que la forma procíclica contiene cantidades significativas de esteroides de tipo ergosta que proceden de la síntesis *de novo*. Finalmente, evidencias recientes sugieren que en las formas sanguíneas se produce un flujo de carbono a través de la ruta biosintética y que la síntesis *de novo* de cantidades mínimas de esteroides es necesaria para determinadas funciones celulares.

El **objetivo central** de esta tesis ha sido estudiar las consecuencias a nivel celular y molecular de la inhibición de la biosíntesis de isoprenoides, enfocando el estudio hacia las etapas tardías específicas de la síntesis de esteroides de tipo colestano y utilizando como modelo de estudio *Trypanosoma brucei*. También se han realizado estudios destinados a establecer un modelo global de compartimentación de la síntesis de isoprenoides en estos organismos.

Para ello, los **objetivos específicos** propuestos durante el desarrollo del trabajo han sido:

1. Determinar la localización subcelular de enzimas que catalizan distintos pasos de la biosíntesis de esteroides con el fin de profundizar en el significado de esta ruta y entender su papel en el contexto del metabolismo intermediario de *Trypanosoma*.
2. Establecer de forma inequívoca la importancia de la síntesis endógena de esteroides en las distintas formas de vida del parásito, con especial incidencia en la forma sanguínea clínicamente relevante.
3. Estudiar el papel de las etapas tardías de la biosíntesis de esteroides en la proliferación, morfología, ciclo celular y composición de esteroides en las dos formas de vida de *Trypanosoma brucei*.

Resultados

3. RESULTADOS

3.1. ANEXO I RESUMEN

Intracellular location of the early steps of the isoprenoid biosynthetic pathway in the trypanosomatids *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*.

International Journal for Parasitology, 39 (2009) 307-314

Juana Carrero-Lérida*, Guiomar Pérez-Moreno*, Víctor M. Castillo Acosta, Luis M. Ruiz-Pérez, Dolores González-Pacanowska.

* Ambos autores contribuyen igual al trabajo.

La localización intracelular de las enzimas implicadas en la síntesis de esteroides en tripanosomas no ha sido totalmente dilucidada y existen ciertas controversias en cuanto al establecimiento de la compartimentación de la ruta. En este trabajo se ha determinado la localización intracelular de dos enzimas implicadas en los pasos tempranos de la ruta, la 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A sintasa (HMGS) y la mevalonato kinasa (MVAK) en promastigotes de *Leishmania major* y en formas procíclicas y sanguíneas de *Trypanosoma brucei*. Para ello se generaron anticuerpos policlonales frente a las proteínas recombinantes purificadas que fueron utilizados en experimentos posteriores de inmunofluorescencia indirecta y en ensayos de permeabilización con digitonina. Los resultados obtenidos demuestran que la HMGS es una enzima mitocondrial, mientras que la fosforilación del mevalonato está asociada mayoritariamente a los glicosomas. En este estudio se ha analizado también la implicación de la peroxina 2, involucrada en el importe de proteínas a la matriz glicosomal, en la correcta localización de la mevalonato kinasa demostrando que la depleción de la peroxina 2 mediante RNA de interferencia produce la acumulación de la MVAK en el citosol. Los resultados se han combinado con observaciones anteriores en otras etapas de la ruta para establecer un modelo de compartimentación que se analiza en el contexto del metabolismo intermediario y establecer el significado bioquímico de esta peculiar distribución de las enzimas de la ruta de isoprenoides.



Intracellular location of the early steps of the isoprenoid biosynthetic pathway in the trypanosomatids *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*

Juana Carrero-Lérida¹, Guiomar Pérez-Moreno¹, Victor M. Castillo-Acosta, Luis M. Ruiz-Pérez, Dolores González-Pacanowska*

Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra", Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avenida del Conocimiento s/n, 18100-Armilla, Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 June 2008

Received in revised form 31 July 2008

Accepted 8 August 2008

Keywords:

Mitochondria

Glycosome

Isoprenoids

3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl Coenzyme A synthase

Mevalonate kinase

ABSTRACT

The isoprenoid biosynthetic pathway is a very complex route that entails multiple steps and generates a high number of end-products that are essential for cell viability such as sterols, dolichols, coenzyme Q, heme and prenylated proteins. In parasites from the Trypanosomatidae family this pathway provides new potential drug targets for exploitation in the search for improved therapies, and indeed compounds such as ketoconazole, aminobisphosphonates or terbinafine have been shown to have antiprotozoal activity both in vitro and in vivo. However, despite the high therapeutic importance of the pathway, the subcellular compartmentalization of the different steps of isoprenoid biosynthesis is not known in detail. Here we have analysed the intracellular location of the enzymes 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl Coenzyme A (HMG-CoA) synthase (HMGS) and mevalonate kinase (MVAK) in *Leishmania major* promastigotes as well as in *Trypanosoma brucei* procyclic and bloodstream forms. For this purpose we generated specific polyclonal antibodies against both highly purified recombinant proteins and used those in indirect immunofluorescence and digitonin titration experiments. Results show that sterol biosynthesis is distributed in multiple intracellular compartments and provide evidence indicating that in trypanosomatids the production of HMG-CoA from acetyl Coenzyme A and generation of mevalonate occur mainly in the mitochondrion while further mevalonate phosphorylation is almost exclusively located in glycosomes. Furthermore, we have determined that peroxin 2 (PEX2) is involved in efficient targeting of MVAK and that the enzyme is relocated to the cytosol upon depletion of this peroxin involved in glycosomal matrix protein import.

© 2008 Australian Society for Parasitology Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Trypanosomatidae comprise a large group of parasitic protozoa, some of which cause endemic infections and death in humans. These include *Trypanosoma brucei* (the causative agent of African sleeping sickness), *Trypanosoma cruzi* (agent of Chagas' disease) and *Leishmania* spp. (agent of visceral and mucocutaneous leishmaniasis). Although several antiparasitic drugs are available, toxic side effects and development of drug resistance are frequent events (Croft et al., 2005). One of the approaches for rational design of antitrypanosomal drugs is to specifically block an essential enzyme or metabolic pathway in the parasite. Sterol biosynthesis, which is required in most eukaryotic kingdoms, is one possible target. The pathway leads to production of cholesterol in mammals, ergosterol in fungi and a variety of 24 alkylated and olefinated sterols in plant and protists (Roberts et al., 2003).

In eukaryotic cells, sterols are important determinants of membrane fluidity and permeability and serve as precursors for bioactive molecules, which function as regulators of cell cycle and development (Roberts et al., 2003). The importance of sterols for trypanosomatids has been proved and there are some inhibitors that act at different points of the pathway (Cammerer et al., 2007; Rodrigues et al., 2007).

The enzymes that produce sterols and other isoprenoids are distributed in different subcellular compartments in multicellular eukaryotes. Studies in humans have indicated that the early steps in the sterol biosynthetic pathway occur predominantly in peroxisomes (Kovacs et al., 2002, 2007), whereas the main localization of the early stages in yeast is the endoplasmic reticulum. The localization of the mevalonate pathway in trypanosomatids is poorly known. We have previously established that 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl Coenzyme A reductase (HMGR) is in the mitochondrion (Pena-Diaz et al., 2004) while farnesyl pyrophosphate synthase (FPPS) is located in the cytosol in *Leishmania* (Ortiz-Gomez et al., 2006). On the other hand, $\Delta^{24,(25)}$ -sterol methenyltransferase, an enzyme specifically involved in a later step of sterol

* Corresponding author. Tel.: +34 958181631; fax: +34 958181632.

E-mail address: dgonzalez@ipb.csic.es (D. González-Pacanowska).

¹ Both authors have contributed equally to this work.

biosynthesis, presents a major location in the endoplasmic reticulum (Jimenez-Jimenez et al., 2008). In order to complete the picture of the intracellular organization of isoprenoid biosynthesis in trypanosomes, in the present study we have analysed the location of two enzymes involved in early steps of the pathway, 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl Coenzyme A synthase (HMGS) and mevalonate kinase (MVAK) in both *Leishmania major* and *T. brucei*.

HMGS catalyzes the condensation of acetyl-CoA and acetoacetyl-CoA to produce HMG-CoA and a series of invariant amino acids characteristic of the active site are conserved in the *L. major* and *T. brucei* enzymes (Misra et al., 2003). In mammals this enzyme has been described to be associated with mitochondria, cytosol (Hogenboom et al., 2004) and peroxisomes (Kovacs et al., 2007). MVAK catalyzes the phosphorylation of mevalonic acid to form mevalonate 5-phosphate and the enzymes from *L. major* and *T. brucei* present the three highly conserved motifs typical of the galactokinase, homoserine kinase, mevalonate kinase and phosphomevalonate kinase (GHMP) superfamily (Zhou et al., 2000; Sgraja et al., 2007).

Here, using digitonin permeabilization and indirect immunofluorescence, we show a mitochondrial localization for HMGS while MVAK is associated mainly with the glycosomal matrix. Furthermore, we demonstrate that in procyclic forms of *T. brucei*, down-regulation of peroxin 2 (PEX2), a RING-finger protein specifically involved in a complex necessary for ongoing glycosomal matrix protein import, causes severe alterations in the distribution of MVAK which accumulates in the cytosol upon RNA interference (RNAi)-mediated depletion of this peroxin.

2. Materials and methods

2.1. Culture methods

Promastigote forms derived from *L. major* strain 252 were grown in M199 (Gibco) supplemented with 10% FBS (Gibco). The *T. brucei* procyclic 449 strain expressing the tetracycline repressor and the *T. brucei* bloodstream S16 strain carrying integrated genes for T7 polymerase and the tetracycline repressor were used. Likewise strains with expression of the PEX2 gene silenced by means of tetracycline-inducible RNAi were analysed. Bloodstream cells were cultured in HMI-9 medium supplemented with 10% FBS at 37 °C and 5% CO₂ with 5 µg mL⁻¹ hygromycin and 0.2 µg mL⁻¹ phleomycin. Procyclic cells were grown in SDM-79 medium supplemented with 10% FBS and 7.5 mg mL⁻¹ hemin at 28 °C with 50 µg mL⁻¹ hygromycin and 0.5 µg mL⁻¹ phleomycin. RNAi was induced with 1 µg mL⁻¹ of doxycycline.

2.2. Expression of *L. major* HMGS and MVAK in *Escherichia coli*

In order to develop an expression system in *E. coli*, the entire coding sequence for the *L. major* HMGS and MVAK genes were amplified by PCR using the oligonucleotide primers HMGSNdeI (5'-CATATGCGCAACACCTGTCTTAG), HMGSEcoRI (5'-GAATTCACCTGGATGTAGCGGTAGT) and MVAKNdeI (5'-CATATGTCGAAGCCC GTCAAGAG-3'), MVAKEcoRI (5'-GAATTCCTATAGGTTTCGACGGCGG-3'); respectively. NdeI and EcoRI restriction sites were placed at the 5' and 3' ends, respectively, for convenient cloning into the pET28a vector (Novagen). The resulting pET-LmHMGS and pET-LmMVAK plasmids were sequenced and used to transform the *E. coli* BL21 (DE3) strain for over-expression. The induction of the polyhistidine-tagged fusion protein was performed adding 1 mM isopropyl β-D-thiogalactoside (Roche) and incubating for 4 h at 37 °C. The cultures were collected by centrifugation and frozen at -80 °C until use.

2.3. Purification of the recombinant protein LmHMGS and LmMVAK

For purification of HMGS, cell paste from 500 mL culture of *E. coli* expressing the recombinant protein were resuspended in 20 mM Tris-HCl pH 8.0. Cells were disrupted by sonication on ice and centrifuged at high speed for 10 min. The pellet, containing the inclusion bodies, was resuspended in cold 2 M urea, 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 2% Triton X-100 pH 8.0 and sonicated. The resuspended pellet was centrifuged and subjected to a second round of urea wash. Finally the pellet was washed once in buffer lacking urea, resuspended in binding buffer (20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM imidazole, 6 M guanidine hydrochloride, 1 mM 2-mercaptoethanol pH 8.0) plus a protease inhibitor cocktail (Roche), stirred for 1 h at room temperature and centrifuged for 15 min. The supernatant was applied to a HiTrap affinity column previously loaded with 0.1 M NiSO₄ and equilibrated with binding buffer. The column was washed with 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazole, 6 M guanidine hydrochloride, 1 mM 2-mercaptoethanol pH 8.0 and developed with a linear gradient of 20–500 mM imidazole. The protein concentration was determined by the method of Bradford (1976), with BSA as a standard, and gave a single band in SDS-PAGE.

For purification of MVAK, cells were pelleted by centrifugation, washed in PBS and resuspended in 10 mL of start buffer (20 mM KH₂PO₄ pH 7.4, 0.5 M NaCl) and protease inhibitor cocktail containing leupeptin (0.02 mg mL⁻¹), benzamidine (1 mM), trypsin inhibitor (0.05 mg mL⁻¹), phenylmethylsulfonyl fluoride (52 µM), aprotinin (0.05 mg mL⁻¹), and phenanthroline (0.01 M), disrupted by sonication, and centrifuged at 14,000g for 30 min. The supernatant was collected and applied to a HiTrap affinity column (Amersham Biosciences) previously loaded with a 0.1 M NiSO₄ solution and equilibrated with start buffer. The column was washed with 20 mM KH₂PO₄ pH 7.4, 0.5 M NaCl, 10 mM imidazole and was developed with a linear gradient of 10–500 mM imidazole. Fractions containing the enzyme were pooled, passed through a PD-10 column (GE Healthcare) and eluted in 20 mM Hepes pH 7.6, 50 mM NaCl. In a second purification step the sample was applied to a cation exchange Mono S column (Pharmacia Biotech) equilibrated with buffer A (20 mM Hepes pH 7.6). The protein was eluted with a linear gradient of 0–1 M NaCl; the final purified protein had 99% purity.

2.4. Western blotting and generation of antibodies against *L. major* HMGS and MVAK

To obtain the polyclonal anti-LmHMGS and anti-LmMVAK antibodies, the purified LmHMGS and LmMVAK proteins were resuspended in PBS and mixed with FCA for the first injection and Freund's incomplete adjuvant for the rest of the injections into New Zealand rabbits. Animals were maintained in a facility accredited by the autonomous government ("Junta de Andalucía") and experiments were performed following procedures approved by the Bioethics Committee of the Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Four inoculations of 400 µg of protein were carried out before obtaining the anti-LmHMGS and anti-LmMVAK serum, at a titer of 1:16,000,000. For Western blotting, 20 µg of total *Leishmania* proteins were subjected to 12.5% SDS-PAGE, blotted on an Immobilon-P membrane (Millipore) and incubated with a 1:100,000 and 1:500,000 dilution of the anti-LmHMGS and anti-LmMVAK antibodies, respectively. Bound antibodies were revealed by using goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase (HRP)-conjugate (Promega) at a dilution of 1:5000 and an ECLTM immunodetection kit (Amersham Pharmacia Biotech). To check the specificity of the antibody, the serum was pre-incubated with the corresponding purified protein overnight at 4 °C. The blocked serum was centrifuged at 16,000g for 15 min at 4 °C and the supernatants were used

in Western blots. For detection of HMGS and MVAK in procyclic and bloodstream forms of *T. brucei*, antibodies were used at a 1:5000 and 1:10,000 dilution, respectively. Densitometric analyses of Western blots were performed by using the 1D-manager program (TDI) and the anti-cytosolic marker (CSM) antibody (Guerra-Giraldez et al., 2002) which recognises an unidentified cytosolic 100 kDa protein was used diluted 1:5000 for normalization.

2.5. Indirect immunofluorescence microscopy

Approximately 10^5 cells were applied to pre-coated poly-L-lysine (Sigma) coverslips, fixed in 4% *p*-formaldehyde (Sigma) for 15 min at room temperature and permeabilized for 30 min with PBS containing Nonidet P-40 (Sigma) at 0.1% for *L. major* promastigotes or 1% for *T. brucei* cells. Subsequently, preparations were blocked with 1.5 % BSA in PBS for 30 min and incubated with the polyclonal antibodies anti-LmHMGS or anti-LmMVAK, both diluted 1:2400, for 1 h. After six washes with blocking buffer for 5 min, cells were incubated in the dark with goat anti-rabbit IgG FITC-conjugate (Sigma) diluted 1:40 for 1 h. After six washes with blocking buffer at room temperature in the dark, parasites were finally fixed with cold methanol (Merck). Samples were treated with Vectashield®-DAPI (Vector Laboratories) and analyzed with an Olympus IX microscope. For visualization of the single mitochondrion, cells were washed twice with PBS, resuspended in the same solution containing 100 nM MitoTracker Red CMXRos (Molecular Probes), and incubated for 15 min at 28 °C in the case of *L. major* promastigotes and procyclic forms of *T. brucei*. Bloodstream cells were incubated at 37 °C. In colocalization studies anti-TbALD, an

antibody directed towards the glycosomal aldolase of *T. brucei*, and the anti-LmMVAK antibody purified with protein-A Sepharose CL-4B (GE Healthcare) and labelled directly with Alexa Fluor 594 (Molecular Probes), were both used at a 1:1200 dilution.

2.6. Digitonin trititation

Parasites were grown to 1.5×10^7 cells mL⁻¹, collected by centrifugation and digitonin trititation was performed as previously described (Pena-Diaz et al., 2004). The supernatants were used to assay the enzymatic activities of pyruvate kinase (cytosolic enzyme) (Callens et al., 1991), hexokinase (glycosomal enzyme) (Racagni and Machado de Domenech, 1983), and citrate synthase (mitochondrial enzyme) (Massarini and Cazzulo, 1975). Antibodies for detection of HMGS and MVAK were used at a 1:25,000 dilution. For procyclic forms of *T. brucei*, cells were fractionated as reported previously (Helfert et al., 2001). CSM was used as a cytosolic marker (Guerra-Giraldez et al., 2002).

3. Results

3.1. Detection of HMGS and MVAK in *L. major* and *T. brucei*

The sequences of the *LmHMGS* and the *LmMVAK* genes were present in the GeneDB database (LmjF24.2110 and LmjF31.0560) at the time this study was initiated. In the case of HMGS, expression of a soluble histidine-tagged fusion protein using pET28 was not successful and most of the protein appeared in inclusion bodies under all temperature and induction conditions assayed. HMGS was therefore purified from clarified inclusion bodies. On the other

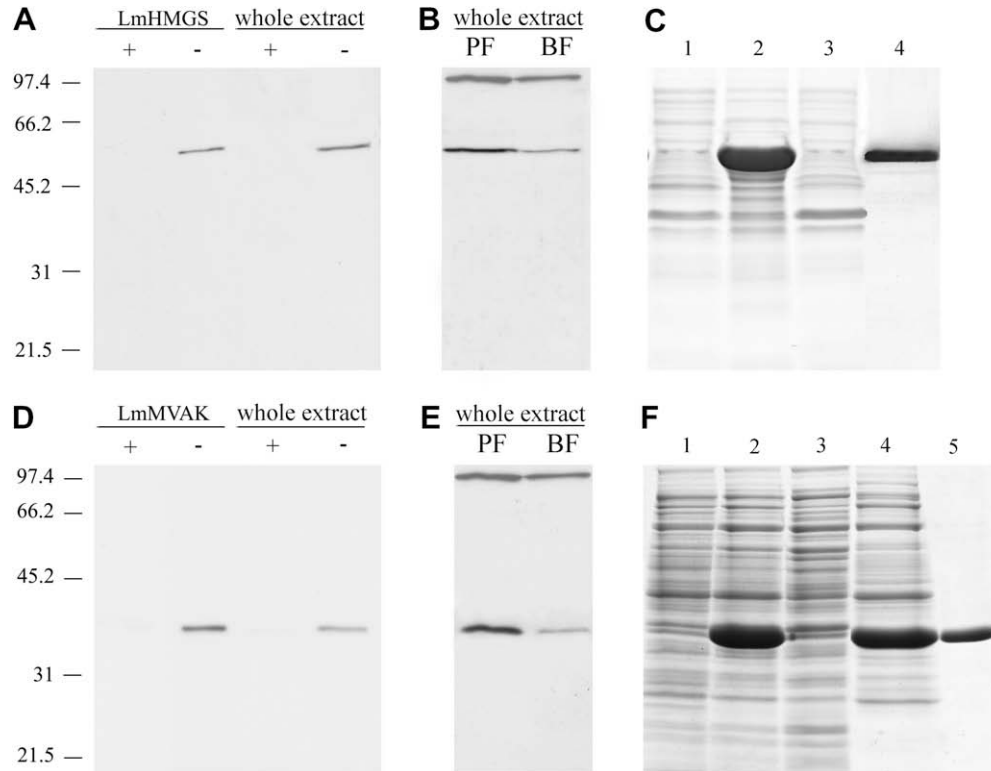


Fig. 1. Western blot analysis of the specificity of the polyclonal antibody anti-LmHMGS (A and B) and anti-LmMVAK (D and E) in promastigotes of *Leishmania major* (A and D) and procyclic and bloodstream cells of *Trypanosoma brucei* (B and E). The antibody specificity was tested in Western blots of recombinant protein and whole extracts of cells after incubation with an excess of recombinant enzyme (saturation assays). Purified protein (10 ng) and 20 µg of whole extract protein were subjected to SDS-PAGE and transferred to an Immobilon-P membrane. +, pre-incubated serum with the corresponding purified protein; -, serum without pre-incubation. The cytosolic marker protein (CSM) was used in procyclic and bloodstream forms for normalization. Purification of LmHMGS (C) and LmMVAK (F). Lane 1: control *Escherichia coli* BL21 (DE3)/pET28a cells. Lane 2: *E. coli* BL21 (DE3) over-expressing LmHMGS (C) or LmMVAK (F). Lane 3: flow-through obtained during the purification procedure. Lane 4: protein eluted from the HiTrap affinity column; HMGS (C) and MVAK (F). Lane 5: LmMVAK protein obtained after the second purification step in a cation exchange Mono S column.

hand the soluble fraction of lysates of *E. coli* cells transformed with pET-MVAK displayed a band of about 37.5 kDa not present in control cells and purification of soluble protein was achieved in two steps. The proteins obtained this way were used for polyclonal antibody production.

Western blot detection demonstrated the presence of both enzymes in extracts from *L. major* promastigote cells and procyclic and bloodstream forms of *T. brucei* (Fig. 1). Single bands that represented the expected molecular weight were visualized. Thus HMGS has a predicted M_r of 55.2 and 54.6 kDa in *L. major* and *T. brucei*, respectively (Fig. 1A and B). In the case of MVAK, bands of the predicted protein sizes of 35.4 kDa in *L. major* and 35.5 kDa in *T. brucei*

were observed (Fig. 1D and E). Saturation experiments where the purified proteins were pre-incubated with the polyclonal serum showed the specificity of the antibodies used. Interestingly, expression of both HMGS and MVAK was 2.5 and 3.78 lower in bloodstream forms compared with procyclic cells, respectively (Fig. 1B and E).

3.2. HMGS in *L. major* and *T. brucei* is targeted to the mitochondrion

To investigate the intracellular location of HMGS, differential permeabilization with digitonin was used in *L. major* promastigotes. Digitonin permeabilization is a classical way to assess the

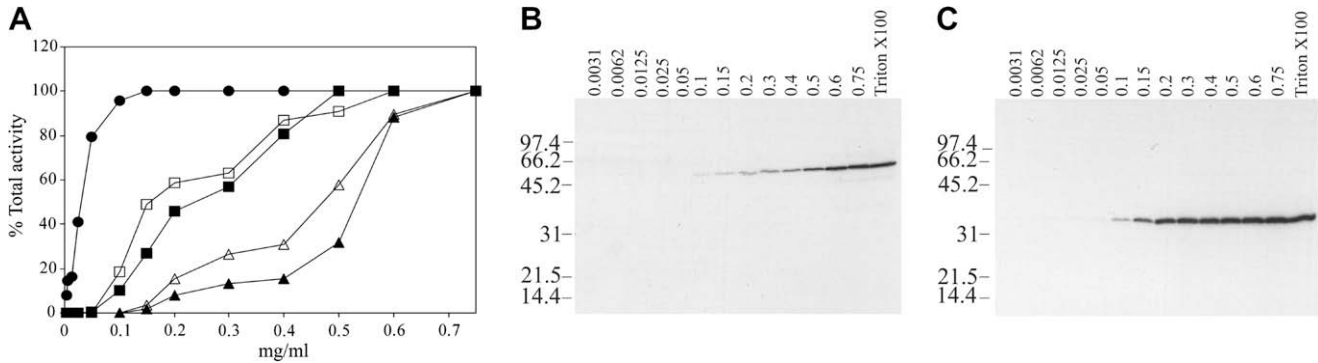


Fig. 2. Digitonin titration of the enzymes LmHMGS (A and B) and LmMVAK (A and C). (A) Activities of pyruvate kinase (closed circles), hexokinase (closed squares) and citrate synthase (closed triangles) were assayed in supernatants of whole *Leishmania major* suspensions in solutions with increasing digitonin concentrations. Total enzyme activity is expressed as a percentage, taking as 100% the total activity obtained in supernatants after permeabilization with 0.5% Triton X-100. HMGS percentage in each extract (open triangles) showed that its pattern of solubilization corresponded to that observed for the mitochondrial marker. Representation of MVAK percentages in each extract (open squares) showed that it was recovered in parallel to the glycosomal marker. Western blot analysis was performed for detection of LmHMGS (B) and LmMVAK (C), respectively, with the supernatants used in the activity measurements of marker enzymes from different organelles. The anti-LmHMGS and anti-LmMVAK antibodies were used diluted 1:25,000.

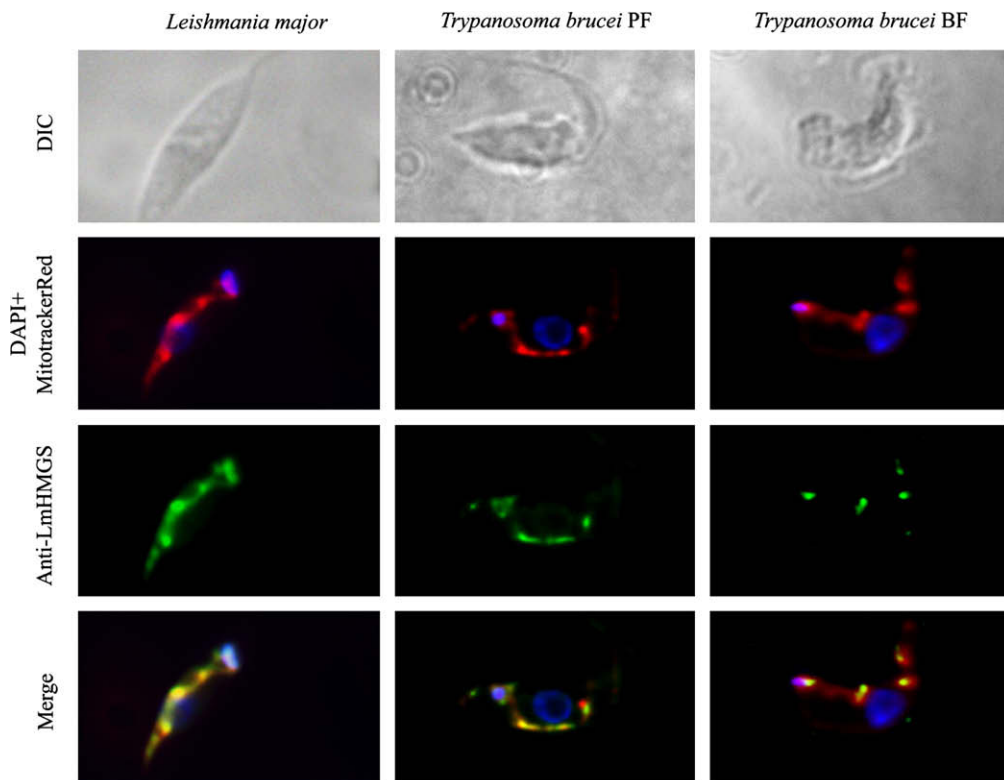


Fig. 3. Indirect immunofluorescence microscopy for detection of the enzyme HMGS in *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei* cells. DAPI staining indicates the localization of DNA in the nucleus and kinetoplast in blue. MitotrackerRed (red) was used for mitochondria visualization. For HMGS detection, the specific polyclonal anti-LmHMGS antibody and the anti-rabbit IgG FITC-conjugate (green) were used. Merged images are shown and overlapping appears in yellow. Images shown were deconvolved with the Huygens Essential program.

subcellular localization of a protein. The plasma membrane is permeabilized with low doses of detergent, whereas glycosomal and mitochondrial membranes are released at higher concentrations. LmHMGS was clearly recovered in supernatants obtained at high concentration of digitonin $>0.4 \text{ mg mL}^{-1}$ and was released in a pattern that closely resembles that of the mitochondrial enzyme citrate synthase (Fig. 2A and B). Glycosomal enzymes were released from 0.1 to 0.4 mg mL^{-1} .

Indirect immunofluorescence was used to further corroborate mitochondrial targeting of the enzyme in *Leishmania*. Cells were permeabilized and incubated with the polyclonal antibody anti-LmHMGS followed by a secondary antibody conjugated to FITC (green). Cells were also pre-incubated with MitoTracker Red for mitochondrion visualization. DAPI was used to stain both nuclear and mitochondrial kinetoplast DNA. As shown in Fig. 3, the green fluorescence was clearly associated with the mitochondrion and no particular concentration of the dye was related to any other

location. A similar staining pattern was obtained in the immunofluorescence analysis of procyclic and bloodstream forms of *T. brucei*. An additional observation that supports the mitochondrial location of this enzyme is the fact that the amino-terminal sequences of LmHMGS and TbHMGS show strong similarity with proteins described to undergo mitochondria targeting in trypanosomatids (Hausler et al., 1997). These proteins carry a short signal (7–9 amino acids) for import containing several basic residues (Table 1).

3.3. MVAK is a glycosomal enzyme in both *L. major* and *T. brucei*

Two peroxisomal targeting signals, PTS1 and PTS2, account for the transport of enzymes into the peroxisomal matrix (Subramani, 1993). PTS1, the major targeting signal, is a carboxyl-terminal tripeptide with the consensus sequence (S/C/A)(K/R/H/N)(L/M) and targets proteins to the peroxisome in all eukaryotic organisms. A small subset of peroxisomal matrix proteins is targeted by PTS2,

Table 1

Comparison of the amino-terminal sequence of the enzymes LmHMGS and TbHMGS with those of different trypanosomatid proteins that undergo mitochondrial import

Organism	Amino terminal sequence ^a	Protein
<i>Leishmania major</i> (this study)	MMR NTCLSLAGVSGMAVYA [*] P HCRV	HMGS
<i>Trypanosoma brucei</i> (this study)	MRR TVRSLAG ISGMSVYTPPCRVALK	HMGS
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Pena-Diaz et al., 2004)	MFRR AILLGCSAAK	HMGR
<i>L. major</i> (Montalvetti et al., 2000)	MRR SLLACSAAKGESWASM	HMGR
<i>T. cruzi</i> (de Marval et al., 1993)	MFR SAARF [*] AGKE	Hsp60
<i>T. brucei</i> (Estevez et al., 1999)	MMR RASYCAGHAFTSL	Glutamate dehydrogenase
<i>T. brucei</i> (Stephens et al., 2007)	MQRS QLARKF ATQVGAYSLR RGRC	Acyl carrier protein

^a Sequence homologies are in bold. Positively charged residues are in italics.

^{*} Denotes known and possible cleavage sites.

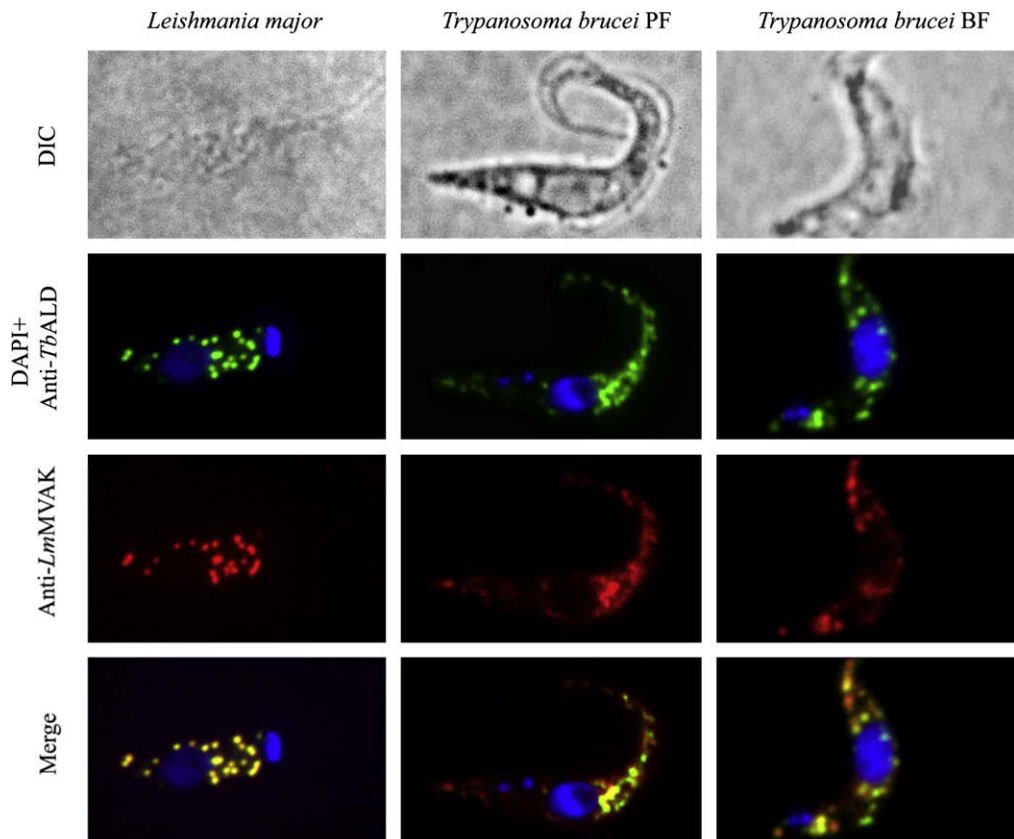


Fig. 4. Indirect immunofluorescence microscopy for detection of the enzyme MVAK in *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei* cells. DAPI staining indicates the localization of DNA in the nucleus and kinetoplast in blue. The polyclonal antibody anti-TbALD was used as a glycosomal marker (green). For MVAK detection, the anti-LmMVAK antibody was purified with protein-A Sepharose and conjugated directly to Alexa Fluor 594 (red). Merged images are shown and overlapping areas appear in yellow.

which consist of a degenerate nine-residue signal located internally or near the amino terminus. The consensus PTS2 has the sequence (R/K)(L/V/I)X5(H/Q)(L/A) (Rachubinski and Subramani, 1995). LmMVAK and TbMVAK both present a PTS1 (SNL and SKL in *L. major* and *T. brucei*, respectively) and a conserved PTS2 (KVILF-GEHF) signal. Indeed, recent proteomic studies have identified MVAK in the glycosomal proteomes of *T. brucei* (Colasante et al., 2006). Here we provide further evidence using digitonin titration and indirect immunofluorescence that MVAK is glycosomal not only in *T. brucei* but also in *L. major*. In the latter MVAK was solubilized following the same pattern of the glycosomal enzyme hexokinase (Fig. 2A and C) and at a digitonin concentration of 0.4 mg mL⁻¹ almost 100% of the enzyme was released, as determined by Western blotting. Immunofluorescence experiments further supported these observations (Fig. 4). Hence cells were incubated with the polyclonal antibody anti-LmMVAK conjugated to the fluorochrome Alexa Fluor 594 (red), and labelled simultaneously with the antibody anti-TbALD (green). MVAK of *L. major* and *T. brucei* appeared compartmentalized in discrete vesicles arranged along the parasite that in colocalization studies with the glycosomal marker overlapped almost 100%.

3.4. Role of PEX2 in import of MVAK to the glycosome

PEX2 is essential for the import of many proteins into the peroxisomes of yeast and mammals (Waterham et al., 1996; Faust and Hatten, 1997) and also in *T. brucei*. Thus, bloodstream forms die rapidly upon RNAi mediated depletion of PEX2 while in procyclics, depletion resulted in a relocation of matrix proteins to the cytosol (Guerra-Giraldez et al., 2002). We examined the distribution of MVAK in the PEX2-depleted strains. In bloodstream forms after 24 h of doxycycline induction, MVAK still exhibited a punctuated fluorescence pattern colocalizing with aldolase (data not shown); however, in procyclic cells depleted of PEX2 for 72 h, aldolase, and especially MVAK, appeared diffusely distributed and lost, in part, the appearance of discrete vesicles that was observed in non-induced control cells (Fig. 5A). The aberrant distribu-

tion demonstrated in the PEX2-depleted cells was even more pronounced in the case of MVAK than that observed for aldolase. Cells were further subjected to fractionation with digitonin and Western blotting was performed (Fig. 5B). The PEX2 mutants were severely defective in targeting MVAK to glycosomes with 46% of the total enzyme relocated to the cytosol in doxycycline treated cells. MVAK in *T. brucei* is a glycosomal enzyme strongly dependent on RING-finger peroxins for efficient organelle import.

4. Discussion

In eukaryotes the subcellular location of the isoprenoid biosynthetic pathway is a controversial subject. It has been described that HMGS and MVAK are localized in the peroxisomes of mammalian cells (Stamellos et al., 1992; Gupta et al., 1999; Olivier et al., 2000; Kovacs et al., 2007) while there are reports indicating a cytosolic location for MVAK in human fibroblasts and liver (Hogenboom et al., 2004). Knowledge about the subcellular destination of proteins is key to elucidating their function. Thus, assembling the complete pathway of isoprenoid biosynthesis in trypanosomes, in terms of spatial organization, may help to better understand sterol trafficking pathways, regulatory features controlling membrane sterol composition and isoprene requirements. We have previously demonstrated that the early step in isoprenoid biosynthesis catalysed by HMGR is located in the mitochondria of both *L. major* and *T. cruzi* (Pena-Diaz et al., 2004). We now show that this is also true for HMGS. Prediction with WoLF PSORT (Horton et al., 2007) indicated a preferentially mitochondrial location for the enzyme, while the probability of being associated with the cytosol was five times lower. Immunofluorescence microscopy studies and digitonin fractionation support that HMGS is also mitochondrial in both *Trypanosoma* and *Leishmania*, which demonstrates an important role of this organelle in providing mevalonate for isoprenoid biosynthesis and raises issues concerning the nature of the source of carbon that contributes to the synthesis of mevalonate-derived products.

Interestingly, previous studies performed in *Leishmania* established leucine as a major substrate for the generation of sterols

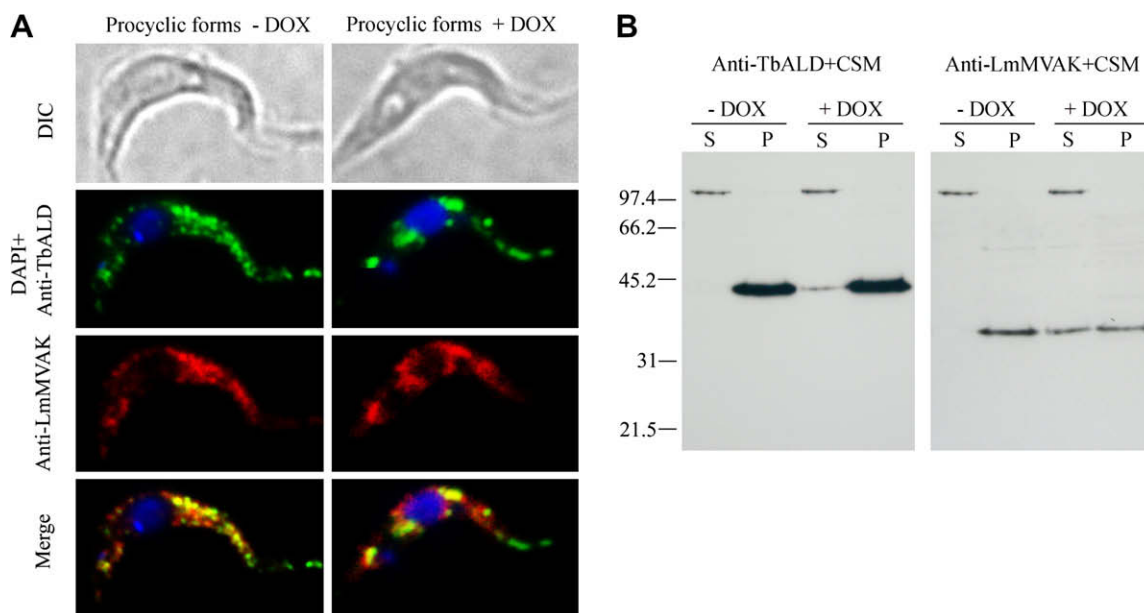


Fig. 5. Effects of depletion of the peroxin PEX2 in *Trypanosoma brucei* procyclics. (A) Indirect immunofluorescence microscopy for detection of the enzyme MVAK. DAPI staining indicates the localization of DNA in the nucleus and kinetoplast in blue. The polyclonal antibody anti-TbALD was used as a glycosomal marker (green). For MVAK detection, the anti-LmMVAK antibody conjugated to Alexa Fluor 594 (red) was used. Merged images are shown and overlapping areas appear in yellow. (B) Western blot analysis showing the distribution of aldolase and MVAK after 3 days of RNA interference (RNAi) induction by means of doxycycline addition. -DOX, RNAi uninduced cells; +DOX, RNAi induced cells; S, soluble fraction; P, pellet. The cytosolic marker (CSM) was used to establish that only the plasma membrane was permeabilized in the assayed conditions.

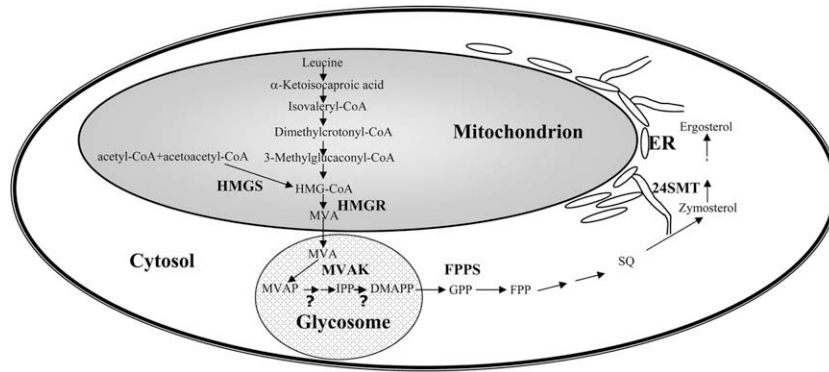


Fig. 6. Schematic representation of the intracellular localization of isoprenoid biosynthesis in the Trypanosomatidae. HMGS, HMG-CoA synthase; HMGR, HMG-CoA reductase; MVAK, mevalonate kinase; FPPS, farnesyl diphosphate synthase; 24SMT, $\Delta^{24,(25)}$ -sterol methenyltransferase; ER, endoplasmic reticulum; MVA, mevalonate; MVAP, mevalonate phosphate; IPP, isopentenyl diphosphate; DMAPP, dimethylallyl diphosphate; GPP, geranyl diphosphate; FPP, farnesyl diphosphate; SQ, squalene.

(Ginger et al., 2001). Degradation of this amino acid via methylglutaconyl-CoA renders HMG-CoA, the substrate of HMGR. However, sterols and isoprenoids in kinetoplastid protozoa can also be labelled using radioactive acetate (Ginger et al., 2000), thus suggesting the existence of an active HMGS. The carbon source for synthesis via HMGS could derive from acetyl-CoA generated in the mitochondria from glucose, fatty acids or amino acid intermediate metabolism. On the other hand, leucine degradation to HMG-CoA has been described to be mitochondrial in different cell types, although this issue remains to be established for the Trypanosomatidae. The location of all these enzymes in the same compartment would confer considerable advantages in terms of energy economy in this organism. However, while in *Leishmania* leucine was a major carbon source for sterol synthesis, this does not appear to be true for *Trypanosoma* (Ginger et al., 2000). The recently obtained genome data may provide answers to this observation as, surprisingly, both *T. brucei* and *T. cruzi* genomes appear to encode a protein exhibiting high identity with HMG-CoA lyase, an enzyme that catalyses the conversion of HMG-CoA to acetyl-CoA and acetoacetate, thus channelling HMG-CoA towards alternative metabolic pathways. Curiously no sequence coding for a lyase could be found in the *L. major* genome which could explain the increased availability of this intermediate for isoprenoid biosynthesis in *Leishmania*. In mammalian cells two forms of HMGS exist, a mitochondrial form is involved in ketone body production while a cytosolic HMGS provides intermediates for isoprenoid metabolism (Royo et al., 1993). In trypanosomes the observation that HMGS together with HMGR (Heise and Oppendoes, 2000; Pena-Diaz et al., 2004) are mitochondrial suggests an interplay between leucine degradation, HMGS and lyase activity, directing carbon towards either mevalonate formation and isoprenoid biosynthesis or ketone body production.

To determine the extent of mitochondria-associated isoprenoid biosynthesis we have analysed in detail the intracellular location of the next step in isoprenoid metabolism, catalysed by MVAK, in *T. brucei* and in *L. major*. Soluble recombinant MVAK was readily obtained, yet the enzyme proved to be inactive using a spectrophotometric assay as previously described (Chu and Li, 2003). This observation is consistent with a recent study reporting the crystallization of the recombinant protein, yet efforts to determine activity were not successful (Sgraja et al., 2007). Apparently the ATP-binding site adopts a conformation that hinders access of the nucleotide triphosphate.

Here we provide evidence further supporting the view that the enzyme is associated with the glycosomal matrix in *L. major* promastigotes as well as in *T. brucei* procyclic and bloodstream forms. The distribution of this pathway between mitochondrion (Heise and Oppendoes, 2000; Pena-Diaz et al., 2004), glycosomes, cytosol

(Ortiz-Gomez et al., 2006; Ferella et al., 2008), endoplasmic reticulum and vesicles (Jimenez-Jimenez et al., 2008) depicted in Fig. 6 may reflect a dynamic localization of enzymes, coordinating cellular isoprenoid production and sterol synthesis to satisfy cellular requirements. Furthermore, we show that peroxins, specifically PEX2, are involved in the importation of an enzyme involved in isoprenoid biosynthesis into the glycosome of *T. brucei*. The peroxisomal RING-finger proteins-PEX2, PEX10 and PEX12-comprise a network of integral membrane proteins that function in the matrix protein import cycle. In *Saccharomyces cerevisiae* the peroxisomes of *pex2* mutants are reduced to empty ghosts (Hettema et al., 2000) while procyclic forms of *T. brucei* depleted of PEX2 showed a relocation of most tested matrix proteins to the cytosol, together with pronounced growth defects (Guerra-Giraldez et al., 2002). An alteration in the distribution of enzymes involved in the isoprenoid pathway could contribute to the observed growth defects in PEX2-depleted cells since several end-products are involved in essential cell processes (Edwards and Ericsson, 1999). Moreover, MVAK appeared to be highly dependent on PEX2 for correct localization since the perturbation in distribution was even more pronounced than in the case of aldolase, a typically glycosomal enzyme.

This multiple intracellular location raises several issues related to isoprenoid metabolism. It is unclear how mevalonate crosses the mitochondrial membrane and enters the glycosome prior to phosphorylation by MVAK, although it may well be through passive diffusion. On the other hand, the cytosolic location of FPPS reported in both *L. major* and *T. cruzi* (Ortiz-Gomez et al., 2006; Ferella et al., 2008) involves the exit of phosphorylated products of mevalonate that need to cross the glycosomal membrane to serve as substrates for FPP synthesis. Finally, why phosphorylation specifically occurs in the glycosome is intriguing and may have metabolic implications regarding ATP availability.

In summary, isoprenoid biosynthesis exhibits particular characteristics in the Trypanosomatidae regarding its intracellular location, since the steps involved take place in multiple compartments different from those observed in mammalian cells (Kovacs and Krisans, 2003) and the mitochondrion appears to play a major role in controlling carbon flow through the isoprenoid pathway. How trafficking of intermediates may occur and the possible metabolic significance of the existence of multiple sites is currently under investigation.

Acknowledgements

We thank the Spanish Plan National (SAF2004-03828), the RICET FIS Network (RD06/0021) and the Junta de Andalucía (CVI-199) for funding. We wish to acknowledge Christine Clayton for providing the *T. brucei* RNAi *PEX2* strains and Paul Michels for

the anti-TbALD antibody. We thank Victoria González for revising the English in the manuscript.

References

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Callens, M., Kuntz, D.A., Opperdoes, F.R., 1991. Characterization of pyruvate kinase of *Trypanosoma brucei* and its role in the regulation of carbohydrate metabolism. *Mol. Biochem. Parasitol.* 47, 19–29.
- Cammerer, S.B., Jimenez, C., Jones, S., Gros, L., Lorente, S.O., Rodrigues, C., Rodrigues, J.C., Caldera, A., Ruiz Perez, L.M., da Souza, W., Kaiser, M., Brun, R., Urbina, J.A., Gonzalez Pacanowska, D., Gilbert, I.H., 2007. Quinuclidine derivatives as potential antiparasitics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 4049–4061.
- Chu, X., Li, D., 2003. Cloning, expression, and purification of His-tagged rat mevalonate kinase. *Protein Expr. Purif.* 27, 165–170.
- Colasante, C., Ellis, M., Ruppert, T., Voncken, F., 2006. Comparative proteomics of glycosomes from bloodstream form and procyclic culture form *Trypanosoma brucei brucei*. *Proteomics* 6, 3275–3293.
- Croft, S.L., Barrett, M.P., Urbina, J.A., 2005. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 21, 508–512.
- de Marval, M.G., Souto-Padron, T., Gottesdiener, K., Silva, R., van der Ploeg, L.H., Rondinelli, E., 1993. Heat shock proteins in *Trypanosoma cruzi*: identification and localization of HSP70 and HSP60 proteins and structure of HSP60 genes (brief report). *Biol. Res.* 26, 313–314.
- Edwards, P.A., Ericsson, J., 1999. Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 157–185.
- Estevez, A.M., Kierszenbaum, F., Wirtz, E., Bringaud, F., Grunstein, J., Simpson, L., 1999. Knockout of the glutamate dehydrogenase gene in bloodstream *Trypanosoma brucei* in culture has no effect on editing of mitochondrial mRNAs. *Mol. Biochem. Parasitol.* 100, 5–17.
- Faust, P.L., Hatten, M.E., 1997. Targeted deletion of the PEX2 peroxisome assembly gene in mice provides a model for Zellweger syndrome, a human neuronal migration disorder. *J. Cell. Biol.* 139, 1293–1305.
- Ferella, M., Li, Z.H., Andersson, B., Docampo, R., 2008. Farnesyl diphosphate synthase localizes to the cytoplasm of *Trypanosoma cruzi* and *T. Brucei*. *Exp. Parasitol.* 119, 308–312.
- Ginger, M.L., Chance, M.L., Sadler, I.H., Goad, L.J., 2001. The biosynthetic incorporation of the intact leucine skeleton into sterol by the trypanosomatid *Leishmania mexicana*. *J. Biol. Chem.* 276, 11674–11682.
- Ginger, M.L., Prescott, M.C., Reynolds, D.G., Chance, M.L., Goad, L.J., 2000. Utilization of leucine and acetate as carbon sources for sterol and fatty acid biosynthesis by Old and New World *Leishmania* species, *Endotrypanum monterogeei* and *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Biochem.* 267, 2555–2566.
- Guerra-Giraldez, C., Quijada, L., Clayton, C.E., 2002. Compartmentation of enzymes in a microbody, the glycosome, is essential in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci.* 115, 2651–2658.
- Gupta, S.D., Mehan, R.S., Tansey, T.R., Chen, H.T., Goping, G., Goldberg, I., Shechter, I., 1999. Differential binding of proteins to peroxisomes in rat hepatoma cells: unique association of enzymes involved in isoprenoid metabolism. *J. Lipid. Res.* 40, 1572–1584.
- Hausler, T., Stierhof, Y.D., Blattner, J., Clayton, C., 1997. Conservation of mitochondrial targeting sequence function in mitochondrial and hydrogenosomal proteins from the early-branching eukaryotes *Crithidia*, *Trypanosoma* and *Trichomonas*. *Eur. J. Cell Biol.* 73, 240–251.
- Heise, N., Opperdoes, F.R., 2000. Localisation of a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in the mitochondrial matrix of *Trypanosoma brucei* procyclics. *Z. Naturforsch. [C]* 55, 473–477.
- Helfert, S., Estevez, A.M., Bakker, B., Michels, P., Clayton, C., 2001. Roles of triosephosphate isomerase and aerobic metabolism in *Trypanosoma brucei*. *Biochem. J.* 357, 117–125.
- Hettema, E.H., Girzalsky, W., van Den Berg, M., Erdmann, R., Distel, B., 2000. *Saccharomyces cerevisiae* pex3p and pex19p are required for proper localization and stability of peroxisomal membrane proteins. *EMBO J.* 19, 223–233.
- Hogenboom, S., Tuyp, J.J., Espeel, M., Koster, J., Wanders, R.J., Waterham, H.R., 2004. Mevalonate kinase is a cytosolic enzyme in humans. *J. Cell Sci.* 117, 631–639.
- Horton, P., Park, K.J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C.J., Nakai, K., 2007. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res.* 35, W585–W587.
- Jimenez-Jimenez, C., Carrero-Lerida, J., Sealey-Cardona, M., Ruiz Perez, L.M., Urbina, J.A., Gonzalez Pacanowska, D., 2008. Delta(24 (25))-sterol methenyltransferase: Intracellular localization and azasterol sensitivity in *Leishmania major* promastigotes overexpressing the enzyme. *Mol. Biochem. Parasitol.* 160, 52–59.
- Kovacs, W.J., Krisans, S., 2003. Cholesterol biosynthesis and regulation: role of peroxisomes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 544, 315–327.
- Kovacs, W.J., Olivier, L.M., Krisans, S.K., 2002. Central role of peroxisomes in isoprenoid biosynthesis. *Prog. Lipid Res.* 41, 369–391.
- Kovacs, W.J., Tape, K.N., Shackelford, J.E., Duan, X., Kasumov, T., Kelleher, J.K., Brunengraber, H., Krisans, S.K., 2007. Localization of the pre-squalene segment of the isoprenoid biosynthetic pathway in mammalian peroxisomes. *Histochem. Cell Biol.* 127, 273–290.
- Massarini, E., Cazzulo, J.J., 1975. Two forms of citrate synthase in a marine *Pseudomonad*. *FEBS Lett.* 57, 134–138.
- Misra, I., Wang, C.Z., Mizioro, H.M., 2003. The influence of conserved aromatic residues in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase. *J. Biol. Chem.* 278, 26443–26449.
- Montalvetti, A., Pena-Diaz, J., Hurtado, R., Ruiz-Perez, L.M., Gonzalez-Pacanowska, D., 2000. Characterization and regulation of *Leishmania major* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *Biochem. J.* 349, 27–34.
- Olivier, L.M., Kovacs, W., Masuda, K., Keller, G.A., Krisans, S.K., 2000. Identification of peroxisomal targeting signals in cholesterol biosynthetic enzymes. AA-CoA thiolase, hmg-coa synthase, MPPD, and FPP synthase. *J. Lipid Res.* 41, 1921–1935.
- Ortiz-Gomez, A., Jimenez, C., Estevez, A.M., Carrero-Lerida, J., Ruiz-Perez, L.M., Gonzalez-Pacanowska, D., 2006. Farnesyl diphosphate synthase is a cytosolic enzyme in *Leishmania major* promastigotes and its overexpression confers resistance to risedronate. *Eukaryot. Cell* 5, 1057–1064.
- Pena-Diaz, J., Montalvetti, A., Flores, C.L., Constan, A., Hurtado-Guerrero, R., De Souza, W., Gancedo, C., Ruiz-Perez, L.M., Gonzalez-Pacanowska, D., 2004. Mitochondrial localization of the mevalonate pathway enzyme 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase in the Trypanosomatidae. *Mol. Biol. Cell.* 15, 1356–1363.
- Racagni, G.E., Machado de Domenech, E.E., 1983. Characterization of *Trypanosoma cruzi* hexokinase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 9, 181–188.
- Rachubinski, R.A., Subramani, S., 1995. How proteins penetrate peroxisomes. *Cell* 83, 525–528.
- Roberts, C.W., McLeod, R., Rice, D.W., Ginger, M., Chance, M.L., Goad, L.J., 2003. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Mol. Biochem. Parasitol.* 126, 129–142.
- Rodrigues, J.C., Bernardes, C.F., Visbal, G., Urbina, J.A., Vercesi, A.E., de Souza, W., 2007. Sterol methenyl transferase inhibitors alter the ultrastructure and function of the *Leishmania amazonensis* mitochondrion leading to potent growth inhibition. *Protist* 158, 447–456.
- Royo, T., Pedragosa, M.J., Ayte, J., Gil-Gomez, G., Vilaro, S., Hegardt, F.G., 1993. Testis and ovary express the gene for the ketogenic mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase. *J. Lipid Res.* 34, 867–874.
- Sgraja, T., Smith, T.K., Hunter, W.N., 2007. Structure, substrate recognition and reactivity of *Leishmania major* mevalonate kinase. *BMC Struct. Biol.* 7, 20.
- Stamellos, K.D., Shackelford, J.E., Tanaka, R.D., Krisans, S.K., 1992. Mevalonate kinase is localized in rat liver peroxisomes. *J. Biol. Chem.* 267, 5560–5568.
- Stephens, J.L., Lee, S.H., Paul, K.S., Englund, P.T., 2007. Mitochondrial fatty acid synthesis in *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* 282, 4427–4436.
- Subramani, S., 1993. Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9, 445–478.
- Waterham, H.R., de Vries, Y., Russel, K.A., Xie, W., Veenhuis, M., Cregg, J.M., 1996. The *Pichia pastoris* PER6 gene product is a peroxisomal integral membrane protein essential for peroxisome biogenesis and has sequence similarity to the Zellweger syndrome protein PAF-1. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2527–2536.
- Zhou, T., Daugherty, M., Grishin, N.V., Osterman, A.L., Zhang, H., 2000. Structure and mechanism of homoserine kinase: prototype for the GHMP kinase superfamily. *Structure* 8, 1247–1257.

3. RESULTADOS

3.2. ANEXO II RESUMEN

Squalene synthesis is required for cell proliferation in both procyclic and bloodstream forms in *Trypanosoma brucei*

En este trabajo se explora el papel de la escualeno sintasa (*TbSQS*), que cataliza la primera reacción específica en la síntesis de esteroides, en *Trypanosoma brucei*. Para ello se han realizado experimentos de interferencia de RNA para la *TbSQS* en formas procíclicas y sanguíneas. Los resultados muestran que la depleción de la *TbSQS* en parásitos procíclicos produce una pérdida de viabilidad celular que se ve potenciada en ausencia de esteroides exógenos. El análisis de los perfiles lipídicos llevados a cabo mediante GC-MS y experimentos de marcaje metabólico con ácido mevalónico marcado revelan que los efectos del RNAi en células procíclicas están asociados a la reducción de esteroides de síntesis endógena de tipo ergosta. Por otra parte, estudios ultraestructurales y de inmunofluorescencia muestran que una depleción de la *TbSQS* da lugar a la aparición de vacuolas de naturaleza lipídica, cambios en el ciclo celular y alteraciones en la morfología, destacando la aparición de células polinucleadas en el caso de la forma sanguínea lo que indica alteraciones en la citocinesis.

Para determinar la esencialidad de la ruta de una forma definitiva en formas sanguíneas de *T. brucei* se intentó generar una línea celular *knock-out* para el gen de la *TbSQS*. El reemplazamiento de un solo alelo produce una potente inhibición de la proliferación celular en la forma sanguínea del parásito, lo que sugiere que la síntesis de esteroides es esencial para la forma clínicamente relevante de *T. brucei*. La expresión de una copia ectópica con el fin de proceder al reemplazamiento del segundo alelo resultó ser tóxica y no fue posible obtener mutantes *knock-out* homocigotos. Concluimos que la síntesis de esteroides es un proceso esencial en ambas formas de vida del parásito y que los compuestos de nueva síntesis cumplen funciones que no pueden ser sustituidas por los esteroides procedentes del medio de cultivo.

3. RESULTADOS

3.2. ANEXO II

Squalene synthesis is required for cell proliferation in both procyclic and bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*

1. Introduction

Protozoan parasites are responsible for a significant portion of the global morbidity, mortality, and economic hardship, and in most countries current control and treatment regimes are either failing or under serious threat (Barrett et al., 2003). African trypanosomiasis, caused by *Trypanosoma brucei* spp., is responsible for tens to hundreds of thousands of human infections annually in areas of sub-Saharan Africa where the infection is endemic and is compounded by the impact of the disease on animal welfare and productivity. Without treatment trypanosomiasis is invariably fatal, and the need of treatment is urgent. Mechanism for combating pathogenic protozoa rely on development and exploitation of new drug targets and/or vaccine candidates as well as efforts at vector control, all of which require detailed understanding of the biology of the pathogen and its relationship with the host and vector (Barry and McCulloch, 2001).

During their life cycle, trypanosomes encounter many different environments and respond to these by dramatic morphological and metabolic changes, including adaptation of their energy metabolism. As the lipid metabolism of trypanosomes differs in many respects from that of its mammalian host, it offers potential and promising targets for the development of urgently needed, new chemotherapeutic drugs to combat these parasites (van Hellemond and Tielens, 2006).

Previous studies have shown that trypanosomes and *Leishmania* have ergosterol and other 24-alkylated sterols in addition to cholesterol as the major sterols present in their cells, as found in fungi and plants (Goad et al., 1984; Urbina et al., 1998; Nes, 2000; Gros et al., 2006). This contrasts with the situation in mammalian cells, which lack ergosta (C28) type sterols.

Procyclic forms of African trypanosomes do not synthesize cholesterol *de novo*, but instead synthesize ergosterol and other 24-alkylated sterol similar to plants and fungi (Roberts et al., 2003). However, when cholesterol is present in their environment it is incorporated by the parasite without further metabolism (Dixon et al., 1972). Trypanosomes acquire cholesterol from the host via receptor-mediated endocytosis of low density lipoproteins (LDL) followed by lysosomal degradation (Coppens and Courtoy, 1995; Coppens et al., 1995). Procyclic trypanosomes are flexible with respect to the source of sterols, as these cells adjust their *de novo* ergosterol biosynthesis to the external supply of cholesterol (Coppens and Courtoy, 1995).

With regard to bloodstream form trypanosomes, which contain predominantly cholesterol, the current dogma is that they are strongly dependent on sterol uptake from the host, as lipoproteins have been demonstrated to be an essential source of cholesterol for these cells (Coppens et al., 1995) and they do not synthesize sterols *de novo*. However a study performed by Low et al. where labelling experiments using radioactive mevalonate were employed to analyse sterol biosynthesis in bloodstream forms (Low et al., 1991) has demonstrated the existence of endogenous sterol biosynthesis in this form of the parasite and this endogenous sterol as determined by GC-MS was identified as cholesterol. Later studies have determined in detail the sterol composition of BFs and have shown that these forms are sensitive to inhibitors of the biosynthetic pathway (Gros et al., 2006; Zhou et al., 2007). These observations contrast with the idea that sterol synthesis *de novo* does not occur in bloodstream forms of *T. brucei*.

The biosynthesis of sterols is a major route for the intervention in the development of anti-trypanosomals in the case of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. (Magaraci et al., 2003; Lorente et al., 2004; Urbina et al., 2004; Hucke et al., 2005). Interest has emerged due to the observation that these parasites have close similarities to fungi in relation to sterol composition and sterol biosynthesis. This has offered a unique opportunity for the development of chemotherapy by targeting the sterol biosynthetic pathway using the type of drugs already successfully employed against fungal pathogens (Roberts et al., 2003). In the case of *Trypanosoma brucei*, sterol biosynthesis inhibitors have received less attention due to the assumption that the bloodstream form of the parasite does not require endogenous sterols for growth and that sterol requirements are satisfied by LDL-mediated sterol uptake from the host.

However recent studies have demonstrated that inhibitors of the enzymes sterol methyl transferase and sterol α -demethylase inhibit the growth of BFs of *T. brucei* and emerge as candidates for new antitrypanosomals (Cammerer et al., 2007; Lepesheva et al., 2007). These observations question the established role of the metabolic pathway in this life form (Coppens and Courtoy, 1995, 2000).

The enzyme squalene synthase (SQS, EC 2.5.1.21) catalyzes the condensation of two molecules of farnesyl diphosphate to produce squalene, the first committed step of the sterol pathway. Is the first enzyme branched out from other farnesyl pyrophosphate (FPP) derivatives, ubiquinones, dolichols, heme, and C₁₅- or C₂₀-isoprenoid chains. Loss of its function in *S. cerevisiae* leads to cell death (Jennings et al., 1991) due to the defect of ergosterol biosynthesis. Therefore inhibitors of this enzyme as candidates of antifungal compound and antitrypanosomals have been intensively pursued. Recently, the SQS from *Trypanosoma cruzi* has been cloned and characterized, studies with quinuclidine derivative inhibitors shows a very potent (sub-nanomolar) activity and selectivity for the parasite enzyme (Sealey-Cardona et al., 2007).

In order to explore the role of the late steps of ergosterol biosynthetic pathway in cell viability and morphogenesis and to obtain conclusive evidence regarding the role of sterol biosynthesis in the both procyclic and the clinically relevant bloodstream forms, we examined the effect of depletion of squalene synthase (*ERG9*) levels using RNAi and *knock-out* studies in the model organism *T. brucei*. The information obtained raises new issues regarding the role of this metabolic pathway and its pharmacological potential in African trypanosomiasis.

2. Materials and methods

2.1. Compounds

Fetal bovine lipoprotein depleted serum media supplement was purchased from Kalen Biomedical and ketoconazole, mevastatine and terbinafine from Sigma Aldrich. These compounds were dissolved in 100% dimethyl sulfoxide (DMSO); the final concentration of DMSO in the cultures did not exceed 0.1 % (vol/vol) and had not effect on cell proliferation.

2.2. RNAi plasmids construct.

Two different construct were made for RNAi studies. *ERG9* (GeneBank™ accession number XP-847542) open reading frame was amplified using *T. brucei* Lister 427 genomic DNA as template, and cloned into the pGEM-T vector system I (Promega). Taq polymerase was used to amplify fragments for RNA interference, were cloned into the tetracycline-inducible vector pGR19 (Clayton et al., 2005). A fragment of the *TbSQS* for construction 1, 538 bp was selected and amplified by PCR with the primers *TbSQS1* 5' BamHI/HindIII (5'-GAGGATCCAAGCTTGAGTTCAAACACTGCG -3') and *TbSQS1* 3' HpaI/ApaI (5'-AACGGGCCCGTCGGTGTACTGTCCC -3'). The *TbSQS* construction 2 generated a 553 bp fragment with the primers *TbSQS2* 5' BamHI/HindIII (5'-CGGATCCAAGCTTGGCCGCGCGAAATATG -3') and *TbSQS2* 3' HpaI/ApaI (5'-AACGGGCCAGCACTCGCCGTGTCCGTCC -3'). These constructs involve two cloning steps. Firstly, the PCR products were cloned into the *Hind* III and *Apa* I sites of *stuffer* vector pGR19 (sense). Secondly, the fragments were digested with *Bam*HI to clone into the *Bam*HI and *Hpa* I restriction sites of pGR19 (antisense), yielding **pGR19-*TbSQS1*** and **pGR19-*TbSQS2***.

2.3. Generation of *knock-out* mutants

To assess the essentiality of the *TbSQS* in *T. brucei*, the two alleles of the *TbERG9* gene were replaced by blasticidin S transferase (*BSD*) and hygromycin phosphotransferase (*HYG*) resistance genes. Previously to perform the second allele replacement, was introduced an ectopic copy of *ERG9* gene where the *SQS* expression happen by adding of doxycycline. Firstly, a 5'UTR fragment of 695 bp and a 3'UTR fragment of 688 bp of the regions flanking the open reading frame of *T. brucei* *ERG9* gene were amplified by PCR from *T. brucei* 427 genomic DNA. The primers used were designed from the sequence found in the Gene DB database (XP-847542), which were 5'-CGCATATGCCACCGGTACTTGAATGAAT -3' (*Nde* I restriction site underlined) and 5'-CGCTCGAGCCGCATCTGCCACCGTACGCGG -3' (*Xho* I) in the case of 5'-UTR region, and 5'-GCGGCCGCATTGGGAGGCGGGCTTCTGCT-3' (*Not* I) and 5'-CTCGAGCATATGGGTAATAGGTAAGTAAGCAC-3' (*Xho* I and *Nde* I) for 3'UTR region. Secondly, to remove one of the two *ERG9* alleles, 5'UTR and 3'UTR regions were ligated consecutively by a *Nde*I restriction site and cloned into

pHD887 vector upstream of the *BSD* resistance gene yielding the construct pHD887-KO1A.

After, SQS ectopic copy was obtained by ORF *TbSQS* amplification with the restriction sites *Nde* I and *Ase* I and cloning in a expression plasmid, which affords regulated expression of the corresponding gene from a procyclin promoter responsive to doxycycline and a *PAC* (puromycin *N*-acetyl transferase) resistance gene as selectable drug. The resultant plasmid was called KOTbSQSCE.

Finally, for removing the second of the *TbERG9* allele, the *HYG* selectable marker obtained from pGR19 (Clayton et al., 2005) by digestion with *Sna*B I was subcloned into *Sna*B I digested pHD887-KO1A replacing the *BSD* resistance gene and yielding the construct pHD887-KO2A.

2.4. Trypanosome culture and transfection for RNAi experiments.

The *T. brucei brucei* procyclic cell line *Tb449* and the bloodstream form cell line *TbS16* were used to generate RNAi transfectants (Estevez et al., 2001). Procyclic forms *T. brucei* were maintained at 28°C in SDM-79 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and bloodstream were cultured at 37°C and 5 % CO₂ in HMI-9 with 10% fetal bovine serum. Cells were grown in presence of 0.5 µg·mL⁻¹ phleomycin (procyclic forms) or 2.5 µg·mL⁻¹ G418 (bloodstream forms) in order to maintain the tetracycline repressor expression. Transfection of procyclic and bloodstream parasites using plasmids linearized with *Not* I were carried out as previously described (Biebinger et al., 1997; Alibu et al., 2005; Clayton et al., 2005) and the cell lines were selected with 50 µg·mL⁻¹ and 5 µg·mL⁻¹ hygromycin for procyclic and bloodstream forms, respectively. Synthesis of dsRNA was induced by the addition of 1 µg·mL⁻¹ doxycycline for each *knock-down*. For further experiments, one clone of each gene was selected based on the tightness of doxycycline expression of dsRNA and the robust elimination of target mRNA, as determined by Northern blot analysis using the appropriate gene fragment as a probe.

2.5. Transfections of trypanosomes with knock-out plamids.

To transfect the knock-out vectors the *T. b. brucei* procyclic cell line *Tb449* and the bloodstream form cell lines *TbS16* were used. The plasmids pHD887-KO1A, pHD887-KO2A and pGRV23b-KOCE were digested with *Nde* I, *Age* I and *Not* I,

respectively, to linearized the plasmids. Cells were electroporated and selected as described (Estevez et al., 2001). The concentrations of selecting drugs were 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ blasticidin, 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ puromycin and 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ hygromycin for bloodstream forms; and 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ blasticidin, 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ puromycin and 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ hygromycin for procyclic forms. The SQS ectopic copy expressions was induced by the addition of 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ doxycycline for bloodstream forms and 0.005 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ doxycycline for procyclic forms.

2.6. Northern blot analysis

For Northern blotting 10 μg of total RNA were separated on formaldehyde gels and blotted onto membrane (Nitre® Schleicher and Schuell). Probes for the Northern blots were amplified by PCR and labelled with Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System (GE Healthcare) following the manufacturer's instructions. As a loading control we used SRP probe (Estevez et al., 2001) and densitometric analyses of Northern blots were performed by using the 1D-manager program (TDI).

2.7. Western blotting

For the preparations of *T. brucei* lysates, the parasites were washed twice in PBS (pH 7.2) and lysed by sonication in the same buffer supplemented with protease inhibitors. Blocking and antibody incubation were performed in PBS containing 5% non-fat milk and 0.05% Tween 20. The membrane was blocked with 5% (wt/vol) nonfat powdered milk in PBS and incubated with a 1:2500 dilution of a polyclonal antibody generated against purified recombinat *Tc*SQS . The immunoreactivity was visualized using a secondary anti-body, anti-rabbit IgG HRP-conjugated diluted 1:5000. Bound antibody was visualized using ECLTM immunodetection reagents (Amersham).

2.8. Southern blot analysis

For Southern blots genomic *T. brucei* DNA (1 mg) was digested with *SspI* and *EcoRV* restriction enzymes, and the digestion products were separated on a 0.8% agarose gel and transferred to Hybon-N membrane (Amersham). The membrane was hybridized overnight at 42°C with the labelled *SQS* ORF probe. Bound probe was detected using a Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System (GE Healthcare).

2.9. Electron microscopy

T. brucei SQS RNAi bloodstream cell lines non-induced and induced for 10 days and *T. brucei* SQS RNAi procyclic cell lines non-induced and induced for 6 days were collected and fixed in 0.5 % glutaraldehyde, 4 % p-formaldehyde, 0.5% picric acid and 3.5% sucrose in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) during 12 h at 4°C. Free aldehyde was quenched with 0.1 M glycine for 1 h and the samples were dehydrated in 50 to 100 % ethanol and embedded in LRWhite resin at -20 °C. Finally, the samples were subjected to polymerization for 2 days at -20 °C in UV and 1 day at room temperature. Ultrathin sections of 500 Å thicknesses were obtained and collected on nickel grids. The sections were observed under a Zeiss 902 10 CR electron microscope at 100 kV.

2.10. Flow cytometry

The flow cytometry analysis of propidium iodide-stained trypanosome cells was carried out as previously described (Castillo-Acosta et al., 2008). The DNA content of propidium iodide-stained cells was analyzed with a fluorescence-activated cell sorting scan (FACS) analytical flow cytometer (BD Biosciences). The percentages of cells in each phase of the cell cycle (G1, S, and G2/M) were determined by the BD CellQuest™ Pro version 4.0.2 software (BD Biosciences).

2.11. Indirect immunofluorescence microscopy.

For the localization of *Tb*SQS using deconvolution epifluorescence microscopy, parasites were collected, washed 3 times with PBS and fixed with 4% formaldehyde in PBS for 20 min at RT. The fixed cells were adhered to poly-L-lysine-coated coverslips, permeabilized using 0.1% NP-40 for 20 min and blocked using 1.5 % BSA in PBS for 1 h. After three washes the cells were incubated for 1 h with the poly-clonal antibody anti-*Tc*SQS (1:250). After three washes with PBS, cells were incubated in the dark with goat anti-rabbit IgG FITC-conjugated (Sigma) diluted 1:40. For colocalization studies the polyclonal antibody *Tb*BiP was used at 1:700 dilution. After three washes with PBS, cells were incubated in the dark with goat anti-rabbit IgG FITC-conjugated (Sigma) diluted 1:40. The polyclonal antibody *Tc*SQS was conjugated with Zenon™ Alexa Fluor 594 Rabbit IgG Labelling Kit (Molecular Probes) diluted 1:100. After three washes with PBS at room temperature in the dark, parasites were finally fixed with 4% p-formaldehyde for 20 min to avoid cross-reaction. After fixation the slides were fixed

with cold methanol (Merck). Samples were treated with Vectashield[®] DAPI (Vector Laboratories) and analyzed on an Olympus microscope. Stacks (0.2- μm z step) acquisition was performed with a microscope system (Cell R IX81; Olympus), 63x/100x objectives, illumination system (MT20; Olympus), and camera (Orca CCD; Hamamatsu). Deconvolution of images was performed using Huygens Essential software (version 3.3; Scientific Volume Imaging). All images displayed in the figures are maximum intensity projections from digitally deconvolved multichannel 3D image datasets. Pseudocoloring and maximum intensity projections were performed using ImageJ software (version 1.37; National Institutes of Health).

2.12. Nile red staining

The cells were harvested by centrifugation, washed three times with PBS and resuspended at 10^7 cells mL^{-1} before to be mounted on poly-L-lysine coated slides and fixed with 4% p-formaldehyde in PBS for 15 min. Preparations were washed one and stained with Nile red $5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in acetone solution for 30 min. The slides were washed three times with PBS and mounted with Vectashield-DAPI. The microscope and digital image acquisition were carried out with a Zeiss Axiophot microscope (Carl Zeiss, INC.).

2.13. Metabolic labelling of *Trypanosomes*

Cells (5×10^7 cells $\cdot\text{mL}^{-1}$) were incubated with [³H] mevalonate ($50 \mu\text{Ci}\cdot\text{mL}^{-1}$) in the different media for 2 hours at 28°C and 37°C for procyclic and bloodstream forms, respectively. At the end of the incubation the cells were centrifuged and subjected to extraction and separation on TLC as indicated below. A LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter (Beckman Coulter[™]) was used to quantify the radioactivity incorporated.

2.14. Lipid composition studies.

For the analysis of the lipid composition in *T. brucei* subsp. *brucei*, total lipids of bloodstream forms and procyclic forms were extracted and fractionated into neutral and polar lipid fractions by silicic acid column chromatography and gas-liquid chromatography (Lorente et al., 2004). The neutral lipid fractions were first analyzed by thin-layer chromatography (on Merck 5721 silica gel plates with hexane - etil ether -

glacial acetic acid [80:20:2] as the developing solvent) and conventional gas-liquid chromatography (isothermic separation in a 4-m glass column packed with 3% OV-1 on Chromosorb 100/200 mesh, with nitrogen as the carrier gas at $24 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, and flame ionization detection in a Varian 3700 gas chromatograph). For quantitative analysis and structural assignments, the neutral lipids were separated in a capillary high-resolution Ultra-2 column (25 m by 0.20 mm [inner diameter]; 5% phenyl-methyl-siloxane; film thickness, $0.33 \text{ }\mu\text{m}$) in a Hewlett-Packard 6890 series II gas chromatograph equipped with an HP5973A mass-sensitive detector. The lipids were injected in chloroform, and the column was kept at 50°C for 1 min, and then the temperature was increased to 270°C at a rate of $25^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ and finally to 300°C at a rate of $1^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$. The carrier gas (He) flow was kept constant at $0.5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. The injector temperature was 250°C , and the detector was kept at 280°C .

3. Results

3.1. Reduced production of *Tb*SQS mRNA results in growth defects in procyclic forms

RNAi mediated knock-down was performed for the SQS gene in both the bloodstream and procyclic forms of the parasite using cells transfected with the two different constructs (figure 1) in order to discard possible phenotypes due to off-target effects. The plasmids pGR19-*Tb*SQS1 and pGR19-*Tb*SQS2 were used in transfection experiments and several resulting clones were recovered and analysed. Construct pGR19-*Tb*SQS1 was selected to further experiments since not differences were observed between both constructs. The effectiveness of RNAi was evaluated by Northern blot and Western blotting. Total RNA was prepared at 2 days of induction (figure 2) and *Tb*SQS transcripts quantified. The efficiency of transcript down-regulation ranged from 80 % in procyclics. Several clones were always tested yet it was not possible to attain increased depletion. In the case of procyclic cells certain defects in growth were observed after RNAi induction (figure 2). Thus cell growth was reduced approximately 30% in doxycycline induced cells. On the other hand, induction of *Tb*SQS RNAi in bloodstream forms was less efficient (60 % reduction in mRNA) and did not result in apparent growth defects.

3.2. Analysis of growth of *Trypanosoma brucei* RNAi cell lines in media supplemented with lipoprotein deficient serum (LPDS)

In order to evaluate the role of *TbSQS* in parasite viability it was of interest to analyse modifications in growth after the induction of RNAi in the absence of an exogenous sterol supply. To this end we have used serum with a low content in lipoproteins. Previous studies have suggested that bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* are auxotrophic for LDL-cholesterol (Coppens et al., 1995), in contrast, the presence of lipoproteins is not critical for procyclics that can be adapted to growth in a medium depleted of LDL-cholesterol (Coppens and Courtoy, 1995) (figure 3). In procyclic cell line (*Tb449*), growth was monitored in a medium supplemented with 10 % lipoprotein-deficient serum (LPDS) instead of normal serum. As shown in figure 3, although the rate was slightly decreased, LPDS supplemented medium supported continued growth thus confirming that procyclics are probably capable of an efficient sterol biosynthesis that allows them to grow when the exogenous sterol supply is limited. This was not the case of the bloodstream form *TbS16* which could not proliferate in a lipoprotein deficient medium (figure 3).

The effect of RNAi mediated depletion of *TbSQS* in procyclic cells was analysed both in medium with whole serum and LPDS. As shown in figure 4, when parasites were grown in the presence of 10% of FBS, only moderate effects on growth were observed after RNAi induction. However when RNAi-mediated *TbSQS* depletion was performed in medium containing LPDS, growth was severely impaired showing that when the supply of exogenous sterols is reduced, endogenous sterol biosynthesis has a major role in parasite viability.

3.3. Gene replacement studies in *Trypanosoma brucei*

Since RNAi mediated depletion was not highly efficient and complete transcript depletion was not achieved, especially in bloodstream forms, further experiments were performed in order to replace both alleles in a cell line containing an ectopic copy of *SQS* under the control of an inducible promoter. The gene is present on chromosome 8 of *T. brucei*, and encodes a protein of predicted mass 51.4 kDa and pI of 6.1. Data from the *T. brucei* genome sequencing project, as well as our Southern blotting analysis (data not shown) showed that *TbSQS* is a single copy gene. As trypanosomes are diploid organisms, we produced two separate constructs for targeted gene replacement of the whole coding sequence of *TbSQS* by the drug resistance markers blasticidin S

deaminase (*BSD*) and hygromycin phosphotransferase (*HYG*). The first allele of *TbSQS* procyclic cells was replaced by the *BSD* marker. The resulting cell line was viable and presented a normal growth phenotype with no apparent morphological defects. This obtained cell line was transfected with the construct *KOTbSQSCE* designed to express an ectopic copy of the gene under the control of the procyclin promoter and with puromycin N-acetyl transferase (*PAC*) as selectable marker. The first observation was that expression of high levels of *SQS* resulted in toxicity and it was necessary to reduce significantly the concentration of doxycycline used in the induction of the ectopic copy to generate lines expressing levels of enzyme that did not exhibit reduced viability. Single knock-out cells expressing the ectopic copy were further transfected repeatedly to eliminate the second copy of the *TbSQS* gene. However, unfortunately viable triple-resistant cells could not be obtained. Southern blotting (figure 5) and PCR analysis (data not shown) of genomic DNA from the single and double-resistant cells confirmed that the construct had integrated at the expected locus, that no other integration events had occurred and that one of the endogenous copies of *TbSQS* had been deleted. Likewise, Northern blotting evidenced a significant reduction in the amount of mRNA already as a consequence of the elimination of a single allele (figure 5). However it was not possible to replace the second allele under any of the conditions tested. These results suggest that extreme fine-tuning of the levels of *TbSQS* are required for correct growth of procyclic cells and that even in the presence of an ectopic copy, recovery of cells lacking both copies of the *ERG9* gene is not feasible.

In the case of bloodstreams, surprisingly elimination of the first allele resulted in a drastic reduction in growth (figure 6). Northern blotting showed a significant decrease in the amount of mRNA for *TbSQS* (figure 5). Introduction of an ectopic copy integrated in the ribosomal RNA locus did not allow for restoration of correct growth. As in the case of procyclics, subsequently, cells were used for transformation in order to knock-out the second copy of the *ERG9* gene. Repeated transfection experiments did not allow for elimination of the second copy of the *ERG9* gene. In sum, precise levels of *TbSQS* seem to be also essential for adequate growth in bloodstream forms of *T. brucei*.

3.4. *SQS*-deficient cells show hypersensitivity to sterol biosynthesis inhibitors

Sensitivity to different sterol biosynthesis inhibitors (SBIs) was monitored in cells depleted for *TbSQS* by RNAi. It was reasoned that if endogenous sterol biosynthesis is a necessary process for adequate growth, cells depleted of *TbSQS* would

be more sensitive to a further blockage in carbon flow through the metabolic pathway than control cells. We have tested three inhibitors acting prior and after squalene synthesis: (1) mevastatin, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase; (2) terbinafine, an inhibitor of squalene epoxidase and (3) ketoconazole, a compound that inhibits sterol 14- α demethylase. Growth inhibition curves are shown in figures 7 and 8. Interestingly, both PFs and BFs are sensitive to SBIs suggesting an important role for *de novo* sterol biosynthesis in cell viability in both life forms. Thus the IC₅₀ values for procyclics were 7 and 13 μ M for terbinafine and ketoconazole, respectively; while in the case of BFs the corresponding IC₅₀ values were 32 and 18 μ M (table 1). Increased growth inhibition was observed in *Tb*SQS depleted bloodstream cells both in the presence of ketoconazole (inhibitor of 14- α demethylase) and mevastatine (an inhibitor of HMG-CoA reductase) with regard to control cells incubated with the drug at the same concentration indicating that perturbations in the pathway due to *Tb*SQS depletion sensitize cells to inhibitors acting at other steps of the pathway (figure 8).

3.5. RNAi mediated depletion of *Tb*SQS results in perturbation of sterol composition and lipid droplet accumulation in procyclic cells

Procyclic cells were analysed for the consequences of *Tb*SQS depletion on total sterol content and ³H-MVA incorporation to sterols. As shown in figure 9, reduced levels of *Tb*SQS resulted in a significant modification in the sterol profile. Thus, there was a pronounced reduction in the amount of ergosta type sterols, while the precursors cholesta-7,24-dienol and cholesta-5,7,24-trienol present in significant amounts in the *Tb*449 parental cell line were practically absent in the RNAi induced cell line, that now contained cholesterol as the main cellular sterol. When short term labelling studies were performed using ³H-MVA, indeed the formation of squalene derived sterols was completely inhibited (figure 10).

Nile red staining was performed and analysed by immunofluorescence microscopy (figure 12). Multiple lipid vesicles were evidenced in *Tb*SQS RNAi cells indicating profound perturbations in lipid homeostasis. While the exact nature of these vesicles has not been determined in the present study, similar structures in yeast have been shown to be storage compartments for triacylglycerols and steryl esters (Daum et

al., 2007; Wagner et al., 2009) which are mobilised when required for end product (i.e. ergosterol) formation.

Further examination of RNAi induced cells by electron microscopy showed the presence of extremely large highly electron dense rounded structures that presumably correspond to the lipid particles revealed by Nile red staining. Electron micrographs shown in figure 13 also evidenced additional modifications in membrane structures such as a certain enlargement of the flagellar pocket.

3.6. *Tb*SQS depleted bloodstream forms exhibit perturbation in the sterol profile and alterations in cytokinesis

RNAi mediated depletion of *Tb*SQS in bloodstream forms resulted in minor modifications in growth yet RNAi was not highly efficient and Western blotting evidenced that protein levels were only mildly reduced (figure 2). These cells were analysed for modification in the cellular sterol profile. Again there was a significant reduction in the amount of cholesta-7,24-dienol and cholesta-5,7,24-trienol present in detectable amounts in the *Tb*S16 parental cell line and therefore upon RNAi induction cholesterol was now more than 99.3 % of the total sterol identified (figure 9). Regarding labelling studies that quantify incorporation of carbon to end products, sterols migrating faster than cholesterol and ergosterol were detected and supposing correspond to cholesta-type sterols that are synthesised *de novo* from mevalonate. The depletion of *Tb*SQS resulted in a net reduction in the incorporation of label to these sterol products as well as a modification in the percentage distribution of the different species separated by TLC (figure 11). *Tb*SQS depleted cells were also analysed for altered morphologies by DAPI staining and counting of DNA content. A significant increase in the number of polyploid cells with multiple nuclei and kinetoplasts were evidenced. This cell population exhibited extremely altered morphologies with multiple flagella and increased size and are the result of multiple rounds of DNA replication and mitosis in the absence of cytokinesis (figures 15 and 16). Electron microscopy was performed with RNAi induced cells and showed the presence of abnormal vesicular structures within the mitochondrion (figure 17 panel F) and large electron dense vesicles that probably correspond to lipid droplets. In addition, the flagellar pocket which is the region where endo and exocytosis processes take place was significantly enlarged (figure 17). These observations further reinforce the idea that although in minor amounts, sterols are

synthesized by bloodstream forms and that perturbation in the sterol biosynthetic pathway result in cellular defects such as faulty cytokinesis and altered membrane morphology.

3.7. Intracellular localization of TbSQS

Immunofluorescence deconvolution microscopy was used for analysing the intracellular localisation of SQS in *Trypanosoma brucei*. The polyclonal antibody used was generated in rabbits using *Trypanosoma cruzi* double truncated soluble SQS expressed and purified as described (Sealey-Cardona et al., 2007). The enzyme in both procyclic and bloodstream forms colocalizes with BiP, a protein located in the lumen of the endoplasmic reticulum and that is frequently used as a marker of this intracellular compartment in *Trypanosoma brucei* (Bangs et al., 1996). Hence, trypanosomal SQS exhibits a similar location as the enzymes from both yeast and mammalian cells (Mullner et al., 2004; Kovacs et al., 2007) where it has been described to be an integral membrane protein with the catalytic domain oriented towards the cytosol in order to readily accept the hydrophylic substrate farnesyl diphosphate (Pandit et al., 2000).

4. Discussion

The importance of SQS in cholesterol metabolism has stimulated research on the mechanism, structure, regulation and essentiality of the enzyme. SQS produces squalene, a C₃₀ isoprenoid, in a two-step reaction in which two molecules of farnesyl diphosphate are condensed head to head (Thompson et al., 1998). Squalene synthase is an attractive target for chemotherapy (Robinson et al., 1993), with many potential inhibitors under investigation.

The potent activity observed for certain compounds that inhibit the sterol biosynthetic pathway in the bloodstream form of the parasite, prompted us to revisit the relatively well documented issue that *T. brucei* bloodstream forms lack the ability to synthesize sterols and depend on the presence in the culture medium of plasma low density lipoprotein particles which are necessary for membrane assembly (Coppens and Courtoy, 1995; Coppens and Courtoy, 2000). Conversely, procyclics may obtain sterols from both exogenous and endogenous sources and both pathways appear to compensate

for each other as incorporation of exogenous lipid down-regulates the isoprenoid biosynthetic machinery (Coppens and Courtoy, 1995).

The analysis of the sterol composition of bloodstream and procyclic forms of *T. brucei* indicated that 24-alkylated sterols are present in procyclics but absent in the bloodstream forms, where cholesterol is the main sterol (Gros et al., 2006; Zhou et al., 2007). The presence of cholesterol is important for the stability and permeability properties of membranes however studies performed in yeast have shown that 24 alkyl sterols also perform important functions and mutants defective in different steps of the biosynthetic pathway exhibit defects in processes such as lipid particle formation, endocytosis, raft domain integrity etc. (Heese-Peck et al., 2002; Pichler and Riezman, 2004). Cumulative mutations affecting sterol biosynthesis in the yeast result in synthetic lethality that is suppressed by alterations in sphingolipid profiles (Valachovic et al., 2006). Indeed, the current concept is that specific sterol intermediates and end products perform different roles in membrane function and toxicity and both the composition and relative balance impact on membrane integrity.

The biological role of the *ERG9* gene in *T. brucei* has not been investigated and the exact requirements of different sterol intermediates/products in cellular function have not been addressed. To understand the role of endogenous sterol synthesis we first isolated the *ERG9* gene from this organism and investigated its essentiality by down regulating its expression by RNAi with a doxycycline regulated system (Alibu et al., 2005). Northern blot analysis clearly indicated that the *ERG9* gene was actively transcribed in both bloodstream forms and procyclics. RNA interference against *TbSQS* in the latter had significant effects on cell growth of the insect form, especially when lipoprotein depleted serum was used in the culture media, and resulted in a depletion of endogenously synthesized sterols. Less severe effects were noted in bloodstreams yet it must be considered that the RNAi was less successful and significant amounts of protein remained after RNAi induction. SQS has been reported to be essential in several organisms and loss of function, for instance, in *S. cerevisiae* leads to cell death (Jennings et al., 1991). Homozygous deletion of the *SQS* gene in mice (*SQS* knock-out) was lethal between embryonic day 9.5 and 12.5 and severe retardation of development and defective neural tube closure was observed, indicating that SQS is essential for development, particularly of the central nervous system (Tozawa et al., 1999).

Conversely, others groups using conditional gene inactivation in mice have reported that loss of viability of cells depleted of squalene was restored by the incorporation of exogenous cholesterol into cells. Apparently the *SQS* deficient mice showed no histological signs of neuronal degeneration, displayed ultrastructurally normal synapses, and exhibited normal motor coordination, concluding that at least some adult neurons no longer require endogenous cholesterol synthesis and can fully meet their cholesterol needs by uptake from their surroundings (Funfschilling et al., 2007). Depletion of the *ERG9* gene in *Candida glabrata* decreased cell viability in laboratory media, whereas it did not affect cell growth in mice. Analyses of the sterol composition of the restored cells in serum-containing media suggested that the defect of ergosterol biosynthesis can be complemented by the incorporation of exogenous cholesterol into the cells. Thus, deactivation of squalene synthase did not affect fungal growth in mice, presumably because the cells were able to incorporate cholesterol from the serum (Nakayama et al., 2000). Finally, squalene accumulation in human plasma does not appear to be toxic and squalene has been described to present protective and antioxidant properties (Smith, 2000; Das et al., 2003).

Certain considerations can be taken into account regarding the possible farnesyl diphosphate accumulation that could take place upon *SQS* inhibition. Thus, farnesyl diphosphate has been shown to be converted to farnesol in different cell types (Muramatsu et al., 2008) and the latter has distinct properties that include “quorum sensing” in *Candida albicans* (Abe et al., 2009; Derengowski et al., 2009) and induction of apoptosis in certain cancer cells (Joo et al., 2007; Scheper et al., 2008). Therefore, in addition to the depletion of essential sterol products, the potential accumulation of farnesol may be considered and could contribute to cytotoxicity in *SQS* depleted cells.

RNAi mediated depletion in bloodstreams resulted in minor effects on growth yet in clear alterations in cell morphology. A significant population of polynucleated cells exhibiting abnormal morphologies was detected by DAPI staining and DIC observation. Electron microscopy revealed pronounced defects in mitochondria membrane appearance with multiple vesicles/ invaginations and enlargement of the region of the flagellar pocket. Cells with multiple nuclei result from defective cytokinesis and repeated rounds of mitosis occurring in the absence of cell division. Indeed cell cycle control appears to have specific features in these organisms and

certain checkpoints present in other cells are absent in *T. brucei* (Hammarton, 2007). In any case, these defects suggest a major role of sterol synthesis in cell morphology and organization and the importance of membrane composition in cell division.

Evidence supporting a fundamental role of *TbSqs* in cell survival in bloodstream forms was obtained in later *knock-out* experiments. While it was not feasible to obtain a double *knock-out* even in the presence of an ectopic copy of the gene under the control of an inducible promoter, the growth defects of the single *knock-out* support the notion that carbon flow through the step catalysed by *TbSqs* is a necessary process for the survival of the clinically relevant form of the parasite. Further studies will determine the role of these processes *in vivo* since it is possible to infect animals with the RNAi/knockout parasites and follow the course of the infection in a mouse model. Since the *TbS16* strain is monomorphic (fails to differentiate to stumpy forms) it is conceivable that there may be differences in the sterol biosynthetic pathway between bloodstream forms cultured *in vitro* and *in vivo* and between monomorphic and pleomorphic strains. While incorporation of mevalonate to sterol products has been demonstrated in animal bloodstream forms (Low et al., 1991) more experimentation will be required to address specific differences related to the differentiation process that occurs during the life cycle of this complex parasite.

5. References

- Abe, S., Tsunashima, R., Iijima, R., Yamada, T., Maruyama, N., Hisajima, T., Abe, Y., Oshima, H., Yamazaki, M., 2009. Suppression of anti-Candida activity of macrophages by a quorum-sensing molecule, farnesol, through induction of oxidative stress. *Microbiology and immunology* 53, 323-330.
- Alibu, V.P., Storm, L., Haile, S., Clayton, C., Horn, D., 2005. A doubly inducible system for RNA interference and rapid RNAi plasmid construction in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology* 139, 75-82.
- Bangs, J.D., Brouch, E.M., Ransom, D.M., Roggy, J.L., 1996. A soluble secretory reporter system in *Trypanosoma brucei*. *Studies on endoplasmic reticulum targeting. The Journal of biological chemistry* 271, 18387-18393.
- Barrett, M.P., Burchmore, R.J., Stich, A., Lazzari, J.O., Frasch, A.C., Cazzulo, J.J., Krishna, S., 2003. The trypanosomiases. *Lancet* 362, 1469-1480.
- Barry, J.D., McCulloch, R., 2001. Antigenic variation in trypanosomes: enhanced phenotypic variation in a eukaryotic parasite. *Advances in parasitology* 49, 1-70.
- Biebinger, S., Wirtz, L.E., Lorenz, P., Clayton, C., 1997. Vectors for inducible expression of toxic gene products in bloodstream and procyclic *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology* 85, 99-112.
- Cammerer, S.B., Jimenez, C., Jones, S., Gros, L., Lorente, S.O., Rodrigues, C., Rodrigues, J.C., Caldera, A., Ruiz Perez, L.M., da Souza, W., Kaiser, M., Brun,

- R., Urbina, J.A., Gonzalez Pacanowska, D., Gilbert, I.H., 2007. Quinuclidine derivatives as potential antiparasitics. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51, 4049-4061.
- Castillo-Acosta, V.M., Estevez, A.M., Vidal, A.E., Ruiz-Perez, L.M., Gonzalez-Pacanowska, D., 2008. Depletion of dimeric all-alpha dUTPase induces DNA strand breaks and impairs cell cycle progression in *Trypanosoma brucei*. *The international journal of biochemistry & cell biology* 40, 2901-2913.
- Clayton, C.E., Estevez, A.M., Hartmann, C., Alibu, V.P., Field, M., Horn, D., 2005. Down-regulating gene expression by RNA interference in *Trypanosoma brucei*. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J)* 309, 39-60.
- Coppens, I., Courtoy, P.J., 1995. Exogenous and endogenous sources of sterols in the culture-adapted procyclic trypomastigotes of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology* 73, 179-188.
- Coppens, I., Levade, T., Courtoy, P.J., 1995. Host plasma low density lipoprotein particles as an essential source of lipids for the bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *The Journal of biological chemistry* 270, 5736-5741.
- Coppens, I., Courtoy, P.J., 2000. The adaptative mechanisms of *Trypanosoma brucei* for sterol homeostasis in its different life-cycle environments. *Annual review of microbiology* 54, 129-156.
- Das, B., Yeger, H., Baruchel, H., Freedman, M.H., Koren, G., Baruchel, S., 2003. In vitro cytoprotective activity of squalene on a bone marrow versus neuroblastoma model of cisplatin-induced toxicity. implications in cancer chemotherapy. *Eur J Cancer* 39, 2556-2565.
- Daum, G., Wagner, A., Czabany, T., Grillitsch, K., Athenstaedt, K., 2007. Lipid storage and mobilization pathways in yeast. *Novartis Foundation symposium* 286, 142-151; discussion 151-144, 162-143, 196-203.
- Derengowski, L.S., De-Souza-Silva, C., Braz, S.V., Mello-De-Sousa, T.M., Bao, S.N., Kyaw, C.M., Silva-Pereira, I., 2009. Antimicrobial effect of farnesol, a *Candida albicans* quorum sensing molecule, on *Paracoccidioides brasiliensis* growth and morphogenesis. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials* 8, 13.
- Dixon, H., Ginger, C.D., Williamson, J., 1972. Trypanosome sterols and their metabolic origins. *Comp Biochem Physiol B* 41, 1-18.
- Estevez, A.M., Kempf, T., Clayton, C., 2001. The exosome of *Trypanosoma brucei*. *The EMBO journal* 20, 3831-3839.
- Funfschilling, U., Saher, G., Xiao, L., Mobius, W., Nave, K.A., 2007. Survival of adult neurons lacking cholesterol synthesis in vivo. *BMC neuroscience* 8, 1.
- Goad, L.J., Holz, G.G., Jr., Beach, D.H., 1984. Sterols of *Leishmania* species. Implications for biosynthesis. *Molecular and biochemical parasitology* 10, 161-170.
- Gros, L., Castillo-Acosta, V.M., Jimenez Jimenez, C., Sealey-Cardona, M., Vargas, S., Manuel Estevez, A., Yardley, V., Rattray, L., Croft, S.L., Ruiz-Perez, L.M., Urbina, J.A., Gilbert, I.H., Gonzalez-Pacanowska, D., 2006. New azasterols against *Trypanosoma brucei*: role of 24-sterol methyltransferase in inhibitor action. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50, 2595-2601.
- Hammarton, T.C., 2007. Cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology* 153, 1-8.
- Heese-Peck, A., Pichler, H., Zanolari, B., Watanabe, R., Daum, G., Riezman, H., 2002. Multiple functions of sterols in yeast endocytosis. *Molecular biology of the cell* 13, 2664-2680.

- Hucke, O., Gelb, M.H., Verlinde, C.L., Buckner, F.S., 2005. The protein farnesyltransferase inhibitor Tipifarnib as a new lead for the development of drugs against Chagas disease. *Journal of medicinal chemistry* 48, 5415-5418.
- Jennings, S.M., Tsay, Y.H., Fisch, T.M., Robinson, G.W., 1991. Molecular cloning and characterization of the yeast gene for squalene synthetase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 6038-6042.
- Joo, J.H., Liao, G., Collins, J.B., Grissom, S.F., Jetten, A.M., 2007. Farnesol-induced apoptosis in human lung carcinoma cells is coupled to the endoplasmic reticulum stress response. *Cancer research* 67, 7929-7936.
- Kovacs, W.J., Tape, K.N., Shackelford, J.E., Duan, X., Kasumov, T., Kelleher, J.K., Brunengraber, H., Krisans, S.K., 2007. Localization of the pre-squalene segment of the isoprenoid biosynthetic pathway in mammalian peroxisomes. *Histochemistry and cell biology* 127, 273-290.
- Lepesheva, G.I., Ott, R.D., Hargrove, T.Y., Kleshchenko, Y.Y., Schuster, I., Nes, W.D., Hill, G.C., Villalta, F., Waterman, M.R., 2007. Sterol 14alpha-demethylase as a potential target for antitrypanosomal therapy: enzyme inhibition and parasite cell growth. *Chemistry & biology* 14, 1283-1293.
- Lorente, S.O., Rodrigues, J.C., Jimenez Jimenez, C., Joyce-Menekse, M., Rodrigues, C., Croft, S.L., Yardley, V., de Luca-Fradley, K., Ruiz-Perez, L.M., Urbina, J., de Souza, W., Gonzalez Pacanowska, D., Gilbert, I.H., 2004. Novel azasterols as potential agents for treatment of leishmaniasis and trypanosomiasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48, 2937-2950.
- Low, P., Dallner, G., Mayor, S., Cohen, S., Chait, B.T., Menon, A.K., 1991. The mevalonate pathway in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. Identification of dolichols containing 11 and 12 isoprene residues. *The Journal of biological chemistry* 266, 19250-19257.
- Magaraci, F., Jimenez, C.J., Rodrigues, C., Rodrigues, J.C., Braga, M.V., Yardley, V., de Luca-Fradley, K., Croft, S.L., de Souza, W., Ruiz-Perez, L.M., Urbina, J., Gonzalez Pacanowska, D., Gilbert, I.H., 2003. Azasterols as inhibitors of sterol 24-methyltransferase in *Leishmania* species and *Trypanosoma cruzi*. *Journal of medicinal chemistry* 46, 4714-4727.
- Mullner, H., Zweytick, D., Leber, R., Turnowsky, F., Daum, G., 2004. Targeting of proteins involved in sterol biosynthesis to lipid particles of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta* 1663, 9-13.
- Muramatsu, M., Ohto, C., Obata, S., Sakuradani, E., Shimizu, S., 2008. Accumulation of prenyl alcohols by terpenoid biosynthesis inhibitors in various microorganisms. *Applied microbiology and biotechnology* 80, 589-595.
- Nakayama, H., Izuta, M., Nakayama, N., Arisawa, M., Aoki, Y., 2000. Depletion of the squalene synthase (ERG9) gene does not impair growth of *Candida glabrata* in mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 44, 2411-2418.
- Nes, W.D., 2000. Sterol methyl transferase: enzymology and inhibition. *Biochimica et biophysica acta* 1529, 63-88.
- Pandit, J., Danley, D.E., Schulte, G.K., Mazzalupo, S., Pauly, T.A., Hayward, C.M., Hamanaka, E.S., Thompson, J.F., Harwood, H.J., Jr., 2000. Crystal structure of human squalene synthase. A key enzyme in cholesterol biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* 275, 30610-30617.
- Pichler, H., Riezman, H., 2004. Where sterols are required for endocytosis. *Biochimica et biophysica acta* 1666, 51-61.
- Roberts, C.W., McLeod, R., Rice, D.W., Ginger, M., Chance, M.L., Goad, L.J., 2003. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in

- apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Molecular and biochemical parasitology* 126, 129-142.
- Robinson, G.W., Tsay, Y.H., Kienzle, B.K., Smith-Monroy, C.A., Bishop, R.W., 1993. Conservation between human and fungal squalene synthetases: similarities in structure, function, and regulation. *Molecular and cellular biology* 13, 2706-2717.
- Scheper, M.A., Shirliff, M.E., Meiller, T.F., Peters, B.M., Jabra-Rizk, M.A., 2008. Farnesol, a fungal quorum-sensing molecule triggers apoptosis in human oral squamous carcinoma cells. *Neoplasia (New York, N.Y)* 10, 954-963.
- Sealey-Cardona, M., Cammerer, S., Jones, S., Ruiz-Perez, L.M., Brun, R., Gilbert, I.H., Urbina, J.A., Gonzalez-Pacanowska, D., 2007. Kinetic characterization of squalene synthase from *Trypanosoma cruzi*: selective inhibition by quinuclidine derivatives. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51, 2123-2129.
- Smith, T.J., 2000. Squalene: potential chemopreventive agent. *Expert opinion on investigational drugs* 9, 1841-1848.
- Thompson, J.F., Danley, D.E., Mazzalupo, S., Milos, P.M., Lira, M.E., Harwood, H.J., Jr., 1998. Truncation of human squalene synthase yields active, crystallizable protein. *Archives of biochemistry and biophysics* 350, 283-290.
- Tozawa, R., Ishibashi, S., Osuga, J., Yagyū, H., Oka, T., Chen, Z., Ohashi, K., Perrey, S., Shionoiri, F., Yahagi, N., Harada, K., Gotoda, T., Yazaki, Y., Yamada, N., 1999. Embryonic lethality and defective neural tube closure in mice lacking squalene synthase. *The Journal of biological chemistry* 274, 30843-30848.
- Urbina, J.A., Payares, G., Contreras, L.M., Liendo, A., Sanoja, C., Molina, J., Piras, M., Piras, R., Perez, N., Wincker, P., Loebenberg, D., 1998. Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: in vitro and in vivo studies. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 42, 1771-1777.
- Urbina, J.A., Concepcion, J.L., Caldera, A., Payares, G., Sanoja, C., Otomo, T., Hiyoshi, H., 2004. In vitro and in vivo activities of E5700 and ER-119884, two novel orally active squalene synthase inhibitors, against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48, 2379-2387.
- Valachovic, M., Bareither, B.M., Shah Alam Bhuiyan, M., Eckstein, J., Barbuch, R., Balderes, D., Wilcox, L., Sturley, S.L., Dickson, R.C., Bard, M., 2006. Cumulative mutations affecting sterol biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* result in synthetic lethality that is suppressed by alterations in sphingolipid profiles. *Genetics* 173, 1893-1908.
- van Hellemond, J.J., Tielens, A.G., 2006. Adaptations in the lipid metabolism of the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*. *FEBS letters* 580, 5552-5558.
- Wagner, A., Grillitsch, K., Leitner, E., Daum, G., 2009. Mobilization of steryl esters from lipid particles of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta* 1791, 118-124.
- Zhou, W., Cross, G.A., Nes, W.D., 2007. Cholesterol import fails to prevent catalyst-based inhibition of ergosterol synthesis and cell proliferation of *Trypanosoma brucei*. *Journal of lipid research* 48, 665-673.

Figure 1

<i>T. brucei</i>	-----MDYVSELYAMIRVRWQMRMAGELQADD---EDLRFCDVLF	DVSRSFALVIM	50
<i>L. major</i>	-----MGFFSDSVAMMRVKWQMRSVKIQVPEE---TDLRFCDIMN	DVSRSFVAVVA	50
<i>S. cerevisiae</i>	MGKLLQLALHPVEMKAALKKFC--RTPLFSDYDQSTSPYLLHCFELLN	LTSRSFAAVIR	58
<i>H. sapiens</i>	-MEFVKCLGHPEEFYNLVRFRIGGKRKVMKMDQDSLSSSLKTCYKYLN	QTSRSFAAVIQ	59
Motif I			
<i>T. brucei</i>	QLK-AALRDAVCVFYLVLRALDVTVEDDMQLP	LEFKLRELPFHTRLHDHTWRLDG-VGEG	108
<i>L. major</i>	QLADQQLRDAICIFYLVLRALDTEDDMSVPVDVKLKEPKFHHTSDMSWCM	SG-VGEG	109
<i>S. cerevisiae</i>	ELH-PELRNCVTLFYLLRALDTEDDMSIEHDLKIDLLRHFHEKLLLT	KWSFDGNAPDV	117
<i>H. sapiens</i>	ALD-GEMRNAVCFYLVLRALDTEDDMTISVEKKVPLLNHNFHSFLYQ	PDRWFME--SKE	116
Motif II			
<i>T. brucei</i>	RERELLQKFPFVSAAFSRLDPSFQSVIEDICRRMADGMCDFLQRTDTCK	KANNKEI SEDNC	168
<i>L. major</i>	RERELLAKYPCVSREFKLLKKEYQDVIANICERMANGMCEFLKR-----		153
<i>S. cerevisiae</i>	KDRAVLTDVFESILIEFHKLKPEYQEVIKEITEKMGNMGADYILDEN-----		163
<i>H. sapiens</i>	KDRQVLEDFPTISLEFRNLAEKYQTVIADICRRMGIGMAEFLDKH-----		161
Motif III			
<i>T. brucei</i>	HDGKSEKSAVETREDFDLYCHYVAGLVGLGLTQLEFVRSGLEKAAL	EENMTRANHMGLLQ	228
<i>L. major</i>	-----PVVTKDDYNQYCHYVAGLVGHGLTQLFARCGFEDPSLDDDL	TSSNHMGLFLQ	205
<i>S. cerevisiae</i>	----YNLNGLQTVHDDYDHYCHYVAGLVGDGLTRLIVIAKFANESLYS	NEQLYEMGLFLQ	219
<i>H. sapiens</i>	-----VTSEQEWDKYCHYVAGLVGIGLSRLFSASEFEDPLVGEDTER	ANSMGLFLQ	212
Motif IV			
<i>T. brucei</i>	KTNIIRDYEDICESPPRVFWPREIWGQYTDLHAFKGITRPTNGSNDTAC	GEGRKYSDE	288
<i>L. major</i>	KTNIIRDYYEDIREPPRMFWPKEIWGTYYTELKELK-----SESN-----		246
<i>S. cerevisiae</i>	KTNIIRDYNEDLVDG--RSFWPKEIWSQYAPQLKDFMKPEN-----		258
<i>H. sapiens</i>	KTNIIRDYLEDOQGG--REFWPEQEVWSRYVKKLGFDAKPEN-----		251
Motif V			
<i>T. brucei</i>	EKEIKSKAVDCLNAMVADALVHLPVIEYLAELRDPTVFAFCAIPQVMA	VATLALVFDN	348
<i>L. major</i>	----NAAAVQCLNAMVADALVHPYIVDYLALRDPVFRFCAIPQVMAI	ATLKEVYNN	301
<i>S. cerevisiae</i>	----EQLGLDCINHLVLNALSVIDVITLTLAGIHEQSTFQFCAIPQV	MAIATLALVFN	313
<i>H. sapiens</i>	----IDLAVQCLNELITNALHHIPDVIITLRSRLRNQSVFNFC	AIPOVMAIATLAACYNN	306
<i>T. brucei</i>	PDVFHRSVKLIRGATCKIIHNATELSAALKLVRTYAQKLLASAHAG	VASHEAVAQSLQVA	408
<i>L. major</i>	PDTFQVKVKVSRPESCRIMLKATTLYSLSMFRDYCVLQEKLDMD	QDASSVSIANS	LAAA 361
<i>S. cerevisiae</i>	REVLHGNVKIRKGTTCYLILKSRILRGCVIEIFDYLLRDIKSKL	AVQDPNFKLNIQISKI	373
<i>H. sapiens</i>	QQVFKGAVKIRKQAVTLMMDATNMPAVKAIYQYMEEIYHRI	PDSDPSSSKTRQIISTI	366
<i>T. brucei</i>	IKTMDEQVLRHNTKLVGEPTRRVLAQ-----YALGGGLLLKVV	DGVFGYL	454
<i>L. major</i>	IERIDLQLKQCQD---VSYTRSLAR-----YPLGGQFLLTVMD	TVAGFF	404
<i>S. cerevisiae</i>	EQFMEMYQDKLPPNVKPNETPIFLVKKERSRYDDELVP	TQEEYKFNMVLSIILSVLL	433
<i>H. sapiens</i>	R--TQNLPCQLIS--RSHYSPIYLS-----FVMLLAALSWQY	LTTLQVTT	408
<i>T. brucei</i>	GR-----		456
<i>L. major</i>	GGRKEIAGHA-		414
<i>S. cerevisiae</i>	GFYYIYTLHRA		444
<i>H. sapiens</i>	-EDYVQTGEH-		417

Figure 1. Alignment of the amino acid sequences of SQS from different organisms: *T. brucei* (Tb927.8.7120), *L. major* (LmjF31.2940), *S. cerevisiae* (YHR190W) and *H. sapiens* (BC029641.1). Sequences were aligned by using ClustalW. Conserved regions (motif I, motif II, motif III and motif IV) are implicated in FPP binding. The two selected regions to construct the RNAi plasmids are marked in pink (construct 1) and blue (construct 2).

Figure 2

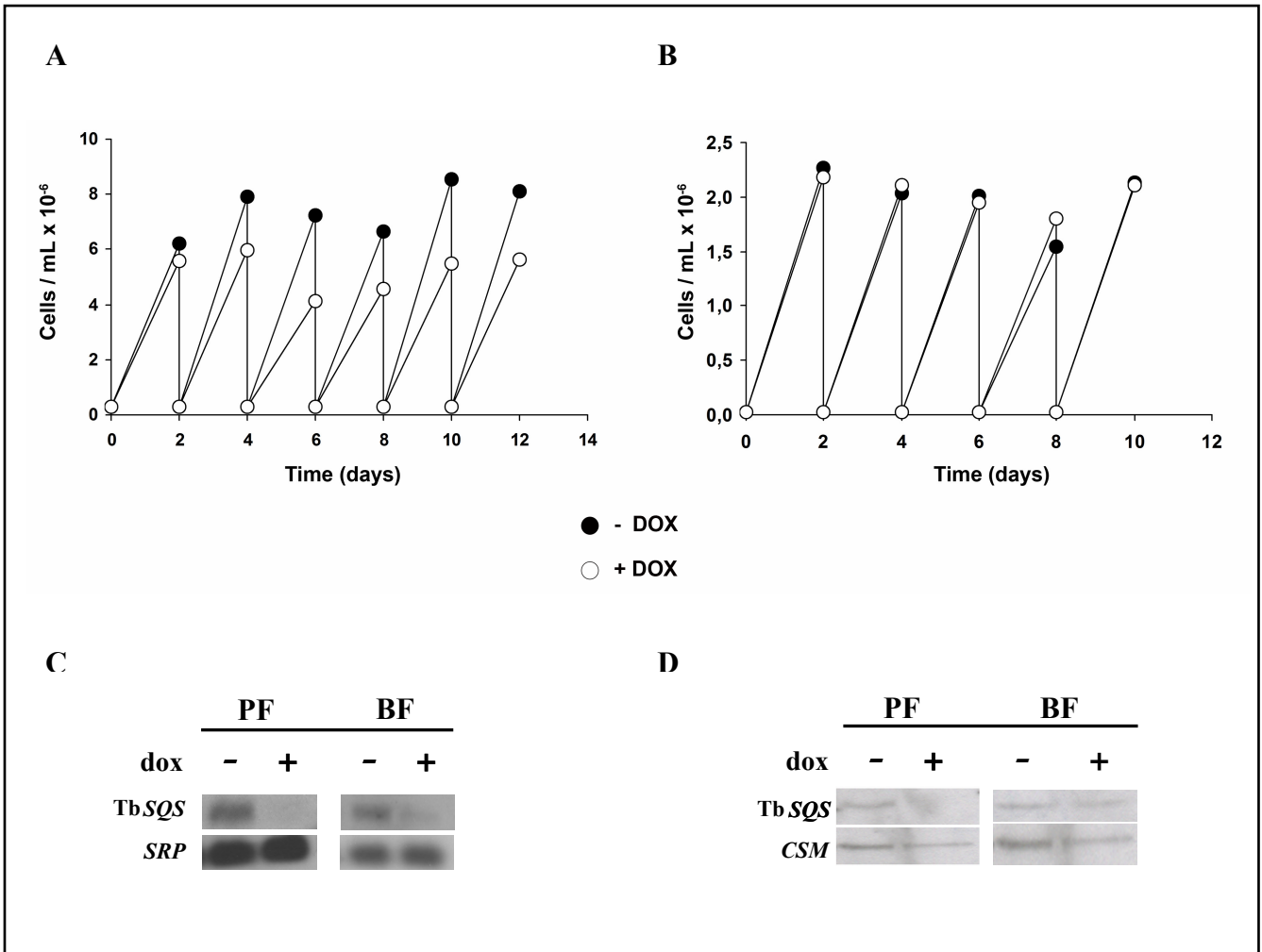


Figure 2. Growth curve of *TbSQS* RNA interference in procyclic cells (**A**). Growth curve of *TbSQS* RNAi in bloodstream forms (**B**). Filled circles, control cells grown without doxycycline; open circles, cells in the presence of $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of doxycycline. Bloodstream cultures were initiated at 1×10^4 cells $\cdot\text{mL}^{-1}$ and procyclic trypanosomes cultures were initiated at 3×10^5 cells $\cdot\text{mL}^{-1}$. The rate of the cell growth was monitored every two days using an electronic particle counter (model ZBI: Coulter Electronics Inc., Hialeah, FL). The levels of *TbSQS* mRNA (**C**) or protein (**D**) were analyzed in cells incubated with doxycycline for 48 h in procyclic (PF) and bloodstream (BF) forms. Loading controls were the signal-recognition particle RNA or the CSM protein.

Figure 3

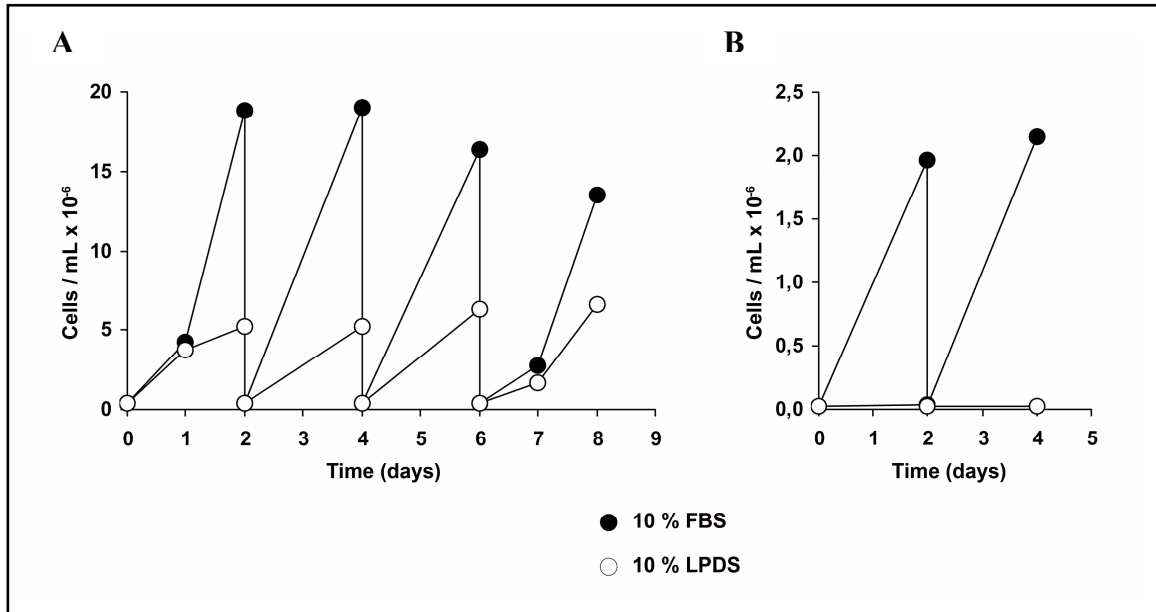


Figure 3. Trypanosomes cells cultured in lipoprotein depleted serum (LPDS). (A) *T. brucei* procyclic form, filled circles cultured in the presence of 10% fetal bovine serum (BSF) and open circles in the presence of 10% LPDS. (B) *T. brucei* bloodstream form, filled circles cultured in the presence of 10% BSF and open circles in the presence of 10% LPDS.

Figure 4

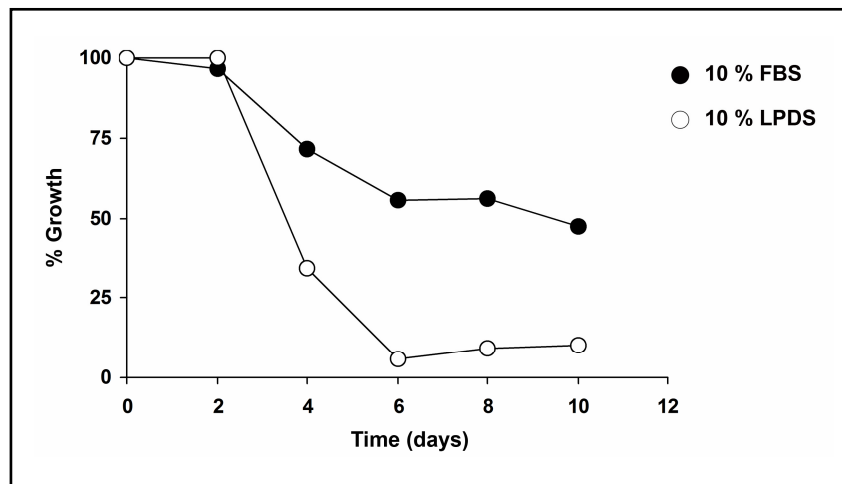


Figure 4. Growth percent after *TbSQS* RNAi induction in procyclic forms. Cells were grown in medium supplemented with 10 % BSF (filled circles) or 10 % LPDS (open circles). Percentages of growth were calculated relative to non-induced control transfected cells.

Figure 5

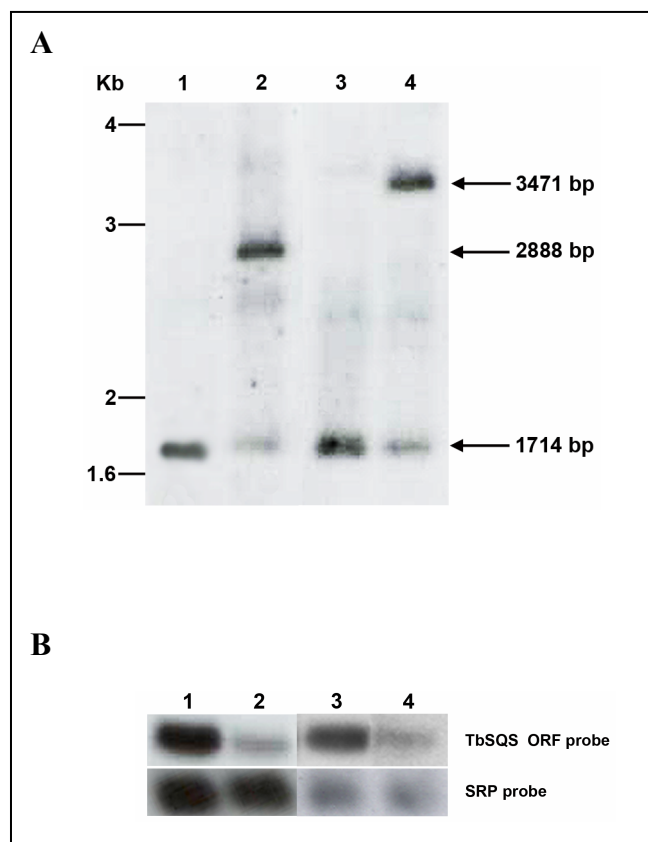


Figure 5. Southern and Northern analysis of *TbSQSKO1A* cell lines. **(A)** Genomic DNA was isolated from *Tb449* (lane 1), procyclic *TbSQSKO1A* (lane 2), *TbS16* (lane 3) and bloodstream *TbSQSKO1A* (lane 4), digested with *SspI* and *EcoRV*, electrophoresed in an agarose gel, transferred to a nylon membrane and hybridised with a *TbSQS* ORF probe. The expected sizes of the observed fragments are indicated. **(B)** Total RNA was also extracted from the same cell lines and analyzed by Northern blot using the same probe. The blot was also hybridised with a SRP (signal recognition particle) probe to serve as a loading control.

Figure 6

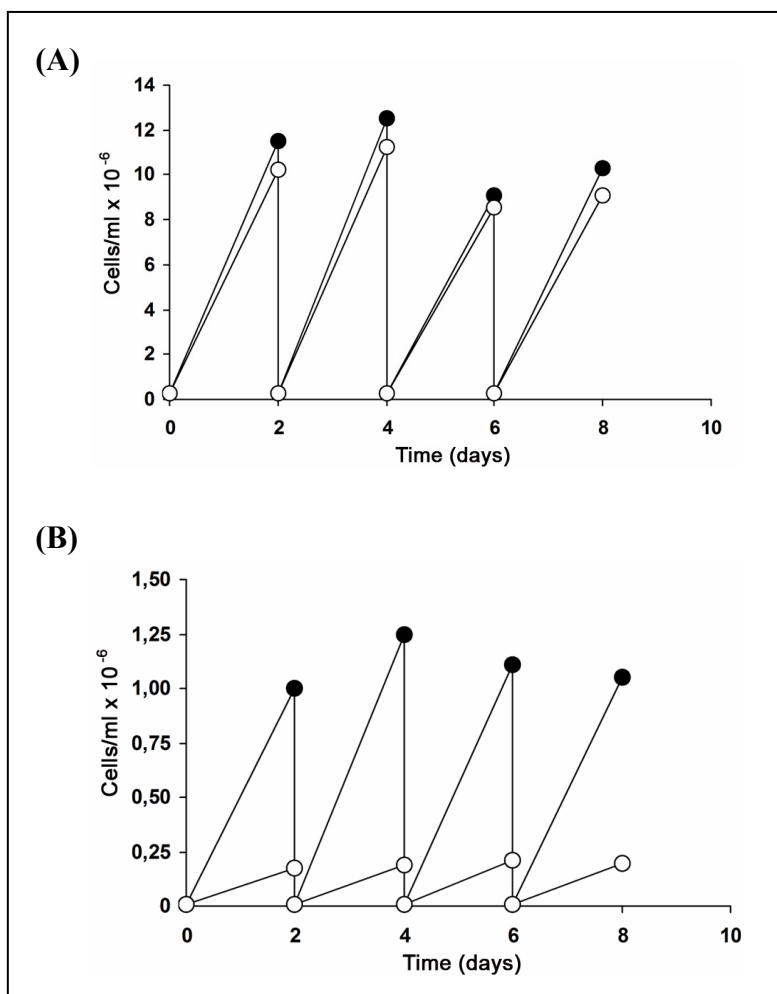


Figure 6. Effect of the deletion of one *TbsQS* allele on the growth of both procyclic (A) and bloodstream (B) trypanosomes. *Tb449* (filled circles) and *TbsQSKO1A* (open circles) cell lines were cultured following up to 8 days and diluted every 2 days as required.

Table 1

Inhibitor	ED ₅₀ value (μM)	
	Procyclic forms	Bloodstream forms
Mevastatine	> 100	5.93 ± 0.01
Terbinafine	6.73 ± 0.43	31.68 ± 1.41
Ketoconazole	12.58 ± 2	17.92 ± 1.61

Table 1. Antiproliferative effects of mevastatine, terbinafine and ketoconazole against procyclic and bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. Values are the average ± standard deviation obtained using six drug concentrations assayed in triplicate.

Figure 7

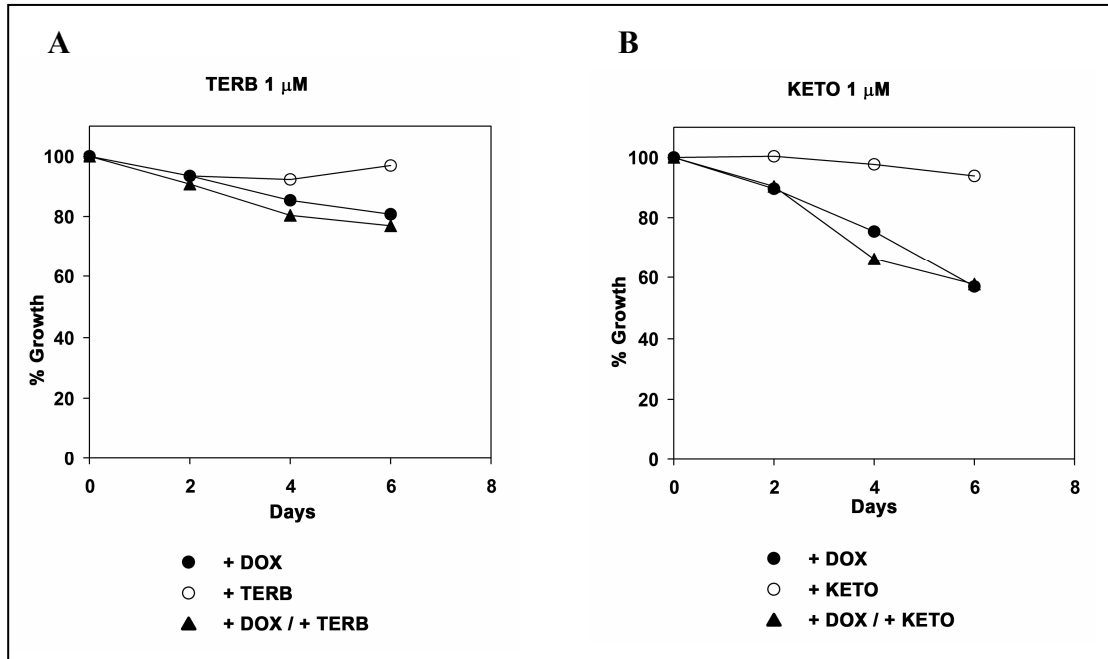


Figure 7. Growth percentage of procyclic forms harboring *TbSQS* RNAi in presence of terbinafine 1 μM (A) and ketoconazole 1 μM (B). Growth percentage was analyzed upon addition of 1 μg·mL⁻¹ doxycycline (●); in the presence of drug (○); and upon addition of a mixture of 1 μg·mL⁻¹ doxycycline and drug (▲).

Figure 8

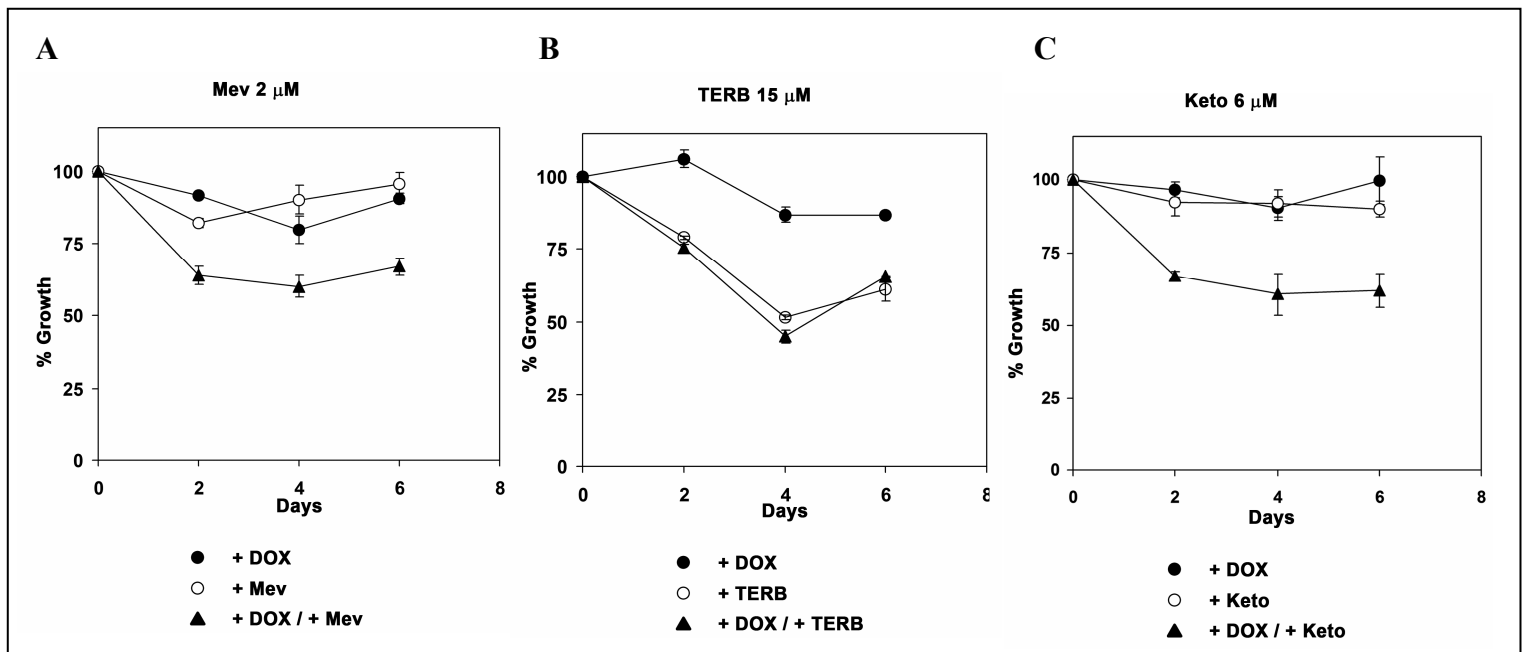


Figure 8. Growth percentage of bloodstream forms harboring *TbSQS* RNAi in presence of mevastatine 2 μM (A) terbinafine 15 μM (B) and ketoconazole 6 μM (C). Growth percentage was analyzed upon addition of 1 μg·mL⁻¹ doxycycline (●); in the presence of drug (○); and upon addition of a mixture of 1 μg·mL⁻¹ doxycycline and drug (▲).

Figure 9

(A)

Sterol	Molecular Weight	Structure	Retention time (min)	% of total sterol	
				Tb 449	Tb SQS RNAi
Cholesta-5,7,24-trienol	382	1	18.8	9,2	0,5
Desmosterol	384	2	17.7	0,0	0,6
Cholesta-8,24-dienol (zymosterol)	384	3	18.7	0,0	0,0
Cholesta-7,24-dienol	384	4	21.3	20,3	0,0
Cholesterol	386	5	17.8	66,3	98,9
Ergosterol	396	6	19.8	3,2	0,1
Ergosta-8,24(25)-dienol	398	7	19.7	1,0	0,0
Squalene	410	8	13.8	0,0	0,0

(B)

Sterol	Molecular Weight	Structure	Retention time (min)	% of total sterol	
				Tb S16	Tb SQS RNAi
Cholesta-5,7,24-trienol	382	1	18.8	1.69	0.12
Desmosterol	384	2	17.7	0.57	0.42
Cholesta-7,24-dienol	384	4	21.3	3.73	0,0
Cholesterol	386	5	17.8	93.86	99.39
Ergosta-8,24(25)-dienol	398	7	19.7	0.03	0.03
Squalene	410	8	13.8	0.0	0.03
Other cholesta sterols	384			0.12	0

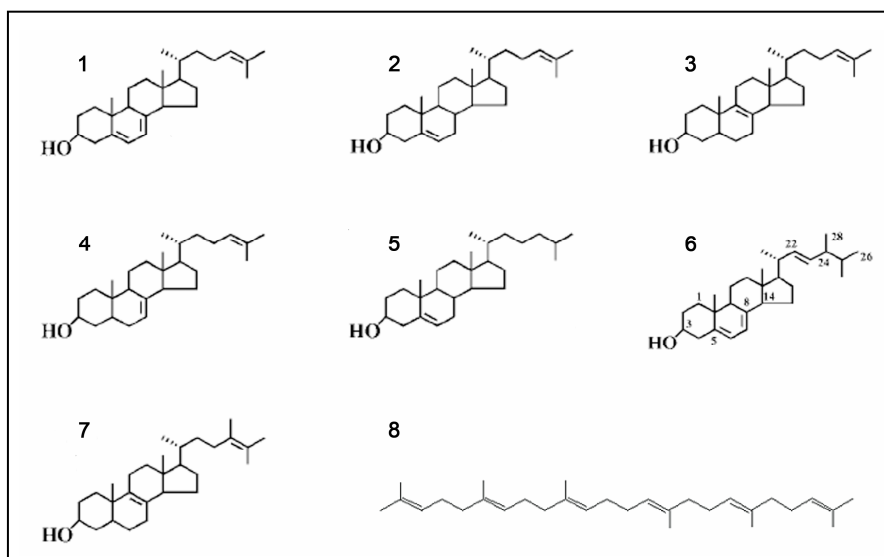


Figure 9. Effect of TbSQS RNAi on neutral lipid composition of procyclic (A) and bloodstream cells (B) after 6 and 10 days of induction, respectively. Sterols were extracted from cells cultivated *in vitro* to late exponential growth phase. Neutral lipids were obtained by silicic acid column chromatography and analyzed by quantitative capillary gas-liquid chromatography and mass spectrometry. Composition is expressed as mass percentages. Tb449 (PF) and TbS16 (BF) cell lines were used as controls.

Figure 10

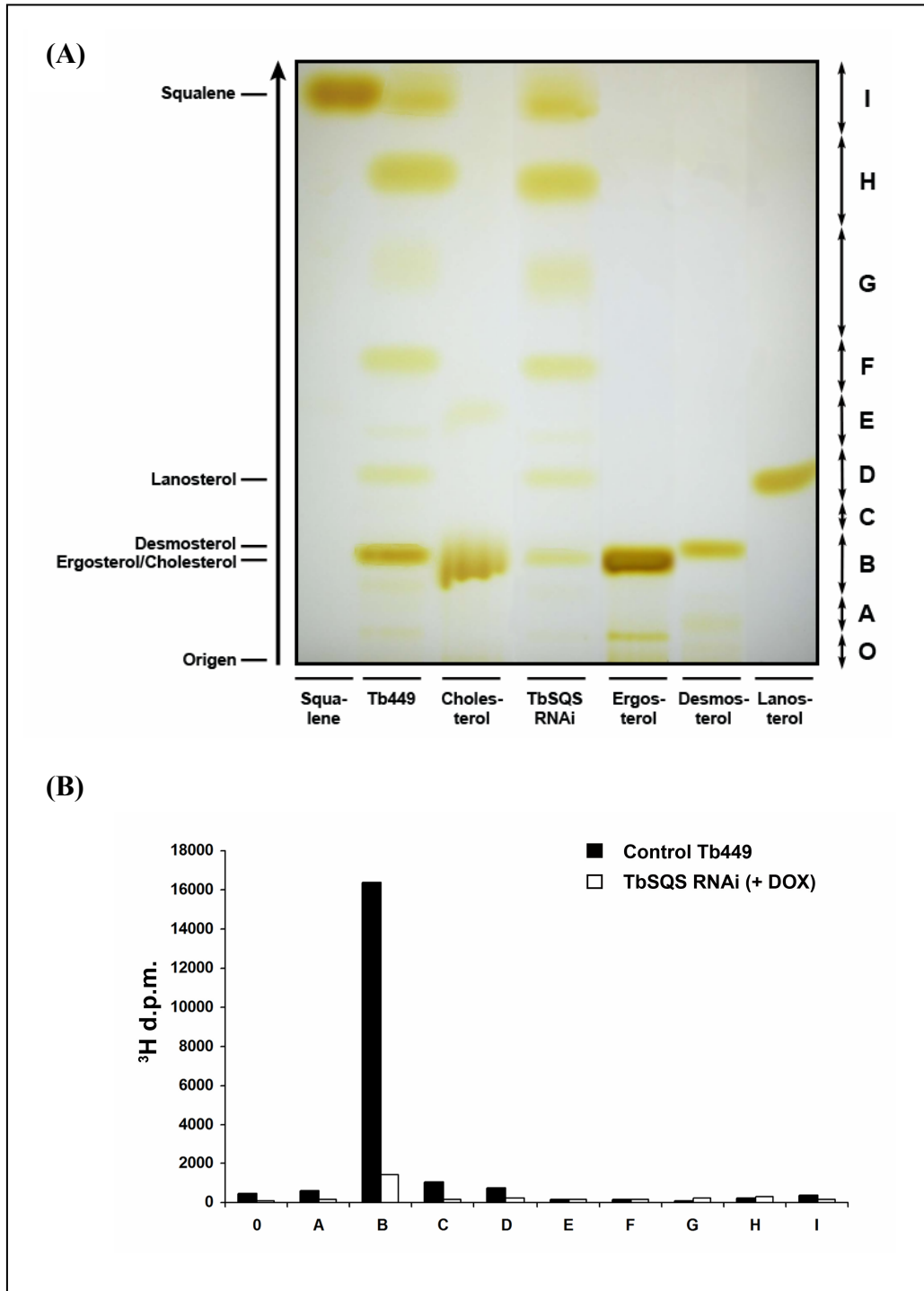


Figure 10. Effect of *TbSQS* depletion on the levels of neutral lipids. Control procyclic *Tb449* and *TbSQS* RNAi cell lines were incubated in the presence of ^3H -mevalonolactone, and the content of neutral lipids was analyzed by thin-layer chromatography (TLC) as described in the Materials and Methods section. **(A)** Potassium iodide staining of the TLC plate showing the neutral lipid profiles of both cell lines. Lanosterol, desmosterol, ergosterol, cholesterol and squalene were included as standards. **(B)** Different regions of the plate (labelled O to I) corresponding to *Tb449* (filled bars) or *TbSQS* RNAi lanes (empty bars) were scraped and quantified in a LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter (Beckman Coulter™).

Figure 11

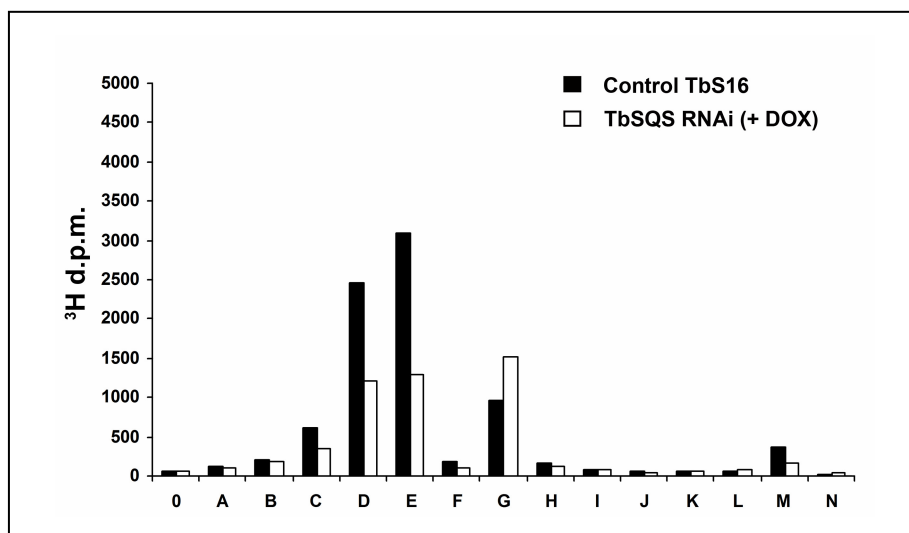


Figure 11. Effect of *TbSQS* depletion on the levels of neutral lipids in bloodstream forms. Control *TbS16* and *TbSQS* RNAi cell lines were incubated in the presence of ^3H -mevalonolactone, and the content of neutral lipids was analyzed by thin-layer chromatography (TLC) as described in the Materials and Methods section. In this case, the TLC plate was divided in more sections than procyclic TLC plate, corresponding **zone C** to desmosterol, ergosterol and cholesterol, **zone E** to lanosterol and **zone M** to squalene. Different regions of the plate (labelled O to N) corresponding to *TbS16* (filled bars) or *TbSQS* RNAi lanes (empty bars) were scraped and quantified in a LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter (Beckman Coulter™).

Figure 12

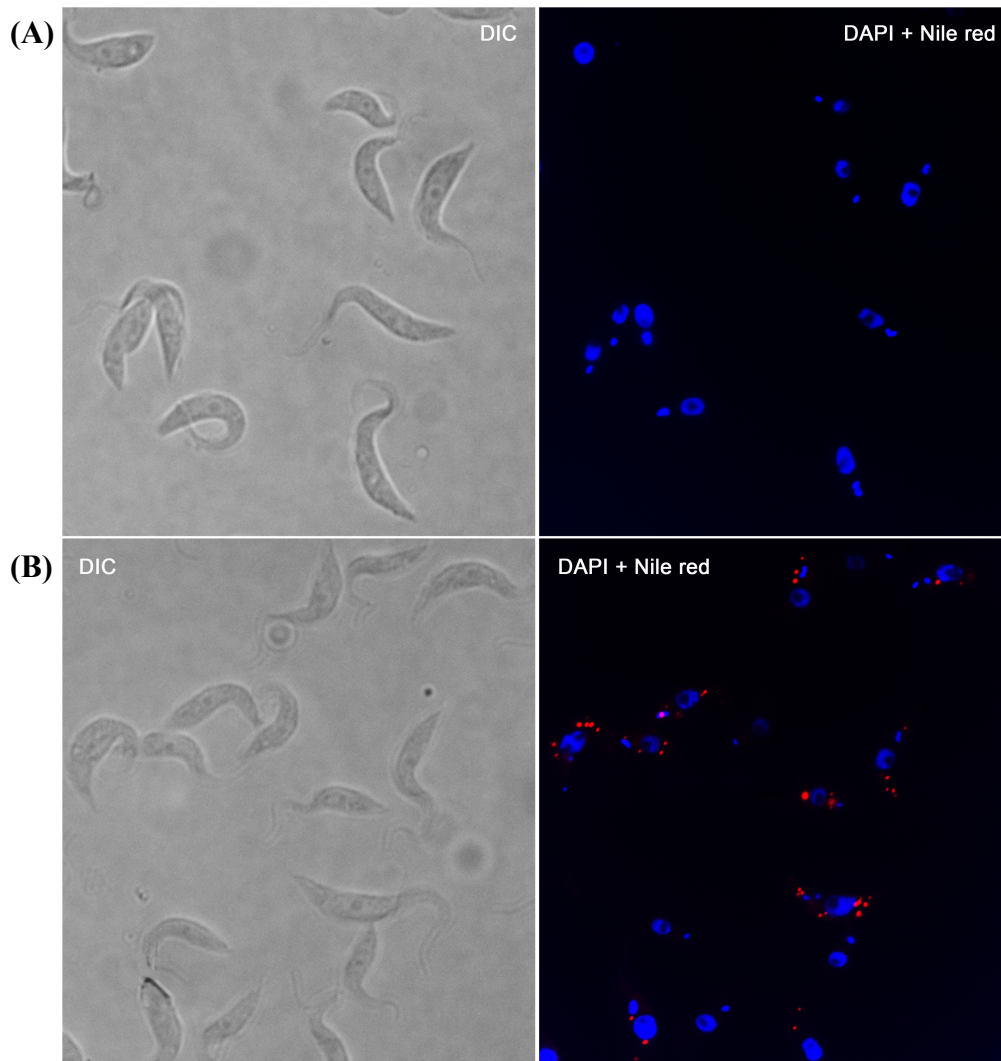


Figure 12. Effect of *TbSQS* depletion on the distribution pattern of intracellular lipid droplets. Control procyclic Tb449 (A) and *TbSQS* RNAi cell lines (B) were stained with DAPI and Nile red as described in the Materials and Methods section. Morphology as established by DIC was not perturbed by SQS depletion.

Figure 13

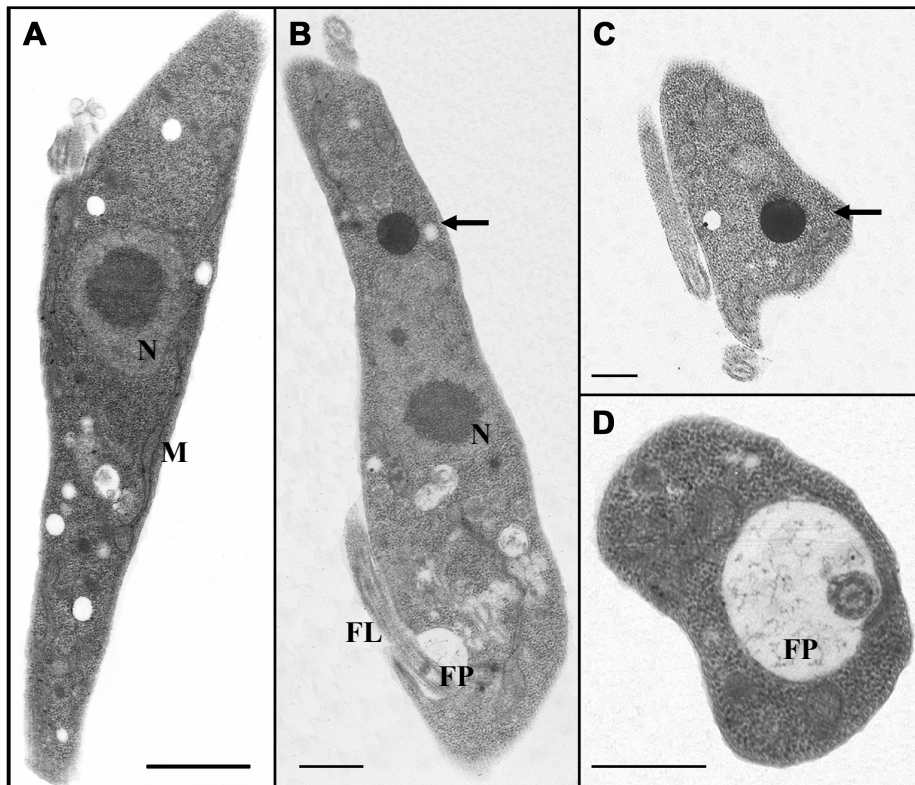


Figure 13. Ultrastructural alterations in *T. brucei* procyclic forms. After 6 days of *TbsQS* RNAi, trypanosomes displayed ultrastructural changes (B, C, D) compared with control parasites (A). The major alterations included the presence of electrodense lipid bodies (black arrow) and slightly enlarged flagellar pockets. FP, flagellar pocket; FL, flagellum; N, nucleus; M, mitochondria. Bars, 1 μm.

Figure 14

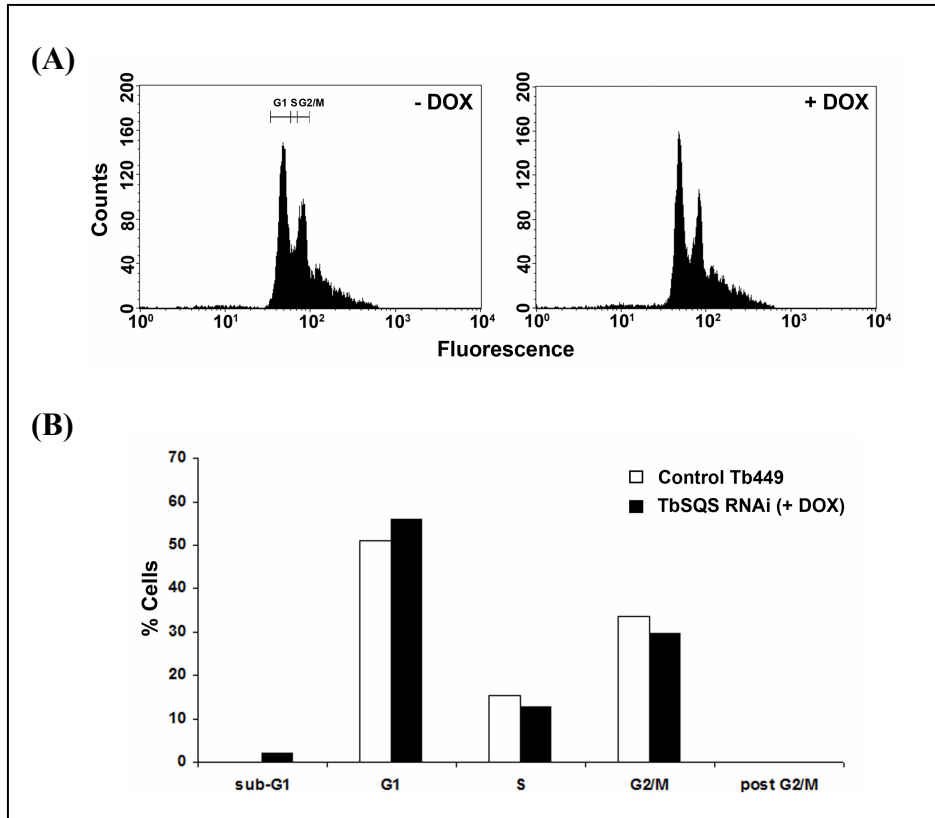


Figure 14. Flow cytometry analysis of procyclic *TbSQS* RNAi cells. Samples were taken for FACS analysis 6 days after incubation in the absence (- DOX) or presence of 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ doxycycline (+ DOX). (A) Graphs from FACS analysis. (B) Graphs that shows the percentages of cells in each of the different cell cycle stages: sub-G1, G1, S, G2/M and post G2/M peaks.

Figure 15

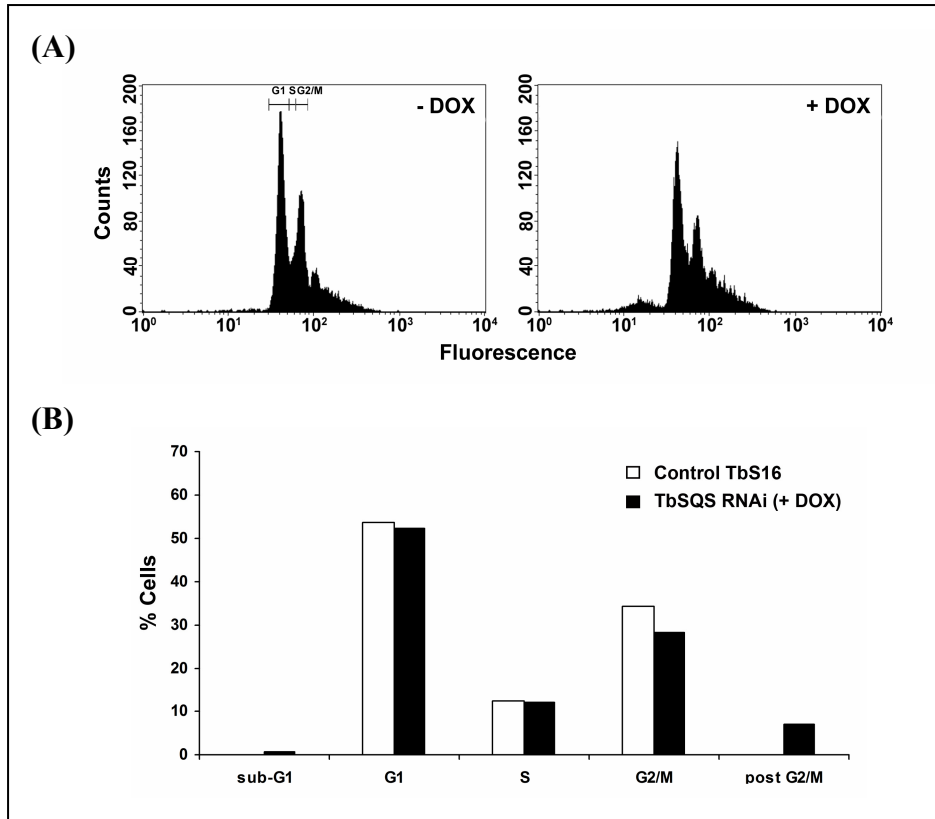


Figure 15. Flow cytometry analysis of bloodstream *TbSQS* RNAi parasites. Samples were taken for FACS analysis 10 days after incubation in the absence (- DOX) or presence of 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ doxycycline (+ DOX). **(A)** Graphs from FACS analysis. **(B)** Graphs that shows the percentages of cells in each of the different cell cycle stages: sub-G1, G1, S, G2/M and post G2/M peaks.

Figure 16

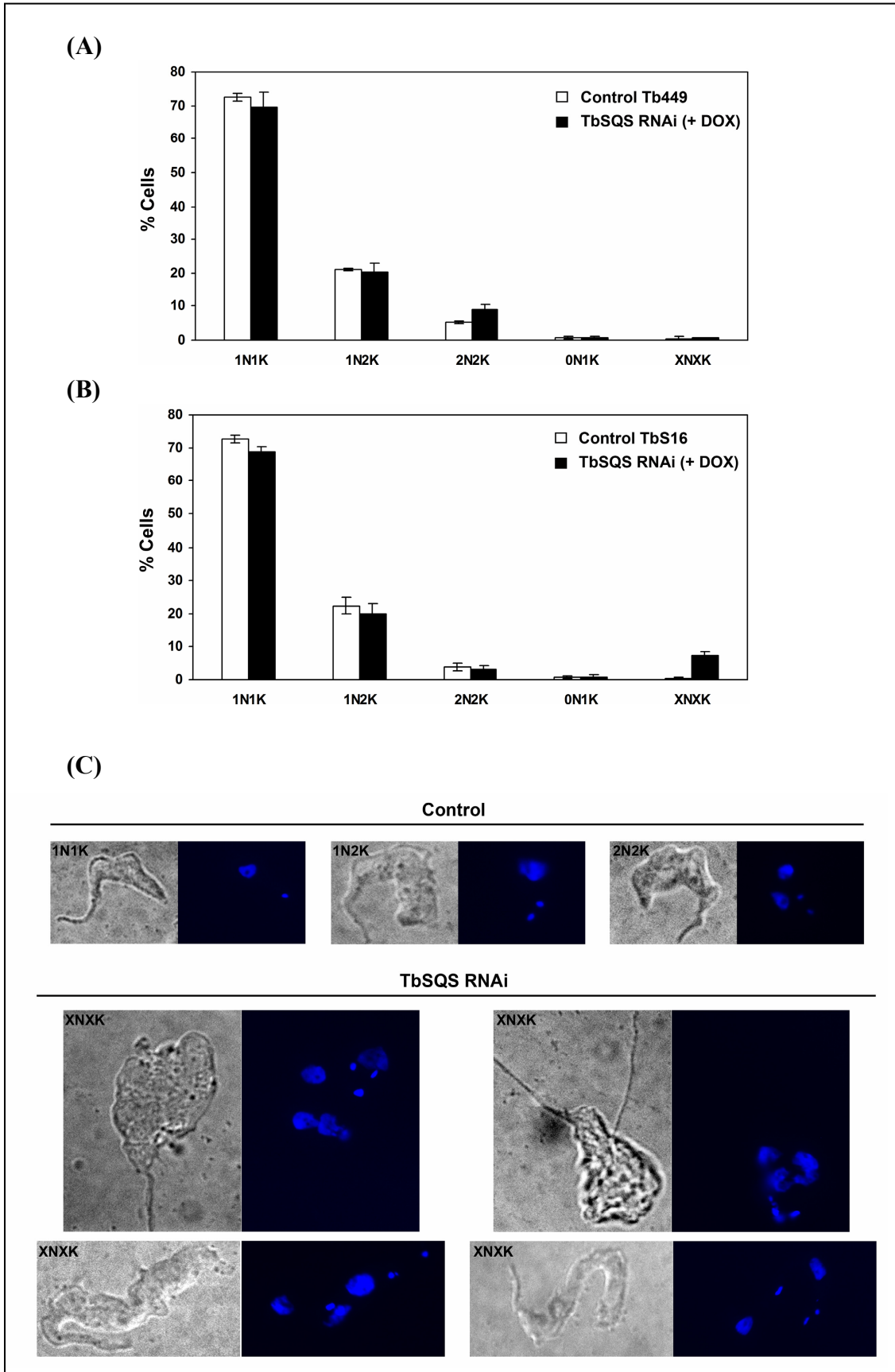


Figure 16. The morphological phenotype of *TbSqs*-deficient *T. brucei* cells. Procyclic forms 6 days after *TbSqs* RNAi induction (**A**) or bloodstream forms 10 days after induction (**B** and **C**) were stained with DAPI and examined under a fluorescence microscope. A quantification of cells with different numbers of nuclei (N) and kinetoplasts (K) was performed. Data are presented as the mean percentage (\pm S.E.) of total cells counted (>100) from three independent experiments.

Figure 17

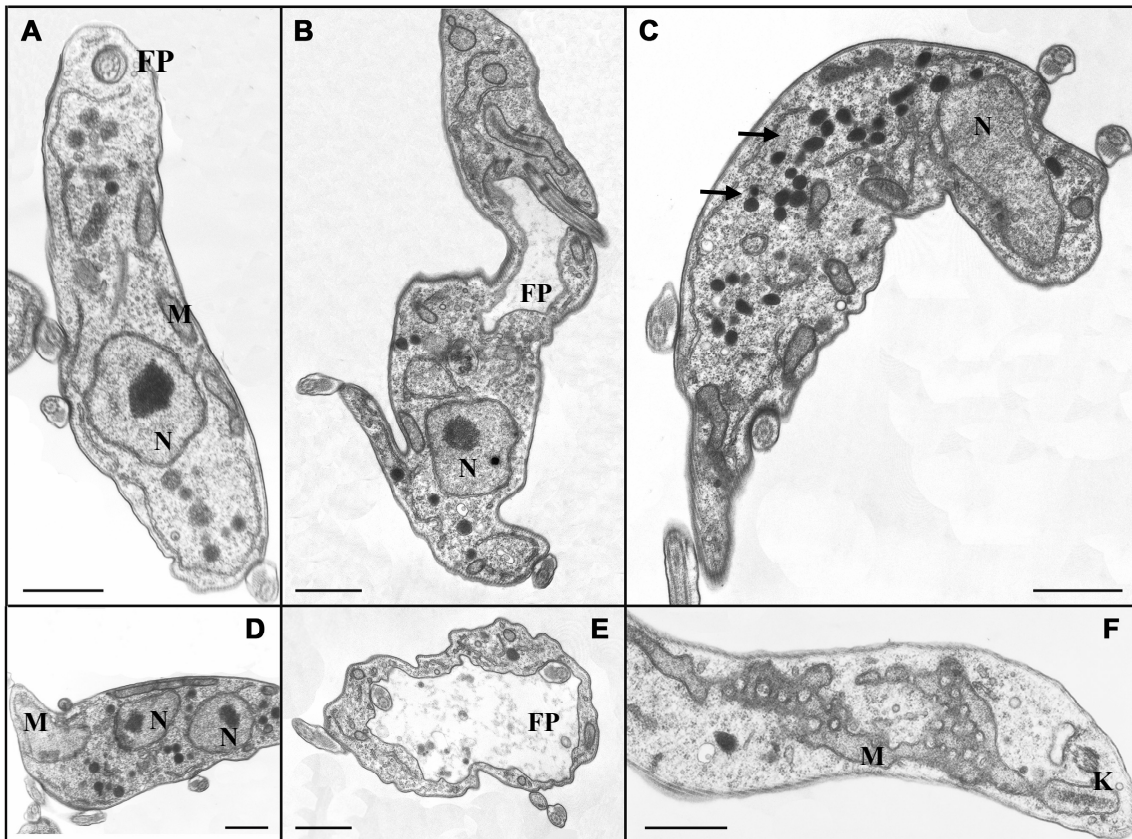


Figure 17. Ultrastructural analysis of *TbSqs* depleted bloodstream cells. Transmission electron microscopy was used to examine the ultrastructure of control cells (**A**) and cells induced for 10 days. Cells depleted of *TbSqs* are abnormally shaped and the major alterations included the presence of several nuclei and flagellums; enlarged flagellar pocket, big mitochondria containing vesicular structures (panel **F**) and electron-dense lipid droplets (arrows) accumulation (**B** to **F**). FP, flagellar pocket; K, kinetoplast; N, nucleus; M, mitochondria. Bars, 1 μ M.

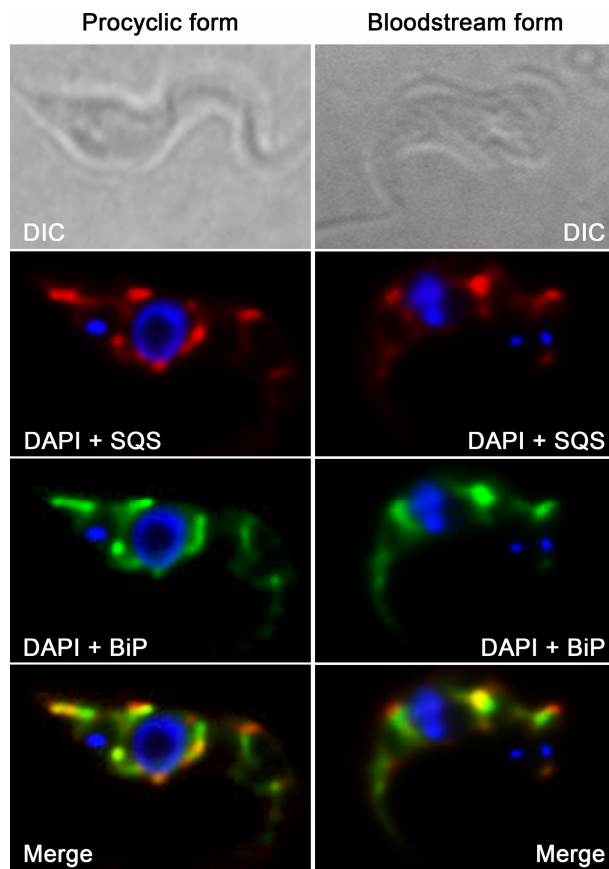
Figure 18

Figure 18. Indirect immunofluorescence microscopy for detection of the enzyme *TbSQS* in procyclic and bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. DAPI staining indicates the localization of DNA in the nucleus and kinetoplast in blue. The polyclonal antibody anti-*TbBiP* was used as an ER marker (green). For *TbSQS* detection, the anti-*TcSQS* antibody was conjugated directly to Alexa Fluor 594 (red). Merge images are shown and overlapping areas appear in yellow.

3. RESULTADOS

3.3. ANEXO III RESUMEN

Squalene epoxidase and alkyl sterol biosynthesis are required for correct cytokinesis and cell morphology in *Trypanosoma brucei*

El objetivo de este estudio fue determinar la relevancia de dos pasos de la ruta de la biosíntesis de esteroides posteriores a la formación de escualeno: la escualeno epoxidasa (SQE) y la 24-esterol metiltransferasa (SMT). La SQE cataliza la oxidación del escualeno y la SMT se encarga de la alquilación en posición 24 del núcleo esteroideo. Ambas enzimas se localizan en el retículo endoplasmático y colocalizan con el marcador BiP. En parásitos procíclicos, el *knock-down* de la SQE produce un fenotipo severo de pérdida de viabilidad celular asociado a procesos de autofagia, mientras que en sanguíneos la inhibición de la proliferación es menos significativa. Este efecto puede deberse tanto a la reducción de esteroides 24 alquilados como a la acumulación de escualeno, un compuesto potencialmente citotóxico, como muestra el análisis de la composición de lípidos obtenido mediante GC-MS. En las formas sanguíneas, la depleción de la *TbSQE* se traduce en una disminución de la proliferación celular que puede estar asociada con una profunda modificación de la homeostasis de esteroides endógenos.

Una reducción de la síntesis de 24 alquil esteroides tras la depleción de *TbSMT* no tiene efectos significativos sobre la proliferación *in vitro* en *T. brucei*, sugiriendo que la metilación en posición 24 no es esencial para el parásito. Sin embargo, estudios de microscopía electrónica evidencian alteraciones en orgánulos relacionados con la ruta endocítica, acumulaciones intracelulares de tipo lipídico y modificaciones en la morfología de las estructuras de membrana. En las formas sanguíneas, además, se observan alteraciones en la citocinesis y un aumento en el número de células polinucleadas.

Estos resultados, junto con los estudios llevados a cabo para la enzima SQS, refuerzan la idea de que los esteroides de síntesis endógena son esenciales para la viabilidad celular. Por otra parte aunque la SMT no es una proteína esencial para *T. brucei*, una adecuada producción de 24 alquil esteroides parece ser importante para procesos como el tráfico vesicular y la división celular.

3. RESULTADOS

3.3. ANEXO III

Squalene epoxidase and alkyl sterol biosynthesis are required for correct cytokinesis and cell morphology in *Trypanosoma brucei*

1. Introduction

Kinetoplastid parasites contain predominantly ergostane-based sterols such as ergosterol (Rodrigues et al., 2002; Liendo et al., 1999; Gros et al., 2006), which differ from cholesterol, the main sterol in mammalian cells, by the presence of a 24-methyl group as well as Δ^7 and Δ^{22} bonds. They also contain smaller amounts of estigmastane-related sterols, which have a 24-ethyl group, and cholesterol, which can be taken up either from the culture medium or the host animal (Goad et al., 1984). Inhibitors of ergosterol biosynthesis such as imidazoles inhibitors of 14- α demethylase and azasterols, inhibitors of 24 sterol methyl transferase, have proved to have antiprotozoan activity (Lorente et al., 2004; Lepesheva et al., 2007; Lepesheva et al., 2008). Moreover, it has been reported that the combination of several inhibitors of the pathway present synergistic effects (Urbina et al., 1993). Lately, several ergosterol biosynthesis inhibitors are extremely promising candidates for the treatment of Chagas' disease (Urbina, 2001; Buckner et al., 2003; Urbina et al., 2004; Hucke et al., 2005).

The introduction of the methyl group in the 24 position is catalyzed by the S-adenosyl-L-methionine: $\Delta^{24, (25)}$ -sterol methyltransferase (SMT; EC 2.1.1.43, *ERG6*) enzyme which is found in fungi, yeast, protozoa and plants, but is not present in vertebrate hosts. Thus, SMT imparts one of the key structural differences between ergosterol and cholesterol and the enzyme is a very attractive target in the search of inhibitors selective for protozoan and fungal sterol biosynthesis. Several studies have shown the antiproliferative effects of these compounds in yeast, fungi, plants, algae (Nes et al., 1991; Ator et al., 1992; Acuna-Johnson et al., 1997; Nes et al., 1997; Mangla and Nes, 2000) and protozoa such as *Leishmania donovani* (Haughan et al., 1995; Magaraci et al., 2003; Lorente et al., 2004; Gros et al., 2006) and *Trypanosoma* (Urbina, 1997; Gros et al., 2006; Zhou et al., 2006; Zhou et al., 2007). SMT has been

described as a membrane-bound enzyme in yeast (Nes, 2000) and plants (Bouvier-Nave et al., 1998) and has been recently characterized in the protozoan *Trypanosoma brucei* (Zhou et al., 2006). In the latter, zymosterol was the preferred substrate and the products of the reaction were a mixture of C24-monoalkylated sterols and an unusual double C24-alkylated sterol typically found in plants.

ERG1 encodes squalene epoxidase (SQE, EC 1.14.99.7), which is a FAD-containing monooxygenase that converts squalene into 2,3-oxidosqualene (Favre and Ryder, 1997; Klobucnikova et al., 2003; Leber et al., 2003). The enzyme plays a key role in the synthesis of essential sterols compounds, hence homozygous disruption of *ERG1* was found to have deleterious effects in yeast cells (Leber et al., 1998; Tsai et al., 2004).

Allylamine antifungals (terbinafine and naftifine) are ergosterol biosynthesis pathway inhibitors acting at the level of squalene epoxidase. Their mode of action is achieved by inhibiting earlier but different steps of ergosterol biosynthesis pathway than azoles (a first generation of antifungal drugs that act on 14 α -demethylation). The inhibition site is located at squalene-epoxidation, producing accumulation of the sterol precursor squalene and blockage of the synthesis of further sterol intermediates (Leber et al., 2003; Akins, 2005). This effect produces fungal death by ergosterol deficiency through an ergosterol depletion and squalene accumulation (Leber et al., 2003; Akins, 2005). Previous reports have shown the growth-inhibitory effects of the ergosterol biosynthesis inhibitors ketoconazole and the allylamine SF 86-327 on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. The growth of cells was immediately arrested by any of these drugs at concentrations greater than or equal to 30 μ M. Moreover, synergistic effects could be observed when the two drugs were used in combination (Urbina et al., 1988).

In several organisms the post-squalene portion of the pathway generally occurs in the endoplasmic reticulum (Goldstein and Brown, 1990; Krisans, 1996; Gaylor, 2002). However, in the case of yeast, it has been reported that SMT is found almost exclusively in lipid particles while SQE is distributed between lipid particles and the endoplasmic reticulum (Zinser et al., 1993; Athenstaedt et al., 1999; Mullner et al., 2004). SMT has been identified as a protein involved in endocytosis (Jimenez-Jimenez et al., 2008) and also required for cargo sorting and vesicle formation during exocytosis

(Proszynski et al., 2005). Indeed, a yeast mutant strain lacking lipid particles bears a defect in ergosterol formation (Sorger et al., 2004).

Recently, we have established that in *L. major*, sterol methenyltransferase is primarily associated to the endoplasmic reticulum and in translucent vesicles presumably of the endocytic pathway (Jimenez-Jimenez et al., 2008). In spite of its interest as a potential drug target, the exact need for 24-methyl sterols and the role of late steps of sterol biosynthesis in parasite viability has not been genetically explored. In the present paper we have performed RNAi-mediated depletion of SMT and SQE in both procyclic and bloodstream forms of *T. brucei*. *TbSMT* deficient procyclic cells exhibit a defect in C24-alkyl sterol formation and morphological alterations including the appearance of electron-dense lipid vesicles and defective membrane morphology. However, the enzyme does not appear to be essential for viability either in procyclics or in bloodstream forms. Depletion of *TbSQE* gives rise to pronounced squalene accumulation, the appearance of multiple lipid droplets and growth and cell cycle defects in both procyclic and bloodstream forms.

2. Materials and methods

2.1. Compounds

Fetal bovine lipoprotein depleted serum media supplement was purchased from Kalen Biomedical. Terbinafine, mevastatine and ketoconazole were from Sigma Aldrich. These drugs were dissolved in 100% dimethyl sulfoxide (DMSO); the final concentration of DMSO in the cultures did not exceed 0.1 % (vol/vol) and had no effect on cell proliferation.

2.2. Purification of recombinant SQE and SMT from *T. brucei*

A version truncated of *TbSQE* ($\Delta N22\Delta C34$) and *TbSMT* ORF overexpressing cells were used for purification (Gros et al., 2006). A pellet of 2 L of cultures overexpressing proteins were resuspended in PBS supplemented with a cocktail of protease inhibitors. After sonication the total extract was loaded in a 12% SDS-polyacrylamide gel stained with Coomassie brilliant blue; the gel bands of interest were excised, and the stained proteins were electrophoretically eluted from the minced gel. After removal of most of the salt and sodium dodecyl sulfate (SDS) by dialysis, the

protein concentration was determined by the method of Bradford and gave a single band in SDS-PAGE.

2.3. Generation of polyclonal antibodies

Anti-*TbSMT* and anti-*TbSQE* antiserums were generated by immunizing rabbits with purified recombinant proteins, which were resuspended in PBS and mixed with Freund's adjuvant before injection in a rabbit. Four inoculations of ~250 µg of proteins were carried out before obtaining the antiserums with a tittle of 1:131.000.000 for *TbSMT* and 1:16.000 for *TbSQE*. To check the specificity of the antibodies, the serums were preincubated with the corresponding purified protein over-night at 4 °C. The blocked serums were centrifuged at 16,000xg for 15 minutes at 4°C and the supernatants were used in Western blots.

2.4. Western blot analysis

For the preparation of *T. brucei* lysates, the parasites were washed twice in PBS (pH 7.2) and lysed by sonication in the same buffer supplemented with protease inhibitors. Twenty one micrograms of protein from total extract was subjected to 12.5% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and blotted onto an Immobilon-P membrane (Millipore). The dilutions of antibodies used to probe the membranes were 1:50.000 and 1:10.000 for anti-*TbSMT* and anti-*TbSQE*, respectively. Bound antibodies were revealed by using goat anti-rabbit immunoglobulin G at a dilution of 1:5.000 (Promega) and an ECL detection kit (Amersham Pharmacia Biotech).

2.5. Immunofluorescence microscopy

The cells were harvested by centrifugation, washed twice and resuspended at 10^7 cells·mL⁻¹ in medium, mounted on poly-l-lysine coated slides, fixed with 4% *p*-formaldehyde in wash solution (PBS 1×, 0.2% Tween[®] 20) for 15 min, washed once and then permeabilized and blocked for 75 min in solution containing 1% Nonidet P-40 and 1% blocking reagent (Roche). The slides were incubated with antibodies against *TbSMT* and *TbSQE* (1:1.000 diluted in blocking solution). The preparations were then incubated with FITC conjugated anti-rabbit secondary antibody (Sigma, 1:500 diluted in blocking solution), and washed with wash solution. The slides were dehydrated in

methanol for 1 min and finally stained and mounted with Vectashield-DAPI (Vector Laboratories, Inc.). For colocalization studies the polyclonal antibody *TbBiP* was used at 1:700 dilution. After three washes with PBS, cells were incubated in the dark with goat anti-rabbit IgG FITC-conjugated (Sigma) diluted 1:40. The polyclonal antibodies *TbSMT* and *TbSQE* were conjugated with ZenonTM Alexa Fluor 594 Rabbit IgG Labelling Kit (Molecular Probes) diluted 1:100. After three washes with PBS at room temperature in the dark, parasites were finally fixed with 4% p-formaldehyde for 20 min to avoid cross-reaction. After fixation the slides were fixed with cold methanol (Merck). Samples were treated with Vectashield[®] DAPI (Vector Laboratories) and analyzed on an Olympus microscope. Stacks (0.2- μ m z step) acquisition was performed with a microscope system (Cell R IX81; Olympus), 63x/100x objectives, illumination system (MT20; Olympus), and camera (Orca CCD; Hamamatsu). Deconvolution of images was performed using Huygens Essential software (version 3.3; Scientific Volume Imaging). All images displayed in the figures are maximum intensity projections from digitally deconvolved multichannel 3D image datasets. Pseudocoloring and maximum intensity projections were performed using ImageJ software (version 1.37; National Institutes of Health).

2.6. Plasmid constructs for RNAi

For RNAi studies using both bloodstream and procyclic forms, two fragments of *TbSQE* and *TbSMT* were amplified by PCR. Oligonucleotides used for PCR are listed in Table 1. The primers *TbSQE1* 5' and *TbSQE1* 3' generated a 645 bp fragment and the primers *TbSQE2* 5' and *TbSQE2* 3' generated a 522 bp fragment for *TbSQE* RNAi. In the case of *TbSMT* RNAi the oligonucleotides used were *TbSMT1* 5' and *TbSMT1* 3' (515 bp) and *TbSMT2* 5' and *TbSMT2* 3' (468 bp) to amplified the fragments for RNAi.

Firstly, the fragments were cloned into the *Hind* III and *Apa* I sites of pGR19 (Clayton et al., 2005). Secondly, the fragments were digested with *Bam*H I for cloning in the opposite orientation (antisense) in the *Bam*H I and *Hpa* I restriction sites of the previous constructs yielding the plasmids pGR19-*TbSQE1*, pGR19-*TbSQE2*, pGR19-*TbSMT1* and pGR19-*TbSMT2*.

2.7. Trypanosome culture and transfection

Procyclic *T.brucei* strain *Tb449* expressing the tetracycline repressor was grown in SDM-79 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and hemine at 28°C.

Bloodstream *T. brucei* strain *TbS16* carrying integrated genes for T7 polymerase and the tetracycline repressor was grown in HMI-9 medium supplemented with 10% fetal bovine serum at 37°C and 5% CO₂. Cells were grown in presence of 0.5 µg·mL⁻¹ phleomycin (procyclic forms) or 2.5 µg·mL⁻¹ G418 (bloodstream forms).

For stable transfection of the procyclic and the bloodstream form via integration into a rDNA spacer region, the vectors were linearized by *Not* I digestion. Transfection methodology was carried out as previously described (Wirtz et al., 1998; Wirtz et al., 1999). Procyclic cells were selected in 50 µg·mL⁻¹ hygromycin and bloodstream cells in 5 µg·mL⁻¹ hygromycin. Resistant parasites were induced by the addition of doxycycline (1 µg·mL⁻¹) and screened by Northern blots.

2.8. Northern blot analyses

Time samples corresponding to non-induced or induced cells were collected by centrifugation and RNA total was isolated from parasites using TRIzol[®] reagent. For Northern blot, 10 µg total RNA were run on 1% agarose /formaldehyde/MOPS gel and transferred by capillarity on NytranN nylon transfer membranes (Schleicher & Schuell). The RNA is then cross-linked to the membranes using an UV transilluminator. Probes for the Northern blots were amplified by PCR and labelled with Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System (GE Healthcare) following the manufacturer's instructions. As a loading control the SRP probe was used (Estevez et al., 2001) and densitometry analyses of Northern blots were performed by using the 1D-manager program (TDI).

2.9. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis

Time samples of transfected *T. brucei* cells (2×10^7 cells) were collected during dsRNA induction, centrifuged ($2500 \times g$, 4 °C, 10 min) and washed twice in PBS 1X. The cell pellets were resuspended in a solution of 70% ice-cold ethanol in PBS 1X and fixed overnight at 4 °C. After washing twice with PBS 1X, the cells were resuspended in 500 µL of PBS 1X containing 40 µg·mL⁻¹ of propidium iodide and 10 µg·mL⁻¹ of RNase A and incubated during 30 min at room temperature. FACS analysis was carried out with a Becton Dickinson FACScan and BD CellQuest™ Pro version 4.0.2. was used to analyze percentages of each phase of the cell cycle G₁, S, and G₂/M as well as a sub-G₁ peak obtained in the flow cytometry profile.

2.10. Electron microscopy

Bloodstream and procyclic cells lines were collected after RNAi induction. Cells were fixed for 12 h at 4°C in 0.5 % grade I glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde, 3.5% sucrose, and 0.5% picric acid in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2). The samples were dehydrated in acetone and embedded in Epon. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and observed in a Zeiss 902 10 CR transmission electron microscope.

2.11. Nile red staining

The cells were harvested by centrifugation, washed three times with PBS and resuspended at 10^7 cells·mL⁻¹ before to be mounted on poly-L-lysine coated slides and fixed with 4% p-formaldehyde in PBS for 15 min. Preparations were washed one and stained with Nile red 5µg·mL⁻¹ in acetone solution for 30 min. The slides were washed three times with PBS and mounted with Vectashield-DAPI. The microscope and digital image acquisition were carried out with a Zeiss Axiophot microscope (Carl Zeiss, INC.).

2.12. Metabolic labelling of *Trypanosomes*

Cells (5×10^7 cells·mL⁻¹) were incubated with [³H] mevalonate (50 µCi·mL⁻¹) in the different media for 2 hours at 28°C and 37°C for procyclic and bloodstream forms, respectively. At the end of the incubation the cells were centrifuged and subjected to extraction and separation on TLC as indicated below. A LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter (Beckman Coulter™) was used to quantify the radioactivity incorporated.

2.13. Studies of lipid composition

For the analysis of the effects of RNAi on the lipid composition of procyclic and bloodstream cells, total lipids were extracted and fractionated into neutral and polar lipid fractions by silicic acid column chromatography and gas-liquid chromatography (Liendo et al., 1999; Lorente et al., 2004). The neutral lipid fractions were first analyzed by thin-layer chromatography (on Merck 5721 silica gel plates with hexane:ethyl ether:glacial acetic acid [80:20:2] as the developing solvent) and conventional gas-liquid chromatography (isothermic separation in a 4-m glass column packed with 3% OV-1 on

Chromosorb 100/200 mesh with nitrogen as the carrier gas at 24 ml/min and flame ionization detection in a Varian 3700 gas chromatograph). For quantitative analysis and structural assignments, the neutral lipids were separated in a capillary high-resolution column (Ultra-2 column, 25 m by 0.20 mm inner diameter, 5% phenyl-methyl-siloxane, 0.33- μm film thickness) in a Hewlett-Packard 6890 Plus gas chromatograph equipped with an HP5973A mass sensitive detector. The lipids were injected in chloroform, and the column was kept at 50°C for 1 min, and then the temperature was increased to 270°C at a rate of 25°C min⁻¹ and finally to 300°C at a rate of 1°C min⁻¹. The carrier gas (He) flow was kept constant at 0.5 ml min⁻¹. The injector temperature was 250°C, and the detector was kept at 280°C.

3. Results

3.1. Depletion of squalene epoxidase is detrimental to growth in *Trypanosoma brucei*

We employed the RNAi technique to knock-down expression of squalene epoxidase using a stem-loop/stuffer strategy. Thus, we generated two different trypanosome lines that expressed 645bp and 522bp fragments of the *ERG1* gene, under the control of a tetracycline-inducible promoter (figure 1). No phenotypical differences were found between both constructs and therefore construct 1 was selected for further studies. Procyclic forms (PFs) were grown in SDM-79 medium to analyze the resulting phenotype. The depletion of the enzyme produced a pronounced decrease in proliferation after 48 hours and growth was practically abolished after 4 days of induction (figure 2).

In the case of RNAi mediated knock-down of *TbSQE* expression in bloodstream forms (BFs), there was a growth inhibition around 30% after 4-6 days yet it was slowly restored thereafter (Figure 3). Western blot analysis of *TbQE* showed a reduction of protein of more than 90% in procyclics yet approximately 30-40% protein remained in BFs. Several constructs and clones were examined for improved protein depletion yet full elimination of protein expression could not be achieved.

Since the effect of inhibition of endogenous sterol synthesis may be dependent on exogenous sterol availability, growth defects were analyzed in procyclic cells where

RNAi induction was performed in lipid deficient media. However, the severe growth defect phenotype was not further pronounced as a result of lipid depletion (figure 4) and in both cases cells rapidly died after about 4 days of doxycycline induction.

TbSQE depleted cells were analysed for sensitivity to the sterol biosynthesis inhibitors (SBIs) mevastatine, terbinafine and ketoconazole. These compounds are inhibitors of the enzymes 3-hydroxy 3-methylglutaryl CoA reductase, squalene epoxidase and 14- α demethylase, respectively. An initial observation is that all three compounds showed activity against both PFs and BFs therefore suggesting that endogenous sterol biosynthesis is required for growth of both life forms in *T. brucei* (table 2), although in the case of mevastatine, inhibition of the synthesis of other isoprenoids (prenyl moiety of prenylated proteins, uiquinone etc.) should be considered. Only in the case of bloodstream forms could slight hypersensitivity to terbinafine and significant sensitivity to ketoconazole be observed (figures 5 and 6).

3.2. *TbSQE* deficient cells present altered sterol profiles and increased squalene accumulation

The composition of sterols in the different life forms of *Trypanosoma brucei* has been previously established (Gros et al., 2006; Zhou et al., 2007). In the present study major components in procyclic forms are cholesterol (approximately 65%), ergosterol (3%) and cholesta-5,7,24-trienol (9%). In the case of BFs, cholesterol is the major sterol (Gros et al., 2006). *TbSQE* depletion resulted in a significant accumulation of squalene as observed by simple TLC separation of the neutral lipid fraction of induced cells. Further sterol analysis was performed by GC-MS and confirmed a pronounced accumulation of squalene (mass 410) and a depletion of post-squalene sterol products. Thus, there was a significant reduction in ergosterol and ergosta type sterols as well as in cholesta-5,7,24-trienol, presumably a precursor in ergosterol biosynthesis (figure 7). This result is consistent with a block in endogenous sterol synthesis. Labelling experiments using ^3H -MVA allowed for measurements of short term *de novo* sterol biosynthesis and confirmation of the result of *TbSQE* depletion. Thus cells were incubated for 2 hours with the radioactive precursor and submitted to lipid extraction and neutral lipid separation. Products were later resolved by TLC and the distribution of radioactivity was monitored. Indeed *TbSQE* deficient cells exhibit increased amounts of radioactivity in the area corresponding to squalene while the amount of label associated

with the sterol fraction where ergosta and cholesta type sterols comigrate was significantly diminished (figure 8).

In the case of bloodstream forms, RNAi-mediated depletion of *TbSQE* resulted also in profound modification of the sterol profile and an accumulation of a radioactive precursor migrating as squalene in labelling experiments (figure 9). Likewise radioactivity associated with the sterol fraction was decreased. The GC-MS data obtained from *TbSQE* depleted BFs was somewhat controversial since there was a significant accumulation of multiple non-identified cholesta type sterols (molecular mass 384) while significant levels of squalene could not be detected (figure 7). Thus, while *de novo* sterol synthesis in bloodstream forms has been assumed to be negligible, the present results show that definitely mevalonate is incorporated to different products in this form of the parasite and that an accumulation of cholesta-type sterols occurs upon *TbSQE* depletion indicating perturbations in sterol homeostasis as a result of the reduction in the conversion of squalene to squalene epoxide.

3.3. Squalene epoxidase depletion gives rise to severe morphological and cell cycle defects

An antibody specifically directed towards *T. brucei* SQE was used in immunofluorescence studies. The polyclonal antibody was produced in rabbits by immunization with a purified truncated version of *TbSQE* obtained from inclusion bodies using SDS-PAGE. Saturation experiments and Western blotting showed that a specific protein of the expected molecular mass of both PFs and BFs was recognised by the polyclonal antibody (figure 10 and 11). Intracellular localization studies show that the enzyme is located to the endoplasmic reticulum and colocalizes with BiP, a protein of the lumen of the endoplasmic reticulum that is used frequently as a marker for this subcellular compartment in *Trypanosoma* (Bangs et al., 1996) (figure 12). Immunofluorescence analysis further evidenced a severe reduction of enzyme in cells where induction of RNAi had been performed. Potential alterations in the cell cycle were analysed by FACS and DAPI analysis of the kinetoplast and nuclear DNA content. The results shown in figures 13 and 14 indicate a slight decrease in cells with one nucleus and one kinetoplast (1K1N) while 2K1N cells slightly increased. A few cells with multiple kinetoplasts (more than two) and nuclei were also detected upon RNAi induction. Interestingly, cell morphology appeared significantly altered in procyclic

induced cells (figure 15). There were several parasites exhibiting enlarged flagellar pockets as well as a number of parasites with several nuclei (figure 15). Severe defects in cell shape were also observed; rounded and aberrant morphologies were indicative of pronounced membrane defects. Electron microscopy provided further insight into the intracellular defects resulting from *TbSQE* depletion. Thus, after 2 days of induction many procyclic parasites presented a complete vacuolization of the cytoplasm, in some cases appearing as structures similar to autophagosomes. Some parasites also presented many vesicles inside and in close association with the flagellar pocket and the flagellar pocket appeared significantly enlarged. Parasites also show a discreet swelling of the mitochondria and strikingly large electron-dense lipid bodies. In addition, some parasites present vesicular (disc-like) structures inside the mitochondria and atypical cytosolic vacuoles suggestive of alterations in the endocytic pathway (figure 16).

Marked disturbance of lipid homeostasis was further corroborated in immunofluorescence studies using Nile red (9-diethylamino-5H-benzo[α]phenoxazine-5-one) a vital stain used for the detection of intracellular lipid droplets. Figure 17 shows that *TbSQE* depleted PFs present multiple large-sized lipid droplets that are easily observable and presumably arise as a result of squalene accumulation and modification in the sterol balance.

In the case of bloodstream forms, immunofluorescence studies showed significant expression of the enzyme in this life form again located in the endoplasmic reticulum (figure 12) and a distinct reduction in the intensity of fluorescence in RNAi (figure 3) induced cells. The *TbSQE* deficient BF population contained many cells with multiple or elongated nuclei and multiple flagella indicating major defects in cytokinesis. Thus DAPI staining analysis revealed a small decrease in both cells with one nucleus and one kinetoplast (1K1N) and in 2K1N cells while cells with multiple kinetoplasts and a bulky nuclear aggregate or multiple nuclei (designed XNXX) emerged during RNAi and increased from ~ 0.5% to ~ 10% of the population after 10 days (figure 14). The cell designed XNXX were a gigantic size, at least several fold larger than the wild type. FACS analysis showed an accumulation of post G2/M cells (figure 13). They had lost the original morphology and become round-shaped containing multiple kinetoplasts and a large amount of nuclear bulky DNA, which in

certain cells was disorganized and fragmented. Some of these cells were apparently polyploid, suggesting the occurrence of additional rounds of nuclear DNA synthesis in the absence of chromosome segregation. The presence of multiple kinetoplasts also indicated a continuous progression of the kinetoplast cycle while cytokinesis was blocked. Observation of these cells using electron microscopy showed the appearance of marked defects including multiple nuclei and flagella, appearance of enlarged flagellar pockets, intense disorganization in the plasma membrane, strong alteration in cell shape, mitochondrial swelling and multiple vesicular bodies (figure 18).

3.4. Sterol methyl transferase is expressed in both procyclic and bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* and is located in the endoplasmic reticulum

Specific antibodies directed towards *T. brucei* SMT were obtained. The enzyme was expressed in *E coli* and obtained by electroelution from denaturing SDS-PAGE gels. Recombinant protein purified this way was used for production of rabbit polyclonal antibodies. Saturation experiments and Western blotting showed that a specific protein of the expected molecular mass of both PFs and BFs was recognised by the polyclonal antibody (figure 10 and 11). As previously described (Gros et al., 2006) expression in BFs was quantified to be approximately three fold lower than in PFs. The antibodies were used in immunofluorescence experiments. We have previously described that SMT in the protozoan *Leishmania* is preferentially located in the endoplasmic reticulum and in endocytic vesicles (Jimenez-Jimenez et al., 2008). The distribution pattern for SMT in *T. brucei* procyclic and bloodstream cells is shown in figure 19. Significant fluorescence was observed for both forms further corroborating significant expression of this sterol biosynthesis enzyme in bloodstreams. The staining pattern clearly resembled that of an enzyme located to the endoplasmic reticulum and colocalizes with BiP. In the case of the procyclic cells again staining was more intense and evenly distributed than in the case of bloodstream cells.

3.5. *Tb*SMT depleted cells present a normal growth phenotype and are not hypersensitive to sterol biosynthesis inhibitors

For the RNAi study we generated two trypanosomes lines that expressed respectively 515 bp and 468 bp fragments of the *ERG6* gene (figure 20), under the control of a tetracycline-inducible promoter. Similar growth phenotypes were obtained in both cases so only one construct was selected at random for further studies. RNAi-

mediated inhibition of *TbSMT* expression was evidenced by Northern and Western blotting (figures 21 and 22). No enzyme could be detected in depleted cells after 2 days of RNAi induction in PFs while approximately 5% was still remaining after prolonged RNAi induction in BFs. Impairment in 24-alkyl sterol synthesis did not result in any case in a defective growth phenotype. Further analysis in a cholesterol depleted medium where whole serum was substituted by lipoprotein deficient serum did not result either in defective growth of procyclics (figure 4). Thus, even in conditions of reduced exogenous cholesterol availability, cells did not present evident defects in proliferation after the full depletion of *TbSMT* activity. Immunofluorescence analysis of RNAi induced cells confirmed the efficiency of RNAi mediated *TbSMT* depletion. Thus, RNAi induced cells exhibited severely reduced fluorescence (figures 21 and 22).

It has been shown in yeast that mutants defective in *erg6* (the yeast gene encoding 24-SMT) are hypersensitive to certain drugs such as terbinafine, an inhibitor of squalene epoxidase. Indeed in general hypersensitivity to several SBIs in ergosterol deficient yeast mutants have been reported (Song et al., 2003). *TbSMT* depleted cells were tested again for sensitivity to mevastatin, terbinafine, ketoconazole. The resulting growth curves are shown in figure 23 for PFs and figure 24 for BFs. Growth inhibition was always slightly enhanced by the presence of SBIs in *TbSMT* depleted cells with regard to non induced cells, yet differences were not significant. We conclude that while inhibitors that act specifically on certain steps of the ergosterol biosynthetic pathway are cytotoxic in both procyclic and BFs, depletion of alkyl sterols does not result in defects in growth and the cytotoxic effects of compounds such as terbinafine and ketoconazole are not due to depletion of 24-alkylsterols.

3.6. *TbSMT* depleted cells are defective in 24-alkyl sterols and exhibit an increased accumulation of zymosterol, the substrate of SMT

Labelling studies using ^3H -MVA and sterol profile analysis were newly performed to establish the impact of *TbSMT* depletion on endogenous sterol biosynthesis. After incubation with labelled mevalonate, lipid extracts of *TbSMT* depleted cells were obtained by extraction with chloroform/methanol and the neutral lipid fraction was attained by further purification and elution with chloroform in silic acid columns as described in the Methods section. The neutral lipid fraction was analysed by GC-MS and the sterol composition of procyclic cells is shown in figure 7.

TbSMT depletion resulted in a significant accumulation of zymosterol which is the preferred substrate of SMT in *T. brucei* (Zhou et al., 2006) while there was a marked decrease in the percentage of ergosterol and ergosta type sterols. A slight increase in cholesta-5,7,24-trienol is also worthy of mention. Consequently, in these cells, cholesterol was the major sterol accounting for 92% of total sterol mass. In bloodstream forms, *TbSMT* RNAi produced an increase in cholesta-7,24-dienol and a concomitant decrease in the percentage of cholesterol. In summary, *TbSMT* depletion does not appear to be detrimental to growth in these parasites however significant modifications in the sterol profile arise as a consequence of the perturbation of 24-alkylation.

In order to identify the potential cell cycle defect produced after knocking-down of *TbSMT*, DNA was labeled with propidium iodide and the DNA content of control cell lines and induced cell populations were determined by FACS analysis. Induction of *TbSMT* RNAi in procyclic forms for 6 days resulted in a slight increase in cells arrested in post G2/M phase (figure 26). In bloodstream forms a small proportion of cells exhibiting highly elongated and enlarged nuclei and multiple kinetoplasts (XNXX) was also detected (figure 25). Formation of the XNXX cells may contribute to the increase of post G2/M population identified in the FACS analysis (figure 26).

Electron microscopy was used for detailed analysis of *TbSMT* deficient cells. Studies in yeast have revealed that deletion of *ERG6* gives rise to pleiotropic phenotypes that include defective conjugation, hypersensitivity to cycloheximide, resistance to nystatin, a severely diminished capacity for genetic transformation, and defective tryptophan uptake (Gaber et al., 1989). These phenotypes reflect the role of ergosterol as a regulator of membrane permeability and fluidity. The analysis revealed the appearance of electron dense vacuoles of great size that had the appearance of lipid droplets (figure 28) that were further identified by Nile red staining (figure 27). Bloodstream cells showed significant defects in membranes morphology and several nuclei. Some cells contain a big flagellar pocket, mitochondrial swelling and vesicular bodies containing membrane fragments.

4. Discussion

The potent activity observed for certain compounds that inhibit the sterol biosynthetic pathway against the bloodstream forms of the parasite (Lorente et al., 2004; Lepesheva et al., 2007; Lepesheva et al., 2008), led us to revisit the very well documented issue that *T. brucei* bloodstream forms lack the ability to synthesize sterols and depend on the presence in the culture medium of plasma low density lipoprotein particles which are necessary for membrane assembly (Coppens and Courtoy, 1995, 2000). Conversely procyclics may obtain sterols from both exogenous and endogenous sources and both pathways appear to compensate for each other as incorporation of exogenous lipid down regulates the isoprenoid biosynthetic machinery (Coppens and Courtoy, 1995).

We and others have previously established the sterol composition of bloodstream and procyclic forms of *T. brucei* 24-alkylated sterols are present in procyclic forms but are absent in the bloodstream form, where cholesterol is the main present sterol (Gros et al., 2006; Zhou et al., 2007). However several other sterol molecules have been identified in procyclics indicating a non conventional ergosterol pathway (Zhou et al., 2007). Sterols may be important from two points of view. First, they have a bulk structural role in cellular membranes and are important for function, stability and permeability. However, sterol derivatives or intermediates may also constitute functionally active metabolites with distinct roles in metabolism that cannot be replaced by cholesterol. Thus, previous studies in fungi and protozoa suggest that 24-methyl sterols serve a dual role in cells (Bloch, 1983; Rodriguez et al., 1985; Roberts et al., 2003): one so called “sparkling”, that involves hormonal levels of sterol and that is involved in cell proliferation, and a second bulk role which satisfies general structural requirements.

The essential nature of late steps in ergosterol biosynthesis in *T. brucei* has not been previously investigated. To address this, we first analysed the requirement of *TbSQE* by down regulating its expression by RNAi with a tetracycline inducible system (Alibu et al., 2005). Northern blot analysis clearly indicated that the *ERG1* gene was transcribed in both bloodstream forms and procyclic forms of *T. brucei*. During the course of the induction procyclic cells showed a pronounced decrease in the growth rate when compared to the non-induced cultures. RNAi mediated depletion of *TbSQE*

expression appeared to be highly efficient with less than 10% mRNA and protein remaining after 48 hours of induction. Growth defects were independent of exogenous sterol supply and resulted in profound modifications in cell morphology as well as perturbations in vesicular transport and lipid content.

Surprisingly, the down-regulation of squalene epoxidase had also a clear effect on cell proliferation and morphology in the bloodstream cells. Major defects included enlarged or multiple flagellar pockets and the presence of giant polyploid cells indicating multiple rounds of mitosis without completion of cytokinesis. This is indicative of profound differences in certain cell cycle check-points which allow for replication and nuclear division to proceed in the absence of cytokinesis in bloodstream forms of *T. brucei*. The reduction in growth was observed both in the presence of whole serum and when LPD serum was used suggesting that the mode of toxicity was not related to bulk sterol requirements.

Ultrastructural alterations induced by ergosterol biosynthesis inhibitors in parasites have been previously reported (Lazardi et al., 1990; Rodriguez et al., 2002; Braga et al., 2004; Rodrigues et al., 2005; Santa-Rita et al., 2005). In addition, studies in *Candida albicans* have shown that blocking of 14 α -demethylase, leading to cholesterol starvation, produces the inhibition of cytokinesis and the formation of polyploid cells, which were multinucleated and had mitotic aberrations. Cholesterol is essential for mitosis completion and, in the absence of cholesterol, the cells fail to undergo cytokinesis, enter G1 phase at higher DNA ploidy (tetraploidy), and then progress through S (replication) into G2, generating polyploid cells (Fernandez et al., 2004). Ultrastructural damage has been reported also in *T. cruzi* epimastigotes after treatment with terbinafine, which blocks ergosterol synthesis in these cells at the level of squalene epoxidase and leads to almost immediate arrest of growth at concentrations greater than 1 μ M, produced proliferation of glycosome-like bodies, polynucleated cells (arrest at cytokinesis), and eventually massive vacuolization (Lazardi et al., 1990).

In the present case, the effect of *TbSQE* depletion on cell proliferation and morphology can be an indication of the need of post squalene metabolic intermediates that may have a cellular function different from bulk sterol requirement which could be

satisfied by cholesterol. On the other hand, it is possible that squalene is a toxic metabolite in trypanosoma and accumulation is a major source of toxicity. In this sense in fungi inhibition of squalene epoxidase by terbinafine, or other allylamine compounds caused a depletion of normal sterols and an accumulation of abnormal amounts of sterol precursors with cytostatic or cytotoxic consequences (Roberts et al., 2003). The inhibition of squalene epoxidase in yeast results in decreased ergosterol and intracellular accumulation of squalene, and its subsequent deposition in numerous lipid droplets through cytoplasm. The vacuolar and cell membranes, as well as the cell wall, are ultimately disrupted and damaged, resulting in fungicidal action (Jain and Sehgal, 2000). Itraconazole (azole), and antifungal, also inhibit ergosterol biosynthesis, but at a later step than terbinafine, after the formation of lanosterol, and are primarily fungistatic, thereby favouring the conclusion that squalene inhibition and squalene accumulation are decisive factors in fungicidal activity (Jain and Sehgal, 2000).

Indeed, multiple evidences are provided here showing a significant accumulation of squalene in procyclic forms upon RNAi induction. Thus, squalene accumulation is demonstrated in both short terms labelling experiments and analysis of the sterol profile where squalene appeared de constitue 14.7% of total isoprenoid evaluated in the neutral lipid fraction. In addition, immunofluorescence studies with Nile red together with ultrastructural analysis of *TbSQE* depleted *T. brucei* cells evidenced the presence of multiple electron dense vacuoles with the typical morphology of lipid inclusions possibly containing an accumulation of squalene. It is possible that squalene accumulation is a major cause of cell death also in *Trypanosoma*.

In the case of BFs squalene appeared to accumulate as a result of *TbSQE* depletion when ^3H -MVA incorporation was analysed. Conversely, the lipid profile, as determined by GC-MS, did not reveal increased levels of squalene. It is possible that this form of the parasite is capable of squalene secretion that allows for elimination of the squalene accumulated which does not then impact of the sterol profile resulting from long-term sterol perturbation. Indeed BFs present extremely high rates of endosome recycling versus procyclic forms (Natesan et al., 2007) which may allow for elimination

of toxic intermediates. On the other hand, the appearance of multiple cholesta type sterols may result from the profound modification in endogenous sterol homeostasis.

In summary, we conclude that the blockage of sterol biosynthesis at the level of squalene epoxidase leads to growth defects and severe morphological alterations in both procyclic and bloodstream forms of *T. brucei*, an observation that suggests that sterol biosynthesis inhibitors may have useful antitrypanosomal activity in the treatment of sleeping sickness. We show that carbon flow through the sterol pathway in bloodstreams occurs and leads to metabolites present in low quantities. Interruption of this low yet sustained carbon flow would lead to the accumulation of toxic intermediates and/or to the depletion of essential metabolites usually present in minor amounts. In any case, previous observations establishing the idea that efficient endogenous sterol biosynthesis is not required for growth in bloodstream forms should be reconsidered in the light of these findings.

5. References

- Acuna-Johnson, A.P., Oehlschlager, A.C., Pierce, A.M., Pierce, H.D., Jr., Czyzewska, E.K., 1997. Stereochemistry of yeast delta 24-sterol methyl transferase. *Bioorganic & medicinal chemistry* 5, 821-832.
- Akins, R.A., 2005. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol* 43, 285-318.
- Alibu, V.P., Storm, L., Haile, S., Clayton, C., Horn, D., 2005. A doubly inducible system for RNA interference and rapid RNAi plasmid construction in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology* 139, 75-82.
- Athenstaedt, K., Zweytick, D., Jandrositz, A., Kohlwein, S.D., Daum, G., 1999. Identification and characterization of major lipid particle proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology* 181, 6441-6448.
- Ator, M.A., Schmidt, S.J., Adams, J.L., Dolle, R.E., Kruse, L.I., Frey, C.L., Barone, J.M., 1992. Synthesis, specificity, and antifungal activity of inhibitors of the *Candida albicans* delta 24-sterol methyltransferase. *Journal of medicinal chemistry* 35, 100-106.
- Bangs, J.D., Brouch, E.M., Ransom, D.M., Roggy, J.L., 1996. A soluble secretory reporter system in *Trypanosoma brucei*. *Studies on endoplasmic reticulum targeting. The Journal of biological chemistry* 271, 18387-18393.
- Bloch, K.E., 1983. Sterol structure and membrane function. *CRC critical reviews in biochemistry* 14, 47-92.
- Bouvier-Nave, P., Husselstein, T., Benveniste, P., 1998. Two families of sterol methyltransferases are involved in the first and the second methylation steps of plant sterol biosynthesis. *European journal of biochemistry / FEBS* 256, 88-96.
- Braga, M.V., Urbina, J.A., de Souza, W., 2004. Effects of squalene synthase inhibitors on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *International journal of antimicrobial agents* 24, 72-78.

- Buckner, F., Yokoyama, K., Lockman, J., Aikenhead, K., Ohkanda, J., Sadilek, M., Sebti, S., Van Voorhis, W., Hamilton, A., Gelb, M.H., 2003. A class of sterol 14-demethylase inhibitors as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 15149-15153.
- Clayton, C.E., Estevez, A.M., Hartmann, C., Alibu, V.P., Field, M., Horn, D., 2005. Down-regulating gene expression by RNA interference in *Trypanosoma brucei*. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J 309, 39-60.
- Coppens, I., Courtoy, P.J., 1995. Exogenous and endogenous sources of sterols in the culture-adapted procyclic trypomastigotes of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology* 73, 179-188.
- Coppens, I., Courtoy, P.J., 2000. The adaptative mechanisms of *Trypanosoma brucei* for sterol homeostasis in its different life-cycle environments. *Annual review of microbiology* 54, 129-156.
- Estevez, A.M., Kempf, T., Clayton, C., 2001. The exosome of *Trypanosoma brucei*. *The EMBO journal* 20, 3831-3839.
- Favre, B., Ryder, N.S., 1997. Cloning and expression of squalene epoxidase from the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Gene* 189, 119-126.
- Fernandez, C., Lobo Md Mdel, V., Gomez-Coronado, D., Lasuncion, M.A., 2004. Cholesterol is essential for mitosis progression and its deficiency induces polyploid cell formation. *Experimental cell research* 300, 109-120.
- Gaber, R.F., Copple, D.M., Kennedy, B.K., Vidal, M., Bard, M., 1989. The yeast gene ERG6 is required for normal membrane function but is not essential for biosynthesis of the cell-cycle-sparking sterol. *Molecular and cellular biology* 9, 3447-3456.
- Gaylor, J.L., 2002. Membrane-bound enzymes of cholesterol synthesis from lanosterol. *Biochemical and biophysical research communications* 292, 1139-1146.
- Goldstein, J.L., Brown, M.S., 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343, 425-430.
- Gros, L., Castillo-Acosta, V.M., Jimenez Jimenez, C., Sealey-Cardona, M., Vargas, S., Manuel Estevez, A., Yardley, V., Rattray, L., Croft, S.L., Ruiz-Perez, L.M., Urbina, J.A., Gilbert, I.H., Gonzalez-Pacanowska, D., 2006. New azasterols against *Trypanosoma brucei*: role of 24-sterol methyltransferase in inhibitor action. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50, 2595-2601.
- Haughan, P.A., Chance, M.L., Goad, L.J., 1995. Effects of an azasterol inhibitor of sterol 24-transmethylation on sterol biosynthesis and growth of *Leishmania donovani* promastigotes. *The Biochemical journal* 308 (Pt 1), 31-38.
- Hucke, O., Gelb, M.H., Verlinde, C.L., Buckner, F.S., 2005. The protein farnesyltransferase inhibitor Tipifarnib as a new lead for the development of drugs against Chagas disease. *Journal of medicinal chemistry* 48, 5415-5418.
- Jain, S., Sehgal, V.N., 2000. Onychomycosis: treatment perspective. *International journal of dermatology* 39, 10-14.
- Jimenez-Jimenez, C., Carrero-Lerida, J., Sealey-Cardona, M., Ruiz Perez, L.M., Urbina, J.A., Gonzalez Pacanowska, D., 2008. Delta(24 (25))-sterol methenyltransferase: Intracellular localization and azasterol sensitivity in *Leishmania major* promastigotes overexpressing the enzyme. *Molecular and biochemical parasitology* 160, 52-59.
- Klobucnikova, V., Kohut, P., Leber, R., Fuchsbichler, S., Schweighofer, N., Turnowsky, F., Hapala, I., 2003. Terbinafine resistance in a pleiotropic yeast

- mutant is caused by a single point mutation in the ERG1 gene. *Biochemical and biophysical research communications* 309, 666-671.
- Krisans, S.K., 1996. Cell compartmentalization of cholesterol biosynthesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 804, 142-164.
- Lazardi, K., Urbina, J.A., de Souza, W., 1990. Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 34, 2097-2105.
- Leber, R., Landl, K., Zinser, E., Ahorn, H., Spok, A., Kohlwein, S.D., Turnowsky, F., Daum, G., 1998. Dual localization of squalene epoxidase, Erg1p, in yeast reflects a relationship between the endoplasmic reticulum and lipid particles. *Molecular biology of the cell* 9, 375-386.
- Leber, R., Fuchsbichler, S., Klobucnikova, V., Schweighofer, N., Pitters, E., Wohlfarter, K., Lederer, M., Landl, K., Ruckenstuhl, C., Hapala, I., Turnowsky, F., 2003. Molecular mechanism of terbinafine resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47, 3890-3900.
- Lepesheva, G.I., Ott, R.D., Hargrove, T.Y., Kleshchenko, Y.Y., Schuster, I., Nes, W.D., Hill, G.C., Villalta, F., Waterman, M.R., 2007. Sterol 14alpha-demethylase as a potential target for antitrypanosomal therapy: enzyme inhibition and parasite cell growth. *Chemistry & biology* 14, 1283-1293.
- Lepesheva, G.I., Hargrove, T.Y., Kleshchenko, Y., Nes, W.D., Villalta, F., Waterman, M.R., 2008. CYP51: A major drug target in the cytochrome P450 superfamily. *Lipids* 43, 1117-1125.
- Liendo, A., Visbal, G., Piras, M.M., Piras, R., Urbina, J.A., 1999. Sterol composition and biosynthesis in *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Molecular and biochemical parasitology* 104, 81-91.
- Lorente, S.O., Rodrigues, J.C., Jimenez Jimenez, C., Joyce-Menekse, M., Rodrigues, C., Croft, S.L., Yardley, V., de Luca-Fradley, K., Ruiz-Perez, L.M., Urbina, J., de Souza, W., Gonzalez Pacanowska, D., Gilbert, I.H., 2004. Novel azasterols as potential agents for treatment of leishmaniasis and trypanosomiasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48, 2937-2950.
- Magaraci, F., Jimenez, C.J., Rodrigues, C., Rodrigues, J.C., Braga, M.V., Yardley, V., de Luca-Fradley, K., Croft, S.L., de Souza, W., Ruiz-Perez, L.M., Urbina, J., Gonzalez Pacanowska, D., Gilbert, I.H., 2003. Azasterols as inhibitors of sterol 24-methyltransferase in *Leishmania* species and *Trypanosoma cruzi*. *Journal of medicinal chemistry* 46, 4714-4727.
- Mangla, A.T., Nes, W.D., 2000. Sterol C-methyl transferase from *Prototheca wickerhamii* mechanism, sterol specificity and inhibition. *Bioorganic & medicinal chemistry* 8, 925-936.
- Mullner, H., Zweytick, D., Leber, R., Turnowsky, F., Daum, G., 2004. Targeting of proteins involved in sterol biosynthesis to lipid particles of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta* 1663, 9-13.
- Natesan, S.K., Peacock, L., Matthews, K., Gibson, W., Field, M.C., 2007. Activation of endocytosis as an adaptation to the mammalian host by trypanosomes. *Eukaryotic cell* 6, 2029-2037.
- Nes, W.D., Janssen, G.G., Bergenstrahle, A., 1991. Structural requirements for transformation of substrates by the (S)-adenosyl-L-methionine:delta 24(25)-sterol methyl transferase. *The Journal of biological chemistry* 266, 15202-15212.

- Nes, W.D., Guo, D., Zhou, W., 1997. Substrate-based inhibitors of the (S)-adenosyl-L-methionine:delta24(25)- to delta24(28)-sterol methyl transferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of biochemistry and biophysics* 342, 68-81.
- Nes, W.D., 2000. Sterol methyl transferase: enzymology and inhibition. *Biochimica et biophysica acta* 1529, 63-88.
- Proszynski, T.J., Klemm, R.W., Gravert, M., Hsu, P.P., Gloor, Y., Wagner, J., Kozak, K., Grabner, H., Walzer, K., Bagnat, M., Simons, K., Walch-Solimena, C., 2005. A genome-wide visual screen reveals a role for sphingolipids and ergosterol in cell surface delivery in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 17981-17986.
- Roberts, C.W., McLeod, R., Rice, D.W., Ginger, M., Chance, M.L., Goad, L.J., 2003. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Molecular and biochemical parasitology* 126, 129-142.
- Rodrigues, J.C., Attias, M., Rodriguez, C., Urbina, J.A., Souza, W., 2002. Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22,26-azasterol, a delta(24(25))-sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46, 487-499.
- Rodrigues, J.C., Urbina, J.A., de Souza, W., 2005. Antiproliferative and ultrastructural effects of BPQ-OH, a specific inhibitor of squalene synthase, on *Leishmania amazonensis*. *Experimental parasitology* 111, 230-238.
- Rodriguez, N., Bailey, B.N., Martin, M.B., Oldfield, E., Urbina, J.A., Docampo, R., 2002. Radical cure of experimental cutaneous leishmaniasis by the bisphosphonate pamidronate. *The Journal of infectious diseases* 186, 138-140.
- Rodriguez, R.J., Low, C., Bottema, C.D., Parks, L.W., 1985. Multiple functions for sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta* 1837, 336-343.
- Santa-Rita, R.M., Lira, R., Barbosa, H.S., Urbina, J.A., de Castro, S.L., 2005. Antiproliferative synergy of lysophospholipid analogues and ketoconazole against *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): cellular and ultrastructural analysis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 55, 780-784.
- Song, J.L., Lyons, C.N., Holleman, S., Oliver, B.G., White, T.C., 2003. Antifungal activity of fluconazole in combination with lovastatin and their effects on gene expression in the ergosterol and prenylation pathways in *Candida albicans*. *Med Mycol* 41, 417-425.
- Sorger, D., Athenstaedt, K., Hrastnik, C., Daum, G., 2004. A yeast strain lacking lipid particles bears a defect in ergosterol formation. *The Journal of biological chemistry* 279, 31190-31196.
- Tsai, H.F., Bard, M., Izumikawa, K., Krol, A.A., Sturm, A.M., Culbertson, N.T., Pierson, C.A., Bennett, J.E., 2004. *Candida glabrata* *erg1* mutant with increased sensitivity to azoles and to low oxygen tension. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48, 2483-2489.
- Urbina, J.A., Lazard, K., Aguirre, T., Piras, M.M., Piras, R., 1988. Antiproliferative synergism of the allylamine SF 86-327 and ketoconazole on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 32, 1237-1242.
- Urbina, J.A., Lazard, K., Marchan, E., Visbal, G., Aguirre, T., Piras, M.M., Piras, R., Maldonado, R.A., Payares, G., de Souza, W., 1993. Mevilonin (lovastatin) potentiates the antiproliferative effects of ketoconazole and terbinafine against

- Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi: in vitro and in vivo studies. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 37, 580-591.
- Urbina, J.A., 1997. Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. *Parasitology* 114 Suppl, S91-99.
- Urbina, J.A., 2001. Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments. *Current opinion in infectious diseases* 14, 733-741.
- Urbina, J.A., Concepcion, J.L., Caldera, A., Payares, G., Sanoja, C., Otomo, T., Hiyoshi, H., 2004. In vitro and in vivo activities of E5700 and ER-119884, two novel orally active squalene synthase inhibitors, against Trypanosoma cruzi. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48, 2379-2387.
- Wirtz, E., Hoek, M., Cross, G.A., 1998. Regulated processive transcription of chromatin by T7 RNA polymerase in Trypanosoma brucei. *Nucleic acids research* 26, 4626-4634.
- Wirtz, E., Leal, S., Ochatt, C., Cross, G.A., 1999. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in Trypanosoma brucei. *Molecular and biochemical parasitology* 99, 89-101.
- Zhou, W., Lipesheva, G.I., Waterman, M.R., Nes, W.D., 2006. Mechanistic analysis of a multiple product sterol methyltransferase implicated in ergosterol biosynthesis in Trypanosoma brucei. *The Journal of biological chemistry* 281, 6290-6296.
- Zhou, W., Cross, G.A., Nes, W.D., 2007. Cholesterol import fails to prevent catalyst-based inhibition of ergosterol synthesis and cell proliferation of Trypanosoma brucei. *Journal of lipid research* 48, 665-673.
- Zinser, E., Paltauf, F., Daum, G., 1993. Sterol composition of yeast organelle membranes and subcellular distribution of enzymes involved in sterol metabolism. *Journal of bacteriology* 175, 2853-2858.

Table 1

Primers	Sequence	Restriction sites	Position	Fragment size
TbSQE1 5'	GA GGATCC AAGCTT CAA CCT GGA GGT ATG	<i>Bam</i> HI / <i>Hind</i> III	253-898 bp	645 bp
TbSQE1 3'	AAC GGGCCC AAC GAT GGT AAC GCT GG	<i>Hpa</i> I / <i>Apa</i> I		
TbSQE2 5'	GA GGATCC AAGCTT CTT CCA ACA TGC GAG AGC	<i>Bam</i> HI / <i>Hind</i> III	944-1466 bp	522 bp
TbSQE2 3'	AAC GGGCCC ACT TAA CGT GGC GAG GTT C	<i>Hpa</i> I / <i>Apa</i> I		
TbSMT1 5'	GA GGATCC AAGCTT GGA CGC CTG CGT GAC	<i>Bam</i> HI / <i>Hind</i> III	90-605 bp	515 bp
TbSMT1 3'	AAC GGGCCC AGG TTT GAT AGC GCG AAA C	<i>Hpa</i> I / <i>Apa</i> I		
TbSMT2 5'	GA GGATCC AAGCTT CGA CGG AGC ATA CGC	<i>Bam</i> HI / <i>Hind</i> III	517-985 bp	468 bp
TbSMT2 3'	AAC GGGCCC GCT CCT TCT TCG AGG ATC TC	<i>Hpa</i> I / <i>Apa</i> I		

Table 1. Oligonucleotides used to amplify RNAi fragments of *TbSQE* and *TbSMT*.

Table 2

Inhibitor	ED ₅₀ value (μM)	
	Procyclic forms	Bloodstream forms
Mevastatine	> 100	5.93 ± 0.01
Terbinafine	6.73 ± 0.43	31.68 ± 1.41
Ketoconazole	12.58 ± 2	17.92 ± 1.61

Table 2. Antiproliferative effects of mevastatine, terbinafine and ketoconazole against both procyclic and bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. Values are the average ± standard deviation obtained using six drug concentrations assayed in triplicate.

Figure 1

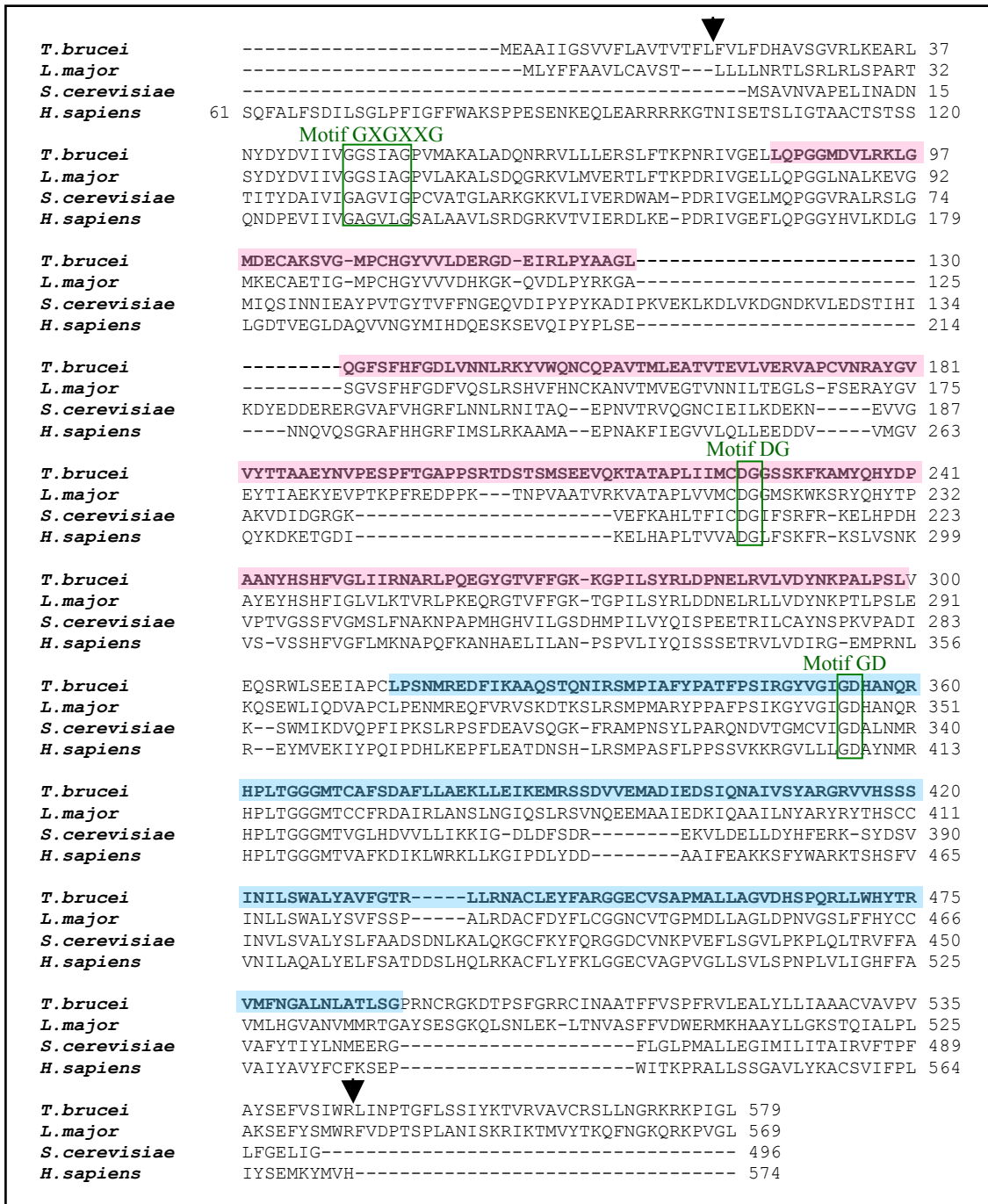


Figure 1. Alignment of the amino acid sequences of SQE from different organisms: *T. brucei* (Tb11.02.0780), *L. major* (LmjF13.1620), *S. cerevisiae* (YGR175C) and *H. sapiens* (NM 003129). The putative FAD-binding site (the dinucleotide-binding GXGXXG motif, and DG and GD motif) is marked in colour green. The two selected regions to construct the RNAi plasmids are marked in pink (construct 1) and blue (construct 2). The arrows indicate the truncation sites of both the amino and carboxy terminus used for expression of recombinant protein and antibody production.

Figure 2

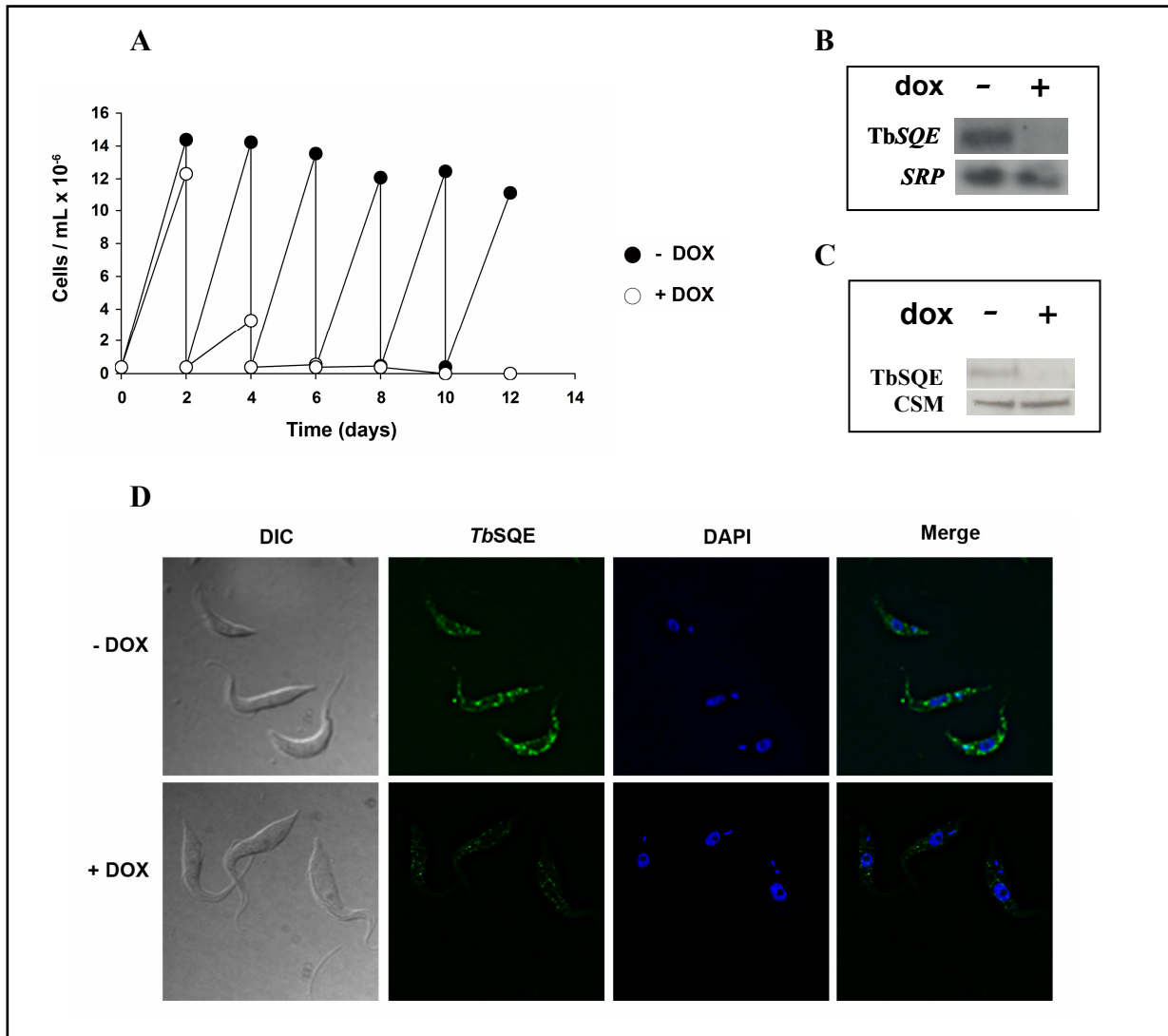


Figure 2. Depletion of *TbSQE* by RNA interference and effects on growth in procyclic forms. A cell line was generated that expressed *TbSQE*-specific dsRNA in a doxycycline-inducible manner. The levels of *TbSQE* mRNA (**B**) or protein by Western-blot (**C**) and immunofluorescence (**D**) were analyzed in cells incubated with doxycycline for 48 h. Loading controls were the signal-recognition particle RNA or the CSM protein. (**A**) The *TbSQE* RNAi cell line was grown in the absence (filled circles) or presence (open circles) of 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ doxycycline to induce RNAi. Cultures were followed up to 12 days and diluted every 2 days as required.

Figure 3

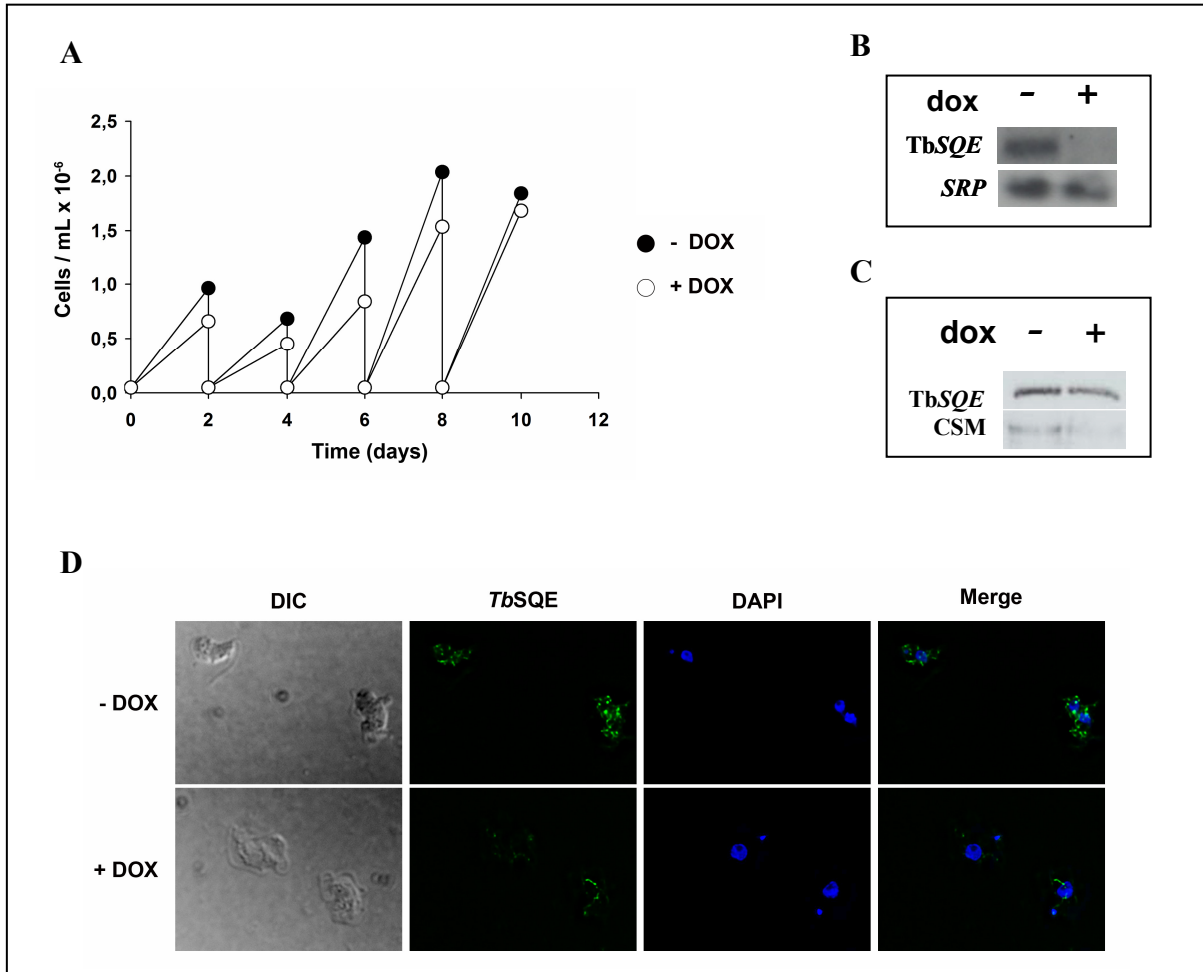


Figure 3. Depletion of *TbSQE* by RNA interference and effects on growth in bloodstream forms. A cell line was generated that expressed *TbSQE*-specific dsRNA in a doxycycline-inducible manner. (A) The *TbSQE* RNAi cell line was grown in the absence (filled circles) or presence (open circles) of 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ doxycycline to induce RNAi. Cultures were followed up to 10 days and diluted every 2 days as required. The levels of *TbSQE* mRNA (B) or protein by Western-blot (C) and immunofluorescence (D) were analyzed in cells incubated with doxycycline for 48 h. Loading controls were the signal-recognition particle RNA or the CSM protein.

Figure 4

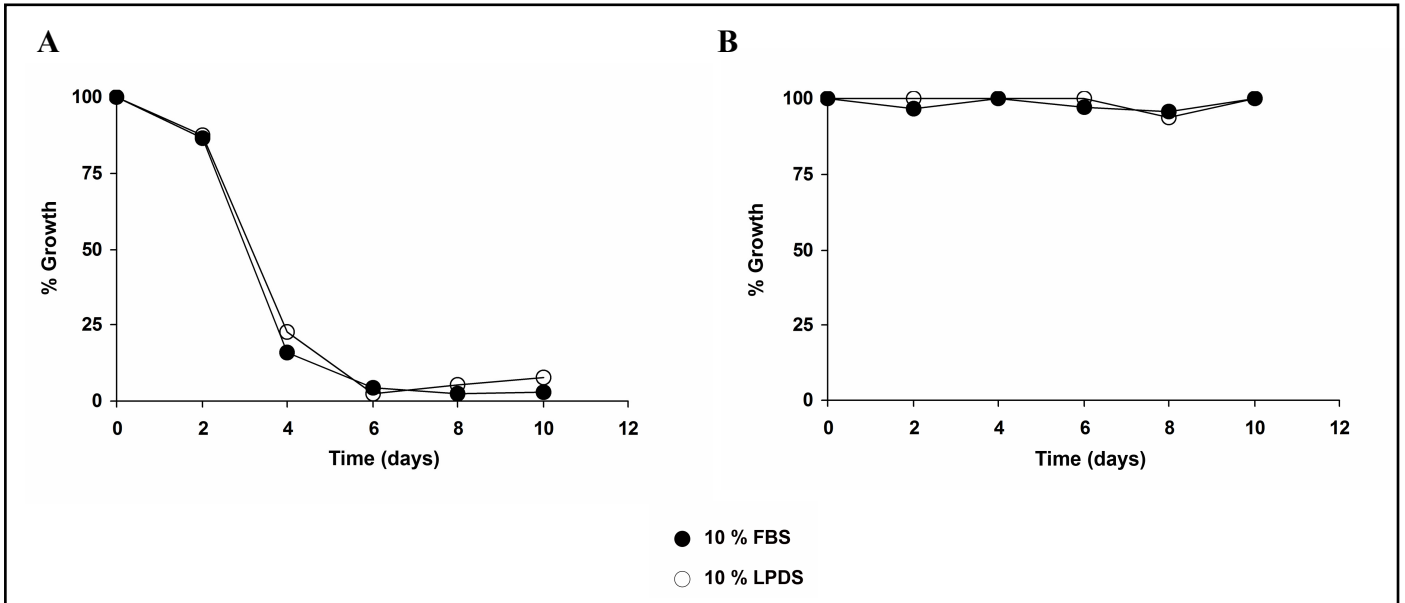


Figure 4. Growth percentage after *TbsQE* RNAi induction (A) and *TbsMT* RNAi induction (B) in procyclic forms. Cells were grown in medium supplemented with 10 % BSF (filled circles) or 10 % LPDS (open circles). Percentages of growth were calculated relative to non-induced control transfected cells.

Figure 5

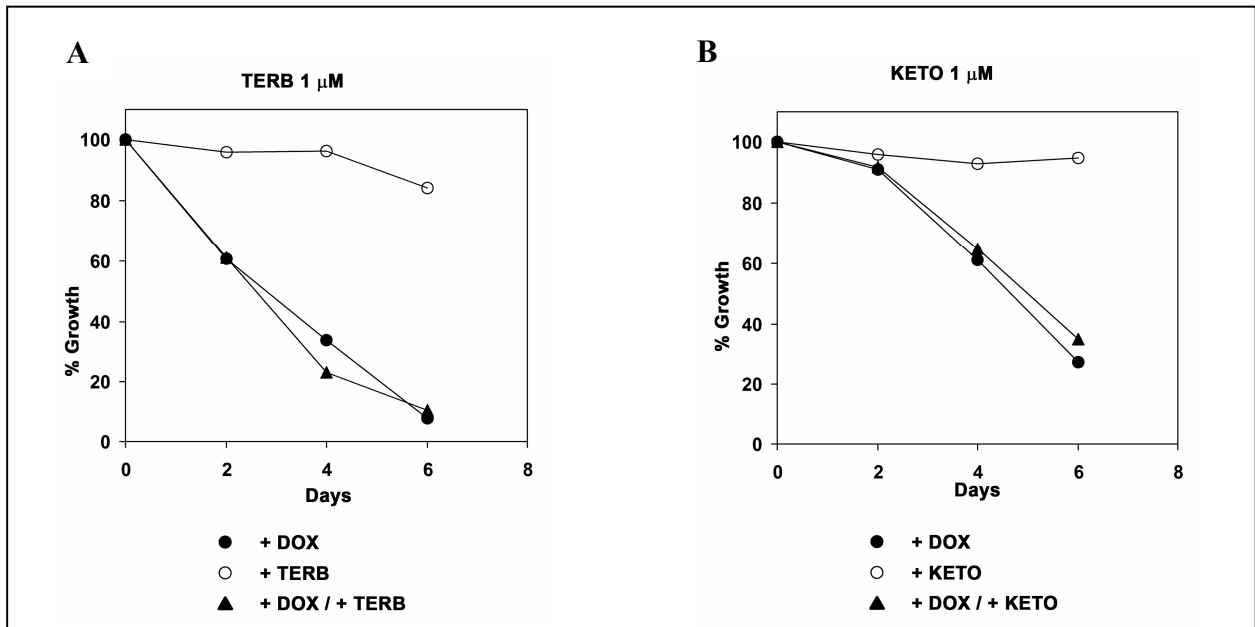


Figure 5. Growth percentage of procyclic forms (PF) harboring *TbsQE* RNAi in presence of terbinafine 1 μ M (A) and ketoconazole 1 μ M (B). Growth percentage was analyzed upon addition of 1 μ g·mL⁻¹ doxycycline (●); in the presence of drug (○); and upon addition of a mixture of 1 μ g·mL⁻¹ doxycycline and drug (▲).

Figure 6

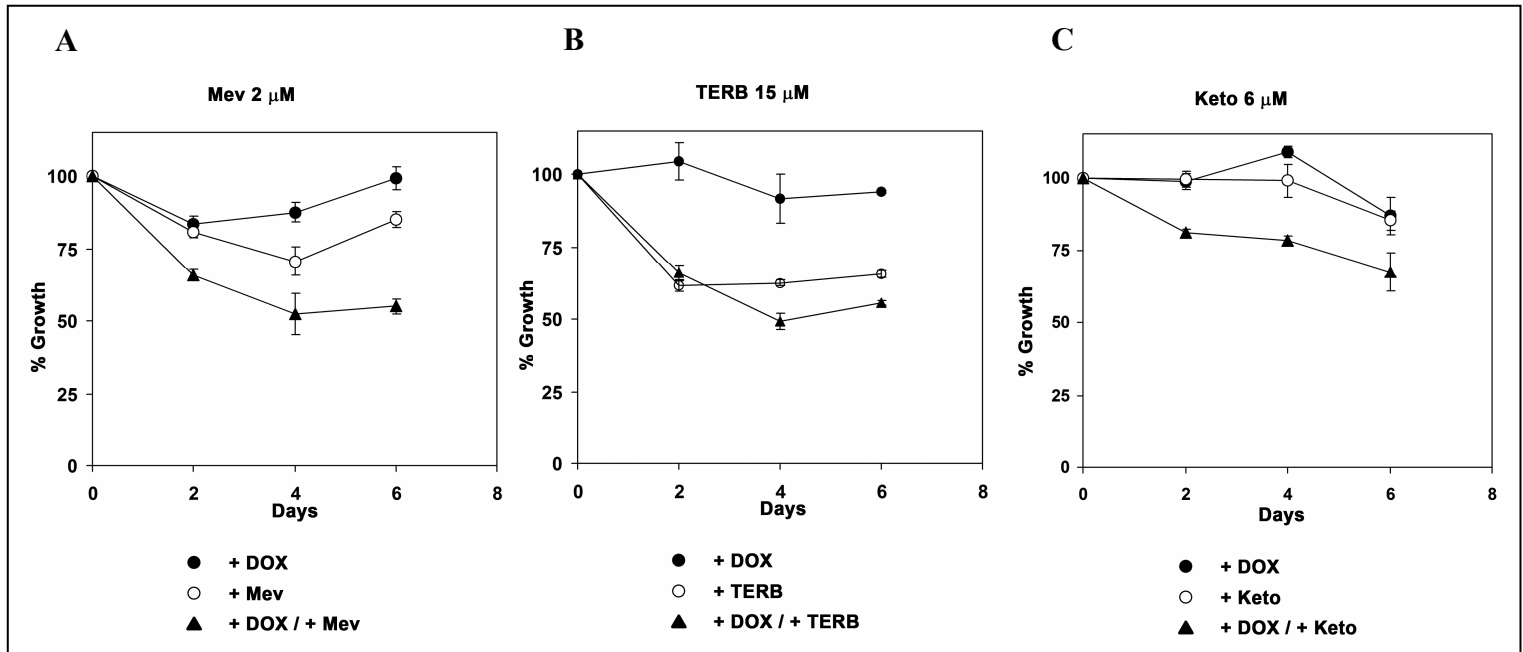


Figure 6. Growth percentage of bloodstream forms (BF) harboring *TbSQE* RNAi in presence of mevastatine 2 μM (A) terbinafine 15 μM (B) and ketoconazole 6 μM (C). Growth percentage was analyzed upon addition of 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ doxycycline (●); in the presence of drug (○); and upon addition of a mixture of 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ doxycycline and drug (▲).

Figure 7

(A)

Sterol	Molecular Weight	Structure	Retention time (min)	% of total sterol		
				<i>Tb</i> 449	<i>Tb</i> SQE RNAi	<i>Tb</i> SMT RNAi
Cholesta-5,7,24-trienol	382	1	18.8	9,2	0,7	1,7
Desmosterol	384	2	17.7	0,0	0,3	0,0
Cholesta-8,24-dienol (zymosterol)	384	3	18.7	0,0	0,2	6,2
Cholesta-7,24-dienol	384	4	21.3	20,3	4,6	0,0
Cholesterol	386	5	17.8	66,3	78,0	92,0
Ergosterol	396	6	19.8	3,2	1,3	0,0
Ergosta-8,24(25)-dienol	398	7	19.7	1,0	0,2	0,0
Squalene	410	8	13.8	0,0	14,7	0,1

(B)

Sterol	Molecular Weight	Structure	Retention time (min)	% of total sterol		
				<i>Tb</i> S16	<i>Tb</i> SQE RNAi	<i>Tb</i> SMT RNAi
Cholesta-5,7,24-trienol	382	1	18.8	1.69	4.99	1.95
Desmosterol	384	2	17.7	0.57	0.11	0.28
Cholesta-7,24-dienol	384	4	21.3	3.73	0.0	13.02
Cholesterol	386	5	17.8	93.86	67.93	84.47
Ergosta-8,24(25)-dienol	398	7	19.7	0.03	0.0	0.0
Squalene	410	8	13.8	0.0	0.0	0.0
Other cholesta sterols	384			0.12	26.96	0.28

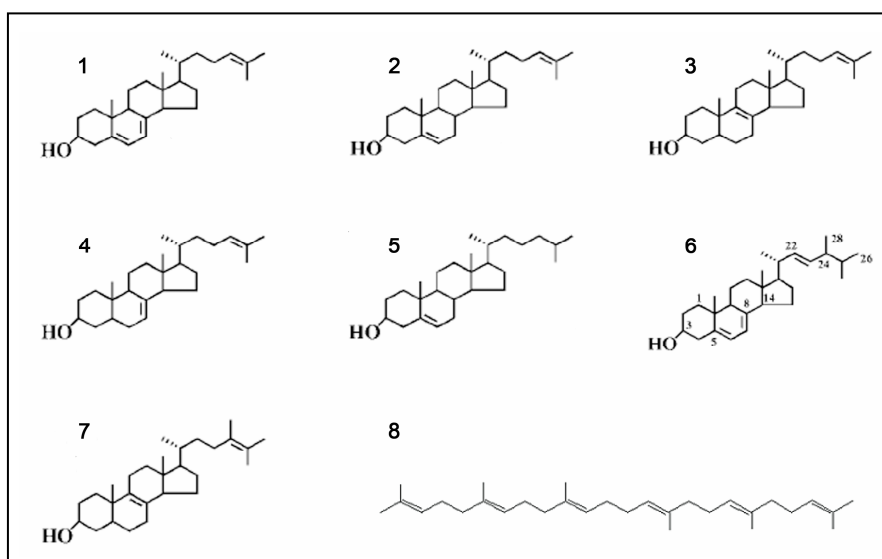


Figure 7. Effect of *Tb*SQE and *Tb*SMT RNAi on neutral lipid composition of procyclic cells after 2 and 6 days, respectively (A). (B) *Tb*SQE and *Tb*SMT RNAi bloodstream cell lines after 10 days of induction. Sterols were extracted from cells cultivated *in vitro* to late exponential growth phase. Neutral lipids were obtained by silicic acid column chromatography and analyzed by quantitative capillary gas-liquid chromatography and mass spectrometry. Composition is expressed as mass percentages. *Tb*449 (PF) and *Tb*S16 (BF) cell lines were used as controls.

Figure 8

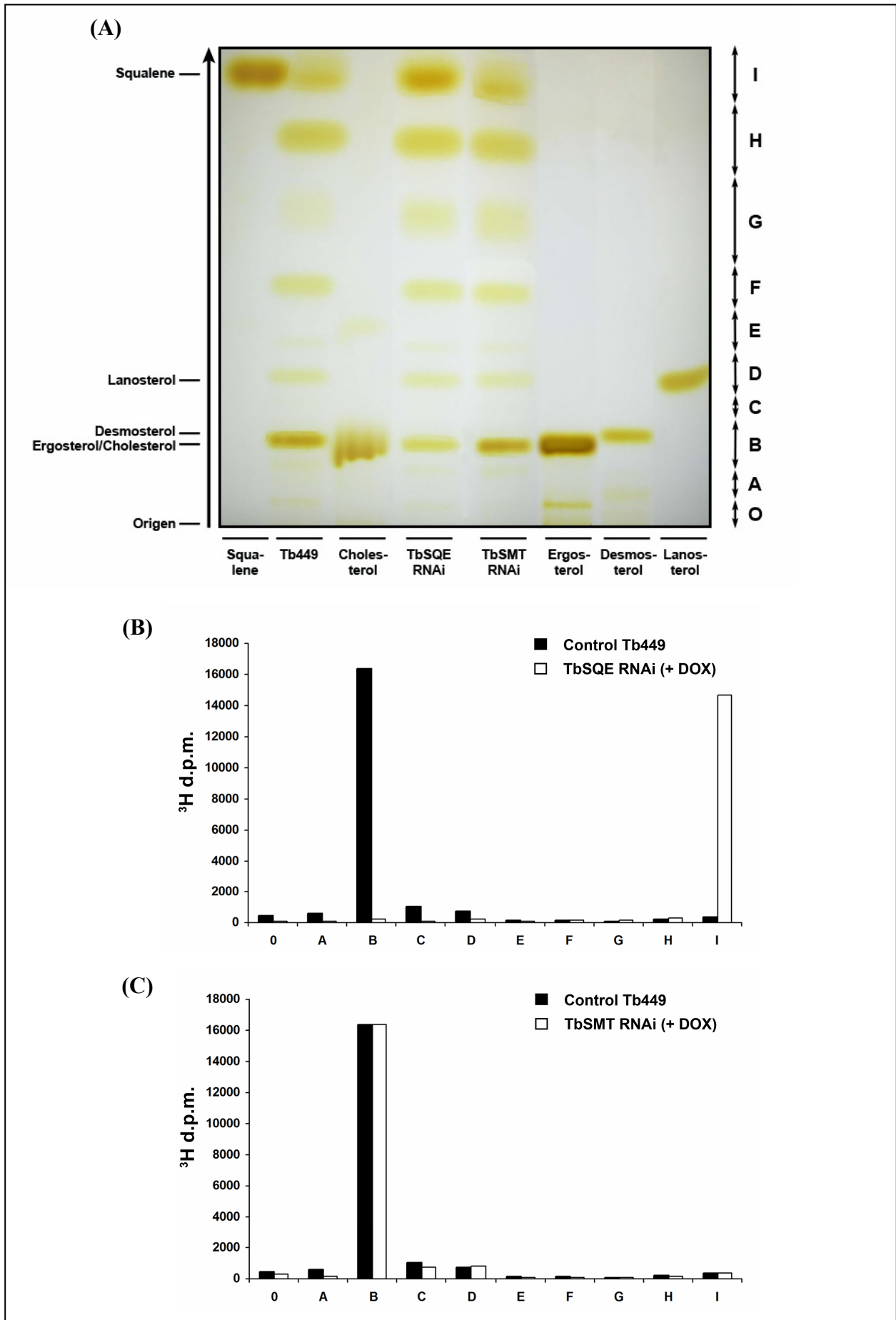


Figure 8. Effect of *TbSQE* and *TbSMT* depletion on the levels of neutral lipids of procyclic parasites. Control procyclic *Tb449* and RNAi cell lines were incubated in the presence of 3H-mevalonolactone, and the content of neutral lipids was analyzed by thin-layer chromatography (TLC) as described in the Materials and Methods section. (A) Potassium iodide staining of the TLC plate showing the neutral lipid profiles of cell lines. Lanosterol, desmosterol, ergosterol, cholesterol and squalene were included as standards. Different regions of the plate (labelled O to I) corresponding to *Tb449* (filled bars) or *TbSQE* RNAi (B) and *TbSMT* RNAi (C) (empty bars) were scraped and analyzed in a LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter (Beckman Coulter™).

Figure 9

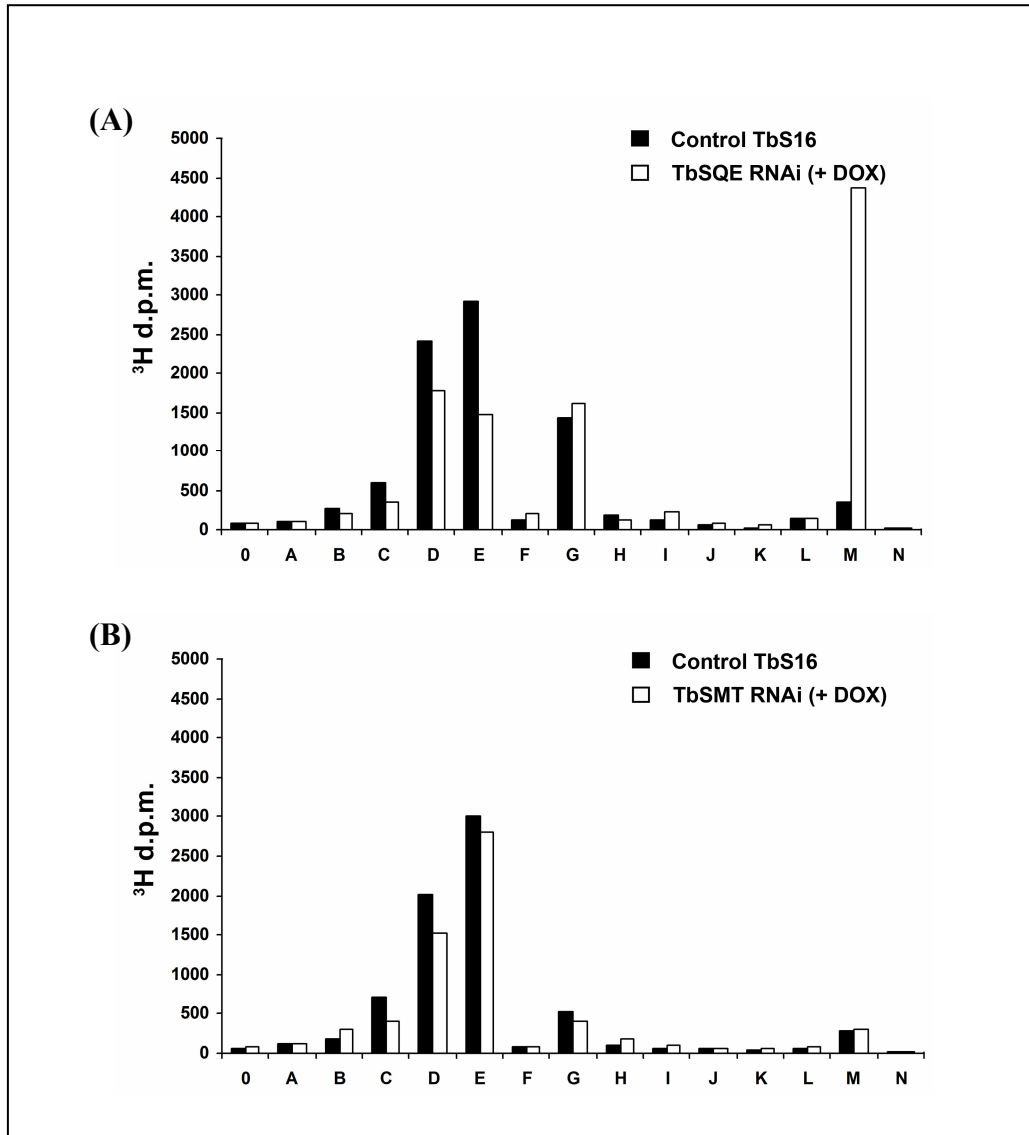


Figure 9. Effect of *TbSQS* depletion on the levels of neutral lipids in bloodstream forms. Control *TbS16*, *TbSQE* RNAi (A) and *TbSMT* RNAi (B) cell lines were incubated in the presence of 3H-mevalonolactone, and the content of neutral lipids was analyzed by thin-layer chromatography (TLC) as described in the Materials and Methods section. In this case, the TLC plate was divided in more sections than procyclic TLC plate, corresponding **zone C** to desmosterol, ergosterol and cholesterol, **zone E** to lanosterol and **zone M** to squalene. Different regions of the plate (labelled O to N) corresponding to *TbS16* (filled bars) or *TbSQE* RNAi and *TbSMT* RNAis (empty bars) were scraped and quantified in a LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter (Beckman Coulter™).

Figure 10

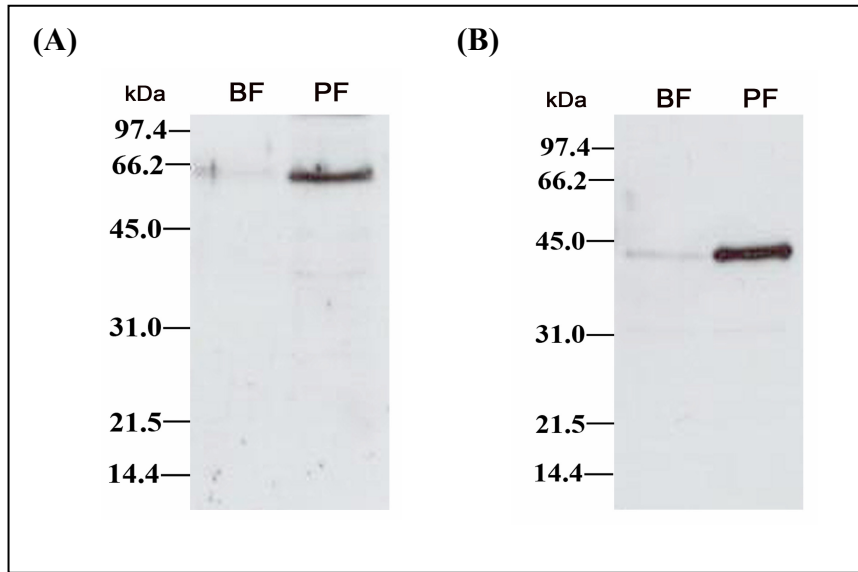


Figure 10. Western blot analysis of *TbSQE* (A) and *TbSMT* (B) protein levels in *Trypanosoma brucei*. Protein extracts were prepared from both bloodstream (BF) and procyclic (PF) forms. Polyclonal sera raised against *TbSQE* and *TbSMT* were used.

Figure 11

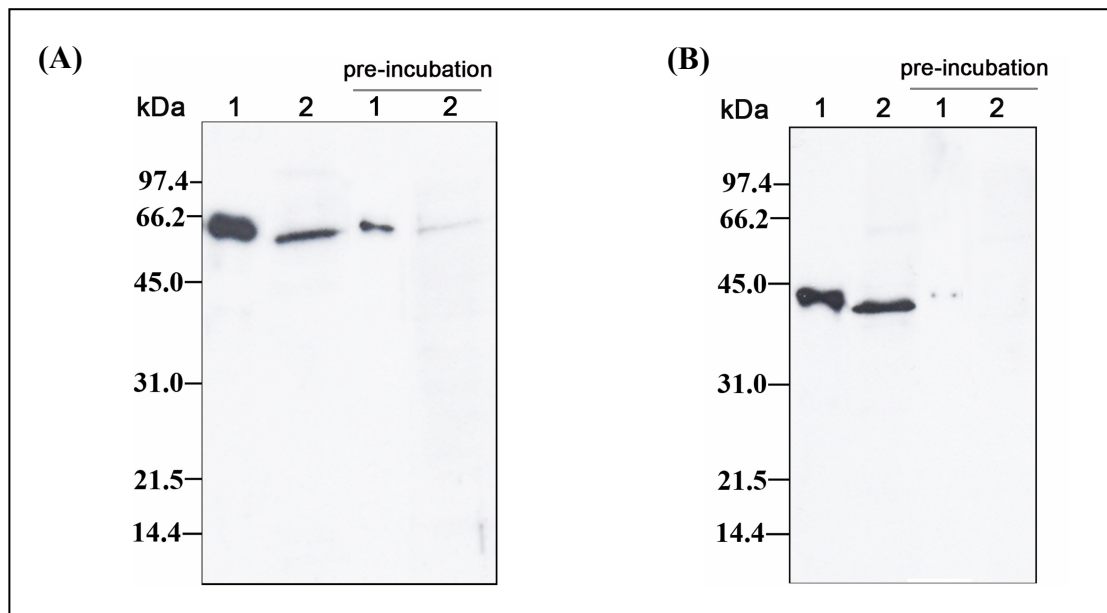


Figure 11. Specificities of the anti-*TbSQE* and anti-*TbSMT* polyclonal antibodies against the *TbSQE* (A) and *TbSMT* (B) proteins were tested in Western blots of recombinant proteins (lane 1) and whole extracts of procyclic cells (lane 2) after incubations with an excess of recombinant enzyme (saturation assays).

Figure 12

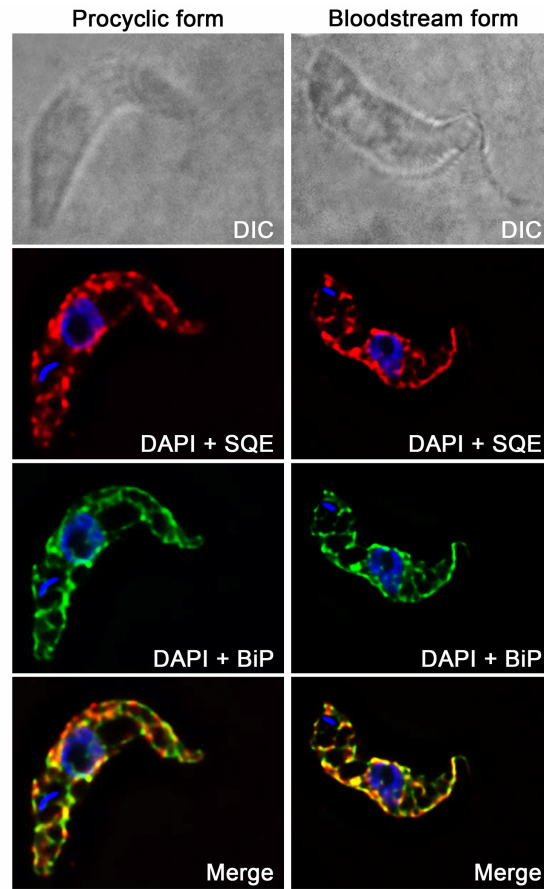


Figure 12. Indirect immunofluorescence microscopy in *T. brucei* and colocalization studies of *TbSQE* with *BiP*, an endoplasmic reticulum marker. DAPI staining indicates the localization of DNA in the nucleus and kinetoplast in blue. For *TbSQE* detection the anti-*TbSQE* antibody directly conjugated with Alexa Fluor 594 (red) and the anti-rabbit IgG FITC (green) conjugate antibody for detecting the anti-*TbBiP* were used. Merged fluorescence is shown and coincident staining is in yellow.

Figure 13

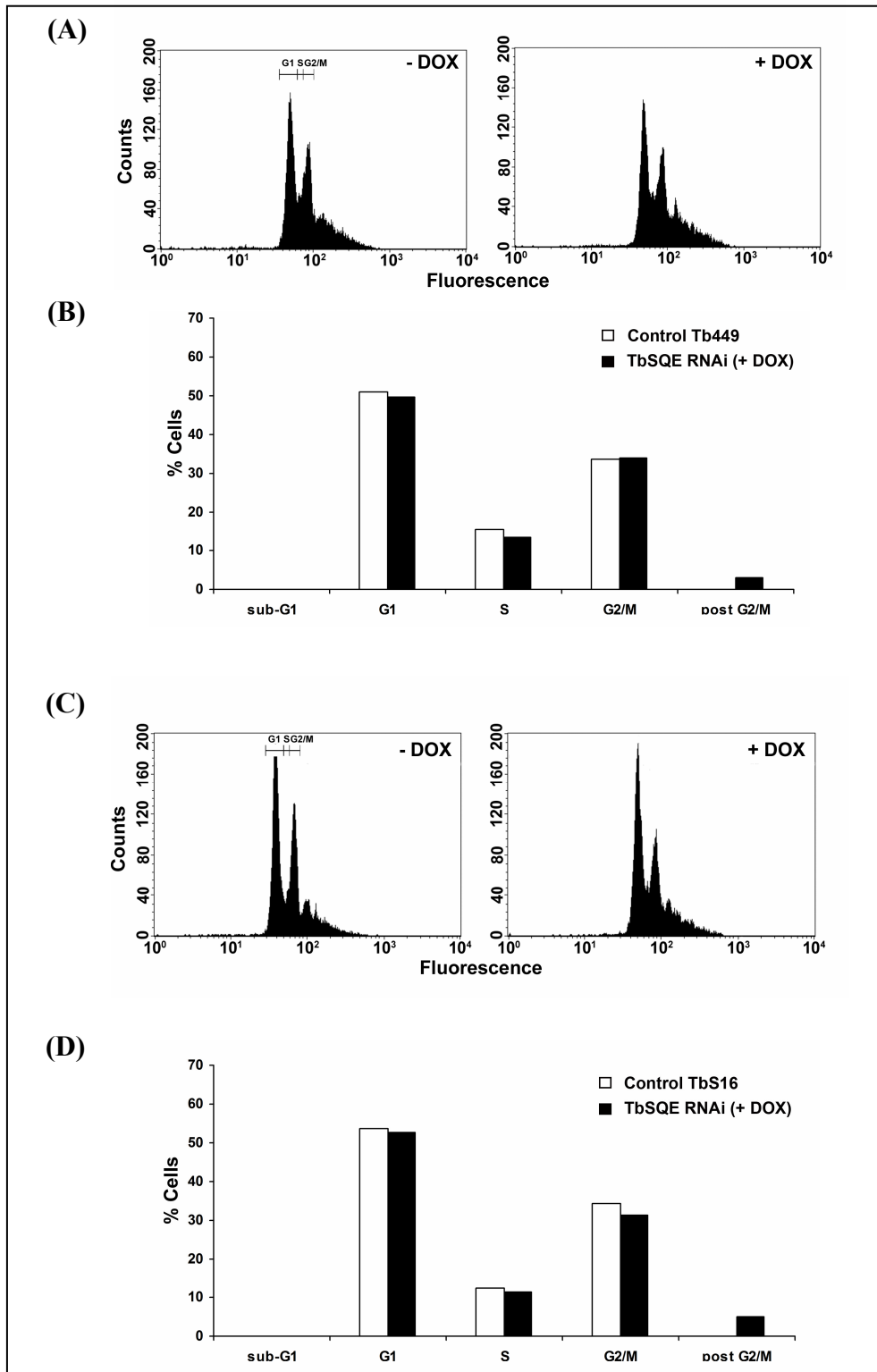


Figure 13. Graphs from FACS analysis of *TbSQE* RNAi procyclic (A) and bloodstream (C) cells. Samples were taken for FACS analysis 2 days and 10 days after incubation in the absence (- DOX) or presence of 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ doxycycline (+ DOX), respectively. Graphs that show the percentages of cells in each of the different cell cycle stages: sub-G1, G1, S, G2/M and post G2/M peaks for procyclic (C) and bloodstream (D) forms.

Figure 14

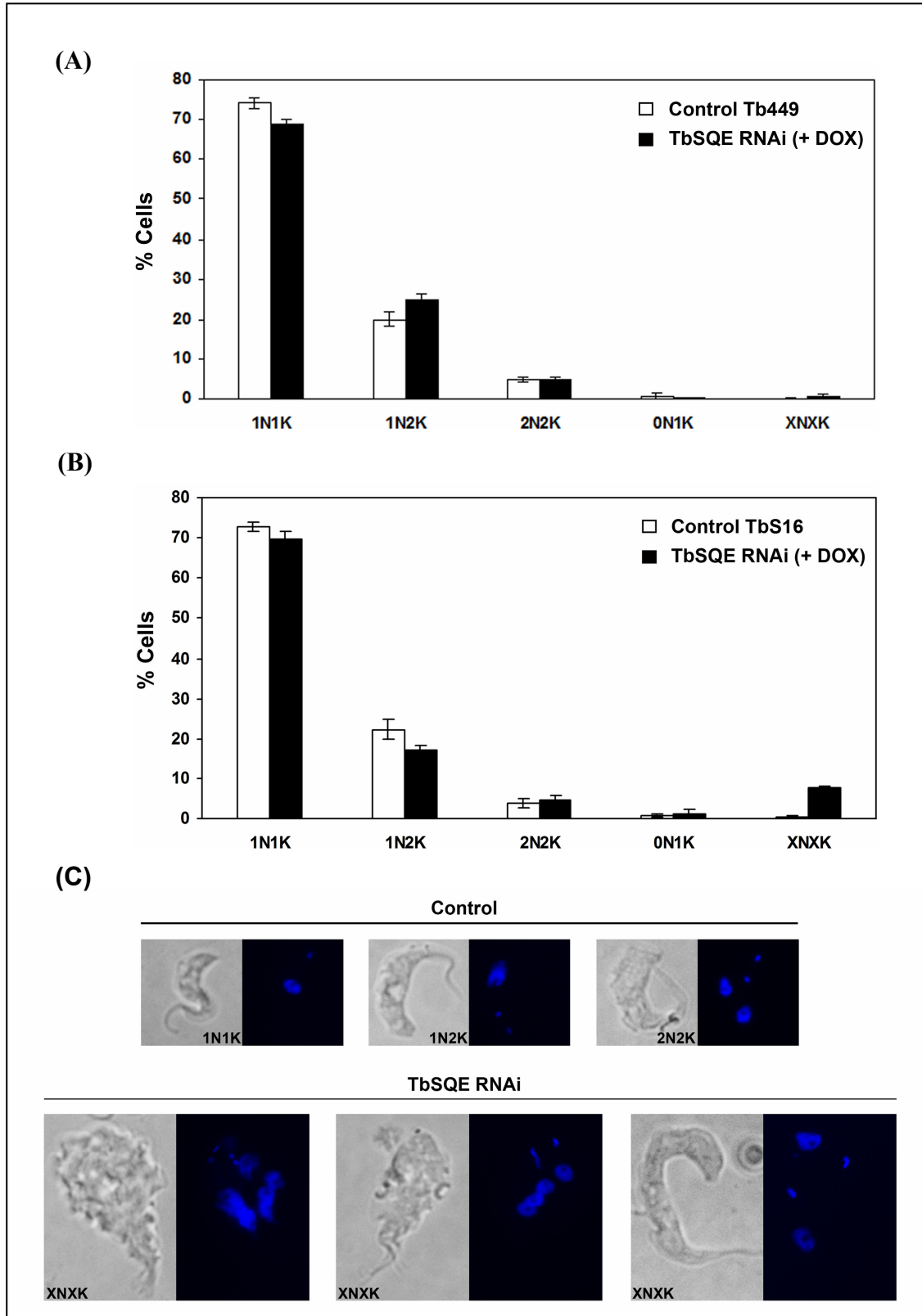


Figure 14. The morphological phenotype of *TbSQE*-deficient *T. brucei* cells. Procyclic forms 2 days after *TbSQE* RNAi induction (**A**) or bloodstream forms 10 days after induction (**B** and **C**) were stained with DAPI and examined under a fluorescence microscope. A quantification of cells with different numbers of nuclei (N) and kinetoplasts (K) was performed. Data are presented as the mean percentage (\pm S.E.) of total cells counted (>100) from three independent experiments.

Figure 15

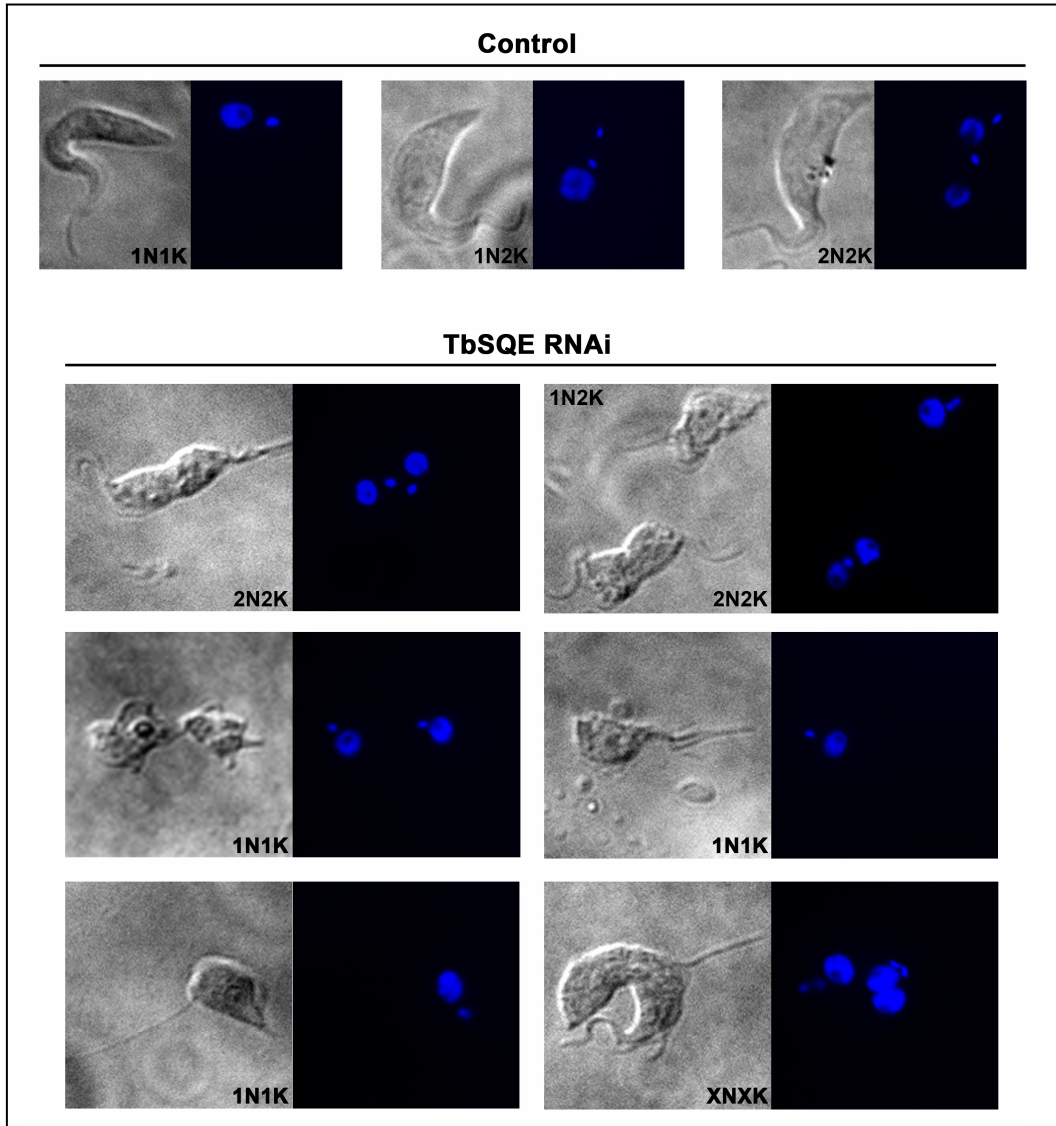


Figure 15. Analysis of morphological changes in *TbSQE* depleted procyclic parasites. RNAi was induced for 2 days and cells stained with DAPI.

Figure 16

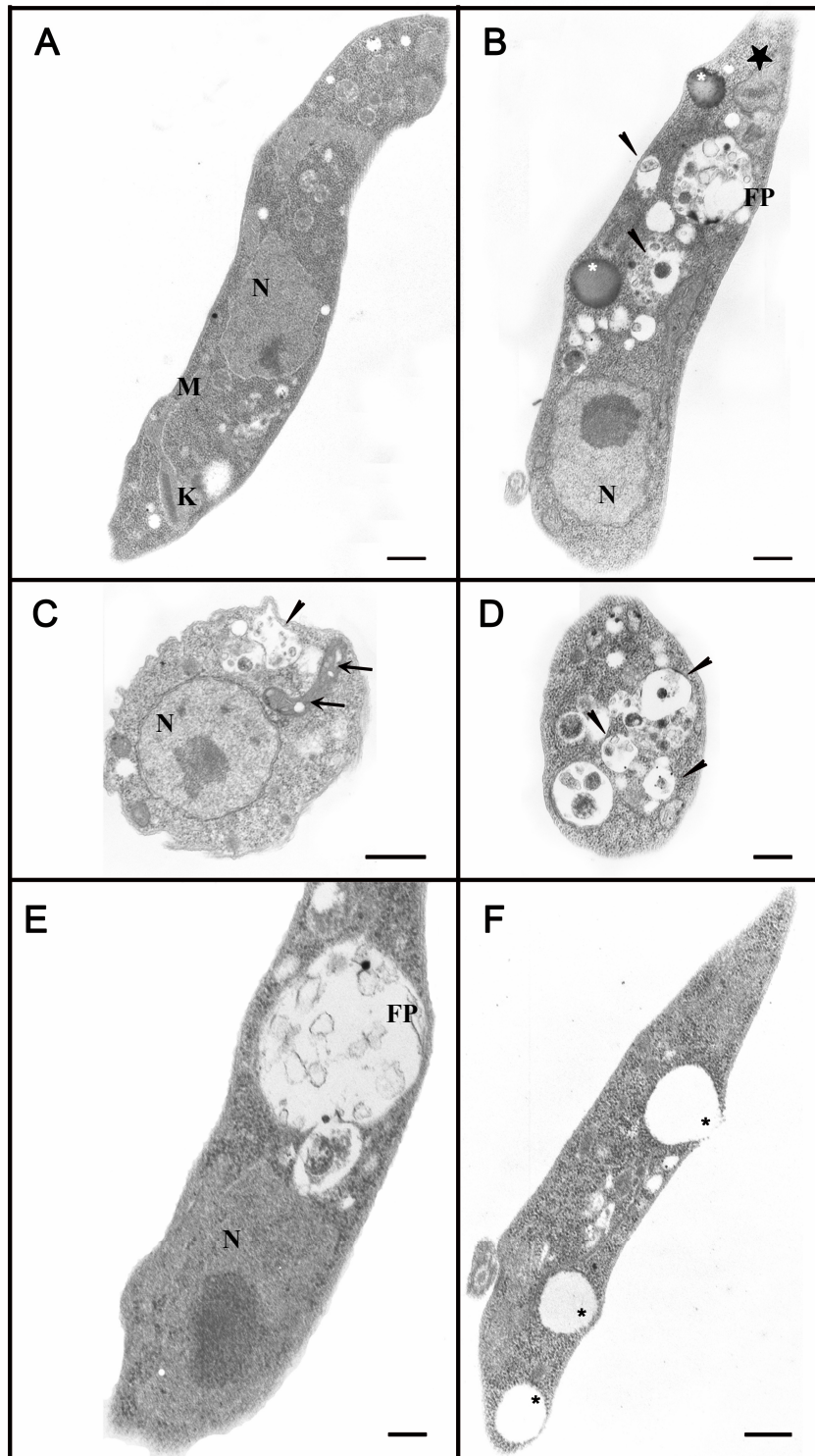


Figure 16. Effects of *TbsQE* RNAi on the ultrastructure of procyclic parasites. Control procyclic cell (panel A). After 2 days of induction many parasites presented a complete vacuolization of the cytoplasm, in some cases appearing as structures similar to autophagosomes (arrowheads). Some parasites also presented many vesicles in close association with the flagellar pocket and changes in the flagellar pocket size (panels B, E). Panel B also shows a discreet swelling of the mitochondria (black star) and electrodense lipid bodies (white asterisk). Some parasites present vesicular structures inside the mitochondria (arrows in panel C) and some atypical cytosolic vacuoles (black asterisk in panel F). N, nucleus; M, mitochondria; K, kinetoplast; FP, flagellar pocket. Bars, 1 μ M.

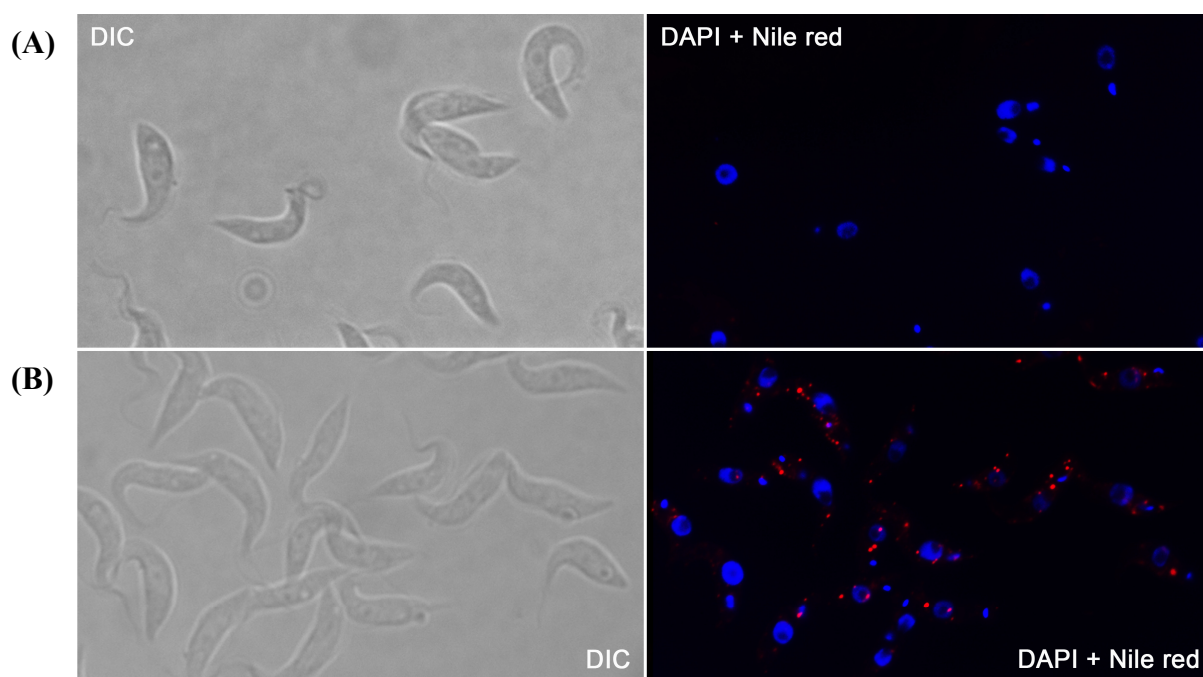
Figure 17

Figure 17. Effect of *TbSQE* depletion on the distribution pattern of intracellular lipid droplets. Control procyclic *Tb449* (A) and *TbSQE* RNAi cell lines (B) were stained with DAPI and Nile red as described in the Materials and Methods section.

Figure 18

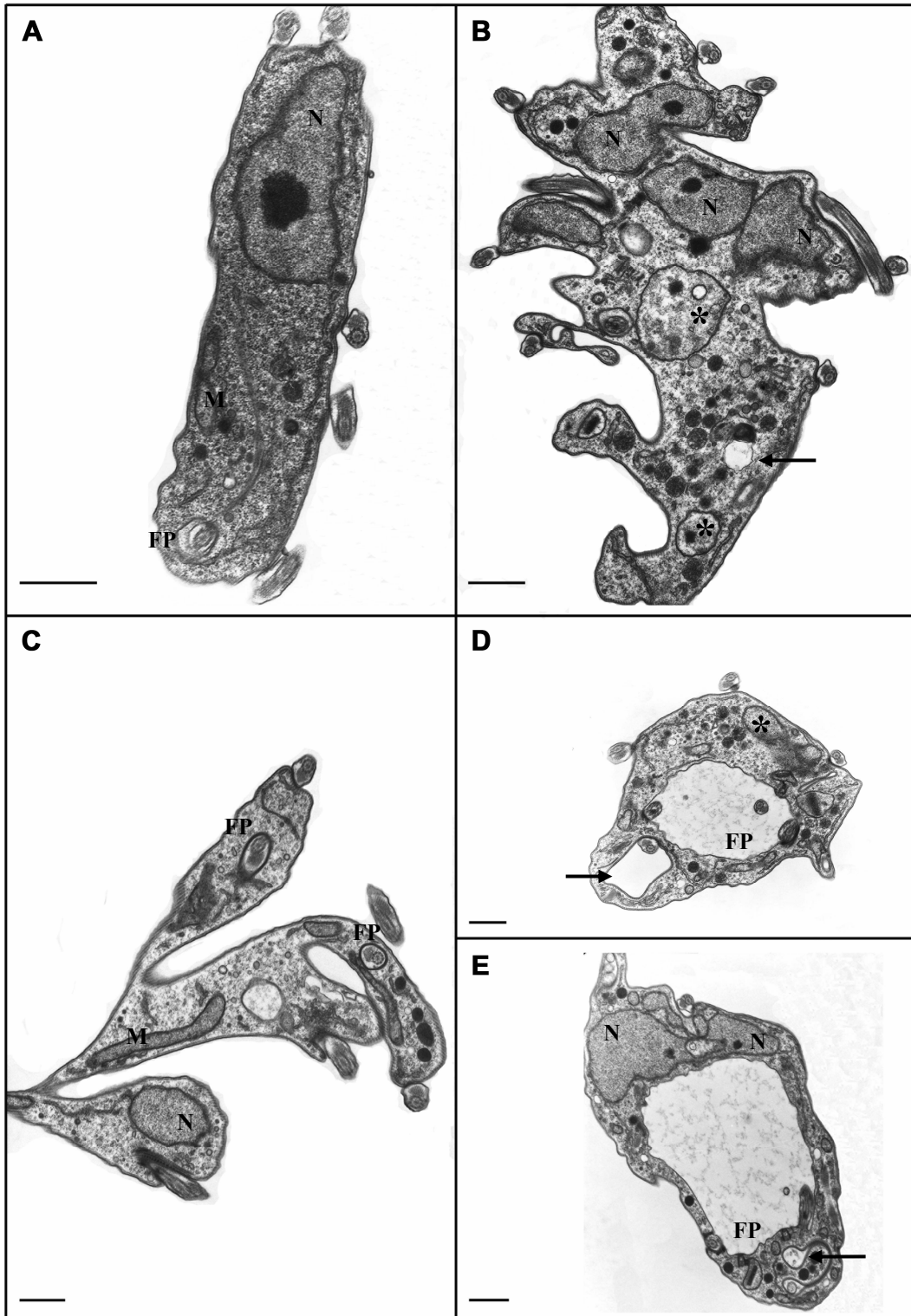


Figure 18. Requirement of *TbSQE* for normal morphology in bloodstream *T. brucei*. 10 days post-induction trypanosomes displayed several ultrastructure changes (B to E) compared with control parasites (A). The major alterations included the presence of several nuclei and flagella per cell; appearance of enlarged flagellar pockets, intense disorganization of the plasma membrane, cellular shape strongly altered, mitochondrial swelling (asterisk) and vesicular bodies (arrow). N, nucleus; M, mitochondria; FP, flagellar pocket. Bars, 1 μM.

Figure 19

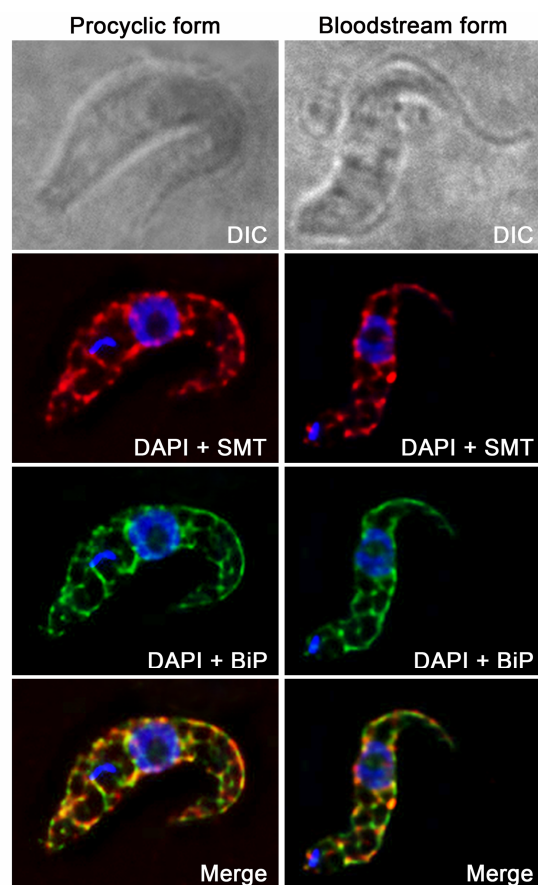


Figure 19. Localization of *TbSMT* in *T. brucei*. *TbSMT* antibody was directly conjugated to the fluorochrome (Zenon-Molecular Probes) and diluted 1:100 (red). The ER protein marker *TbBiP* antibody (FITC) was diluted 1:700. *TbSMT* appears to be associated mainly with the endoplasmic reticulum.

Figure 20

<i>T. brucei</i>	MSAGSRGPLSLLIARERDANGVN-----GDVNATAGRLRDRYDGKGASASE	46
<i>L. major</i>	MSAGGRE TAPMNLRRRNKDEIN-----GDVNAAADRFRNRFEK--ATLEE	44
<i>S. cerevisiae</i>	MSETELRKRQAQFTRELHGDDIGKKTGLSALMSKNNSAQKEAVQKYLRNWDGRDCKDAEE	60
Motif I		
<i>T. brucei</i>	RR-QDATSLTNEYDYDIVTDFEYEGWGQNFHFAPRYMNETFFYESLARHEYFLAYHAQFKPT	105
<i>L. major</i>	RK-AATTMTVNEYDYDLVTDFEYEGWGQNFHFAPRYAGETFFESLARHEYFLAARGGFMEG	103
<i>S. cerevisiae</i>	RRLEDYNEATHSYYNVVTDFEYEGWGSSFHFSRFYKGESFAAS IARHEHYLAYKAGIQRG	120
Motif II		
<i>T. brucei</i>	DTVLDVGCIGGPARNMVRFVTSNVMGVNNNEYQINRARQHDHSRYGMSGKINYTKTDFCN	165
<i>L. major</i>	DHIVDVGCGVGGPARNIVRLTRCNVTGVNNNDYQISRARRHDALAGMSCKIDYVKTDFCN	163
<i>S. cerevisiae</i>	DLVLDVGCIGGPARNIVRLTRCNVTGVNNNDYQIAKAKYYAKYKNSDQMDQDFVKGDFMK	180
<i>T. brucei</i>	MCFGDNEFDGAYAIEATCHSESKVKCYSEVFRAIKPGAYFMLYEWCLTDLYDPANEEHQ	225
<i>L. major</i>	MSLADNTFDGAYAIEATCHAKDKVKCYSEVFRVIKPGTCFVLYEWCMTDKYNPNDEYHRT	223
<i>S. cerevisiae</i>	MDFEENTFDKVYAIEATCHAPKLEGVYSEIYKVLKPGGTFAYVEWMTDKYDENNPEHRK	240
<i>T. brucei</i>	VRHGIELGDGLPELDTMRQVAAVKAAGFVVEESFDMAERFESGEPKSVPWYEPLOGSYT	285
<i>L. major</i>	IKHRIELGDGLPEMETCKQVIEYMKEAGFVVEEAIDVISQFESSPIKSI PWYQPLVGDYS	283
<i>S. cerevisiae</i>	IAYEIELGDGIPKMFHVDVARKALKKNCGFVFLVSEDLADNDDE-----IPWYYPLTGEWK	295
<i>T. brucei</i>	SLSGLR-----ATPAGRWLTSVTCRLEAVRLAPAGTCKATEILEE GAVNLVKGGELG	338
<i>L. major</i>	SLQGLR-----STPIGRILTNIMCRVLEFVHLPKGTYKATEVLEEAESLVVGGQLG	336
<i>S. cerevisiae</i>	YVQNLANLATFFRTSYLGRQFTTAMVTVMKLGLAPEGSKEVTAALENAAVGLVAGGKSK	355
**:		
<i>T. brucei</i>	IFTSPFFVKARKPRLGEELSC-----	359
<i>L. major</i>	IFTSPFYIRARKPSKQA-----	353
<i>S. cerevisiae</i>	LFTPMLLFVARKPENAE TSPQTSQEATQ	383

Figure 20. Alignment of sterol methyl transferase amino acid sequences (GeneDB accession numbers) from *T. brucei* (Tb10.v4.0247), *L. major* (LmjF36.2380) and *S. cerevisiae* (YML008C). Sterol and AdoMet binding sites are indicated as motif I and motif II, respectively. The two selected regions to construct the RNAi plasmids are marked in pink (construct 1) and blue (construct 2).

Figure 21

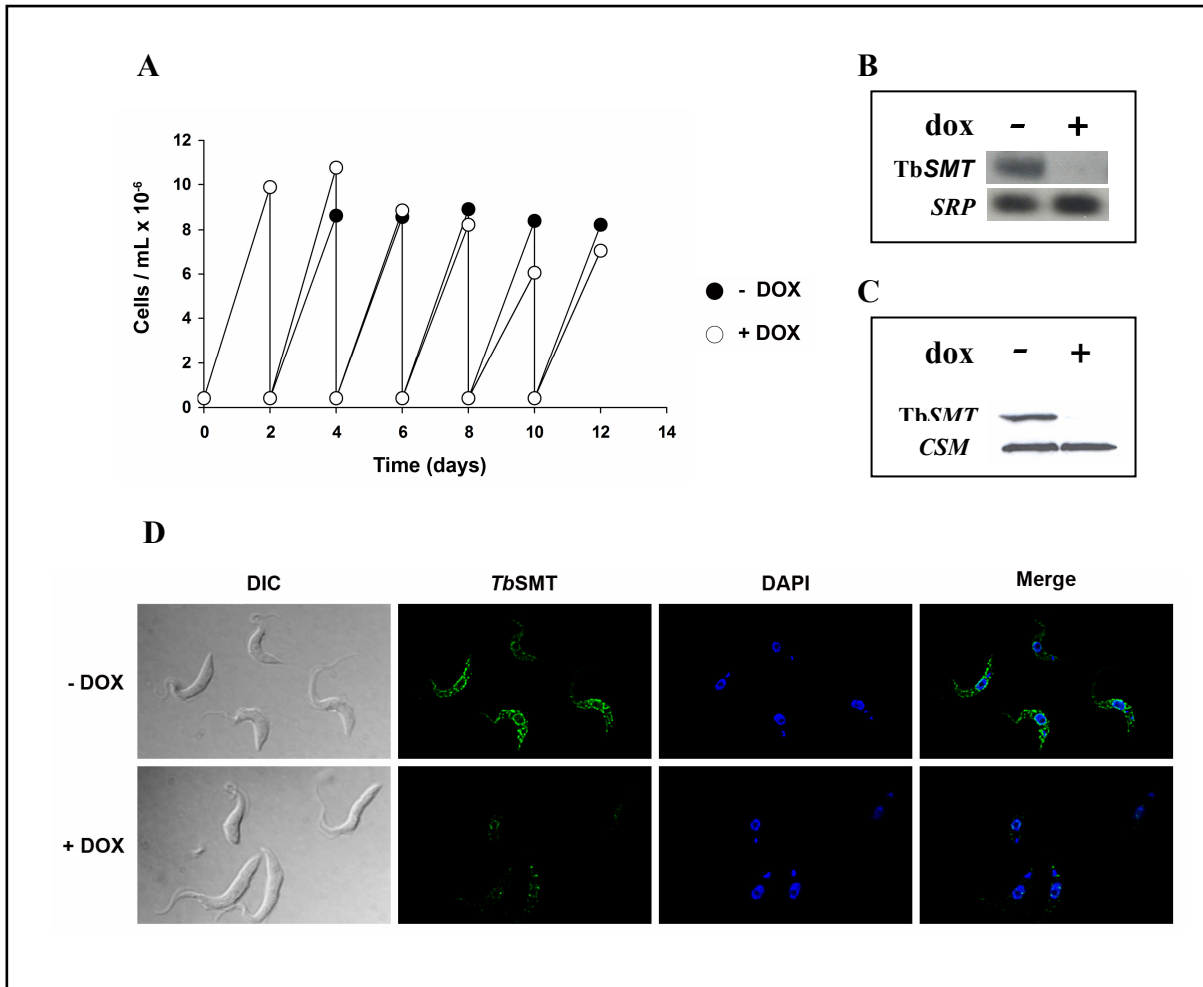


Figure 21. RNAi of *TbSMT* in procyclic cells. **(A)** Growth profiles of procyclic cells after RNAi induction determined by growing the cells in the absence (filled circles) or after the addition of $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ doxycycline (open circles). Cells were diluted with fresh medium with or without doxycycline every 48 h in order to avoid stationary phase parasites. **(B)** RNA of procyclic forms (transfected with pGR19-*TbSMT*) grown for 48 hours in the presence of doxycycline ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) was analyzed by Northern blotting. The same filter was hybridised with SRP (signal recognition particle RNA) as a loading control. **(C)** Western blot analysis of *TbSMT* with CSM {Guerra-Giraldez, 2002 #85} as a loading control. **(D)** Immunofluorescence analysis of protein levels after RNAi induction using the anti-*TbSMT* polyclonal antibody.

Figure 22

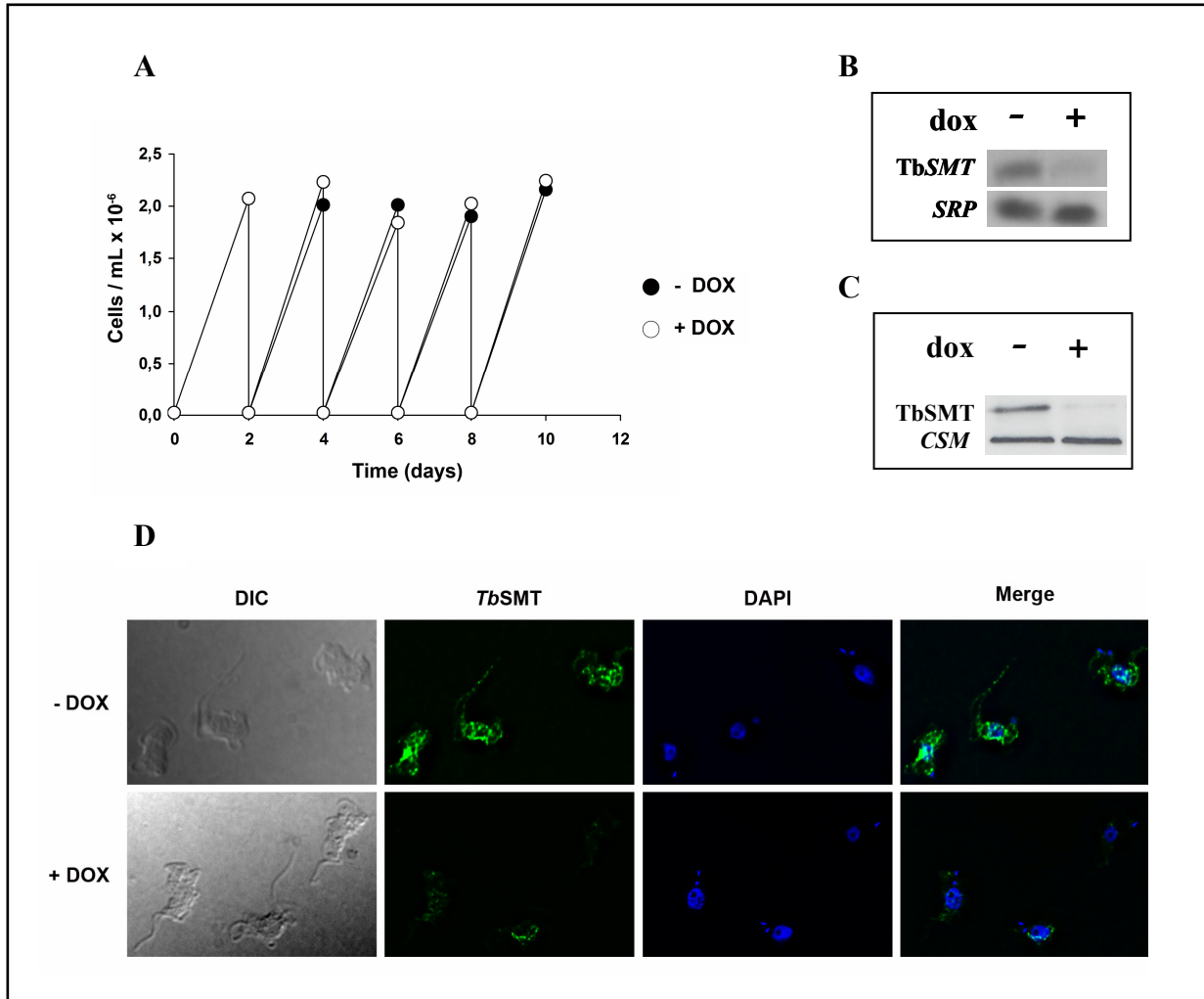


Figure 22. RNAi of *TbSMT* in bloodstream cells. **(A)** Growth profiles of bloodstream cells after RNAi induction were determined by growing the cells in the absence (filled circles) or after addition of $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ doxycycline (open circles). Cells were diluted with fresh medium with or without doxycycline every 48 h in order to avoid stationary phase parasites. **(B)** Northern blots showing levels of *TbSMT* mRNA. Equal amounts of RNA ($10 \mu\text{g}$) from uninduced (-) and induced (+) cells were loaded on each lane. **(C)** Protein levels were analyzed by Western blots using anti-*TbSMT* polyclonal serum. Loading controls were the signal-recognition particle RNA or the CSM protein. **(D)** Analysis of protein levels after RNAi induction by immunofluorescence using the anti-*TbSMT* polyclonal antibody.

Figure 23

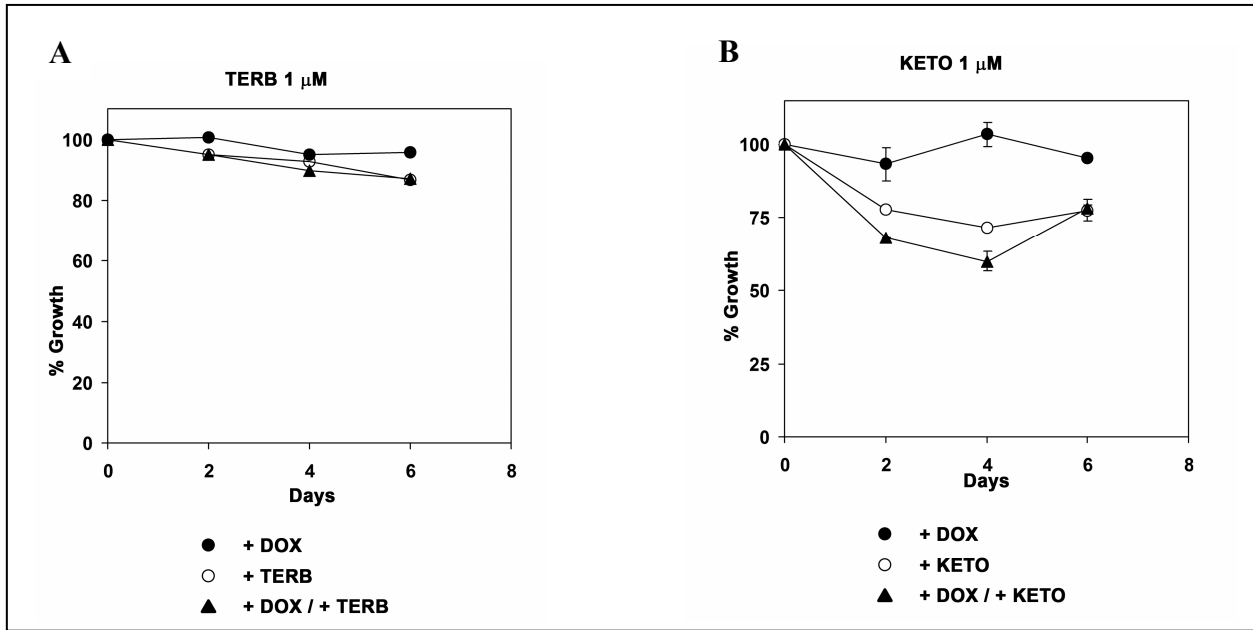


Figure 23. Growth percentage of procyclic forms harboring *TbSMT* RNAi in presence of terbinafine 1 μM (A) and ketoconazole 1 μM (B). Growth percentage was analyzed upon addition of 1 μg·mL⁻¹ doxycycline (●); in the presence of drug (○); and upon addition of a mixture of 1 μg·mL⁻¹ doxycycline and drug (▲).

Figure 24

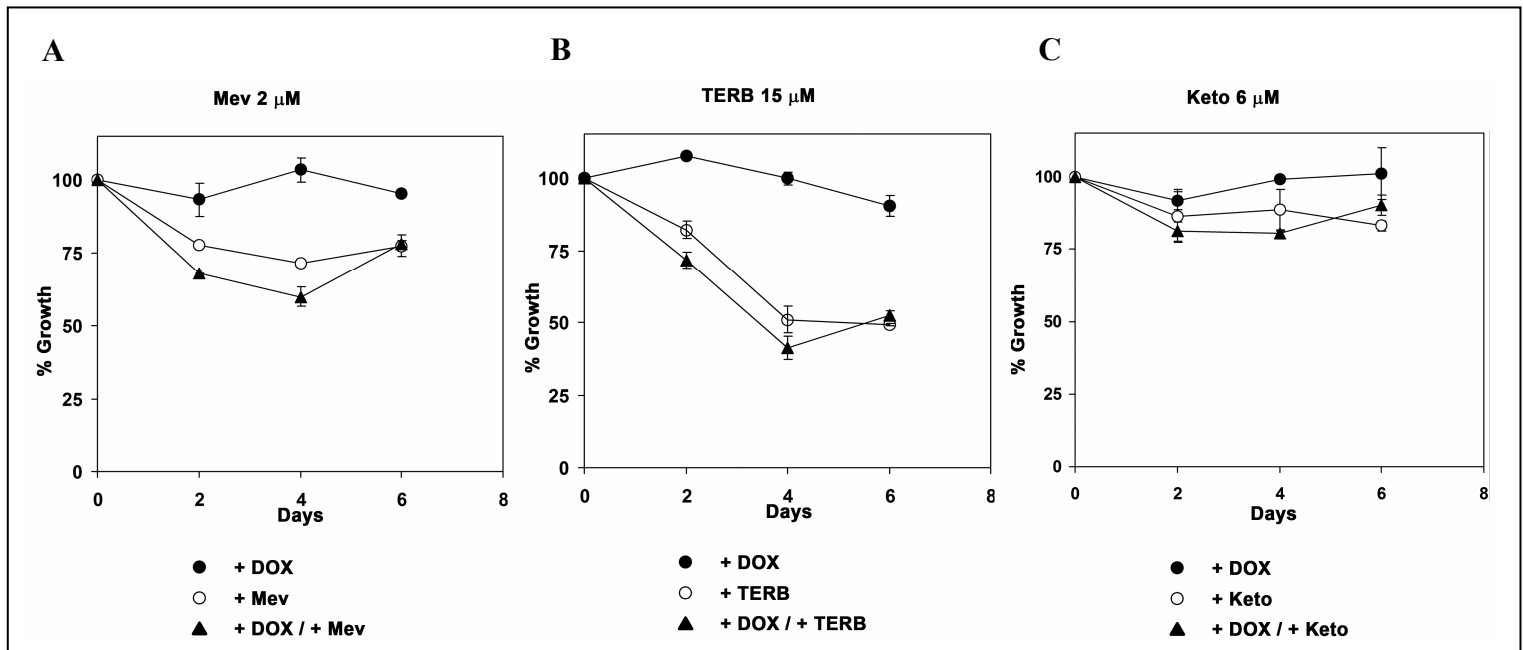


Figure 24. Growth percentage of bloodstream forms harboring *TbSMT* RNAi in presence of mevastatin 2 μM (A) terbinafine 15 μM (B) and ketoconazole 6 μM (C). Growth percentage was analyzed upon addition of 1 μg·mL⁻¹ doxycycline (●); in the presence of drug (○); and upon addition of a mixture of 1 μg·mL⁻¹ doxycycline and drug (▲).

Figure 25

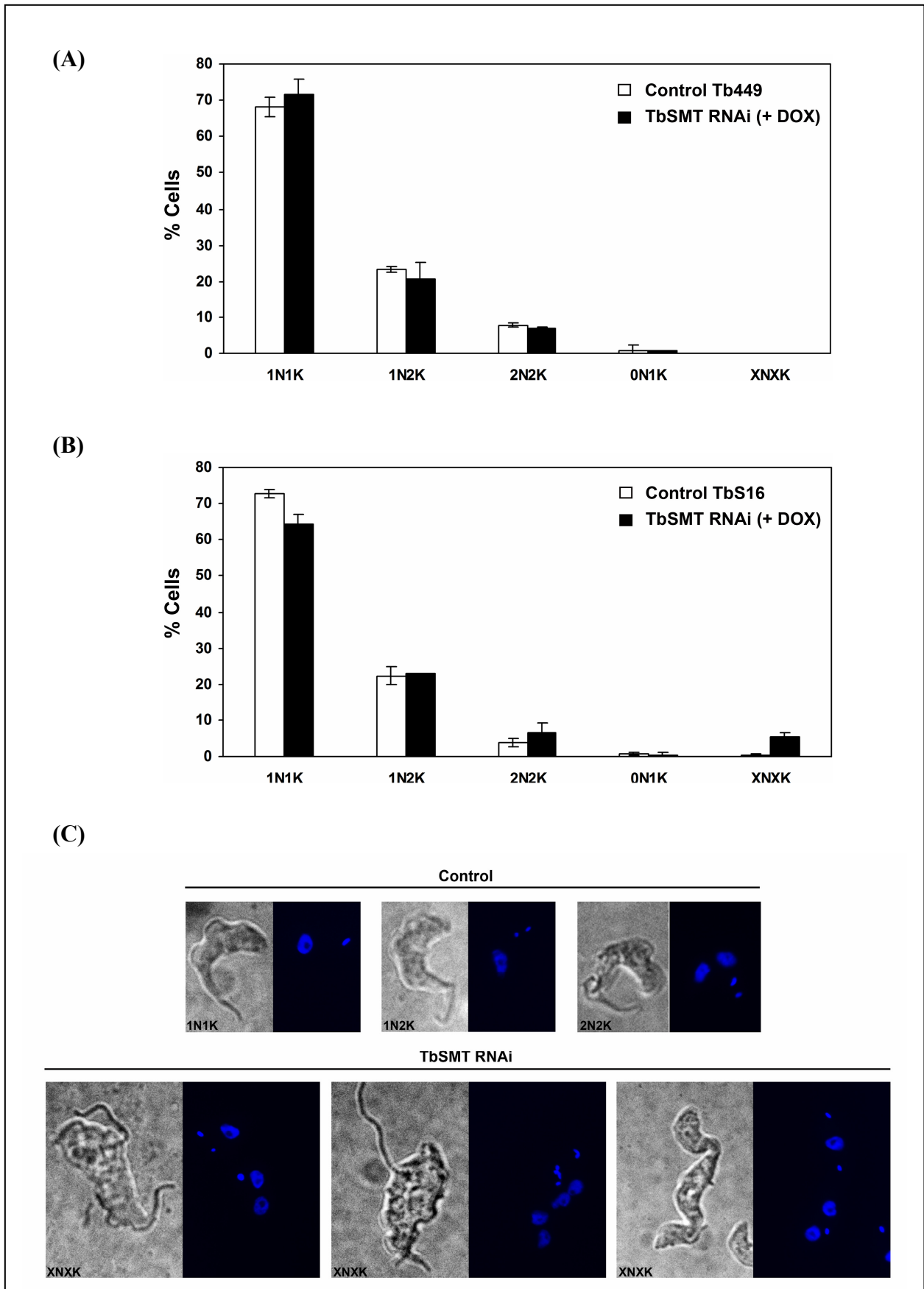


Figure 25. The morphological phenotype of *TbSMT*-deficient *T. brucei* cells. Procyclic forms 6 days after *TbSMT* RNAi induction (A) or bloodstream forms 10 days after induction (B and C) were stained with DAPI and examined under a fluorescence microscope. A quantification of cells with different numbers of nuclei (N) and kinetoplasts (K) was performed. Data are presented as the mean percentage (\pm S.E.) of total cells counted (>100) from three independent experiments.

Figure 26

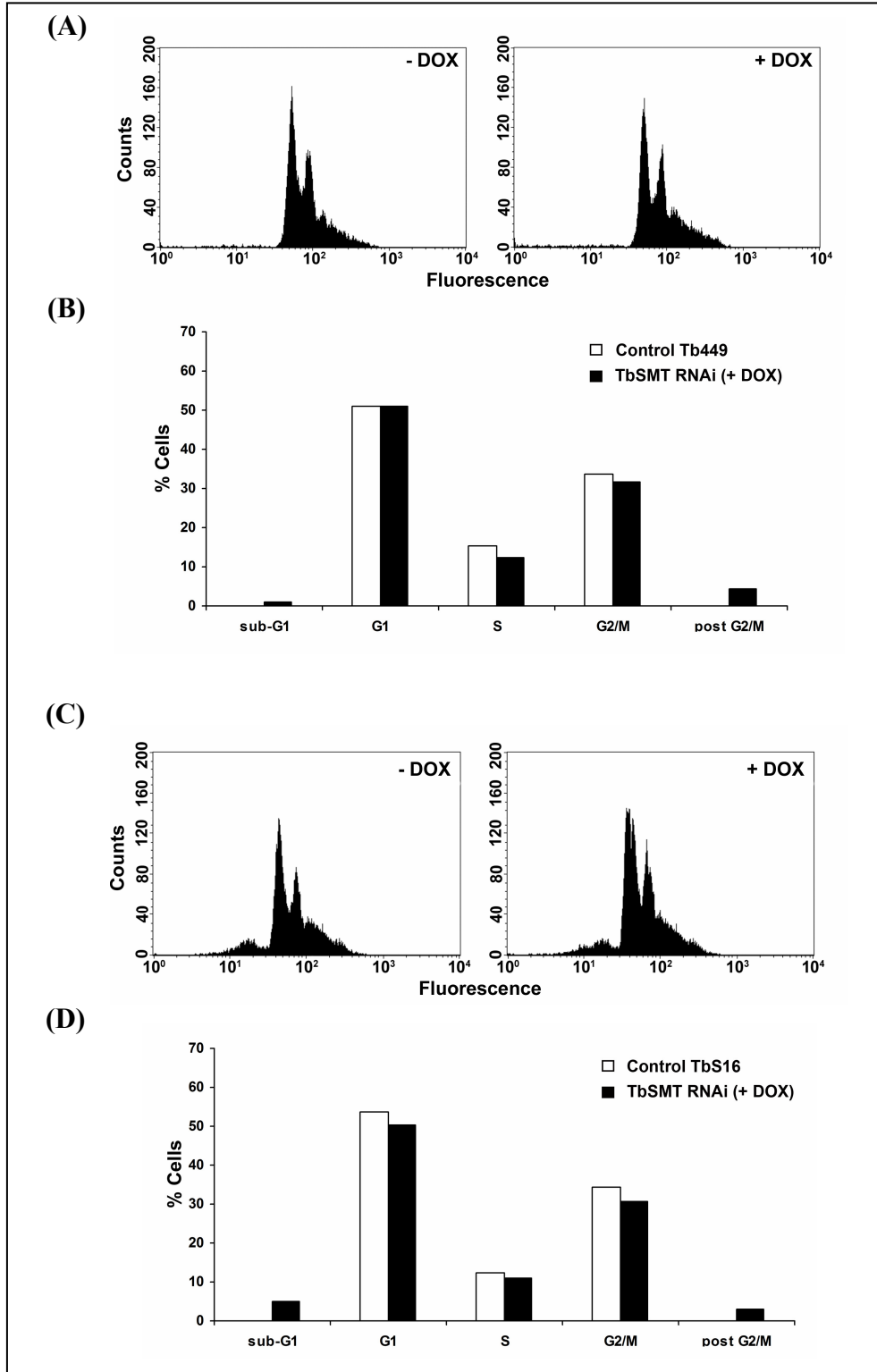


Figure 26. Graphs from FACS analysis of *TbSMT* RNAi procyclic (A) and bloodstream (C) cells; samples were taken for FACS analysis 2 days and 10 days after induction without (- DOX) and with $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ doxycycline (+ DOX), respectively. Graphs that show the percentages of cells in each of the different cell cycle stages: sub-G1, G1, S, G2/M and post G2/M peaks for procyclic (C) and bloodstream (D) forms.

Figure 27

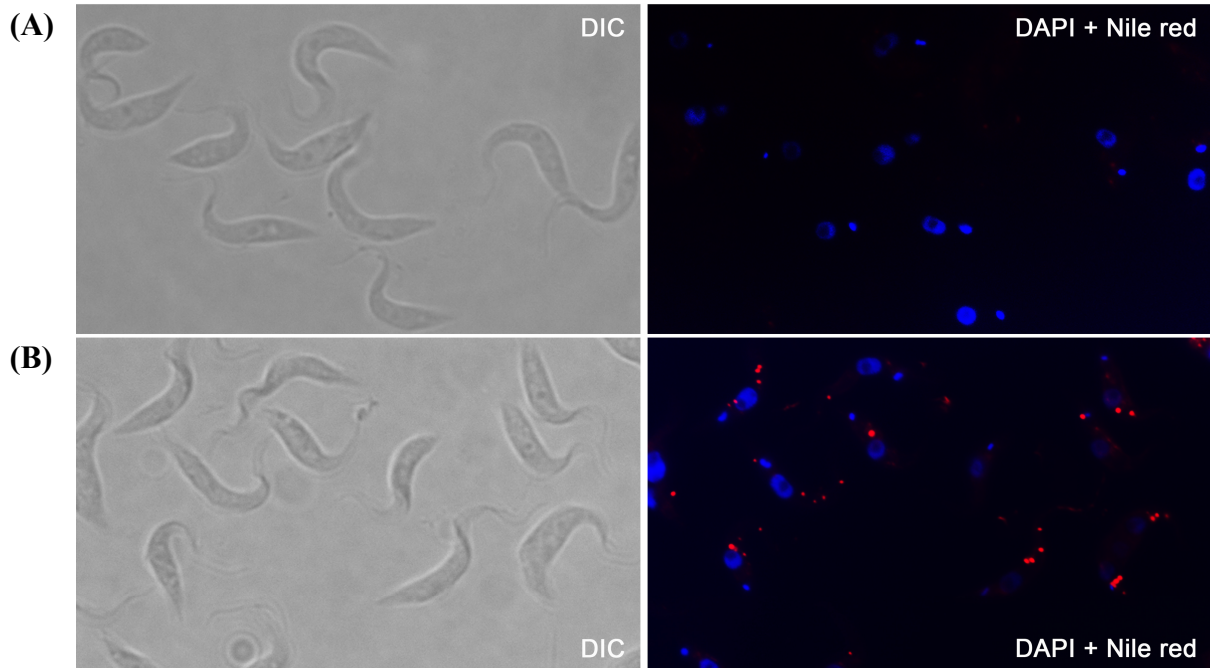


Figure 27. Determination of intracellular lipid droplets distribution in procyclic trypanosomes, *Tb449* cell line as control (A) and *TbSMT* RNAi cell line (B). Parasites were stained with DAPI and Nile red as described previously.

Figure 28

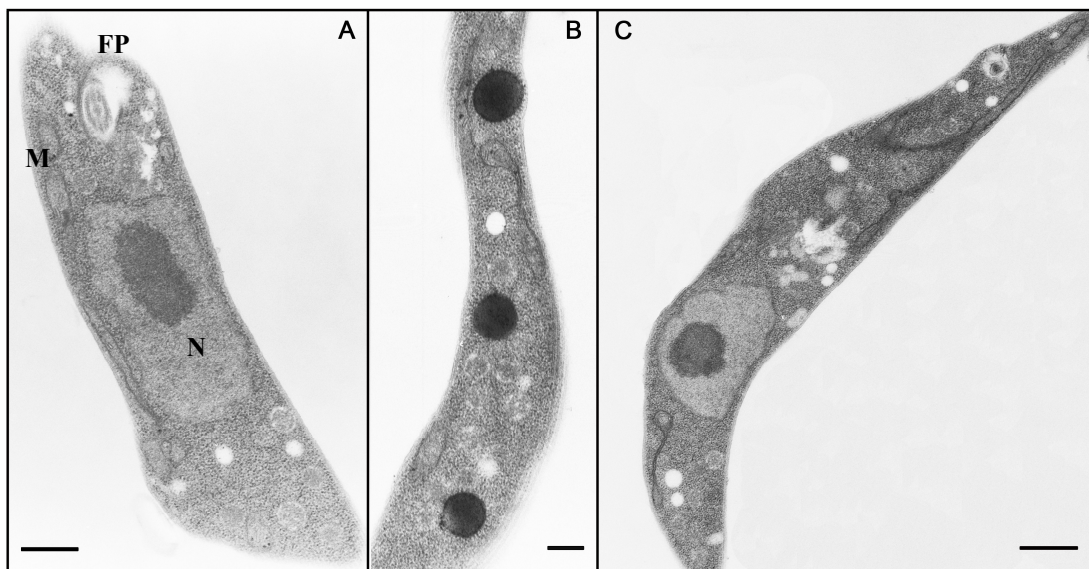


Figure 28. Transmission electron microscopy of *TbSMT* RNAi shows electrodense lipid droplet accumulation and vesicular alterations in procyclic trypanosomes after 6 days of induction. Control *Tb449* (panel A) and *TbSMT* RNAi (panels B, C) cell lines. N, nucleus; M, mitochondria; FP, flagellar pocket. Bars, 1 μ M.

Figure 29

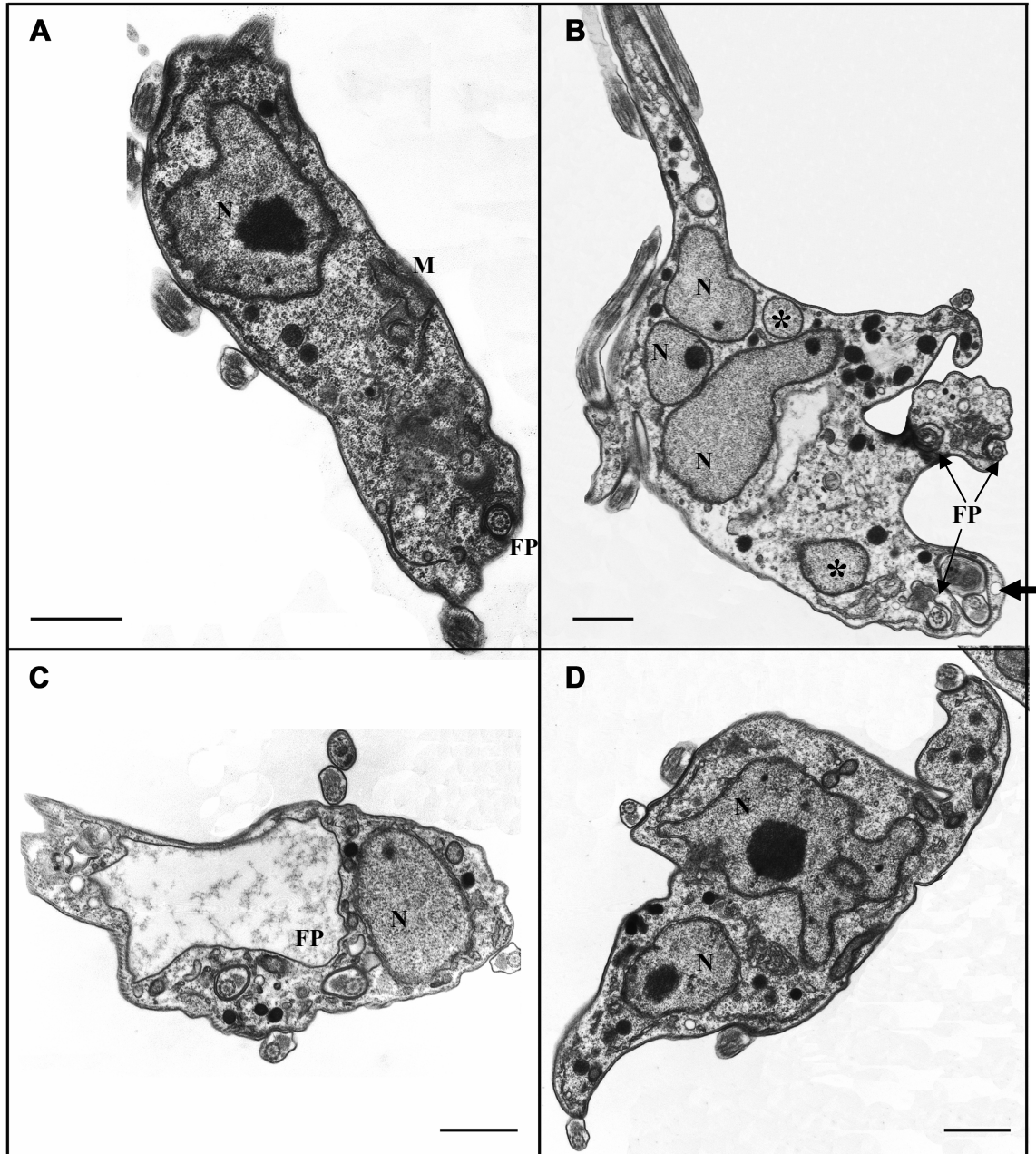


Figure 29. Analysis of the *TbSMT* RNAi bloodstream cell line by transmission electron microscopy after 10 days of induction. Induced parasites present several nuclei and flagella, mitochondrial swelling (asterisk) and vesicular bodies (thick arrow). The cellular shape is strongly altered and big flagellar pockets are evidenced. Panel A shows control cell and panels B, C and D the RNAi induced cells. N, nucleus; M, mitochondria; FP, flagellar pocket. Bars, 1 μ M.

Discusión

4. DISCUSIÓN

Los tripanosomátidos son un amplio grupo de protozoos patógenos que poseen una gran versatilidad tanto biológica como bioquímica y una plasticidad que les confiere la capacidad de infectar un gran número de vertebrados incluyendo a los humanos. Presentan una increíble flexibilidad metabólica, biológica y con relativa facilidad generan mecanismos de resistencia frente a una gran variedad de fármacos. La escasa efectividad y la alta toxicidad de los fármacos disponibles hacen imprescindible el desarrollo de nuevos compuestos para sustituir a los actuales. El mayor conocimiento de la bioquímica y biología molecular de los parásitos protozoos ha permitido la identificación de diferencias significativas con respecto a las células del hospedador humano. Es de esperar que los estudios realizados en este campo permitan llevar a cabo un diseño racional de nuevos fármacos que presenten una mayor eficacia y una menor toxicidad.

En los últimos años se ha producido un enorme avance en el conocimiento de la bioquímica y la biología celular de *Trypanosoma cruzi* y organismos relacionados como *Trypanosoma brucei* y varios miembros del género *Leishmania*, incluyendo el establecimiento del genoma completo de esos organismos, recientemente publicados (Berriman et al., 2005; El-Sayed et al., 2005; Ivens et al., 2005).

Estudios llevados a cabo en las últimas dos décadas han demostrado consistentemente que especies de la familia *Trypanosomatidae* requieren esteroides específicos para mantener su viabilidad y capacidad de proliferación a lo largo de todo su ciclo de vida y que inhibidores específicos de la biosíntesis de ergosterol (IBEs) son potentes agentes antiproliferativos frente a protozoos parásitos, tanto *in vitro* como *in vivo* (Urbina and Docampo, 2003; Urbina, 2002; Croft et al., 2005; Orenes Lorente et al., 2005). Su efectividad radica en el hecho de que estos organismos presentan elevadas cantidades de esteroides de tipo ergosta mientras que en células de mamífero, el colesterol constituye el componente principal de las membranas. Las necesidades de esteroides 24-alquilados no pueden ser sustituidas por el colesterol del medio lo que convierte a la biosíntesis de isoprenoides y esteroides en un proceso esencial.

En el caso particular de *T. brucei*, las formas sanguíneas contrastan con las procíclicas y con el resto de tripanosomátidos porque poseen colesterol en sus membranas como esteroles mayoritario, suponiendo más del 99 % de esteroides totales, mientras que carecen de cantidades significativas de esteroides de tipo ergosta (C28) (Gros et al., 2006). Esta situación parece indicar que las formas sanguíneas de *T. brucei* carecen de la capacidad de sintetizar esteroides *de novo* ya que pueden captar colesterol del medio a partir de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Coppens et al., 1988; Green et al., 2003). Sin embargo, existen estudios en las formas sanguíneas que describen la existencia de actividad HMG-CoA reductasa (Coppens and Courtoy, 1995) y esteroles metiltransferasa (Gros et al., 2006) así como la formación de productos a partir de la formación del mevalonato como isoprenoides, dolicol y ubiquinona (Low et al., 1991). Así, en este último estudio realizado por Low y col. se determinó que el colesterol es el producto principal de la ruta del mevalonato en formas sanguíneas de *T. brucei* (Low et al., 1991), aunque la metodología empleada no permite distinguir si el producto de la ruta era el colesterol u otros esteroides de tipo colesta. En cualquier caso, los datos de Low y col. junto con los obtenidos en estudios recientes, indicando que inhibidores de la ruta de biosíntesis de esteroides tienen efecto antiproliferativo en formas sanguíneas (Lepesheva et al., 2007; Lepesheva et al., 2008; Lorente et al., 2004; Gros et al., 2006), nos ha llevado a investigar más profundamente cuál es el papel de la síntesis endógena de esteroides en este organismo.

Hasta la fecha el único estudio existente que analiza la esencialidad de la ruta de biosíntesis de isoprenoides en *T. brucei* es el trabajo realizado por Docampo y col. (Montalvetti et al., 2003) que demuestra que la depleción de la enzima farnesil difosfato sintasa (FPPS) inhibe el crecimiento. En este trabajo validan a la FPPS como diana para el desarrollo de fármacos utilizando técnicas de RNA de interferencia (RNAi). La depleción de la FPPS tiene múltiples efectos ya que es la encargada de sintetizar el farnesil difosfato (FPP) que sirve de sustrato para la formación del dolicol, la ubiquinona, el grupo hemo, los grupos farnesilo de proteínas y el ergosterol. Sin embargo, el carácter esencial de las etapas tardías de la biosíntesis de esteroides no ha sido analizado con anterioridad y se carece de información acerca de la importancia de la síntesis endógena en procesos como el ciclo celular y la proliferación.

Como ya se ha indicado, la escualeno sintasa (SQS) tiene un papel central en el metabolismo de esteroides y ha sido ampliamente estudiada con el fin de establecer las características del mecanismo de acción y su naturaleza esencial. Otra enzima que ha recibido una gran atención como diana farmacológica frente a infecciones producidas por hongos es la escualeno epoxidasa (SQE). La esterol metiltransferasa (SMT) también ha despertado un interés desde el punto de vista farmacológico porque no existe en humanos. En definitiva, el elevado potencial terapéutico de la ruta, junto con las interrogantes planteados en relación con el papel de la síntesis de esteroides en *Trypanosoma brucei*, motivaron un conjunto de estudios destinados a establecer las consecuencias de la depleción de estas tres enzimas claves desde el punto de vista terapéutico. El estudio se ha realizado tanto en la forma procíclica como en la forma sanguínea clínicamente relevante que infecta al humano. Para determinar las consecuencias de una perturbación de los niveles de intermediarios o de productos finales se han generado varias líneas de *Trypanosoma brucei* donde se han modulado los niveles de SQS, SQE y SMT mediante la utilización de RNA de interferencia (RNAi).

El mecanismo de RNAi en *T. brucei* fue descrito por primera vez en 1998 (Ngo et al., 1998), proporcionando una herramienta muy poderosa para llevar a cabo el análisis de función de genes contribuyendo a desvelar el papel de múltiples procesos y proteínas, muchas de ellas con función desconocida, tras el advenimiento del genoma de estos organismos. El RNAi es un proceso natural de silenciamiento génico descubierto en *Caenorhabditis elegans* como una respuesta a la presencia de RNA de doble cadena. Este fenómeno ha sido descrito posteriormente en muchos organismos como células de mamífero y de plantas.

Para el análisis funcional de los genes que codifican para la SQS, SQE y SMT en *T. brucei* se generaron dos construcciones diferentes para cada gen con el objetivo de evitar efectos *off-target*. Para ello se utilizó la estrategia *stuffer* o sistema tallo-lazo que ha resultado ser más robusta que el sistema ampliamente utilizado con dos promotores T7 enfrentados (Motyka and Englund, 2004).

4.1. Papel de la síntesis de esteroides en la proliferación, morfología y ciclo celular en formas procíclicas de *Trypanosoma brucei*

Al analizar los requerimientos de estas enzimas mediante RNAi en la forma procíclica se observó que la depleción de los niveles de *TbSQS* produce una inhibición del crecimiento de aproximadamente el 40% mientras que la reducción en los niveles de *TbSQE* produce un fenotipo muy severo de pérdida de viabilidad celular ocasionando prácticamente la muerte total del cultivo a los 4 días de inducir la interferencia. La inhibición de la producción de esteroides con un grupo alquilo en posición 24 mediante depleción de la *TbSMT*, por el contrario, no afecta a la proliferación celular. Con estos resultados, y entendiendo que los procíclicos presentan la capacidad de adaptarse a diferentes condiciones de disponibilidad de esteroides a través de la adquisición de lipoproteínas del medio y modular la síntesis endógena (Coppens and Courtoy, 1995), se estudió el efecto sobre el crecimiento de la depleción de las tres enzimas mencionadas en un medio con un bajo contenido en lípidos. Cuando se induce el RNAi de la *TbSQS* en ausencia de esteroides exógenos, se observa una acentuación de la pérdida de viabilidad celular siendo la inhibición del crecimiento prácticamente del 100% a los 6 días de inducción. Esto sugiere que en condiciones de una limitación en el aporte exógeno, la síntesis endógena aporta parte de los esteroides necesarios para asegurar la supervivencia y que existen mecanismos adaptativos eficaces que modulan la ruta biosintética en respuesta a la disponibilidad de “nutrientes”. El crecimiento en suero deslipidado también fue analizado en el caso de las formas procíclicas donde se indujo el RNAi para la *TbSQE*. Dado que el fenotipo de inhibición de la proliferación resultante de la depleción de la *TbSQE* era muy pronunciado ya de por sí, es posible que la ausencia de esteroides no tuviera efectos adicionales significativos. A esto se une el hecho de que es probable que parte del efecto observado se deba a una acumulación de intermediarios tóxicos como el escualeno.

Finalmente, tampoco se observa una reducción en la tasa de proliferación cuando se bloquea el aporte de esteroides exógenos en células donde se induce el RNAi de la *TbSMT*. Esta observación sugiere que la formación de esteroides de tipo ergosta es prescindible para la correcta proliferación celular y que las células son capaces de crecer

careciendo de este tipo de estructuras independientemente del contenido del colesterol del medio.

Un análisis detallado de la composición de esteroides en la línea celular control de la forma procíclica (*Tb449*) muestra que el colesterol constituye el 66% del total de esteroides. Además contienen cantidades significativas de ergosterol (3.2%), colest-7,24-dienol (20.3%) y colest-5,7,24-trienol (9.2%). La procedencia del colesterol se supone exógena mientras que el resto de compuestos identificados serían de síntesis endógena (Gros et al., 2006).

La naturaleza de los esteroides identificados en procíclicos, junto con la información del proyecto genoma, permite establecer un modelo para la síntesis de esteroides en *T. brucei*. Dado que varios de los genes implicados en la síntesis del ergosterol (ergosta-5,7,22-trienol) están ausentes, se sugiere la siguiente ruta de transformación de un intermediario trimetilado (el lanosterol):

- 1) La desmetilación en posición 4
- 2) La desmetilación en posición 14
- 3) La metilación en posición 24
- 4) La reordenación del doble enlace en posición Δ^8 a la posición Δ^5
- 5) La introducción del doble enlace en posición Δ^{22}
- 6) La introducción del doble enlace en posición Δ^{24}

Existen dudas con respecto a como tiene lugar la síntesis de esteroides alquilados en posición 24 ya que ortólogos de determinadas enzimas como la Δ^7 y Δ^{24} reductasas parecen estar ausentes del genoma. Se ha identificado un ortólogo de la Δ^{14} reductasa que aún no ha sido caracterizada y es concebible que presente una especificidad de sustrato diferente pudiendo reducir a esteroides en posiciones alternativas. Por otra parte, precisamente es posible que la presencia de concentraciones significativas de colest-5,7,24-trienol y colest-7,24-dienol se deban a la ausencia de estas actividades Δ^7 y Δ^{24} reductasa.

Al examinar la composición de lípidos de las líneas celulares inducidas surge la posibilidad de que los fenotipos resultantes podrían deberse tanto a la depleción de productos finales como a un acúmulo o desequilibrio en la concentración de

determinados intermediarios. En la línea celular *TbSQS* RNAi se observó una reducción significativa de los intermediarios identificados, tanto de tipo colestá como ergosta con lo que el porcentaje de colesterol aumenta significativamente. Esta observación era previsible dado que la enzima cataliza la primera reacción de la ruta de síntesis de esteroides propiamente dicha y su *knock-down* perturbaría la síntesis de todos los intermediarios posteriores. El análisis de la composición de esteroides cuando se induce el RNAi de la *TbSQE* claramente demuestra una disminución en los niveles de esteroides que sintetiza el parásito y una acumulación mayoritaria de escualeno, el sustrato de la escualeno epoxidasa. El aumento pronunciado en escualeno intracelular podría ser parcialmente la causa del fenotipo de letalidad (Leber et al., 2003; Akins, 2005; Pasrija et al., 2005). Resultados semejantes han sido descritos en levaduras donde la inhibición de la escualeno epoxidasa por acción de la terbinafina y otras alilaminas produce una depleción de esteroides normales y una acumulación de precursores con actividades citostáticas o citotóxicas (Roberts et al., 2003). La inhibición de la escualeno sintasa en levadura da lugar a un descenso en la síntesis de ergosterol y una acumulación de escualeno que es depositada en numerosas vacuolas lipídicas. El escualeno produce a su vez alteraciones en la membrana vacuolar y plasmática con efectos fungicidas (Jain and Sehgal, 2000). Contrariamente, estudios en humanos han demostrado que elevados niveles de escualeno en plasma no son tóxicos y que este compuesto incluso tiene propiedades antioxidantes y citoprotectores (Das et al., 2003; Gupta et al., 2003).

Finalmente, células con niveles disminuidos de la *TbSMT* muestran una reducción sustancial de los esteroides 24-alquilados y una acumulación de zimosterol y colestá-5,7,24-trienol. El zimosterol ha sido propuesto como el sustrato óptimo para la SMT de *T.brucei* (Zhou et al., 2006) ya que se acumula en células procíclicas tratadas con un inhibidor específico de la enzima. Otro sustrato probable de la SMT es el colestá-5,7,24-trienol (Zhou et al., 2006; Nes, 2003), que en nuestro caso también se acumula al inducir la interferencia de la *TbSMT*. Cuando se tratan otros tripanosomátidos con azasteroles el análisis de la composición de lípidos también mostró una acumulación de zimosterol y colestá-5,7,24-trienol, entre otros esteroides (Lorente et al., 2004). En definitiva, los resultados obtenidos demuestran la efectividad de los RNAis para perturbar la composición de esteroides lo que provee de herramientas

poderosas para analizar el papel biológico en estos organismos de determinados esteroides endógenos.

En relación con la *TbSMT*, resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio demuestran que transfectantes de *L. major* que sobreexpresan la enzima no son resistentes a inhibidores específicos como el 25,26-azasterol (Jimenez-Jimenez et al., 2008). Esto sugiere que el efecto antiproliferativo de los azasteroles *in vitro* observados en los tripanosomátidos (Magaraci et al., 2003; Lorente et al., 2004; Urbina et al., 1996b), incluso en las formas sanguíneas de *T. brucei*, se puede deber a modos de acción adicionales e independientes de la depleción de esteroides 24-alquilados (Gros et al., 2006). Nuestros datos son consistentes con la idea de que la reacción de alquilación en posición 24 no es un proceso esencial, como ya se describió para levaduras (Gaber et al., 1989) aunque su inhibición puede generar un desequilibrio de ciertos intermediarios/productos finales que pueden tener efectos sobre las propiedades de las estructuras de membrana.

Los resultados obtenidos por GC-MS sobre la composición de esteroides completan los resultados previos obtenidos mediante marcaje metabólico con ^3H -mevalonato, donde se han cuantificado los lípidos neutros de síntesis endógena de las líneas celulares tras inducir la interferencia para los genes de la *TbSQS*, *TbSQE* y *TbSMT*. Los extractos de lípidos neutros provenientes de las diferentes líneas celulares se separaron mediante cromatografía en capa fina (TLC) y con la ayuda de estándares disponibles comercialmente, se identificaron las diferentes zonas para después proceder a la cuantificación de la radioactividad incorporada. Observamos que en la zona donde migra el colesterol, el ergosterol, el desmosterol y probablemente otros intermediarios, la radioactividad cuantificada es mucho menor para las líneas celulares donde se han inducido los RNAs de la *TbSQS* y la *TbSQE*, lo que indica un bloqueo de la síntesis endógena de la mayoría de los esteroides. Por otra parte, se observa un aumento significativo en la cantidad de radioactividad asociada a la zona donde migra el escualeno en los extractos de lípidos neutros de células donde se ha inhibido la expresión de la *TbSQE*.

Varios estudios demuestran el papel de los esteroides en la regulación del ciclo celular en células de mamífero (Hancock, 2006; Hager et al., 2006; Zhuang et al., 2005). Para analizar el papel de esteroides en el ciclo celular de tripanosomátidos se analizaron las distintas líneas celulares mediante tinción del DNA con DAPI y se procedió al recuento de las distintas formas de acuerdo con el número de núcleos (N) y kinetoplastos (K). Asimismo se realizaron estudios mediante FACS para cuantificar las distintas fases del ciclo celular. En general, la depleción de las distintas enzimas implicadas en la síntesis de esteroides no produce alteraciones en el ciclo celular en procíclicos, si bien es de destacar un ligero aumento en el número de células polinucleadas en el caso de la línea *TbSQE* RNAi que exhibía parásitos con marcadas alteraciones morfológicas (observadas mediante contraste de fase), apareciendo formas redondeadas que habían perdido la morfología habitual mucho más alargada y esbelta. En definitiva, en este caso la depleción de productos finales junto con la acumulación de escualeno genera alteraciones en la estructura de la membrana plasmática.

Estudios de la ultraestructura, mediante microscopía electrónica de transmisión, pusieron de manifiesto en la línea *TbSQS* RNAi acumulaciones de tipo lipídico electrodensas que bien podrían corresponder a intermediarios de la síntesis del ergosterol no identificados o son el resultado de una alteración generalizada del metabolismo lipídico en respuesta a modificaciones en la composición de esteroides. Es de destacar que alteraciones en la síntesis de esteroides en levadura generan modificaciones compensatorias en el metabolismo de fosfolípidos y otros lípidos, y que existen mecanismos adaptativos en la composición de membranas destinadas a mantener la integridad y la fluidez (Sharma, 2006). Otras alteraciones incluyen modificaciones en el bolsillo flagelar, que como ya se ha mencionado, es la estructura celular a través de la cual se realiza la endocitosis y la exocitosis. Estudios realizados en levaduras (Munn et al., 1999; Hongay et al., 2002; Heese-Peck et al., 2002) y en células de mamífero (Kwik et al., 2003) han demostrado la relación de los esteroides con las diferentes fases de la endocitosis. Resultará de interés determinar en estudio futuros el impacto de la modificación de la composición de esteroides sobre la ruta endocítica en *Trypanosoma*.

En células *TbSMT* deficientes también se observaron acumulaciones de naturaleza lipídica muy electrodensas, mientras que células sometidas a la depleción de la *TbSQE* muestran una morfología profundamente alterada posiblemente reflejo de las consecuencias citotóxicas de la acumulación de escualeno. Las células *TbSQE* RNAi presentan también estructuras parecidas a autofagosomas, una profunda alteración del sistema de vacuolización, perturbaciones en la estructura y el tamaño del bolsillo flagelar que contienen restos celulares, partículas lipídicas de naturaleza electrodensa y una ligera dilatación de la mitocondria. Alteraciones semejantes han sido observadas en *T. cruzi* y varias especies de *Leishmania* al ser sometidos al tratamiento con diferentes inhibidores de la biosíntesis de esteroides (IBEs) (Fernandes Rodrigues et al., 2008; Lorente et al., 2004; Braga et al., 2004; Rodrigues et al., 2002). Las alteraciones incluyen la dilatación de la mitocondria, la acumulación de partículas lipídicas, la dilatación y vacuolización del bolsillo flagelar y en algunos casos la aparición de estructuras autofagosómicas. Se sabe que en epimastigotes de *T. cruzi* la mitocondria posee una concentración muy elevada de esteroides exógenos y endógenos, que contrasta con la ausencia de esteroides en la membrana interna mitocondrial en células de mamífero, y que podría ser la causa de las perturbaciones que sufre la estructura de la mitocondria en respuesta al tratamiento con IBEs en estos parásitos (Rodrigues et al., 2001). Por otro lado, se ha descrito en diferentes células de mamífero que la depleción del colesterol induce autofagia (Cheng et al., 2006) y un estudio muy reciente establece una íntima relación entre el metabolismo lipídico y los procesos autofágicos sugiriendo que la autofagia interviene en la regulación intracelular del almacenamiento de lípidos (Singh et al., 2009). Es posible que las estructuras autofagosómicas observadas puedan estar relacionadas con alteraciones en la homeostasis lipídica que serían consecuencia tanto de la depleción de productos finales como de la acumulación del escualeno.

Con estos resultados podemos concluir que las etapas tardías de la biosíntesis de esteroides son requeridas para la supervivencia de la forma procíclica de *T. brucei*. Las enzimas *TbSQS* y *TbSQE* catalizan las primeras reacciones específicas de la formación de esteroides y la disminución de los niveles de estas proteínas produce, como hemos demostrado, una reducción de los niveles de varios intermediarios. También podemos establecer que hay una coordinación entre la síntesis endógena y la adquisición de esteroides extracelulares que permite al parásito adaptarse a diferentes condiciones

ambientales . Finalmente, hemos establecido que aunque la alquilación en posición 24 no es esencial para el parásito, la ausencia de esteroides de tipo ergosta genera defectos morfológicos y una perturbación del metabolismo lipídico.

4.2. Papel de la síntesis de esteroides en la proliferación, morfología y ciclo celular en formas sanguíneas de *Trypanosoma brucei*

Una de las herramientas para el diseño racional de fármacos antiprotozoarios es bloquear específicamente una enzima o una ruta metabólica del parásito. Como ya se ha visto, la biosíntesis de esteroides es un blanco potencial de drogas. Esta ruta produce colesterol en mamíferos, ergosterol en hongos y una amplia variedad de esteroides 24-alquilados en plantas y protistas (Roberts et al., 2003). El colesterol, el ergosterol y el sitosterol (plantas) son componentes estructurales esenciales de las membranas plasmáticas. La estructura de los esteroides estabiliza las membranas, regula la permeabilidad y fluidez de las mismas y modula la actividad de las enzimas de unión a la membrana y de los canales iónicos. Además, los esteroides sirven como moléculas bioactivas, las cuales a niveles nanomolares (hormonal) pueden actuar como reguladores del ciclo celular y del desarrollo (Roberts et al., 2003; Vanden Bossche et al., 1995).

Mientras que los mamíferos pueden captar el colesterol de la dieta, el bloqueo de la producción de ergosterol en hongos es letal produciendo defectos en la citocinesis, el bloqueo del crecimiento celular y, eventualmente, el colapso de la membrana plasmática (Vanden Bossche et al., 1995). Actualmente, se utilizan inhibidores de la biosíntesis de esteroides (IBEs) para el tratamiento contra agentes fúngicos en el área clínica y en el área de la agricultura. En las últimas dos décadas han aparecido numerosos estudios con resultados positivos para el uso de IBEs como potencial tratamiento para enfermedades infecciosas causadas por *T. cruzi* (Lazardi et al., 1990; Urbina et al., 1996a; Apt et al., 1998; Araujo et al., 2000; Molina et al., 2000; Urbina, 2001; Buckner et al., 2003; Urbina et al., 2004; Hucke et al., 2005) y especies de *Leishmania* (Gebre-Hiwot and Frommel, 1993; Haughan et al., 1995; Rodrigues et al., 2005). En el caso concreto de *T. brucei* se ha descrito que las formas sanguíneas no sintetizan esteroides de tipo endógeno sino que todo el colesterol que contienen proviene del hospedador (Coppens et al.,

1988; Coppens and Courtoy, 2000). Esta situación se ve reforzada por la marcada dependencia de esteroides exógenos para la supervivencia celular. Aún así, no se puede descartar que haya un flujo mínimo de carbono a través de los pasos posteriores de la ruta cuyo resultado sea la síntesis de esteroides a niveles hormonales con funciones críticas para la célula. De hecho, se ha detectado actividad lanosterol sintasa (Buckner et al., 2000) y esterol metiltransferasa en parásitos sanguíneos (Gros et al., 2006), además de detectarse la expresión de 14 α -desmetilasa (Joubert et al., 2001) y, como se ha demostrado en este trabajo, de escualeno sintasa y escualeno epoxidasa. Además, experimentos recientes con IBEs, inhibidores de la 14 α -desmetilasa (Lepesheva et al., 2007; Lepesheva et al., 2008) y de la 24-SMT (Lorente et al., 2004; Gros et al., 2006)(Zhou et al., 2007), muestran una potente actividad antiprotozoaria *in vitro* contra la forma sanguínea de *T. brucei*. Aunque los azastaroles pueden tener un mecanismo de acción diferente a la inhibición de la 24-SMT (Gros et al., 2006), la actividad de los azoles frente a la 14 α -desmetilasa parece ser bastante específica.

Así, aunque el “dogma” establecido es que las formas sanguíneas de *T. brucei* no sintetizan esteroides, los hallazgos recientes ponen en duda esta afirmación. Uno de los objetivos de esta tesis ha sido establecer de forma inequívoca la importancia de la síntesis endógena de esteroides en la forma sanguínea clínicamente relevante. El primer paso fue generar las líneas celulares con niveles reducidos de *TbSQS*, *TbSQE* y *TbSMT* en las formas sanguíneas, al igual que hicimos en la forma procíclica. Para nuestra sorpresa, el *knock-down* de la *TbSQE* en las BFs resultó en una disminución de la proliferación celular de aproximadamente el 30%, resultado que no se observa en los casos de la *TbSQS* y de la *TbSMT*. La depleción de los niveles de *TbSMT* mediante RNAi fue bastante efectiva con la disminución de hasta el 90% de proteína, pero en el caso de la *TbSQS* no se logró reducir la cantidad de proteína más de un 30%. Uno de los problemas de la técnica de RNAi es que los niveles de proteína nunca pueden ser abolidos completamente y, además, un fenómeno frecuente es que después de apreciarse un fenotipo claro de inhibición del crecimiento, tras varios días de inducción, los cultivos pueden recuperar un crecimiento normal como ocurre en el caso de la escualeno epoxidasa. Se ha descrito que la pérdida del efecto del silenciamiento puede ocurrir por mutaciones en los operadores de tetraciclina, por la pérdida de los insertos

de RNAi, por defectos en la maquinaria del RNAi o por fenómenos epigenéticos (Motyka and Englund, 2004).

Un estudio que podía darnos información sobre la importancia de la ruta en *T. brucei* es analizar si las líneas celulares en las que se induce la interferencia son más sensibles a inhibidores específicos de la ruta. Para ello se determinaron las IC₅₀ de inhibidores de la ruta disponibles comercialmente como son la mevastatina que es un inhibidor clásico de la HMGR, la terbinafina que actúa sobre la escualeno epoxidasa y el ketoconazol comúnmente utilizado para bloquear la reacción catalizada por la SMT. Todos estos compuestos presentaban actividad antiproliferativa *in vitro* en ambas formas celulares (procíclicas y sanguíneas), excepto la mevastatina en PFs con una IC₅₀ mayor de 100 µM. Cuando añadimos concentraciones subletales de estas drogas (5-10% inhibición) a los cultivos celulares, donde se inducen los RNAis mediante la adición de doxiciclina, observamos que las PFs no presentaban hipersensibilidad a estos fármacos. En cambio, los cultivos celulares correspondientes a la forma sanguínea vieron potenciado su fenotipo en las líneas celulares con niveles reducidos de *TbSQS* y *TbSQE*. En cultivos con niveles de *TbSQE* reducidos se observó hipersensibilidad a mevastatina y ketoconazol alcanzando hasta un 50% de pérdida de viabilidad. En las células con expresión de los niveles de *TbSQS* ligeramente reducidos y donde el RNAi no tenía efecto de pérdida de viabilidad, se observa una inhibición del crecimiento de hasta un 40% cuando adicional añadir mevastatina y ketoconazol. En la línea celular correspondiente al RNAi de la *TbSMT* no se producen cambios en la actividad proliferativa al tratarla con ninguno de estos compuestos. El panorama hasta este momento era sorprendente, pues por primera vez había resultados que indicaban que enzimas específicas de la biosíntesis de esteroides podían ser fundamentales para la viabilidad celular en la forma sanguínea de *T. brucei*. Los datos obtenidos hasta este momento para la esteroil metiltransferasa probaban, al igual que en PFs, que la reacción de alquilación en posición 24 no era esencial para la forma sanguínea de este organismo.

De la misma manera que se hizo en las formas procíclicas, se determinó la composición de lípidos neutros mediante GC-MS en las líneas celulares *knock-down* para *TbSQS*, *TbSQE* y *TbSMT* en parásitos sanguíneos. En trabajos previos se había

determinado la composición de esteroides en las formas sanguíneas, en el trabajo llevado a cabo por Gros y col. (Gros et al., 2006) el esteroide mayoritario que detectaron en las formas sanguíneas fue el colesterol (99%), mientras que el grupo de Nes y col. (Zhou et al., 2007), al determinar la composición de esteroides de las formas sanguíneas de *T. brucei* crecidas en rata, cuantificaron colesterol en un 96% y el resto correspondían a otro tipo de esteroides que podrían provenir de la dieta de los animales de experimentación.

Por GC-MS se determinó la composición lipídica en la línea celular control (*TbS16*) obteniéndose 94% de colesterol e intermediarios de la ruta en proporciones muy bajas como colest-7,24-dienol y colest-5,7,24-trienol, incluso en cantidades traza como el desmosterol. La composición de lípidos en células donde se ha inducido el RNAi de la *TbSQS* varía ligeramente aumentando los niveles de colesterol al 99% y disminuyendo la concentración de los demás intermediarios. En células donde se reducen los niveles de *TbSMT* se acumula colest-7,24-dienol a la vez que se reducen los niveles de colesterol. Las variaciones más severas aparecen en las células donde se reducen los niveles de *TbSQE* ya que el colesterol se reduce al 68% y se produce una acumulación de intermediarios de tipo colest sin determinar con una masa molecular de 384. La alteración de la homeostasis lipídica como consecuencia de la reducción de *TbSQE* puede ser la causa de la inhibición de la proliferación en esta forma celular. Era de esperar que el RNAi de la *TbSQE* produjera cierta acumulación de escualeno en las células, pero por GC-MS no se detecta dicha acumulación. Las formas sanguíneas presentan una velocidad de reciclaje de los endosomas muy superior a las formas procíclicas (Natesan et al., 2007) y es posible que esta forma celular sea capaz de secretar el escualeno de una forma eficaz para evitar un alteración de los perfiles de esteroides. En cambio, los experimentos de marcaje metabólico realizados a corto plazo muestran claramente una acumulación de escualeno en las BFs.

Estudios del ciclo celular en estas líneas celulares mediante tinción con DAPI mostraron un aumento en la cantidad de células polinucleadas, del 0.5% presentes en la línea control hasta un 10% en los cultivos inducidos. En todos los casos se observa mediante microscopía de fluorescencia que las células presentan defectos en la citocinesis y, por lo tanto, no son capaces de segregarse correctamente sus orgánulos

degenerando en células gigantes que poseen agregados de núcleos y kinetoplastos, y varios flagelos. Este tipo de células (XNXX) surgen a partir de varias etapas de replicación sin que se produzca la división celular, por lo que principalmente podemos deducir que se produce un arresto a nivel de la citocinesis. En las células polinucleadas se observan además de núcleos independientes perfectamente segregados, núcleos fusionados que no han sufrido una división completa y esto puede suponer un arresto en la fase G2/M del ciclo celular como se muestra en el esquema de la figura 4.1. La caracterización de deficiencias en el ciclo celular como consecuencia de la depleción de enzimas de la biosíntesis de esteroides no es fácil, sin embargo, lo que está claro es el efecto que la interferencia genera sobre alguno de los puntos de control (check-point) del ciclo celular. En nuestro caso, el fenotipo observado es muy similar al fenotipo que aparece en parásitos donde se ha deplecionado la proteína TOR2, cuya función es controlar el crecimiento celular en *T. brucei* a nivel espacial mediante la remodelización del citoesqueleto de actina (Barquilla et al., 2008), sugiriendo que los esteroides podrían participar en estos procesos.

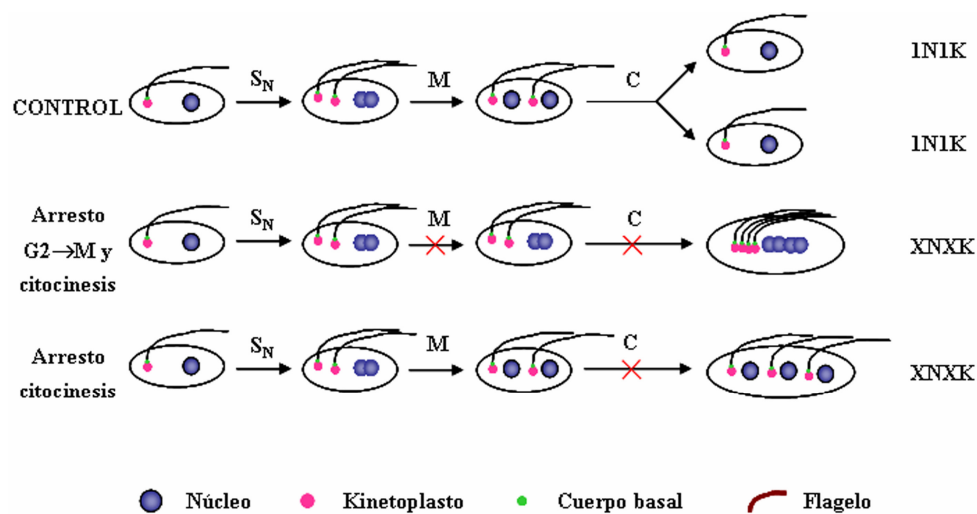


Figura 4.1. Modelo demostrativo de las distintas respuestas a arresto en fase G2/M y citocinesis en *Trypanosoma brucei*. SN, fase S nuclear; M, mitosis; C, citocinesis.

Al hacer microscopía electrónica de transmisión se corrobora la presencia de células multinucleadas. Se observan también la aparición de estructuras membranosas en el citoplasma y alteraciones de la membrana plasmática que producen formas celulares absolutamente aberrantes que pueden ser la consecuencia de que las bicapas lipídicas

pierdan sus propiedades al sustituir sus esteroides por intermediarios con estructuras moleculares diferentes. Los parásitos presentan también perturbaciones en la mitocondria y algunas contienen estructuras vesiculares como ocurre en otros tripanosomátidos cuando se bloquea la síntesis de esteroides (Rodrigues et al., 2002; Braga et al., 2004; Lorente et al., 2004; Fernandes Rodrigues et al., 2008). En algunas células se aprecia la acumulación de varias partículas lipídicas electrodensas que pueden contener productos intermediarios de la ruta y aparecen bolsillos flagelares muy agrandados con múltiples flagelos, incluso, varios bolsillos flagelares en una misma célula. Estos resultados aportan evidencias de que los esteroides en las formas sanguíneas de *T.brucei* pueden participar en los procesos endocíticos como ha sido descrito en el caso de levadura con mutantes de genes de la ruta de biosíntesis de isoprenoides. En levadura, los esteroides pueden ser requeridos para la formación de los dominios de membrana, confiriendo propiedades físicas distintas en las membranas de los diferentes compartimentos. Esto explicaría que los pasos de internalización y de postinternalización tengan requerimientos de esteroides diferentes, como se demuestra en los estudios realizados con los mutantes *ergΔ* (Heese-Peck et al., 2002). Hay evidencias también en levadura de que los esteroides están involucrados en la fusión de las vacuolas y en el desequilibrio de los perfiles de esteroides que llevan a la fragmentación vacuolar (Hongay et al., 2002).

4.3. La biosíntesis de esteroides es esencial en las formas procíclicas y sanguíneas de *Trypanosoma brucei*

A pesar de que mediante la técnica de RNA de interferencia no se eliminan los niveles de estas proteínas, los parásitos presentan profundas alteraciones a nivel celular. Por tanto, no podemos concluir que estas enzimas no sean esenciales para la supervivencia celular en las formas sanguíneas.

Para validar las etapas tardías de la biosíntesis de esteroides como dianas terapéuticas en *T. brucei* procedimos a la generación de dos líneas celulares (forma procíclica y forma sanguínea) *knock-out* (KO) para el gen de la escualeno sintasa, ya que es la única forma de asegurar la abolición completa de los niveles de expresión de una proteína. Como *T. brucei* es un organismo diploide, se generaron dos plásmidos con regiones de la 5'UTR y la 3'UTR del gen de la escualeno sintasa conteniendo dos

marcadores de resistencia diferentes, para llevar a cabo el reemplazamiento de los dos alelos mediante recombinación genética. La estrategia seguida es reemplazar un alelo del gen de la SQS mediante la transfección de una de las construcciones generadas y el otro alelo usando la construcción que porta un marcador de resistencia diferente (figura 4.2). En el caso de que el gen no sea esencial estos dos pasos de recombinación génica deben ocurrir fácilmente. En nuestro caso, el primer reemplazamiento alélico tuvo lugar sin complicaciones en ambas formas celulares. Se demostró por Southern-blot que la recombinación había ocurrido en la zona correcta y mediante Northern-blot se corroboró que los niveles de mRNA se habían reducido a la mitad tanto en formas procíclicas como en formas sanguíneas. La línea celular KO para el primer alelo, en formas procíclicas, no mostraba alteraciones en la viabilidad celular, sin embargo, el KO de un solo alelo en las formas sanguíneas produjo una inhibición del crecimiento del 80%.

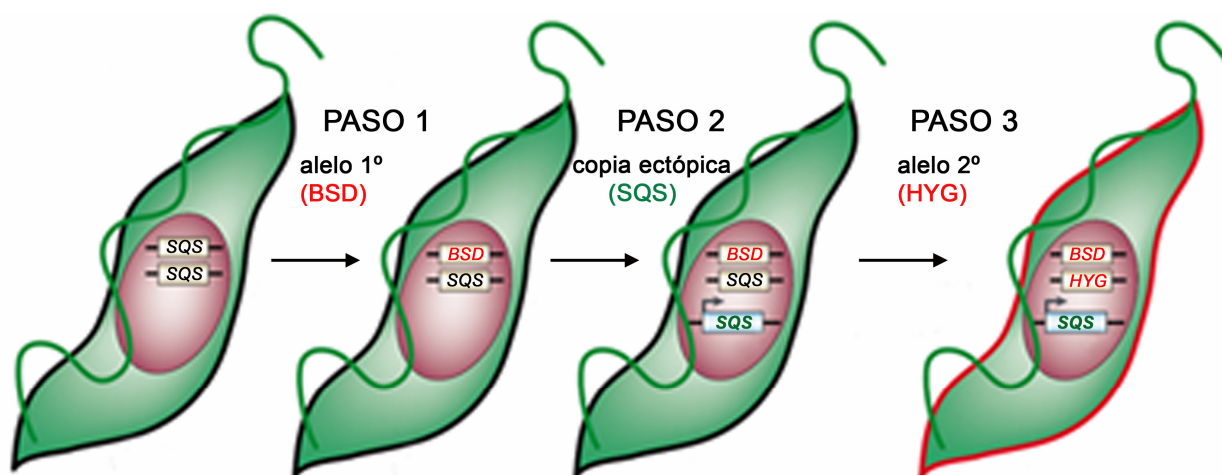


Figura 4.2. Esquema de la estrategia seguida para generar una línea celular *knock-out* para el gen de la escualeno sintasa en *Trypanosoma brucei*.

A continuación, se procedió a reemplazar el segundo alelo, pero no fue posible ni en las formas procíclicas ni en las formas sanguíneas tras repetidos intentos. Para intentar conseguir líneas celulares KO para la SQS y, viendo que el gen podía ser esencial, se construyó un plásmido donde se inducía la expresión de una copia ectópica del gen de la SQS de *T. brucei*. Tras reemplazar el primer alelo se transfectó esta construcción y con el fondo genético de la expresión basal de una copia ectópica del gen se procedió a reemplazar el segundo alelo. Para ambas líneas celulares, fue imposible

obtener el KO del gen que codifica para la escualeno sintasa, ni siquiera en presencia de una copia ectópica sobreexpresándose. Estos datos aportan más que evidencias de la esencialidad de la biosíntesis endógena de esteroides en *Trypanosoma brucei* y permite comprender varias incógnitas generadas sobre el papel que cumplen en las formas sanguíneas enzimas de la biosíntesis de esteroides ubicadas en las etapas tardías de la ruta metabólica.

En levaduras se han propuesto tres papeles funcionales para el ergosterol (Rodríguez et al., 1985): una función “sparking” o capacidad de mantener y/o disparar el crecimiento; función de “dominio crítico” que hace referencia a que es requerido sólo en áreas restringidas de la membrana y función “bulk” que consiste en el mantenimiento de la estructura global y fluidez óptima de las membranas celulares. Estas funciones son altamente dependientes del grupo metilo en el carbono 24, puesto que sustituciones del grupo α -metilo por 24b- β -metilo no pueden ejercer la misma función. Las formas sanguíneas de *T. brucei* probablemente utilicen el colesterol del hospedador para desempeñar la función estructural de componente mayoritario de las membranas celulares. Esto es lógico desde el punto de vista de ahorro energético porque esta forma celular habita en el torrente sanguíneo donde hay una gran disponibilidad de colesterol. Nuestros resultados refuerzan la idea de que en sanguíneos, contradiciendo lo pensado hasta el momento, existe un flujo mínimo de carbono que conlleva la síntesis de esteroides endógenos necesarios a muy bajas concentraciones, incluso no detectables, con un papel hormonal y de señalización celular esenciales para la proliferación celular de estos parásitos.

4.4. La biosíntesis de esteroides en tripanosomátidos implica la participación de varios orgánulos.

La ruta de biosíntesis de isoprenoides ha sido objeto de numerosos estudios debido a la diversidad de funciones del colesterol y de sus precursores biosintéticos a nivel celular y de organismo. En células eucariotas la compartimentación intracelular de reacciones bioquímicas contribuye a su regulación espacial y temporal lo que implica que el conocimiento de la localización intracelular de una proteína es clave para entender su funcionamiento. Estudios en células de mamífero indican que los pasos tempranos de la

síntesis de isoprenoides se localizan principalmente en peroxisomas (Kovacs et al., 2007), mientras que en levaduras están asociados mayoritariamente al retículo endoplásmico (Leber et al., 1998; Jimenez-Jimenez et al., 2008).

En tripanosomátidos, la localización intracelular de la biosíntesis de esteroides está sujeta a controversia. En el caso de la HMG-CoA reductasa (HMGR), enzima que cataliza la formación del mevalonato, hay estudios en *T. brucei* que describían la asociación de la enzima a microsomas (Coppens et al., 1995) y a la matriz mitocondrial (Heise and Opperdoes, 2000). Estudios de fraccionamiento bioquímico en *T. cruzi* sugirieron una localización de la HMGR mayoritariamente glicosomal y minoritariamente asociada a la fracción citosólica (Concepcion et al., 1998). Sin embargo, estudios detallados llevados a cabo en nuestro laboratorio, tanto en *T. cruzi* como en *L. major*, utilizando técnicas de permeabilización con digitonina e inmunomicroscopía electrónica, indican claramente una asociación predominante de la HMGR con la matriz mitocondrial (Pena-Diaz et al., 2004). Trabajos recientes en nuestro laboratorio realizados en *L. major* utilizando permeabilización con digitonina, inmunofluorescencia indirecta e inmunomicroscopía electrónica en parásitos *wild-type* y que sobreexpresan la FPPS, señalan que ésta es mayoritariamente una enzima citosólica (Ortiz-Gomez et al., 2006). En otros organismos esta enzima se ha descrito también principalmente en el citosol debido a la presencia de la misma en las fracciones solubles de células y tejidos (Hugueney et al., 1996); aunque también se han descrito FPPSs localizadas en mitocondrias y cloroplastos de plantas (Cunillera et al., 1996; Sanmiya et al., 1999); y en peroxisomas en células de mamífero (Kovacs et al., 2007).

Una parte de este trabajo ha sido determinar la localización de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A sintasa (HMGS) y de la mevalonato kinasa (MVAK) con el objetivo de completar el conocimiento de la localización intracelular de los pasos tempranos de la biosíntesis de isoprenoides en tripanosomátidos. En células de mamífero aparecen dos formas de HMGS, una mitocondrial relacionada con la producción de cuerpos cetónicos y una forma citosólica implicada en la biosíntesis de isoprenoides (Royo et al., 1993). Nosotros hemos demostrado, mediante estudios de inmunofluorescencia indirecta y permeabilización con digitonina, que la HMGS es una enzima mitocondrial en *L. major* y *T. brucei*. Estos resultados proveen a la mitocondria

de un papel determinante en la contribución a la formación del mevalonato, puesto que la HMGR se localiza también en este orgánulo. En la mitocondria de diferentes tipos celulares también tiene lugar la degradación de la leucina, que podría representar una fuente de carbono principal para la síntesis de esteroides en tripanosomátidos, como se ha demostrado en el caso de *Leishmania* (Ginger et al., 2001). Aunque en tripanosomátidos no se conoce aún en qué compartimento tiene lugar la degradación de la leucina, el hecho de que todas estas enzimas se localicen en el mismo orgánulo representaría una ventaja para el parásito en términos de ahorro energético. Sin embargo, *T. cruzi* y *T. brucei* utilizan el acetato como principal fuente de carbono para la formación de esteroides e isoprenoides (Ginger et al., 2000) y esto podría explicarse porque en los genomas de ambos tripanosomas aparece una secuencia que codifica una proteína de alta identidad con la HMG-CoA liasa que cataliza la conversión del HMG-CoA a acetato, canalizando el HMG-CoA hacia rutas metabólicas alternativas. Sorprendentemente, esta secuencia no aparece en el genoma de *L. major*, lo que explicaría la elevada disponibilidad de HMG-CoA para la biosíntesis de isoprenoides en *Leishmania*.

Como ya se ha mencionado la enzima que interviene tras la HMGS, la HMGR, se localiza en la mitocondria aportando a este orgánulo un papel fundamental en la regulación de la síntesis de isoprenoides. Para estudiar en mayor profundidad cuál es el papel de este orgánulo en la biosíntesis de esteroides procedimos al análisis de la localización intracelular de la enzima que cataliza el siguiente paso en la ruta, la mevalonato kinasa (MVAK). Realizamos el estudio en promastigotes de *L. major* y en formas procíclicas y sanguíneas de *T. brucei*, demostrando por diferentes técnicas que la MVAK está asociada principalmente con la matriz de los glicosomas. Para llegar a esta conclusión se llevaron a cabo experimentos de permeabilización con digitonina y microscopía de fluorescencia utilizando como marcador glicosomal la proteína aldolasa. Estos resultados concuerdan con las predicciones basadas en las señales de localización presentes en las secuencias de la HMGS y la MVAK de *L. major* y *T. brucei*. Así que hasta el momento las etapas tempranas de la biosíntesis de isoprenoides se localizan entre la mitocondria, los glicosomas y el citoplasma puesto que la FPPS actúa en el citoplasma celular tanto en *L. major* (Ortiz-Gomez et al., 2006) como en *T. brucei* y *T. cruzi* (Ferella et al., 2008). Hasta este punto se requiere que el mevalonato atraviese

la membrana mitocondrial y entre en el glicosoma antes de ser fosforilado por la MVAK. Tras la MVAK tienen lugar dos fosforilaciones sucesivas que podrían producirse también en el glicosoma cuya localización queda por determinar, aunque sería lógico pensar que se localizan en este orgánulo donde el ATP es abundante.

Las reacciones posteriores a la formación de farnesil difosfato son específicas de la síntesis de esteroides y con el objeto de profundizar en el conocimiento de esta ruta hemos determinado la localización espacial de la escualeno sintasa (SQS), la escualeno epoxidasa (SQE) y la 24-esterol metiltransferasa. En el caso de las enzimas ubicadas en las etapas tardías de la biosíntesis de esteroides en tripanosomátidos también se ha generado cierta controversia. Estudios de fraccionamiento subcelular en gradiente de densidad realizados por Urbina y col. (Urbina et al., 2002) sugerían que la SQS posee una localización dual entre glicosomas y microsomas en *T. cruzi* y *L. major*. Este trabajo ha puesto de manifiesto mediante estudios de inmunofluorescencia indirecta, que la SQS está asociada mayoritariamente con el retículo endoplasmático en *T. brucei*. En nuestro laboratorio se ha determinado también la SQS de *T. cruzi* como reticular (resultados no publicados). Diversos autores coinciden en que la localización de la SQS es mayoritariamente reticular. En células hepáticas de rata se localiza en el retículo endoplasmático (Stamellos et al., 1993) y en la línea celular Hep G2 la SQS reside también en este orgánulo (Cohen et al., 1992). Nuestras observaciones son consistentes con estos resultados ya que el patrón reticular obtenido coincide con el de la proteína BiP que es un marcador del retículo endoplasmático.

La SQE se describió en levaduras asociada al retículo endoplasmático y a partículas lipídicas (Leber et al., 1998). Nosotros demostramos que la escualeno epoxidasa de *T. brucei* también colocaliza mayoritariamente con la proteína BiP, demostrando una localización mayoritaria en el retículo endoplasmático.

Con respecto a la 24-SMT, estudios realizados en *S. cerevisiae*, evidencian que la 24-SMT posee una localización dual asociada al retículo endoplasmático y a partículas lipídicas (Leber et al., 1998). En un estudio reciente llevado a cabo por nuestro grupo de investigación se ha determinado que la 24-SMT en promastigotes de *L. major* se distribuye mayoritariamente en el retículo endoplasmático, aunque también

aparece asociada a vesículas endocíticas (Jimenez-Jimenez et al., 2008). En parásitos que sobreexpresan la SMT a altos niveles se observa una interacción mayor con las vesículas endocíticas. Para completar el conocimiento en tripanosomátidos hemos analizado la localización de la 24-SMT en formas procíclicas y sanguíneas de *T. brucei*, demostrando también una asociación mayoritaria con el retículo endoplasmático. Diversos autores proponen un modelo en el cual plantean que la distinta ubicación de las enzimas pertenecientes a las etapas tardías de la ruta, se debe a un papel regulador cuya función es mantener la homeostasis de esteroides entre las distintas membranas de los compartimentos celulares. Otro papel que se puede asignar a la SMT, como se ha visto en levaduras, es la participación activa en procesos de endocitosis. Como demostramos en este trabajo, la depleción de esta enzima en *T. brucei* produce graves alteraciones en los compartimentos celulares encargados de la endocitosis, tanto en formas sanguíneas como en procíclicas, lo que refuerza la teoría de un papel regulador de estos procesos en *T. brucei*.

Existe un gran interés en conocer la localización de todos los pasos de la ruta de biosíntesis de esteroides en tripanosomátidos debido al potencial de ésta en el desarrollo de nuevos antiprotozoarios. La distribución encontrada de las enzimas pertenecientes a las etapas tempranas y tardías de la ruta es claramente divergente en cuanto a la de las células de mamíferos o plantas (Figura 4.3). El tráfico de intermediarios a través de los distintos compartimentos, gran parte de los cuales no son capaces de difundir libremente a través de las membranas, sugiere la existencia de transportadores y estas particularidades pueden ser explotadas como futuras herramientas de intervención clínica.

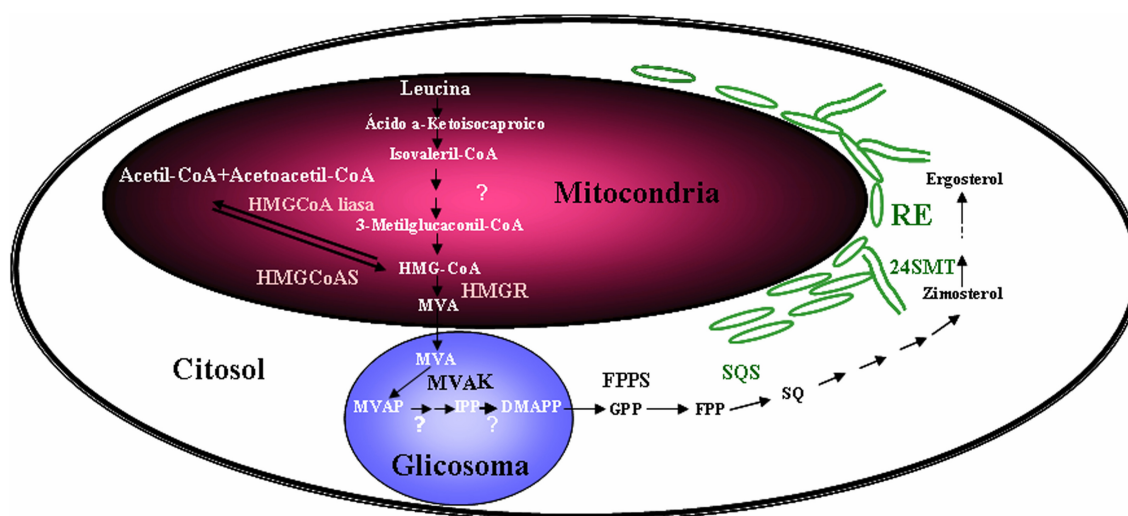


Figura 4.3. Compartimentación de la ruta de la síntesis de esteroides en tripanosomas. **HMGS**, 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima-A sintasa; **HMGR**, 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima-A reductasa; **MVA**, mevalonato; **MVAK**, mevalonato kinasa; **MVAP**, fosfomevalonato; **IPP**, isopentenil difosfato; **DMAPP**, dimetilalil difosfato; **GPP**, geranil difosfato; **FPP**, farnesil difosfato; **FPPS** farnesil difosfato sintasa; **SQ**, escualeno; **SQS**, escualeno sintasa; **SQE**, escualeno epoxidasa; **24SMT**, Δ^{24} -esterol metiltransferasa; **RE**, retículo endoplasmático.

4.5. La MVAK puede participar en los defectos celulares observados durante el silenciamiento génico de la peroxina 2

Como ya se mencionó en la introducción, los glicosomas son microcuerpos relacionados con los peroxisomas que contienen las primeras enzimas del metabolismo de la glucosa y la forma de *T. brucei* del hospedador mamífero es completamente dependiente de la glicolisis para la generación de ATP. Estudios donde se expresan en el citosol proteínas de localización glicosomal que participan en la formación de glucosa, sugieren que es de vital importancia para la célula la adecuada compartimentación de las enzimas glicolíticas (Blattner et al., 1998; Helfert et al., 2001). Otros estudios, además, sugieren que en la forma sanguínea de *T. brucei* la compartimentación juega un papel esencial en la regulación de la glucolisis (Bakker et al., 2000; Michels et al., 2000). En cambio, la forma procíclica de *T. brucei* depende principalmente del metabolismo mitocondrial de aminoácidos para generar ATP (Michels et al., 2000), pero a parte de las enzimas responsables de la glucolisis, existen otras proteínas asociadas a los glicosomas cuyas actividades varían considerablemente entre diferentes especies de parásitos y estadios del ciclo de vida. Las peroxinas (PEX)

son proteínas que participan en la biogénesis de los microcuerpos necesarias para la formación de la membrana y que intervienen en el transporte de las proteínas desde el citosol a la matriz glicosomal (Baerends et al., 2000; Subramani et al., 2000). Mutaciones en la proteína *PEX2* produce un importe defectuoso de las proteínas de la matriz de los peroxisomas de levaduras y células de mamífero (Faust and Hatten, 1997; Waterham et al., 1996).

Como hemos demostrado en este trabajo, la MVAK es una enzima íntimamente relacionada con el glicosoma y la peroxina 2 (*PEX2*) está específicamente involucrada en el importe de la MVAK al glicosoma. Cuando se reducen los niveles de expresión de *PEX2* mediante RNA de interferencia, las formas sanguíneas sufren una reducción del crecimiento severa en tan solo 24 horas, puesto que los glicosomas son indispensables para la obtención de energía en esta forma celular. (Guerra-Giraldez et al., 2002). En las formas procíclicas *el knock-down* de *PEX2* es a los 3 días cuando tiene un efecto más acusado sobre el crecimiento y los efectos son análogos a los observados en los mutantes de levadura y células de mamífero: el importe de las proteínas de matriz se altera gravemente produciendo una acumulación de enzimas glicosomales en el citosol de la célula (Guerra-Giraldez et al., 2002). Aunque en las formas procíclicas no se produce una reducción del número de glicosomas como ocurre en los tripanosomas sanguíneos donde la disminución de glicosomas es masiva, nuestros resultados muestran que las peroxinas, concretamente *PEX2*, participan en el importe de, al menos, una enzima implicada en la biosíntesis de isoprenoides, la mevalonato kinasa. Al estudiar la distribución de la MVAK en parásitos con expresión reducida de *PEX2*, observamos que en las formas sanguíneas la MVAK mantiene un patrón punteado que colocaliza con el de la aldolasa. Mientras que en los procíclicos la depleción de *PEX2* produce una distribución difusa de la aldolasa y especialmente de la MVAK, por lo que una distribución alterada de las enzimas implicadas en la biosíntesis de isoprenoides podría contribuir a los defectos en el crecimiento observado en células con *PEX2* deplecionado, poniendo de manifiesto la importancia de la ruta para los tripanosomátidos.

Conclusiones

5. CONCLUSIONES

1. Los estudios de localización intracelular de las enzimas de la biosíntesis de esteroides en tripanosomátidos ponen de manifiesto una distribución dinámica de la ruta, implicando al citosol, glicosomas, mitocondria y retículo endoplasmático. Esta distribución difiere de la de células de mamífero y refleja la existencia de peculiaridades del metabolismo específicas de estos organismos.
2. La peroxina PEX2 tiene un papel fundamental en la localización glicosomal de la mevalonato kinasa. Además, estudios de RNAi sugieren que la correcta compartimentación de las enzimas de la biosíntesis de esteroides es importante para la supervivencia celular en *Trypanosoma brucei*.
3. La depleción de la escualeno sintasa (*TbSQS*) mediante RNA de interferencia produce una disminución significativa del crecimiento en la forma procíclica de *Trypanosoma brucei*. El fenotipo de pérdida de viabilidad se ve potenciado en ausencia de esteroides exógenos, lo que demuestra una dependencia de esteroides que provienen de la síntesis endógena.
4. La reducción de los niveles de SQS aumenta la sensibilidad a inhibidores específicos de la biosíntesis de isoprenoides en las formas sanguíneas de *Trypanosoma brucei*. Datos obtenidos en experimentos de *knock-out*, sugieren que esta forma de vida requiere un flujo mínimo de carbono destinado a la formación de esteroides para la supervivencia.
5. La disminución de los niveles de la escualeno epoxidasa (*TbSQE*) produce un potente fenotipo de pérdida de viabilidad en las formas procíclicas, y de forma menos acusada inhibe el crecimiento de las formas sanguíneas. Esta inhibición de la proliferación puede ser debida a la acumulación de escualeno o a la disminución de productos de la ruta esenciales para la funcionalidad celular.

6. El *knock-down* de la esteroil metiltransferasa (*TbSMT*) no produce alteraciones en la proliferación celular ni genera sensibilidad a inhibidores de la biosíntesis de esteroides, sugiriendo que la reacción de alquilación en posición 24 no es esencial para *Trypanosoma brucei*.

7. La disminución en los niveles de la *TbSQS*, la *TbSQE* y la *TbSMT* en las formas procíclicas induce, con carácter general, la formación de acumulaciones lipídicas de elevado tamaño, seguramente resultado de perturbaciones en la homeostasis intracelular de lípidos. Otras modificaciones incluyen alteraciones en la estructura de la mitocondria y del bolsillo flagelar, y la aparición de autofagosomas. En las formas sanguíneas, la depleción de estas enzimas genera cambios morfológicos severos y alteraciones en la citocinesis.

Bibliografía

- Akins, R.A., 2005. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol* 43, 285-318.
- Alexander, D.L., Schwartz, K.J., Balber, A.E., Bangs, J.D., 2002. Developmentally regulated trafficking of the lysosomal membrane protein p67 in *Trypanosoma brucei*. *Journal of cell science* 115, 3253-3263.
- Alvar, J., Yactayo, S., Bern, C., 2006. Leishmaniasis and poverty. *Trends in parasitology* 22, 552-557.
- Andela, V.B., Pirri, M., Schwarz, E.M., Puzas, E.J., O'Keefe, R.J., Rosenblatt, J.D., Rosier, R.N., 2003. The mevalonate synthesis pathway as a therapeutic target in cancer. *Clinical orthopaedics and related research*, S59-66.
- Ansele, J.H., Anbazhagan, M., Brun, R., Easterbrook, J.D., Hall, J.E., Boykin, D.W., 2004. O-alkoxyamidine prodrugs of furamidine: in vitro transport and microsomal metabolism as indicators of in vivo efficacy in a mouse model of *Trypanosoma brucei rhodesiense* infection. *Journal of medicinal chemistry* 47, 4335-4338.
- Apt, W., Aguilera, X., Arribada, A., Perez, C., Miranda, C., Sanchez, G., Zulantay, I., Cortes, P., Rodriguez, J., Juri, D., 1998. Treatment of chronic Chagas' disease with itraconazole and allopurinol. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 59, 133-138.
- Araujo, M.S., Martins-Filho, O.A., Pereira, M.E., Brener, Z., 2000. A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 45, 819-824.
- Armijos, R.X., Weigel, M.M., Calvopina, M., Mancheno, M., Rodriguez, R., 2004. Comparison of the effectiveness of two topical paromomycin treatments versus meglumine antimoniate for New World cutaneous leishmaniasis. *Acta tropica* 91, 153-160.
- Bach, T.J., Boronat, A., Campos, N., Ferrer, A., Vollack, K.U., 1999. Mevalonate biosynthesis in plants. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 34, 107-122.
- Baerends, R.J., Faber, K.N., Kiel, J.A., van der Klei, I.J., Harder, W., Veenhuis, M., 2000. Sorting and function of peroxisomal membrane proteins. *FEMS microbiology reviews* 24, 291-301.
- Bakker, B.M., Mensonides, F.I., Teusink, B., van Hoek, P., Michels, P.A., Westerhoff, H.V., 2000. Compartmentation protects trypanosomes from the dangerous design of glycolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 2087-2092.
- Barquilla, A., Crespo, J.L., Navarro, M., 2008. Rapamycin inhibits trypanosome cell growth by preventing TOR complex 2 formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 14579-14584.
- Barrett, M.P., Burchmore, R.J., Stich, A., Lazzari, J.O., Frasch, A.C., Cazzulo, J.J., Krishna, S., 2003. The trypanosomiases. *Lancet* 362, 1469-1480.
- Bates, E.J., Knuepfer, E., Smith, D.F., 2000. Poly(A)-binding protein I of *Leishmania*: functional analysis and localisation in trypanosomatid parasites. *Nucleic acids research* 28, 1211-1220.
- Beach, D.H., Goad, L.J., Holz, G.G., Jr., 1986. Effects of ketoconazole on sterol biosynthesis by *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochemical and biophysical research communications* 136, 851-856.

- Berman, J.D., Gallalee, J.V., Best, J.M., Hill, T., 1987. Uptake, distribution, and oxidation of fatty acids by *Leishmania mexicana* amastigotes. *The Journal of parasitology* 73, 555-560.
- Bern, C., Adler-Moore, J., Berenguer, J., Boelaert, M., den Boer, M., Davidson, R.N., Figueras, C., Gradoni, L., Kafetzis, D.A., Ritmeijer, K., Rosenthal, E., Royce, C., Russo, R., Sundar, S., Alvar, J., 2006. Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 43, 917-924.
- Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D.C., Lennard, N.J., Caler, E., Hamlin, N.E., Haas, B., Bohme, U., Hannick, L., Aslett, M.A., Shallom, J., Marcello, L., Hou, L., Wickstead, B., Alsmark, U.C., Arrowsmith, C., Atkin, R.J., Barron, A.J., Bringaud, F., Brooks, K., Carrington, M., Cherevach, I., Chillingworth, T.J., Churcher, C., Clark, L.N., Corton, C.H., Cronin, A., Davies, R.M., Doggett, J., Djikeng, A., Feldblyum, T., Field, M.C., Fraser, A., Goodhead, I., Hance, Z., Harper, D., Harris, B.R., Hauser, H., Hostetler, J., Ivens, A., Jagels, K., Johnson, D., Johnson, J., Jones, K., Kerhornou, A.X., Koo, H., Larke, N., Landfear, S., Larkin, C., Leech, V., Line, A., Lord, A., Macleod, A., Mooney, P.J., Moule, S., Martin, D.M., Morgan, G.W., Mungall, K., Norbertczak, H., Ormond, D., Pai, G., Peacock, C.S., Peterson, J., Quail, M.A., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M.A., Reitter, C., Salzberg, S.L., Sanders, M., Schobel, S., Sharp, S., Simmonds, M., Simpson, A.J., Tallon, L., Turner, C.M., Tait, A., Tivey, A.R., Van Aken, S., Walker, D., Wanless, D., Wang, S., White, B., White, O., Whitehead, S., Woodward, J., Wortman, J., Adams, M.D., Embley, T.M., Gull, K., Ullu, E., Barry, J.D., Fairlamb, A.H., Opperdoes, F., Barrell, B.G., Donelson, J.E., Hall, N., Fraser, C.M., Melville, S.E., El-Sayed, N.M., 2005. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science (New York, N.Y)* 309, 416-422.
- Bhattacharya, S.K., Sinha, P.K., Sundar, S., Thakur, C.P., Jha, T.K., Pandey, K., Das, V.R., Kumar, N., Lal, C., Verma, N., Singh, V.P., Ranjan, A., Verma, R.B., Anders, G., Sindermann, H., Ganguly, N.K., 2007. Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *The Journal of infectious diseases* 196, 591-598.
- Biardi, L., Sreedhar, A., Zokaei, A., Vartak, N.B., Bozeat, R.L., Shackelford, J.E., Keller, G.A., Krisans, S.K., 1994. Mevalonate kinase is predominantly localized in peroxisomes and is defective in patients with peroxisome deficiency disorders. *The Journal of biological chemistry* 269, 1197-1205.
- Biardi, L., Krisans, S.K., 1996. Compartmentalization of cholesterol biosynthesis. Conversion of mevalonate to farnesyl diphosphate occurs in the peroxisomes. *The Journal of biological chemistry* 271, 1784-1788.
- Blattner, J., Helfert, S., Michels, P., Clayton, C., 1998. Compartmentation of phosphoglycerate kinase in *Trypanosoma brucei* plays a critical role in parasite energy metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 11596-11600.
- Bouvier-Nave, P., Husselstein, T., Benveniste, P., 1998. Two families of sterol methyltransferases are involved in the first and the second methylation steps of plant sterol biosynthesis. *European journal of biochemistry / FEBS* 256, 88-96.
- Braga, M.V., Urbina, J.A., de Souza, W., 2004. Effects of squalene synthase inhibitors on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *International journal of antimicrobial agents* 24, 72-78.

- Bringaud, F., Riviere, L., Coustou, V., 2006. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Molecular and biochemical parasitology* 149, 1-9.
- Brown, M.S., Goldstein, J.L., Siperstein, M.D., 1973. Regulation of cholesterol synthesis in normal and malignant tissue. *Federation proceedings* 32, 2168-2173.
- Brun, R., Schumacher, R., Schmid, C., Kunz, C., Burri, C., 2001. The phenomenon of treatment failures in Human African Trypanosomiasis. *Trop Med Int Health* 6, 906-914.
- Brusselmans, K., Timmermans, L., Van de Sande, T., Van Veldhoven, P.P., Guan, G., Shechter, I., Claessens, F., Verhoeven, G., Swinnen, J.V., 2007. Squalene synthase, a determinant of Raft-associated cholesterol and modulator of cancer cell proliferation. *The Journal of biological chemistry* 282, 18777-18785.
- Buckner, F., Yokoyama, K., Lockman, J., Aikenhead, K., Ohkanda, J., Sadilek, M., Sebti, S., Van Voorhis, W., Hamilton, A., Gelb, M.H., 2003. A class of sterol 14-demethylase inhibitors as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 15149-15153.
- Buckner, F.S., Nguyen, L.N., Joubert, B.M., Matsuda, S.P., 2000. Cloning and heterologous expression of the *Trypanosoma brucei* lanosterol synthase gene. *Molecular and biochemical parasitology* 110, 399-403.
- Cabrera, J.A., Bolds, J., Shields, P.E., Havel, C.M., Watson, J.A., 1986. Isoprenoid synthesis in *Halobacterium halobium*. Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a concentration in response to mevalonate availability. *The Journal of biological chemistry* 261, 3578-3583.
- Clayton, C.E., 2002. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *The EMBO journal* 21, 1881-1888.
- Cohen, L.H., Griffioen, M., van Roermund, C.W., Wanders, R.J., 1992. Subcellular localization of squalene synthase in human hepatoma cell line Hep G2. *Biochimica et biophysica acta* 1126, 114-118.
- Concepcion, J.L., Gonzalez-Pacanowska, D., Urbina, J.A., 1998. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: subcellular localization and kinetic properties. *Archives of biochemistry and biophysics* 352, 114-120.
- Coppens, I., Opperdoes, F.R., Courtoy, P.J., Baudhuin, P., 1987. Receptor-mediated endocytosis in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *The Journal of protozoology* 34, 465-473.
- Coppens, I., Baudhuin, P., Opperdoes, F.R., Courtoy, P.J., 1988. Receptors for the host low density lipoproteins on the hemoflagellate *Trypanosoma brucei*: purification and involvement in the growth of the parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 6753-6757.
- Coppens, I., Bastin, P., Levade, T., Courtoy, P.J., 1995a. Activity, pharmacological inhibition and biological regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology* 69, 29-40.
- Coppens, I., Courtoy, P.J., 1995. Exogenous and endogenous sources of sterols in the culture-adapted procyclic trypomastigotes of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology* 73, 179-188.

- Coppens, I., Levade, T., Courtoy, P.J., 1995b. Host plasma low density lipoprotein particles as an essential source of lipids for the bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *The Journal of biological chemistry* 270, 5736-5741.
- Coppens, I., Courtoy, P.J., 2000. The adaptative mechanisms of *Trypanosoma brucei* for sterol homeostasis in its different life-cycle environments. *Annual review of microbiology* 54, 129-156.
- Corvera, S., D'Arrigo, A., Stenmark, H., 1999. Phosphoinositides in membrane traffic. *Current opinion in cell biology* 11, 460-465.
- Croft, S.L., Barrett, M.P., Urbina, J.A., 2005. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends in parasitology* 21, 508-512.
- Cunillera, N., Arro, M., Delourme, D., Karst, F., Boronat, A., Ferrer, A., 1996. *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed farnesyl-diphosphate synthase genes. *The Journal of biological chemistry* 271, 7774-7780.
- Chappell, J., Wolf, F., Proulx, J., Cuellar, R., Saunders, C., 1995. Is the Reaction Catalyzed by 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase a Rate-Limiting Step for Isoprenoid Biosynthesis in Plants? *Plant physiology* 109, 1337-1343.
- Chappuis, F., Udayraj, N., Stietenroth, K., Meussen, A., Bovier, P.A., 2005. Eflornithine is safer than melarsoprol for the treatment of second-stage *Trypanosoma brucei gambiense* human African trypanosomiasis. *Clin Infect Dis* 41, 748-751.
- Chen, C.K., Doyle, P.S., Yermalitskaya, L.V., Mackey, Z.B., Ang, K.K., McKerrow, J.H., Podust, L.M., 2009. *Trypanosoma cruzi* CYP51 Inhibitor Derived from a *Mycobacterium tuberculosis* Screen Hit. *PLoS neglected tropical diseases* 3, e372.
- Cheng, J., Ohsaki, Y., Tauchi-Sato, K., Fujita, A., Fujimoto, T., 2006. Cholesterol depletion induces autophagy. *Biochemical and biophysical research communications* 351, 246-252.
- Das, B., Yeager, H., Baruchel, H., Freedman, M.H., Koren, G., Baruchel, S., 2003. In vitro cytoprotective activity of squalene on a bone marrow versus neuroblastoma model of cisplatin-induced toxicity. implications in cancer chemotherapy. *Eur J Cancer* 39, 2556-2565.
- Demierre, M.F., Higgins, P.D., Gruber, S.B., Hawk, E., Lippman, S.M., 2005. Statins and cancer prevention. *Nat Rev Cancer* 5, 930-942.
- Denoyelle, C., Albanese, P., Uzan, G., Hong, L., Vannier, J.P., Soria, J., Soria, C., 2003. Molecular mechanism of the anti-cancer activity of cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, on aggressive human breast cancer cells. *Cellular signalling* 15, 327-338.
- Descoteaux, A., Turco, S.J., 1999. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochimica et biophysica acta* 1455, 341-352.
- Desjeux, P., Alvar, J., 2003. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Annals of tropical medicine and parasitology* 97 Suppl 1, 3-15.
- Desjeux, P., 2004. Leishmaniasis. *Nat Rev Microbiol* 2, 692.
- 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., Andersson, B., 2005a. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science (New York, N.Y.)* 309, 409-415.
- El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Blandin, G., Berriman, M., Crabtree, J., Aggarwal, G., Caler, E., Renaud, H., Worthey, E.A., Hertz-Fowler, C., Ghedin, E., Peacock, C., Bartholomeu, D.C., Haas, B.J., Tran, A.N., Wortman, J.R., Alsmark, U.C., Angiuoli, S., Anupama, A., Badger, J., Bringaud, F., Cadag, E., Carlton, J.M., Cerqueira, G.C., Creasy, T., Delcher, A.L., Djikeng, A., Embley, T.M., Hauser, C., Ivens, A.C., Kummerfeld, S.K., Pereira-Leal, J.B., Nilsson, D., Peterson, J., Salzberg, S.L., Shallom, J., Silva, J.C., Sundaram, J., Westenberger, S., White, O., Melville, S.E., Donelson, J.E., Andersson, B., Stuart, K.D., Hall, N., 2005b. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science (New York, N.Y.)* 309, 404-409.
- El Sawalhy, A., Seed, J.R., 1998. Diagnosis of trypanosomiasis in experimental mice and field-infected camels by detection of antibody to trypanosome tyrosine aminotransferase. *The Journal of parasitology* 84, 1245-1249.
- Elmberger, P.G., Engfeldt, P., Dallner, G., 1988. Presence of dolichol and its derivatives in human blood. *Journal of lipid research* 29, 1651-1662.
- Engstler, M., Thilo, L., Weise, F., Grunfelder, C.G., Schwarz, H., Boshart, M., Overath, P., 2004. Kinetics of endocytosis and recycling of the GPI-anchored variant surface glycoprotein in *Trypanosoma brucei*. *Journal of cell science* 117, 1105-1115.
- Fairlamb, A.H., 2003. Chemotherapy of human African trypanosomiasis: current and future prospects. *Trends in parasitology* 19, 488-494.
- Faust, P.L., Hatten, M.E., 1997. Targeted deletion of the PEX2 peroxisome assembly gene in mice provides a model for Zellweger syndrome, a human neuronal migration disorder. *The Journal of cell biology* 139, 1293-1305.
- Ferella, M., Li, Z.H., Andersson, B., Docampo, R., 2008. Farnesyl diphosphate synthase localizes to the cytoplasm of *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei*. *Experimental parasitology* 119, 308-312.
- Fernandes Rodrigues, J.C., Concepcion, J.L., Rodrigues, C., Caldera, A., Urbina, J.A., de Souza, W., 2008. In vitro activities of ER-119884 and E5700, two potent squalene synthase inhibitors, against *Leishmania amazonensis*: antiproliferative, biochemical, and ultrastructural effects. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52, 4098-4114.
- Fevre, E.M., Picozzi, K., Jannin, J., Welburn, S.C., Maudlin, I., 2006. Human African trypanosomiasis: Epidemiology and control. *Advances in parasitology* 61, 167-221.

- Field, H., Farjah, M., Pal, A., Gull, K., Field, M.C., 1998. Complexity of trypanosomatid endocytosis pathways revealed by Rab4 and Rab5 isoforms in *Trypanosoma brucei*. *The Journal of biological chemistry* 273, 32102-32110.
- Friant, S., Zanolari, B., Riezman, H., 2000. Increased protein kinase or decreased PP2A activity bypasses sphingoid base requirement in endocytosis. *The EMBO journal* 19, 2834-2844.
- Furuya, T., Kessler, P., Jardim, A., Schnauffer, A., Crudder, C., Parsons, M., 2002. Glucose is toxic to glycosome-deficient trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 14177-14182.
- Gaber, R.F., Copple, D.M., Kennedy, B.K., Vidal, M., Bard, M., 1989. The yeast gene ERG6 is required for normal membrane function but is not essential for biosynthesis of the cell-cycle-sparking sterol. *Molecular and cellular biology* 9, 3447-3456.
- Garcia, A., Courtin, D., Solano, P., Koffi, M., Jamonneau, V., 2006. Human African trypanosomiasis: connecting parasite and host genetics. *Trends in parasitology* 22, 405-409.
- Garzoni, L.R., Caldera, A., Meirelles Mde, N., de Castro, S.L., Docampo, R., Meints, G.A., Oldfield, E., Urbina, J.A., 2004a. Selective in vitro effects of the farnesyl pyrophosphate synthase inhibitor risedronate on *Trypanosoma cruzi*. *International journal of antimicrobial agents* 23, 273-285.
- Garzoni, L.R., Waghabi, M.C., Baptista, M.M., de Castro, S.L., Meirelles Mde, N., Britto, C.C., Docampo, R., Oldfield, E., Urbina, J.A., 2004b. Antiparasitic activity of risedronate in a murine model of acute Chagas' disease. *International journal of antimicrobial agents* 23, 286-290.
- Gazit, V., Ben-Abraham, R., Pick, C.G., Katz, Y., 2003. beta-Phenylpyruvate induces long-term neurobehavioral damage and brain necrosis in neonatal mice. *Behavioural brain research* 143, 1-5.
- Gebre-Hiwot, A., Frommel, D., 1993. The in-vitro anti-leishmanial activity of inhibitors of ergosterol biosynthesis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 32, 837-842.
- Gelb, M.H., Scholten, J.D., Sebolt-Leopold, J.S., 1998. Protein prenylation: from discovery to prospects for cancer treatment. *Current opinion in chemical biology* 2, 40-48.
- Gilinger, G., Bellofatto, V., 2001. Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. *Nucleic acids research* 29, 1556-1564.
- Gillett, M.P., Owen, J.S., 1992. Characteristics of the binding of human and bovine high-density lipoproteins by bloodstream forms of the African trypanosome, *Trypanosoma brucei brucei*. *Biochimica et biophysica acta* 1123, 239-248.
- Ginger, M.L., Chance, M.L., Goad, L.J., 1999. Elucidation of carbon sources used for the biosynthesis of fatty acids and sterols in the trypanosomatid *Leishmania mexicana*. *The Biochemical journal* 342 (Pt 2), 397-405.
- Ginger, M.L., Prescott, M.C., Reynolds, D.G., Chance, M.L., Goad, L.J., 2000. Utilization of leucine and acetate as carbon sources for sterol and fatty acid biosynthesis by Old and New World *Leishmania* species, *Endotrypanum monterogeii* and *Trypanosoma cruzi*. *European journal of biochemistry / FEBS* 267, 2555-2566.

- Ginger, M.L., Chance, M.L., Sadler, I.H., Goad, L.J., 2001. The biosynthetic incorporation of the intact leucine skeleton into sterol by the trypanosomatid *Leishmania mexicana*. *The Journal of biological chemistry* 276, 11674-11682.
- Goad, L.J., Holz, G.G., Jr., Beach, D.H., 1984. Sterols of *Leishmania* species. Implications for biosynthesis. *Molecular and biochemical parasitology* 10, 161-170.
- Goldstein, J.L., Brown, M.S., 2001. Molecular medicine. The cholesterol quartet. *Science (New York, N.Y)* 292, 1310-1312.
- Gotteland, J.P., Loubat, C., Planty, B., Junquero, D., Delhon, A., Halazy, S., 1998. Sulfonamide derivatives of benzylamine block cholesterol biosynthesis in HepG2 cells: a new type of potent squalene epoxidase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 8, 1337-1342.
- Green, H.P., Del Pilar Molina Portela, M., St Jean, E.N., Lugli, E.B., Raper, J., 2003. Evidence for a *Trypanosoma brucei* lipoprotein scavenger receptor. *The Journal of biological chemistry* 278, 422-427.
- Grimmer, S., van Deurs, B., Sandvig, K., 2002. Membrane ruffling and macropinocytosis in A431 cells require cholesterol. *Journal of cell science* 115, 2953-2962.
- Gros, L., Castillo-Acosta, V.M., Jimenez Jimenez, C., Sealey-Cardona, M., Vargas, S., Manuel Estevez, A., Yardley, V., Rattray, L., Croft, S.L., Ruiz-Perez, L.M., Urbina, J.A., Gilbert, I.H., Gonzalez-Pacanowska, D., 2006. New azasterols against *Trypanosoma brucei*: role of 24-sterol methyltransferase in inhibitor action. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50, 2595-2601.
- Grunfelder, C.G., Engstler, M., Weise, F., Schwarz, H., Stierhof, Y.D., Boshart, M., Overath, P., 2002. Accumulation of a GPI-anchored protein at the cell surface requires sorting at multiple intracellular levels. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 3, 547-559.
- Grunfelder, C.G., Engstler, M., Weise, F., Schwarz, H., Stierhof, Y.D., Morgan, G.W., Field, M.C., Overath, P., 2003. Endocytosis of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein via clathrin-coated vesicles, sorting by default in endosomes, and exocytosis via RAB11-positive carriers. *Molecular biology of the cell* 14, 2029-2040.
- Guerra-Giraldez, C., Quijada, L., Clayton, C.E., 2002. Compartmentation of enzymes in a microbody, the glycosome, is essential in *Trypanosoma brucei*. *Journal of cell science* 115, 2651-2658.
- Gupta, S.D., Mehan, R.S., Tansey, T.R., Chen, H.T., Goping, G., Goldberg, I., Shechter, I., 1999. Differential binding of proteins to peroxisomes in rat hepatoma cells: unique association of enzymes involved in isoprenoid metabolism. *Journal of lipid research* 40, 1572-1584.
- Gupta, A.K., Cooper, E.A., Lynde, C.W., 2003. The efficacy and safety of terbinafine in children. *Dermatologic clinics* 21, 511-520.
- Hager, M.H., Solomon, K.R., Freeman, M.R., 2006. The role of cholesterol in prostate cancer. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 9, 379-385.
- Hammarton, T.C., 2007. Cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology* 153, 1-8.
- Hancock, J.F., 2006. Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nature reviews* 7, 456-462.

- Hannaert, V., Bringaud, F., Opperdoes, F.R., Michels, P.A., 2003. Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid biology and disease* 2, 11.
- Hata, S., Inoue, T., Kosuga, K., Nakashima, T., Tsukamoto, T., Osumi, T., 1995. Identification of two splice isoforms of mRNA for mouse hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4). *Biochimica et biophysica acta* 1260, 55-61.
- Haughan, P.A., Chance, M.L., Goad, L.J., 1995. Effects of an azasterol inhibitor of sterol 24-transmethylation on sterol biosynthesis and growth of *Leishmania donovani* promastigotes. *The Biochemical journal* 308 (Pt 1), 31-38.
- Heese-Peck, A., Pichler, H., Zanolari, B., Watanabe, R., Daum, G., Riezman, H., 2002. Multiple functions of sterols in yeast endocytosis. *Molecular biology of the cell* 13, 2664-2680.
- Heise, N., Opperdoes, F.R., 2000. Localisation of a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in the mitochondrial matrix of *Trypanosoma brucei* procyclics. *Zeitschrift fur Naturforschung* 55, 473-477.
- Helfert, S., Estevez, A.M., Bakker, B., Michels, P., Clayton, C., 2001. Roles of triosephosphate isomerase and aerobic metabolism in *Trypanosoma brucei*. *The Biochemical journal* 357, 117-125.
- Hellemond, J.J., Bakker, B.M., Tielens, A.G., 2005. Energy metabolism and its compartmentation in *Trypanosoma brucei*. *Advances in microbial physiology* 50, 199-226.
- Herwaldt, B.L., 1999. Leishmaniasis. *Lancet* 354, 1191-1199.
- Hidaka, Y., Satoh, T., Kamei, T., 1990. Regulation of squalene epoxidase in HepG2 cells. *J Lipid Res* 31, 2087-2094.
- Hillner, B.E., 2000. The role of bisphosphonates in metastatic breast cancer. *Seminars in radiation oncology* 10, 250-253.
- Hogenboom, S., Tuyp, J.J., Espeel, M., Koster, J., Wanders, R.J., Waterham, H.R., 2004a. Phosphomevalonate kinase is a cytosolic protein in humans. *Journal of lipid research* 45, 697-705.
- Hogenboom, S., Tuyp, J.J., Espeel, M., Koster, J., Wanders, R.J., Waterham, H.R., 2004b. Mevalonate kinase is a cytosolic enzyme in humans. *Journal of cell science* 117, 631-639.
- Hongay, C., Jia, N., Bard, M., Winston, F., 2002. Mot3 is a transcriptional repressor of ergosterol biosynthetic genes and is required for normal vacuolar function in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* 21, 4114-4124.
- Horiuchi, T., Aigaki, T., 2006. Alternative trans-splicing: a novel mode of pre-mRNA processing. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 98, 135-140.
- Hucke, O., Gelb, M.H., Verlinde, C.L., Buckner, F.S., 2005. The protein farnesyltransferase inhibitor Tipifarnib as a new lead for the development of drugs against Chagas disease. *Journal of medicinal chemistry* 48, 5415-5418.
- Huguency, P., Bouvier, F., Badillo, A., Quennemet, J., d'Harlingue, A., Camara, B., 1996. Developmental and stress regulation of gene expression for plastid and cytosolic isoprenoid pathways in pepper fruits. *Plant physiology* 111, 619-626.
- Ivens, A.C., Peacock, C.S., Worthey, E.A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M.A., Adlem, E., Aert, R., Anupama, A., Apostolou, Z., Attipoe, P., Bason, N., Bauser, C., Beck, A., Beverley, S.M., Bianchettin, G.,

- Borzym, K., Bothe, G., Bruschi, C.V., Collins, M., Cadag, E., Ciarloni, L., Clayton, C., Coulson, R.M., Cronin, A., Cruz, A.K., Davies, R.M., De Gaudenzi, J., Dobson, D.E., Dueterhoeft, A., Fazelina, G., Fosker, N., Frasch, A.C., Fraser, A., Fuchs, M., Gabel, C., Goble, A., Goffeau, A., Harris, D., Hertz-Fowler, C., Hilbert, H., Horn, D., Huang, Y., Klages, S., Knights, A., Kube, M., Larke, N., Litvin, L., Lord, A., Louie, T., Marra, M., Masuy, D., Matthews, K., Michaeli, S., Mottram, J.C., Muller-Auer, S., Munden, H., Nelson, S., Norbertczak, H., Oliver, K., O'Neil, S., Pentony, M., Pohl, T.M., Price, C., Purnelle, B., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Reinhardt, R., Rieger, M., Rinta, J., Robben, J., Robertson, L., Ruiz, J.C., Rutter, S., Saunders, D., Schafer, M., Schein, J., Schwartz, D.C., Seeger, K., Seyler, A., Sharp, S., Shin, H., Sivam, D., Squares, R., Squares, S., Tosato, V., Vogt, C., Volckaert, G., Wambutt, R., Warren, T., Wedler, H., Woodward, J., Zhou, S., Zimmermann, W., Smith, D.F., Blackwell, J.M., Stuart, K.D., Barrell, B., Myler, P.J., 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science (New York, N.Y)* 309, 436-442.
- Iyer, V.R., Eisen, M.B., Ross, D.T., Schuler, G., Moore, T., Lee, J.C., Trent, J.M., Staudt, L.M., Hudson, J., Jr., Boguski, M.S., Lashkari, D., Shalon, D., Botstein, D., Brown, P.O., 1999. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science (New York, N.Y)* 283, 83-87.
- Jain, S., Sehgal, V.N., 2000. Onychomycosis: treatment perspective. *International journal of dermatology* 39, 10-14.
- Jeffries, T.R., Morgan, G.W., Field, M.C., 2001. A developmentally regulated rab11 homologue in *Trypanosoma brucei* is involved in recycling processes. *Journal of cell science* 114, 2617-2626.
- Jimenez-Jimenez, C., Carrero-Lerida, J., Sealey-Cardona, M., Ruiz Perez, L.M., Urbina, J.A., Gonzalez Pacanowska, D., 2008. Delta(24 (25))-sterol methenyltransferase: Intracellular localization and azasterol sensitivity in *Leishmania major* promastigotes overexpressing the enzyme. *Molecular and biochemical parasitology* 160, 52-59.
- Joubert, B.M., Nguyen, L.N., Matsuda, S.P., Buckner, F.S., 2001. Cloning and functional characterization of a *Trypanosoma brucei* lanosterol 14alpha-demethylase gene. *Molecular and biochemical parasitology* 117, 115-117.
- Keller, G.A., Barton, M.C., Shapiro, D.J., Singer, S.J., 1985. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase is present in peroxisomes in normal rat liver cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 770-774.
- Khanzada, U.K., Pardo, O.E., Meier, C., Downward, J., Seckl, M.J., Arcaro, A., 2006. Potent inhibition of small-cell lung cancer cell growth by simvastatin reveals selective functions of Ras isoforms in growth factor signalling. *Oncogene* 25, 877-887.
- Kirchhausen, T., 2000. Clathrin. *Annual review of biochemistry* 69, 699-727.
- Konkle, M.E., Hargrove, T.Y., Kleshchenko, Y.Y., von Kries, J.P., Ridenour, W., Uddin, M.J., Caprioli, R.M., Marnett, L.J., Nes, W.D., Villalta, F., Waterman, M.R., Lepesheva, G.I., 2009. Indomethacin amides as a novel molecular scaffold for targeting *Trypanosoma cruzi* sterol 14alpha-demethylase. *Journal of medicinal chemistry* 52, 2846-2853.
- Korn, E.D., Von Brand, T., Tobie, E.J., 1969. The sterols of *Trypanosoma cruzi* and *Crithidia fasciculata*. *Comparative biochemistry and physiology* 30, 601-610.

- Kovacs, W.J., Tape, K.N., Shackelford, J.E., Duan, X., Kasumov, T., Kelleher, J.K., Brunengraber, H., Krisans, S.K., 2007. Localization of the pre-squalene segment of the isoprenoid biosynthetic pathway in mammalian peroxisomes. *Histochemistry and cell biology* 127, 273-290.
- Kraus, J.M., Verlinde, C.L., Karimi, M., Lepesheva, G.I., Gelb, M.H., Buckner, F.S., 2009. Rational modification of a candidate cancer drug for use against Chagas disease. *Journal of medicinal chemistry* 52, 1639-1647.
- Krazy, H., Michels, P.A., 2006. Identification and characterization of three peroxins--PEX6, PEX10 and PEX12--involved in glycosome biogenesis in *Trypanosoma brucei*. *Biochimica et biophysica acta* 1763, 6-17.
- Kribii, R., Arro, M., Del Arco, A., Gonzalez, V., Balcells, L., Delourme, D., Ferrer, A., Karst, F., Boronat, A., 1997. Cloning and characterization of the *Arabidopsis thaliana* SQS1 gene encoding squalene synthase--involvement of the C-terminal region of the enzyme in the channeling of squalene through the sterol pathway. *European journal of biochemistry / FEBS* 249, 61-69.
- Krisans, S.K., Ericsson, J., Edwards, P.A., Keller, G.A., 1994. Farnesyl-diphosphate synthase is localized in peroxisomes. *The Journal of biological chemistry* 269, 14165-14169.
- Kwik, J., Boyle, S., Fooksman, D., Margolis, L., Sheetz, M.P., Edidin, M., 2003. Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent organization of cell actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 13964-13969.
- Laden, B.P., Tang, Y., Porter, T.D., 2000. Cloning, heterologous expression, and enzymological characterization of human squalene monooxygenase. *Archives of biochemistry and biophysics* 374, 381-388.
- Landfear, S.M., 2003. Trypanosomatid transcription factors: waiting for Godot. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 7-9.
- Landfear, S.M., Ullman, B., Carter, N.S., Sanchez, M.A., 2004. Nucleoside and nucleobase transporters in parasitic protozoa. *Eukaryotic cell* 3, 245-254.
- Lazardi, K., Urbina, J.A., de Souza, W., 1990. Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 34, 2097-2105.
- Leber, R., Landl, K., Zinser, E., Ahorn, H., Spok, A., Kohlwein, S.D., Turnowsky, F., Daum, G., 1998. Dual localization of squalene epoxidase, Erg1p, in yeast reflects a relationship between the endoplasmic reticulum and lipid particles. *Molecular biology of the cell* 9, 375-386.
- Leber, R., Fuchsbichler, S., Klobucnikova, V., Schweighofer, N., Pitters, E., Wohlfarter, K., Lederer, M., Landl, K., Ruckstuhl, C., Hapala, I., Turnowsky, F., 2003. Molecular mechanism of terbinafine resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47, 3890-3900.
- Lepesheva, G.I., Ott, R.D., Hargrove, T.Y., Kleshchenko, Y.Y., Schuster, I., Nes, W.D., Hill, G.C., Villalta, F., Waterman, M.R., 2007. Sterol 14 α -demethylase as a potential target for antitrypanosomal therapy: enzyme inhibition and parasite cell growth. *Chemistry & biology* 14, 1283-1293.

- Lepesheva, G.I., Hargrove, T.Y., Kleshchenko, Y., Nes, W.D., Villalta, F., Waterman, M.R., 2008. CYP51: A major drug target in the cytochrome P450 superfamily. *Lipids* 43, 1117-1125.
- Li, Y.C., Park, M.J., Ye, S.K., Kim, C.W., Kim, Y.N., 2006. Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by cholesterol-depleting agents. *The American journal of pathology* 168, 1107-1118; quiz 1404-1105.
- Liendo, A., Visbal, G., Piras, M.M., Piras, R., Urbina, J.A., 1999. Sterol composition and biosynthesis in *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Molecular and biochemical parasitology* 104, 81-91.
- Lorente, S.O., Rodrigues, J.C., Jimenez Jimenez, C., Joyce-Menekse, M., Rodrigues, C., Croft, S.L., Yardley, V., de Luca-Fradley, K., Ruiz-Perez, L.M., Urbina, J., de Souza, W., Gonzalez Pacanowska, D., Gilbert, I.H., 2004. Novel azasterols as potential agents for treatment of leishmaniasis and trypanosomiasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48, 2937-2950.
- Lorenz, P., Owen, J.S., Hassall, D.G., 1995. Human serum resistant *Trypanosoma brucei* rhodesiense accumulates similar amounts of fluorescently-labelled trypanolytic human HDL3 particles as human serum sensitive T.b. brucei. *Molecular and biochemical parasitology* 74, 113-118.
- Low, P., Dallner, G., Mayor, S., Cohen, S., Chait, B.T., Menon, A.K., 1991. The mevalonate pathway in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. Identification of dolichols containing 11 and 12 isoprene residues. *The Journal of biological chemistry* 266, 19250-19257.
- Magaraci, F., Jimenez, C.J., Rodrigues, C., Rodrigues, J.C., Braga, M.V., Yardley, V., de Luca-Fradley, K., Croft, S.L., de Souza, W., Ruiz-Perez, L.M., Urbina, J., Gonzalez Pacanowska, D., Gilbert, I.H., 2003. Azasterols as inhibitors of sterol 24-methyltransferase in *Leishmania* species and *Trypanosoma cruzi*. *Journal of medicinal chemistry* 46, 4714-4727.
- Marcelli, M., Cunningham, G.R., Haidacher, S.J., Padayatty, S.J., Sturgis, L., Kagan, C., Denner, L., 1998. Caspase-7 is activated during lovastatin-induced apoptosis of the prostate cancer cell line LNCaP. *Cancer research* 58, 76-83.
- Martin, M.B., Arnold, W., Heath, H.T., 3rd, Urbina, J.A., Oldfield, E., 1999. Nitrogen-containing bisphosphonates as carbocation transition state analogs for isoprenoid biosynthesis. *Biochemical and biophysical research communications* 263, 754-758.
- Matthews, K.R., Tschudi, C., Ullu, E., 1994. A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes & development* 8, 491-501.
- Men, S., Boutte, Y., Ikeda, Y., Li, X., Palme, K., Stierhof, Y.D., Hartmann, M.A., Moritz, T., Grebe, M., 2008. Sterol-dependent endocytosis mediates post-cytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity. *Nature cell biology* 10, 237-244.
- Menys, V.C., Durrington, P.N., 2003. Squalene synthase inhibitors. *British journal of pharmacology* 139, 881-882.
- Michels, P.A., Hannaert, V., Bringaud, F., 2000. Metabolic aspects of glycosomes in trypanosomatidae - new data and views. *Parasitology today (Personal ed)* 16, 482-489.

- Michels, P.A., Bringaud, F., Herman, M., Hannaert, V., 2006. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochimica et biophysica acta* 1763, 1463-1477.
- Molina, J., Martins-Filho, O., Brener, Z., Romanha, A.J., Loebenberg, D., Urbina, J.A., 2000. Activities of the triazole derivative SCH 56592 (posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 44, 150-155.
- Montalvetti, A., Bailey, B.N., Martin, M.B., Severin, G.W., Oldfield, E., Docampo, R., 2001. Bisphosphonates are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farnesyl pyrophosphate synthase. *The Journal of biological chemistry* 276, 33930-33937.
- Montalvetti, A., Fernandez, A., Sanders, J.M., Ghosh, S., Van Brussel, E., Oldfield, E., Docampo, R., 2003. Farnesyl pyrophosphate synthase is an essential enzyme in *Trypanosoma brucei*. In vitro RNA interference and in vivo inhibition studies. *The Journal of biological chemistry* 278, 17075-17083.
- Morgan, G.W., Allen, C.L., Jeffries, T.R., Hollinshead, M., Field, M.C., 2001. Developmental and morphological regulation of clathrin-mediated endocytosis in *Trypanosoma brucei*. *Journal of cell science* 114, 2605-2615.
- Motyka, S.A., Englund, P.T., 2004. RNA interference for analysis of gene function in trypanosomatids. *Current opinion in microbiology* 7, 362-368.
- Moyersoens, J., Choe, J., Kumar, A., Voncken, F.G., Hol, W.G., Michels, P.A., 2003. Characterization of *Trypanosoma brucei* PEX14 and its role in the import of glycosomal matrix proteins. *European journal of biochemistry / FEBS* 270, 2059-2067.
- Moyersoens, J., Choe, J., Fan, E., Hol, W.G., Michels, P.A., 2004. Biogenesis of peroxisomes and glycosomes: trypanosomatid glycosome assembly is a promising new drug target. *FEMS microbiology reviews* 28, 603-643.
- Muck, A.O., Seeger, H., Wallwiener, D., 2004. Inhibitory effect of statins on the proliferation of human breast cancer cells. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics* 42, 695-700.
- Munn, A.L., Heese-Peck, A., Stevenson, B.J., Pichler, H., Riezman, H., 1999. Specific sterols required for the internalization step of endocytosis in yeast. *Molecular biology of the cell* 10, 3943-3957.
- Nakamura, Y., Sakakibara, J., Izumi, T., Shibata, A., Ono, T., 1996. Transcriptional regulation of squalene epoxidase by sterols and inhibitors in HeLa cells. *The Journal of biological chemistry* 271, 8053-8056.
- Natesan, S.K., Peacock, L., Matthews, K., Gibson, W., Field, M.C., 2007. Activation of endocytosis as an adaptation to the mammalian host by trypanosomes. *Eukaryotic cell* 6, 2029-2037.
- Nes, W.D., 2000. Sterol methyl transferase: enzymology and inhibition. *Biochimica et biophysica acta* 1529, 63-88.
- Nes, W.D., 2003. Enzyme mechanisms for sterol C-methylations. *Phytochemistry* 64, 75-95.
- Ngo, H., Tschudi, C., Gull, K., Ullu, E., 1998. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 14687-14692.

- Nilsen, T.W., 1995. trans-splicing: an update. *Molecular and biochemical parasitology* 73, 1-6.
- Nishikura, K., 2006. Editor meets silencer: crosstalk between RNA editing and RNA interference. *Nature reviews* 7, 919-931.
- Olivier, L.M., Chambliss, K.L., Gibson, K.M., Krisans, S.K., 1999. Characterization of phosphomevalonate kinase: chromosomal localization, regulation, and subcellular targeting. *Journal of lipid research* 40, 672-679.
- Olliaro, P.L., Guerin, P.J., Gerstl, S., Haaskjold, A.A., Rottingen, J.A., Sundar, S., 2005. Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980-2004. *The Lancet infectious diseases* 5, 763-774.
- Ono, T., Bloch, K., 1975. Solubilization and partial characterization of rat liver squalene epoxidase. *The Journal of biological chemistry* 250, 1571-1579.
- Opperdoes, F.R., Borst, P., 1977. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS letters* 80, 360-364.
- Orenes Lorente, S., Gomez, R., Jimenez, C., Cammerer, S., Yardley, V., de Luca-Fradley, K., Croft, S.L., Ruiz Perez, L.M., Urbina, J., Gonzalez Pacanowska, D., Gilbert, I.H., 2005. Biphenylquinuclidines as inhibitors of squalene synthase and growth of parasitic protozoa. *Bioorganic & medicinal chemistry* 13, 3519-3529.
- Ortiz-Gomez, A., Jimenez, C., Estevez, A.M., Carrero-Lerida, J., Ruiz-Perez, L.M., Gonzalez-Pacanowska, D., 2006. Farnesyl diphosphate synthase is a cytosolic enzyme in *Leishmania major* promastigotes and its overexpression confers resistance to risedronate. *Eukaryotic cell* 5, 1057-1064.
- Overath, P., Engstler, M., 2004. Endocytosis, membrane recycling and sorting of GPI-anchored proteins: *Trypanosoma brucei* as a model system. *Molecular microbiology* 53, 735-744.
- Pal, A., Hall, B.S., Nesbeth, D.N., Field, H.I., Field, M.C., 2002. Differential endocytic functions of *Trypanosoma brucei* Rab5 isoforms reveal a glycosylphosphatidylinositol-specific endosomal pathway. *The Journal of biological chemistry* 277, 9529-9539.
- Pasrija, R., Krishnamurthy, S., Prasad, T., Ernst, J.F., Prasad, R., 2005. Squalene epoxidase encoded by ERG1 affects morphogenesis and drug susceptibilities of *Candida albicans*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 55, 905-913.
- Paton, V.G., Shackelford, J.E., Krisans, S.K., 1997. Cloning and subcellular localization of hamster and rat isopentenyl diphosphate dimethylallyl diphosphate isomerase. A PTS1 motif targets the enzyme to peroxisomes. *The Journal of biological chemistry* 272, 18945-18950.
- Pays, E., Vanhamme, L., Perez-Morga, D., 2004. Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: facts, challenges and mysteries. *Current opinion in microbiology* 7, 369-374.
- Pena-Diaz, J., Montalvetti, A., Flores, C.L., Constan, A., Hurtado-Guerrero, R., De Souza, W., Gancedo, C., Ruiz-Perez, L.M., Gonzalez-Pacanowska, D., 2004. Mitochondrial localization of the mevalonate pathway enzyme 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase in the *Trypanosomatidae*. *Molecular biology of the cell* 15, 1356-1363.

- Prado-Figueroa, M., Raper, J., Opperdoes, F.R., 1994. Possible localisation of dolichol-dependent mannosyltransferase of *Trypanosoma brucei* to the rough endoplasmic reticulum. *Molecular and biochemical parasitology* 63, 255-264.
- Roberts, C.W., McLeod, R., Rice, D.W., Ginger, M., Chance, M.L., Goad, L.J., 2003. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Molecular and biochemical parasitology* 126, 129-142.
- Rodan, G.A., Martin, T.J., 2000. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science (New York, N.Y)* 289, 1508-1514.
- Rodrigues, C.O., Catisti, R., Uyemura, S.A., Vercesi, A.E., Lira, R., Rodriguez, C., Urbina, J.A., Docampo, R., 2001. The sterol composition of *Trypanosoma cruzi* changes after growth in different culture media and results in different sensitivity to digitonin-permeabilization. *The Journal of eukaryotic microbiology* 48, 588-594.
- Rodrigues, J.C., Attias, M., Rodriguez, C., Urbina, J.A., Souza, W., 2002. Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22,26-azasterol, a delta(24(25))-sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46, 487-499.
- Rodrigues, J.C., Urbina, J.A., de Souza, W., 2005. Antiproliferative and ultrastructural effects of BPQ-OH, a specific inhibitor of squalene synthase, on *Leishmania amazonensis*. *Experimental parasitology* 111, 230-238.
- Rodriguez, N., Bailey, B.N., Martin, M.B., Oldfield, E., Urbina, J.A., Docampo, R., 2002. Radical cure of experimental cutaneous leishmaniasis by the bisphosphonate pamidronate. *The Journal of infectious diseases* 186, 138-140.
- Rodriguez, R.J., Low, C., Bottema, C.D., Parks, L.W., 1985. Multiple functions for sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta* 1837, 336-343.
- Royo, T., Pedragosa, M.J., Ayte, J., Gil-Gomez, G., Vilaro, S., Hegardt, F.G., 1993. Testis and ovary express the gene for the ketogenic mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase. *Journal of lipid research* 34, 867-874.
- Sakakibara, J., Watanabe, R., Kanai, Y., Ono, T., 1995. Molecular cloning and expression of rat squalene epoxidase. *J Biol Chem* 270, 17-20.
- Sanmiya, K., Ueno, O., Matsuoka, M., Yamamoto, N., 1999. Localization of farnesyl diphosphate synthase in chloroplasts. *Plant & cell physiology* 40, 348-354.
- Saxena, N., Lahiri, S.S., Hambarde, S., Tripathi, R.P., 2008. RAS: target for cancer therapy. *Cancer investigation* 26, 948-955.
- Schmidt, A., Wolde, M., Thiele, C., Fest, W., Kratzin, H., Podtelejnikov, A.V., Witke, W., Huttner, W.B., Soling, H.D., 1999. Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature* 401, 133-141.
- Sealey-Cardona, M., Cammerer, S., Jones, S., Ruiz-Perez, L.M., Brun, R., Gilbert, I.H., Urbina, J.A., Gonzalez-Pacanowska, D., 2007. Kinetic characterization of squalene synthase from *Trypanosoma cruzi*: selective inhibition by quinuclidine derivatives. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51, 2123-2129.
- Sebti, S.M., 2005. Protein farnesylation: implications for normal physiology, malignant transformation, and cancer therapy. *Cancer cell* 7, 297-300.

- Shapiro, S.Z., Webster, P., 1989. Coated vesicles from the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*: purification and characterization. *The Journal of protozoology* 36, 344-349.
- Shapiro, T.A., Englund, P.T., 1995. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annual review of microbiology* 49, 117-143.
- Sharma, S.C., 2006. Implications of sterol structure for membrane lipid composition, fluidity and phospholipid asymmetry in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research* 6, 1047-1051.
- Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M., Czaja, M.J., 2009. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 458, 1131-1135.
- Soltis, D.A., McMahon, G., Caplan, S.L., Dudas, D.A., Chamberlin, H.A., Vattay, A., Dottavio, D., Rucker, M.L., Engstrom, R.G., Cornell-Kennon, S.A., et al., 1995. Expression, purification, and characterization of the human squalene synthase: use of yeast and baculoviral systems. *Archives of biochemistry and biophysics* 316, 713-723.
- Song, Y., Lin, F.Y., Yin, F., Hensler, M., Rodrigues Poveda, C.A., Mukkamala, D., Cao, R., Wang, H., Morita, C.T., Gonzalez Pacanowska, D., Nizet, V., Oldfield, E., 2009. Phosphonosulfonates Are Potent, Selective Inhibitors of Dehydrocholesterol Synthase and Staphyloxanthin Biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. *Journal of medicinal chemistry*.
- Sorger, D., Athenstaedt, K., Hrastnik, C., Daum, G., 2004. A yeast strain lacking lipid particles bears a defect in ergosterol formation. *The Journal of biological chemistry* 279, 31190-31196.
- Soto, J., Berman, J., 2006. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis with miltefosine. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 100 Suppl 1, S34-40.
- Stamellos, K.D., Shackelford, J.E., Shechter, I., Jiang, G., Conrad, D., Keller, G.A., Krisans, S.K., 1993. Subcellular localization of squalene synthase in rat hepatic cells. Biochemical and immunochemical evidence. *The Journal of biological chemistry* 268, 12825-12836.
- Strickler, J.E., Patton, C.L., 1980. *Trypanosoma brucei brucei*: inhibition of glycosylation of the major variable surface coat glycoprotein by tunicamycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 1529-1533.
- Stuart, K.D., Schnauffer, A., Ernst, N.L., Panigrahi, A.K., 2005. Complex management: RNA editing in trypanosomes. *Trends in biochemical sciences* 30, 97-105.
- Subramani, S., Koller, A., Snyder, W.B., 2000. Import of peroxisomal matrix and membrane proteins. *Annual review of biochemistry* 69, 399-418.
- Subtil, A., Gaidarov, I., Kobylarz, K., Lampson, M.A., Keen, J.H., McGraw, T.E., 1999. Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 6775-6780.
- Sundar, S., Jha, T.K., Thakur, C.P., Mishra, M., Singh, V.P., Buffels, R., 2003. Single-dose liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis in India: a multicenter study. *Clin Infect Dis* 37, 800-804.

- Sundar, S., Jha, T.K., Thakur, C.P., Sinha, P.K., Bhattacharya, S.K., 2007. Injectable paromomycin for Visceral leishmaniasis in India. *The New England journal of medicine* 356, 2571-2581.
- Thompson, J.F., Danley, D.E., Mazzalupo, S., Milos, P.M., Lira, M.E., Harwood, H.J., Jr., 1998. Truncation of human squalene synthase yields active, crystallizable protein. *Archives of biochemistry and biophysics* 350, 283-290.
- Ukomadu, C., Dutta, A., 2003. p21-dependent inhibition of colon cancer cell growth by mevastatin is independent of inhibition of G1 cyclin-dependent kinases. *The Journal of biological chemistry* 278, 43586-43594.
- Urbina, J.A., Lazard, K., Marchan, E., Visbal, G., Aguirre, T., Piras, M.M., Piras, R., Maldonado, R.A., Payares, G., de Souza, W., 1993. Mevinolin (lovastatin) potentiates the antiproliferative effects of ketoconazole and terbinafine against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: in vitro and in vivo studies. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 37, 580-591.
- Urbina, J.A., Payares, G., Molina, J., Sanoja, C., Liendo, A., Lazard, K., Piras, M.M., Piras, R., Perez, N., Wincker, P., Ryley, J.F., 1996a. Cure of short- and long-term experimental Chagas' disease using D0870. *Science (New York, N.Y)* 273, 969-971.
- Urbina, J.A., Vivas, J., Lazard, K., Molina, J., Payares, G., Piras, M.M., Piras, R., 1996b. Antiproliferative effects of delta 24(25) sterol methyl transferase inhibitors on *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: in vitro and in vivo studies. *Chemotherapy* 42, 294-307.
- Urbina, J.A., 1997. Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. *Parasitology* 114 Suppl, S91-99.
- Urbina, J.A., 2001. Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments. *Current opinion in infectious diseases* 14, 733-741.
- Urbina, J.A., 2002. Chemotherapy of Chagas disease. *Current pharmaceutical design* 8, 287-295.
- Urbina, J.A., Concepcion, J.L., Rangel, S., Visbal, G., Lira, R., 2002. Squalene synthase as a chemotherapeutic target in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. *Molecular and biochemical parasitology* 125, 35-45.
- Urbina, J.A., Docampo, R., 2003. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in parasitology* 19, 495-501.
- Urbina, J.A., Concepcion, J.L., Caldera, A., Payares, G., Sanoja, C., Otomo, T., Hiyoshi, H., 2004. In vitro and in vivo activities of E5700 and ER-119884, two novel orally active squalene synthase inhibitors, against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48, 2379-2387.
- Vanden Bossche, H., Koymans, L., Moereels, H., 1995. P450 inhibitors of use in medical treatment: focus on mechanisms of action. *Pharmacology & therapeutics* 67, 79-100.
- Waterham, H.R., de Vries, Y., Russel, K.A., Xie, W., Veenhuis, M., Cregg, J.M., 1996. The *Pichia pastoris* PER6 gene product is a peroxisomal integral membrane protein essential for peroxisome biogenesis and has sequence similarity to the Zellweger syndrome protein PAF-1. *Molecular and cellular biology* 16, 2527-2536.
- Webster, P., Shapiro, S.Z., 1990. *Trypanosoma brucei*: a membrane-associated protein in coated endocytotic vesicles. *Experimental parasitology* 70, 154-163.

-
- Xia, Z., Tan, M.M., Wong, W.W., Dimitroulakos, J., Minden, M.D., Penn, L.Z., 2001. Blocking protein geranylgeranylation is essential for lovastatin-induced apoptosis of human acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* 15, 1398-1407.
- Yamamoto, S., Bloch, K., 1970. Studies on squalene epoxidase of rat liver. *The Journal of biological chemistry* 245, 1670-1674.
- Zanolari, B., Friant, S., Funato, K., Sutterlin, C., Stevenson, B.J., Riezman, H., 2000. Sphingoid base synthesis requirement for endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* 19, 2824-2833.
- Zhong, W.B., Wang, C.Y., Chang, T.C., Lee, W.S., 2003. Lovastatin induces apoptosis of anaplastic thyroid cancer cells via inhibition of protein geranylgeranylation and de novo protein synthesis. *Endocrinology* 144, 3852-3859.
- Zhou, W., Lepesheva, G.I., Waterman, M.R., Nes, W.D., 2006. Mechanistic analysis of a multiple product sterol methyltransferase implicated in ergosterol biosynthesis in *Trypanosoma brucei*. *The Journal of biological chemistry* 281, 6290-6296.
- Zhou, W., Cross, G.A., Nes, W.D., 2007. Cholesterol import fails to prevent catalyst-based inhibition of ergosterol synthesis and cell proliferation of *Trypanosoma brucei*. *Journal of lipid research* 48, 665-673.
- Zhuang, L., Kim, J., Adam, R.M., Solomon, K.R., Freeman, M.R., 2005. Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts. *The Journal of clinical investigation* 115, 959-968.
- Zinser, E., Paltauf, F., Daum, G., 1993. Sterol composition of yeast organelle membranes and subcellular distribution of enzymes involved in sterol metabolism. *Journal of bacteriology* 175, 2853-2858.