

Universidad de Granada
Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra"
C.S.I.C.

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha ... 6/02/02
ENTRADA NUM. 362

**UNA NUEVA SUBFAMILIA DE
TRANSPORTADORES ABC DE LEISHMANIA:
CARACTERIZACION DEL GEN LTRABC1.1**



Adriana Parodi Talice
Tesis doctoral
2002

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
N.º Documento 613522401
N.º Copia 15496211

**UNA NUEVA SUBFAMILIA DE TRANSPORTADORES ABC DE
LEISHMANIA: CARACTERIZACION DEL GEN LTRABC1.1**

**Memoria presentada por la Lic. Adriana Parodi Talice para
aspirar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas**

Esta Tesis ha sido realizada bajo la dirección de:



Dr. Francisco Gamarro Conde



Dr. Santiago Castanys Cuello



Adriana Parodi Talice
Aspirante al grado de Doctor
Granada, enero 2002



INDICE

A. INTRODUCCION	1
1. LEISHMANIA Y LEISHMANIASIS	1
1.1. El parásito	1
1.2. La enfermedad	2
1.3. El tratamiento	4
1.4. Establecimiento de la infección	4
1.5. Componentes de la superficie del parásito	5
1.6. Tráfico vesicular en Leishmania	8
2. BIOLOGIA MOLECULAR DE LEISHMANIA	9
2.1. Organización cromosómica de Leishmania	9
2.2. El genoma de Leishmania	11
2.3. Ploidía y sexo	11
2.4. Expresión génica en Leishmania	12
2.5. Regulación de la expresión génica en Leishmania	15
2.6. Plasticidad del genoma	17
2.7. Elementos repetitivos y composición de bases	19
2.8. Organelos y particularidades de Leishmania	20
3. TRANSPORTADORES ABC	21
3.1. Organización estructural de los transportadores ABC	22
3.2. Clasificación de la familia ABC	24
3.3. Mecanismo de transporte y topología de las proteínas ABC	28
4. PROTEINAS ABC Y TRANSPORTE DE LIPIDOS	32
4.1. Propiedades de las membranas	32
4.2. Transportadores ABC implicados en el movimiento de lípidos	36
4.3. La subfamilia ABCA	40
4.4. Topología de las proteínas ABCA	48
4.5. Localización de ABCA1	50
4.6. Funciones de ABCA1	51
5. TRANSPORTADORES ABC EN LEISHMANIA	51
5.1. Transportadores relacionados con la subfamilia ABCC	51
5.2. Transportadores relacionados con la subfamilia ABCB	52
B. OBJETIVOS	54
C. MATERIALES Y METODOS	55
C.1. MATERIALES	55
1. REACTIVOS QUIMICOS, FARMACOS Y OTROS MATERIALES	55
2. TAMPONES Y SOLUCIONES	57
2.1. Soluciones para transferencia de placas de lisis	57
2.2. Soluciones para Southern blot	57
2.3. Soluciones para Northern blot	58
2.4. Soluciones para electroforesis de campo pulsado (CHEF)	58
2.5. Soluciones de hibridación	58

2.6. Soluciones para electroforesis de proteínas	58
2.7. Soluciones para Western blot	59
3. MEDIOS DE CULTIVO	59
3.1. Medios para bacterias y fagos	59
3.2. Medios para parásitos	59
4. LINEAS CELULARES	60
4.1. Cepas bacterianas	60
4.2. Líneas de parásitos	60
5. VECTORES PLASMIDICOS	61
5.1. Vectores de clonaje	61
5.2. Vectores de expresión	61
6. OLIGONUCLEOTIDOS SINTETICOS	61
6.1. Oligonucleótidos para secuenciación	61
6.2. Oligonucleótidos para clonaje	62
C.2. METODOS	64
1. CULTIVO Y MANIPULACION DE LEISHMANIA	64
1.1. Cultivo in vitro de Leishmania	64
1.2. Criopreservación y descongelación de parásitos	64
1.3. Transfección de parásitos	64
1.4. Clonado de <i>L.infantum</i> transfectada con LABC1N-3'	65
1.5. Recuento de los parásitos	65
1.6. Determinación de la inhibición del crecimiento (IC) y de la dosis inhibitoria 50(DI ₅₀).....	65
1.7. Ensayo MTT	65
2. CULTIVO Y MANIPULACION DE BACTERIAS	66
2.1. Cultivo de bacterias	66
2.2. Preparación de células electrocompetentes y transformación.....	66
2.3. Infección de bacterias con bacteriófagos.....	66
2.4. Transferencia de bacteriófagos a membranas de nitrocelulosa	67
2.5. Rastreo de la librería	67
2.6. Preparación de bacteriófagos a gran escala.....	67
3. AISLAMIENTO DE ACIDOS NUCLEICOS	68
3.1. Aislamiento de ADN genómico de parásitos	68
3.2. Aislamiento de ADN de fagos	68
3.3. Aislamiento de ADN plasmídico	68
3.4. Aislamiento de ARN total de parásitos	69
3.5. Purificación de ARN poliadenilado de parásitos	69
4. TRATAMIENTO ENZIMATICO DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS	69
4.1. Digestión del ADN con enzimas de restricción	69
4.2. Reacción de Ligación	69
4.3. Marcaje de sondas radiactivas	70
4.4. Reacción de la transcriptasa inversa	70
4.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	70

4.6. Secuenciación del ADN	71
5. ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA DE ACIDOS NUCLEICOS	71
5.1. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	71
5.2. Electroforesis en campo pulsado	71
5.3. Purificación del ADN incluido en agarosa	72
5.4. Electroforesis de ARN en geles desnaturalizantes	72
5.5. Transferencia de ADN mediante "Southern blot"	72
5.6. Transferencia de ARN mediante "Northern blot"	73
5.7. Hibridación de ácidos nucleicos con sondas radiactivas	73
6. TECNICAS DE OBTENCION Y ANALISIS DE PROTEINAS	73
6.1. Obtención de proteínas totales de <i>Leishmania</i>	73
6.2. Cuantificación de proteínas	74
6.3. Electroforesis de proteínas en geles SDS-PAGE	74
6.4. Obtención de proteína recombinante de bacterias transformadas	74
6.5. Cromatografía de afinidad con Ni ²⁺ -NTA	75
7. TECNICAS INMUNOLOGICAS	75
7.1. Obtención de anticuerpos policlonales de conejo	75
7.2. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA)	76
7.3. Transferencia de proteínas a membrana y detección con anticuerpos: Western-blot.....	76
7.4. Purificación de la fracción IgG por columna de proteína A	77
7.5. Inmunofluorescencia indirecta	77
7.6. Inmunomicroscopía electrónica	78
8. OTRAS TECNICAS	78
8.1. Eflujo de ³ H-colesterol	78
8.2. Acumulación intracelular de NBD-fosfolípidos y análisis mediante citometría de flujo	79
D. RESULTADOS	80
1. AISLAMIENTO DEL GEN LtrABC1.1	80
1.1. Rastreo de una librería genómica de <i>Leishmania</i>	80
1.2. Caracterización del fago recombinante que contiene el gen LtrABC1.1	80
1.3. Identificación de una secuencia repetida invertida.....	83
1.4. Análisis de secuencia y análisis predictivo de la estructura de ABC1.1	84
2. ORGANIZACION GENOMICA Y LOCALIZACION CROMOSOMICA DE LtrABC1.1	92
2.1. Caracterización de la subfamilia ABCA y número de genes LtrABC1.1.....	92
2.2. Localización cromosómica de los genes ABCA.....	94
3. EXPRESION DEL GEN LTRABC1.1.....	95
3.1. Transcripción de LtrABC1.1	95
3.2. Adición del miniexón del ARNm de ABC1.1.....	95
3.3. Identificación del sitio de poliadenilación del ARNm de ABC1.1.....	98
4. OBTENCION DE PARASITOS QUE SOBREEXPRESAN LA PROTEINA ABC1.1.....	98
4.1. Construcción de plásmidos de expresión con el gen LtrABC1.1.....	98
4.2. Transfección de parásitos con LtrABC1.1	100
4.3. Caracterización genómica de los parásitos transfectados	101

4.4. Expresión de ABC1.1 en los parásitos transfectados	102
5. ANALISIS DE LA EXPRESION Y LA LOCALIZACION DE LA PROTEINA ABC1.1.....	103
5.1. Obtención de anticuerpos policlonales dirigidos contra la proteína ABC1.1.....	103
5.2. Inmunodetección de la proteína ABC1.1.....	105
5.3. Localización de la proteína ABC1.1.....	106
6. PAPEL FUNCIONAL DE LA PROTEINA ABC1.1.....	108
6.1. Clonaje de los parásitos transfectados con ABC1N-3'.....	108
6.2. Estudios de viabilidad celular	109
6.3. Estudios de resistencia a fármacos en las líneas transfectadas.....	109
6.4. Eflujo de ³ H-colesterol	111
6.5. Acumulación de análogos de fosfolípidos fluorescentes.....	112
E. DISCUSION	115
1. LA LEISHMANIASIS: UN PROBLEMA MUNDIAL	115
2. TRANSPORTADORES ABC EN LEISHMANIA.....	115
3. CARACTERIZACION MOLECULAR DE LA SUBFAMILIA ABCA Y DEL GEN LTRABC1.1..	116
4. IDENTIFICACION DE UNA SECUENCIA REPETIDA INVERTIDA	119
5. CARACTERIZACION DE LAS SECUENCIAS 5' Y 3' NO CODIFICANTES DEL GEN LTRABC1.1.....	123
6. ANALISIS DE LA SECUENCIA Y DE LA TOPOLOGIA DE LA PROTEINA ABC1.1.....	125
7. EXPRESION DE LTRABC1 Y LOCALIZACION DE LA PROTEINA.....	127
8. ESTUDIOS FUNCIONALES DE LA PROTEINA ABC1.1	129
8.1. Estudios de resistencia a fármacos	129
8.2. ¿Es ABC1.1 un transportador de lípidos?.....	131
F. CONCLUSIONES	137
G. BIBLIOGRAFIA	138

INTRODUCCION

A. INTRODUCCION

1. LEISHMANIA Y LEISHMANIASIS

1.1. El parásito

Leishmania es un parásito protozoario patógeno perteneciente a la familia Trypanosomatidae, orden Kinetoplástida. Se conocen más de veinte especies y subespecies diferentes de *Leishmania* responsables de la enfermedad denominada leishmaniasis.

El ciclo de vida de este parásito transcurre alternando entre dos formas morfológica y bioquímicamente distintas. Los promastigotes, flagelados y extracelulares, se multiplican y desarrollan en el tracto digestivo del insecto vector de la enfermedad, que generalmente se trata de mosquitos del género *Phlebotomus* (Europa, Africa y Asia) o *Lutzomyia* (América). Cuando se introduce en el huésped mamífero por la picadura del mosquito, los promastigotes son fagocitados por células retículo-endoteliales del huésped, y sufren una transformación a formas amastigotas no flageladas, las cuales se replican en vacuolas fagolisosomales acídicas. Estas formas intracelulares amastigotas pueden mantener la infección invadiendo nuevas células del huésped mamífero o a través de una nueva picadura pueden ser ingeridas por el insecto vector donde se transforman en promastigotes (figura A1).

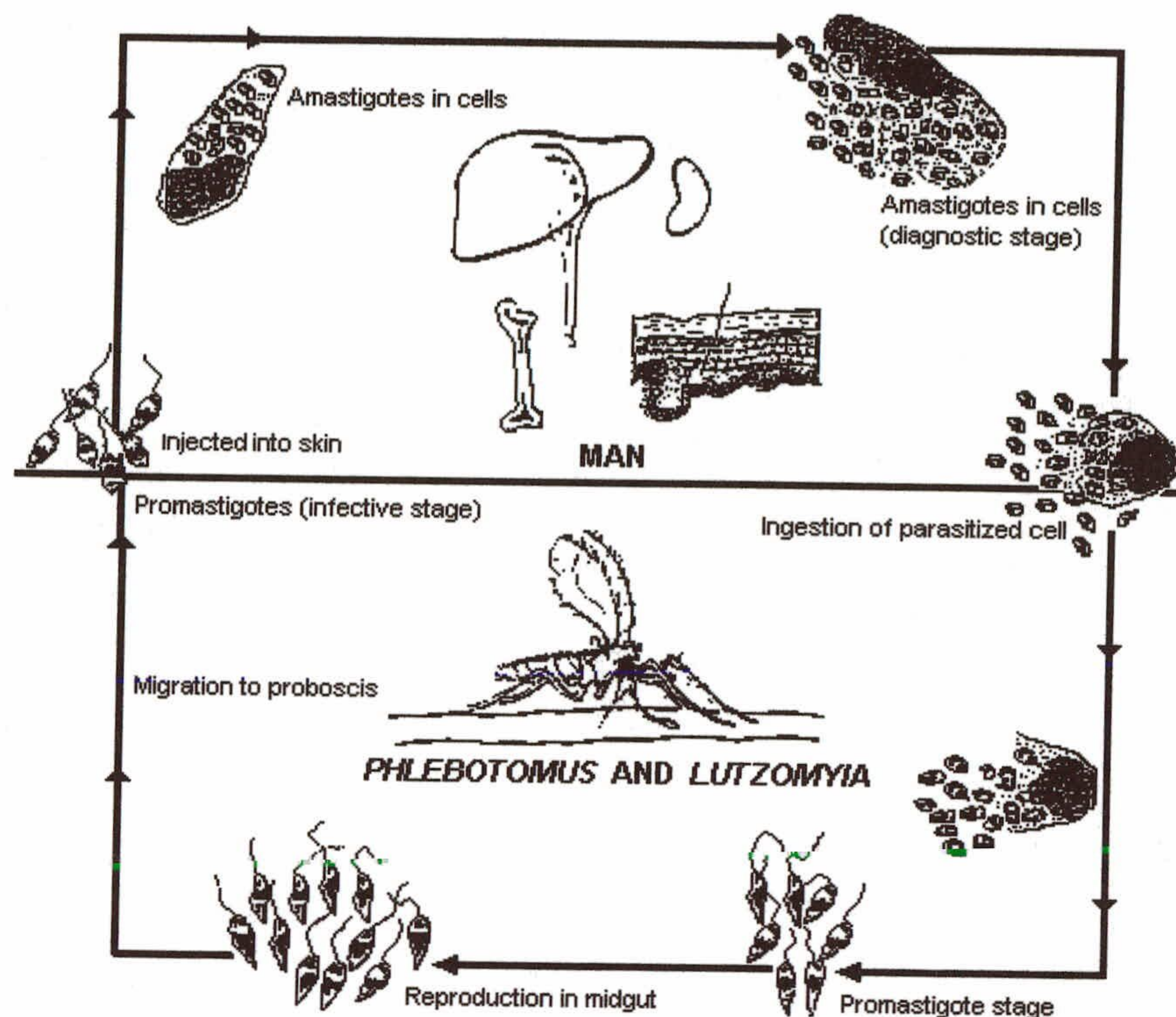


Figura A1. Ciclo de vida de *Leishmania*. Tras la inoculación de promastigotes infectivos en la piel del hospedador vertebrado durante la picadura del insecto, los macrófagos los fagocitan. Tras la internalización y formación de fagosomas, los amastigotes se replican dentro del macrófago, finalmente lisando la célula para ser liberados. Estos pueden infectar nuevos macrófagos. El ciclo se cierra cuando el insecto vector en una nueva picadura ingiere macrófagos con amastigotes, que vuelven a diferenciarse en promastigotes dentro del tracto intestinal del insecto.

1.2. La enfermedad

La leishmaniasis comprende un conjunto de enfermedades con manifestaciones clínicas muy diferentes en humanos, que dependen de la especie que infecta y también de las características genéticas e inmunológicas de la persona infectada. Existen dos presentaciones clínicas principales de la leishmaniasis: lesiones dérmicas, de la piel y membranas mucosas; y lesiones viscerales, en órganos internos. La enfermedad dérmica puede manifestarse como lesiones cutáneas que a menudo curan solas o como úlceras nasales y orales progresivas que pueden ser refractarias al tratamiento. Las especies que producen este tipo de enfermedad son *L. tropica*, *L. infantum*, *L. aethiopica*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, y se ubican fundamentalmente en Asia, África y cuenca mediterránea. La mayoría de las infecciones viscerales, causadas por especies como *L. donovani*, *L. infantum* y *L. chagasi* son asintomáticas en individuos inmunocompetentes, pero aquellas con enfermedad crónica se presentan con fiebre, fatiga, pérdida de peso, edema periférico,

esplenomegalia, hepatomegalia y anemia, que resultan en supresión inmune e infecciones secundarias, la causa usual de muerte.

Según datos de la Organización Mundial de la Salud, la leishmaniasis es endémica en 88 países (figura A2), con un total de 350 millones de personas en situación de riesgo, de las cuales 12 millones están afectadas por la enfermedad (Dirección web: <http://www.who.int/emc/diseases/leish/leishmaniasis>). Entre las enfermedades parasitarias, la leishmaniasis constituye la segunda causa de muerte por año (Hirst y Stapley, 2000) y se calcula que por año aparecen 1,5-2 millones de nuevos casos.

Durante los últimos diez años las regiones endémicas para *Leishmania* se han expandido significativamente, incrementándose el número de casos registrados de la enfermedad. Además, la co-infección *Leishmania*/HIV ha emergido como una nueva enfermedad con dificultades en la diagnosis y el tratamiento. Hay estudios que indican que *Leishmania* puede inducir la activación del HIV latente en monocitos y células T infectadas. Además, el HIV puede incrementar el crecimiento intracelular de los parásitos dentro de macrófagos (revisado por Wolday y col., 1999).

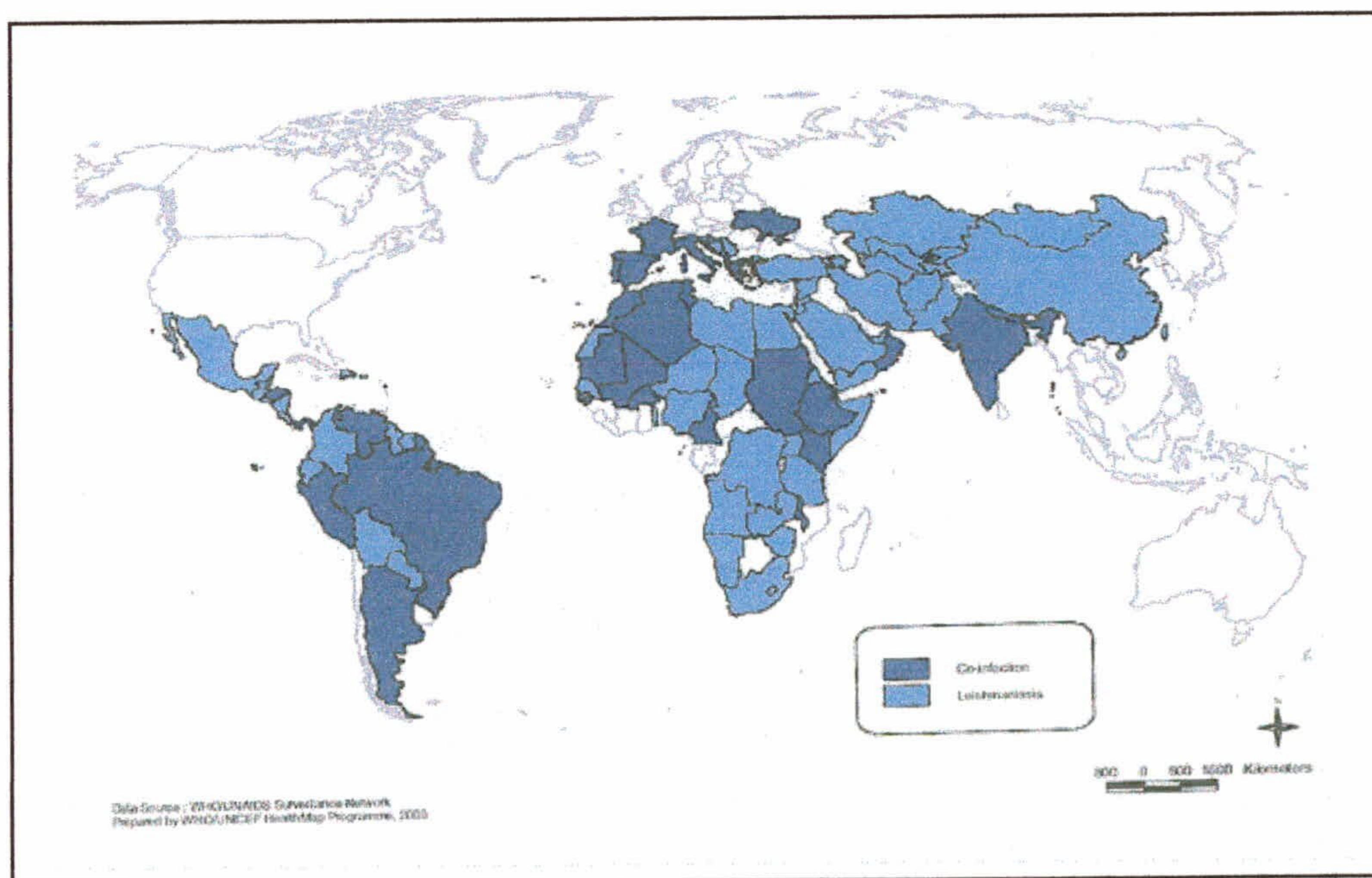


Figura A2. Distribución en el mundo de la leishmaniasis y países donde se ha reportado co-infección *Leishmania*/HIV.

1.3. El tratamiento

Actualmente, el tratamiento de la enfermedad está basado en la quimioterapia, aunque también se están intentando otras aproximaciones como el desarrollo de vacunas y tratamiento inmunológico. La primera línea de fármacos utilizados contra todas las formas de leishmaniasis son los antimoniales pentavalentes como Pentostam (estibogluconato de sodio) y Glucantime (antimoniato de meglumina). Aunque no se conoce sus mecanismos exactos de acción se cree que interfieren con la glicolisis y la β -oxidación de los ácidos grasos produciendo una depleción del ATP intracelular. La utilización de los antimoniales como fármacos leishmanicidas presenta sin embargo varias desventajas. No son fármacos seguros debido a su toxicidad, por lo que se debe limitar la dosis a aplicar. Además, presentan varios efectos secundarios y son altamente ineficaces, registrándose cada vez con mayor frecuencia casos de resistencia al tratamiento.

La segunda línea de fármacos incluye pentamidina, anfotericina B, ketoconazol y alopurinol. Su eficacia es menor que la de los antimoniales pentavalentes y se suelen aplicar en casos de resistencia a fármacos de primera línea.

Por otra parte, los alquil-lisofosfolípidos como la ilmofosina, la miltefosina y la edelfosina, desarrollados como fármacos antitumorales, parecen constituir prometedores fármacos leishmanicidas. Han demostrado tener actividad leishmanicida en modelos animales (Croft y col., 1996). En particular la miltefosina ha sido aplicada en casos de leishmaniasis visceral que no habían respondido a la terapia con antimoniales (Sundar y col., 1998; 1999) y en casos de leishmaniasis cutánea (Soto y col., 2001), pudiendo así constituir en el primer tratamiento oral efectivo.

1.4. Establecimiento de la infección

Para el establecimiento de la infección por *Leishmania* existen dos etapas claves: la expresión de factores de virulencia sobre el parásito y la interferencia con la respuesta inmune de los macrófagos del huésped. Se sabe que tras la infección hay un aumento en el Ca^{2+} citosólico dentro de los macrófagos; lo mismo ocurre en el parásito. El pretratamiento de estas células con compuestos quelantes o bloqueadores de canales de Ca^{2+} inhiben la entrada del parásito (Docampo y Moreno, 1996). Por otra parte, se conoce que los parásitos pueden modular vías de señalización dentro de sus células huésped, normalmente responsables de la destrucción de los patógenos. Se

ha demostrado que promastigotes de *Leishmania* inhiben la producción de IL-12, una citoquina inflamatoria, de macrófagos infectados *in vitro* (revisado por Mosser y Karp, 1999). Por otra parte, los sitios donde infecta *Leishmania* se caracterizan por una gran concentración de macrófagos con una significativa incapacidad para migrar. Esto es debido a que el parásito es capaz de regular la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 (revisado por Alexander y col., 1999).

Se conoce que *Leishmania* entra en el macrófago huésped por fagocitosis. Se ha demostrado que durante la adhesión del parásito a la superficie celular hay intercambio tanto de glicoproteínas asociadas a la membrana como de lípidos entre el parásito y la célula huésped (Henriques y de Souza, 2000). Durante el proceso de reconocimiento e internalización participan varios receptores del macrófago (Rittig y Bogdan, 2000), como son el receptor de manosa-fucosa, el receptor de fibronectina y los receptores del complemento CR1 y CR3. Los promastigotes pueden interactuar directamente con estas moléculas o la interacción ocurre luego de la opsonización del parásito por moléculas del huésped, como ha sido demostrado con C3.

Una vez dentro del macrófago, *Leishmania* reside en la vacuola parasitófora. Esta presenta características de compartimiento endosomal/lisosomal y se encuentra repleta de enzimas hidrolíticas y con un pH ácido lisosomal típico. El parásito se ha adaptado a estas condiciones; contribuyen a esta adaptación componentes de la superficie, como veremos más adelante, con actividad proteasa capaz de destruir enzimas del huésped con capacidades microbicidas. Pero además, se reconoce que la formación y maduración de la vacuola parasitófora es un proceso dinámico que implica un intercambio continuo de moléculas entre el parásito y su huésped. Durante el curso de la infección, la vacuola parasitófora aumenta de tamaño a expensas de la célula huésped. Macromoléculas provenientes del huésped que entran en la vacuola parasitófora son endocitadas por *L. mexicana* a través del bolsillo flagelar (Russell y col., 1992). Se ha demostrado que la vacuola parasitófora adquiere material citosólico a través de dos rutas independientes: una actividad transportadora de aniones orgánicos y un mecanismo de adquisición de macromoléculas que está modulado por compuestos que afectan la autofagia (Schaible y col., 1999).

1.5. Componentes de la superficie del parásito

Existen tres características particulares de la membrana plasmática de *Leishmania* así como del resto de los tripanosomátidos, y que los distinguen de los

eucariotas superiores. En primer lugar, presentan una abundancia especial de estructuras ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI); en segundo lugar, toda la membrana plasmática presenta en su cara citoplasmática una red de microtúbulos que corren paralelos al eje longitudinal del parásito, y que proporcionan una solidez especial a la membrana; en tercer, y posiblemente debido a esa rigidez que impone restricciones para procesos como la endocitosis y la exocitosis, existe una porción de la membrana desprovista de microtúbulos, situada en el extremo anterior del parásito y denominada bolsillo flagelar. Es la zona donde surge el flagelo y es un área de la membrana plasmática con características propias.

Las superficies celulares de todos los tripanosomátidos están cubiertas por proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) y/o glicolípidos GPI libres que forman envolturas protectoras y participan en las interacciones huésped-parásito. Estas moléculas son particularmente abundantes en parásitos en comparación con eucariotas superiores. A nivel ultraestructural se observa que los promastigotes se cubren de una conspicua envoltura. Estudios bioquímicos han revelado que esta envoltura está compuesta por una serie de glicoproteínas ancladas a GPI, un proteofosfoglicano (PPG) anclado a GPI fuertemente glicosilado y un lipofosfoglicano (LPG) complejo (revisado por Ilgoutz y McConville, 2001). Debajo de estas macromoléculas, se encuentra una capa de glicolípidos GPI libres densamente empaquetados que cubren una porción significativa de la superficie celular. Estas moléculas colectivamente forman una barrera que protege a los promastigotes de procesos como la lisis mediada por complemento, radicales de oxígeno e hidrolasas en los ambientes de sus huéspedes insecto y mamífero (Ilgoutz y McConville, 2001).

La glicoproteína anclada a GPI predominante en los promastigotes de *Leishmania* es una metaloproteasa de 60 kDa llamada GP63 o leishmanolisina. Cada promastigote está cubierto por aproximadamente 500.000 copias de GP63 que corresponden al 1% del total de proteínas celulares. Otro tipo de moléculas son los proteofosfoglicanos (PPG), algunos de los cuales se anclan a la superficie por GPI. Son menos abundantes que GP63 y están constituidos por un polipéptido como esqueleto que se encuentra extensivamente modificado con cadenas de fosfoglicanos. Los lipofosfoglicanos (LPG) son las macromoléculas más abundantes de la superficie de promastigotes, hay aproximadamente 6 millones por célula. Presentan cadenas de fosfoglicanos, como los PPG, pero generalmente son mucho más largas. Tanto el largo de estas cadenas como la naturaleza de las cadenas laterales de los LPG pueden cambiar durante el desarrollo del parásito (McConville y col., 1992). Los

glicolípidos GPI libres son numéricamente más abundantes que todas las macromoléculas ancladas a GPI. A diferencia de los LPG y glicoproteínas ancladas a GPI, los GPI libres no disminuyen a medida que los promastigotes se diferencian en amastigotes. De hecho constituyen la clase principal de moléculas de superficie que se encuentra en amastigotes. Pero los amastigotes también adquieren glicosfingolípidos de los macrófagos donde residen y los incorporan a la cara externa de su membrana plasmática (Winter y col., 1994). Este podría representar un mecanismo de evasión inmune.

La función que cumplen estos componentes de la superficie de *Leishmania* ha sido investigada mediante la selección de parásitos deficientes en alguno de ellos y la evaluación de la capacidad proliferativa o de supervivencia en el huésped. Más recientemente, se han identificado varios genes necesarios para la síntesis y/o ensamblaje de los LPG, glicoproteínas ancladas a GPI y GPIs libres, por lo que se han generado mutantes nulos incapaces de sintetizar determinadas clases de moléculas. Beverley y Turco (1998) identificaron varios genes involucrados en la biosíntesis de LPG. Estudios realizados con mutantes nulos para uno de estos genes de *L. major*, *LPG1*, sugirieron que LPG podía ser un factor de virulencia (Spath y col., 2000). Sin embargo, estudios similares realizados con el gen de *L. mexicana* no llevaron a la misma conclusión (Ilg, 2000). Estos resultados podrían reflejar la existencia de diferencias entre especies de *Leishmania*. Cabe notar por ejemplo que *L. mexicana* sintetiza más PPGs que *L. major* (Ilg y col., 1999). Un segundo gen involucrado en la biosíntesis de LPG es *LPG2*, cuya mutación nula produce parásitos viables pero incapaces de establecer una infección en el insecto vector (Sacks y col., 2000). Por otra parte, Chen y col. (2000) investigaron la función que cumple GP63 mediante su inhibición. En este caso bloquearon su función mediante la expresión episomal de una copia antisentido del gen *GP63* dio lugar a parásitos con reducida capacidad infectiva. En otro estudio, se anuló el gen *gpi8*, el cual codifica para la transamidasa necesaria para la adición del anclaje GPI a la proteína GP63 y en este caso no se observaron cambios de infectividad (Hilley y col., 2000). Por último, la función de los GPIs ha sido investigada anulando el gen *dpms*, el cual codifica para una enzima necesaria para la biosíntesis de los anclajes GPI y los GPI libres. Fue imposible deletar ambas copias del gen a menos que estuviera primero presente una copia episomal (Ilgoutz y col., 1999), lo que sugiere que esta enzima es esencial.

Los lípidos de los tripanosomátidos presentan algunas particularidades, tanto con respecto a su estructura como a su distribución. Los principales fosfolípidos de

Leishmania parecen ser de colina, etanolamina e inositol (Adosraku y col., 1993). Wassef y col. (1985) determinaron la composición lipídica de membranas purificadas de promastigotes de *L. donovani* y observaron que un 70% de los lípidos totales están constituidos por fosfolípidos, un 20-25% son lípidos neutros y un 5-10% glicolípidos. Entre los lípidos neutros un 60% son esteroides y un 30% diglicéridos. Los fosfolípidos de la membrana están compuestos por: 15% fosfatidilcolina, 37% fosfatidiletanolamina, 18% fosfatidilinositol, 10% fosfatidilserina, y pequeñas cantidades de cardiolipina, fosfatidilglicerol y ácido fosfatídico. Cuando se analizaron distintas fracciones celulares como son la membrana plasmática y la membrana mitocondrial, se observaron diferencias pronunciadas en los contenidos de fosfolípidos, reflejando especificidades de cada compartimiento. Se han descrito cambios de composición en determinadas situaciones (Haughan y Goad, 1991). Se observó una mayor proporción de lípidos polares cuanto más vigoroso era el crecimiento de un cultivo. Así mismo, se observó una mayor proporción de fosfolípidos con respecto a los lípidos neutros cuando la temperatura del cultivo aumentó de 25 a 37°C. Estos cambios tienden a promover una mayor estabilidad de las membranas del parásito a mayor temperatura.

El principal esteroide componente de la membrana de *Leishmania* es el ergosterol. La biosíntesis de esteroides es una de las vías que está siendo estudiada intensamente para buscar posibles blancos quimioterapéuticos ya que se conoce que estos parásitos requieren de determinados esteroides para su crecimiento y viabilidad celular (Urbina, 1997).

1.6. Tráfico vesicular en *Leishmania*

Los parásitos como *Leishmania* son células muy polarizadas, donde la comunicación vesicular entre el citoplasma y la superficie celular se restringe a un área pequeña especializada de la membrana plasmática en el extremo anterior de la célula, denominada bolsillo flagelar (Overath y col., 1997). Como ya se ha mencionado, el bolsillo flagelar es una invaginación especializada de la membrana que rodea al flagelo emergente. En esta área se concentra la maquinaria especializada en la endocitosis/exocitosis, que garantiza la supervivencia de estos parásitos en sus huéspedes insecto y mamífero. El bolsillo flagelar es el sitio donde ocurre la captación de nutrientes a través de la vía de endocitosis mediada por receptor, la secreción de proteínas al medio extracelular, y la integración de proteínas de membrana en la superficie celular. Varias proteínas específicas residen en el bolsillo flagelar, reflejando

las funciones especializadas que cumple esta porción de membrana, que probablemente también contengan composiciones lipídicas particulares. Debido a sus características particulares probablemente el bolsillo flagelar constituya el sitio más vulnerable de la superficie del parásito, por lo que es posible que allí residan dianas aún no identificadas que puedan ser utilizadas para combatir al parásito.

Aún se conoce poco acerca de las vías secretorias y endocíticas de tripanosomátidos. Estos parásitos presentan un gran retículo endoplásmico (RE) disperso en el citoplasma, un aparato de Golgi compuesto por 4-6 láminas y una zona de brote de vesículas ubicada entre el RE y la cara cis del aparato de Golgi. Existen además elementos túbulovesiculares y vesículas adyacentes al Golgi que probablemente constituyan la red trans-Golgi, y varias vesículas de mayor tamaño entre el trans-Golgi y el bolsillo flagelar. Las vías de tráfico vesicular en tripanosomátidos, han sido particularmente investigadas en el curso de estudios sobre la biosíntesis de GPI. Experimentos de localización subcelular de enzimas involucradas en su biosíntesis pusieron de manifiesto una estructura adicional túbulovesicular denominada MVT (de "multivesicular tubule") que se extiende desde el bolsillo flagelar hacia el extremo posterior de la célula (Ilgoutz y col., 1999a; Weise y col., 2000; Mullin y col., 2001). Se considera esta estructura un compartimento lisosomal terminal.

Se han clonado los genes de varias proteínas de unión a GTP de la familia Rab en *T. brucei* (Field y Boothroyd, 1995). Estas proteínas probablemente cumplan funciones en el control del tráfico vesicular en tripanosomátidos, como lo hacen en las células de mamíferos. Más recientemente, se ha descrito el primer miembro de la familia Rho de GTPasas en tripanosomátidos (Nepomuceno-Silva y col., 2001). En mamíferos esta familia ejerce un importante número de funciones entre las que se encuentra el tráfico de membrana y la remodelación del citoesqueleto, particularmente en procesos tales como la fagocitosis (Chimini y Chavrier, 2000).

2. BIOLOGIA MOLECULAR DE *LEISHMANIA*

2.1. Organización cromosómica de *Leishmania*

Leishmania se reproduce por mitosis (fisión binaria) en todas las etapas del ciclo de vida, y los cromosomas no se condensan en ninguna fase del ciclo celular. Ya que no es posible la obtención de un cariotipo por análisis de los cromosomas

metafásicos, la electroforesis en gel de campo pulsado (CHEF) puede utilizarse para generar "cariotipos" moleculares con patrones de bandas electroforéticas reproducibles. El genoma haploide de *Leishmania* contiene unas 35 megabases. Consiste en 36 cromosomas que varían en tamaño desde 0,3 Mb a 2,5 Mb (Wincker y col., 1996). El empleo de múltiples CHEF hibridados con 244 sondas (equivalente a un marcador cada 130 Kb) ha permitido identificar todos los cromosomas. De esta forma se ha podido conocer que el cariotipo molecular de *Leishmania* está conservado entre las especies y cepas con la mayoría de los genes sinténicos entre las especies. Al comparar 300 *loci* entre distintas especies de *Leishmania* se observó que 32 de los 36 grupos de ligamiento se conservaban entre todas las especies (Britto y col., 1998).

Los telómeros, complejos de nucleoproteínas que se forman en los extremos de los cromosomas de eucariotas, protegen a los cromosomas de la degradación y reordenamientos y aseguran la replicación cromosómica completa. La estructura y mantenimiento de los extremos cromosómicos en *Leishmania* parece ser similar a la de otros eucariotas. Una actividad telomerasa es responsable de agregar deoxiribonucleótidos trifosfatos a los extremos 3' de las hebras de ADN cromosómicas, con propiedades de reconocimiento de un cebador y elongación similares a las otras telomerasas eucarióticas (Cano y col., 1999). El análisis de 5 especies de *Leishmania* ha revelado la presencia de repetidos en tándem de seis nucleótidos (CCCTAA)_n que también se encuentran en *T. brucei* y en todos los vertebrados estudiados (Fu y Barker, 1998). Estos repetidos están seguidos por una secuencia conservada asociada al telómero de 100 pb (LCTAS). El grado de similitud entre secuencias LCTAS se correlacionó con la taxonomía: miembros de un complejo comparten un alto grado de conservación en estas secuencias. Fu y Barker (1998) propusieron un mecanismo de "slipage" que promueve la formación de repetidos LCTAS para mantener las regiones teloméricas y subteloméricas de los cromosomas. Una base de ADN inusual β-D-glucosil-hidroximetiluracil, llamada "J" es abundante en repetidos teloméricos de organismos kinetoplásticos y en otros elementos de ADN repetitivos de *T. brucei* (Van Leeuwen y col., 1998). J está relacionada con control transcripcional en genes de glicoproteínas de superficie variantes de *T. brucei*. En *Leishmania* se ha propuesto que esta base puede también funcionar en la represión de la transcripción de elementos repetidos e inhibiendo la recombinación entre secuencias repetitivas, para mantener así la integridad genómica.

2.2. El genoma de *Leishmania*

En el marco de los proyectos internacionales de genoma de parásitos, coordinados por la UNDP/Banco Mundial/OMS Programa especial para la investigación y TDR, *Leishmania major* cepa Friedlin ha sido incluida como representativa de todas las especies de *Leishmania*. Se ha construido una librería en cósmidos, y los 9.216 clones fueron utilizados para la elaboración de un mapa físico global (Ivens y col., 1997; Ivens y col., 1998). La secuenciación de los clones comenzó en 1996 y hasta hoy se ha completado la secuencia de los cromosomas 1 y 3. A partir de los datos de densidad génica del cromosoma 1 (1 gen/3,7 Kb), se puede predecir que existe un total de aproximadamente 9.800 genes en *Leishmania*, de los cuales un 40% codifica para proteínas desconocidas. La secuencia del genoma completo estará disponible en el 2003.

2.3. Ploidía y sexo

Mucho se ha especulado sobre estos aspectos. Evidencias de "knockouts" génicos, polimorfismos de restricción, recombinación genética y alteraciones cariotípicas, apuntan a un estado predominantemente diploide. Cupolillo y col. (1997) utilizando patrones de electroforesis de isoenzimas para examinar diversidad genética entre especies de *Leishmania*, observaron heterocigocidad en varios *loci*, apoyando la hipótesis diploide. Sin embargo, evidencias a partir de una variedad de marcadores genéticos, indican que la heterocigocidad parece ser poco común, apoyando a un modelo diploide caracterizado por un bialelismo homólogo (Wincker y col., 1996; Britto y col., 1998).

Aunque *Leishmania* se multiplica por fisión binaria, se asume que en la naturaleza exista la reproducción sexual, debido a la existencia del genoma diploide. Sin embargo, el intercambio genético en tripanosomátidos sólo ha sido probado en *T. brucei*, donde se demostró experimentalmente la producción de híbridos tras la co-transmisión de diferentes cepas parentales a través del vector. En *Leishmania* aún no está claro este posible mecanismo. Se han descrito híbridos naturales con una combinación de caracteres moleculares de las especies simpátricas, y se ha reportado la observación microscópica de fusión celular (Bañuls y col., 1997; Gibson y Stevens, 1999). A pesar de esta evidencia, se asume que el intercambio genético debe ser un fenómeno infrecuente del ciclo de vida de *Leishmania*. Han fallado todos los intentos

de realizar cruzamientos sexuales en el laboratorio, lo que sugiere que el intercambio genético debe darse con una baja frecuencia (Panton y col., 1991). Por otra parte, estudios de genética de poblaciones indican que las dos consecuencias genéticas de la reproducción sexual, es decir, segregación y recombinación, están ausentes en *Leishmania* y se ha propuesto un modelo clonal, asexual para sus poblaciones (Tibayrenc y col., 1990, 1991; Tibayrenc, 1995). Aún así el modelo clonal no implica ausencia completa de reproducción sexual, pero parece ser tan infrecuente que no altera la estructura de población clonal.

2.4. Expresión génica en *Leishmania*

Los genomas de tripanosomátidos están organizados como unidades policistrónicas. Estas unidades pueden contener repetidos en tándem de marcos abiertos de lectura idénticos o muy similares, separados por cortas regiones intergénicas (Swindle y col., 1988).

La organización de los genes de ARN ribosómico en *Leishmania* es similar a la de otros eucariotas: múltiples genes, repetidos cabeza a cola, con regiones codificantes separadas por secuencias espaciadoras (Requena y col., 1997). Muchos genes que codifican para proteínas se encuentran repetidos en tándem. Por ejemplo, existen *loci* que contienen pares de genes muy relacionados, mientras que otros *loci* contienen genes multi-copia repetidos en tándem. Ejemplos son los genes para α - y β -tubulinas, proteínas de choque térmico, proteasas y antígenos de superficie. Los pares de genes se caracterizan por presentar un alto grado de conservación de secuencia aunque presentan considerable divergencia en sus secuencias no traducidas (UTR) 5' y 3'. Los genes multi-copia generalmente están organizados como repetidos directos en tándem, sin embargo, pueden alternarse con otros genes repetidos. También pueden existir copias dispersas en diferentes cromosomas, como en el caso de los genes para la histona H4 de *L. infantum* (Soto y col., 1997). Esta organización repetida de genes puede significar un mecanismo para aumentar la abundancia de transcritos de proteínas de alta expresión (Stiles y col., 1999). Hay cierta correlación entre el número de copias de los genes de choque térmico en promastigotes y la concentración intracelular del correspondiente péptido. Hay varias copias de los genes para las proteínas HSP70 y HSP83, las cuales constituyen el 2,1% y 2,8% de las proteínas celulares, respectivamente; mientras que el gen de copia única *hsp100* codifica para una proteína que representa sólo el 0,25% (Brandau y col., 1995).

Entre las distintas especies de *Leishmania*, se observa una conservación en muchos *loci* repetidos, tanto en el número de genes como en su organización; sin embargo, en otros casos, particularmente cuando se trata de genes que codifican para antígenos de superficie como *gp63*, se observa un mayor grado de heterogeneidad (Webb y col., 1991; Medina-Acosta y col., 1993; Voth y col., 1998).

Existen muchos aspectos de la transcripción de *Leishmania* que aún no se conocen. En la mayoría de los casos no se han identificado elementos promotores propiamente dichos y apenas se ha comenzado a identificar proteínas nucleares que pueden tener funciones como factores de transcripción. El avance en la secuenciación de cromosomas completos, como el cromosoma 1 de *Leishmania major* y el análisis de las regiones codificantes ha puesto en evidencia una organización peculiar. Este cromosoma contiene 79 genes que codifican para proteínas, 29 de los cuales está codificados en tándem sobre una hebra de ADN mientras que los 50 genes restantes están codificados en tándem sobre la otra hebra. Ambos "clusters" están separados por una región de 1,6 Kb y son transcritos en direcciones opuestas hacia los telómeros. En esta región central que es la candidata para contener un promotor, no se identificaron promotores para ARN polimerasas, tampoco secuencias centroméricas u orígenes de replicación. Los cromosomas 3 y 4 han sido parcialmente secuenciados y también parecen tener 2 "clusters" génicos, pero en este caso la transcripción de ellos procede hacia el centro del cromosoma.

A pesar de que no se conocen promotores bien definidos para la ARN polimerasa II, se sabe que la transcripción es llevada a cabo por polimerasas con sensibilidades a α -amanitina, similares a las ARN polimerasas de mamíferos. Sí se han identificado promotores resistentes a α -amanitina para la ARN polimerasa I delante de genes para ARNs ribosomales y en el caso de *T. brucei*, en genes que codifican para glicoproteínas variables de superficie y prociclinas. También se ha identificado una actividad ARN polimerasa III con sensibilidad intermedia para la α -amanitina que transcribe genes de ARNs pequeños. Existe un ejemplo de promotor para la ARN polimerasa II que ha sido caracterizado en el gen del miniexón de *L. tarentolae* (Yu y col., 1998). Se trata de un promotor bipartito con un elemento GN₃CCC en la posición -39 a -33 y un elemento GACN₅G en la posición -66 a -58, relativas al sitio de iniciación de la transcripción. Se ha demostrado que el espaciamiento entre ambos elementos es crítico para la función promotora y la selección del sitio de inicio de la transcripción, como ocurre en los promotores modulares de otros organismos. Se ha identificado un factor proteico que presenta una

alta afinidad por este elemento, lo que sugiere que puede tratarse de un potencial factor de transcripción (Yu y col., 1998). En *Trypanosoma cruzi* se ha identificado una proteína, denominada PPB1, capaz de unirse al elemento promotor del gen del miniexón e inducir la expresión de este gen (Wen y col., 2000).

Hasta ahora no se han encontrado intrones en los genes de *Leishmania*, aunque el reciente descubrimiento de cis-splicing en otros tripanosomátidos (Mair, y col., 2000) sugiere que podrían encontrarse excepciones a lo que parece una regla. Se reconoce que la transcripción es policistrónica. Un único ARN conteniendo las distintas secuencias codificantes es procesado para dar los ARNm individuales. Este procesamiento consiste en dos mecanismos: la adición de una secuencia denominada miniexón en el extremo 5' de cada transcripto y la adición de una cola de poliadeninas.

El mecanismo mediante el cual una secuencia de 39 nucleótidos, llamada miniexón, se agrega al extremo 5' de todos los ARNm, se denomina "trans-splicing" (Vanhamme y Pays, 1995). El miniexón está codificado por un ordenamiento de alrededor de 150 genes. La reacción de "trans-splicing" ocurre en una corta secuencia consenso, normalmente el dinucleótido AG, precedida por una región de polipirimidinas (Matthews y col., 1994). La selección del sitio de adición del miniexón puede variar dentro de un mismo transcripto, lo que muestra que no existen requerimientos estrictos de secuencia. Por lo general la reacción tiene lugar en el primer AG después de la región de polipirimidinas. Durante la reacción de "trans-splicing", el extremo 5' de los transcriptos maduros, como en el resto de los eucariotas, se cubre de una estructura cap4. El cap 4 consiste en una 7-metil-guanina unida al primer nucleótido (Sutton y Boothroyd, 1988). Se conoce poco de los componentes proteicos del posible "trans-spliceosoma", aunque se sabe que participan una serie de ARNs nucleares pequeños (Tschudi y Ullu, 1990).

Los tripanosomátidos carecen del sitio consenso AAUAAA para la poliadenilación que se encuentra en eucariotas superiores y además muestran heterogeneidad en el uso del sitio de poliadenilación. Se pueden utilizar varios sitios dentro de una única unidad transcripcional (LeBowitz y col., 1993), lo que sugiere que la terminación transcripcional no está acoplada a la poliadenilación. A pesar de ser un evento impreciso, se ha visto una fuerte preferencia para la poliadenilación en la adeninas de sitios CAn, GAn, o TAn (Stiles, 1999). Recientemente se ha identificado una proteína de unión a poli A (PAB1) en *Leishmania major* (Bates y col., 2000) que podría tener un papel en la estabilización de los ARNm y en la iniciación y terminación

de la traducción, como fue descrito para proteínas homólogas en otros eucariotas (Gallie, 1998).

Durante el procesamiento de los transcriptos policistrónicos, la reacción de "trans-splicing" de un gen ubicado corriente abajo precede a la poliadenilación del gen ubicado corriente arriba (Ullu y col., 1993) y en *Leishmania* se ha descrito que ambos procesos están acoplados (LeBowitz y col., 1993).

Los transcriptos de *Leishmania* suelen tener regiones no traducidas (UTR) 5' y 3' más largas que las de otros eucariotas. El largo promedio de las UTRs de ARNm de *L. donovani* y *L. major* es de alrededor de 200 nucleótidos para las regiones 5' y 1000 nucleótidos para las 3' (Stiles y col., 1999). Esta característica, si bien puede estar relacionada con la función reguladora propuesta para estas regiones, también puede reflejar la organización genómica y espaciamiento de los genes de *Leishmania*, siendo las reacciones de procesamiento 5' y 3' las que determinan el largo de las UTRs.

2.5. Regulación de la expresión génica en *Leishmania*

Los mecanismos de regulación génica en tripanosomátidos son distintos del resto de los eucariotas. Los genes que codifican para proteínas parecen transcribirse por lo general constitutivamente para dar lugar a ARNs policistrónicos que son procesados para producir ARNm monocistrónicos maduros. Sin embargo, los genes que pertenecen a la misma unidad pueden mostrar patrones de expresión muy diferentes. Así, la regulación de la expresión génica se da predominantemente a nivel post-transcripcional.

Se han identificado varios puntos de regulación post-transcripcional en la expresión de genes de tripanosomátidos. Los más estudiados han sido factores que afectan la estabilidad del ARNm y se han identificado señales que median en la estabilidad dentro de regiones 3'-UTR, así como en regiones intergénicas y codificantes de transcriptos específicos (Hotz y col., 1997; Weston y col., 1999). Existen ejemplos de que las 3'UTR están involucradas en la expresión diferencial de genes tanto a través de la regulación de la estabilidad del ARN como de la traducción. Los genes multicopia *GP63*, que poseen 3'UTRs divergentes, muestran distintos patrones de expresión según la etapa de desarrollo. Utilizando genes reporteros se demostró que estas secuencias participan en la expresión específica de estos genes

(Kelly y col., 2001). Por otra parte, existen 6 genes *HSP70* distribuidos en tándem sobre un cromosoma de *L. infantum*. Estos genes muestran una alta conservación en sus 5'UTR y en las regiones codificantes mientras que sus 3'UTR son diferentes (Quijada y col., 1997). En particular la 3'UTR del gen 6 es completamente divergente con respecto a la de los otros cinco genes. La transcripción de estos genes es similar pero el ARNm del gen 6 es 50 veces más abundante y, a diferencia del resto, su abundancia no cambia en respuesta a choque térmico (Quijada y col., 2000). Así pues, se cree que las regiones 3'UTR contienen elementos de acción en cis involucrados en la expresión diferencial de los genes de *Leishmania*. Las 3'UTRs también pueden contener elementos que favorecen la desestabilización de los ARNm. Esto ha sido demostrado en el caso de *T. cruzi*, donde se han descrito elementos ricos en AU (ARE) que causan desestabilización de transcritos, tal como ha sido descrito en eucariotas superiores (Di Noia y col., 2000). Las secuencias 5'UTR también han sido relacionadas con estabilidad de transcritos.

Aunque la mayoría de los casos de regulación post-transcripcional ocurren a nivel del control de la estabilidad de los ARNm, también existen ejemplos de control traduccional. Se ha demostrado que la expresión de histonas en *Leishmania* es regulada durante la inhibición de la síntesis de ADN mediante un bloqueo de la traducción de sus ARNm (Soto y col., 2000).

La regulación post-transcripcional en *Leishmania* puede implicar a proteínas que promueven ya sea la estabilidad o degradación del mensajero. Se ha demostrado que la inhibición de la transcripción por actinomicina D aumenta la estabilidad del mensajero del transportador de glucosa de *L. mexicana* LmGT2, indicando la existencia de factores de degradación. Por el contrario, la actinomicina D promueve la degradación del mensajero de la proteína quinasa c-lpk2 de *L. major* y los ARNm de α -tubulina y β -tubulina de 2.2 Kb, lo que sugiere que la transcripción es necesaria para la estabilidad de estos mensajeros, presumiblemente a través de factores de estabilización lábiles (Coulson y col., 1996; Simon-Tov y col., 1996).

La naturaleza de las secuencias involucradas en el control de la estabilidad de los mensajeros no se conoce. Hay una considerable divergencia en las secuencias 3'UTR de genes casi idénticos aunque diferencialmente regulados, lo que hace prácticamente imposible la identificación de secuencias comunes. Varios autores han comentado la presencia de potenciales estructuras tallo-lazo en los 3'UTR de transcritos cuya abundancia varía durante el desarrollo.

Aunque generalmente la abundancia de una proteína de *Leishmania* refleja su patrón de expresión de ARN, esto no siempre es así. En algunos casos, modificaciones traduccionales o post-traduccionales afectan los niveles de proteínas. En *L. infantum* hay un único ARNm de gp63 y un patrón diferencial de glicosilación produce diferentes gp63 durante el desarrollo (González-Aseguinolaza y col., 1997). La actividad de la proteína quinasa relacionada con cdc2 de *L. mexicana* (LmmCRK-1) también parece regularse post-traduccionalmente; la actividad de esta quinasa sólo se detecta en promastigotes aunque el ARNm y la proteína están presentes a lo largo de todo el ciclo de vida (Mottram y col., 1993).

Así pues resta mucho por conocer tanto sobre los elementos como sobre los factores involucrados en la regulación de la expresión génica de tripanosomátidos en general y de *Leishmania* en particular.

2.6. Plasticidad del genoma

Los estudios mediante CHEF han puesto en evidencia importantes polimorfismos cromosómicos tanto interespecíficos como intraespecíficos en *Leishmania* (Bastien y col., 1992), principalmente debidos a variaciones en el tamaño cromosómico, que pueden implicar hasta un 25% del largo de un cromosoma. Así, los cromosomas homólogos pueden diferir marcadamente en tamaño dentro de una misma cepa. Esta plasticidad observada en el genoma de *Leishmania* es consecuencia de dos tipos principales de reordenamientos: los que afectan a las regiones subteloméricas de los cromosomas y los que afectan a ciertas regiones de manera recurrente.

La plasticidad genómica podría representar un modo general de mutación de estos parásitos. Además hacen uso de ella mediante procesos de amplificación génica bajo diversas circunstancias. La amplificación génica frecuentemente se observa en parásitos resistentes a fármacos (revisado por Beverley, 1991). Un ejemplo es la región H del genoma de *Leishmania*, el cual parece ser un segmento propenso a la amplificación. La región H se ha visto amplificada de forma espontánea en diferentes especies de *Leishmania* o tras ser seleccionadas por exposición a metotrexato y otros fármacos. El círculo H así generado contiene un segmento de 30 Kb en orientaciones invertidas. El ADN amplificado puede constituir el 5-10% del ADN total del parásito. La mayoría de las amplificaciones estudiadas en *Leishmania* se originaron en respuesta a

rondas de selección con fármacos, pero varias amplificaciones no están asociadas a un fenotipo particular, por ejemplo el círculo T, molécula dimérica circular de 20 Kb de *L. tarentolae*; el círculo D, una estructura repetida invertida de 75 Kb de *L. tropica*; y la expansión del ordenamiento repetido en tándem de genes del miniexón en *L. major* (Petrillo-Peixoto y col., 1989; Hightower y col., 1988; Iovannisci y col., 1989).

Leishmania puede además llevar material genético adicional como minicromosomas multicopia. Estos se originan espontáneamente o como consecuencia de la exposición a condiciones adversas, tales como selección con fármacos. Estas amplificaciones pueden ser estables o inestables (Beverley, 1991).

Las amplificaciones génicas generalmente ocurren como eventos conservativos, donde las copias cromosómicas se conservan intactas, aunque también se ha descrito amplificación no conservativa, a través de recombinación intracromosómica entre repetidos directos. Se han propuesto varios modelos para explicar la generación de amplificaciones circulares y lineales. La mayoría de las amplificaciones por resistencia a fármacos estudiadas en *Leishmania* son conservativas, es decir, no implican cambios en la estructura cromosómica o en la ploidía. Por lo tanto el modelo más plausible que se ha propuesto es el que implica sobre-replicación de un locus cromosómico durante el ciclo celular y posterior resolución por recombinación del ADN amplificado. Los sitios preferentes para que ocurra este proceso son secuencias repetidas homólogas. Así, genes flanqueados por repetidos directos sufrirán amplificación de tipo directa, mientras que genes flanqueados por repetidos invertidos sufrirán amplificación invertida (Beverley, 1991).

En *Leishmania* los sitios de reordenamiento de ADN comúnmente están dentro de secuencias repetidas homólogas. En comparación con mamíferos, los sistemas que median en la recombinación homóloga en *Leishmania* parecen ser mil veces más activos cuando se miden las frecuencias relativas de "targeting" de genes homólogos. Esto debe contribuir a la gran plasticidad observada en su genoma.

Sin duda, la amplificación génica es capaz de modelar el genoma de *Leishmania*. Muchos genes de tripanosomátidos están presentes como múltiples copias ligadas, mientras que sus homólogos en otros organismos son de una o unas pocas copias. Además, la amplificación de genes no sólo proporciona cambios cuantitativos, sino que proporciona sustratos para la evolución de nuevos genes y funciones.

2.7. Elementos repetitivos y composición de bases

En cuanto a su composición de secuencia, el genoma de *Leishmania* es relativamente rico en GC y contiene alrededor de un 30% de secuencias repetidas. La mitad de estas secuencias son repetidos hexámeros teloméricos y subteloméricos, mientras que el resto son repetidos de secuencia simple, transposones y familias génicas dispersas o en tándem, tales como ARNr, miniexón, tubulina, y gp63.

Los motivos de secuencia de ADN repetitivo cortos son elementos comunes en la mayoría de los genomas eucarióticos y están presentes como repetidos en tándem, conocidos como microsatélites, dispersos a través del genoma en regiones no codificantes de proteínas, o en los extremos cromosómicos, en secuencias asociadas a telómeros. Midiendo cinéticas de reasociación de ADN (análisis Cot), Leon y col. (1978) identificaron un componente altamente repetitivo que ocupa el 12% del genoma nuclear de *L. donovani*. También se identificó un componente medianamente repetitivo que ocupa otro 13%. Motivos repetidos de ADN microsatélite están presentes en los cromosomas de varias especies de *Leishmania*, siendo los repetidos (CA)_n los más comunes (Rossi y col., 1994).

Alonso y col. (1992) compararon las composiciones de base de tripanosomátidos, y encontraron que los géneros *Crithidia* y *Leishmania* eran más ricos en bases G/C (58 y 57% respectivamente) que *T. brucei* (51%) o *T. cruzi* (44%). Las regiones codificantes presentaron un mayor contenido en G/C que las regiones no codificantes, y las regiones no codificantes 3' fueron más ricas en G/C que las 5'. Los autores especularon que estas diferencias pueden deberse a la naturaleza más primitiva de *Crithidia* y *Leishmania*. Alvarez y col. (1994) compararon kinetoplástidos monogénicos (*Crithidia*) con digenéticos (*Leishmania* y *Trypanosoma*), analizando tanto secuencias codificantes como flanqueantes. Se encontró que *Crithidia* y *Leishmania* comparten un uso de bases similar en las terceras posiciones de los codones, existiendo una fuerte preferencia por G o C en esta posición, un ligero desvío hacia A/T en la segunda posición (55%) y un desvío a G/C en la primera posición (60%). Al comparar niveles de expresión con contenido en G/C se observó que en *Trypanosoma*, pero no en *Leishmania* o *Crithidia*, el contenido de G/C se correlacionó con nivel de expresión; los genes altamente expresados en *T. brucei* contienen un mayor contenido en G/C en la tercera posición de los codones al compararlos con los de más baja expresión.

El análisis del contenido nucleotídico del cromosoma 1 reveló un desvío a purinas no debido al azar y sesgo GC que está correlacionado con las dos unidades policistrónicas de genes presentes en este cromosoma, sugiriendo que nuevos procesos transcripcionales en *Leishmania* pueden ser responsables del desvío nucleotídico, el cual a su vez afecta la organización génica cromosómica (McDonagh y col., 2000).

2.8. Organelos y particularidades de *Leishmania*

Los organismos del orden Kinetoplástida, al cual pertenece *Leishmania*, tienen un organelo único llamado kinetoplasto, un apéndice de su única mitocondria, localizado cerca del cuerpo basal del flagelo que contiene una red de miles de ADN's circulares pequeños concatenados y que constituyen el ADN mitocondrial. La presencia del kinetoplasto es sólo una de las muchas características distintivas que presentan estos organismos. Una característica excepcional es el fenómeno de corrección ("editing") de los ARNm mitocondriales, consistente en la adición o delección post-transcripcional de uridinas para dar origen a mensajes con sentido (revisado por Hajduk y col., 1993). Por ejemplo, da lugar a la formación de codones de iniciación para la traducción mitocondrial, a la corrección del marco de lectura de genes a nivel de su ARN o, en los casos de una corrección extensiva, da lugar a marcos de lectura completos. La información necesaria para la correcta inserción o delección de uridinas en los ARNm se encuentra en pequeños transcritos mitocondriales llamados ARN guías. La reacción de "editing" es llevada a cabo por un complejo de alto peso molecular que contiene los ARN guías, los ARNm a corregir y proteínas.

En todos los tripanosomátidos, la mayoría de las enzimas glicolíticas se encuentran en organelos especializados llamados glicosomas. Los glicosomas también contienen sistemas enzimáticos peroxisomales típicos y su ruta de biogénesis es similar y homóloga a la de los peroxisomas de otros organismos (revisado por Michels y col. 2000). En los glicosomas están presentes una variedad de vías metabólicas. Los metabolitos de las enzimas contenidas dentro de los glicosomas parecen formar un pool separado de los metabolitos del citosol. La membrana glicosomal forma una barrera por lo que se asume que deben existir proteínas transportadoras específicas en la membrana glicosomal para mediar en el influjo y eflujo de los sustratos y productos de las vías glicosomales. La mayoría de las vías glicosomales utilizan enzimas que catalizan la transferencia de grupos fosfatos y reacciones redox. Estas reacciones involucran ATP-ADP, NAD(P)⁺-NAD(P)H y

pirofosfato inorgánico. Como la membrana glicosomal parece ser impermeable a estos compuestos, su consumo y producción dentro del glicosoma por las distintas vías debe estar balanceado. Esto puede requerir la coordinación de los distintos flujos metabólicos a través del glicosoma.

Los ácidocalcisomas son organelos acídicos ricos en calcio que aunque presentes en varios microorganismos, fueron descritos por primera vez como tales en tripanosomátidos (revisado por Docampo y Moreno, 2001). Se caracterizan por su naturaleza acídica, su alta densidad electrónica y su abundante contenido en polifosfatos, calcio, magnesio y otros elementos. Los ácidocalcisomas no parecen pertenecer a la vía endocítica puesto que marcadores de esta vía no reconocen estos organelos y además de su posible función en el balance de cargas negativas de los polifosfatos, también se ha especulado que puede tener participación en procesos que requieren liberación de Ca^{2+} , como durante la invasión de células huésped.

3. TRANSPORTADORES ABC

Los sistemas ABC constituyen una de las superfamilias más abundantes de proteínas. Están involucrados en el transporte de una gran variedad de compuestos, pero también participan en muchos procesos celulares y su regulación. Así pues, no todas las proteínas ABC son transportadoras. Entre las que no lo son se encuentran proteínas como las de la familia UVR de *E. coli* (revisado por Courcelle y Hanawalt, 2001), implicada en reparación del ADN, o la proteína RLI (inhibidora de Rnasa L) que es un modulador de la actividad de la Rnasa L (Bisbal y col., 1995), o la proteína GCN20 de *S. cerevisiae* que participa en la activación del factor de iniciación de la traducción eIF-2 α (Marton y col., 1997).

Entre los transportadores ABC existen tanto exportadores como importadores. Los importadores son fundamentalmente procarióticos y su principal función es la de proporcionar nutrientes esenciales para la bacteria. Por otra parte los exportadores se encuentran tanto en procariotas como en eucariotas y participan en la extrusión de numerosos y variados compuestos.

3.1. Organización estructural de los transportadores ABC

Los transportadores ABC se componen de cuatro dominios estructurales: dos dominios transmembrana hidrofóbicos (TMD) y dos dominios hidrofílicos citosólicos que llevan la región de unión a ATP (NBD) (figura A3). Estos cuatro dominios constituyen la unidad básica funcional de estas proteínas y pueden expresarse como polipéptidos independientes, como pares de dominios o como una sola proteína. Generalmente los importadores bacterianos presentan los cuatro polipéptidos independientes y necesitan para su función óptima de una proteína de unión al sustrato extracelular. Esta proteína, que es esencial para el transporte, es una proteína periplásmica en el caso de bacterias Gram-negativas o una lipoproteína anclada a la superficie en el caso de bacterias Gram-positivas y Archaea. En cuanto a los exportadores, los cuatro dominios se fusionan de distintas formas. Algunos exportadores procarióticos también requieren la participación de proteínas accesorias. Las proteínas ABC que no son transportadoras no tienen TMDs.

Las proteínas periplásmicas realizan dos funciones relacionadas. Por un lado dan alta afinidad y especificidad por el sustrato. Aunque su mecanismo no se conoce, los transportadores que requieren de estas proteínas poseen una mayor afinidad que los que no las requieren. Además, los transportadores que presentan una amplia especificidad no utilizan proteínas periplásmicas. Por otro lado, estas proteínas también confieren direccionalidad, ya que la mayoría de los transportadores que las requieren funcionan como importadores.

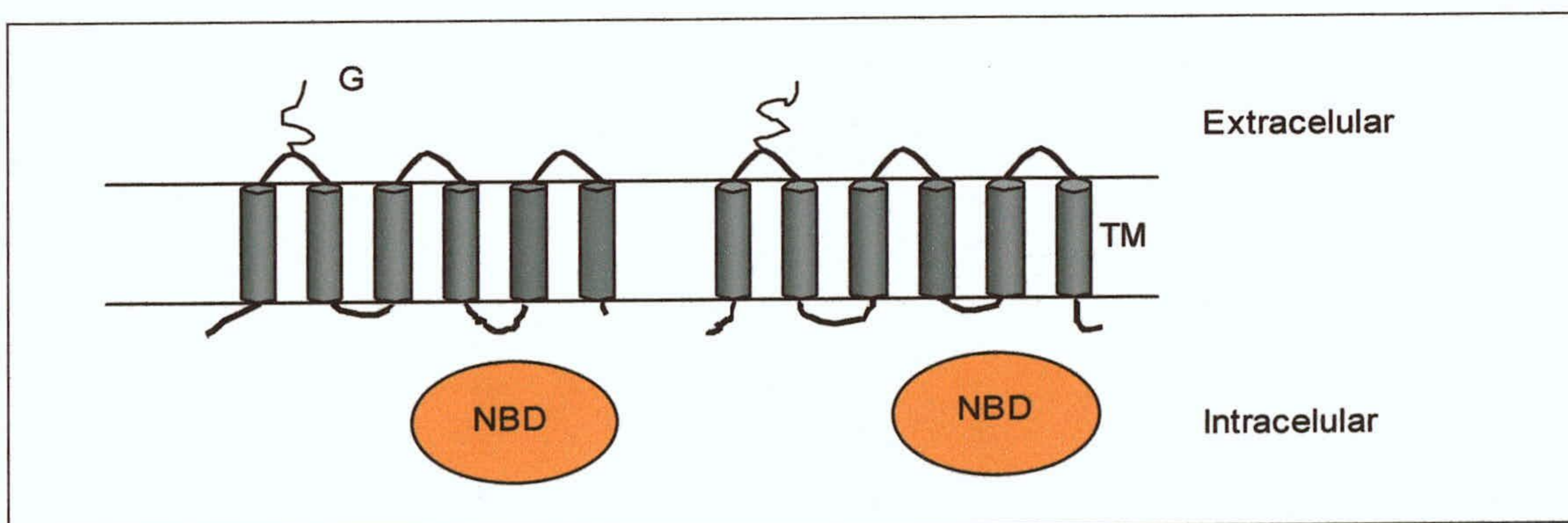


Figura A3. Organización estructural de un transportador ABC típico. Los cuatro dominios que componen una unidad funcional están representados como polipéptidos individuales. Cada dominio transmembrana (TMD) atraviesa seis veces la membrana. Los dominios de unión a nucleótido (NBD) se ubican sobre la cara citosólica de la membrana. Frecuentemente las proteínas ABC se encuentran glicosiladas (G) en eucariotas.

La característica que comparten todas las proteínas de los sistemas ABC es la presencia de un dominio ATPasa o dominio de unión a nucleótido (NBD), que se ha demostrado que une e hidroliza el ATP, proporcionando la energía necesaria para la función de estas proteínas. Este NBD presenta tres motivos muy conservados: los motivos Walker A (GXXGXGKS/T) y Walker B (h4DE/D, donde h corresponde a un residuo hidrofóbico) que se encuentran en muchas ATPasas y un tercer dominio o motivo sello que lleva la secuencia consenso LSGGQ, característica exclusiva de las proteínas ABC. Los NBDs son las regiones más conservadas dentro de las proteínas ABC alcanzando entre un 30 y un 40% de identidad. La integridad de estos dominios es esencial para la función de los transportadores. Se han reportado mutaciones en los NBDs de varios transportadores que inhiben su actividad. Mediante el uso de análogos no hidrolizables se ha demostrado que la hidrólisis del ATP es necesario y ocurre junto con el proceso de transporte. El ATP no es el único sustrato de estos transportadores ya que se ha visto que pueden utilizar otros nucleótidos. Por ejemplo, CFTR utiliza GTP (Randak y col., 1996) y el NBD1 de ABCR funciona como una nucleotidasa general (Biswas, 2001). Varios estudios han demostrado que ambos NBDs de un transportador actúan cooperativamente (Loo y Clarke, 1995; Takada y col., 1998; Urbatsch y col., 1998).

Los TMDs están constituidos por varios segmentos hidrofóbicos en α -hélice que atraviesan la membrana. Para muchos transportadores cada TMD contiene seis segmentos, pero hay variaciones con respecto a esta estructura típica. Por ejemplo, las proteínas MRP contienen 5 segmentos hidrofóbicos adicionales con un extremo amino-terminal extracelular y una región citoplásmica de unión con el resto del transportador. Los TMDs conforman la vía a través de la cual los sustratos atraviesan la membrana y determinan la especificidad del transportador mediante sitios capaces de unirse al sustrato. Las evidencias provienen de varios estudios donde mutaciones en los TMDs pueden cambiar la selectividad del transportador por el sustrato. También experimentos con proteínas quiméricas muestran que la especificidad por el sustrato reside en los TMDs y no en los NBDs. Una quimera construida con los TMDs del transportador MDR1 y los NBDs de MDR2, transporta los sustratos típicos de MDR1 (Buschman y Gros, 1991). Las dos Pgps presentan un alto porcentaje de homología (78% de identidad), sin embargo MDR3 no transporta la mayoría de los sustratos de MDR1. Zhou y col. (1999) también construyeron quimeras MDR1/MDR2 por mutagénesis dirigida, demostrando que el cambio de tres aminoácidos ubicados en el segmento transmembrana 6 de MDR2 es suficiente para que reconozca varios sustratos de MDR1.

Los transportadores ABC poseen una alta afinidad por sus sustratos y funcionan unidireccionalmente para translocar solutos en contra de altos gradientes de concentración. Los sustratos transportados por estas proteínas son muy variables, pudiendo ser iones, metales pesados, carbohidratos, aminoácidos, antibióticos, fármacos anticancerígenos, péptidos, fosfolípidos, esteroides, pigmentos, proteínas, entre otros. Dentro de una célula, los transportadores ABC se encuentran en varios compartimentos: membrana plasmática, peroxisomas, retículo endoplasmático, complejo de Golgi, mitocondrias y vesículas secretorias intracelulares. Así, es concebible imaginar que participan en una gran variedad de actividades biológicas. Se ha demostrado que sus actividades dependen de la formación de complejos funcionales con otras proteínas, como es el caso del transportador SUR el cual se encuentra asociado estrechamente al canal del K^+ KIR6.1 o KIR6.2 (revisado por Baukrowitz y Falker, 2000). También CFTR interacciona con el complejo adaptador endocítico AP-2 a través de un motivo de internalización que contiene el residuo tirosina (YDSI), ubicado en el extremo carboxilo-terminal y que le permite incorporarse a la vía endocítica mediada por clatrina (Weixel y Bradbury, 2000; 2001).

3.2. Clasificación de la familia ABC

En humanos se conocen 48 transportadores ABC que han sido divididos en siete subfamilias (tabla A1) en base a la similitud de sus estructuras génicas y la homología de sus secuencias. La subfamilia ABCA contiene actualmente 12 miembros, entre los cuales se encuentra ABCA1, involucrada en el transporte de colesterol y fosfolípidos, y ABCA4 o ABCR que transporta derivados de vitamina A en las células fotorreceptoras de la retina. La subfamilia ABCB contiene 11 miembros. A esta familia pertenece la Pgp MDR1 (ABCB1), que fue el primer gen en ser clonado y caracterizado por su capacidad de conferir el fenotipo MDR en células de cáncer. La proteína MDR2 o ABCB4 se expresa en el hígado y está involucrada en la secreción de fosfatidilcolina. También en esta familia están las proteínas TAP1 y TAP2 (ABCB2 y ABCB3), los cuales son transportadores configurados por un TMD y un NBD que heterodimerizan para transportar péptidos al retículo endoplásmico, los cuales son presentados como antígenos a moléculas HLA de clase I. La subfamilia ABCC contiene un transportador particular, CFTR o ABCC7 caracterizado como un canal de iones cloro pero que también se ha demostrado ejerce funciones reguladoras sobre otros canales. ABCC8 y ABCC9 son los transportadores SUR que unen sulfonilurea y modulan canales de potasio involucrados en la regulación de la secreción de insulina. El resto de esta subfamilia está compuesta por nueve proteínas MRP relacionadas con

multirresistencia. ABCC1, ABCC2 y ABCC3 transportan compuestos conjugados a glutation y otros aniones orgánicos. ABCC4, ABCC5, ABCC11 y ABCC12 son proteínas más pequeñas que carecen de un dominio amino-terminal. La subfamilia ABCD contiene 4 proteínas transportadores con un TMD y un NBD localizados en el peroxisoma. Las subfamilias ABCE y ABCF contienen proteínas ABC que no son transportadores. Finalmente la subfamilia ABCG contiene seis transportadores con un TMD y un NBD, que a diferencia del resto tiene un NBD en el extremo amino y un TMD en el extremo carboxilo. ABCG1, ABCG5 y ABCG8 están relacionadas con el transporte de esteroides, mientras que ABCG2 o BCRP se ha relacionado con resistencia a fármacos en células tumorales.

GEN	ALIAS	EXPRESION	FUNCION
ABCA1	ABC1	ubicua	Eflujo de colesterol a HDL
ABCA2	ABC2	cerebro	Resistencia a estramustina
ABCA3	ABC3,ABCC	pulmón	
ABCA4	ABCR	Fotorreceptores	Retinoides
ABCA5		Músculo, corazon, testis	
ABCA6		Hígado	Esteroles??
ABCA7		Bazo, timo	
ABCA8		Ovario	
ABCA9		Corazón	
ABCA10		Músculo, corazón	
ABCA12		Estómago	
ABCA13		Bajo en todos los tejidos	
ABCB1	MDR1	Tejido adrenal, riñón, cerebro	Resistencia a multiples fármacos
ABCB2	TAP1	Todas las células	Transporte de péptidos
ABCB3	TAP2	Todas las células	Transporte de péptidos
ABCB4	MDR3	Hígado	Transporte de PC
ABCB5		Ubicua	
ABCB6	MTABC3	Mitocondria	Transporte de hierro
ABCB7	ABC7	Mitocondria	Transporte de Fe/S
ABCB8	MABC1	Mitocondria	
ABCB9		Corazón, cerebro	
ABCB10	MTABC2	Mitocondria	
ABCB11	SPGP	Hígado	Transporte sales biliares
ABCC1	MRP1	Pulmón, testis, PBMC	Resistencia a fármacos
ABCC2	MRP2	Hígado	Eflujo de aniones orgánicos
ABCC3	MRP3	Pulmón, intestino, hígado	Resistencia a fármacos
ABCC4	MRP4	Próstata	Transporte de nucleósidos
ABCC5	MRP5	Ubicua	Transporte de nucleósidos
ABCC6	MRP6	Riñón, hígado	
ABCC7	CFTR	Tejido exocrino	Canal de iones cloruro
ABCC8	SUR	Páncreas	Receptor de sulfonilurea
ABCC9	SUR2	Corazón, músculo	
ABCC10	MRP7	Baja en todos los tejidos	
ABCC11	MRP8	Baja en todos los tejidos	
ABCC12	MRP9	Baja en todos los tejidos	
ABCD1	ALD	Peroxisomas	Regulación de transporte de ácidos grasos de cadena muy larga
ABCD2	ALDL1,ALDR	Peroxisomas	
ABCD3	PXMP1,PMP70	Peroxisomas	
ABCD4	PMP69,P70R	Peroxisomas	
ABCE1	OABP,RNS41	Ovario, testis, bazo	Proteína de unión a oligoadenilato
ABCF1	ABC50	Ubicua	
ABCF2		Ubicua	
ABCF3		Ubicua	
ABCG1	ABC8, White	Ubicua	Transporte de colesterol?
ABCG2	BCRP,ABCP,MXR	Placenta, intestino	Resistencia a fármacos
ABCG4	White2	Hígado	
ABCG5	White3	Hígado, intestino	Transporte de esteroides de plantas
ABCG8		Hígado, intestino	Transporte de esteroides de plantas

Tabla A1. Lista de genes ABC humanos pertenecientes a las siete subfamilias descritas. La nomenclatura se basa en la propuesta recientemente realizada por Wain y col. (2000). Se detallan también, cuando corresponde, los nombres originales o alternativos de los genes. Adaptado de Dean y col., 2001.

Desde el punto de vista médico, varias proteínas ABC de mamíferos poseen gran relevancia ya que se han identificado mutaciones en sus correspondientes genes que resultan en severas enfermedades genéticas. Entre éstas se encuentran la fibrosis quística, la adrenoleucodistrofia, la colestasis hepática, la distrofia macular de Stargard y la enfermedad de Tangier. Las proteínas ABC relacionadas con éstas y otras enfermedades se detallan en la tabla A2. Además, la sobreexpresión de ciertos transportadores ABC es la causa más frecuente de resistencia a agentes citotóxicos como antibióticos, antifúngicos, herbicidas y fármacos anticancerígenos. En particular la glicoproteína-P (Pgp) codificada por el gen *MDR1* de mamíferos, ha mostrado ser una de las principales responsables del fenotipo de multirresistencia (MDR) en células tumorales, siendo capaz de transportar un gran número de compuestos hidrofóbicos, así como otras moléculas tales como lípidos, esteroides, xenobióticos y péptidos (revisado por Ambudkar y Gottesman, 1998). Las proteínas MRP también se han relacionado con el fenotipo MDR, siendo capaces de conferir resistencia a varios fármacos como doxorubicina, daunomicina, vincristina y colchicina. A diferencia de *MDR1*, *MRP1* transporta compuestos conjugados con glutatión. Más recientemente se ha descrito la proteína de resistencia en cáncer de mama (BCRP o ABCG2) que confiere resistencia a antraciclinas anticancerígenas (Allikmets y col., 1998; Doyle y col., 1998; Miyake y col., 1999) y cuyo gen está amplificado o involucrado en translocaciones cromosómicas en líneas celulares seleccionadas por tratamiento con topotecano, mitoxantrona o doxorubicina. BCRP es un transportador constituido por un TMD y un NBD, y se cree que funciona como un homodímero. Proteínas ABC relacionadas con resistencia también existen en otros organismos, como LmrA de *Lactococcus lactis*, Pdr5p, Ycf1p y Yor1p de *Saccharomyces cerevisiae*, y Cdr1p de *Candida albicans* (Bauer y col., 2000).

TRANSPORTADOR	ENFERMEDAD
CFTR (ABCC7)	Fibrosis quística
ALD (ABCD1)	Adrenoleucodistrofia
PMP70 (ABCD3)	Síndrome de Zellweger
MDR3 (ABCB4)	Colestasis intrahepática familiar
MRP2 (ABCC2)	Síndrome Dubin-Johnson
MRP6 (ABCC6)	Seudoxantoma elástico
ABCR (ABCA4)	Distrofia macular de Stargardt; Retinitis pigmentosa
ABCA1	Enfermedad de Tangier; Hipercolesterolemia familiar
ABCG5	Sitosterolemia
ABCG8	Sitosterolemia
SUR (ABCC8)	Hipoglucemia hiperinsulinémica persistente familiar
ABC7 (ABCB7)	Anemia y ataxia sideroblástica ligada al sexo
TAP1/2 (ABCB2/3)	Infeción?

Tabla A2. Lista de transportadores y enfermedades causadas por mutaciones en sus genes correspondientes.

3.3. Mecanismo de transporte y topología de las proteínas ABC

Desde el punto de vista estructural, debido a la dificultad para trabajar con estas proteínas, no ha sido hasta los últimos años cuando se ha comenzado a avanzar en la resolución de sus estructuras tridimensionales. Se han determinado las estructuras cristalinas de varios NBDs, como el de la proteína HisP de *Salmonella typhimurium* (Hung y col., 1998), el de MalK de *Thermococcus litoralis* (Diederichs y col., 2000), el de RbsA (Armstrong y col., 1998) y la proteína Rad50 de *Pyrococcus furiosus* (Hopfner y col., 2000). Las estructuras de todos ellos, aunque diferentes en relación a otras ATPasas, comparten muchas similitudes. Son estructuras en forma de L con dos brazos gruesos conectados por seis láminas β . Rosenberg y col. (1997) presentaron la estructura a baja resolución (2.5 nm) de una proteína ABC completa, la Pgp, a partir de datos de microscopía electrónica. Globalmente la proteína fue descrita como un cilindro, que si se mira desde el espacio extracelular es un poro de forma cónica con un diámetro máximo de 5 nm que se va afinando hacia la base que se enfrenta a la cara interna de la membrana. Este poro está delimitado por los dos TMDs del transportador. Además, la topología de la Pgp ha sido abordada con otros estudios como el mapeo de epítopes. Estos abordajes y otros han llevado a proponer varios modelos topológicos para la proteína (ver Zhang, 2001).

Aún no se conoce el mecanismo preciso por el cual los transportadores ABC translocan sus sustratos a través de la membrana. Se sabe que la especificidad por un sustrato determinado reside en los TMDs de la proteína ABC, por lo que esta

interacción debe ser específica para cada transportador. Por otra parte, los NBDs, que presentan una considerable homología de secuencia, realizan una función similar en todas las proteínas, consistente en unir e hidrolizar el ATP para proporcionar la energía necesaria para el proceso de transporte. Sin embargo, estos dominios deben ser capaces de recibir las señales intramoleculares provenientes de los TMDs, que indican la presencia del sustrato y consecuentemente realizar la hidrólisis del ATP. Finalmente, la utilización de la energía liberada se cree que facilita cambios conformacionales que resultan en el movimiento del sustrato de un lado a otro de la membrana. Se ha demostrado que la conformación de la Pgp cambia durante su ciclo catalítico y al unirse a sus sustratos. Dos modelos han intentado explicar el mecanismo por el cual los variados sustratos de la Pgp son transportados. El modelo de aspiradora hidrofóbica plantea que los fármacos hidrofóbicos son directamente expulsados por la proteína desde la membrana plasmática (Gottesman, 1993), mientras que otro modelo plantea que la Pgp actúa como una "flipasa" (en realidad debería ser flopasa), transportando sustratos desde la cara interna de la bicapa lipídica a la cara externa (Higgins, 1992). En consecuencia, el coeficiente de partición y la lipofilicidad de los compuestos deben ser factores claves para determinar la eficiencia de transporte de la Pgp. La amplia selectividad de este transportador puede explicarse entonces porque sus sustratos potenciales deben ser capaces de intercalarse en la bicapa donde serían reconocidos por la Pgp.

La existencia de estados conformacionales de la Pgp durante el ciclo catalítico fue propuesta por Senior y col. (1995) y apoyada por otros investigadores utilizando proteólisis de vesículas de membrana aisladas (Shapiro y col., 1996; Wang y col., 1997). Se ha propuesto, en el caso de los exportadores, la existencia de sitios de unión al sustrato de alta afinidad que se encuentran en el interior de la membrana, reorientándose como consecuencia de los cambios conformacionales para quedar expuestos al exterior de la membrana con una afinidad reducida y como consecuencia el sustrato es liberado (Higgins, 2001). También se han investigado los cambios conformacionales de la Pgp por unión de ligandos o sustratos. Sonveaux y col. (1999) investigaron el "quenching" de la fluorescencia intrínseca de la Pgp purificada y reconstituída. Estos experimentos mostraron que la proteína adopta conformaciones diferentes al unirse a antraciclinas en ausencia y presencia de ATP.

Los diversos estudios realizados sobre la Pgp han llevado a plantear la existencia de topologías alternativas de esta proteína. Entonces, Zhang (2001) ha propuesto que las estructuras topológicas de la Pgp cambian durante el proceso de

transporte. Es posible que los segmentos transmembrana que, en los diferentes estudios, se han ubicado tanto en el citoplasma como en el espacio extracelular, constituyan la parte móvil del transportador. Estos segmentos se deslizarían a través del canal hidrofóbico formado por los segmentos estacionarios embebidos en la membrana, para translocar fármacos desde dentro hacia fuera (Zhang, 2001).

Recientemente Rosenberg y col. (2001) estudiaron, mediante microscopía electrónica de cristales bidimensionales, los cambios conformacionales de la Pgp inducidos durante varias de las etapas del ciclo catalítico. La estructura nativa de la proteína parece formar una cámara constituida por los dos TMD de 60-70 Å de diámetro dentro de la membrana abierta hacia el espacio acuoso. Los "gaps" que quedan entre los dos TMDs parecen formar sitios de entrada a la cámara desde la fase lipídica, lo que permitiría el acceso del sustrato a la cámara desde la cara interna de la bicapa, tal como predice el modelo flipasa. Los NBDs se localizan en la cara citoplásmica de la membrana pero no está clara la interacción con los TMDs. Durante las diferentes etapas del ciclo catalítico la proteína sufre una gran reorganización dentro del plano de la membrana, como consecuencia de la unión del ATP a los NBDs, que implican reempaquetamiento de los segmentos TM. Rosenberg y col. (2001), a diferencia del modelo planteado por Zhang, proponen que las hélices α de los TMD rotan en el plano de la membrana y como resultado se crean nuevas interacciones entre hélices que producen la exposición de sitios involucrados en la unión al sustrato.

Este año se publicó la primera estructura de alta resolución (4.5 Å) de un transportador ABC completo (Chang y Roth, 2001). Se trata de la proteína transportadora del lípido A, MsbA de *Escherichia coli*. La estructura presentada por estos investigadores apoya los datos bioquímicos que muestran que la vía a través de la cual los sustratos atraviesan la membrana está exclusivamente formada por los TMDs y que los segmentos que los componen son realmente α -hélices. Los NBDs presentan una estructura similar a la determinada por otros estudios. Una novedad está constituida por el hecho de que los TMDs y los NBDs parecen estar unidos por un corto puente compuesto de loops transmembranas intracelulares. Este puente, denominado dominio intracelular, podría ser la región encargada de la transmisión de señales entre los TMDs y los NBDs. De hecho, la mayoría de los residuos que conforman esta región se encuentran muy conservados entre las proteínas ABC. Los dos TMDs forman una cámara de estructura simétrica dentro de la membrana que se abre hacia la cara citoplásmica (figura A4) proporcionando un lugar de entrada para el sustrato y que cambiaría su orientación para permitir el acceso del sustrato a la cara

externa de la membrana. Esta estructura resulta diferente de la propuesta para la Pgp por Rosenberg y col. (1997;2001). En un intento por explicar esta discrepancia, Higgins y Evan (2001) proponen que las diferencias pueden simplemente reflejar la naturaleza dinámica de los transportadores ABC. Por consiguiente, tanto las estructuras como los mecanismos de translocación continúan siendo aspectos de investigación y debate.

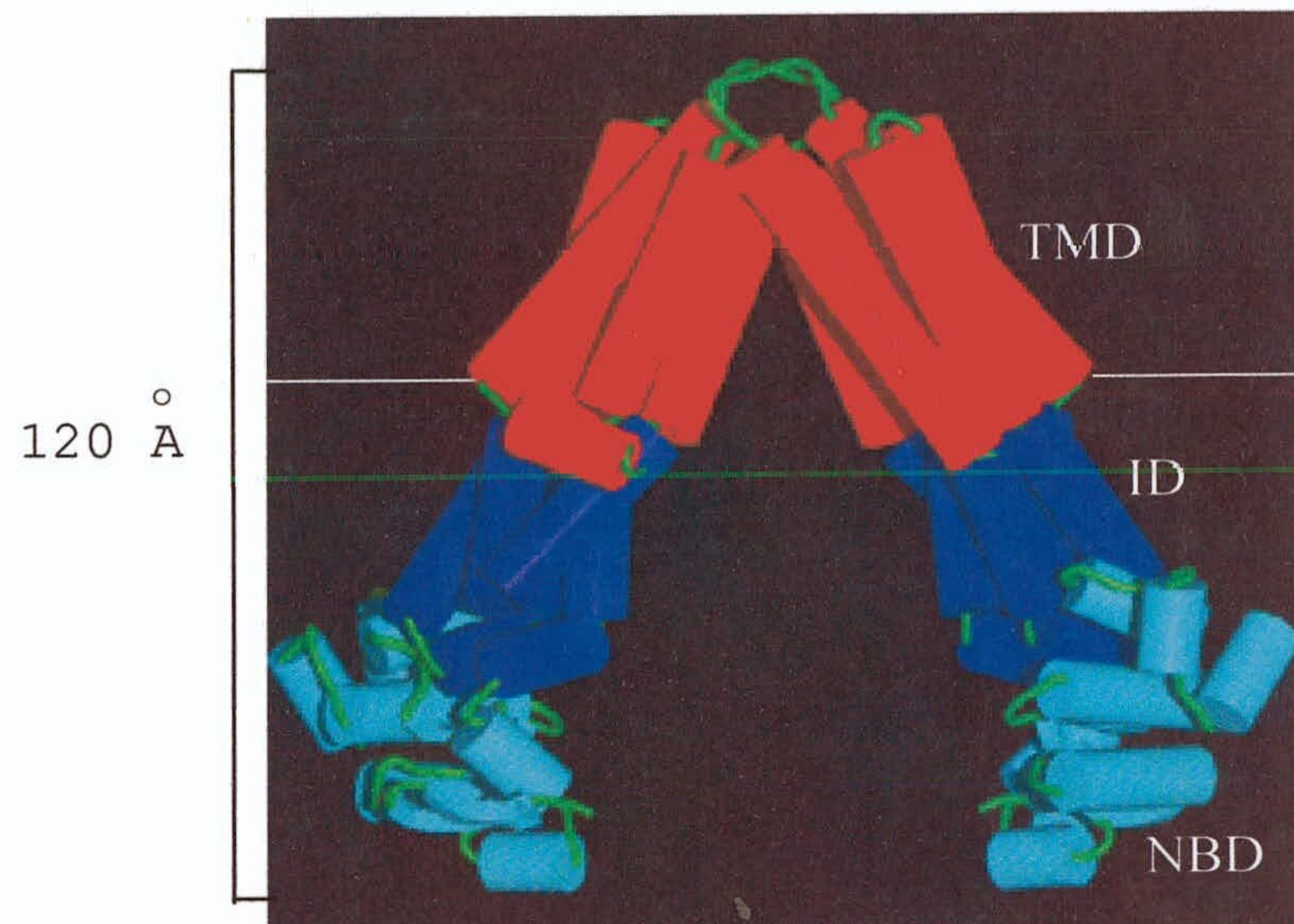


Figura A4. Estructura de la proteína MsbA. Los TMD están representados en rojo, los dominios intracelulares en azul y los NBD en celeste. Las líneas blancas delimitan la porción de la proteína que se encuentra en la membrana (arriba) y la porción citosólica (abajo).

La actividad ATPasa de varios transportadores ABC ha sido investigada tanto *in vitro*, utilizando NBDs purificados, como en sistemas de expresión en células de insecto Sf9. La actividad ATPasa de membranas de células Sf9 que sobreexpresan una determinada proteína puede determinarse en presencia de sustratos potenciales para esta proteína. Así pues, se ha visto que la actividad ATPasa basal de varias MRPs es muy baja y sólo aumenta en presencia de sustratos (Bakos y col., 1998;2000). En contraste, la actividad basal de MDR1 es de alrededor de 15 nmol/mg/min y es estimulada a 65 nmol/mg/min en presencia de verapamilo (Sarkadi y col., 1992).

Se ha demostrado que la actividad de varias proteínas ABC está regulada por el estado de fosforilación de la proteína. Fosforilaciones en la región de unión de las dos mitades del transportador Pgp pueden modular la interacción con ciertos fármacos (Szabo y col., 1997). Además, se piensa que la Pgp es capaz de regular una actividad

canal de cloro activada por volumen y se ha propuesto que las dos actividades de esta proteína, transporte o regulación del canal, son moduladas por diferentes estados de fosforilación de la Pgp (revisado por Idriss y col., 2000).

4. PROTEINAS ABC Y TRANSPORTE DE LÍPIDOS

4.1. Propiedades de las membranas

Los fosfolípidos de la membrana plasmática de las células animales se distribuyen asimétricamente en la bicapa lipídica. Los aminofosfolípidos, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina, se concentran en la cara interna de la membrana, mientras que los fosfolípidos de colina, fosfatidilcolina y esfingomielina se ubican preferentemente en la cara externa. Esta observación se realizó por primera vez en la membrana de eritrocitos en la década de los 70 (revisado por Raggars y col. 2000) y permitió establecer el concepto de la asimetría de lípidos como una propiedad general de las membranas plasmáticas. Los primeros modelos proponían que esta asimetría era resultado de un equilibrio entre el movimiento espontáneo de lípidos a través de la bicapa e interacciones específicas de los aminofosfolípidos con proteínas internas del citoesqueleto. Más tarde, estos modelos fueron reemplazados por otros que planteaban la existencia de proteínas de membrana integrales que actuaban como transportadores de lípidos entre las dos caras de la membrana. Además, pronto se hizo evidente que la distribución asimétrica de los fosfolípidos en la membrana no era una propiedad estable sino que podía alterarse en respuesta a determinadas situaciones, siendo por tanto dinámica y regulada. La bicapa lipídica dejó entonces de ser considerada como una estructura pasiva que alberga proteínas funcionalmente activas, para llegar al concepto de que los lípidos así como las propiedades físicas de la bicapa juegan roles importantes en procesos celulares.

La primera evidencia del papel de una proteína de membrana en el mantenimiento de la asimetría de lípidos provino de los trabajos de Seigneuret y Devaux en 1984, quienes demostraron un movimiento específico hacia el interior celular de análogos de fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina en membranas de eritrocitos humanos. Sus resultados fueron corroborados por otros investigadores utilizando todo tipo de análogos (revisado por Bevers, 1999).

Esta actividad denominada aminofosfolípido translocasa, ha sido identificada en una variedad de membranas plasmáticas (revisado por Daleke y Lyles, 2000), pero su identidad molecular aún no ha sido establecida con certeza. Se ha purificado una proteína candidata a partir de eritrocitos (Auland y col. 1994), vesículas sinápticas y gránulos cromafines (Tang y col., 1996). Esta consiste en una ATPasa de 115-120 kDa dependiente de iones magnesio. El clonaje de esta ATPasa a partir de gránulos cromafines bovinos y levaduras (Tang y col., 1996), reveló que se trataba de un miembro de la subfamilia de ATPasas tipo P. Sin embargo, la función de esta proteína como una aminofosfolípido translocasa ha sido cuestionada, ya que la delección de *DRS2*, el gen homólogo de levaduras, no tiene efecto sobre la internalización o distribución de análogos de fosfatidilserina o fosfatidiletanolamina fluorescentes ni sobre la cantidad de aminofosfolípidos endógenos expuestos en la cara externa de la membrana plasmática (Siegmund y col., 1998; Marx y col., 1999).

Ya que en la mayoría de las células de mamíferos los aminofosfolípidos se localizan predominantemente en la cara citoplásmica de la membrana, es lógico suponer que la aminofosfolípido translocasa sea una proteína ubicua. De hecho se ha demostrado su actividad en varios tipos celulares (Connor y col., 1989). De acuerdo con su pertenencia a la familia de ATPasas tipo P, la aminofosfolípido translocasa puede ser inhibida por vanadato. Se ha visto además que niveles micromolares de Ca^{2+} intracelular inhiben también su actividad (Daleke y Lyles, 2000).

La pérdida de la distribución asimétrica en las membranas se traduce en importantes funciones de señalamiento y reconocimiento (revisado en Zwaal y Schroit, 1997). La pérdida de asimetría resulta de la aparición de fosfatidilserina en la superficie celular, la cual ocurre bajo determinadas situaciones como son la activación celular. La primera observación de este fenómeno se realizó sobre plaquetas, donde la exposición de fosfatidilserina activa la superficie celular para que se ensamblen los complejos de proteasas involucrados en la coagulación sanguínea (Bervers y col., 1982; Bervers y col., 1983). El movimiento de lípidos a través de la membrana que resulta en exposición de fosfatidilserina, también ha sido demostrado en varios otros tipos celulares como linfocitos, células endoteliales, eritrocitos y células tumorales. En la mayoría de los casos este movimiento de lípidos es resultado de un incremento en la concentración de calcio intracelular, lo cual tiene importantes implicaciones fisiológicas y patológicas en varios procesos como son la coagulación sanguínea, la apoptosis, y el reconocimiento célula-célula.

En un sistema de ensayo continuo del movimiento de lípidos en la membrana de plaquetas activadas, utilizando análogos fluorescentes NBD y reducción con ditionito, se demostró un movimiento bidireccional de fosfolípidos reversible e independiente del grupo polar del fosfolípido. Esta actividad "scramblasa" fue sensible al reactivo sulfidrilo piridilditioetilamina, sugiriendo que una proteína está involucrada en este proceso (Williamson y col., 1995). Más tarde esta proteína fue purificada a partir de eritrocitos (Bassé y col., 1996), demostrándose que participa en el movimiento de fosfolípidos de una manera dependiente de Ca^{2+} . Zhou y col. (1997) clonaron el gen que la codifica y demostraron la existencia de un motivo de unión a Ca^{2+} (Zhou y col., 1998). Se cree que un mal funcionamiento de la "scramblasa" es el responsable de una enfermedad denominada síndrome de Scott, que se caracteriza por incapacidad de movilizar fosfatidilserina desde la cara interna a la superficie en respuesta a una elevación del Ca^{2+} (Zhou y col., 1998).

A diferencia del creciente grupo de evidencias que se acumulan en cuanto a la translocación hacia la cara interna de aminofosfolípidos, se conoce muy poco sobre cómo la fosfatidilcolina se mantiene predominantemente en la cara externa de la membrana. Es posible que este fosfolípido permanezca fuera sólo como consecuencia de requerimientos estructurales impuestos por el mantenimiento activo de los aminofosfolípidos en la cara interna. Otra posibilidad es la existencia de actividades transportadoras. Estudios con eritrocitos han demostrado la existencia de una "flopasa" capaz de facilitar la migración de lípidos a través de la bicapa en dirección opuesta a la aminofosfolípido translocasa (Connor y col., 1992). Esta actividad mostró ser más inespecífica en cuanto al tipo de fosfolípido y dependiente de temperatura y ATP. La velocidad media de movimiento de lípidos hacia fuera es de 1,5 horas, mucho más lenta que la velocidad de movimiento hacia adentro mediada por la aminofosfolípido translocasa (5-10 minutos). Ambas actividades parecen operar independientemente ya que se ha demostrado que el movimiento de aminofosfolípidos hacia el interior no afecta la velocidad de movimiento hacia el exterior (Connor y col., 1992). De hecho, como veremos más adelante varias proteínas ABC están involucradas en el transporte de lípidos hacia la cara externa de la membrana.

La exposición de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana también constituye una señal para el reconocimiento y la fagocitosis de células apoptóticas por parte de macrófagos (Fadok y col., 1992). De hecho, células apoptóticas que no expresan externamente fosfatidilserina no son fagocitadas por macrófagos, a pesar de que muestran el resto de cambios morfológicos y bioquímicos típicos de la apoptosis

(Fadok y col., 2001). Se ha propuesto que la externalización de fosfatidilserina es el resultado de un balance entre la aminofosfolípido translocasa y la "scramblasa", reguladas por iones Ca^{2+} intracelulares, los cuales ejercen efectos opuestos sobre la función de ambas proteínas. Bratton y col. (1997) demostraron que la exposición de fosfatidilserina en la etapa temprana de la apoptosis es consecuencia de una activación de la "scramblasa" y una concomitante inhibición de la aminofosfolípido translocasa. Sin embargo, la relación entre los niveles de Ca^{2+} intracelular y el movimiento de lípidos en las células apoptóticas no está clara. La quelación del Ca^{2+} intracelular no parece afectar la exposición de fosfatidilserina, aunque el Ca^{2+} extracelular parece ser esencial, sugiriendo que la entrada de este ión es la señal para el movimiento de lípidos (Hampton y col., 1996). Se ha propuesto, como veremos más adelante, que transportadores ABC de lípidos pueden jugar un papel facilitador de la fagocitosis durante este proceso mediante la distribución transversal y lateral de los lípidos de la membrana (Fadok y Chimini, 2001).

La cara citosólica del retículo endoplasmático (RE) es el sitio de síntesis de numerosos lípidos de membrana como los glicerofosfolípidos. Así los lípidos deben moverse a través de la membrana del RE y este movimiento, que está mediado por proteínas, tiende a equilibrar los lípidos entre ambas caras (Herrmann y col., 1990). El proceso de translocación de fosfatidilserina a la mitocondria desde su lugar de síntesis en membranas del RE, fue investigado usando un sistema reconstituido *in vitro*, y se observó que en esta translocación está implicada una proteína de membrana mitocondrial, que es estimulada por Mg^{2+} y Ca^{2+} e inhibida por agentes reactivos de grupos sulfidrilos (Shiao y col. 1998). Además de los fosfolípidos, lípidos más complejos deben atravesar la membrana del RE, durante los procesos de síntesis de proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) y de N-glicosilación de proteínas que ocurren en la superficie luminal del RE, mientras que los precursores fosfatidilinositol glicosilado y fosfodolicol se sintetizan en la superficie citosólica. También C_6 -NBD-galactosil-ceramida, la cual es sintetizada en el lumen del RE, se vuelve rápidamente disponible sobre la cara citosólica (Burger y col., 1996). La glucosilceramida es sintetizada en la superficie citosólica del complejo de Golgi y dado que las enzimas que actúan en etapas posteriores de la síntesis de glicosfingolípidos se encuentran en el lumen, la glucosilceramida debe translocarse desde la cara citosólica a la luminal del Golgi. Usando análogos de lípidos de cadena corta sobre membranas enriquecidas, se ha sugerido que esta translocación es dependiente de ATP (Burger y col., 1996; Lannert y col., 1998). Así pues, varias actividades proteicas

deben estar implicadas en el movimiento intracelular de lípidos, muchas de las cuales pueden ser transportadores ABC aún no identificados.

4.2. Transportadores ABC implicados en el movimiento de lípidos

El primer transportador ABC que se demostró que está implicado en el transporte de lípidos fue la glicoproteína-P codificada por el gen *Mdr2* en ratón o *MDR3* en humanos (Ruetz y Gros, 1994; Smit y col., 1994). La función de este transportador no se conocía hasta que Smit y col. (1993) generaron un ratón homocigota nulo para *Mdr2* y encontraron que era completamente incapaz de secretar fosfatidilcolina en la bilis. Este defecto producía daño en el hígado como consecuencia de altas concentraciones de sales biliares. De hecho, una deficiencia en la Pgp MDR3 humana, homóloga de *Mdr2* de ratón, produce colestasis intrahepática familiar progresiva (De Vree y col., 1998), enfermedad caracterizada por la ausencia de secreción de ácidos biliares y la acumulación de compuestos tóxicos en el hígado que dañan a los hepatocitos. La excreción de fosfatidilcolina en la bilis de los ratones *Mdr2*^{-/-} puede restaurarse por la expresión del gen *MDR3* humano en los hepatocitos (Smith y col., 1998; Crawford y col., 1997), demostrándose así que las Pgps murina y humana cumplen la misma función.

Ruetz y Gros (1994) abordaron el estudio de la función de esta proteína utilizando mutantes de levadura sensibles a temperatura que transfectaron con el gen *mdr2*. Estas células tienen defectos en el transporte vesicular y bajo la temperatura restrictiva acumulan vesículas en ruta hacia la superficie. Utilizando estas vesículas como modelo para el estudio de la capacidad transportadora de esta proteína, los autores demostraron que la Pgp-Mdr2 transloca un análogo de fosfatidilcolina, mostrando una alta especificidad por análogos de fosfolípidos que contienen colina. Además, dicha translocación podía ser inhibida por el inhibidor de Pgps verapamilo.

Los resultados de Ruetz y Gros fueron apoyados por los estudios de Van Helvoort y col. (1996), quienes utilizaron monocapas de células de riñón para estudiar el transporte de fármacos y de una variedad de análogos de lípidos. Las células fueron cultivadas en presencia de un precursor lipídico de cadena corta que es captado y convertido en el análogo lipídico correspondiente. El producto puede ser extraído de la cara externa de la membrana celular por BSA si es transportado activamente a través de ésta. De esta forma, confirmaron la especificidad de la Pgp-MDR3 por lípidos con colina. Esta proteína también mostró especificidad por las porciones de ácidos grasos:

translocó C₆-NBD-PC, un análogo con un ácido graso de 16 carbonos en la posición *sn*-1 y un ácido graso de 6 carbonos fluorescente en la posición *sn*-2, pero no un análogo de fosfatidilcolina con ácidos grasos de 8 carbonos.

La fosfatidilcolina es sintetizada en el retículo endoplásmico, por lo que se propuso que era transportada desde el retículo endoplásmico a la cara interna de la membrana canalicular del hepatocito a través de la proteína de transferencia de fosfatidilcolina (Smit y col. 1993). Cuando fibroblastos que expresan el gen *MDR3* fueron marcados con ¹⁴C-colina e incubados con la proteína de transferencia de fosfatidilcolina y liposomas aceptores, se observó una mayor transferencia de fosfatidilcolina radiactiva a la cara externa de la membrana, al compararlos con fibroblastos controles (Smit y col. 1994).

Aunque *Mdr2/MDR3* se expresa en hígado donde cumple una función específica como translocador de fosfatidilcolina, se han detectado bajos niveles de ARN en otros tejidos, como corazón y músculo esquelético, aunque la proteína no se detecta por inmunohistoquímica o Western blot (Smit y col. 1994). Sin embargo, los ratones *Mdr2(-/-)* pueden ser rescatados con un transgen *MDR3* expresado sólo en el hígado bajo un promotor específico (Smith y col., 1998), lo que apunta a que su principal función, si no exclusiva, la realiza en este órgano.

Por otra parte, las Pgps responsables del fenotipo de multirresistencia a fármacos (MDR) codificadas por el gen *MDR1* humano y *mdr1a/mdr1b* de ratón, también son capaces de transportar lípidos. Utilizando análogos de fosfolípidos de cadena corta se demostró que células humanas transfectadas con el gen *MDR1* eran capaces de translocar estos análogos de la cara interna a la cara externa de la membrana plasmática mostrando un amplio rango en cuanto al grupo polar del fosfolípido transportado (van Helvoort y col. 1996; van Helvoort y col. 1997). Este transporte era inhibido por verapamilo y PSC833, y también por depleción de energía. Más recientemente, se ha demostrado que *MDR1* es capaz de transportar a través de la membrana plasmática el factor activador de plaquetas (PAF), el cual es un análogo de cadena corta de fosfatidilcolina (Raggers y col., 2001). PAF es un lípido natural sintetizado por una variedad de células y está implicado en numerosos procesos biológicos como la activación de células inflamatorias y otros efectos fisiológicos. Para ejercer su acción PAF debe ser transportado a la superficie celular donde interacciona con un receptor específico en la célula diana (revisado por Prescott y col., 2000). Es posible entonces que PAF sea uno de los sustratos naturales de *MDR1*.

Aunque van Helvoort y col. (1996) demostraron que MDR1 también transloca versiones más naturales de lípidos que carecen de la mitad NBD, no se conoce si MDR1 es capaz de transportar lípidos de membrana naturales. De hecho, los ratones *Mdr2(-/-)* no secretan nada de fosfolípidos de cadena larga en la bilis a pesar de que hay cantidades sustanciales de proteínas *Mdr1a* y *Mdr1b* en la membrana canalicular del hepatocito y el gen *Mdr1* de ratón no es capaz de restaurar el transporte de fosfatidilcolina en ratones *Mdr2(-/-)* (Smit y col., 1993). Además, ratones *Mdr1a/Mdr1b(-/-)* no muestran defectos detectables en el metabolismo de lípidos (Schinkel y col., 1997).

Utilizando la línea celular multirresistente CEM/VBL300 que sobreexpresa la proteína MDR1, Bosch y col. (1997) demostraron que estas células acumularon menos análogos fluorescentes de cadena corta de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina que las células parentales, mientras que no hubo diferencias en la acumulación de fosfatidilserina entre ambos tipos de células. La acumulación de estos fosfolípidos en las células que expresan MDR1 aumentó en presencia de los agentes revertidores del fenotipo MDR verapamilo, ciclosporina A y PSC833, sugiriendo una actividad de eflujo dependiente de MDR1.

Los transportadores de fármacos anticancerígenos MRPs también están relacionados con el transporte de lípidos. MRP1 transfectado en células de riñón transportó C_6 -NBD-GlcCer y C_6 -NBD-SM y este transporte fue inhibido por los moduladores de MRP sulfonilpirazona e indometacina, pero no por el inhibidor de MDR1 PSC833 (Raggers y col., 1999). Dekkers y col. (1998) demostraron que MRP1 podía translocar además C_6 -NBD-PS y C_6 -NBD-PC pero no fosfatidilserina endógena, por lo que concluyeron que MRP1 debía reconocer a estos análogos de lípidos modificados como xenobióticos para expulsarlos fuera de la célula. En un estudio posterior, este mismo grupo comparó la distribución en la membrana de eritrocitos de fosfolípidos endógenos y de análogos NBD en ausencia o presencia de inhibidores de MRP1 (Dekkers y col., 2000). Observaron una distribución muy similar con ambos tipos de fosfolípidos y la inhibición prolongada de MRP1 no sólo resultó en cambios en la distribución de los NBD-fosfolípidos sino también de fosfolípidos de colina y esfingomielina endógenos, proponiendo en consecuencia que MRP1 tiene un papel activo en la orientación de fosfatidilcolina y esfingomielina en la cara externa de la membrana de los eritrocitos.

Más recientemente, un miembro de la subfamilia ABCG, ABCG1 (ABC8) se ha descrito como un regulador del transporte de fosfolípidos y colesterol en macrófagos. Este transportador exhibe una alta homología con el gen *white* de *Drosophila*, cuyo producto junto con los de los genes *scarlet* y *brown*, transporta precursores de los pigmentos de los ojos. ABCG1 se expresa en la superficie celular y en compartimentos intracelulares de macrófagos cargados con colesterol; su expresión se induce en macrófagos durante la incorporación de colesterol y se inhibe durante su liberación (Klucken y col., 2000). Por otra parte, mutaciones en ABCG5 y ABCG8 causan una enfermedad autosómica recesiva rara denominada sitosterolemia, la cual se caracteriza por una hiperabsorción de esteroides vegetales (sitosteroides), hipercolesterolemia y disminución de la excreción biliar de esteroides de la dieta. Se ha demostrado que estos transportadores participan en la captura intestinal de esteroides (Berge y col., 2000; Lee y col., 2001). ABCG4 presenta un 72% de identidad con ABCG1 y se ha mostrado que su expresión es regulada por oxisteroides y retinoides (Engel y col., 2001).

Otro transportador cuyo gen han sido encontrado mutado en la adrenoleucodistrofia (ALDP) fue propuesto como regulador del transporte peroxisomal para ácidos grasos de cadena muy larga (Mosser y col., 1993). Esta enfermedad neurodegenerativa se caracteriza por una acumulación de ácidos grasos de cadena muy larga (>C22:0) en el suero, debida a un defecto en la β -oxidación de estos ácidos grasos en los peroxisomas. Estudios genéticos y bioquímicos en *Saccharomyces cerevisiae* mostraron que dos homólogos de ALDP, Pat1p y Pat2p tienen una función importante en la β -oxidación de ácidos grasos de cadena larga como oleato (C18:1) y palmitato (C16:0), pero no ácidos grasos de cadena media como miristato (C14:0) (Hetteima y col., 1996). ALDP parece ensamblarse con la proteína relacionada con ALDP (ALDPR) para formar un heterodímero funcional. Recientemente, mediante estudios genéticos con ratones que carecen de ALDP, se ha descrito que ALDP puede estar implicado en la localización perixosomal de la acil-CoA sintetasa de cadena muy larga (VLACS), la cual es deficiente en enfermos de adrenoleucodistrofia. La sobreexpresión de VLACS en fibroblastos deficientes de ALDP no corrige el defecto de la β -oxidación, mientras que si lo hace la coexpresión de VLACS y ALDP, sugiriendo que la enzima requiere la función del transportador (Yamada y col., 2000).

En levaduras se emplearon mutantes defectivos en el transporte de aminofosfolípidos y el análisis de mutantes que acumulan fosfatidiletanolamina permitió identificar a dos reguladores transcripcionales, PDR1 y PDR3, implicados en

resistencia a fármacos (Kean y col., 1997). Esto sugirió que transportadores de fármacos regulados por estos factores de transcripción podían ser los responsables del eflujo de fosfatidiletanolamina. Consecuentemente, más tarde se demostró que los transportadores ABC de levaduras Yor1P y Pdr5p están involucrados en el eflujo de C₆-NBD-PE (Decottignies y col., 1998). Se ha observado que en condiciones de depleción de ATP así como a baja temperatura (2°C) el movimiento hacia el exterior celular de fosfolípidos-NBD resulta inhibido (Hanson y Nichols, 2001) y que mutaciones de ganancia de función en los factores PDR1 y PDR3, producen un aumento del eflujo de NBD-fosfolípidos, en una inhibición de su influjo. Esta inhibición ocurre en levaduras en respuesta a deprivación de nutrientes (Hanson y Nichols, 2001).

En bacterias se observó que la inactivación de un gen, denominado *htrB*, interfirió con el crecimiento y viabilidad de *Escherichia coli* a altas temperaturas debido a una acumulación de fosfolípidos (Karow y col., 1991). Otro gen, denominado *msbA*, es capaz de suprimir el fenotipo de crecimiento sensible a la temperatura de mutantes nulos para *htrB* así como la acumulación de fosfolípidos. El producto del gen *msbA* es un transportador ABC que se ha visto implicado en el transporte del lípido A, un precursor de lipopolisacárido, a través de la membrana interna (Polissi y Georgopoulos, 1996; Zhou y col., 1998). Los fosfolípidos y lipopolisacárido de *E. coli* se sintetizan en la cara interna de la membrana interna y luego son rápidamente transportados a la membrana externa por mecanismos aún no muy conocidos. El estudio de un mutante defectivo para *MsbA* sensible a la temperatura demostró que esta proteína está implicada en el transporte hacia la membrana externa de la bacteria de todos los lípidos principales (Doerfler y col., 2001).

4.3. La subfamilia ABCA

Varios transportadores pertenecientes a la subfamilia ABCA (ver Tabla 1) se han relacionado con el movimiento de lípidos. El primer miembro de la familia ABCA en ser clonado fue el gen ABCA1 de ratón (Luciani y col., 1994). Más tarde, utilizando la información de secuencia de este gen, se identificó ABCA1 en humanos (Langmann y col., 1999). ABCA1 ha sido la proteína más ampliamente estudiada del grupo junto con ABCR (ABCA4), otro miembro de esta familia descubierto por clonaje posicional como el responsable de la distrofia macular de Stargardt (Allikmets y col., 1997). Las proteínas ABCA presentan entre ellas alrededor de un 60% de identidad y en general

son de expresión ubicua, aunque a cada una se le puede asignar un territorio preferencial (Broccardo y col., 1999).

Mutaciones en el gen ABCA1 son responsables de la deficiencia de HDL familiar y la enfermedad de Tangier (Bodzioch y col., 1999; Rust y col., 1999; Brooks-Wilson y col., 1999). Esta es una enfermedad autosómica rara con menos de 100 casos reportados. Se caracteriza por una casi completa ausencia de colesterol-HDL en el plasma y acumulación de ésteres de colesterol en los macrófagos de los tejidos, lo que produce esplenomegalia, amígdalas alargadas y de color naranja, debido a la acumulación de ésteres de colesterol y caroteonides. Las concentraciones plasmáticas de apolipoproteína, el principal constituyente proteico de HDL, son muy bajas. Bajos niveles de HDL están ligados al desarrollo de enfermedades coronarias. De hecho, los pacientes con enfermedad de Tangier en muchos casos desarrollan complicaciones cardiovasculares. Se ha propuesto que diferentes mutaciones en ABCA1 resultan en distintas manifestaciones de la enfermedad, siendo las mutaciones más severas las causantes del desarrollo de enfermedades coronarias (Bodzioch y col., 1999).

La vinculación de la función de este transportador con la formación de HDL pronto dio origen a numerosas investigaciones que se centraron en estudiar el papel que desempeña ABCA1 en el transporte reverso de colesterol. Este es el mecanismo por el cual las células periféricas, como los macrófagos de los tejidos, liberan colesterol y fosfolípidos desde sus membranas plasmáticas a las lipoproteínas del plasma, para su transporte al hígado y posterior excreción como sales biliares. Un defecto en el eflujo de colesterol deriva en acumulación de ésteres de colesterol dentro de macrófagos y en la formación de células espumosas que se depositan en las paredes arteriales con el consiguiente daño arterioesclerótico. Se cree que HDL tiene una participación activa en el transporte reverso de colesterol y en consecuencia se le reconoce una función cardioprotectora.

Se ha demostrado que el gen ABC1 es sensible a esteroides. El ARNm y la proteína ABCA1 son inducidos en macrófagos tras la incubación con LDL acetilado, el cual carga a las células con colesterol, y esta inducción es revertida al descargar los macrófagos por incubación con HDL3 (Langmann y col., 1999). Se observó similar regulación de la expresión de ABCA1 en fibroblastos humanos durante la incorporación de colesterol y la subsecuente remoción por la lipoproteína aceptora apolipoproteína AI (apoAI) (Lawn y col., 1999).

Más recientemente, la función de ABCA1 ha sido investigada en ratones mutantes nulos para el gen (Orso y col., 2000; McNeish y col., 2000; Hamon y col., 2000; Christiansen-Weber y col., 2000). Los ratones *ABCA1* *-/-* carecen de colesterol-HDL y apoA1, coincidiendo en general con el fenotipo observado en pacientes con enfermedad de Tangier. Fibroblastos provenientes de estos ratones mutantes muestran una casi completa ausencia de eflujo de colesterol y fosfolípidos dependiente de apoA1 (Orso y col., 2000; Hamon y col., 2000). Además, los ratones *-/-* mostraron un aumento en la absorción de colesterol desde el intestino (McNeish y col., 2000). Se observó una distorsión en la herencia mendeliana con un bajo número de ratones *-/-*, sugiriendo una letalidad perinatal (McNeish y col., 2000). También los ratones mutantes tienen una deficiencia en vitaminas A, E y K1 (Orso y col., 2000), lo que indica que ABCA1 puede facilitar el transporte de estas vitaminas o puede estar relacionado con su metabolismo. El análisis del contenido celular de fosfolípidos en fibroblastos provenientes de homocigotos para la enfermedad de Tangier, no reveló alteraciones en la concentración de los principales fosfolípidos (Fobker y col., 2001). Sin embargo, se encontró un enriquecimiento en dos fosfolípidos minoritarios: cardiolipina y lisocardiolipina. La cardiolipina se encuentra predominantemente en la membrana interna mitocondrial de eucariotas y su función es desconocida. Se ha propuesto que tiene una función en la translocación de colesterol a través de la membrana mitocondrial (Schlame y Hostetler, 1997).

El eflujo del exceso de colesterol celular a HDL se sabe que ocurre por dos mecanismos. Un mecanismo de difusión acuosa y otro dependiente de energía y que requiere su extracción por apolipoproteínas. ApoA1 es el principal componente proteico de HDL y se ha demostrado que actúa como aceptor de lípidos en el eflujo mediado por ABCA1 (Wang y col., 2000; Hamon y col., 2000). No obstante, otras apolipoproteínas también actúan como aceptores de lípidos a través de esta vía (Remaley y col., 2001). Se ha encontrado que el eflujo de colesterol dependiente de apoA1 requiere endocitosis mediada por clatrina, reciclaje y resecretión de apoA1 (Takahashi y Smith, 1999). Esto puede significar que dicho eflujo no tenga lugar en la membrana plasmática sino en el compartimiento de reciclaje endocítico. Un esquema de las principales vías y moléculas implicadas en el movimiento de colesterol en las células, puede observarse en la figura A5.

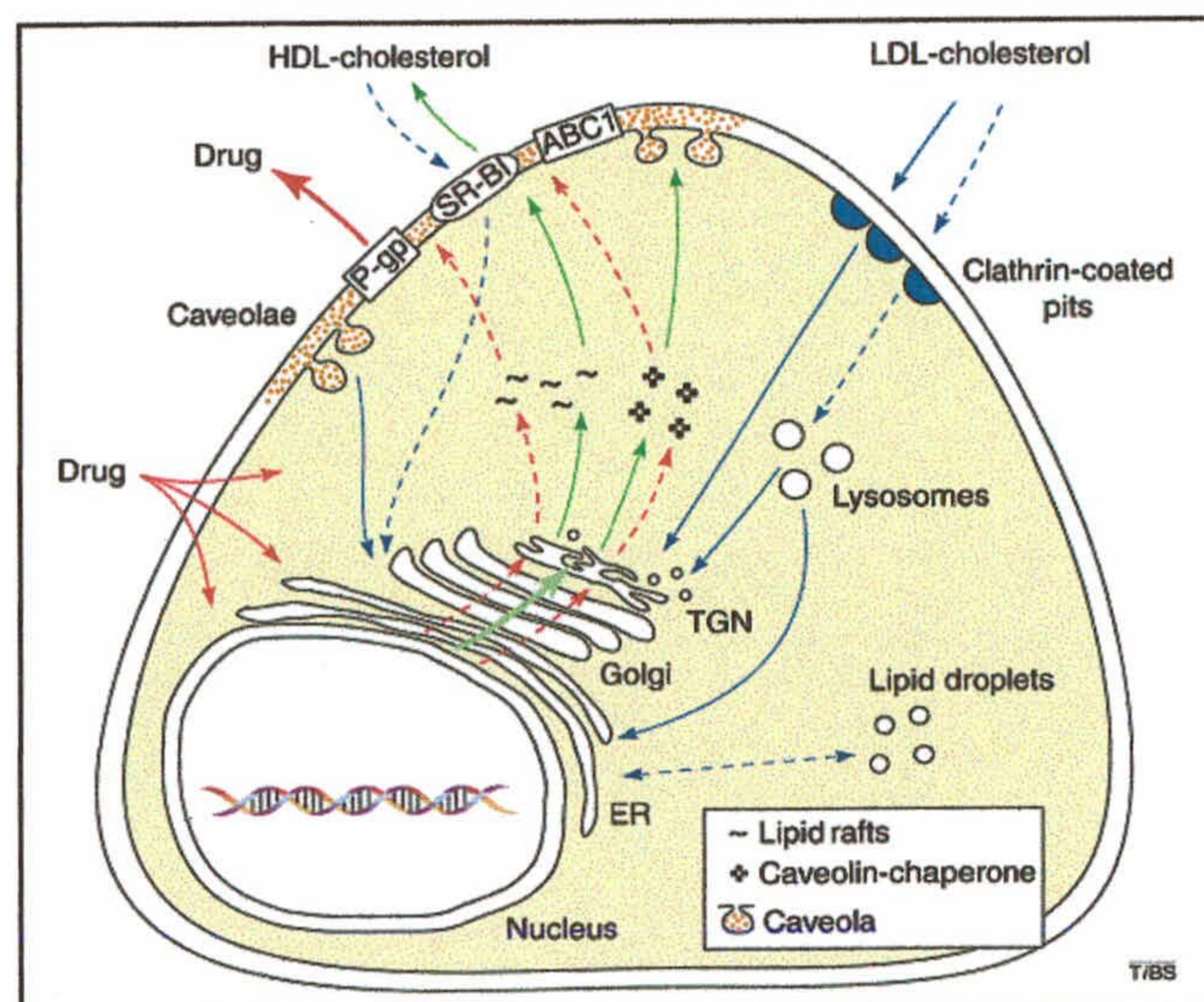


Figura A5. Movimiento de colesterol en las células. Se muestran las principales rutas de importación (flechas azules) y exportación (flechas verdes) de colesterol. La síntesis de novo de colesterol tiene lugar en el retículo endoplásmico (ER). Esteres de colesterol (flechas punteadas) son adquiridos a partir de lipoproteínas de baja densidad (LDL) a través de la internalización por vesículas cubiertas de clatrina, son hidrolizados en lisosomas y dirigidos a la membrana plasmática y al ER. Esteres de colesterol derivados de HDL son adquiridos a través de un receptor específico, SR-BI. El colesterol libre es adquirido por la membrana plasmática principalmente a través de LDL. El colesterol de cualquiera de las fuentes recicla y se acumula en la red trans-Golgi (TGN) en ruta hacia la membrana plasmática. Se ha propuesto que el transportador ABCA1 actúa facilitando el transporte de colesterol a través de la membrana plasmática, aunque su localización en caveolas (dominios ricos en colesterol) no ha podido ser demostrada.

El papel crítico que juega ABCA1 en la formación de HDL, ha llevado a la tentación de especular que su regulación farmacológica puede conducir a modular los niveles de HDL. Sin embargo, la administración de macrófagos provenientes de ratones salvajes a ratones *ABCA1* $-/-$, sólo produce un pequeño aumento de los niveles de HDL (Haghsassand y col., 2001), lo que sugiere que ABCA1 contribuye sólo parcialmente a los niveles globales de HDL.

La secuencia de ADNc de ABCA1 originalmente publicada (Luciani y col., 1994; Langmann y col., 1999) carecía de una secuencia que codifica para los 60 aminoácidos amino-terminales de la proteína más tarde identificados (Zhao y col., 2000; Costet y col., 2000; Santamarina-Fojo y col., 2000; Pullinger y col., 2000). Esta parte de la proteína ha mostrado ser esencial para su función, ya que una construcción que carece de ella no fue capaz de inducir el eflujo de colesterol a través de apoA1 (Wang y col., 2000).

Por otra parte, se ha relacionado la función de la proteína ABCA1 con la fagocitosis de células apoptóticas durante el desarrollo (Luciani y Chimini, 1996). El

patrón de expresión de ABCA1 durante el desarrollo se correlacionó con el lugar y el momento en que tiene lugar la muerte celular programada, expresándose en macrófagos encargados de la fagocitosis de cuerpos apoptóticos en los brotes de los miembros. Además, el bloqueo de ABCA1 por un anticuerpo específico impidió la capacidad fagocítica de macrófagos *ex vivo* (Luciani y Chimini, 1996). La caracterización de *ced-7* (Wu y Horvitz, 1998), el ortólogo de ABCA1 en el nemátodo *C. elegans*, apoyó estos resultados. *Ced-7* es uno de los seis genes, identificados mediante estudios genéticos, que participan en el control de la fagocitosis de cuerpos celulares durante el desarrollo en *C. elegans*. El gen *ABCA1* es de expresión ubicua, pero sus mayores niveles de expresión se encuentran en placenta, hígado, pulmón y glándulas adrenales (Langmann y col., 1999). Su abundante presencia en placenta y tejidos fetales también está de acuerdo con su función propuesta en el aclarado de células apoptóticas durante el desarrollo.

Uno de los eventos más tempranos durante la muerte de una célula apoptótica es la exposición de residuos de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática. Se cree que esto es el resultado de inhibir la aminofosfolípido translocasa y de activar la "scramblasa". Este movimiento de lípidos es necesario para la fagocitosis de las células apoptóticas por macrófagos y ocurre tanto en las células que mueren como en las células fagocíticas (Marguet y col., 1999). La fagocitosis y la exposición de fosfatidilserina pueden ser inhibidas por la glibenclamida, un inhibidor de la actividad de ABCA1 (Becq y col., 1997; Hamon y col., 1997). De hecho, se ha demostrado que ABCA1 es capaz de promover la translocación inducida por Ca^{2+} de este fosfolípido hacia la cara externa de la membrana (Hamon y col., 1997). También promueve la fagocitosis; la sobreexpresión de ABCA1 aumenta la capacidad fagocítica mientras que la inhibición de su función la bloquea (Hamon y col., 1997).

Se ha propuesto que ABCA1 también está implicado en procesos de endocitosis. Fibroblastos provenientes de enfermos de Tangier presentan un aumento del 50% de la endocitosis mediada por receptores y este fenotipo puede ser reproducido en fibroblastos normales tratados con glibenclamida (Zha y col., 2001). Además, las células de enfermos de Tangier presentan menos fosfatidilserina en la cara externa de la membrana, lo que está de acuerdo con la función propuesta para ABCA1 como un translocador de fosfatidilserina. Así, la falta de esta función de ABCA1 puede causar un aumento de la fosfatidilserina que se encuentra en la cara interna y por consiguiente una alteración de las propiedades de la membrana que facilitan movimientos tales como la endocitosis (Zha y col., 2001).

Este transportador también puede estar relacionado con otras funciones celulares. Becq y col. (1997) analizaron la capacidad de transporte iónico de ABCA1 usando técnicas electrofisiológicas y lo describieron como un transportador de aniones dependiente de AMPc y sensible a glibenclamida. La glibenclamida es una sulfonilurea capaz de inhibir la secreción de IL-1 β a partir de macrófagos de ratón y monocitos humanos (Hamon y col., 1997). Esta interleukina es uno de los mediadores más efectivos de reacciones inflamatorias principalmente producidas por macrófagos o monocitos activados y a diferencia de las otras citoquinas, no es secretada a través de la vía exocítica clásica. Se ha demostrado la existencia de una correlación precisa entre la inhibición farmacológica de la actividad de ABC1 y de la secreción de IL-1 β , sugiriendo que ABC1 puede participar en la secreción de esta citoquina (Hamon y col., 1997).

Se ha visto que los oxisteroles modulan la expresión del gen *ABCA1* a través del receptor de hormona nuclear X del hígado (LXR). Estudios iniciales demostraron que la incubación de macrófagos peritoneales de ratón con el ligando fisiológico de LXR, 22-R-hidroxicolesterol o un agonista selectivo producen un aumento de tres veces en el ARNm de ABCA1 (Repa y col., 2000), mientras que en macrófagos aislados de mutantes nulos para los receptores LXR α y LXR β no se observa esta inducción. Venkateswaran y col. (2000) confirmaron que el tratamiento de fibroblastos NIH3T3 o macrófagos RAW264 con oxisteroles produce una inducción del ARNm de ABCA1. Además, la expresión de LXR α en estas células lleva a una inducción de hasta 30 veces del ARNm de ABCA1 y a un aumento en el eflujo de colesterol mediado por apoA1. La respuesta se ve atenuada en células que expresan formas dominantes negativas de LXR α o LXR β . El receptor X del hígado heterodimeriza con el receptor X retinoide (RXR) y el complejo LXR/RXR se une a un elemento DR4 en el promotor de ABCA1 para promover su trans-activación (Costet y col., 2000).

Gan y col. (2001) estudiaron el efecto de varios metabolitos del mevalonato sobre la expresión de ABCA1 en dos líneas celulares humanas. Observaron que el tratamiento con geranilgeranil pirofosfato (GGPP) produjo una inhibición de la expresión de ABCA1 que fue dependiente de la dosis y del tiempo. GGPP es uno de los principales productos de la ruta del mevalonato y parece actuar como un antagonista de LXR pues impide la interacción de estos receptores con coactivadores nucleares.

El AMPc también juega un papel importante en la regulación de la expresión de ABCA1. Su ARNm fue inducido 10 veces en fibroblatos incubados con 8-Br-AMPc (Lawn y col., 1999). El tratamiento de células RAW264 con 8-Br-AMPc causó un aumento en el ARNm y la proteína ABCA1 así como un incremento en el eflujo de colesterol mediado por apoAI (Oram y col., 2000). Además, la preincubación de estas células con AMPc induce la unión específica de apoAI y el eflujo de colesterol a este receptor (Abe-Dohmae y col., 2000). Estos datos apuntan a que el gen ABCA1 es inducible por AMPc, aunque no se ha identificado aún un motivo responsable de dicha regulación en el promotor del gen ABCA1 (Oram y col., 2000).

Los agonistas de PPAR α y PPAR γ inducen la expresión de ABCA1 y el eflujo de colesterol en macrófagos normales mientras que no lo hacen en macrófagos provenientes de pacientes con enfermedad de Tangier (Chinetti y col., 2001). Estos activadores también inducen el ARNm de LXR α . Además PPAR y LXR α tienen efectos aditivos sobre la expresión de ABCA1. Aún no se han identificado en el promotor de ABCA1 elementos responsables de la inducción por PPAR, por lo que PPAR puede ejercer sus efectos sobre la expresión de ABCA1 más bien de forma indirecta a través de la inducción de LXR α .

Se ha visto que IFN- γ ejerce un efecto inhibitorio sobre la expresión del ARNm de ABCA1 y sobre el eflujo de fosfolípidos y colesterol mediado por apoAI en macrófagos peritoneales de ratón y en células espumosas (Panousis y Zuckerman, 2000).

Ya que existen transportadores ABC que actúan en concierto con otras proteínas para ejercer su función, se ha investigado si proteínas intracelulares que están implicadas en el transporte de lípidos, son capaces de modular la actividad de ABCA1. Un ejemplo lo constituye la proteína caveolina, que se conoce participa en el eflujo de lípidos a HDL. La caveolina es uno de los principales constituyentes de las caveolas, dominios de la membrana celular que están enriquecidos en colesterol y esfingolípidos. Sin embargo, estos dominios no parecen participar en el eflujo de colesterol y fosfolípidos mediado por ABCA1 y este transportador no se encuentra en caveolas (Méndez y col., 2001).

Las proteínas pequeñas de unión a GTP también podrían actuar como proteínas accesorias de ABCA1. Estas proteínas incluyen a Rho, Rac1 y Cdc42 las

cuales se sabe son importantes en el tráfico vesicular y en la modulación de la estructura de la membrana plasmática (Chimini y Chavrier, 2000; Ridley, 2001). Se ha reportado que fibroblastos provenientes de pacientes con enfermedad de Tangier presentan niveles aumentados de varias proteínas Rho y Rac1 en sus fibroblastos (Utech y col., 2001) mientras que los niveles de Cdc42 están disminuidos (Hirano y col., 2000). Además, la transfección de células con Cdc42 produce un aumento del eflujo de colesterol dependiente de ABCA1, mientras que la transfección con una forma dominante negativa produce una disminución del eflujo (Hirano y col., 2000). Así pues, parece haber una relación entre estas proteínas y ABCA1. Se conoce que la familia Rho tiene importantes funciones en la transducción de señales que vinculan receptores de la membrana plasmática con la organización del citoesqueleto (Bishop y Hall, 2000). De hecho fibroblastos y macrófagos provenientes de enfermos de Tangier presentan alteraciones morfológicas con citoesqueletos de actina anormales y una menor formación de folipodios (Hirano y col., 2000).

Otros miembros de la familia ABCA han sido implicados en el transporte de lípidos. Fenotipos asociados a diferentes formas de retinitis pigmentosa o degeneración de mácula, se han asociado con mutaciones en el gen que codifica para ABCR (ABCA4). Este transportador se expresa específicamente en las células fotorreceptoras de la retina donde se ha propuesto que transloca N-retinilideno-fosfatidiletanolamina (Weng y col., 1999; Ahn y col., 2000). Ratones mutantes nulos para ABCR muestran niveles elevados de all-trans-retinaldehído en la retina tras exposición a la luz y niveles elevados de fosfatidiletanolamina en los segmentos exteriores.

ABCA2 fue identificado junto a ABCA1 en el cromosoma 9 humano (Luciani y col., 1994). Este transportador se encontró amplificado en una línea celular de carcinoma de ovario resistente a estramustina (Laing y col., 1998). La sobreexpresión de ABCA2 contribuyó al fenotipo de resistencia ya que las células se sensibilizaron bajo tratamiento con ARNm antisentido de ABCA2 (Laing y col., 1998). Dado que la estramustina no es un sustrato natural, quedaba por determinarse si ABCA2 puede transportar esteroides. No obstante, la transfección de células HEK293 con ABCA2 sólo produce una resistencia de 2 veces a bajas concentraciones de estramustina (Vulevic y col., 2001). Esta proteína es muy abundante en cerebro (Luciani y col., 1994; Zhao y col., 2000; Vulevic y col., 2001), particularmente en los oligodendrocitos (Zhao y col., 2000), por lo que también se propuso que podía estar involucrada en la formación y/o síntesis de la mielina. ABCA2 fue colocalizado con el marcador

lisosomal/endosomal LAMP1 y con un esteroide fluorescente análogo de la estramustina (Vulevic y col., 2001). Más recientemente, el estudio de la región promotora del gen ABCA2 reveló la existencia de sitios potenciales de unión para factores de transcripción involucrados en la diferenciación de células nerviosas y mieloides (Kaminski y col., 2001). ABCA2 el cual presenta un 50% de homología con ABCA1, también es inducible por la importación de colesterol en macrófagos (Kaminski y col., 2001).

ABCA3 fue clonado a partir de una librería de ADNc de una línea celular de carcinoma tiroideo medular (Klugbauer y Hofmann, 1996) y parece expresarse exclusivamente en pulmón. Más recientemente, este transportador fue clonado a partir de este tejido y utilizando un anticuerpo específico se localizó en la membrana limitante de los cuerpos lamelares en las células de tipo II alveolares (Yamano y col., 2001). Basados en estos resultados, se ha propuesto que ABCA3 participa en la formación de surfactante pulmonar, que se compone principalmente de fosfolípidos y proteínas surfactantes específicas.

Otros transportadores de la subfamilia ABCA, como ABCA6 y ABCA7 también han sido estudiados y se les ha vinculado con transporte de lípidos. ABCA6 se expresa más abundantemente en hígado, pulmón, corazón y cerebro (Kaminski y col., 2001); el gen humano se encuentra en el cromosoma 17 ligado al gen que codifica para ABCA8, el miembro de la subfamilia con quien comparte la mayor homología (60%). ABCA7 se expresa mayoritariamente en tejidos mielo-linfáticos y al igual que ABCA1 es un gen regulado por la exportación e importación de colesterol en macrófagos (Kaminski y col., 2000).

4.4. Topología de las proteínas ABCA

Los alineamientos de secuencia en combinación con los análisis de hidropatía de los miembros de la subfamilia ABCA han puesto en evidencia varias características particulares de este grupo. En primer lugar, una región muy hidrofóbica muy conservada en el extremo amino-terminal, y en segundo lugar, un largo segmento entre el primer NBD y el segundo TMD. Este segmento se ha llamado dominio regulatorio y puede separarse en dos mitades de tamaño similar por una región hidrofóbica. A diferencia de otros transportadores ABC, los análisis de hidropatía de varias proteínas ABCA muestran que podrían poseer 14 posibles segmentos hidrofóbicos (Zhao y col., 2000 y otras citas ABC1). Estos análisis han llevado a

proponer varios modelos topológicos para estas proteínas que se diferencian en la posición que asignan a los segmentos 1 y 8. En el primer modelo propuesto para ABCR (figura A6) los segmentos 1 y 8 atraviesan la membrana, de manera que existen dos grandes "loops" extracelulares entre los dos primeros segmentos de cada TMD (Illing y col., 1997). Por otra parte, en el caso de ABCA1, se ha argumentado que el segmento 8 no es lo suficientemente largo para poder atravesar la membrana y se propuso que penetra en ésta sin alcanzar el exterior, por lo que la región posterior al segmento 8 es intracelular (Luciani y col., 1994; Broccardo y col., 1999). Este modelo planteaba que el extremo amino-terminal también era intracelular y más corto pues aún no se conocían los 60 aminoácidos caracterizados posteriormente y que incluyen al segmento hidrofóbico 1. También se ha propuesto un modelo topológico que representa un híbrido entre los dos modelos anteriores, es decir, en la mitad amino-terminal del transportador, el segmento 1 atraviesa la bicapa mientras que en la mitad carboxilo-terminal del transportador, el segmento 8 se inserta sólo parcialmente en la bicapa (Azarian y col., 1997; Sun y col., 2000; Fitzgerald y col., 2001). Mediante la identificación de sitios de N-glicosilación en la proteína ABCR, Bungert y col. (2001) apoyaron el modelo propuesto por Illing, sugiriendo que ABCA1 y ABCA2, que muestran una considerable similitud de secuencia (alrededor de un 50% de homología), pueden tener una topología similar. Además, demostraron que las mitades amino y carboxilo-terminal de ABCR interaccionan a través de puentes disulfuro. Como se ha demostrado para la proteína MDR1, es posible imaginar que las proteínas ABCA adopten varias conformaciones según el microambiente lipídico en el que se encuentren.

Se ha identificado entre los aminoácidos 45 y 46 de la proteína ABCA1 humana un posible sitio de corte que estaría ubicado justo después del segmento hidrofóbico 1 (Tanaka y col., 2001). Basados en estudios de inmunolocalización del epítipo de hemaglutinina introducido en el extremo amino-terminal de la proteína, Tanaka y col., proponen que este sitio de corte es utilizado para dar la forma madura. Luego del sitio de corte existe una región hidrofílica que contiene 12 posibles sitios de N-glicosilación. Mediante estudios de la movilidad electroforética de proteínas tratadas con N-glicosilasa F, se ha concluido que ABCA1 se encuentra altamente glicosilada (Tanaka y col., 2001) y mediante inmunodetección del epítipo de hemaglutinina introducido en esta región hidrofílica, se observó que esta región se encuentra hacia el exterior celular, apoyando así los modelos A o C de la figura A6.

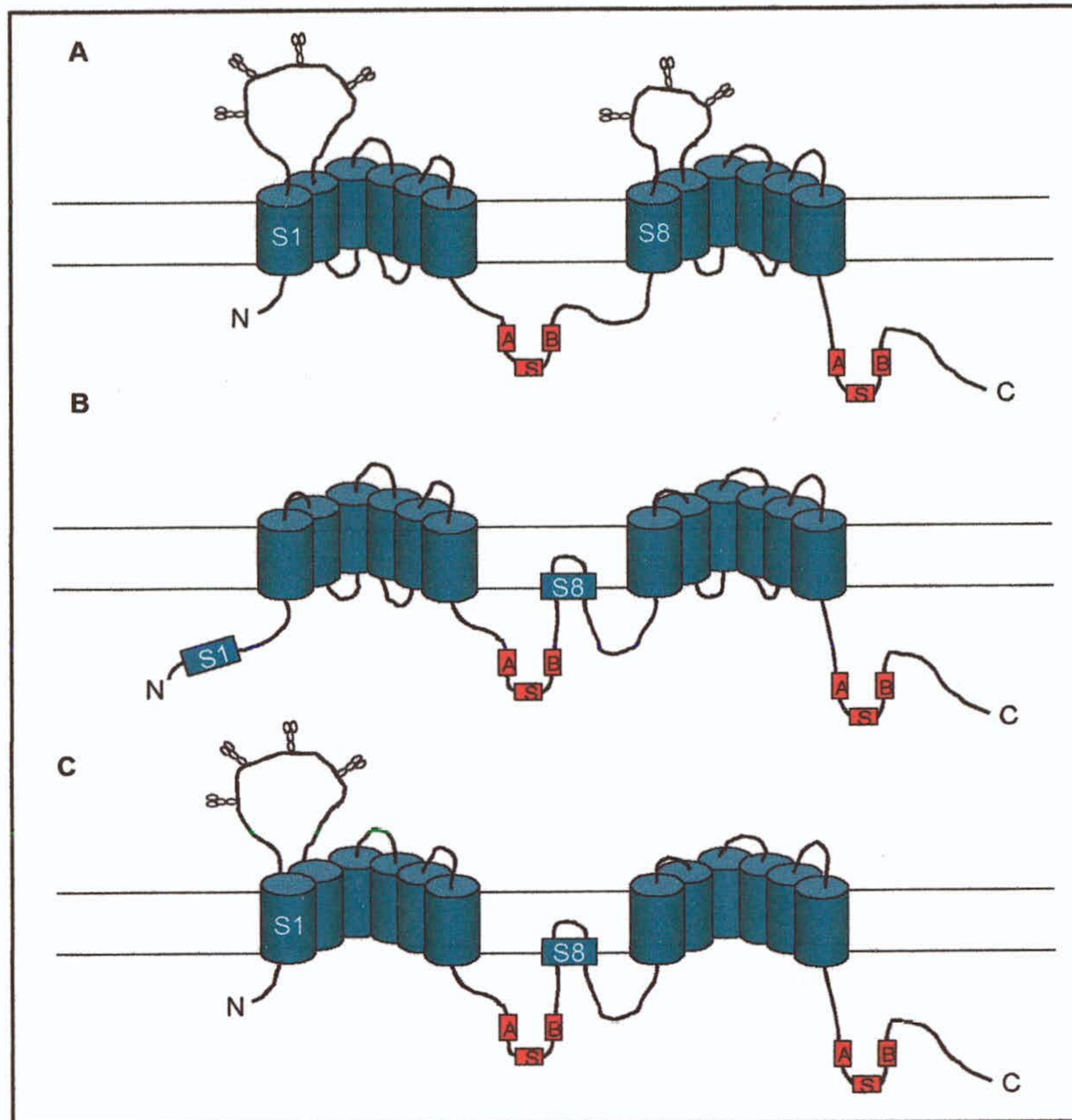


Figura A6. Modelos topológicos propuestos para las proteínas ABCR y ABCA1. **A.** Modelo propuesto por Illing y col. (1997) para ABCR. En este modelo, el segmento 1 (S1) cercano al extremo amino-terminal atraviesa la membrana y es seguido por una gran dominio exocitoplasmático. El segmento 8 (S8) también atraviesa la membrana. **B.** Modelo propuesto por Luciani y col. (1994). En este modelo los TMDs contienen seis segmentos transmembrana conectados por cortos bucles. El extremo amino-terminal contiene un gran dominio citoplasmático. El segmento 8 (S8) no alcanza a atravesar la membrana e interrumpe un dominio citoplasmático denominado regulatorio. **C.** Modelo topológico híbrido propuesto por varios grupos (ver texto) que contiene características estructurales de los modelos A y B.

4.5. Localización de ABCA1

La localización subcelular de ABCA1 ha sido estudiada por varios métodos. Los análisis por citometría de flujo y western blot con fracciones subcelulares de fibroblastos mostraron que este transportador se encuentra en la superficie celular así como en membranas del complejo de Golgi (Orso y col., 2000). La proteína también ha sido detectada en compartimientos endolisosomales de células HeLa transfectadas con quimeras ABCA1-GFP utilizando microscopía confocal e inmunofluorescencia (Hamon y col., 2000). Otros estudios han demostrado que endosomas tempranos conteniendo ABCA1 se mueven entre la membrana plasmática y otros compartimientos endocíticos y sugieren que puede tener funciones importantes en el tráfico de lípidos celulares (Neufeld y col., 2001). Esta localización, junto con el hecho de que pacientes con enfermedad de Tangier muestran una red trans-Golgi dilatada y alteraciones en el

transporte de lípidos desde el Golgi a la membrana plasmática, ha llevado a sugerir que ABCA1 puede moverse entre el compartimiento endolisosomal, el complejo de Golgi y dominios específicos en la membrana plasmática, ya sea para transportar lípidos directamente o para facilitar su translocación entre los compartimientos (Schmitz y Langmann, 2001). En concordancia con estas ideas, Chen y col. (2001) demostraron que la principal fuente celular de colesterol para el eflujo mediado por ABCA1 proviene de endosomas tardíos/lisosomas.

4.6. Funciones de ABCA1

Tomando en cuenta todos estos resultados, se han propuesto modelos para explicar la función de ABCA1 en el transporte de lípidos (Hamon y col. 2000; Oram, 2000; Chambenoit y col., 2001; Remaley y col., 2001). Así, se cree que ABCA1 ejerce su función principalmente controlando la homeostasis de los lípidos de la membrana y por lo tanto propiedades de la membrana que influirán en procesos posteriores. Hamon y col. (2000) propusieron que la translocación de fosfatidilserina a la superficie celular, como resultado de la función de ABCA1, modifica las propiedades de la membrana y puede favorecer la liberación de fosfolípidos y colesterol, además de inducir procesos como la fagocitosis en células apoptóticas. Esta modificación local y transitoria de los lípidos de la membrana favorecerían la exposición de apoA1 en la superficie celular y la posterior extracción por este aceptor de fosfolípidos y colesterol de la cara externa (Chambenoit y col., 2001). Así ABCA1 no tendría una función directa sobre el eflujo de colesterol. Hay datos que apoyan la idea de que los fosfolípidos más que el colesterol constituyen los sustratos primarios para el transporte por ABCA1. Utilizando un análogo de colesterol fotoactivable, Wang y col. (2001) demostraron que ABCA1 no se une directamente a colesterol y que el eflujo de colesterol desde las células ocurre como consecuencia de la actividad de eflujo de fosfolípidos ejercida por ABCA1. La depleción de colesterol celular con ciclodextrina no impide el posterior eflujo de fosfolípidos (Wang y col., 2001).

5. TRANSPORTADORES ABC EN LEISHMANIA

5.1. Transportadores relacionados con la subfamilia ABCC

El primer transportador ABC identificado en *Leishmania* fue la PGPA (Ouellette y col., 1990). Esta proteína forma parte de una familia que contiene cuatro miembros

más cuyos genes se distribuyen en dos *loci* en el genoma de *Leishmania*. Los genes *pgpB* y *pgpC* ligados a *pgpA* se encuentran sobre un cromosoma de 800 kb, mientras que los genes *pgpD* y *pgpE* están ligados a un cromosoma de entre 950 y 1.400 Kb, según la especie de *Leishmania* que se analice (Legaré y col., 1994).

De esta familia, la proteína PGPA ha sido muy estudiada debido a que se ha encontrado formando parte de un elemento extracromosómico, el círculo H, amplificado en cepas de *Leishmania* resistentes a arsenito, antimonio trivalente o antimonio pentavalente, este último utilizado como leishmanicida. PGPA comparte un 33% de identidad con la proteína relacionada con multirresistencia de mamíferos (MRP1) (Cole y col., 1992). MRP1 transporta sustratos conjugados con glutatión (GSH) (revisado por Hipfner y col., 1999) y de hecho experimentos de transfección de *Leishmania* con el gen de *pgpA* mostraron su relación con el metabolismo de tioles, proponiéndose que este transportador reconoce metales conjugados con tripanotión (TSH) (Grondin y col., 1997), el principal tiol presente en tripanosomátidos. Más recientemente, estudios de localización de la PGPA mostraron su ubicación intracelular en estructuras de membrana cercanas al bolsillo flagelar (Legaré y col., 2001). Estudios de transporte de metales conjugados a GSH realizados con vesículas obtenidas de parásitos transfectados con *pgpA*, han llevado a apoyar el modelo propuesto por Ouellette y col. (1998). Dicho modelo plantea que la PGPA se encuentra localizada en membranas de un compartimento intracelular, donde confiere resistencia secuestrando metales conjugados a TSH.

5.2. Transportadores relacionados con la subfamilia ABCB

Otros transportadores ABC que han sido caracterizados en *Leishmania* son proteínas tipo MDR1, las cuales presentan un alto grado de similitud de secuencia con las Pgp de mamíferos. Se han descrito genes tipo *mdr1* en *L. donovani* (Henderson y col., 1992), *L. enrietti* (Chow y col., 1993), *L. amazonensis* (Gueiros-Filho y col., 1995) y *L. tropica* (Chiquero y col., 1998). Estos genes fueron identificados en líneas resistentes a varios compuestos. Algunos de estos compuestos presentan interés clínico ya que se utilizan como fármacos leishmanicidas. Un ejemplo lo constituyen los alquil-lisofosfolípidos (ALP), como miltefosina y edelfosina. La línea resistente a daunomicina de *L. tropica* que sobreexpresa el transportador tipo MDR1 también confiere resistencia a estos ALPs (Pérez-Victoria y col., 2001c), y esta resistencia depende de la expresión de la Pgp, ya que una línea mantenida en ausencia de

daunomicina, que se ha demostrado pierde la sobreexpresión de la Pgp, también pierde la resistencia a ALP.

El proyecto genoma de *Leishmania*, actualmente en marcha, arroja frecuentemente secuencias que presentan homologías significativas con proteínas ABC. Teniendo en cuenta que entre los distintos organismos, esta familia se encuentra bien representada, cabe esperar que se identifiquen nuevos miembros en *Leishmania*.

OBJETIVOS

B. OBJETIVOS

Los transportadores ABC constituyen una de las familias de proteínas más numerosas que se conocen. Sus miembros y sus funciones se encuentran conservados a lo largo de la escala evolutiva. Las proteínas ABC cumplen diversas funciones celulares, transportando una gran variedad de compuestos a través de las membranas, pero también participan en numerosos procesos celulares y en su regulación. Sus funciones a menudo son esenciales para la viabilidad celular. En los últimos años, se han identificado varios transportadores ABC relacionados con el movimiento de lípidos a través de las membranas celulares. En particular, los miembros de una de las subfamilias más recientemente caracterizadas en mamíferos, la subfamilia ABCA, están involucrados en el tráfico de lípidos de membrana, regulando así varios procesos celulares.

En el presente trabajo nos planteamos como objetivo general la identificación y posterior estudio molecular y funcional de transportadores relacionados con la subfamilia ABCA en parásitos del género *Leishmania*.

Como objetivos específicos nos planteamos los siguientes:

- Identificar, mediante el rastreo de una librería genómica de *Leishmania tropica*, secuencias relacionadas con la subfamilia ABCA de transportadores.
- Caracterizar molecularmente los genes que codifican para esta subfamilia, para conocer su organización genómica, su expresión y su localización cromosómica.
- Estudiar la funcionalidad de uno de estos genes, para conocer su posible papel el transporte de lípidos y las implicaciones que dicha actividad puede ejercer sobre otros procesos biológicos de importancia para el parásito.

MATERIALES Y METODOS

C. MATERIALES Y METODOS

C.1. MATERIALES

1. REACTIVOS QUIMICOS, FARMACOS Y OTROS MATERIALES

Los reactivos químicos utilizados fueron de las siguientes casas comerciales: Sigma, Roche, Calbiochem, Amersham-Pharmacia, Merck. Los reactivos para los medios de cultivo fueron de las siguientes casas comerciales: el RPMI 1640 y el SBF, de la casa Gibco BRL.; los aminoácidos y vitaminas de Sigma Chemical Co. El sistema de filtración de 0,2 μ M para esterilizar fue de VacuCap™, Gelman Science. Los frascos de cultivo fueron de la casa Falcon. El isotón® II fue de Coulter. Los reactivos para el LB y otros medios bacterianos fueron de Difco. Las enzimas utilizadas fueron de Roche, Promega, Gibco BRL, Sigma; los desoxinucleótidos fueron de Roche.

La desoxicitidina-5'-trifosfato (α -³²P dCTP) (3000 Ci/mmol) fue suministrada por Amersham-Pharmacia. Para purificar las sondas radioactivas se utilizó Sephadex G-50 (Amersham-Pharmacia).

Para la electroforesis en geles de agarosa se empleó agarosa D1 de Pronadisa. Los bloques de ADN para electroforesis en campo pulsado (CHEF) se prepararon con agarosa de bajo punto de fusión de Bio-Rad. Los marcadores de tamaño de ADN utilizados fueron ADN del fago lambda y ØX174 cortados con *Hind*III y *Hae*III, respectivamente, de Promega. Los filtros de nylon Hybond-N® para la transferencia de ácidos nucleicos fueron de Amersham-Pharmacia.

La librería genómica de *L. tropica* fue construida en nuestro laboratorio por Santiago Castanys, mediante digestión parcial del ADN genómico con la enzima *Sau* III y clonaje de insertos con un tamaño promedio de 14 Kb en el vector lambda EMBL3. Para el rastreo de la librería se utilizaron membranas de nitrocelulosa PROTRAN BA 85 de Schleicher & Schuell.

Para hacer los geles de SDS-PAGE, se utilizó SDS, acrilamida, bisacrilamida (N,N'-metilen-bis-acrilamida), TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamina), y persulfato amónico de Bio-Rad. Los marcadores de tamaño de proteínas utilizados fueron los standards de Bio-Rad. Las membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF)

Immobilon-P para Western-blot fueron de Millipore. La transferencia se realizó en un aparato Semi-Phor TE70 (Hoefer Sci. Inst.).

Los análogos de fosfolípidos fosfatidilcolina (C₆-NBD-PC), fosfatidiletanolamina (C₆-NBD-PE) y fosfatidilserina (C₆-NBD-PS) fueron de Avanti Polar-Lipids Inc.

Los fármacos empleados fueron:

- Ampicilina: Sigma. Stock 100 µg/ml en agua.
- Geneticina: Gibco BRL. Stock 20 mg/ml en RPMI 1640.
- Alquil-lisofosfolípidos: la miltefosina (hexadecilfosfocolina) fue de Sigma, y la edelfosina (1-O-octadecil-2-O-metil-sn-glicero-3-fosfocolina) fue de Bachem. Se disuelven en Tris-HCl 20mM pH 7,4.
- NBD-fosfolípidos: se disolvieron en etanol, guardándose en frascos de vidrio a -80°C.
- Doxorubicina: se disolvió en PBS.
- Glibenclamida: Sigma. Se disolvió en DMSO.
- All-*trans*-retinol y ácido retinoico: Sigma. Se disolvieron en etanol.

Otros compuestos utilizados fueron:

- 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP): Roche.
- Albumina de suero bovino (BSA): Roche.
- Albúmina de suero bovino (BSA) libre de lípidos: Sigma.
- Dimetilsulfoxido (DMSO): Sigma.
- Isopropil-β-D-tiogalacto-piranósido (IPTG): Roche.
- 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium bromuro (MTT): Sigma. Stock 5 mg/ml en PBS y filtrar. Se Almacenó a 4 °C hasta un máximo de 2 semanas.
- NBT: Roche.
- N-lauril-sarcosina: Sigma.
- Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF): Sigma. Se disuelve en metanol a una concentración de 100 µg/ml
- Tween 20: Merck.
- 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-galactopiranósido (X-Gal): Roche.
- Bromuro de etidio: Sigma. Solución stock 10 mg/ml.
- Cloroformo isoamílico: cloroformo más alcohol isoamílico en proporción 24:1.
- Fenol: saturado y equilibrado con Tris 0,1 M pH 8,0 más hidroxiquinoleina al 0,1%.

- Hidrosulfito de sodio (Ditionito): Sigma. Se preparó en el momento de usar en Tris 1M pH10.

Se utilizaron los kits: "Random Primed DNA labeling" de Roche, "High Pure Plasmid Isolation Kit" de Roche, "Wizard Maxipreps" de Promega, "GeneClean" de BIO 101 inc., "Puregene DNA Isolation Kit" de Gentra, "Quick Prep Micro mRNA Purification" de Pharmacia.

2. TAMPONES Y SOLUCIONES

- TAE 10x: Tris 0,4 M; EDTA 10 mM pH 8,0; Acido acético glacial 11,42 ml para 1l. Utilizado para la electroforesis de ADN.
- Tampón de carga para ADN 6x: azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%, glicerol 30%.
- Tampón TE (pH 7,4): Tris-HCl 10 mM pH 7,4; EDTA 1 mM pH 8.
- Tampón HPMI: Hepes 20 mM; NaCl 132 mM; KCl 3,5 mM; MgCl₂ 0,5 mM; Glucosa 5 mM; CaCl₂ 1mM, ajustándose el pH a 7,25. Utilizado en experimentos de acumulación de análogos de fosfolípidos.
- Tampón HBS: Hepes 21 mM; NaCl 137 mM; KCl 5 mM; glucosa 6 mM, ajustándose el pH a 7,4. Utilizado en experimentos de transfección.
- Tampón fosfato salino (PBS) : NaCl 0,14 M; KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, Na₂HPO₄ 10 mM pH 7,4.
- Tampón MNE 10x : ácido 4-morfolino propanosulfónico MOPS 0,2 M, acetato sódico 0,05 M, EDTA 10 mM, pH 7,0. Utilizado para la electroforesis de ARN.

2.1. Soluciones para transferencia de placas de lisis

- Solución de desnaturalización: NaOH 0,5M; NaCl 1,5M
- Solución de neutralización: Tris-HCl 1M pH 8; NaCl 1,5M
- Solución de lavado: SSC 2X

2.2. Soluciones para Southern blot

- Solución HCl: HCl 0,25 M.
- Solución Desnaturalizante: NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M.
- Solución Neutralizante: Tris-HCl 0,7 M pH 7,4, NaCl 1,5 M.
- Tampón 20x SSC: NaCl 3 M, citrato sódico 0,3 M pH 7,2.

2.3. Soluciones para Northern blot

- Formamida desionizada: Roche.
- MNE 50x: ácido 4-morfolino propanosulfónico (MOPS) 0,2 M, AcONa (H₂O)₃ 50 mM, EDTA 10m M pH 7,4. Esterilización por filtración.

2.4. Soluciones para electroforesis de campo pulsado (CHEF)

- Tampón para bloques: 0,5 M EDTA pH 9, 1% n-lauril-sarcosina, 1 mg/ml proteinasa K.
- TBE 10x: Tris-HCl 89 mM pH 8,3, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM.
- Tampón de lavado: EDTA 0,2 M.

2.5. Soluciones de hibridación

- ADNss: 100 µg/ml en agua. Se calienta a 100 °C durante 10 min. y se fragmenta pasándolo varias veces por una aguja.
- Denhardt's 50x: BSA (seroalbúmina bovina) 1%, ficoll 1%, polivinilpirrolidona 1%.
- Solución de hibridación: SSC 6X, Denhardt 5X, SDS 0,2%, ADNss 10 µg/ml. Esta solución se empleó para la hibridación de "Southern blots".
- Solución de hibridación con formamida: formamida desionizada 50%, Denhardt's 5x, SSC 5x, EDTA 5 mM, ADNss 200 µg/ml desnaturalizado. Esta solución se empleó para la hibridación de "Northern blots".
- Soluciones de lavado: SSC 2X + SDS 0,1%; SSC 1X + SDS 0,1%; SSC 0,2X + SDS 0,1%.

2.6. Soluciones para electroforesis de proteínas

- Tampón de lisis ("Urea Cracking Buffer"): Na₂HPO₄ 10 mM, β-mercaptoetanol 1%, SDS 1%, urea 5 M, pH 7,0.
- Tampón de muestra 2x: 1,25 ml de tampón concentrador; 0,3 g SDS, 20% glicerol, 10% β-mercaptoetanol, 0,2% azul de bromofenol completando hasta 5 ml con urea 8M.
- Tampón de corrida 10X: Tris-HCl 0,25 M, glicina 1,92 M, SDS 1%, pH 8,3. Filtrar.
- Acrilamida-Bisacrilamida: acrilamida 0,3 g/ml, bisacrilamida 8 mg/ml. Filtrar.
- Tampón separador: Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 0,4. Filtrar.
- Tampón concentrador: Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; SDS 0,4. Filtrar.
- Persulfato de amonio: 100 mg/ml en agua. Filtrar

2.7. Soluciones para Western blot

- Tampón fosfatasa: Tris-HCl 0,1 M pH 9,5, NaCl 0,1M, MgCl₂ 5 mM.
- Tampón ánodo I: Tris 0,3M; metanol 10% pH 10,4.
- Tampón ánodo II: Tris 25 mM; metanol 10% pH 10,4.
- Tampón cátodo: Tris 25 mM; glicina 40 mM; metanol 10% pH 9,4.
- Solución de bloqueo: BSA 1%, Tween-20 0,05%, en PBS 1X.
- Solución de revelado: 10 ml de tampón fosfatasa, 50 µl de cloruro azul de nitrotetrazolio (NBT, 100 mg/ml), 37,5 µl 5-bromo-4-cloro 3-indolil fosfato (BCIP, 50 mg/ml).
- Rojo de Ponceau: Rojo de Ponceau-S 0,5%; ácido acético 1%.
- Azul de Coomassie: Azul de Coomassie 0,2%; ácido acético 10%; metanol 25%.

3. MEDIOS DE CULTIVO

3.1. Medios para bacterias y fagos

- LB líquido: 10 g de bactotripton, 10 g de NaCl y 5 g de extracto de levadura en 1 l de agua bidestilada pH 7,5.
- LB agar: Bacto Agar al 1,5% en LB líquido.
- NZY: 10 g de hidrolizado enzimático de caseína (NZ amina); 5 g de NaCl; 5 g de extracto de levadura; 1g de aminoácidos de caseína; 2 g de MgSO₄; pH 7.
- NZY agar: Bacto Agar al 1,5% en NZY líquido.
- NZY top agarosa: agarosa al 0,75% en NZY líquido.
- Solución SM: 5,8 g de NaCl; 2 g de MgSO₄·7H₂O; 50 ml de Tris-HCl pH 7,5; 5 ml de solución de gelatina al 2% para 1 l.

3.2. Medios para parásitos

- RPMI 1640 modificado: 8,32 g de RPMI 1640; 4,75 g de HEPES; 1,6 g de bicarbonato sódico; 100 ml de solución de aminoácidos 10 X; 0,2 ml de ácidos orgánicos y azúcares (SAAA) 1000x en 800 ml de H₂O, ajustándose el pH a 7,2 y añadiéndose 200 ml de suero bovino fetal (SBF, inactivado por calor a 56 °C durante 30 min). Esterilizar por filtración.
- SAAA 10x: arginina 4,4 mg/ml, cistina 0,8 mg/ml, glutamato 2,5 mg/ml, glutamina 16,4 mg/ml, prolina 69 mg/ml, L-ornitina 1 mg/ml, glucosa 7 mg/ml,

fructosa 4 mg/ml, malato 6,7 mg/ml, α -cetoglutarato 3,7 mg/ml, fumarato 0,55 mg/ml y succinato 0,6 mg/ml

- Solución de vitaminas 100x: pantotenato cálcico 10% (p/v); cloruro de colina 10% (p/v); ácido fólico 10% (p/v); clorhidrato de piridoxal 10% (p/v); clorhidrato de tiamina 10% (p/v); l-inositol 20% (p/v); nicotinamida 1% (p/v) y riboflavina 1% (p/v).

4. LINEAS CELULARES

4.1. Cepas bacterianas

Todas las cepas corresponden a la especie *Escherichia coli*

- DH5 α : F' ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR recA 1 end A1 hsdR 17 (r_k⁻, M_k⁺) supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 rel A1 (GibcoBRL). Para la transformación y propagación de los insertos clonados en los plásmidos pBluescript KS II y pGEM-T.
- XL1-Blue: recA1, endA1, gyrA46, thi-1, supE44, hsdR17, relA1, lac⁻, [F' proAB⁺, lacI^q, lac Δ AM15, Tn10(tet^r)] (Bullock y col.,1987). Para la transformación y propagación de los insertos clonados en los plásmidos pBluescript KS II, pGEM-T y pQE30.
- M15 (pREP4): NaI^s Str^s rif^s, lac⁻ ara⁻ gal⁻ mtl⁻ F⁻ recA⁺ uvr⁺. (Qiagen). Para la expresión de proteínas clonadas en el vector pQE30.
- P2392: hsdR514 (r_k-m_k⁺), F⁻e14⁻(mrcA⁻), supE44, supF58,lacY1, Δ (lacIZY)6 galT22, metB1, trpR55(P2). Para crecimiento del fago λ EMBL3.

4.2. Líneas de parásitos

- *Leishmania infantum*: cepa 21578
- *Leishmania tropica*: cepa 656 LRC

5. VECTORES PLASMIDICOS

5.1. Vectores de clonaje

- pBluescript II KS +/- (Stratagene): Vector utilizado para el subclonado y secuenciación de fragmentos de ADN.
- pGEM-T (Promega): Vector diseñado para el subclonado y secuenciación de fragmentos de ADN amplificados por PCR.

5.2. Vectores de expresión

- pQE-30 (Qiagen): Vector utilizado para la expresión de polipéptidos como proteínas fusionadas a 6 histidinas en el extremo amino terminal.
- pX: (Lebowitz y col., 1990). Cedido por el Dr. Stephen M. Beverley (Depto. of Molecular Microbiology Washington University, St. Louis Missouri. USA). El vector esta construido a partir de secuencias de la región R de *L. major*, un ADN circular extracromosómico de 30 Kb, en el que se ha sustituido el gen de la DHFR-TS por el gen *neo* que codifica para la neomicina fosfotransferasa y le confiere resistencia a la geneticina (G418).
- PKSNEOA: Vector para la expresión en *Leishmania*, similar al pX, modificado en polilinker en nuestro laboratorio por S. Castanys.

6. OLIGONUCLEOTIDOS SINTETICOS

6.1. Oligonucleótidos para secuenciación

NOMBRE	SECUENCIA
LABC1-1	AAGGTTGCTGTGCGGAAC
LABC1-2	GTTGCGATCATGGTGGAC
LABC1-3	TGTCGAGCGTGTTCACTG
LABC1-4	ATTGATTGCCTCGCCCAC
LABC1-5	CGAGCAGATGGTGCAGAC
LABC1-6	CCTCATGCAAAGCCGACG
LABC1-7	TCAGCAGAATCGTGTGCCACTTC

LABC1-8	GCTTCGACTTCAGGAACATGTTTCG
LABC1-9	GACGTCGCCGTCGTTGTC
LABC1-10	TGTAGCACAGGGAGCTGC
LABC1-11	GACTCGAAAGGGAATCTC
LABC1-12	GTTTCTCACGCCACGTAG
LABC1-13	TGAGAAAAGCTGAGCCTC
LABC1-15	GTCCACCATCGCACTGTC
LABC1-16	TCGTTTCAGCGACCAGCAC
LABC1-17	TTGCCACGTTGACTTGTC
LABC1-18	AGCATACAGCTGCACGTC
LABC1-19	ACACGGTTGCGATCATGA
LABC1-20	TCATCGGAGAGTACTCGC
LABC1-21	GAGTTGCCGCTCACGAGC
LABC1-22	GACGGCCCACAGCATGAC
LABC1-23	AGCACGCCGACGATCGTG
LABC1-24	CGTACAGAGATGACTCCAC
LABC1-25	GGTGGCATCAGTCGATTG
LABC1-26	GATCGTCGGCACGATTG
LABC1-27	GATGACGCCACCACCTC
LABC1-28	GCATACGCGCTCAGCTTC

6.2. Oligonucleótidos para clonaje

NOMBRE	SECUENCIA
LAC1-1	ggatccAGCACGCCGACGATCGTG
LAC1-2	aagcttGCGTACAGAGATGACTCC
LSL	AACGCTATATAAGTATCAG
T+ANCH	CCTCTGAAGGTTCCAGAATCGATAGGAATTC(T) ₁₈
ANCH	CCTCTGAAGGTTCCAGAATCGATA
ABC1-3'-3	GGTCGCGTGAGTGAAGTTG

Las letras minúsculas corresponden a secuencias no presentes en el ADN genómico, y fueron agregadas para introducir sitios de restricción. Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados en el "Servicio de Síntesis de Oligonucleótidos" del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra" (CSIC), Granada.

C.2. METODOS

1. CULTIVO Y MANIPULACION DE *LEISHMANIA*

1.1. Cultivo *in vitro* de *Leishmania*

Los promastigotes fueron cultivados *in vitro* a 28°C en medio RPMI 1640 modificado como describe Jackson y col., (1986), suplementado con 20% de suero bovino fetal (SBF) inactivado. El mantenimiento de los parásitos en cultivo se realizó mediante pases continuados, cada uno consistente en la inoculación de 4 millones de parásitos en fase logarítmica en 2 ml de medio fresco.

1.2. Criopreservación y descongelación de parásitos

La criopreservación se realizó con cultivos en fase logarítmica adicionándole 10% de glicerol. La temperatura se redujo de forma escalonada hasta llegar a -80°C y por último se almacenaron en nitrógeno líquido. La descongelación de los parásitos se llevó a cabo de un modo rápido, introduciendo el vial a 37°C. Posteriormente, los parásitos fueron centrifugados a 1000 g durante 10 min para eliminar los restos de glicerol y el sedimento celular se resuspendió en 4 ml de medio de cultivo para iniciar su crecimiento a 28 °C.

1.3. Transfección de parásitos

Promastigotes de *L.infantum* en fase logarítmica de crecimiento se lavaron 3 veces con PBS estéril y una vez con HBS estéril (Hepes 21 mM, NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Na₂HPO₄ 7 mM, glucosa 6 mM, pH 7,4). Finalmente fueron resuspendidos en HBS a una concentración de 5 millones/ml; 400 µl de esta suspensión se mezclaron con 100 µg de ADN plasmídico y se incubó durante 10 min en hielo. La transfección se realizó en el sistema ECM 600[®] de BTX utilizando como condiciones 450 voltios, 1300 µf y 13 ohms. Tras la electroporación, los parásitos se incubaron 10 min. en hielo y se transfirieron a 5 ml de medio RPMI modificado con 20% de SBF, incubándose a 28°C. A las 24 horas se añadió el fármaco de selección, que en este caso fue geneticina (G418) a una concentración inicial de 25 µg/ml. Tras sucesivos pases en presencia de

concentraciones crecientes de fármaco, los parásitos transfectados fueron finalmente mantenidos con 2 mg/ml de G418.

1.4. Clonado de *L. infantum* transfectada con LABC1N-3'

La línea de *L. infantum* transfectada con el plásmido LABC1N-3', fue clonada en medio sólido conteniendo RPMI/1% agarosa con 500 µg/ml de G418. Se plaquearon 500 y 5000 parásitos en placas de cultivo que fueron incubadas a 28°C en atmósfera húmeda por varios días hasta la visualización de los clones. Cada clon fue transferido a medio líquido en presencia de G418. Se eligieron aquellos clones que crecieron mejor en estas condiciones y se chequearon los niveles de expresión de proteína por Western Blot.

1.5. Recuento de los parásitos

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

1.6. Determinación de la inhibición del crecimiento (IC) y de la dosis inhibitoria 50 (DI₅₀)

La DI₅₀ se define como la concentración de fármaco que inhibe en un 50% el crecimiento de los parásitos. El porcentaje de inhibición de crecimiento (%IC) se calculó tras la incubación en presencia o ausencia del compuesto ensayado. Se partió de cultivos de parásitos en fase logarítmica. Un preinóculo de 4×10^6 parásitos/ml se cultivó en tubos estériles con 2 ml de medio en presencia de los diferentes fármacos. Los cultivos se hicieron por duplicado para cada concentración utilizada. Los parásitos se incubaron durante 72 horas a 28 °C y se contaron en un contador Coulter Counter.

1.7. Ensayo MTT

El método se basa en que las deshidrogenasas mitocondriales convierten el sustrato MTT, soluble y amarillo, en el producto formazán, insoluble y de color púrpura. La cantidad de producto formado depende del número de células y de la viabilidad de las mismas, y es cuantificado espectrofotométricamente tras solubilizar los cristales de formazán con SDS (Mosmann T, 1983). Para realizar el ensayo, se sembraron

300.000 parásitos/pocillo en un volumen final de 100 μ l de RPMI 20% SBF en una placa de microtitulación de 96 pocillos, y se incubó durante 72 horas a 28°C en presencia de las distintas concentraciones de fármaco. Al cabo de este tiempo, se añadió 10 μ l de MTT (5 mg/ml), y se incubó 4 h a 28°C para permitir la formación de los cristales. Finalmente los cristales de formazán se disolvieron, añadiendo 100 μ l de SDS 20% e incubando en oscuridad a 37 °C durante 4-16 h. La reducción del MTT se determinó leyendo la D.O.₅₄₀ en un lector de ELISA.

2. CULTIVO Y MANIPULACION DE BACTERIAS

2.1. Cultivo de bacterias

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

2.2. Preparación de células electrocompetentes y transformación

3 ml de bacterias se crecieron durante 16 horas en medio líquido con agitación a 37°C. Dicho pre-cultivo fue inoculado en 150 ml de LB, continuando su crecimiento hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,6. Las células se centrifugaron a 4000 g por 15 min a 4°C, y se lavaron en agua bidestilada estéril con los siguientes volúmenes: 1 volumen, 0,5 volúmenes y 0,02 volúmenes, centrifugándose cada vez 15 min a 4000 g a 4°C. Las bacterias se resuspendieron finalmente en 0,003 volúmenes de glicerol al 10% y se guardaron a -80°C hasta su utilización. Para la transformación se utilizó un electroporador BTX ECM 600 y las condiciones fueron 2,5 kV, 129 ohms, con un pulso de 5-6 milisegundos.

2.3. Infección de bacterias con bacteriófagos

Previamente a la infección, células de la cepa P2392 de *E. coli* fueron crecidas, precipitadas y resuspendidas en MgSO₄ 10 mM. Una dilución de los fagos en SM se incubó con 600 μ l de las células durante 15 minutos a 37°C. La dilución de los fagos se calculó de forma de obtener 4 x 10⁴ placas de lisis por placa de 150 mm de diámetro.

Seguidamente, a la mezcla se le agregó 6 ml de NZY top agar a 50°C y se vertieron en placas de Petri de 150 mm con NZY agar equilibradas a 37°C. Estas placas se incubaron durante toda la noche a 37°C hasta obtener placas de lisis.

2.4. Transferencia de bacteriófagos a membranas de nitrocelulosa

Sobre las placas de lisis se colocó un filtro de nitrocelulosa PROTRAN BA 85 (Schleicher & Schuell) dejándose absorber durante 2 min. Una vez retirado se colocó un segundo filtro durante 5 min para obtener una réplica del primero. Los filtros fueron tratados durante 3 min. con solución desnaturalizante, luego 5 min. con solución neutralizante, y finalmente durante 1 min. en SSC 2X. El tratamiento se hizo sobre papel Whatman 3 MM empapado en las soluciones anteriores y manteniendo los fagos en la parte superior de los filtros. Para fijar el ADN a los filtros, estos se secaron a temperatura ambiente y se fijaron a 80°C por 30 minutos en vacío.

2.5. Rastreo de la librería

Antes de realizar el rastreo, la librería genómica de *L. tropica* fue titulada. Para ello se prepararon distintas diluciones las cuales fueron utilizadas para infectar bacterias de la cepa P2392 tal como se describió previamente. El conteo de las placas de lisis obtenidas con cada dilución nos permitió obtener el título de la librería. Esta fue entonces plaqueada a razón de obtener 40.000 placas de lisis por placa de 150 mm. Una vez obtenidas las placas de lisis, los fagos fueron transferidos a filtros de nitrocelulosa por duplicado, como ya se ha descrito. Los filtros una vez fijados, fueron hibridados con la sonda. Tras la evaluación de las autorradiografías, se seleccionaron las placas de lisis que mostraron señal positiva con mayor intensidad en ambos duplicados. Los clones positivos se recogieron en 1 ml de SM y fueron nuevamente sembrados en placas de 90 mm de diámetro, para someterse a un nuevo proceso de selección hasta obtener todas los clones positivos tras la hibridación con la sonda. Los clones positivos se almacenaron en alícuotas de 1 ml de SM con unas gotas de cloroformo a 4°C, y para tiempos prolongados a -80°C con DMSO al 7%.

2.6. Preparación de bacteriófagos a gran escala

Para obtener el lisado de bacterias en medio líquido, se incubó una mezcla de 100 µl de un cultivo de células P2392 con 100 µl del stock de fagos en SM y 100 µl de una solución 1:1 de MgCl₂ 10 mM / CaCl₂ 10 mM durante 15 minutos a 37°C. Esta

mezcla se transfirió a un matraz con 50 ml de medio NZY y se incubó a 37°C con agitación durante 6-8 horas hasta observar lisis celular. Al lisado obtenido se le agregó 100 µl de cloroformo para completar la lisis y permitir la liberación de las partículas fágicas. Posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 10.000 rpm (rotor Sorvall SS-34) para eliminar restos celulares. El sobrenadante fue filtrado y se almacenó a 4°C con unas gotas de cloroformo.

3. AISLAMIENTO DE ACIDOS NUCLEICOS

3.1. Aislamiento de ADN genómico de parásitos

Se realizó siguiendo el protocolo descrito en el kit "Puregene DNA isolation" de Gentra, partiendo de 100 millones de parásitos. El ADN se resuspendió en agua bidestilada y se determinó su concentración mediante espectrofotometría (1 D.O.₆₀₀ = 50 µg/ml).

3.2. Aislamiento de ADN de fagos

La extracción de ADN se realizó a partir de lisados de bacterias en medio líquido. 50 ml de lisado se incubaron durante una hora a 37°C con 1 µg/ml de DNasa y 5 µg/ml de RNasa. Finalizado este período, se añadió 3,5 g de NaCl y 6 g de polietilenglicol (PEG 8000), agitándose una hora suavemente. Tras la precipitación durante la noche a 4°C, la mezcla se centrifugó 10 min a 10.000 rpm a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el sedimento fue resuspendido en 1 ml de SM. Los fagos se lisaron añadiendo EDTA 10 mM pH 8, SDS 0,2% y 100 µg/ml de Proteinasa K e incubándolos 1 hora a 37°C. El ADN fue extraído con fenol-cloroformo y cloroformo, precipitándose con acetato sódico 0,3 M pH 7 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. El ADN precipitado se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en agua bidestilada estéril.

3.3. Aislamiento de ADN plasmídico

Para las extracciones de ADN plasmídico a pequeña escala se empleó el kit "High pure isolation plasmid" de Roche. El método consiste en una lisis alcalina y precipitación con una solución de acetato potásico. El sobrenadante es pasado por una resina, lavado y eluido con un tampón Tris-HCl 10 mM pH 8,5. Para extracciones a mayor escala se siguió el protocolo del kit "Wizard maxiprep" (Promega), partiendo de 200-500 ml de cultivo bacteriano.

3.4. Aislamiento de ARN total de parásitos

El aislamiento de ARN total se llevó a cabo utilizando el reactivo Trizol (Gibco BRL) que se basa en el método de Chomczynski y Sacchi (1987). En el caso de *Leishmania*, 10^9 parásitos fueron resuspendidos en 1 ml de Trizol e incubados 15 min. a temperatura ambiente (T.A.). Finalizado este tiempo, se añadieron 200 μ l de cloroformo, se agitó vigorosamente el tubo durante 15 segundos, y se incubó 2-3 min. a T.A. Tras una centrifugación de 15 min. a 12.000 rpm a 4°C, se agregó a la fase acuosa 0,5 ml de isopropanol, incubándose 10 min. a T.A. Tras una nueva centrifugación de 10 min a 4°C y a 12.000 rpm. el sobrenadante fue descartado y el sedimento conteniendo el ARN se lavó con etanol al 75% y se resuspendió finalmente en agua tratada con DEPC. La concentración del ARN obtenido fue determinada mediante espectrofotometría, midiendo su absorbancia a 260 nm (1 D.O.= 40 μ g/ml).

3.5. Purificación de ARN poliadenilado de parásitos

El ARNm fue purificado siguiendo las instrucciones del kit "Quick Prep Micro mRNA Purification" (Pharmacia). Este se basa en el aislamiento de la fracción poliadenilada del ARN mediante su unión a oligo(dT)celulosa.

4. TRATAMIENTO ENZIMATICO DE LOS ACIDOS NUCLEICOS

4.1. Digestión del ADN con enzimas de restricción

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

4.2. Reacción de Ligación

Las reacciones de ligación de fragmentos de ADN se realizaron con la enzima T4 DNA ligasa (1 U/ μ g de ADN), procedente del bacteriófago T4. El volumen final fue de 20 μ l en el tampón suministrado por la casa comercial, utilizando por lo general

relaciones molares inserto:vector de 5:1. Generalmente, la reacción se realizó durante 16 horas a 16°C.

4.3. Marcaje de sondas radiactivas

Se utilizó el procedimiento de "Random Primed" (Feinberg y Vogelstein, 1983) para marcar moléculas de ADN con α ^{32}P -dCTP (Amersham corp.). Esta técnica se basa en la utilización de una mezcla de hexanucleótidos que actúan como cebadores para la síntesis de ADN por el fragmento Klenow de la DNA Polimerasa I de *E. coli*. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 μl con una concentración de ADN de 20-50 ng, 50 μCi de α ^{32}P -dCTP y 2 U de Klenow, siguiendo el protocolo de la casa comercial (Roche). Las sondas marcadas se purificaron mediante cromatografía en columnas de 1 ml de Sephadex G-50 (Pharmacia). El ADN marcado fue resuspendido en un volumen final de 100 μl y el número de cuentas por minuto (cpm) se determinó en un contador de centelleo.

4.4. Reacción de la transcriptasa inversa

Para la síntesis de ADNc a partir de un molde de ARN se utilizaron 17 U de la AMV transcriptasa inversa ("Avian Myeloblastosis Virus") en una reacción conteniendo 2 μg de ARN poliA⁺, 100 pmol de cebador antisentido, una mezcla de deoxinucleótidos (400 μM de cada uno), y la reacción se llevó a cabo en presencia de un inhibidor de RNasa (33U), incubándose durante dos horas 30 min a 42°C. Se realizó una desnaturalización a 95°C durante 15 min, y una dilución 1:10 en agua bidestilada, para posteriormente ser utilizada en posteriores experimentos.

4.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se empleó la Taq polimerasa de *Thermus aquaticus*, tanto la EcoTaq (C-Viral) para fragmentos de tamaño pequeño, como la mezcla enzimática de la "ExpandTM Long Template PCR System" de Roche, para fragmentos de gran tamaño. Las reacciones se llevaron a cabo por lo general en un volumen final de 50 μl conteniendo una mezcla de 12-40 pmol de cada cebador, 0,1 vol. de tampón de PCR (Roche), 400 μM de cada deoxinucleótido, 10-100 ng de ADN molde y 1-5 U de polimerasa. Las condiciones de la PCR y el número de ciclos de amplificación se ajustaron para cada experimento.

4.6. Secuenciación del ADN

La secuenciación de ADN se realizó por el método de terminación de cadena por dideoxinucleótidos descrito por Sanger y col. (1977). El método se basa en la interrupción de la síntesis de ADN por una polimerasa mediante la incorporación de un dideoxinucleótido, que detiene la elongación de la cadena a partir de un cebador, por no tener un extremo 3'-OH al cual añadir el siguiente nucleótido trifosfato. La secuenciación se realizó con un secuenciador automático 373 Automated DNA (Applied Biosystems) utilizando el *kit* AmpliTaqDyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing (Perkin Elmer) y utilizando una optimización llevada a cabo en nuestro Instituto (Lario y col., 1977). Los cebadores utilizados fueron los universales T3, T7 y SP6, así como oligonucleótidos sintéticos específicos.

5. ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA DE ACIDOS NUCLEICOS

5.1. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Mediante esta técnica, los fragmentos de ADN pueden ser separados según su tamaño y posteriormente ser transferidos a membranas o bien purificados a partir del gel. Se utilizaron geles de agarosa de porcentaje entre 0,8 y 1,5%, según los tamaños a separar, preparados en tampón TAE y realizándose la separación a 5 voltios/cm. Las muestras se cargaron en los geles con tampón de carga. El ADN se visualizó tiñiendo los geles con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio y observándolos bajo luz ultravioleta.

5.2. Electroforesis en campo pulsado

La preparación de los bloques de agarosa se realizó siguiendo el método de Garvey (1986). Cada bloque contiene aproximadamente 8×10^7 parásitos (unos 24 µg de ADN) en fase logarítmica de crecimiento. Tras lavar los parásitos tres veces en PBS 1X se resuspendieron en 0,3 ml de PBS y se mezclaron con igual volumen de agarosa de bajo punto de fusión al 1,2% en PBS. La mezcla se depositó en moldes y se dejó solidificar a 4 °C. Los bloques solidificados se depositaron en el tampón de digestión (EDTA 0,5 M pH 9, N-lauril sarcosina 1% y proteinasa K 1%) y se incubaron durante 48 h a 50 °C. Posteriormente, se lavaron 3 veces en EDTA 0,2 M pH 8, (cada lavado de 3 h) y quedaron almacenados en este tampón a 4 °C hasta su utilización. La electroforesis se

realizó en geles al 1,5% de agarosa y tampón TBE 0,5X en un aparato de electroforesis CHEF de LKB-Bromma con un sistema controlador de pulsos 2015 Pulsaphor Plus acoplado a un sistema de refrigeración 2219 Multitemp II Thermostatic Circulator. Para la separación de los cromosomas de *Leishmania* se aplicaron pulsos de 100, 200 y 300 seg., cada uno durante 24 horas. El marcador de peso molecular utilizado fue "Yeast chromosome PFG Marker", de *S. cerevisiae* YPH80 No. 345 BioLabs. Finalmente, los geles se transfirieron a membranas de nylon Hybond-N para su posterior hibridación con las sondas radioactivas.

5.3. Purificación del ADN incluido en agarosa

Los fragmentos de ADN se aislaron utilizando el kit comercial Gene Clean® (Bio 101 Inc) siguiendo el protocolo de la casa comercial. El fragmento de agarosa fue disuelto en una solución de NaI a 45-55 °C durante 10 min y el ADN se retuvo en una resina de sílice ("Glass Milk®"). La resina, que contiene el ADN, se lavó con una solución de etanol para eliminar impurezas y finalmente el ADN se eluyó con agua, incubándolo a 45-55 °C durante 2 min.

5.4. Electroforesis de ARN en geles desnaturalizantes

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

5.5. Transferencia de ADN mediante "Southern blot"

El ADN separado mediante electroforesis en geles de agarosa fue transferido a membranas de nylon Hybond-N® (Amersham), según la técnica descrita por Southern (1975). Los geles fueron tratados 10 min con HCl 0,25 M para depurinizar el ADN y facilitar su hidrólisis; posteriormente, fueron tratados con solución desnaturalizante durante 30 min, y con solución neutralizante durante el mismo tiempo. La transferencia se realizó durante toda la noche por capilaridad en tampón

SSC 20X. Finalizada la transferencia, los filtros se lavaron en SSC 2X y una vez secos el ADN fue unido covalentemente por irradiación con luz ultravioleta durante 3-5 min.

5.6. Transferencia de ARN mediante "Northern blot"

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

5.7. Hibridación de ácidos nucleicos con sondas radiactivas

Los filtros conteniendo ADN fueron preincubados en bolsa a 65 °C durante 1 hora y con agitación suave, en la solución de hibridación (0,2 ml/cm² de filtro). Posteriormente, se hibridaron durante 16 horas, a 65 °C y agitación suave, con un volumen de solución de hibridación de 0,05 ml/cm² de filtro, en presencia de la sonda marcada radioactivamente (10⁶ cpm/ml) previamente desnaturalizada (10 min a 100 °C y 2 minutos en hielo). En el caso de filtros conteniendo ARN, la hibridación se realizó a 42 °C en una solución conteniendo 50% de formamida. Los lavados se llevaron a cabo en SSC 2X/SDS 0,1%, a 65 °C. En algunos casos cuando se requirieron condiciones de mayor astringencia, se continuaron los lavados disminuyendo la concentración de sales hasta 0,2X de SSC. Una vez lavados, los filtros se dejaron secar al aire y se expusieron a una película autorradiográfica a -80 °C, utilizándose pantallas amplificadoras.

6. TECNICAS DE OBTENCION Y ANALISIS DE PROTEINAS

6.1. Obtención de proteínas totales de *Leishmania*

Los parásitos fueron lavados 3 veces con PBS 1X y se resuspendieron en tampón de lisis a una concentración de 10⁹ parásitos/ml de tampón de lisis. Las muestras se incubaron 30 min. a 37 °C y posteriormente se añadió un volumen del tampón de muestra 2X.

6.2. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó utilizando el método colorimétrico de Bradford (1976). Este método consiste en la cuantificación de la unión del colorante Coomassie brilliant blue a las proteínas de la muestra, medida por espectrofotometría. Para obtener los valores, se realizó previamente una curva patrón con los valores de D.O.₅₉₀ obtenidos a partir de concentraciones crecientes de albúmina.

6.3. Electroforesis de proteínas en geles SDS-PAGE

La separación de proteínas en función de su tamaño se realizó mediante la técnica de electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida y SDS (SDS-PAGE), según el método de Laemmli (1970). La separación electroforética se realizó en geles discontinuos, compuestos por un gel superior (almacenador) preparado al 3-3,75% de acrilamida/bisacrilamida y pH 6,8, y un gel inferior (separador) al 10-14% y pH 8,8. Los porcentajes de acrilamida se eligieron en función del tamaño de las proteínas de interés a separar. La electroforesis se llevó a cabo en minigeles empleando la cubeta Mighty Small SE250 (Hoefer Sci. Inst.) entre 20-25 mA/gel. Como marcador de peso molecular se utilizaron los standards preteñidos de BioRad. La fijación y visualización de las proteínas se realizó mediante tinción con una solución de Azul Coomassie R-250 al 0,2% en 40% de metanol y 10% ácido acético durante media hora y posterior decoloración en 40% de metanol y 10% de ácido acético.

6.4. Obtención de proteína recombinante de bacterias transformadas

Se partió de un cultivo de 20 ml de LB conteniendo una colonia aislada de bacterias transformadas con el vector pQEAC-1. Este se creció durante la noche en presencia de 100 µg/ml de ampicilina y 25 µg/ml de kanamicina a 37 °C con agitación. Este cultivo se transfirió a un litro de LB incubándose a 37°C con agitación hasta una D.O.₆₀₀ de 0,6, momento en que se indujo la expresión de la proteína añadiendo al cultivo IPTG a una concentración de 500 µM incubándose durante 3 h a 37 °C. El cultivo se centrifugó durante 10 min a 4.000 g, y tras lavarlo 3 veces con PBS se resuspendió en PBS con 1 mg/ml de lisozima, incubándose 30 min a temperatura ambiente. Se realizó un chequeo de solubilidad de la proteína inducida, para lo cual las células se lisaron mediante 2 pulsos de sonicación de 30 seg. Tras una centrifugación de 35 min a 14.000 rpm, se separaron los sobrenadantes y los sedimentos, que se

resuspendieron en tampón de lisis. Una alícuota de cada uno de ellos se calentó 10 min a 95°C, se centrifugó 2 min y se cargó en geles de poliacrilamida.

6.5. Cromatografía de afinidad con Ni²⁺-NTA

El vector pQE-30 permite producir la proteína recombinante fusionada con un extremo de 6 histidinas. La proteína fue purificada por cromatografía de afinidad utilizando como soporte sólido Ni²⁺-ácido nitrilotetra-acético (Ni-NTA) (Qiagen). En nuestro caso se empleó la purificación en "batch" bajo condiciones desnaturalizantes. El sedimento de proteínas insolubles fue resuspendido en Tampón A (hidrocloruro de guanidina 6M, Fosfato de sodio 0,1M, Tris-HCl 0,01M pH 8). Se incubó con agitación 1 hora a temperatura ambiente. Se agregó la resina Ni-NTA que previamente ha sido equilibrada con tampón A. La mezcla de proteínas y resina se incubó 45 min a temperatura ambiente con agitación constante. Posteriormente se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón A, 5 volúmenes de tampón B (urea 8M, fosfato de sodio 0,1M, Tris-HCl 0,01M pH 8), 5 volúmenes de tampón C (pH 6,3), 5 volúmenes de tampón D (pH 5,9) y 5 volúmenes de tampón E (pH 4,5). Los sobrenadantes de cada eluido se recuperaron y chequearon en geles de poliacrilamida.

7. TECNICAS INMUNOLOGICAS

7.1. Obtención de anticuerpos policlonales de conejo

Para la obtención de anticuerpos contra las proteínas recombinantes se utilizaron conejos de la cepa New Zealand White. Previamente a su inmunización, se tomó una muestra de suero preinmune para su utilización como control en los ensayos posteriores. Se realizaron inmunizaciones por vía subcutánea con 150 µg de proteína, de acuerdo al siguiente protocolo. La primera inmunización se realizó con 150 µg de proteína en 500 µl de PBS con un volumen igual de Adyuvante Completo de Freund (Sigma), mezclándose hasta lograr una emulsión homogénea. La emulsión se inyectó por vía subcutánea en tres sitios diferentes. Dos semanas después se realizó la segunda inmunización con igual cantidad de proteína pero esta vez con un volumen de Adyuvante Incompleto de Freund (Sigma), siguiéndose el mismo procedimiento que en la primera. Cinco inoculaciones más fueron practicadas espaciadas por dos semanas y durante las cuales se extrajo sangre del conejo para medirse los títulos de anticuerpos mediante la técnica de ELISA. Finalmente, a los 15 días de la última inoculación, se

realizó la sangría final. Los sueros se obtuvieron incubando las muestras de sangre durante dos horas a temperatura ambiente, 20 min a 37°C, y posteriormente en hielo varias horas para permitir la formación del coágulo. Tras centrifugar durante 10 min a 2.500 g, el sobrenadante fue recuperado almacenándose a 4 °C con 0,02% de azida sódica o a -80 °C.

7.2. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA)

Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos. Se aplicó a cada pocillo 0,5 µg de proteína en un volumen de 200 µl de ácido bórico 100 mM pH 9,5, incubándose 5 h a 37 °C. Posteriormente, las placas se lavaron tres veces con TBS/1% Tween20 (TBS-T) y se bloquearon durante la noche a 4 °C con 200 µl por pocillo de una solución de TBS-T conteniendo 5 µg/ml de BSA. Las placas se lavaron tres veces con 200 µl TBS-T y posteriormente se agregaron 200 µl de las diferentes diluciones del suero preinmune e inmune en TBS-T, incubándose una hora a 37 °C. Los pocillos se lavaron nuevamente con TBS-T y se agregaron 100 µl del anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma) en una dilución 1/5.000 incubándose una hora a 37°C. Las placas se lavaron nuevamente y se revelaron con 200 µl de para-nitrofenil fosfato (1 mg/ml) en una solución de dietanolamina 100 mM pH 9,5/MgCl₂ 0,5 mM durante 10 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo añadiendo 50 µl por pocillo de EDTA 0,5 M pH 8, midiéndose la D.O.405 en un lector de placas Titertek.

7.3. Transferencia de proteínas a membrana y detección con anticuerpos: Western-blot.

Las proteínas separadas por electroforesis en geles de acrilamida se transfirieron a membranas Immobilon-P (Millipore). Se siguieron las instrucciones descritas por la casa comercial. Finalizada la electroforesis, el gel fue sumergido en el tampón Cátodo durante 15 min. La membrana fue preparada humedeciéndola en metanol absoluto durante 15 seg, transfiriéndola a agua 2 min y finalmente incubándola en tampón Anodo II durante 5 min. El "sandwich" de transferencia se montó colocando la membrana sobre papeles Whatman humedecidos en tampones Anodo I y II, y el gel sobre la membrana cubierto de papeles Whatman humedecidos en tampón Cátodo. La transferencia semihúmeda se realizó en un aparato Semi-Phor TE70 (Hoefer Sci. Inst.) 1,2 mA/cm² durante una hora. Finalizada la transferencia, la membrana fue teñida con Rojo Ponceau 0,5% /ácido acético 1% para visualizar las

proteínas y determinar la eficiencia de la transferencia, destiñéndose con NaOH 0,1N. Finalmente la membrana se sumergió 10 seg en metanol. Para la inmunodetección, las membranas se incubaron durante una hora con el suero inmune anti-ABC1.1 diluido 1/5.000 en tampón de bloqueo (1% BSA en PBS 1X) conteniendo 0,05% Tween-20. Tras 2 lavados de 10 seg con tampón de bloqueo, se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina (1/5.000) durante 30 min. Después de 2 lavados rápidos, la membrana fue revelada en tampón fosfatasa conteniendo los sustratos NBT y BCIP.

7.4. Purificación de la fracción IgG por columna de proteína A

Se utilizó la columna de proteína A sepharosa CL-4B de Pharmacia siguiendo las instrucciones de la casa comercial. La columna fue equilibrada con tampón de unión (Tris-HCl 50 mM pH 7). A continuación se aplicaron 20 ml de suero inmune diluido 1/10 en el tampón anterior. Después de lavar la columna con el mismo tampón, la fracción IgG retenida en la columna fue eluída con tampón glicina 0,1M pH 3 y posteriormente neutralizada con unas pocas gotas de Tris-HCl 1M pH 9. El título de la fracción purificada fue determinado por ELISA.

7.5. Inmunofluorescencia indirecta

Los parásitos se lavaron 4 veces con PBS 1X a 4°C y se resuspendieron en PBS 1X a una concentración de 2×10^6 parásitos/ml. Se utilizaron portaobjetos provistos con 10 círculos de 6 mm de diámetro (BioMerieux) y se depositaron 20-30 μ l de la suspensión de parásitos por círculo, dejándose secar completamente a temperatura ambiente y almacenándose a -20°C hasta su utilización. Para su fijación, los portaobjetos con parásitos fueron incubados 5 min con etanol absoluto a -20°C y 8 min con acetona a -20°C. Para la inmunofluorescencia, las preparaciones fueron incubadas con los sueros preinmune e inmune diluidos en tampón IFI (PBS/0,1%BSA) durante 1 h a 37°C en cámara húmeda. Se lavaron 3 veces en tampón IFI y se incubaron con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a fluoresceína (Sigma), diluido 1/200 en tampón IFI 1 h a 37°C en cámara húmeda. Los portaobjetos se lavaron 3 veces en tampón IFI y tras su montaje con Vectashield (Vecta Laboratories Inc.) se observaron las muestras en microscopio de fluorescencia.

7.6. Inmunomicroscopía electrónica

Los parásitos (aproximadamente 10^9) se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron con 2% paraformaldehído/0,05% glutaraldehído en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 durante 4 horas. Los bloques de inclusión fueron preparados por el servicio técnico del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Los bloques se seccionaron en cortes ultrafinos de 700 Å de espesor y se montaron sobre rejillas de níquel de malla 300. Las gradillas que contienen los cortes fueron incubadas en atmósfera húmeda. Las soluciones utilizadas fueron filtradas a través de poros de 0,22 μm . Las gradillas conteniendo los cortes fueron incubadas por 30 min sobre gotas de PBS/BSA 3% a temperatura ambiente, posteriormente por 10 min en PBS/BSA 1% y durante 16 horas con distintas diluciones del anticuerpo anti-ABC1.1 purificado en PBS/BSA 1% con 0,05% Tween-20. Se realizaron 5 lavados rápidos y 5 lavados de 5 min cada uno con PBS/BSA 3%, 3 lavados rápidos y 3 lavados de 5 min cada uno con PBS/BSA 1%, y finalmente 1 lavado de 5 min con PBS. Posteriormente, las gradillas fueron incubadas 10 min en PBS/BSA 3%, 10 min en PBS/BSA 1% y finalmente con una dilución 1/75 del anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con partículas de oro de 10 nm (Sigma) durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras realizar los mismos lavados detallados anteriormente, las gradillas se enjuagaron en agua y se secaron con ayuda de papel Whatman. Previo a su visualización, las gradillas fueron contrastadas con acetato de uranilo durante 2 min.

8. OTRAS TECNICAS

8.1. Eflujo de ^3H -colesterol

Se siguió el procedimiento básicamente el procedimiento empleado por Fielding y col. (2000) y Chambenoit y col. (2001), para medir eflujo de colesterol en células de mamíferos, con algunas modificaciones y adaptado a las condiciones adecuadas para parásitos. Parásitos en fase logarítmica de crecimiento fueron sembrados en medio RPMI modificado con 1% SBF a una concentración de 20 millones/ml e incubados durante 24 horas a 28°C en presencia de ^3H -colesterol (5 $\mu\text{Ci/ml}$). Finalizada esta incubación, los parásitos cargados con colesterol fueron lavados 2 veces con PBS y una vez con PBS/0,5% BSA libre de lípidos. Para la determinación del eflujo, los parásitos se resuspendieron en: 1) medio RPMI 1640 con

0,5% BSA en ausencia o presencia de apoAI (10 $\mu\text{g/ml}$), o 2) medio RPMI 1640 con 1% o 20% SBF. Tras incubarlos 12-14 horas, los parásitos fueron centrifugados 10 min a 3.000 g. Los sobrenadantes fueron transferidos a nuevos tubos conteniendo un volumen de dibutilftalato, centrifugados nuevamente, midiéndose en contador de centelleo la radiactividad de los sobrenadantes obtenidos. Los sedimentos fueron resuspendidos en NaOH 0,1N/SDS 0,2% y se midió la radiactividad asociada. El porcentaje de eflujo de ^3H -colesterol de cada muestra fue determinado como la cantidad de radiactividad en el medio dividido por la suma de la radiactividad medida en el medio y en el sedimento.

8.2. Acumulación intracelular de NBD-fosfolípidos y análisis mediante citometría de flujo.

Los ensayos de acumulación de análogos de fosfolípidos (NBD-fosfolípidos) se realizaron preincubando los parásitos (8 millones/ml) con PMSF 500 μM durante 30 min en tampón HPMI, con o sin glucosa a 28°C. Una vez finalizada dicha preincubación, se añadió un volumen con una concentración 2X del NBD-fosfolípido correspondiente en HPMI, suplementando nuevamente PMSF a una concentración de 500 μM final. En el caso del ensayo de acumulación en hielo, tras la preincubación con PMSF, los parásitos se colocaron en hielo por 5 min antes de agregar el C_6 -NBD-PS. La concentración de NBD-fosfolípidos empleada fue en el caso de C_6 -NBD-PS de 2 μM y en el caso de C_6 -NBD-PC y C_6 -NBD-PE, de 1 μM . Los parásitos (4 millones/ml) fueron incubados con NBD-fosfolípidos durante 30 min en las siguientes condiciones: 1) en HPMI con glucosa a 28 °C; 2) en HPMI con glucosa en hielo; 3) en HPMI sin glucosa y en presencia de azida 10 mM. A continuación, se realizaron dos lavados con PBS en frío, se resuspendió cada muestra en PBS frío y se colocó en hielo. La fluorescencia celular se midió inmediatamente después del tratamiento con ditionito durante 30 seg. Se realizaron medidas de 10.000 células por muestra en citómetro de flujo Beckton Dickinson (Mountain View, CA). El análisis de los datos se llevó a cabo determinando la fluorescencia intracelular debida a la acumulación de los compuestos utilizados, medida como canales de fluorescencia media. Se establecieron regiones y se analizaron 10.000 sucesos en las mismas, que se representaron en forma de histogramas. Se utilizó el programa Cell Quest para el análisis de los datos.

RESULTADOS

D. RESULTADOS

1. AISLAMIENTO DEL GEN *LtrABC1.1*

1.1. Rastreo de una librería genómica de *Leishmania*

Para identificar secuencias codificantes de transportadores ABC que presentaran homología con los miembros de la subfamilia ABCA, realizamos el rastreo de una librería genómica de *Leishmania tropica*. Esta librería había sido previamente construida en el laboratorio, utilizando como vector el fago λ EMBL3. Se empleó como sonda una secuencia parcial de *Trypanosoma cruzi* codificante de un posible transportador de la subfamilia ABCA. Esta secuencia parcial, de 900 pares de bases (pb), correspondió al extremo 3' del gen. La librería contó con un título de $3,4 \times 10^{10}$ unidades formadoras de placa por mililitro (pfu/ml) y fue plaqueada a razón de 30.000 pfu por placa, sobre cuatro placas en total. Tras su crecimiento, las placas de lisis fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa por duplicado y fueron hibridadas con la sonda antes mencionada. En el rastreo primario se obtuvieron entre 20 y 25 clones positivos por placa, de los cuales 24 en total fueron plaqueados otra vez para realizar un segundo rastreo. Finalmente se seleccionaron 6 clones que fueron sometidos a un tercer rastreo, y así hasta obtener la homogeneidad de cada clon.

1.2. Caracterización del fago recombinante que contiene el gen *LtrABC1.1*

Tras el rastreo de la librería genómica se obtuvo el ADN de los clones elegidos y se procedió a su mapeo utilizando diferentes enzimas de restricción. Para determinar la ubicación del gen dentro de cada inserto, los productos de digestión fueron transferidos a membranas de nylon e hibridados con la sonda de *T. cruzi* ya mencionada. Entre los clones analizados, fue seleccionado el fago denominado 2B1, con un tamaño de inserto de 13.271 pb y que parecía contener un gen completo (Figura D1). A partir del ADN de este fago se procedió a clonar un fragmento de 2,5 Kb que hibridó con la sonda de *T. cruzi*. Dicho fragmento fue clonado en el sitio de restricción para Sal I del plásmido pBluescript-KS y tras su secuenciación completa se identificó como la porción 3' de una secuencia codificante de un transportador ABC. Este fragmento consistió en la secuencia que codifica el segundo dominio de unión a ATP de la proteína, seguida de secuencia no codificante. Posteriormente este trozo de 2,5 Kb fue utilizado como sonda para reconocer y clonar otro fragmento proveniente de la digestión del fago 2B1 con la enzima Bgl II. El nuevo fragmento clonado, de 3 Kb,

correspondió a la porción 3' de la secuencia codificante, y que solapaba con el fragmento de 2,5 Kb ya conocido. Una porción de 300 pb de este fragmento se empleó como sonda para la identificación de la porción 5' del gen contenido en el fago 2B1. Un fragmento de 5 Kb, producto de la digestión con las enzimas Xho I y Hind III, que resultó positivo tras la hibridación con esta sonda, fue clonado y secuenciado. Este fragmento contenía la porción 5' del gen precedida de 2 Kb de secuencia no codificante. Finalmente se procedió a clonar el fragmento restante de 4 Kb, producto de la digestión con Sal I y Xho I. Así, la secuencia codificante del gen *LtrABC1.1* consiste de 5.529 nucleótidos. Un esquema de los diferentes fragmentos clonados y sus posiciones respectivas dentro del mapa del fago 2B1, así como los plásmidos resultantes, puede observarse en la figura D1.

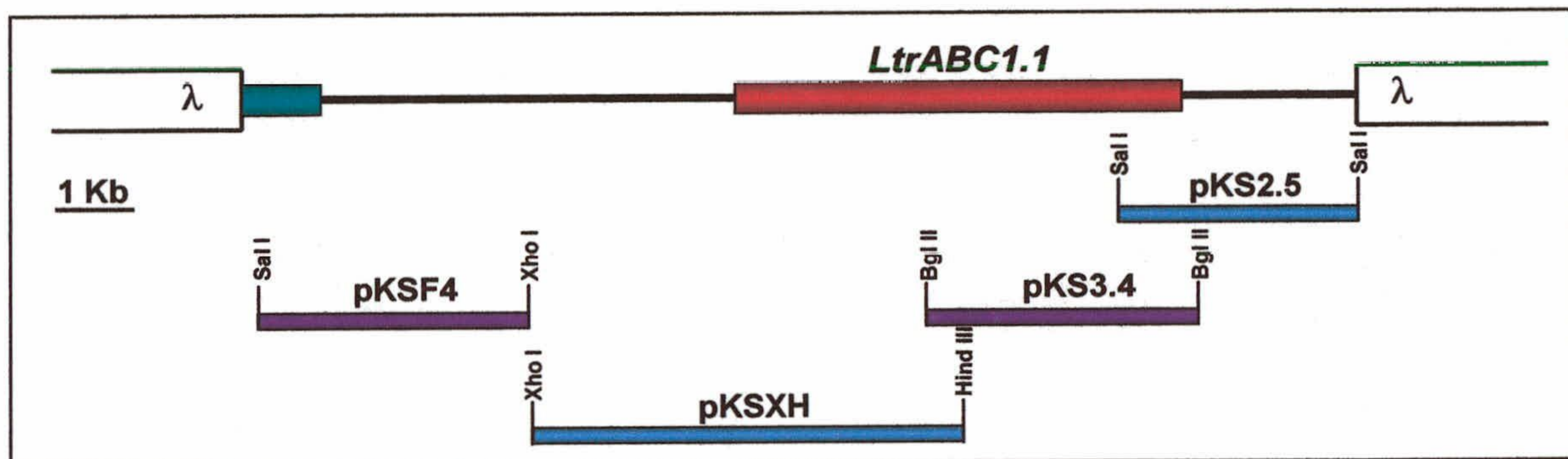


Figura D1. Representación esquemática del inserto contenido en el fago 2B1. El inserto de 13.271 pb está flanqueado por los brazos del fago λEMBL3. La secuencia codificante del gen *LtrABC1.1* está representada en color rojo. Debajo se señalan los distintos fragmentos clonados en el vector pBluescript-KS y los nombres de los plásmidos resultantes. pKS2.5 contiene un fragmento Sal I de 2,5 Kb; pKS3.4 contiene un fragmento Bgl II de 3 Kb; pKSXH contiene un fragmento Xho I/Hind III de 5 Kb; pKSF4 contiene un fragmento Sal I/Xho I de 4 Kb. A la izquierda del esquema, en verde, se señala la secuencia codificante de la duplicación génica, que denominamos *LtrABC1.2* (ver más adelante).

Tras el análisis por mapeo de restricción y la secuenciación del fragmento de 4 Kb ubicado corriente arriba del gen *LtrABC1.1* (ver Figura D1), se encontró, truncado por uno de los brazos del fago, el extremo 3' de otro gen de la familia ABC. Esta secuencia de 1,1 Kb parece constituir una duplicación génica ya que es idéntica a la secuencia del gen *LtrABC1.1*, excepto en la región 3' donde ocurren algunos cambios (figura D2). Los cambios de dos nucleótidos, G por C y T por G en las posiciones 5.503 y 5.505 de la secuencia de *LtrABC1.1*, dan ambos lugar a un cambio del aminoácido valina en la posición 1.835 por una leucina; el cambio de una G por una A en la posición 5.321, produce un cambio del aminoácido serina en la posición 1.774 de la proteína, por el aminoácido asparagina; el cambio de una G por una A en la posición 5.328 constituye un cambio silencioso; finalmente, el cambio de una T por una C, en la

1.3. Identificación de una secuencia repetida invertida

El análisis de las regiones 5' y 3' no codificantes del gen *LtrABC1.1* reveló la existencia de una secuencia en la región 5' que se encuentra repetida e invertida en el extremo 3' y que en consecuencia está flanqueando el gen *LtrABC1.1* (ver figura D1). El largo de esta repetición invertida no lo conocemos puesto que la secuencia ubicada 3' con respecto al gen se encuentra truncada por uno de los brazos del fago 2B1. La repetición caracterizada es de al menos 219 pb de longitud y mostró ser idéntica a nivel nucleotídico. Está ubicada en la región 5' no codificante, entre los nucleótidos 2004-2223 antes del sitio de inicio de la traducción de ABC1.1 y en la región 3' no codificante, se encuentra entre los nucleótidos 1.149 y 1.368 después del triplete de terminación de la traducción.

Dado que *Leishmania*, al igual que el resto de las células eucarióticas, contiene familias de secuencias repetidas, quisimos conocer si este elemento se hallaba representado en muchos sitios en el genoma del parásito. Para ello, utilizamos la secuencia repetida como sonda para la hibridación de un Southern genómico de *Leishmania tropica*, que fue digerido con enzimas cuyas dianas no están presentes en la sonda. Observamos un patrón de bandas de hibridación discreto lo que sugiere que dicha secuencia se encuentra sólo moderadamente repetida en el genoma de *Leishmania* (Figura D3).

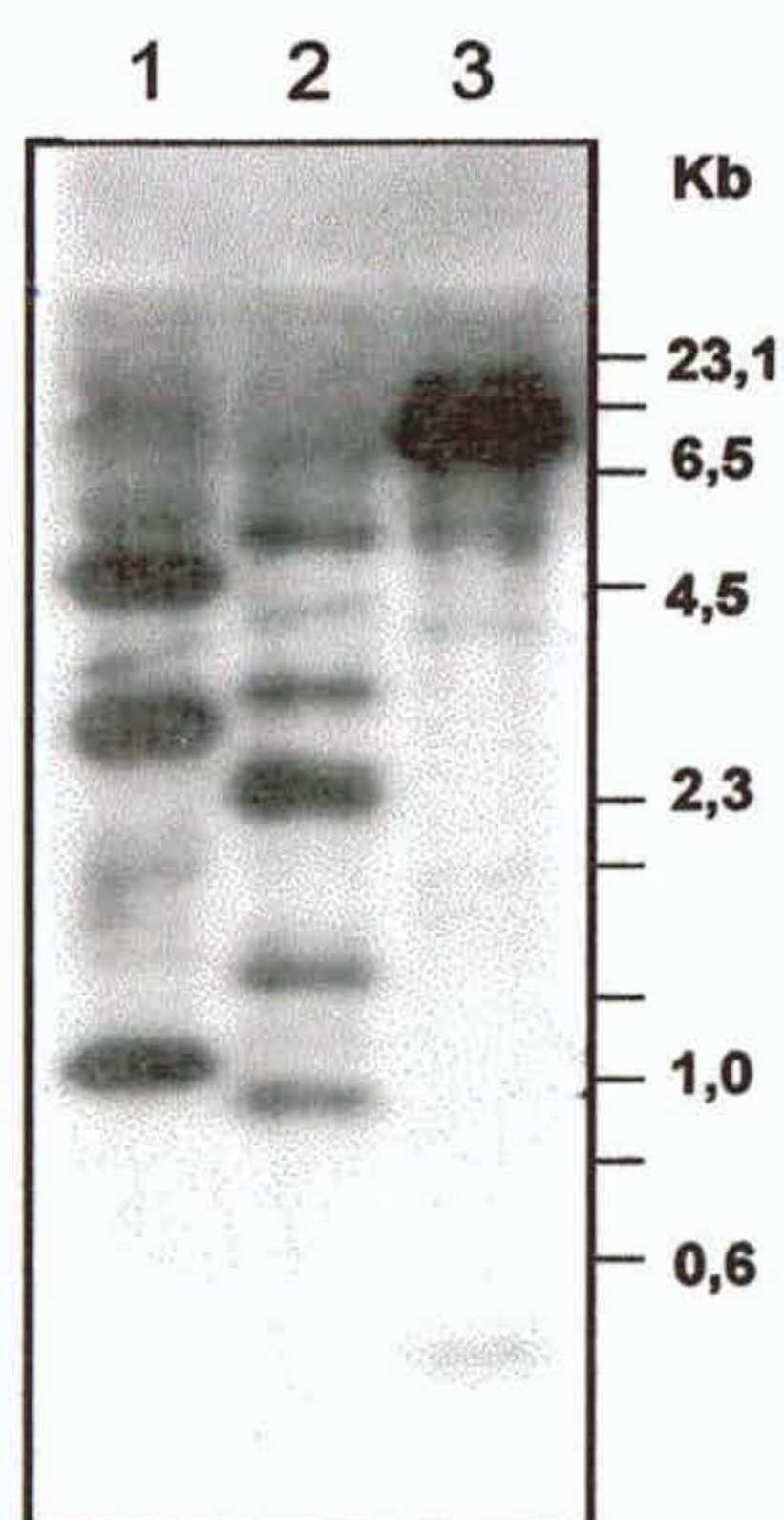


Figura D3. Caracterización de la secuencia repetida invertida que flanquea al gen *LtrABC1.1*. Southern blot de ADN de *L. tropica* hibridado con la sonda de la secuencia repetida. Las enzimas de restricción empleadas fueron: 1. Ksp I; 2. Pst I; 3. Xho I.

La búsqueda de homologías de esta secuencia repetida en el banco de datos del genoma de *Leishmania*, no arrojó homologías significativas con ninguna secuencia.

1.4. Análisis de secuencia y análisis predictivo de la estructura de ABC1.1

A partir de la secuencia del gen *LtrABC1.1* obtenida hemos podido deducir su secuencia en aminoácidos (figura D4). El análisis de dicha secuencia permitió identificar que se trata de un transportador ABC completo de 1.843 aminoácidos, con las dos mitades homólogas de la proteína, cada una consistente en una región hidrofóbica, compuesta por 6 segmentos transmembrana, correspondiente al dominio transmembrana (TMD) y una región hidrofílica correspondiente al dominio de unión a nucleótidos (NBD). En este último dominio destacan los motivos conservados en la familia de transportadores ABC, como son los motivos Walker A y Walker B así como el sello de la familia ABC (ver figura D4).

MPGAGPLVPSNSTTTTQNPLLLFASPGALPGLSFSRNNSEAFGEGQLFTPAVEGEYSMP	60
SGGSAFLRSDDRMIRGTALRTGEMRATTLEAGNHASPSAAENDVNDGSCVEMTAEQIPL	120
AQADDQYDVLHRRSASANS PARCRPRAGCCQQLGHTILRVLIILMKREW CSTLCE <u>FLIPIL</u>	180
<u>FVFGSVMLWAV</u> FGTAQNSAGVYYSSTGPEKVSAMTDKISSSLCYNASLASGIAGLTPCLE	240
^{TM1}	
GQKYYCPHGRGIPTGFCYDPPLKNVVAQLL GALPLTTS PMLPLDTLIACQWVGMDQSIRA	300
STPFSYGGLLYFAPRTPEVESLVS YMRAQSKLFDNAYGGTFATAADATSHILSLTHDDPP	360
TWGVVELDSYTADTFNVKIMVNSSALPATS DSILSGYLGGLDMSTNSPYIFSGYTTLQTL	420
VYNHYTTSVLGKPKATKPLTYTAMPTKAYNTS <u>SFLLTGASLAPLILVLGFLYPVS</u> QLTKRI	480
^{TM2}	
VVEKELRIREAMLIMGLSEWTMYLAWLVVYGVWYTVVSIITVLLRLTYLPESP GYVFF	540
^{TM3}	
<u>MFLLEFSWSTIALSGAIAAV</u> FSKARLAAIIAPLIYFAMAIPLFAMERASGGAKMGIMILGP	600
^{TM4}	
SAFAVGFALLFEHEVNGGAGVGALAYFRDEPKLIVVFVLLFVDIFVYLLMMYFDRVVPK	660
^{TM5}	
^{TM6}	
EWGTTKNPLFFVIDPVRWCFRRRAGDADNDGDVPGDGRAEDGVFEAVDPAVEEAAVRI	720
RGLRKTFRRGKAFAAVDDLCWSLNEGEISVLL <u>GHNGAGKST</u> TMNLMTGMLEADGGDCYV	780
YGHSVRHEL SAVRQEIGLCPQHNI LWPQLTVREHLDYAAIKGLRGSEKEDAIRLLAAV	840
DLEDKEHYMSKAL <u>SGGQ</u> KRKL SVAVAFVGGSR <u>LVILDE</u> PTAGMDVGARRHTWSLLKEMAK	900
WHTILLTTHFMDEADLLGDTVAIMSKGRLQCAGSNMFLKSKLGVGFVLTMSVVS HARRGP	960
IEQMVQTLVPAAEAIGSGAGEVAYRLPMASKPMFPDLLCAVEEGI PGLGINAYSLSATT L	1020
EEVFIKIAEGPDAERDADALAAKEKAEATAAVVNVEMEKGRWARRRLQFRAMMVKRLWNA	1080
LRDRRTQ <u>FFQIVCPVACVLLAMLTLVRL</u> FSTPTIVLSSDVYGTAVDIPLANCEGVLDVT	1140
^{TM7}	
TPFSTKAHMDIWTDPDASAFSTKLNRTYQTHAKERYGGVSCAAAGSGELYHSVFYNTSA	1200
LHEVAIETANVFAAHLRVATGRDNVSVTTAVASLPKTSQQRAVESSLYAMMIAVIIMIPF	1260
^{TM8}	
<u>TFIPSTFVGWIVRERE</u> CKARHLQNVSGLSFYIYWLSN <u>FLEDLCSYIVTMCLVIVVFLA</u> FG	1320
^{TM9}	
RDEYVAVNNIGATFVVFLLYGVSGILMAYALSFAFDNHSTAQN <u>VVMLVNFIVGFLLVLAV</u>	1380
^{TM10}	
^{TM11}	
<u>SALSLKESTRNLAKVLRWIFRIVPSYCVGEAINNLASLKVTRAFGIDTSTWDMDVVGWVC</u>	1440
<u>VYMAIEIPVFLFITLFI</u> DHPGRRQRSQRLFHNPDGAAEVI EDEDEDVAERRAVLEGGER	1500
^{TM12}	
EGDLVRVLNLRKEYPNGKVAVRNIALGVRPGEVFGFL <u>GTNGAGKTT</u> TISILCQEFYPTSG	1560
RAYVCGNDIVTESSEALRCIGYCPQFDACL DLLTVEEHLYLYAGVIRGISSRACDRVVRGL	1620
MKLCGLTEYRRTKSHEL <u>SGGN</u> RRKLSVAVSLIGGPR <u>VVFFDE</u> PSAGMDPVARRGLWNAIE	1680
TVADNCSVVLTHHLEEVEALHRVAIMVDGTLRCIGDKTHLKQKYGTGFEVAVRVADES	1740
PEVMAGVELFFEEEFPSKLT EVRAGRFTYQLPSTVRLSSVFTALEQQKEKLQICDYSVS	1800
QTSIEQVFMRISEKAELEHEEEHRQRMESKKSCCVCCCGGLPR	1843

Figura D4. Secuencia de la proteína LtrABC1.1. Los posibles segmentos transmembrana se señalan en verde; los motivos Walker A y Walker B en rojo, y el sello de la familia en azul. Los números que se indican a la derecha de la secuencia corresponden a las posiciones de los aminoácidos en la secuencia de la proteína.

Empleando el algoritmo descrito por Kyte y Doolittle (1982) se dedujo la topología probable de este transportador a partir de su perfil de hidrofobicidad. Como puede observarse en la figura D5, se reconocen 12 segmentos transmembranas,

estando el primero y el séptimo más separados con respecto al resto, lo que supone que entre ellos deben existir grandes lazos exocitoplasmáticos.

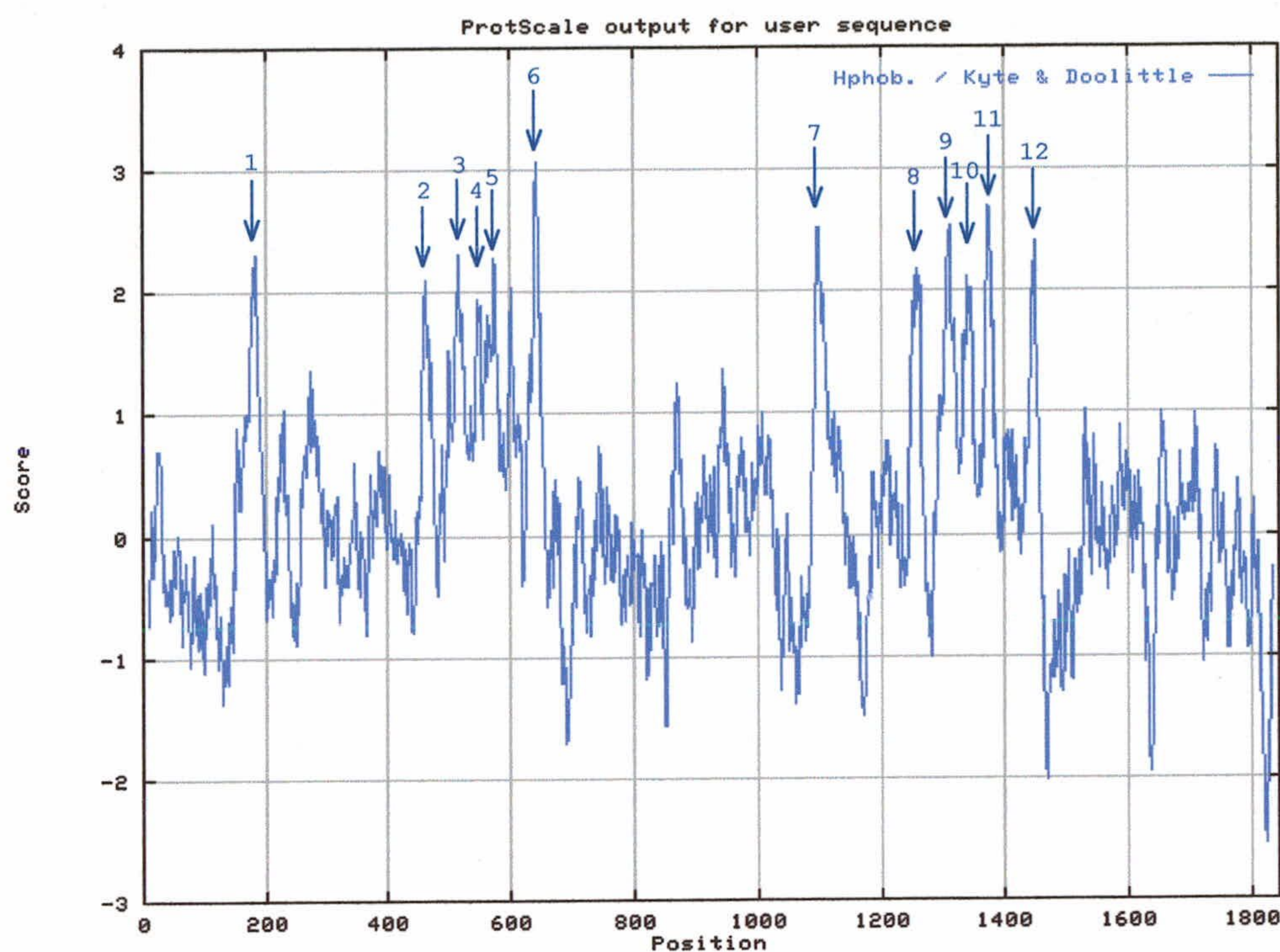


Figura D5. Perfil de hidrofobicidad de la proteína LtrABC1.1. Se empleó el método descrito por Kyte y Doolittle (1982) para el análisis de los posibles segmentos transmembrana de la proteína. Se empleó una ventana de 11 aminoácidos para el análisis de hidropatía. Se indican con flechas los doce segmentos transmembranas reconocidos.

La búsqueda de homologías de esta secuencia con otras proteínas empleando los bancos de datos del GenBank+PDB+SwissProt+PIR+PRF, mostró que presenta las mayores homologías con los miembros descritos de la subfamilia ABCA de mamíferos. El alineamiento de su secuencia con las proteínas ABCA conocidas, realizado mediante el programa ClustalW, mostró que la proteína ABC1.1 de *Leishmania* presenta un 33 % de identidad con la proteína ABCA1 humana, un 34 % con la proteína ABCA4 humana y un 29 % de identidad con la proteína CED7 de *C. elegans* (figura D6). Al realizar el alineamiento entre las regiones más conservadas de las proteínas (NBD1 y NBD2), se observa que ABC1.1 de *Leishmania* alcanza un 50% de identidad con ABCA1 humana y un 47% con ABCR humana, mientras que para el NBD2 estos valores fueron de 48% y 49%, respectivamente.

La secuencia del gen *LtrABC1.1* con secuencias no codificantes flanqueantes fue depositada en el banco de datos del GenBank, con el número de acceso AF200948.

	*	20	*	40	*	60	*	80	
ABCA1	:	----	MACWPOLRLLWKNLTFRRRQTCQLLEVAWPLFIFLILISVRLSYPPYEQHECHFPNKA-MPSAGTLPWVQGI	:	74				
ABCA2	:	----	MGFLHQLQLLWKNVTLKRRSPWVLAFEIFIPVLFVFFILLGLRQKKPTISVKEVPFYTAAPLTSAGILPVMQSLC	:	75				
ABCA3	:	----	MAVLRQLALLWKNYTLQKRKVLVTVLELFLPLFPGLIWLRLKIQSENVNATIYPGQ---SIQELP-----L	:	67				
ABCR	:	----	MGFVRQIQLLWKNWTLRKRQKIRFVVELVWPLSLFLVLIWLRNANPLYSHHECHFPNKA-MPSAGMLPWVQGI	:	74				
ABCA7	:	----	MAFWTQMLLLWKNFMYRRRQPVQLLVELLWPLFLFFILVAVRHSHPLEHHECHFPNKP-LPSAGTVPWVQGLI	:	74				
CED7	:	----	MNRLRQFSLLLWKDWVLLRRNKVWTLFELIIPCLLLGPLVYLVVKNADHTSSPENIYDNFQVKGTVEDVFLES--	:	73				
LABC1.1	:	----	MPGAGPLVPSPNSTTTTQNPLLLFASPGALPGLSFSRNNSEAFGEGQLFTPAVEGEYSPMSGGSAFLRSD	:	72				
	*	100	*	120	*	140	*	160	
ABCA1	:	----	CNANNPCFRYPTPGEAPGVVGNFNKSIVARLFS DARRLLYSQKDTSMKDMRKVLRTLQIQIKSSSNL-----KLQ	:	145				
ABCA2	:	----	PDQRDEFGLQYANS--TVTQLLERLDRVVEEENLFDPARPSLGSLEALRQHLEALSAGPGTSGSHLDRSTVSSFLD	:	153				
ABCA3	:	----	F-----FTFPPPGDT-----WELAYIPSHSDAAKT-----	:	92				
ABCR	:	----	CNVNNPCFQSPTPGESPGIVSNYNNSILARVYRDFQELLMNAPESQHLGRIWTELHILSQFMDTLRTHPERIAGRIR	:	154				
ABCA7	:	----	CNVNNTCFPQLTPGEEPGRLSNFNDSLVSRLADARTVLGGASAHRTLGLGKLIATLRAARSTAQ-----	:	140				
CED7	:	----	-----N-----FLKPIYKRWCLRS-----	:	87				
LABC1.1	:	----	RMIRGTALRTGEMRATTLEAGNHASPSAAENDVNDGSCVEMTAEQIPLAQADDQYDVLHRRSASAN-----	:	138				
	*	180	*	200	*	220	*	240	
ABCA1	:	----	DFLVDNETFSGLYHNLSLPKSTVDKMLRADVILHKVFLOGYQ-----LHLTSLCNGSK	:	199				
ABCA2	:	----	SVARNPQELWRFLTQNLSPNSTAQALLAARVDPPEVYHLLFGPSSALDSQSLHKGQEPWSRLGGNPLFRMEELLAPA	:	233				
ABCA3	:	----	-----	:	-				
ABCR	:	----	DILKDEETLTLFLIKNIGLSDSVVYLLINSQVRPEQFAHGVPD-----LALKDIACSEA	:	208				
ABCA7	:	----	-----	:	-				
CED7	:	----	-----	:	-				
LABC1.1	:	----	-----	:	-				
	*	260	*	280	*	300	*	320	
ABCA1	:	----	SEEMIQLG-----DQEV-----SELCG---LPREKAAAERVLRSNM DILKPILR-----LNSTSPFFPS	:	251				
ABCA2	:	----	LLEQLTCTPGSGELGRILTVPESQKQALQGYRDAVCSGQAAARARRFSGLSAELRNQLDVAKVSQQLGLDAPNGSDSSPQ	:	313				
ABCA3	:	----	-----V-----T-----ETVR--RA-	:	100				
ABCR	:	----	LLERFIIF-----SQRRGAKTVRYALCS---LSQGTLOWIEDTLYANVDFFKLFRVL---PTLLDSRSQ	:	266				
ABCA7	:	----	-----PQ-----PTKQSPLEPPMLDVAELLTSLLR-----ESLGLALG-	:	174				
CED7	:	----	-----	:	-				
LABC1.1	:	----	-----SPARCRPR	:	146				
	*	340	*	360	*	380	*	400	
ABCA1	:	----	KELAEATKTLHSLGTLAQELFSMRSWSDMRQEV-----MFLTNVNSSS---SSTQIYQAVSRIVCGHPPEGGGL	:	317				
ABCA2	:	----	APPPRRLQALLGDLDDAQKVLQDVVLSALALLPQGACTGRTPGPPASGAGGAANGTGAGAVMGNATAEAGAPSAAAL	:	393				
ABCA3	:	----	-----LVINMR-----VRGFPSEKDF	:	116				
ABCR	:	----	GINLRSWGGLSDMSPRIQEFIHRSMDLLWVT-----RPLMQNGGPE---TFTKLMGILSDLLCGYPEGGGS	:	332				
ABCA7	:	----	-QAQEPLHSLLEAAGDLAQELLALRSLVELR-----ALLQRPRGTS---GPLELLSEALCSVRGPPSTVGP	:	236				
CED7	:	----	-----DVVVGYTSKDA	:	99				
LABC1.1	:	----	AGCCQQLGHTILRVLILMKREWCSTLCEFLIP-----ILFVFGSVMLWAVFGTAQNSAG	:	200				
	*	420	*	440	*	460	*	480	
ABCA1	:	----	KIKSLNWEEDNNYKALFGNGTEEDAETFYDNSTTPYCN--DLMKNLESSPLSRIIWKALKPLLVG--KILYTPDTPATR	:	393				
ABCA2	:	----	ATPDTLQGCASFVQLWAG---LQPILCGNRTIEPEALRRGNMSSLGFTSKEQRNLGLLVHMTSNPKILYAPAGSEVD	:	470				
ABCA3	:	----	-----EDYIRYDN--CSSV-----LAAVVEHFPNHSKEPLPLA---VKYHLRFSYTR	:	160				
ABCR	:	----	RVLSFNWEEDNNYKAFGLIDSTRKDPIYSYDRRTSFCN--ALIQSLESNPLTKIAWRAAKPLLMG--KILYTPDSPAAR	:	408				
ABCA7	:	----	---SLNWEASDLMELVG---QEPESALPDSSLSPACS--ELIGALDSHPLSRLLRRLKPLILG--KLLFAPDTPFTR	:	305				
CED7	:	----	-----AKRTVDDLMKKFAERFQSA--KLKLSVKNESSE	:	130				
LABC1.1	:	----	-----V-YYSSTGPEKVSAMTDKISSSLCYNASLASGIAGLTPCLEG--QKYICPHGRGIP	:	253				
	*	500	*	520	*	540	*	560	
ABCA1	:	----	QVMAEVNKTFOELAVFHDLEGMWEELSPKIWTFMENSQEMDLVRMLLDSRDNDHFWEQQLDGLDWTAAQDIVAFLAKHPED	:	473				
ABCA2	:	----	RVILKANETFAFVGNVTHYAQVWLNISAEIRSFLEQGRLOQLRWLQOYVAELR---LHPEALNLSLDELPPALRQ--DN	:	545				
ABCA3	:	----	R-----N-----YMWOTG---SFF-----LKET-----EG-WHTTSLFPLFP-----	:	189				
ABCR	:	----	RILKNANSTFEELEHVRKLVKAWEEVGPQIWFYFDNSTQMNMIIRDTLGNPTVKDFLNRQLGEEGITAEAILNFLYKGP	:	488				
ABCA7	:	----	KLMAQVNRTEELTLRDVREVWEMLGPRIFFTMNDSSNVAMLQRLLQMQDEG--RRQPRPGGRDHMEALRSFLD----	:	378				
CED7	:	----	E-----QLLTVLRNDLPMLNETFCAINSYAAG-----VVFDEVDVTNKKLNRYRILLG---	:	177				
LABC1.1	:	----	TGFCYDPLKNVVAQLLQALPLTTPMLPLDILACQWVG-MDQSIRASTPFSYGGLLYFAPRTPEVESLVSYMRAQSKL	:	332				


```

*      580      *      600      *      620      *      640
ABCA1 : VQSSNGSVYTWREAFNETNQAIRTISRMECVNLNKLEPIATEVWLINKSMELLLDER--KFWAGIVFTGITPGSIELPH- : 550
ABCA2 : FSLPSG--MALLQQLDTIDNAACGWIQFMSKVSVDIFKGFPEESIVNYTLNQAYQDNVTVFASVIFQTRK--DGSLPP- : 620
ABCA3 : -----NPG-----PRELTSPDGG-----E----- : 203
ABCR  : SQADDMANFDWRDIFNITDRTLRLVNQYLECLVLDKFESYNDETQLTQRALSLEEN--MFWAGVVFPDMPWTSSLLPP- : 565
ABCA7 : -PGSGG--YSWQDAHADVGLVGLTGRVTECLSLDKLEAAPSEAAALVSRALQLLAEH--RFWAGVVFLGPEDSSDPTEHP : 453
CED7  : -----KTPEETWHLTETSYPYGP----- : 196
LABC1.1 : FDNAYGG--TFATAADATSHILSLTHDDPPTWGVVELDSYTADTFNVKIMVNSSALP----- : 387

```

```

*      660      *      680      *      700      *      720
ABCA1 : -----HVKYKIRMDIDNVERTNKIKDGYWDPGPRADPFEDMRYVWGGFAYLQDVVEQAIIRVLTGTEKK-TGVYMQQM : 622
ABCA2 : -----HVHYKIRQNSSFTEKTNEIRRAYWRPGNTG--GRFYFLYG-FVWIQDMMERAIIDTFVGHVVEPGSYVQMF : 690
ABCA3 : -----P--GYIREGFLAVQHAVDR-----AIMEYHADAATRQLFQRLTVTIKR-----F : 245
ABCR  : -----HVKYKIRMDIDVVEKTNKIKDRYWDSPRADPVEDFRYIWWGGFAYLQDMVEQGITRSQVQAEAP-VGIYLLQOM : 637
ABCA7 : TPDGPGHVRIKIRMDIDVVRTNKRDRFWDPGPAADPLTDLRYVWGGFVYLDLVERAAVRVLSGANPR-AGLYLQOM : 532
CED7  : -----SSGRYSRIPSSPP-----YWTS AFLTFQHAIESSFLSSVQSGAPDLP-ITLRGL : 244
LABC1.1 : -----ATSDSILSGYLGGLDMSTN---SPYIFSGYTTLOTLVNHYTTSVLGKPKATKP-LTYTAM : 443

```

```

*      740      *      760      *      780      *      800
ABCA1 : PYPCYVDDIFLRVMSRSMPLFMTLAWIYSVAVIKGIYVEKEARLKETMRIMGLDNSILWFSWFISSLIPLLVSAGLLV : 702
ABCA2 : PYPCYTRDDFLFVIEHMMPLCMVISWVYSVAMTIQHIVAEEKHLKEVMKTMGLNNAVHWVAVFITGFVQLSISVTALTA : 770
ABCA3 : PYPFIADPFLVAIQYQLPLLLLSFTYTALTIAARAVVQEKERRLKEYMRMMGLSSWLHWSAWELLFFLFLIAASFMTL : 325
ABCR  : PYPFVDDSFMIILNRCFPIFMVLAWIYSVSMVKSIVLEKELRLKETLKNQGVSNVAVIWCWFLDSEFSIMSISIFLLTI : 717
ABCA7 : PYPCYVDDVFLRVLSRSLPLFLTLAWIYSVTLTVKAVVREKETRLRDTMRAMGLSRAVLWLGWFLSCLGPFLSAALLVL : 612
CED7  : PEFKYKTSVSAFIDFFPFIWAFVTFIN--VIHITREIAAENHAVKPYLTAMGLSTFMFYAAHVMAFLKFFVIFLCSII : 322
LABC1.1 : PTKAYNTSSFLLTGASLAPLILVLGFLYPVSQLTKRIVVEKELRIRIAMLIMGLSEWTMYLAWLVVYGVWYTVVSIITV : 523

```

```

*      820      *      840      *      860      *      880
ABCA1 : ILKLG-----NLLPYSDFSVVVFVFLSVFAVVTILQCFLISTLFSRANLAAACGGIYFTLYLPVLCVA----WQDYVGF : 773
ABCA2 : ILKYG-----QVLMHSHVVI IWLFLAVYAVATIMFCFLVSVLYSKAKLASACGGIYFSLVVPYMYVAIREEVAHDKITA : 845
ABCA3 : LFCVKVKNVAVLSRSDPFLVLAFLLCFAISTISFSFMVSTFFSKANMAAFAFGFLYFFTYIPYFFVAP----RYNWMTL : 401
ABCR  : FIMHG-----RILHYSDFIFLFLFLAFSTATIMLCFLLSTFFSKASLAAACSGVIYFTLYLPHILCFA----WQDRMTA : 788
ABCA7 : VLKLG-----DILPYSHPGVVFLFLAAFAVATVTQSFLLSAFFSRANLAAACGGIAYFSLYLPVLCVA----WRDRLPA : 683
CED7  : PLTFV-----M-EFVSPAALIVTVLMYGLGAVIFGAFVASFFNNTNSAIKAILVAWGAMIGISYKLRP-----ELDQI : 389
LABC1.1 : LLRLT-----YLPESPYPYVFFMFLLSWSTIALSGAIAAVFSKARLAAI IAPLIYFAMAIPLFAMER-----ASGGA : 591

```

```

*      900      *      920      *      940      *      960
ABCA1 : TLKIFASLLSPVAFGFGCEYFALFEEQIGVQWDLNFESPVEEDGFNLTTSVSMMLFDTFLYGVMTWYIEAVFPQYQYGP : 853
ABCA2 : FEKCIASLMSTTAFGLGSKYFALYEAVGVGIQWHTFSQSPVEGDDFNLLAVTMLMVDVAVVYGILTWYIEAVHPGMYGLP : 925
ABCA3 : SQKLCSCLLSNVAMAMGAQLIGKFEAKGMGIQWRDLSLVNVDVDFCFGQVLGMLLLDSVLYGLVWYMEAVFPQYQYGP : 481
ABCR  : ELKKAVSLLSPVAFGFGTEYLVRFEEOGLGLQWSNIGNSPTEGDEFSFLLSMQMLLDAAVYGLLAWYLDQVFPQYQYGP : 868
ABCA7 : GGRVAASLLSPVAFGFGCESLALLEEQGEGAQWVHNGTRPT-ADVFLSAQVSGLLLDAAALYGLATWYIEAVCPQYQYGP : 762
CED7  : SSCFLYGLNINGAFALAVEAISDYMRRELERLNTNMFNDSS--LHFLSLGVALVMMIVDILWMSIGALVVDHIRTSADFSL : 467
LABC1.1 : KMG--IMILGPSAFVGFALLFEHEVNGG---AGVGALAYFRDEPKLIVVFLVLLFVDIFVYLLMMYFDRVVPKEWGT : 665

```

```

*      980      *      1000      *      1020      *      1040
ABCA1 : R-PWYFPCTKSYWFGESD-----EKSHPGSNQKRIS-----EICMEEEPHTLKLGV : 900
ABCA2 : R-PWYFPLQKSYWLGSRTEAWESW-----PWARTPRLSVMEEDQACAMESRRFEETRGMEEEPHTLPLVVC : 992
ABCA3 : Q-PWYFFIMPSYWCCKPRAVAG-----KEEEDSDPEKALR-----NEYFEAEPEDLVAGIK : 531
ABCR  : L-PWYFLLQESYWLGGEGCSTREE-R-----ALEKTEPLTEETEDPEHPEGI : 930
ABCA7 : E-PWNFPFRS YWCGPRP-----PKSPAPCPTPLDP-----KVLVEEAPPGLSPGV : 808
CED7  : RTLFDFAEPEDDENQTDGVTQONTRINEQVRNRVRRSDMEIQMNPMASTSLNPPNADSDSLEGGSTEADGARDTARADII : 547
LABC1.1 : KNELFFVIDPVRWFCRRRAGDAD-----NDGDVPGDGRAEDG-----VFEAVDPAVEEAAAVR : 719

```

```

*      1060      *      1080      *      1100      *      1120
ABCA1 : IQNLVKVYRDGMK--VAVDGLALNFYEGQITSFLGHNGAGKTTTMSILTGLFPPTSGTAYILG--KDIRSEMSTIRQNLG : 976
ABCA2 : VDKLTKVYKDDK--LALNKLSLNLYENQVVSFLGHNGAGKTTTMSILTGLFPPTSGSATIYG--HDIRTEMDEIRKNLG : 1068
ABCA3 : IKHLSKVFRVGNKDRAAVRDLNLYENQITVLLGHNGAGKTTTMSILTGLFPPTSGRAYISG--YEISQDMVQIRKSLG : 609
ABCR  : VKNLVKIFEPGCR--PAVDRLNITFYENQITAFGLGHNGAGKTTTMSILTGLFPPTSGTVLVGG--RDIETSLDAVRQSLG : 1006
ABCA7 : VRSLEKRFPGSPQ--PALRGLSLDFYQGHITAFGLGHNGAGKTTTMSILSGLFPPTSGGSAFILG--HDVRSMAAIRPHLG : 884
CED7  : VRNLVKIWTSTGER--AVDGLSLRAVRGQCSILLGHNGAGKSTTFESIAGIIRPTNGRITICG--YDVGNEPGETRRHIG : 623
LABC1.1 : IRGLRKTFRRGKAFAAVDDLCWSLNEGETSVLLGHNGAGKSTTMNLMTGMLEADGGDCYVYG--HSVRHEL SAVRQEIG : 797

```



```

*      1140      *      1160      *      1180      *      1200
ABCA1 : VCPQHNVLFDMLTVEEHIWYARLKLSEKHVKAEMEQMALDVGLPSSKLSKTSQLSGGMQRKLSVALAFVGGSKVVIL : 1056
ABCA2 : MCPQHNVLFDRLTVEEHLWYFYSRLKSMQEEIRREMDKMIEDLELSN-KRHSLVQTLSSGGMKRKLSVAIAFVGGSRAILL : 1147
ABCA3 : LCPQHDILFDNLTVAEHLVYFYAQLKGLSRQKCPPEVKQMLHIIGLED-KWNSRSRFLSSGGMRRKLSIGIALIAGSKVLIL : 688
ABCR  : MCPQHNLVLFHHLTVAEHMLFYAQLKGLKGSQEEAQLMEAMLEDTGLHH-KRNEEAQDLSSGGMQRKLSVAIAFVGDQAKVVIL : 1085
ABCA7 : VCPQYNVLFDMTLVDEHVWYFGRLLKGLSAAVVGPEQDRLLQDVGLVS-KQSVQTRHLSGGMQRKLSVAIAFVGGSQVVIL : 963
CED7  : MCPQYNPLYDQLTVSEHLKLVYGLKGLGAREKDFKQDMKRLSDVKLDF-KENEKAVNLSGGMQRKLCVCMALIGDSEVVLL : 702
LABC1.1 : LCPQHNLVLPQLTVREHLDYAAIKGLRGSEKEDAIRRLAAVDLED-KEHYMSKALSSGGQKRKLSVAVAFVGGSRVLIL : 876
    
```

```

*      1220      *      1240      *      1260      *      1280
ABCA1 : DEPTAGVDPYSRRGIWELLKRYRQGRITILSTHMHDEADVLGDRIAIISHGKLCVSSFLKQNLGTGYLTLVKKDVE : 1136
ABCA2 : DEPTAGVDPYARRAIWDLILKYKPGRTILLSTHMHDEADLLGDRIAIISHGKLCVSSPLFKGTYGQYRLLVLRPAE : 1227
ABCA3 : DEPTSGMDAISRRAIWDLQKQSDRTIVLTHFMDEADLLGDRIAIMAKGELQCCGSSFLKQYKYGAGYHMTLVKPHC : 768
ABCR  : DEPTSGVDPYSRRSIWDLKLYRSGRTIIMSTHMHDEADLLGDRIAIQAQGRLYCSGTPFLKNCFGTGLYTLVLRKMN : 1165
ABCA7 : DEPTAGVDPASRRGIWELLKRYREGRTLILSTHHLDEAELLGDRVAVVAGGRLLCCGSPFLRRHLGSGYLLTLVKARLP : 1043
CED7  : DEPTAGMDPGARQDVQKLVREKANRTILLTTHYMDEAERLGDWVVFIMSHGKLVASGTNQLKQKFGTGYLLTVLDHNG : 782
LABC1.1 : DEPTAGMDVGARRHTWSLLKEMAKWHTILLTTHFMDEADLLGDTVAIMSKGRLLCAGSNMFLKSKLGVGFVLTMSVVSHA : 956
    
```

```

*      1300      *      1320      *      1340      *      1360
ABCA1 : SSLSSCRNSSSTVSYLKKEDSVSQSSSDAGLGSDDHESDTLTIDVSAISNLRKHVSEARLVEDIGHELTYVLPYEAKEG : 1216
ABCA2 : PGGP-----QEPGLASSPPGR-----APLSSCSELQVQFIRKHVASCLLVSDTSTELSYILPSEAAKKG : 1287
ABCA3 : NPED-----ISQLVHHHVPNATLESSAGAELSFILPRESTRH- : 805
ABCR  : IQSQR---KGSEGTCSKSSKGFSTTCPAHVDDLTPEQVLDGDVNEIMDVVLLHHVPEAKLVEICIGQELIFLLPNKNFKHR : 1241
ABCA7 : LTTN-----EKADTMEGSVDTRQEKNGSQSRSRVGTPQLLALVQHWVPGARLVEELPHELVLVLPYTGADHG : 1111
CED7  : DKRK-----MAVILTDVCTHYVKEAERGEMHGQOIEIILPEARKKEF : 824
LABC1.1 : RRGF-----IEQMVQTLVPAEAATGSGAGEVAYRLPMASKPM- : 993
    
```

```

*      1380      *      1400      *      1420      *      1440
ABCA1 : A-----FVELFHEIDDRISDLGISSYGISETTLEEIFLKVAAESGVDAETS DGTLPARRNRRRAFGD- : 1277
ABCA2 : A-----FERLFQHLERSLDALHLSSFGIMDTLEEVLKVVSEEDQSLNSEADVKESTRKDVLPGAEG : 1349
ABCA3 : -----FEGFLAKLEKKQKELGIAFGASITTEEVFLRVGKLVDSMDIQAIQLPALQYQHERR-- : 864
ABCR  : A-----YASLFRELEETLADLGLSSFGISDTPLLEEIFLKVTEDSDSGPLFAGGAQKRENVNPRHP- : 1302
ABCA7 : S-----FATLFRLEDTRLAELRLTGYGISDTSLEEIFLKVVEECAADTDMEDGSCGHLCTGIAG-- : 1171
CED7  : VPLFQALEAIQDRNYSNVFDNMPNTLKSQATLLEMRSGLSLNTLEQVFITIGDKVDKAIASRQNSRISHNSRNASE-- : 902
LABC1.1 : -----FPDLLCAVEEGIPGLGINAYSLSATTLLEEVFIKIAEGPDAERDADALAAKEKAEATAAVWN : 1054
    
```

```

*      1460      *      1480      *      1500      *      1520
ABCA1 : -----KQSCLRPFTEDDAADPNDSIDPESRETDLLSGMDGKGSY-----Q : 1318
ABCA2 : PASGEGHAGNLARCSELTQSQASLQSASSVGSARGDEGAGYTDVYGDYRPLFDNPQDPDNVSLQEVEAEALS RVGQGSRK : 1429
ABCA3 : -----ASDWAVDSN-LCGAMPSPDGIGALIEERTAVKLNLTG----- : 900
ABCR  : -----CLGPREKAGQTPQDSNVCSPGAPAAHPEGQPPPEPECPGPQ-----L : 1344
ABCA7 : -----LDVTLRLKMPPEQETALENGEPAGSAPETDQGSQPDVAVG-----R : 1210
CED7  : -----PSLKPAGYDTQSSTKSADSYQKLMDSQARG-PEKSG----- : 937
LABC1.1 : -----VEMEK-----GR----- : 1061
    
```

```

*      1540      *      1560      *      1580      *      1600
ABCA1 : VKGWKLTQQQFVALIWKRLLIARRSRKGFQAQIVLPAVFCIALVFSLIVPP-FGKYPSLELQPWMYN-----EQYTFV : 1391
ABCA2 : LDGGWLKVRQFHGLLVKRFHCARRNSKALFSQILLPAFFVVCVAMTVALSVP-IGDLPLVLSQSYHNYTQPRGNFIPY : 1508
ABCA3 : ---LALHCQQFWAMFLKKAAYSREWKMVAQVLELTCVTLALLAINYSSE-LFDDPMLRRLTLGEYG-----RTVVPF : 970
ABCR  : NTGTQLVLQHVQALLVQRFOHTIRSHKDFLAQIVLPATFVFLALMLSIVIPP-FGEYPALTLHPWIYG-----QQYTF : 1417
ABCA7 : VQGWALTRQQLQALLKRFLLARRSRGLFAQIVLPALFVGLALVFSLIVPP-FGHYPALRLSPTMYG-----AQVSFF : 1283
CED7  : ---VAKMVAQFISIMRKKFLYSRRNWAQLFTQVLIPIILLGLVGLSLLTKSNNTDQFSVRSRSLTPSGIE----- : 1002
LABC1.1 : ---WARRRLOFRAMMVKRLWNLDRRTQFFQIVCEVACVLLAMLLTLVR---LFSTFTIVLSSDVYG-----TAVDI : 1128
    
```

```

*      1620      *      1640      *      1660      *      1680
ABCA1 : SNDA-----PEDTGTLELLNALTDPFGTRCMENPIPDTPCQAGEEWTTPVPPQTIMDLFQNGNWTM QNPS PAC : 1463
ABCA2 : ANEERREYRLRLSPDASPQQLVSTFRLPQVG-----ATCVLKS PANGSLG---PTLNLSSGESRLLAARFFDSMCLESFT : 1581
ABCA3 : SVPG-----TSQLG-----QQLSE-----HLKDALQAE----- : 993
ABCR  : SMDE-----PGSEQFTVLADVLLNKPGFGNRCLKEGWLPEYPCGNSTP-WKTSPVSPNITQLFQKQKWTQVNPSPSC : 1488
ABCA7 : SEDA-----PGDPGRARLLEALLQEAGLE-----EPPVQHSRHSFAPEVPAEVAKVLASGNWTPESPSPAC : 1345
CED7  : -----PSKVVVRFENG----- : 1013
LABC1.1 : PLAN-----CEGVLDVT----- : 1140
    
```



```

*      1700      *      1720      *      1740      *      1760
ABCA1 : QCSSDKIKKMLPVCPPGAGGLPPPQRKQNTADILQDLTGRNISDYLKTYVQIIAKSLKNIWVNEFRYG-GFSLGVSN- : 1541
ABCA2 : QGLPLSNFVPPPPSPAPSDSPASPEDDLQAWNVS LPPTAGPEMWTSA PSLPRLVREPVRCTCSAQGTGFSCPSSVGGHPP : 1661
ABCA3 : -----GQEPR--EVLG-----DL-----EEFLIFRASVEGGGFN----- : 1020
ABCR  : RCSTREKLTMLPECEGAGGLPPPQRTQRSTEILQDLTDRNISDFLVKTYPALIRSSLKSKFWVNEQRYG-GISIGGKL- : 1566
ABCA7 : QCSRPGARRLLPDCPAAAGGPPPPQAVTGSGEVQNLGRNLSDFLVKTYPRLVRQGLKTKKVVNEVRYG-GFSLGGR-- : 1422
CED7  : -----TIPEEAANFEKILRKS GGFVNLN-----YNTKNPLPNITKSLIG----- : 1052
LABC1.1 : -----TFSTKAHMDIWDVDPDASAFS-----TKLNRTYQTHAKERYG----- : 1178

```

```

*      1780      *      1800      *      1820      *      1840
ABCA1 : TQALPPSQEVNDATKQ-----MKKHLKLAKDSSADRFLNSLGR---FMTGLDTRNNVVKVWFNNKGWHAIS : 1603
ABCA2 : QMRVVTGDILTDTIGHNVSEYLLFTSDRFLHRYGAIITFGNVLSIPASFGTRAPPMVRKIAVRRAAQVFYNNKGYHSM : 1741
ABCA3 : ERCLVAAS-----FR-----DVGERTVVNALFNNQAYHSPA : 1051
ABCR  : PVPVITGEALVGFLSD-----LGRIMNVSGGPITREASKEIPD---FLKHLETEDNIKVWFNNKGWHALV : 1628
ABCA7 : DPGLPSGQELGRSVEE-----LWALLSPLPGGALDRVLKNLTA---WAHSLDAQDSLKIWFNNKGWHSMV : 1484
CED7  : EMPPATIG-----MTMNSDNLEALFNMRYHYHVP : 1081
LABC1.1 : GVSCAAAG-----SGELYHS-VFYNTSALHEVA : 1205

```

```

*      1860      *      1880      *      1900      *      1920
ABCA1 : SFLNVINNAILRANLQKGE-NPSHYGITAFNHPLNLTQQQLSEVAPMTTSVDVLSICVIFAMSFVPASFVFLIQERS : 1682
ABCA2 : TYLNSLNNAILRANLPKSKGNPAAYGITVTNHMPNKT SASLSLDYLLQG-TDVVIAIFIIIVAMSFVPASFVFLVAEK : 1820
ABCA3 : TALAVVDNLLFKLLCGPHA-----SIVVSNFPQPRSAQAQKQFNEGRKGFDIANLLFAMAF LASTFSILAVSERAV : 1125
ABCR  : SFLNVAHNAILRASLPKDR-SPEEYGITVISQPLNLTKEQLSEITVLTTSVDAVVAICVIFSMSFVPASFVFLYLIQ : 1707
ABCA7 : AFVNRASNAILRAHLPPGP-ARHAHSITTLNHPLNLTKEQLSEAALMASSVDVLSICVVFAMSFVPASFVFLVLI : 1563
CED7  : TLISMINRARLTGTVDAEIS-----SGVFLYSKSTSNLNLLPSQLIDVLLAPMLLILIFAMVTSTFVMFLIEERT : 1151
LABC1.1 : IETANVFAAHLRVATGRDN----VSVTTAVASLPKTSQORAVESSLYA---MMIAVIMIPFTFIPSTFVGVIVREREC : 1277

```

```

*      1940      *      1960      *      1980      *      2000
ABCA1 : KAKHLQFISGVKPVIIYWSNFWDMCNVVPATLVIIIFICFQOKSYVSSNLPVLALLLLLYGWSITPLMYPASFVFKI : 1762
ABCA2 : KAKHLQFVSGCNPIIYWLANYVWDMNLNYPATCCVILFVFDLPAYTSPTNFPAVLSIFLLYGWSITPIMYPASFVFE : 1900
ABCA3 : QAKHVQFVSGVHVASFWSALLWDLISFLIPSLLLLVVFKAFDVRATRDGHMADTLLLLLYGWAIIPMLYLMNFFFLG : 1205
ABCR  : KSKHLQFISGVSPPTYWVTNFWLWDMNYSVVSAGLVVGFIFGFQKAYTSPENLPALVALLLYGWAVIPMYPASFV : 1787
ABCA7 : RAKHLQLMGGLSPTLYWLGFLWDMCNVLPACIVVLIFLAFQRAYVAPANLPALLLLLYGWSITPLMYPASFVFFSV : 1643
CED7  : QFAHQFLTGISPITFYASLIYDGLYSLICLIFFLFLAFH---WMY-DHLAIVILFWFLYFFSSVFFIYAVSFLFQS : 1227
LABC1.1 : KARHLQNVSGLSFYIYWSNFWLDFLCSYIVTMCLVIVVFLAFGRDEYVAVNNGATFVVFLLYGVSGILMAYALSFA : 1357

```

```

*      2020      *      2040      *      2060      *      2080
ABCA1 : PSTAYVVLTSVNLFINGSVATFVLELFTDNK-LNNINDILKSVFLIFPHFCIGRGLIDMVKN-----QAMADAL : 1832
ABCA2 : PSSAYVFLIVINLFIGITATVATFLLQLFEHDKDLKVVNSYLKSCFLIFPNYNLGHGLMEMAYN-----EYINEY : 1971
ABCA3 : AATAYTRLTIFNILSGIATFILMVTIMRIPAVKL--EELSKTLDHVFLVLPNHCLGMAVSSFYENYETRRYCTSS : 1283
ABCR  : PSTAYVALSCANLFIGINSSAITFILELFENNRTLLRFNAVLRKLLIVFPFHFCIGRGLIDLALS-----QAV : 1858
ABCA7 : PSTAYVVLTICINLFIGINGSMATFVLELFSQK-LQEVSRILKQVFLIFPHFCIGRGLIDMVRN-----QAMA : 1713
CED7  : PSKANVLLIIWQVVISGAALLAVFLIFMIFNID-EWLKSILVNIFMFLPSYAFGSAIITINTYG-----MILP : 1296
LABC1.1 : HSTAQNVMVLVNFIVGFLLVAVSALSLEKSTR---NLAKVLRWIFRIVPSYCVGEAINNLASL-----KVTRAF : 1424

```

```

*      2100      *      2120      *      2140      *      2160
ABCA1 : ERFGE-NRFVSPLSWDL--VGRNLFAMAVEGCVVFFLITVLIQYRFFIRPR-----PVNAKLSPLNDEDEDVRR : 1897
ABCA2 : AKIGQFDKMKSPFEWDI--VTRGLVAMAVEGCVVGFLLTIMCQYNFLRRPQ-----RMPVSTKPVED-DVDVAS : 2036
ABCA3 : CKKYNIQYQENFYAWSAPGVGRFVASMAASGCAYLILLFLIETNLLQRLRGILCALRRRRTLTELYTRMPVLPEDQ : 1363
ABCR  : ARFGE-EHSANPFHWDL--IGKNLFAMVVEGCVVFFLTLVLRHFFLSQW-----IAEPTKEPIVDEDDDDVAE : 1923
ABCA7 : ERLGD-RQFQSPLRWEV--VGKNLLAMVIQGPLFLLFTLLQHRSQLLPQ-----PRVRSPLLGEEDDVAR : 1778
CED7  : EELMNWDHCGKN-AWLMGTFCVCSFALFVLLQFKFVRRFLSQVWTVRRSS-----HNNVQPMMDLPVCEVSE : 1364
LABC1.1 : GIDTS-----TWDMDVGVWCVYMAIEIPVFLFITLFDHPGRRQRS-----QRLFHNPDGAAEVI EDEDEDVAA : 1489

```

```

*      2180      *      2200      *      2220      *      2240
ABCA1 : ERQRILDGGGQ----NDILEIKELTKIYRRK-----RKPAVDRICVGI PPGEFCFGLLG VNGAGKSSTFKMLTGDT : 1963
ABCA2 : ERQVRVLRGDAD----NDMVKIENLTKVYKSRKI-----GRILAVDRCLGVRGECFGLLG VNGAGKTSTFKMLTG : 2105
ABCA3 : ERTRILAPSPDS--LLHTPLIIKELSKVYEQR-----VPLLAVDRSLAVQKGEFCFGLLG VNGAGKTTTFFKML : 1433
ABCR  : ERQRIITGGNK-----TDILRLHELTKIYPGT-----SSPAVDRLCVGVRPGEFCFGLLG VNGAGKTTTFF : 1989
ABCA7 : ERERVVQATQ----GDVLVLRNLTKVYRQG-----RMPAVDRCLGIPPEFCFGLLG VNGAGKTSTFRMVTGDT : 1844
CED7  : ERERVHRVNSQ----NSALVIKDLTKTFGRF-----TAVNELCLAVDQKECFGLLG VNGAGKTTTFFNILTQ : 1428
LABC1.1 : ERRAVLEGGERE----GDLVRVLRNLRKEYPNG-----KVAVRNIALGVRPGEVFGFLGTNGAGKTTTISILCQ : 1555

```

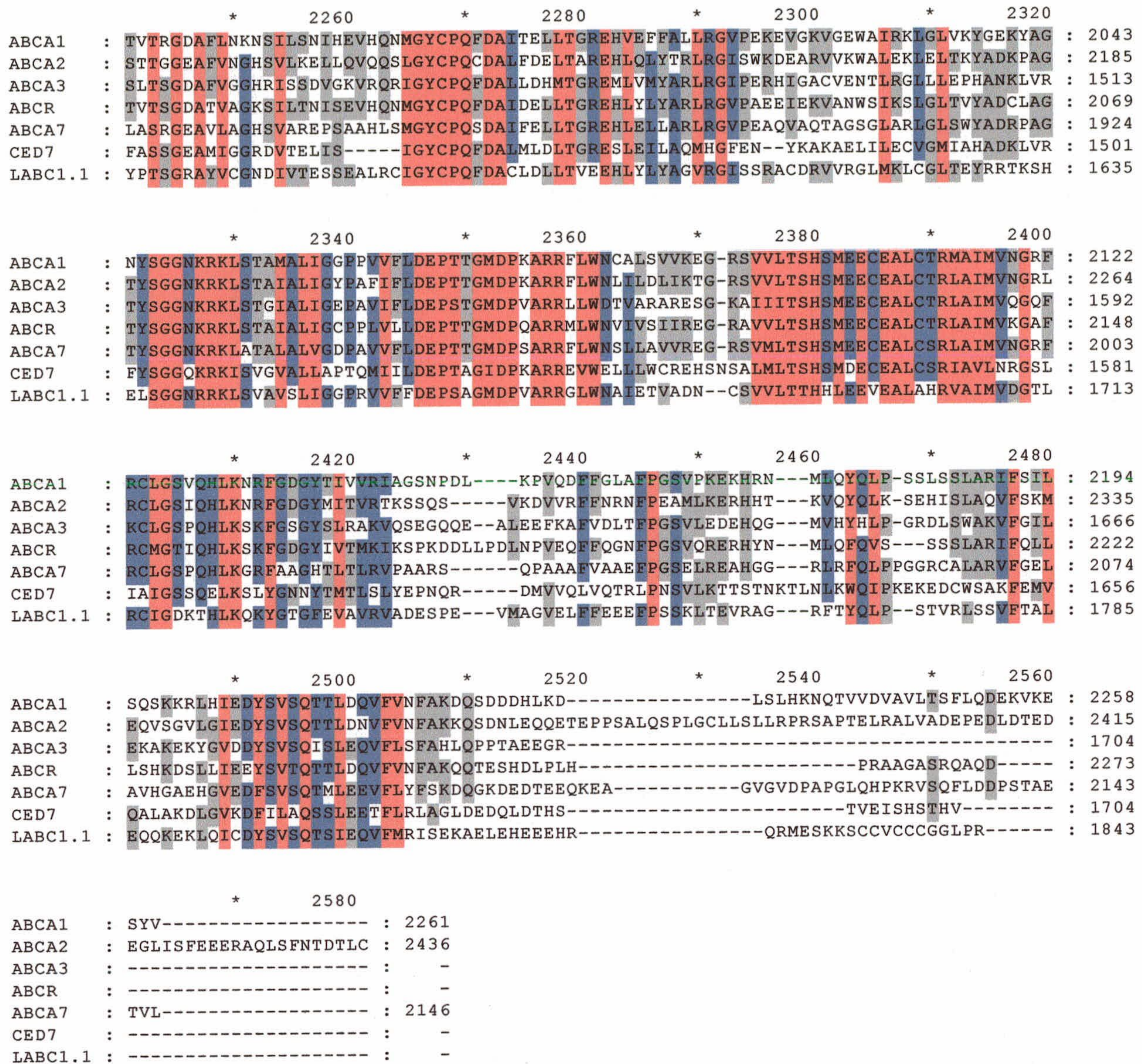



Figura D6. Alineamiento de LtrABC1 con proteínas ABCA. La secuencia deducida en aminoácidos del gen de *Leishmania* fue alineada con algunos de los miembros humanos de la subfamilia ABCA, así como con la proteína CED7 de *C.elegans*, empleando el programa de alineamiento múltiple ClustalW. En color rojo se señalan los residuos que se encuentran 100% conservados entre las distintas secuencias, en color azul, los que presentan un 80% y en color gris un 60%.

2. ORGANIZACION GENOMICA Y LOCALIZACION CROMOSOMICA DE *LtrABC1.1*

2.1. Caracterización de la subfamilia ABCA y número de genes *LtrABC1.1*

Para conocer la organización genómica de este gen en *L. tropica*, el ADN del parásito fue digerido con enzimas de restricción que presentan sitios de corte dentro del gen pero no dentro de las sondas seleccionadas, dando origen a fragmentos de tamaño conocido. Un esquema con la ubicación, en la secuencia de *LtrABC1.1*, de las distintas sondas utilizadas en estos y posteriores estudios puede observarse en la figura D7. Comparamos, mediante experimentos de Southern Blot, el patrón de hibridación resultante de utilizar dos sondas: una correspondiente a la secuencia que codifica el NBD1 (sonda Bam HI/Hind III) y otra que codifica para el NBD2 (sonda BstE II/Bgl II). Utilizamos estas sondas para hibridar un Southern blot de ADN genómico de *L. tropica* digerido con combinaciones de enzimas cuyas dianas no estaban presentes en las sondas. Además, algunas de estas combinaciones dividen las secuencias codificantes de los dos NBDs de ABC1.1 en dos fragmentos distintos, lo que nos permitiría identificar las señales de hibridación correspondientes a estos dos fragmentos del gen. Observamos un patrón de múltiples bandas (figura D8A), lo que sugiere la existencia de una familia de genes relacionados con ABC1.1 en el genoma de *L. tropica*. Utilizamos entonces, una sonda correspondiente a la secuencia que se encuentra entre el 1º y 2º segmento transmembrana del TMD2 de la molécula. Esta región presenta gran variabilidad de secuencia entre las distintas proteínas ABCA, por lo que la sonda proveniente de esta región la definimos como específica para reconocer el gen *LtrABC1.1*. Hibridamos con esta sonda un Southern blot de ADN genómico de *L. tropica* digerido con distintas enzimas de restricción cuyas dianas no estaban presentes en la sonda utilizada y cortan sólo una vez dentro del gen *LtrABC1.1*. Al emplearse esta sonda específica de ABC1.1, sólo resultaron positivos dos fragmentos, posiblemente correspondientes a este gen y su duplicación (figura D8B).

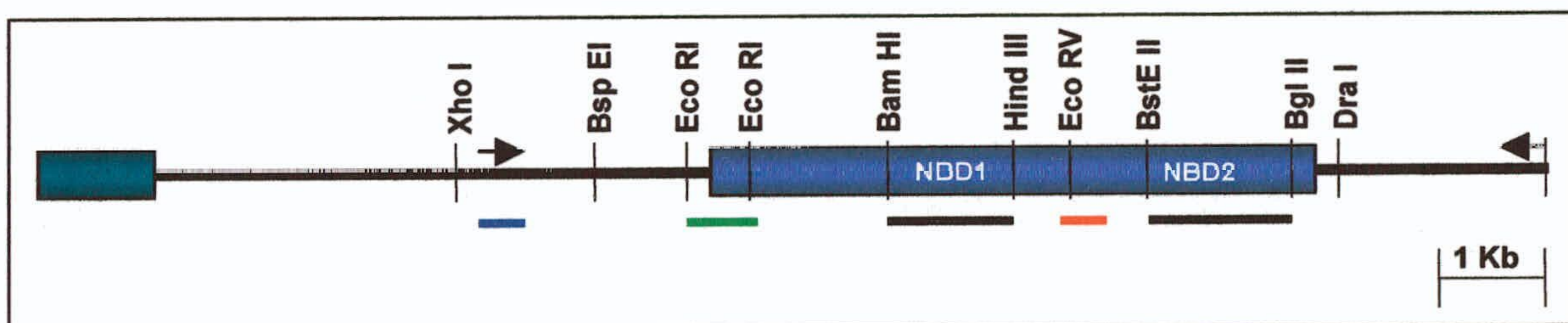


Figura D7. Mapa de restricción del fago 2B1. Se indican las principales dianas para enzimas de restricción, que han sido utilizadas para obtener sondas. La sonda correspondiente al NBD1 fue obtenida por digestión con Bam HI y Hind III (señalada como una línea negra); la

sonda correspondiente al NBD2 fue obtenida por digestión con Bste II y Bgl II (también señalada como una línea negra); la sonda correspondiente al extremo 5' (señalada como una línea verde) fue obtenida tras digestión con Eco RI; la sonda correspondiente al lazo ubicado entre los segmentos transmembrana 7° y 8° (señalada en rojo) fue obtenida por PCR utilizando los oligonucleótidos LABC1-23 y LABC1-24; la sonda correspondiente a la secuencia repetida invertida (señalada en azul) fue obtenida por PCR, utilizando los oligonucleótidos LABC1-26 y LABC1-27.

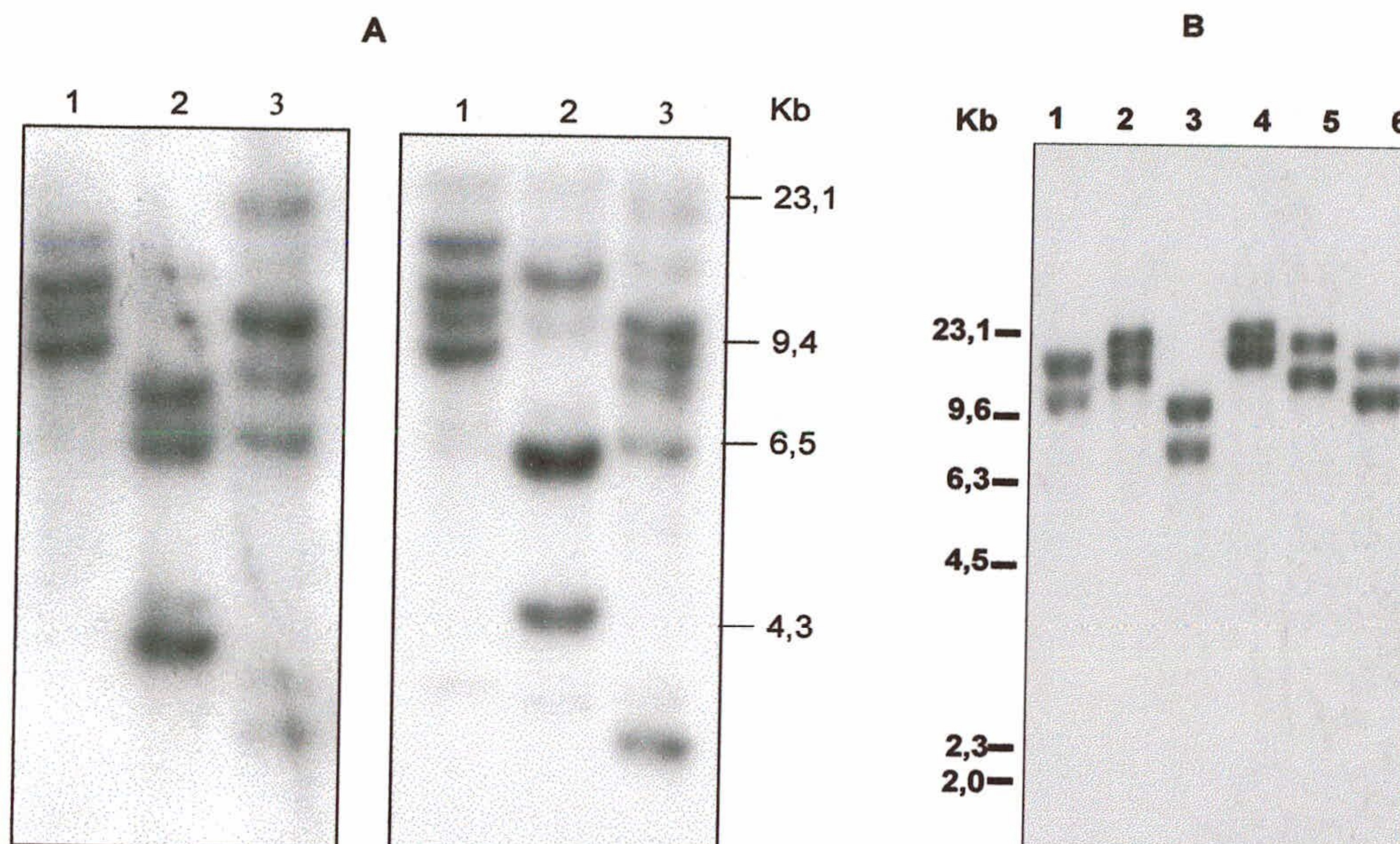


Figura D8. Organización genómica del gen *LtrABC1.1*. Análisis mediante Southern blot de ADN genómico de *L. tropica*. 4 μ g de ADN fueron digeridos con enzimas de restricción, y tras la corrida electroforética el ADN fue transferido a membranas de nylon e hibridado con las sondas radiactivas correspondientes. **A.** Southern blot hibridado con las sondas del NBD1 y al NBD2. Las enzimas empleadas fueron: 1. Bsp EI/Eco RI; 2. Bsp EI/Eco RV; 3. Bsp EI/Bam HI. **B.** Southern blot hibridado con la sonda específica para ABC1.1, correspondiente a la región del lazo que se encuentra entre el 1° y 2° segmento transmembrana del TMD2. Las enzimas empleadas fueron: 1. Apa I; 2. Eco RI; 3. Eco RI/Hind III; 4. Hind III; 5. Bgl II; 6. Hind III/Bgl II.

Puesto que la hibridación con las sondas NBD1 y NBD2 puso de manifiesto la existencia de varias secuencias relacionadas con ABC1.1, quisimos caracterizar la subfamilia ABCA en distintas especies de *Leishmania*. Mediante experimentos de Southern blots se analizó la presencia de secuencias ABC1 en los genomas de *L. tropica*, *L. infantum*, *L. donovani*, *L. braziliensis* y *L. tarentolae*. Empleamos sondas correspondientes a las secuencias que codifican para el NBD1 y para el NBD2 del gen *LtrABC1.1*. Puede observarse en la figura D9 que existen varias secuencias relacionadas con el gen *ABC1.1*. Ambas sondas reconocen varias bandas en las distintas especies, aunque los patrones de hibridación son diferentes en los distintos genomas, evidenciando la alta variabilidad de secuencia que existe dentro del género.

En algunos genomas, como los de *L. infantum* y *L. donovani*, puede observarse un patrón de hibridación similar, con cuatro bandas principales. Estos resultados nuevamente sugieren que en *Leishmania* existen varios genes relacionados con esta subfamilia de transportadores.

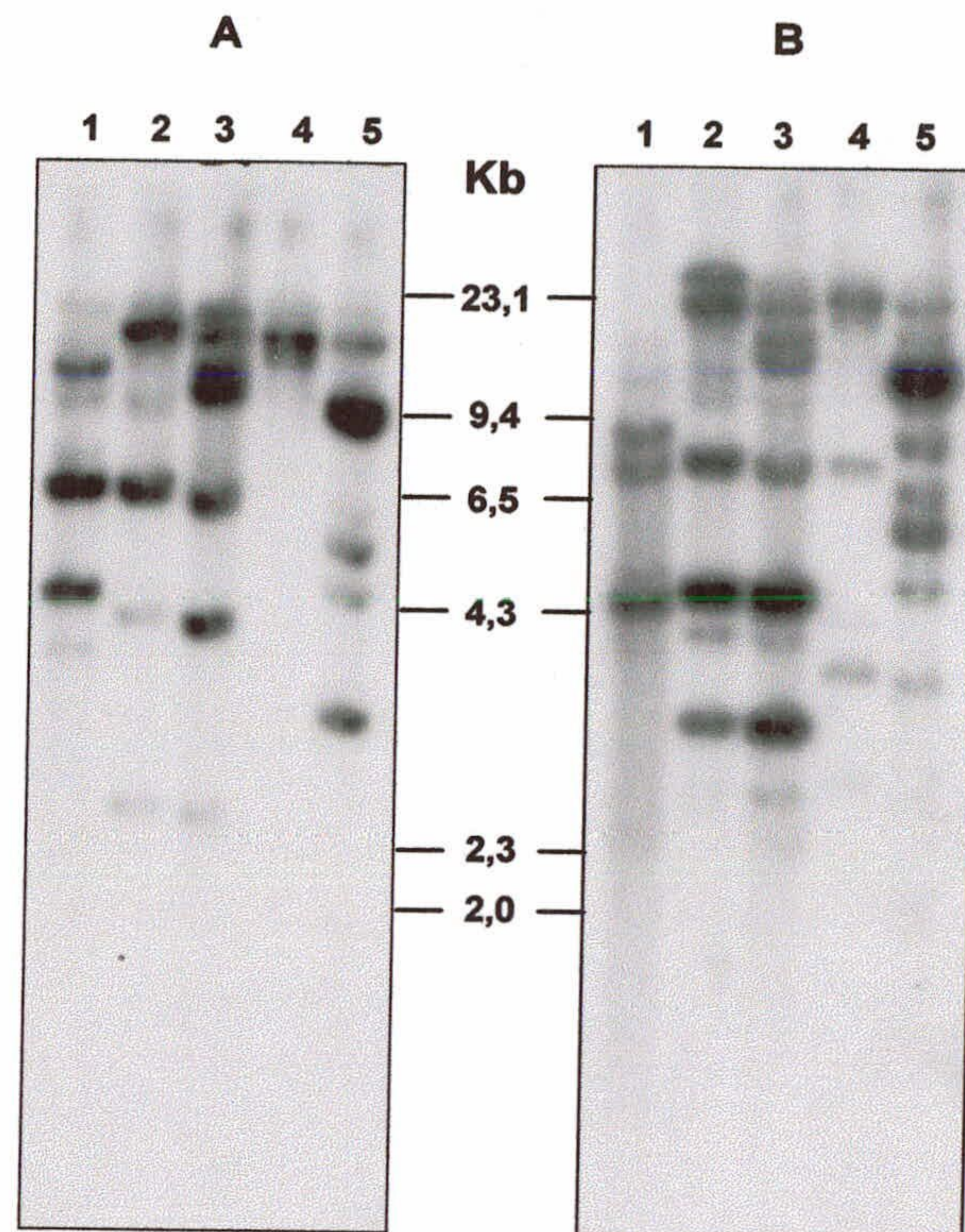


Figura D9. Organización genómica de genes ABCA en *Leishmania* sp. Southern blot con ADN genómico proveniente de varias especies de *Leishmania* fue hibridado con una sonda correspondiente a la secuencia que codifica para el NBD1 de *LtrABC1.1* (A) y con una sonda correspondiente a la secuencia del NBD2 del mismo gen (B). Carriles: 1. *L. tropica*; 2. *L. infantum*; 3. *L. donovani*; 4. *L. braziliensis*; 5. *L. tarentolae*.

2.2. Localización cromosómica de los genes ABCA

La técnica de electroforesis en campo pulsado (CHEF) permite separar los cromosomas de *Leishmania* como bandas discretas. Utilizamos esta técnica para conocer la localización cromosómica del gen *LtrABC1.1*. Tras la separación electroforética de las bandas cromosómicas de *L. tropica* y posterior transferencia a membranas de nylon, éstas fueron hibridadas con las dos sondas ya mencionadas, es decir con la correspondiente al NBD2 de *ABC1.1* y con la sonda específica para este gen, correspondiente al lazo. La figura D10 muestra que mientras que con la sonda que corresponde al NBD2 se reconocen dos bandas cromosómicas de 1,3 y 0,6 Mb aproximadamente (figura D10A), con la sonda específica se reconoce únicamente la

banda cromosómica de mayor tamaño (figura D10B), indicando que allí se ubica el gen *LtrABC1.1*. Así pues en la banda cromosómica de menor tamaño se deben encontrar otros miembros de la subfamilia ABCA.

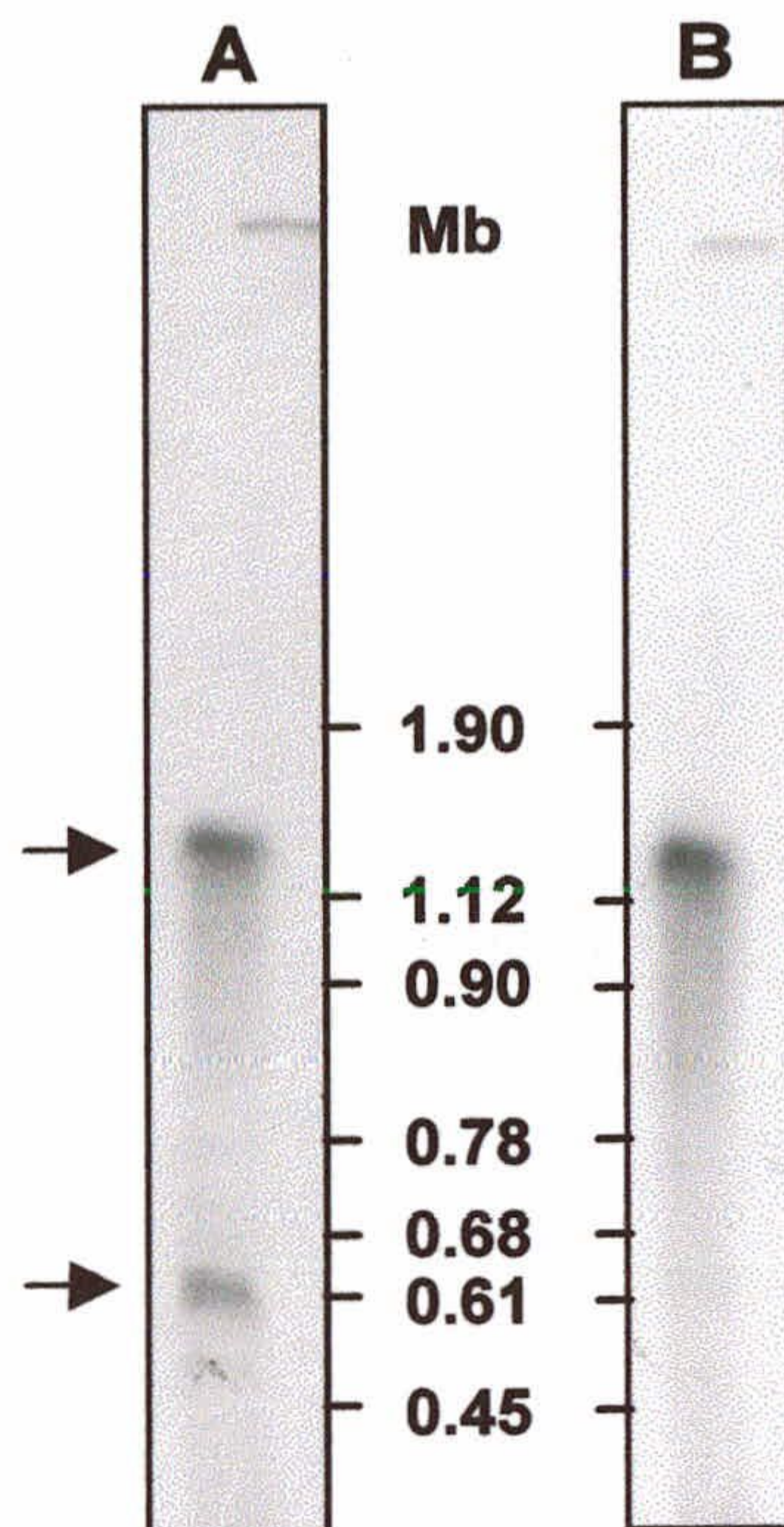


Figura D10. Análisis por CHEF de la localización del gen *LtrABC1.1*. Bloques conteniendo parásitos de *L. tropica* fueron sometidos a CHEF para separar las bandas cromosómicas. Estas fueron posteriormente transferidas a membranas de nylon e hibridadas con la sonda correspondiente al NBD2 (A) y la sonda correspondiente al lazo (B). Las señales de hibridación correspondientes a las bandas cromosómicas de 1, 3 y 0,6 Mb, se indican con flechas.

3. EXPRESION DEL GEN *LtrABC1.1*

3.1. Transcripción de *LtrABC1.1*

Para estudiar la transcripción del gen *LtrABC1.1* realizamos experimentos de Northern blot utilizando tanto ARN total como la fracción poliadenilada de dichos ARNs obtenidos de *L. tropica* y de *L. infantum*. Muestras conteniendo 40 µg de ARN total o 5 µg de ARNm fueron separadas por electroforesis en gel de agarosa-formaldehído, transferidas a membranas de nylon e hibridadas con la sonda específica para ABC1.1. No se obtuvo en ningún caso señales correspondientes a transcritos ABC1.1.

3.2. Adición del miniexón del ARNm de ABC1.1

Para ubicar el sitio aceptor del miniexón en el gen se procedió a la síntesis del ADN copia (ADNc) a partir de ARNm de *L. infantum* utilizando un cebador antisentido específico correspondiente a los nucleótidos 655-673 de la secuencia del gen *ABC1.1* con respecto al sitio de inicio de la traducción (LABC1-11). El ADNc así sintetizado fue

utilizado como molde para una reacción de amplificación por PCR, empleándose en este caso un oligonucleótido sentido correspondiente a parte de la secuencia del miniexón (LSL) y un oligonucleótido antisentido de *ABC1.1* (LABC1-20), que está ubicado a 163 bases del triplete ATG iniciador de la traducción. Como se muestra en la figura D11, entre los productos de amplificación se obtuvo una banda mayoritaria de 620 pb que fue clonada en el plásmido pGEM-T. Tras la secuenciación de varios clones positivos se identificaron dos sitios de adición del miniexón en la secuencia del gen *ABC1.1* (ver figura D12). Estos sitios AG están ubicados corriente abajo de regiones ricas en pirimidinas y a 443 y 463 nucleótidos de distancia con respecto al sitio de inicio de la traducción.

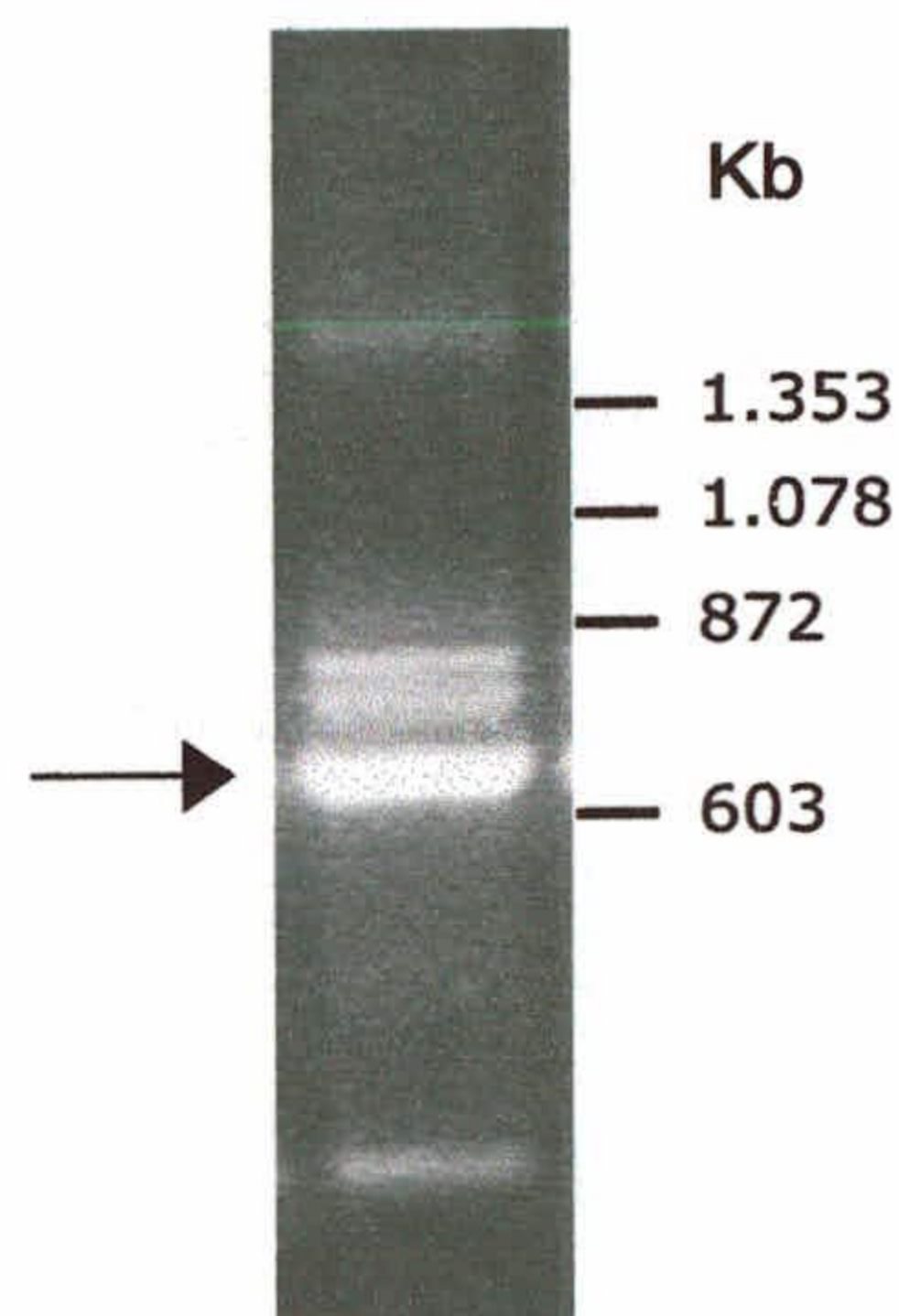


Figura D11. Sitio aceptor del miniexón en el ARNm de *ABC1.1*. Amplificación por PCR del ADNc de *L. infantum* utilizando como cebadores el oligonucleótido LSL correspondiente a la secuencia del miniexón y LABC1-11. Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en gel al 1% de agarosa y se tiñeron con bromuro de etidio. Se señala el producto de amplificación mayoritario de 620 pb obtenido.

CACAGCCACAGCTCGCCTGCGACTGTTGCGCCACGGCTAAGGCCTGGTTCGTCCAGGA	-60
CGAGCGGCCTGCCGTGGATCGGGCCGCGGTCTAACCGGCTCTTCCTCTTCTTCT	-120
CGTCCCTTCCCCGGGTGCGTGTGCGCGATCGGCGCCAGGCGGACCTGGCGGGACTG	-180
CATGCCTTGATCCACCCGGGCCGCGTCCAGGGCTCTGCTCGAGGTGCTCTCATCGCG	-240
CTTCCC GCATCTGCGCCGCATCGGCCACACGGTCGCATGCAGGAGATGCCGCATGT	-300
TTCCCGAGCATGCACGTTCTTTTTTTTTTCGGTGCGCCGTGTGTGTGGGGGCGGGT	-360
GATAGGTATGGATCTCGTCCCTCCGACATGTGTGGATCGTCCGCACGATTCGTAGTG	-420
CGCTGCTGCAAAGGTGATCATCACGACGGCAAGCCTCCTCGGCACAGCGATAGCCCA	-480
TACCTGTCCGCCGATACCGAGGAGCCCGCCAGCGGTACCCGAGGGCAGGCTGCAGGG	-540
TCTTTGGCTTTCCACACAGTGGGTGCTGGGCCGTGAGATAACCACGGCGAGGTGGT	-600
GGGCGTCATCAGGGGCCCTTTGCTGACTAGAAGCCGAAAAACAAAAACGCTTTTTTT	-660
TGTGTGCGAGGTTTGCTTTTCGCGTGAAATTCCTCTTGTGTAGTCATGGTATCTCAG	-720
GGAGTGGGTACTCGCCATCAGAAGACCTCCGTGACGTACCTGTTGCACGGAAGGTTT	-780
CATCCATTCTCTGTGTCTCTCGGTTGTGCGCCTCCTCCCCGACCTTTGGTCGTGC	-840
CGTCCCACGCAGACGACTCGAAAGGGAATCTCTCTATTACGCTTTTTTGCCCTCGCT	-900
GCCTCTCACGGTGAAGTTGCACACTCACACGCCTCACCTCCTCTCCTCCCCACACG	-960
CACACACCCCGCTGTATCACATTTGCAAATACACGCACAAGTACACGTATTCAGTCC	-1020
TCTTCCACTACCCACGCGCGCCTCTTCTTGCTCGCCCCCTCCGCCACCGACGGACT	-1080
TGAAGCGCACACGCAACGCAAACCAGCGCGAGTCCGTTGATCGACTCAGCGGTGGTG	-1140
CTGTTTTTCGGCGGCCGCGCGTGTATGTCCCCTCACCGCACCTTCCCTCTCTCACTCT	-1200
TTGTTCACAATCGCGGTGCTGAAGCTCCCCTTAGCTTTTTTACTCCACCCCTCTCCA	-1260
CACCTGCCGCAAGCCCCTGCGAGGAGAGACGGAGTGTGTGTGCGTGCTGGAGAGGTC	-1320
GCACGCCTCTACGTGCGTGCGTGAGTCTATGAGGTTGGCCGTGAGCCTTTTCTTGTC	-1380
TTTCGTTTTGTGGCTTCTTAGGCACTTATTAACCTTTCATGCTTTTCTCCTTTTTT	-1440
AAGCGCTCTCTGTTATTGAATCCCTCTCTGCGTCTCTTTGTGTGTTTCGTTGTACG	-1500
GTCATCCGAGACCGGCACAGTCGTTTCTCACGCCACGTAGCGGCTGCTTTAGCACT	-1560
CCCGCATATATACACACACTACACACGCACACACATATCATCGTGCACACAGAAT	-1620
ACCCGAGTCCCGCGTCAGGTTCCGGAGAAGACAAACAGGTGGAGCCTCCCCGTCAAT	-1680
TCTTTCATCGCATCGTTCGTGTGTCTCCCCTATCCATTGCCCGCTCTCGTCTTACCC	-1740
CCGTTTTCAAACGCGTGGTCGCGCGCGTCTGTGCTTGGCTTTGGGCCTGCACACACA	-1800
CACACACACACACACTTCCCTTCCCTCCCTGGGCGTCCACATCCAGTTTTGTTCG	-1860
TTTTCTCTTTGTTCTTCCCTTTCGGCGTGACTGTGTGGGACAGGCCTCGGCACGCC	-1920
AAGTCGCACGCACCGCCGTTTCGCCCTGTTTTGGCTTCTGCTTTGCTCGCTTACCT	-1980
CTCTAACCTTTTTTATTTCTGTGCGCTTCCCTTTACAGCTCTGCGGACTGATTCACA	-2040
GTGTGCTTCCGCGCCTCTTTCACCCCTTCCCTTGACCACCCGCATTCGCCACCCCTTC	-2100
CTCTCCTCAGAACGGAGACTCCTGGTAGCTCTGGCGGCTGTCTCTTTCCCTCTCCC	-2160
TCTGACACACTCTCTTGTGATTTCCGCCAAGAAGCTCTCTCTTGGTGGACAGATC	-2220
CGCCACGAAAAAATCCCGAAACGGACGTCAAGCGCATATACGGCTGAAGCCGCTGC	-2280
TTTACACCAACGTTGGGCTTCACAGACTCAGCTGGCCGGTGCAGGCGCATTCGTTTT	-2340
CTCGTTGCCGCTTCACACGAGCCTCCTCCCTCAGAATTCGAGAAAAGTGGGAGTTGC	-2400
CGCTCACGAGCTCTCTGCACAGCGAGGAGGAAAGCGCTGACGGCGTGTGACGTGGTA	-2460
TCCGCGAAGAGCGGACTACTCCCTTCAACCAGAGCGAGGCGCCTATGCCTGGGGCTG	+13
GCCCGCTTGTACCCTCTCCTAACTCCACGACGACGACGACGAGAACCCTGCTTTTAT	+73
TCGCCTCGCCAGGCGCACTGCCAGGATTGAGCTTTTCCCGAAACAACCTC	+133

Figura D12. Secuencia del extremo 5' del gen *LtrABC1.1*. En naranja se señala la secuencia repetida invertida que se encuentra flanqueando la región codificante de *LtrABC1.1*. Los dos sitios AG utilizados para la adición del miniexón se encuentran señalados en azul y se encuentran precedidos de secuencias ricas en pirimidinas (en celeste). El codón de inicio de la traducción se encuentra en rojo subrayado. También se indican en verde regiones consistentes en el repetido CA, comúnmente encontrado en el genoma de *Leishmania* y que forma parte del ADN microsatélite (Rossi y col., 1994).

3.3. Identificación del sitio de poliadenilación del ARNm de ABC1.1

Para ubicar el sitio de poliadenilación en el transcrito correspondiente a ABC1.1, se empleó una estrategia similar a la utilizada para identificar el sitio aceptor del miniexón. En este caso, la síntesis de ADNc a partir de ARNm de *L. infantum*, se realizó utilizando como cebador un oligonucleótido que contiene una secuencia poli T seguida por una secuencia de anclaje de 24 nucleótidos (ANCH+T). La secuencia de anclaje incorporada durante la síntesis de ADNc en los extremos 3' de todas las moléculas, es aprovechada en la siguiente reacción de amplificación por PCR, donde utilizamos un oligonucleótido antisentido correspondiente a dicha secuencia de anclaje (ANCH) y un oligonucleótido sentido correspondiente a la secuencia codificante de ABC1.1 anterior al codón de terminación (LABC1-3). Los productos de amplificación obtenidos fueron re-amplificados con un oligonucleótido sentido correspondiente a la región no codificante ubicada inmediatamente después del triplete de terminación (LABC1-3'-3) y el oligonucleótido ANCH. Se obtuvo una banda mayoritaria de aproximadamente 250 nucleótidos que fue clonada en el plásmido pGEM-T y secuenciada utilizando los cebadores universales del vector. El análisis de la secuencia de varios plásmidos conteniendo este producto, mostró que el sitio de poliadenilación en el transcrito de ABC1.1 se encuentra a 246 y a 248 nucleótidos de distancia con respecto al triplete de terminación (ver figura D2).

4. OBTENCION DE PARASITOS QUE SOBREENPRESAN LA PROTEINA ABC1.1

4.1. Construcción de plásmidos de expresión con el gen *LtrABC1.1*

Los fragmentos de los distintos plásmidos obtenidos (ver figura D1) fueron sucesivamente subclonados en el plásmido pBluescript-KS para obtener la secuencia completa codificante del gen que denominamos *LtrABC1.1*. En dicha construcción también fueron incluidas regiones no codificantes flanqueantes del gen.

Se realizaron dos construcciones plasmídicas conteniendo el gen *LtrABC1.1* que difieren en la extensión de la secuencia 3' no codificante. Un esquema de los pasos realizados se presenta en la figura D13. Para la construcción del plásmido llamado LABC1 se realizaron los siguientes pasos:

- Digestión del plásmido pKS2.5 con las enzimas Sal I y Dra I y clonaje del fragmento de 1,5 Kb resultante en el plásmido pBluescript-KS en los sitios Sall/EcoRV.
- Digestión del plásmido pKS3.4 con Sal I y clonaje del fragmento de 1,8 Kb resultante en el plásmido anterior digerido con Sall.
- Digestión del plásmido pKSXH con Xho I y Hind III y clonaje del fragmento de 4 Kb en el plásmido anterior.

El plásmido resultante, llamado LABC1, contiene el marco abierto de lectura del gen *LtrABC1.1* con 2.171 nucleótidos de región 5' no codificante y 218 nucleótidos de región 3' no codificante.

Para la construcción del plásmido LABC1-3' el fragmento BstEII-XbaI de 2,6 Kb obtenido de la digestión del plásmido pKS2.5 fue clonado en el plásmido LABC1 (ver figura D13). El plásmido resultante contiene, a diferencia de LABC1, 1.360 nucleótidos de región 3' no codificante.

Para construir vectores adecuados para la transfección de parásitos, se añadió a los plásmidos ya descritos (LABC1 y LABC1-3'), un fragmento de 2,5 Kb proveniente de la digestión del plásmido pKSNEOA. Este fragmento contiene la secuencia codificante del gen de la neomicina fosfotransferasa (NEO), flanqueado por regiones no codificantes que contienen las secuencias necesarias para su correcta expresión. Este fragmento fue clonado en el sitio XhoI corriente arriba del gen *ABC1.1*. Los plásmidos resultantes se denominaron LABC1N y LABC1N-3'.

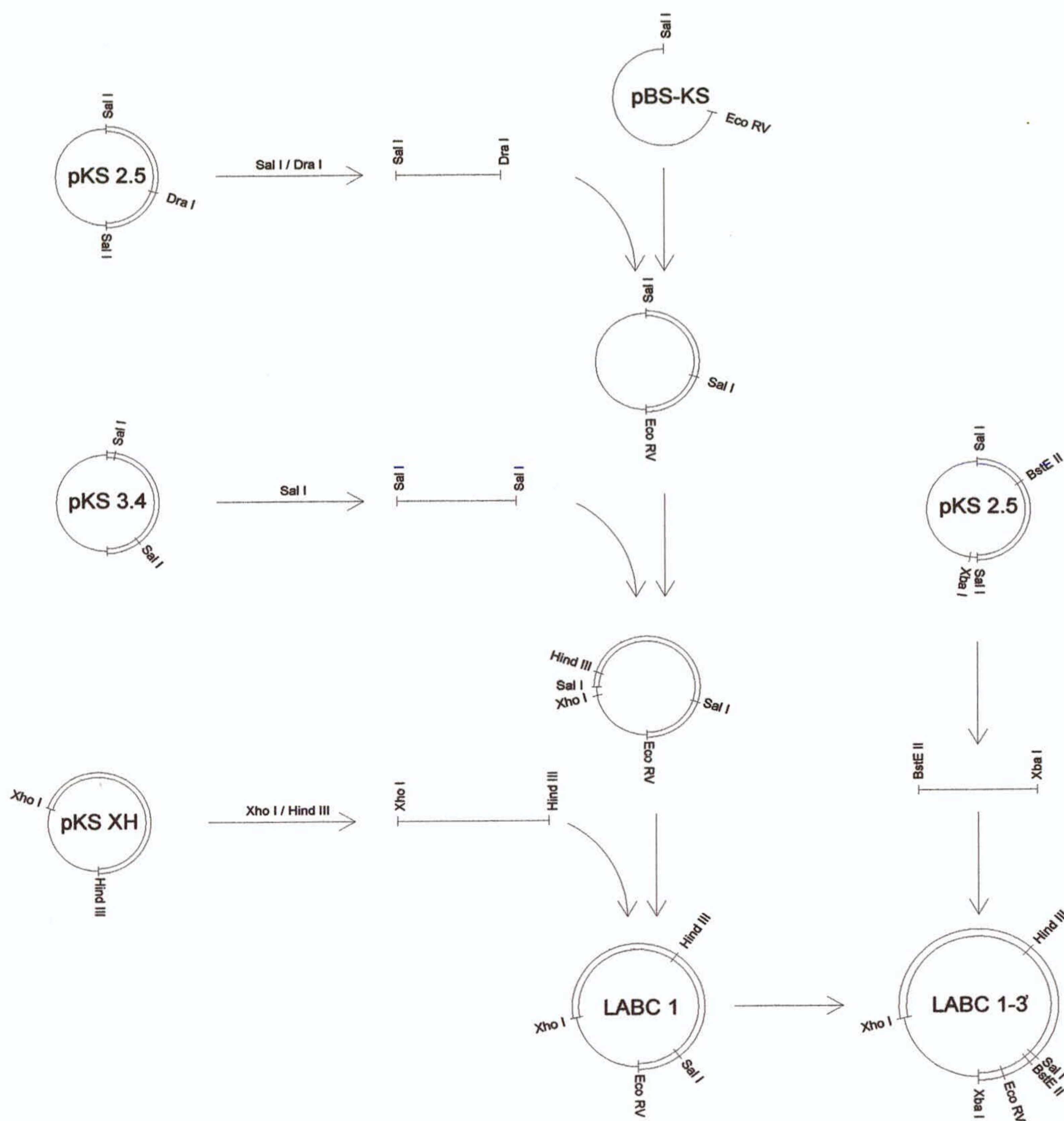


Figura D13. Etapas en el clonaje del gen *LtrABC1.1* en plásmidos de expresión. A partir de los plásmidos que llevan distintos fragmentos de la secuencia codificante del gen, se realizaron dos construcciones plasmídicas que contienen el gen *LtrABC1.1* flanqueado por sus regiones no codificantes en el plásmido pBluescript-KS. Los plásmidos resultantes, LABC1 y LABC1-3' se diferencian en el tamaño de la región 3' no codificante incluida en la construcción.

4.2. Transfección de parásitos con *LtrABC1.1*

En los experimentos de transfección se emplearon promastigotes de *L. infantum* en fase logarítmica de crecimiento. 50 millones de estos parásitos fueron transfectados por electroporación con 100 μ g de ADN plasmídico. Se emplearon los plásmidos LABC1N y LABC1N-3' así como el plásmido pKSNEOA como control. Una vez electroporados los parásitos, se resuspendieron en medio RPMI 1640 con 20%

SBF y a las 24 horas se les agregó geneticina (G418) a una concentración inicial de 50 $\mu\text{g/ml}$ para la selección de los parásitos transfectados. Tras sucesivos pases a concentraciones crecientes del fármaco, los parásitos transfectados fueron seleccionados y finalmente adaptados a una concentración de 2 mg/ml de G418.

4.3. Caracterización genómica de los parásitos transfectados

La presencia del ADN extracromosómico circular en los parásitos transfectados fue puesta en evidencia mediante Southern blot de ADN genómico proveniente de estos parásitos y posterior hibridación con una sonda que reconoce al gen *ABC1.1*. El ADN obtenido de los parásitos transfectados tanto con LABC1N como con LABC1N-3' fue digerido con una combinación de enzimas de manera de obtener las bandas correspondientes al gen episomal de distinto tamaño con respecto a la copia genómica. Tras la hibridación con una sonda correspondiente al extremo 5' del gen (fragmento EcoRI/EcoRI), fue posible cuantificar las señales de hibridación correspondientes a ambos genes (figura D14). La relación obtenida entre la cantidad de radiactividad (medida en cuentas por minuto) presente en la banda episomal y la banda genómica da como resultado la cantidad de veces con que se encuentra más representado el gen en los parásitos transfectados con respecto a parásitos controles. Esta cuantificación en el caso de los parásitos que contienen el plásmido LABC1N fue de 140 veces, mientras que en el caso de los transfectados con LABC1N-3' fue de 81 veces.

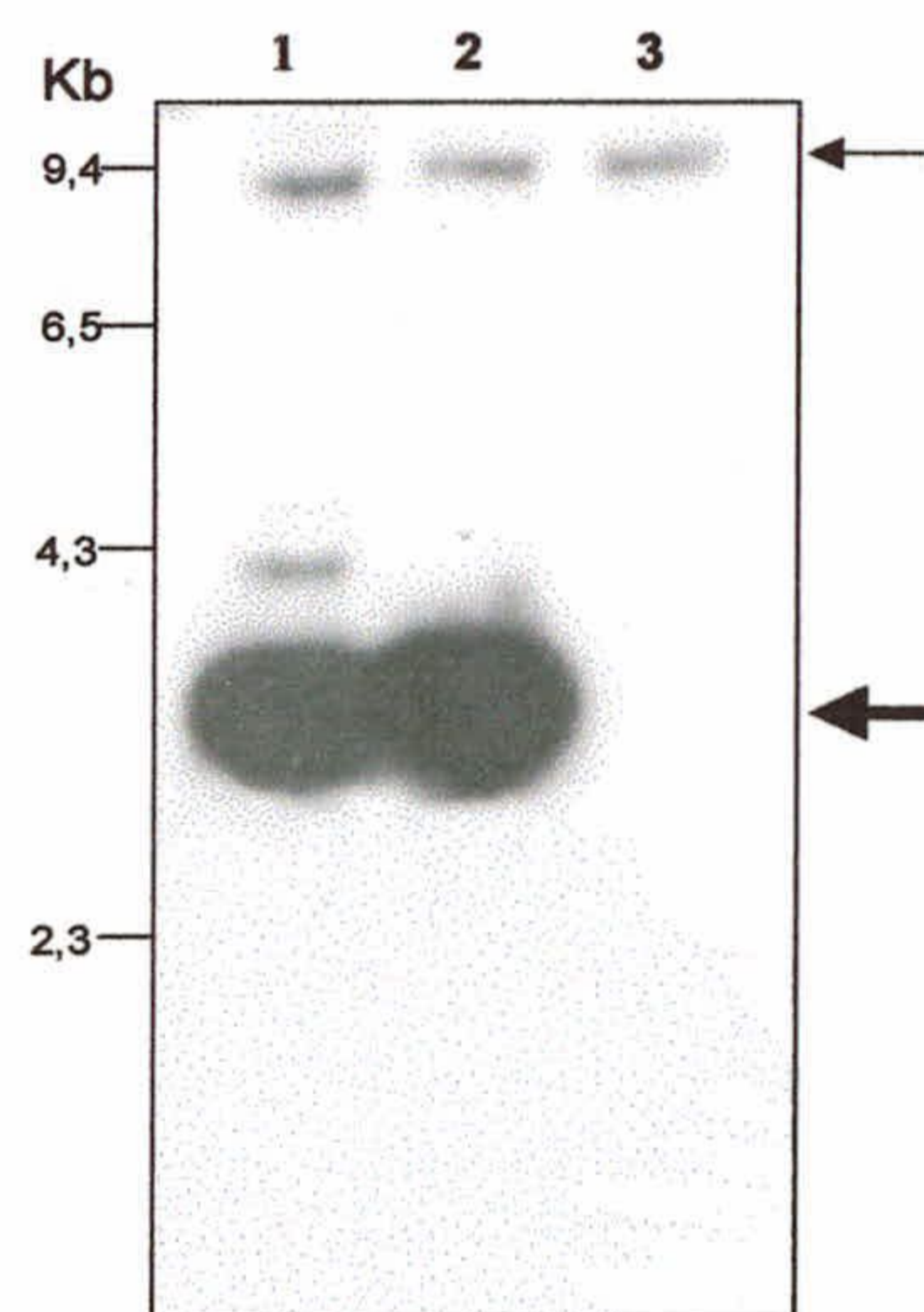


Figura D14. Caracterización genómica de los parásitos transfectados. El ADN de los parásitos transfectados fue digerido con la enzima de restricción Bam HI, transferido a membrana de nylon e hibridado con una sonda correspondiente al extremo 5' del gen *LtrABC1.1*. 1. Parásitos transfectados con el plásmido control pKSNEOA; 2. Parásitos transfectados con el plásmido LABC1N; 3. Parásitos transfectados con el plásmido LABC1-3'. Las bandas señaladas con una flecha fina corresponden a las copias genómicas del gen

ABC1.1, mientras que las señaladas con la flecha gruesa corresponden a las copias episomales.

4.4. Expresión de *ABC1.1* en los parásitos transfectados

La sobreexpresión de los transcritos correspondientes a *ABC1.1* en los parásitos transfectados fue puesta en evidencia por Northern blot (figura D15). Se identificaron bandas de hibridación mayores de 6 Kb de tamaño, correspondientes al mensajero de *ABC1.1* sobreexpresado en los parásitos transfectados; en los parásitos controles transfectados con el plásmido vacío no se detectaron bandas de hibridación.

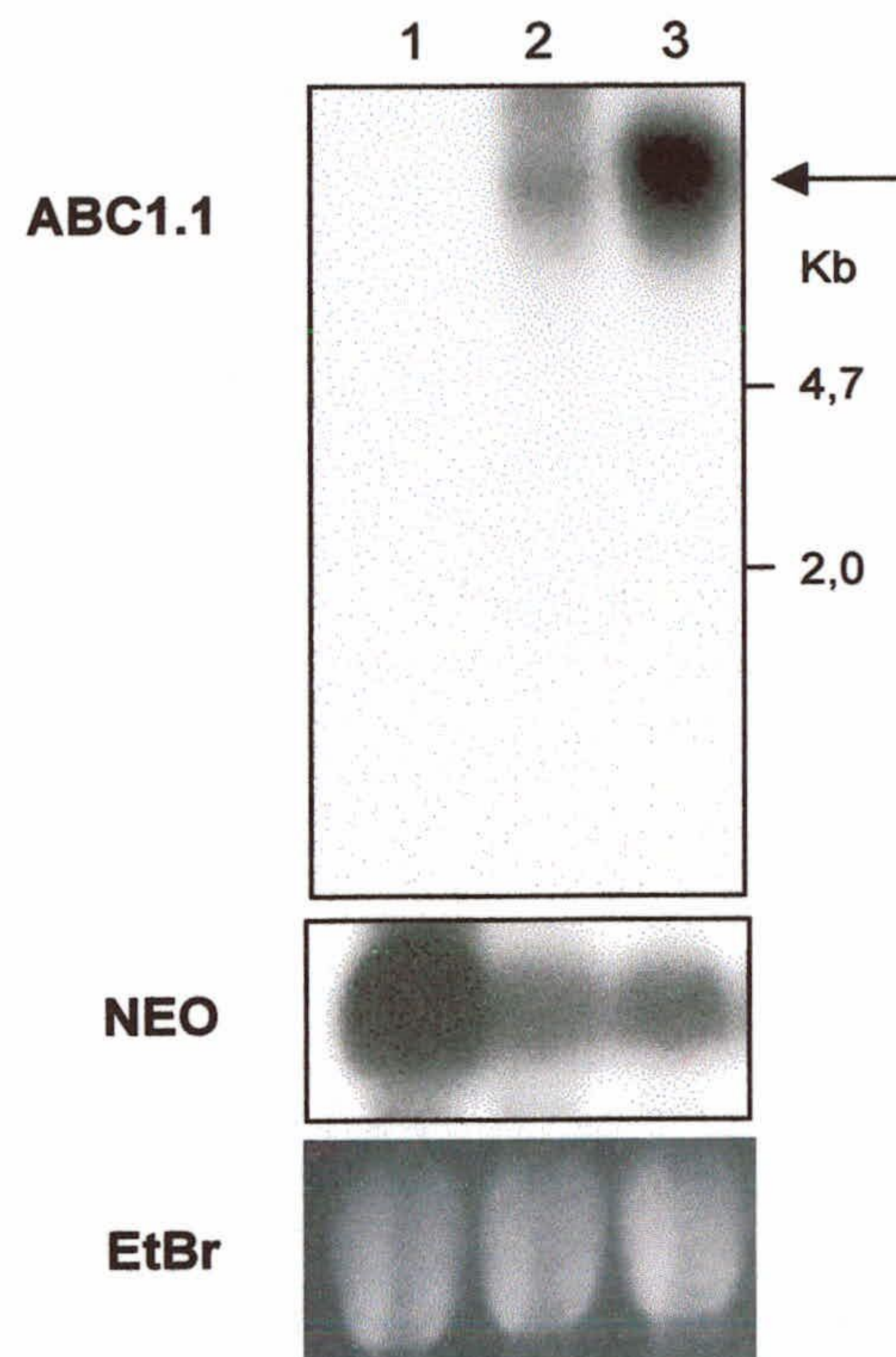


Figura D15. Sobreexpresión del gen *ABC1.1* en los parásitos transfectados. Northern blot con ARN total proveniente de los parásitos transfectados. Tras la transferencia a membranas de nylon, el ARN fue hibridado con la sonda específica para *ABC1.1* correspondiente al lazo y con la sonda correspondiente a la región codificante del gen *NEO*. 1. parásitos transfectados con el plásmido control; 2. parásitos transfectados con el plásmido LABC1N; 3. parásitos transfectados con el plásmido LABC1N-3'. Se señala con una flecha los transcritos correspondientes a *ABC1.1*. Debajo se muestra el gel teñido con EtBr.

5. ANALISIS DE LA EXPRESION Y LA LOCALIZACION DE LA PROTEINA ABC1.1

5.1. Obtención de anticuerpos policlonales dirigidos contra la proteína ABC1.1

Para obtener anticuerpos que reconozcan de manera específica la proteína ABC1.1 se eligió como inmunógeno la región de la proteína que se encuentra entre el 7° y el 8° segmento transmembrana, debido a que presenta la mayor divergencia de secuencia al compararla con otros miembros de la familia (figura D16). Además, en los estudios de Southern blot y CHEF, esta región del lazo, utilizada como sonda de ADN, mostró ser específica para *ABC1.1*. Así cabía esperar que anticuerpos dirigidos contra esa región fueran capaces de reconocer únicamente a la proteína ABC1.1 y no a las demás proteínas relacionadas con ABC1.1 presentes en *Leishmania*. La secuencia que codifica para esta región de la proteína fue amplificada por PCR utilizando dos oligonucleótidos específicos que introdujeron las dianas para las enzimas de restricción BamHI y HindIII (AC1-1 y AC1-2). El fragmento amplificado de 412 pb fue clonado en el plásmido pGEM-T y su secuencia fue confirmada utilizando los cebadores universales del vector. Posteriormente este fragmento fue subclonado en el vector de expresión pQE30 inducible por IPTG. Este plásmido permite el clonaje del fragmento fusionado a una secuencia que codifica para varias histidinas, lo que permitirá su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad.

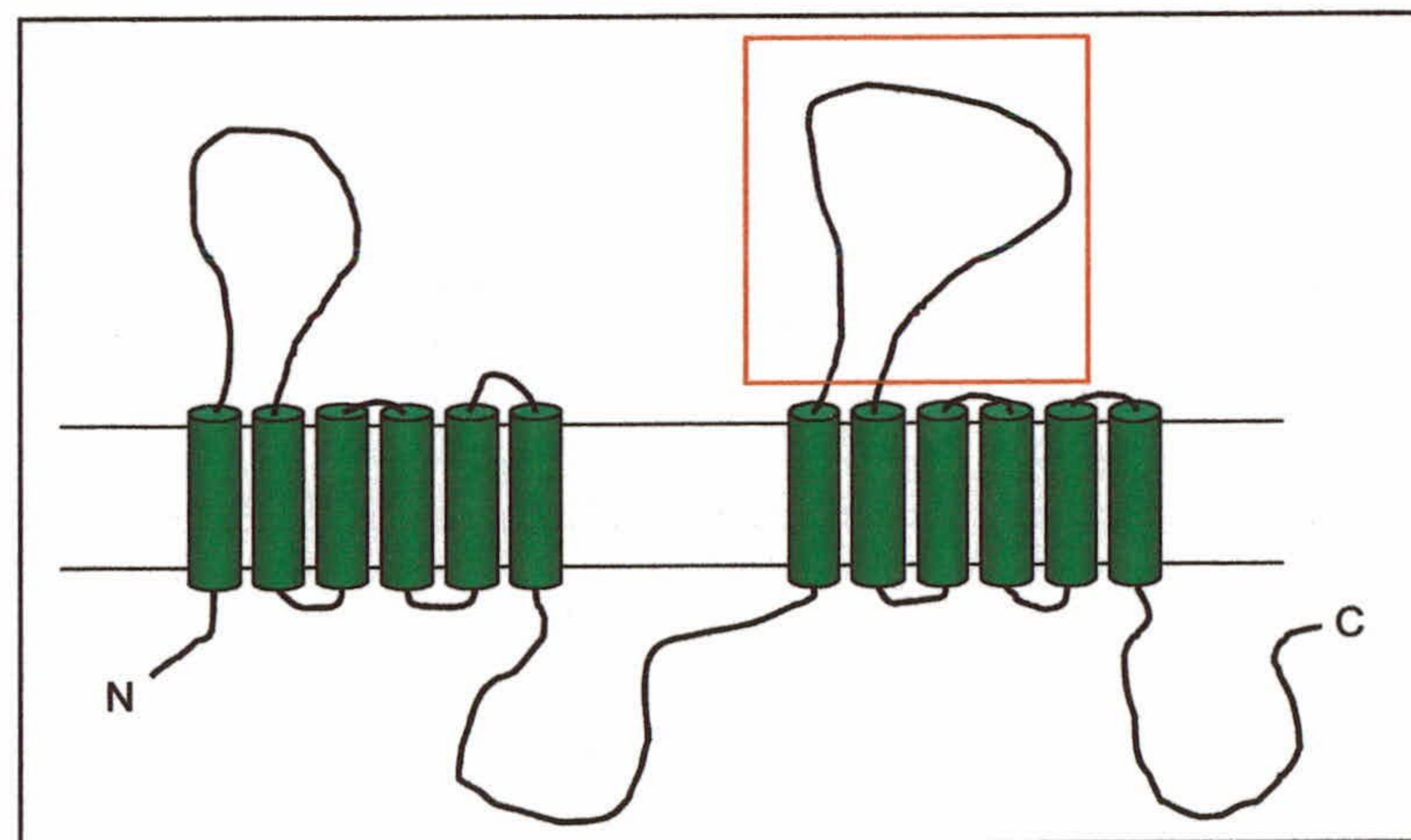


Figura D16. Obtención de anticuerpos policlonales dirigidos contra la proteína ABC1.1. Representación esquemática de la proteína LtrABC1.1; encuadrado en rojo se representa la región del lazo ubicada entre los segmentos transmembrana 7° y 8°, empleada como inmunógeno para la producción de anticuerpos policlonales dirigidos contra ABC1.1.

El plásmido resultante, denominado pQEAC-1, fue utilizado para transformar bacterias de la cepa M15. Se chequeó la expresión del péptido en distintas colonias

inducidas con IPTG y se optimizaron las condiciones de mayor expresión de la proteína recombinante. Se realizaron chequeos de solubilidad del péptido y a pesar de ensayar condiciones de inducción a bajas temperaturas, el péptido permaneció insoluble, como se demostró por electroforesis en geles de poliacrilamida. Por lo tanto, se procedió a la purificación del péptido bajo condiciones desnaturalizantes. Las condiciones de inducción de la expresión del péptido a gran escala fueron a la temperatura de 37°C y con 0,5 mM de IPTG durante un tiempo de 5 horas (figura D17A). La purificación se llevó a cabo en un tampón que contiene hidrocloreuro de guanidina 6M y mediante cromatografía de afinidad utilizando la resina Ni-NTA. La elución se llevó a cabo en tampones conteniendo urea a pH 5,9 y 4,5. Los eluidos de la purificación fueron controlados mediante electroforesis y posterior tinción de los geles con azul de Coomassie (figura D17B).

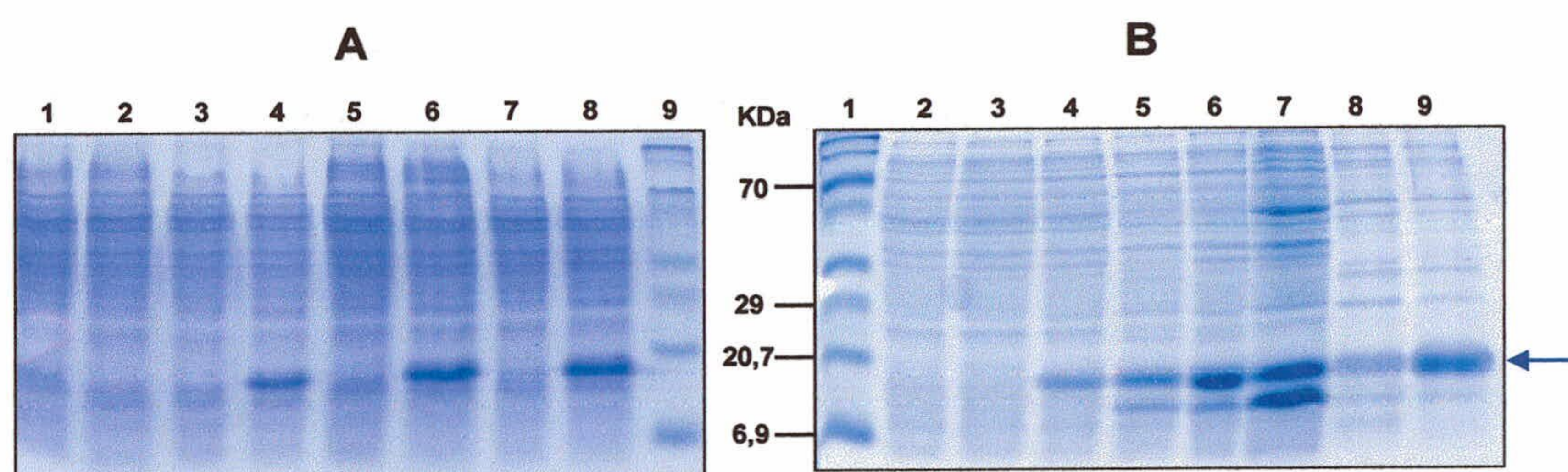


Figura D17. Inducción y purificación de la proteína recombinante. Electroforesis en geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie. **A.** Proteínas provenientes de distintas colonias conteniendo el plásmido pQEAC1 sin inducir (**carriles impares**) o inducidas con 0,5 mM IPTG (**carriles pares**). Los carriles 1 y 2 corresponden a colonias que llevan el plásmido control, pQE30 vacío. **B.** Proteínas obtenidas de las distintas fracciones durante el proceso de purificación. 1. Marcador de peso molecular; 2. proteínas provenientes de una colonia que lleva el plásmido control inducida con 0,5 mM IPTG; 3. proteínas provenientes de un colonia que lleva el plásmido pQEAC1 sin inducir; 4. proteínas provenientes de un colonia que lleva el plásmido pQEAC1 inducida con 0,5 mM IPTG; 5. proteínas del sobrenadante tras centrifugación; 6. proteínas del sedimento tras centrifugación; 7. proteínas totales de la colonia tras sonicación, antes de la centrifugación; 8. sobrenadante con proteínas tras elución con tampón pH 5,9; 9. sobrenadante corresponde al eluido final de la purificación con tampón pH 4,5, el cual contiene una banda de aproximadamente 14 KDa correspondiente al péptido recombinante (señalada con una flecha).

Tras la cuantificación mediante la técnica de Bradford, el péptido así parcialmente purificado fue utilizado para la inmunización de un conejo de la cepa New Zealand White. El protocolo de inmunización consistió en siete inoculaciones por vía subcutánea con 150 μ g de péptido. El título de los anticuerpos policlonales obtenidos a partir del suero del conejo inmunizado fue determinado mediante la técnica de ELISA, obteniéndose un título final mayor de 1/640.000.

5.2. Inmunodetección de la proteína ABC1.1

La expresión de la proteína ABC1.1 fue analizada sobre los parásitos transfectados mediante Western blot y detección con el suero inmune conteniendo anticuerpos anti-ABC1.1. Se separaron proteínas totales provenientes de 10 millones de parásitos en geles de poliacrilamida al 10%. Los geles fueron transferidos a membranas PVDF y éstas fueron incubadas con una dilución 1/5.000 del suero inmune, posteriormente con un segundo anticuerpo conjugado a fosfatasa alcalina, y finalmente se reveló con los sustratos de dicha enzima BCIP y NBT.

Como se muestra en la figura D18, se observó una banda de aproximadamente 200 KDa en los carriles correspondientes a las proteínas obtenidas de los parásitos transfectados tanto con LABC1N como con LABC1N-3', mientras que no se observó banda en el carril correspondiente a los parásitos transfectados con el plásmido control pKSNEOA. Puede observarse también que a pesar de que cada carril contenía la misma cantidad de proteínas totales, la señal correspondiente a los parásitos transfectados con el plásmido LABC1N-3' es más intensa que la señal correspondiente a los parásitos que contienen el plásmido LABC1N. El tamaño de la proteína reconocida por el suero inmune corresponde al calculado para ABC1.1 a partir de su secuencia de aminoácidos, siendo aproximadamente de 205 KDa.

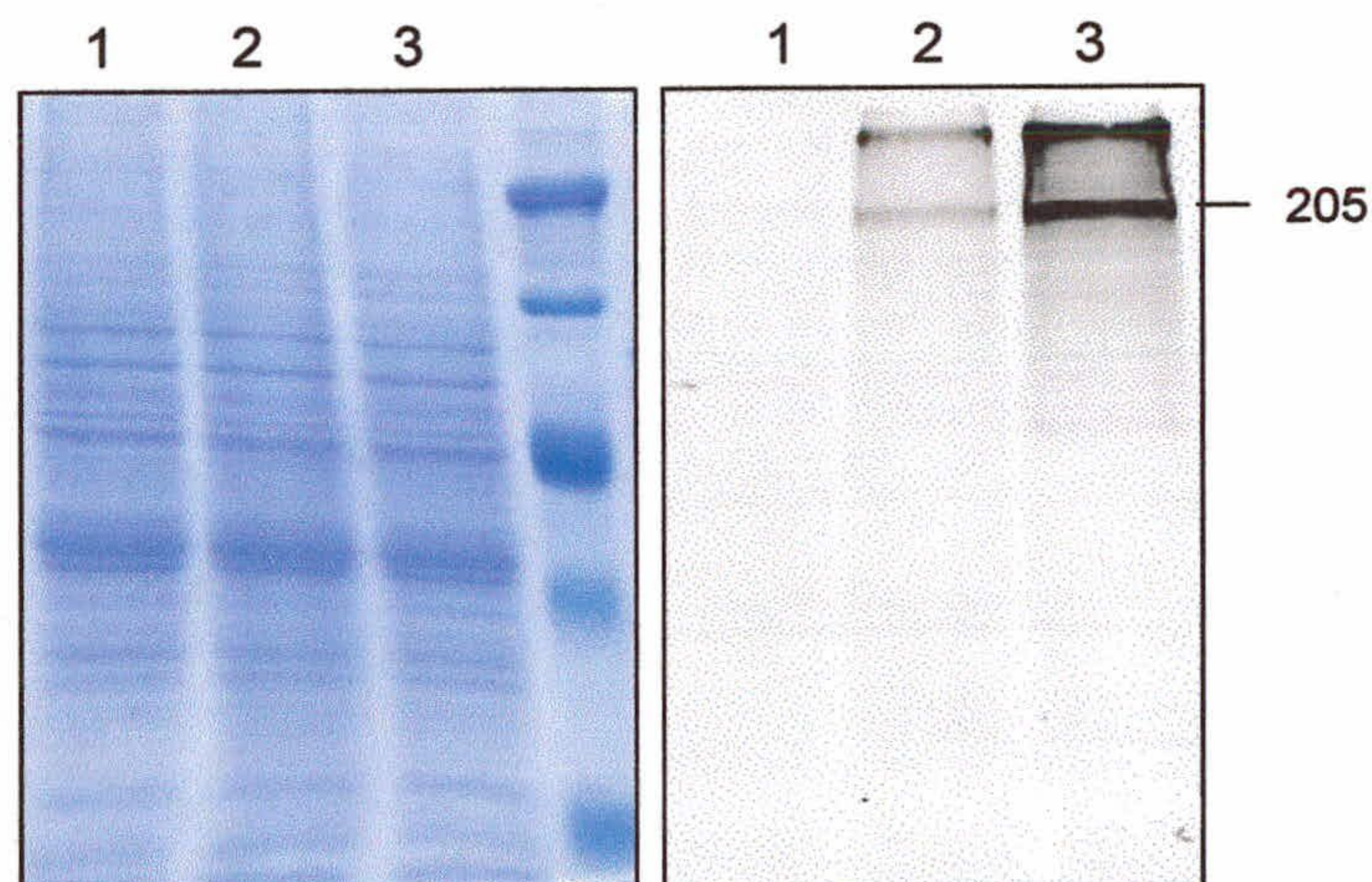


Figura D18. Expresión de la proteína ABC1.1 en parásitos transfectados. Western blot utilizando los anticuerpos policlonales anti-ABC1.1 y su correspondiente gel teñido con azul de Coomassie. 1. Parásitos transfectados con el plásmido control pKSNEOA; 2. Parásitos transfectados con el plásmido LABC1N; 3. Parásitos transfectados con el plásmido LABC1N-3'.

5.3. Localización de la proteína ABC1.1

Para conocer la localización subcelular de esta proteína abordamos dos estrategias: la inmunofluorescencia indirecta, y la inmunomicroscopía electrónica.

Puesto que la expresión de la proteína en parásitos salvajes no se detecta por Western blot, los estudios de localización fueron realizados sobre los parásitos transfectados con el plásmido LABC1N-3', que fueron comparados con parásitos controles transfectados con el plásmido vacío. Como puede observarse en la figura D19, experimentos de inmunofluorescencia indirecta indicaron que la proteína se concentra principalmente en la región del bolsillo flagelar y en la membrana plasmática incluyendo el flagelo.

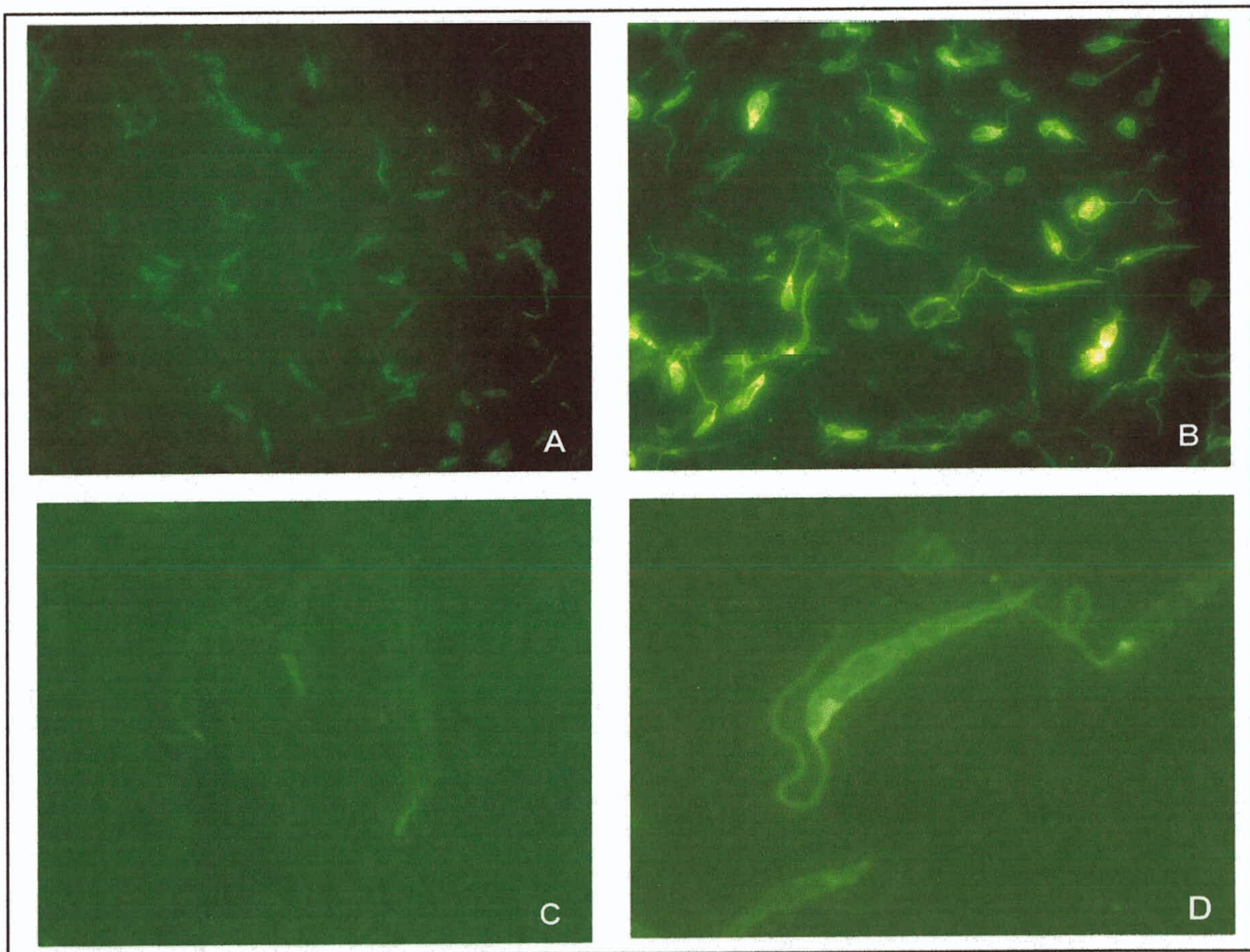


Figura D19. Inmunofluorescencia indirecta de parásitos que sobreexpresan la proteína ABC1.1. Los parásitos fueron incubados con el antisuero anti-ABC1.1, lavados e incubados con anticuerpos anti-IgG conjugados a fluoresceína (FITC) para ser observados por microscopía de epifluorescencia. A. y C. Parásitos transfectados con el plásmido control; B. y D. Parásitos transfectados con el gen *LtrABC1.1*. Se forzaron las condiciones de exposición para tomar las fotografías de los parásitos controles con respecto a los transfectados con ABC1.1.

Puesto que los estudios por microscopía óptica no nos permiten determinar si la proteína presenta otras localizaciones emprendimos estudios de inmunomicroscopía electrónica. Para ello, los anticuerpos policlonales del suero inmune fueron purificados mediante cromatografía en columna de afinidad de proteína A sepharosa para obtener la fracción IgG de los anticuerpos. De esta forma esperábamos disminuir el ruido de fondo y aumentar la especificidad de reconocimiento de los anticuerpos. En la figura D20 podemos observar fotos obtenidas de dichos estudios, donde la marca parece concentrarse principalmente en la zona del bolsillo flagelar y membrana plasmática.

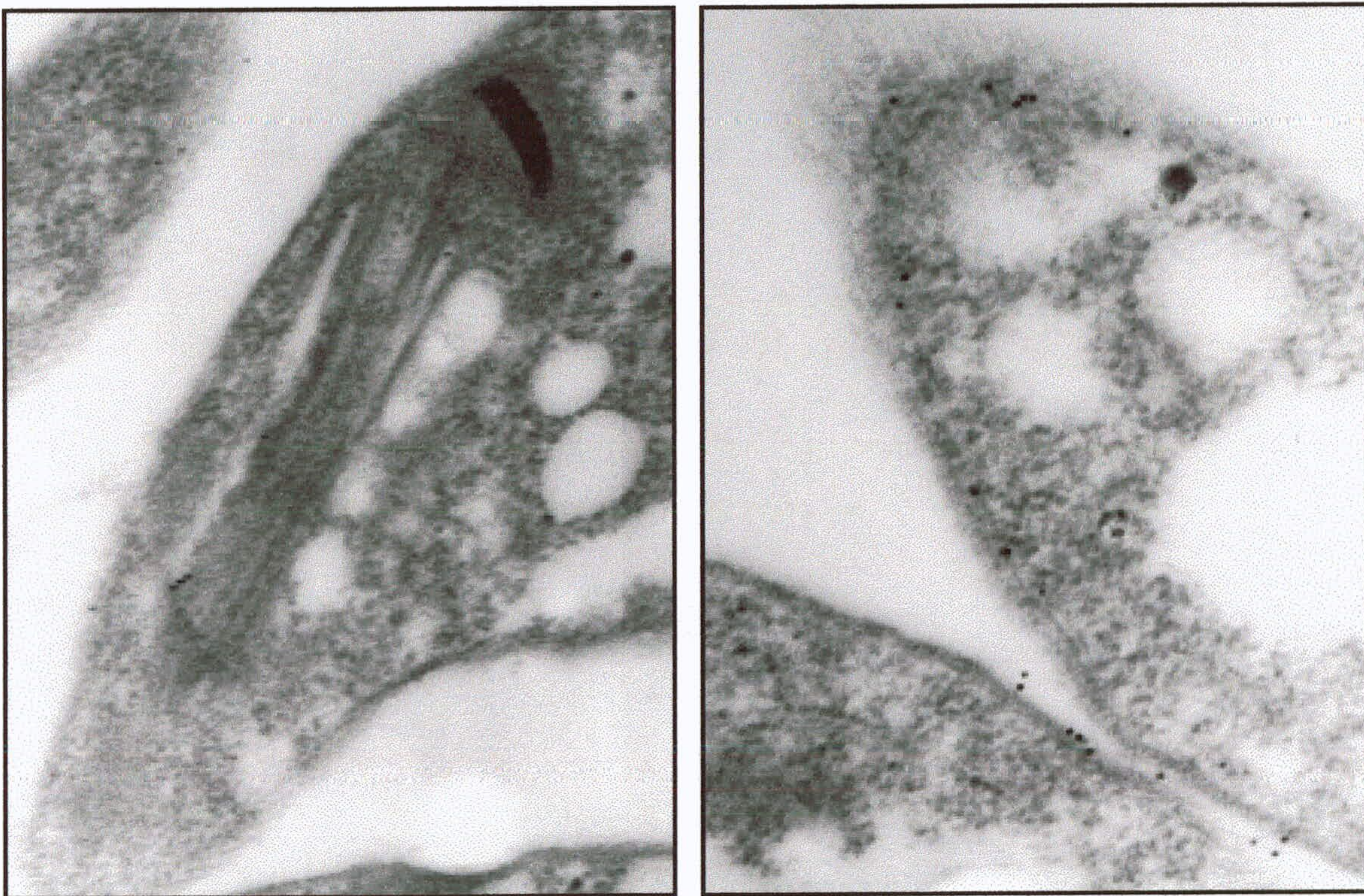


Figura D20. Inmunomicroscopía electrónica con parásitos que sobreexpresan la proteína ABC1.1. Los parásitos fueron incubados con la fracción IgG de anticuerpos anti-ABC1.1, lavados e incubados con anticuerpos anti-IgG conjugados a partículas de oro para ser observados por microscopía electrónica de transmisión. Ambas fotos corresponden a parásitos transfectados con la construcción LABC1N-3'. Las fotos fueron tomadas a X

6. PAPEL FUNCIONAL DE LA PROTEINA ABC1.1

6.1. Clonaje de los parásitos transfectados con ABC1N-3'

Para los estudios funcionales posteriores, utilizamos los parásitos transfectados con el plásmido LABC1N-3' (L.inf ABC1N-3') puesto que en los estudios de Western blot mostraron una mayor expresión de la proteína. Con el objetivo de obtener una población homogénea en cuanto a la expresión de la proteína decidimos proceder al clonaje esta línea. El clonaje se realizó en medio sólido constituido por RPMI 1640 suplementado con SBF al 20% y agarosa al 1%, en presencia de 500 $\mu\text{g/ml}$ de G418. Se obtuvieron 15 clones los cuales fueron aislados y transferidos a medio líquido conteniendo 2 mg/ml de G418. De estos clones se seleccionaron 7 que crecieron mejor en presencia del antibiótico; sobre estos clones se analizaron los niveles de expresión de la proteína, comparándolos con la línea parental heterogénea mediante Western blot (figura D21). El análisis densitométrico de las bandas permitió seleccionar al clon 5 que, aunque presentó menor nivel de expresión con respecto a la línea heterogénea, fue entre los clones, el de mayor expresión.

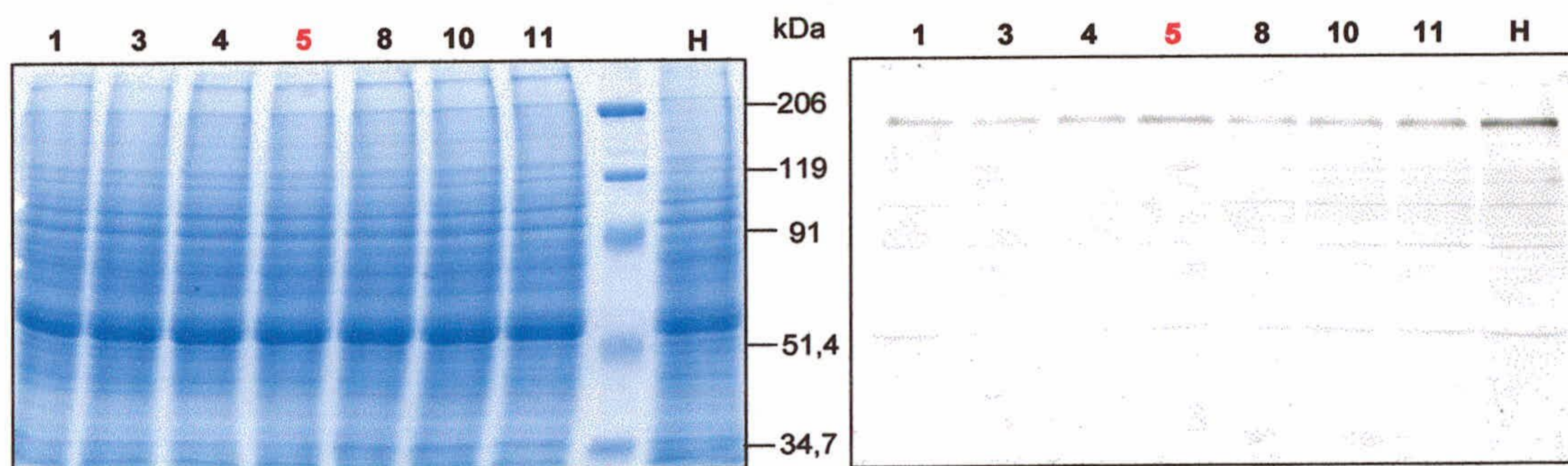


Figura D21. Clonaje de la línea transfectada con LABC1N-3'. Western blot con distintos clones obtenidos a partir del clonaje de la línea de parásitos transfectados con LABC1N-3'. Los números corresponden a los clones seleccionados, a partir de los cuales se analizaron los niveles de expresión de la proteína ABC1.1. H corresponde a la línea de parásitos parental heterogénea. En rojo se resalta el clon 5, el cual fue finalmente seleccionado como el clon de mayor expresión de la proteína. **A.** Gel teñido con azul de Coomassie; **B.** Western blot con los anticuerpos anti-ABC1.1.

6.2. Estudios de viabilidad celular

Para conocer si existen diferencias en el crecimiento de los parásitos transfectados con respecto a los parásitos salvajes, realizamos curvas de crecimiento para cada una de las líneas. Se sembró de cada línea 4 millones/ml de cultivo y se realizaron conteos diarios hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. Como se puede ver en la figura D22, las curvas de crecimiento son similares para todas las líneas.

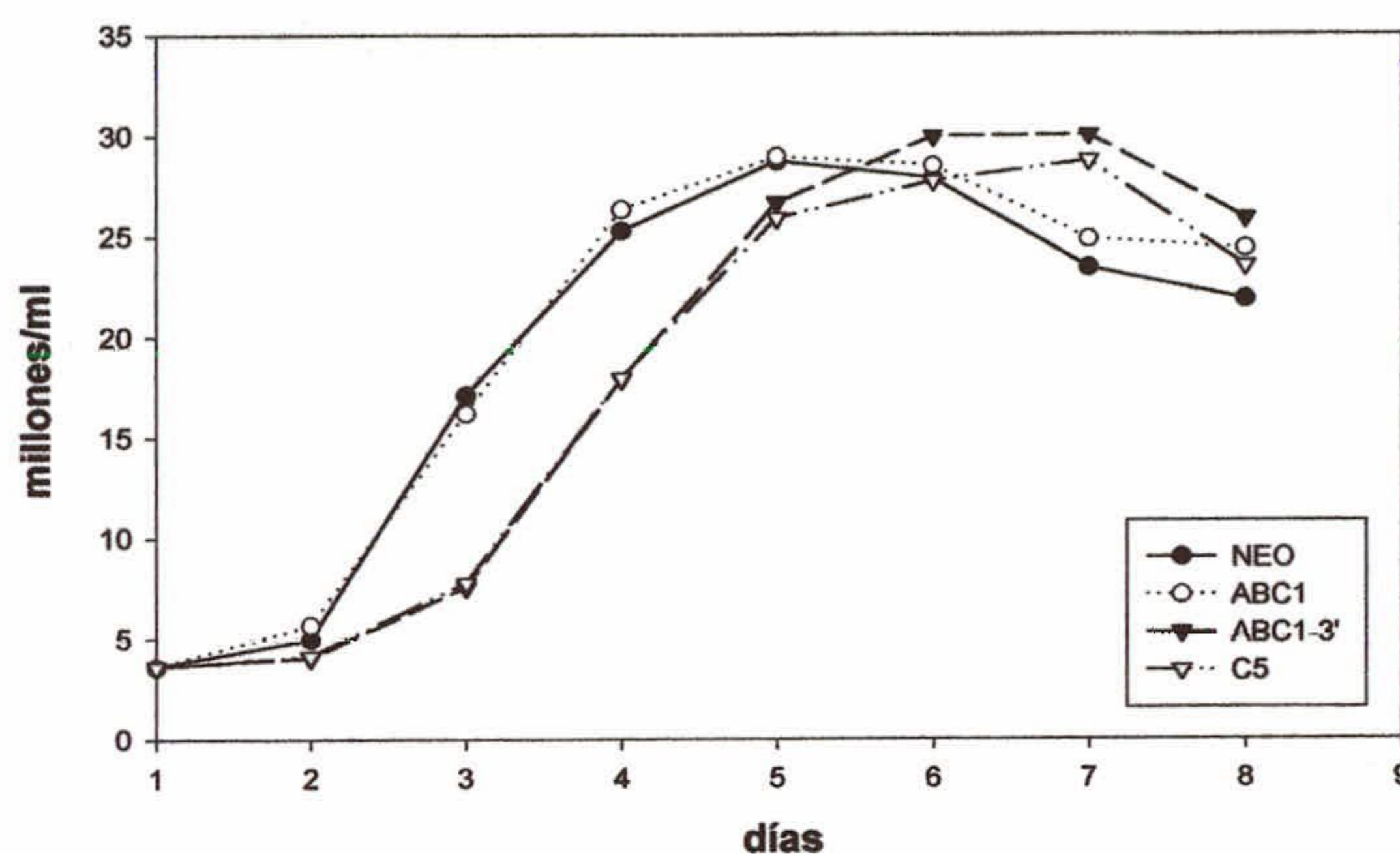


Figura D22. Curvas de crecimiento obtenidas de los parásitos transfectados con el gen *LtrABC1.1*. Se inocularon inicialmente 4×10^6 /ml y los parásitos del cultivo se contaron diariamente en contador de células Coulter. **NEO** corresponde a la línea transfectada con el plásmido control; **ABC1** corresponde a la línea transfectada con el plásmido LABC1N; **ABC1-3'** corresponde a la línea transfectada con el plásmido LABC1N-3'; **C5** es la línea que fue clonada a partir de los parásitos con el plásmido LABC1N-3'.

6.3. Estudios de resistencia a fármacos en las líneas transfectadas

Para conocer si la sobreexpresión de ABC1.1 en los parásitos transfectados podía conferirles resistencia frente a la acción de distintos compuestos, realizamos estudios de viabilidad celular. Tras un período de incubación de los parásitos 72 horas en presencia de los compuestos, se determinó la dosis inhibitoria 50 (DI₅₀), definida como la concentración del compuesto necesaria para inhibir en un 50% el crecimiento de los parásitos.

Los alquil-lisofosfolípidos: edelfosina y miltefosina, son análogos de fosfatidilcolina de cadena corta y constituyen agentes leishmanicidas que actualmente se encuentran en fase clínica de estudio (Soto y col., 2001). Ensayamos la viabilidad celular frente a estos compuestos utilizando tanto la línea transfectada con ABC1.1 como la línea control. No observamos diferencias de viabilidad entre ambas líneas,

siendo las DI_{50} para edelfosina 5,1 μM en el caso de L.inf NEO y 5,15 μM en el caso de L.inf ABC1.1, mientras que para miltefosina la DI_{50} fue de 8,8 μM y 9,0 μM respectivamente.

Por otra parte ensayamos compuestos que se ha demostrado son sustratos de proteínas ABC, como doxorubicina. La línea de *L. infantum* ABC1-3' presentó una DI_{50} de 8,05 μM para este compuesto mientras que la DI_{50} de *L. infantum* NEO fue de 9,85 μM .

Otro de los compuestos que analizamos fue la glibenclamida. Esta sulfonilurea se ha descrito como un inhibidor de varios transportadores ABC, entre los que se encuentra ABCA1 (Becq y col., 1997). En presencia de glibenclamida tampoco encontramos diferencias de viabilidad entre los parásitos controles y los transfectados y no pudimos determinar la DI_{50} ya que a las mayores concentraciones ensayadas (200 μM) se observó cerca de un 100% de crecimiento en ambas líneas.

Finalmente realizamos ensayos de viabilidad frente a ácido retinoico y retinol. Ambos son sustratos de proteínas ABC (Sun y col., 1999). En el caso de ácido retinoico no determinamos la DI_{50} puesto que a la mayor concentración ensayada (100 μM), los parásitos crecieron más de un 50 %, mientras que en el caso de retinol la DI_{50} para *L. infantum* ABC1-3' fue de 64,2 μM y la de *L. infantum* NEO fue de 56,15 μM .

Finalmente fueron también ensayados en similares experimentos otros compuestos, como ketoconazol y anfotericina B. El sitio primario de acción de la anfotericina B son los esteroides de membrana, mientras que el ketoconazol es inhibidor de la ruta de síntesis de esteroides en *Leishmania* (Beach y col., 1988; Saha y col., 1986). No observamos diferencias de viabilidad en los parásitos transfectados y controles. Si bien se presentan las DI_{50} para estos compuestos, cabe señalar que sólo fueron ensayados en un experimento. Los resultados obtenidos con todos los compuestos ensayados se pueden observar en la tabla D1.

COMPUESTO	DI ₅₀	
	NEO	ABC1.1
Edelfosina	5,1 $\mu\text{M}\pm 0,2$	5,15 $\mu\text{M}\pm 0,2$
Miltefosina	7,15 $\mu\text{M}\pm 1,65$	7,5 $\mu\text{M}\pm 1,5$
Doxorubicina	9,85 $\mu\text{M}\pm 0,95$	8,05 $\mu\text{M}\pm 1,45$
Glibenclamida	>200 μM	>200 μM
Acido retinoico	>100 μM	>100 μM
Retinol	56,1 $\mu\text{M}\pm 0,85$	64,2 $\mu\text{M}\pm 1,6$
Ketoconazol	27,5 μM	28,1 μM
Anfotericina B	0,15 μM	0,16 μM

Tabla D1. Estudios de resistencia a fármacos en parásitos transfectados con ABC1.1. Los parásitos fueron incubados en presencia de distintas concentraciones de los compuestos según las condiciones descritas en la sección 1.7 de Métodos. La DI₅₀ fue determinada calculando la concentración de cada compuesto que inhibe en un 50% el crecimiento de los parásitos. Se presentan los valores medios obtenidos de dos experimentos realizados por duplicado con las desviaciones estándar obtenidas. En el caso de los compuestos ketoconazol y Anfotericina B, se presentan los datos obtenidos de un experimento por duplicado.

6.4. Eflujo de ³H-colesterol

La proteína ABCA1 se expresa en macrófagos de mamíferos donde se ha descrito que es capaz de transportar fosfolípidos y colesterol a aceptores lipoproteínas (apoA1). Quisimos conocer si en los parásitos que sobreexpresan ABC1.1 la actividad de eflujo de colesterol era mayor que en los parásitos controles tras un período de acumulación con colesterol marcado radiactivamente. Se llevó a cabo un protocolo adaptado a partir de métodos ya descritos (Fielding y col., 2000; Chambenoit y col., 2001). Para permitir el eflujo los parásitos se incubaron durante 12 horas en presencia de ApoA1. Tras este período de tiempo, las células fueron centrifugadas y se determinó en contador de centelleo tanto la radiactividad presente en el medio como en las células después de su lisis. El porcentaje de eflujo fue estimado hallando la relación entre la radiactividad encontrada en el sobrenadante y la radiactividad total (sobrenadante + sedimento). Como puede observarse en la figura D23A, ambas líneas de parásitos presentan un eflujo basal de 2-3% que se duplica en presencia de ApoA1, no encontrándose diferencias entre ellas.

Para conocer si existen otros aceptores de colesterol en el suero capaces de unir y permitir su eflujo desde los parásitos, realizamos el mismo experimento de eflujo de colesterol incubando las células en presencia de 1% y 20% SBF. La figura D23B muestra los resultados obtenidos tanto con la línea transfectada *L. infantum* ABC1-3' clonada (C5) como con la línea *L. infantum* NEO. El eflujo en presencia de 1% SBF

osciló entre el 8 y el 10%, mientras que en presencia de 20 % SBF, el eflujo fue estimulado hasta un 17-19% para la línea control y un 22-23% para la línea transfectada con ABC1.1. El análisis estadístico muestra que no existen diferencias significativas en los porcentajes de eflujo obtenidos a partir de ambas líneas ($p > 0,05$). Sin embargo, cabe resaltar que en los tres experimentos realizados el porcentaje de eflujo de ^3H -colesterol de la línea transfectada con ABC1.1 fue mayor que el de la línea control.

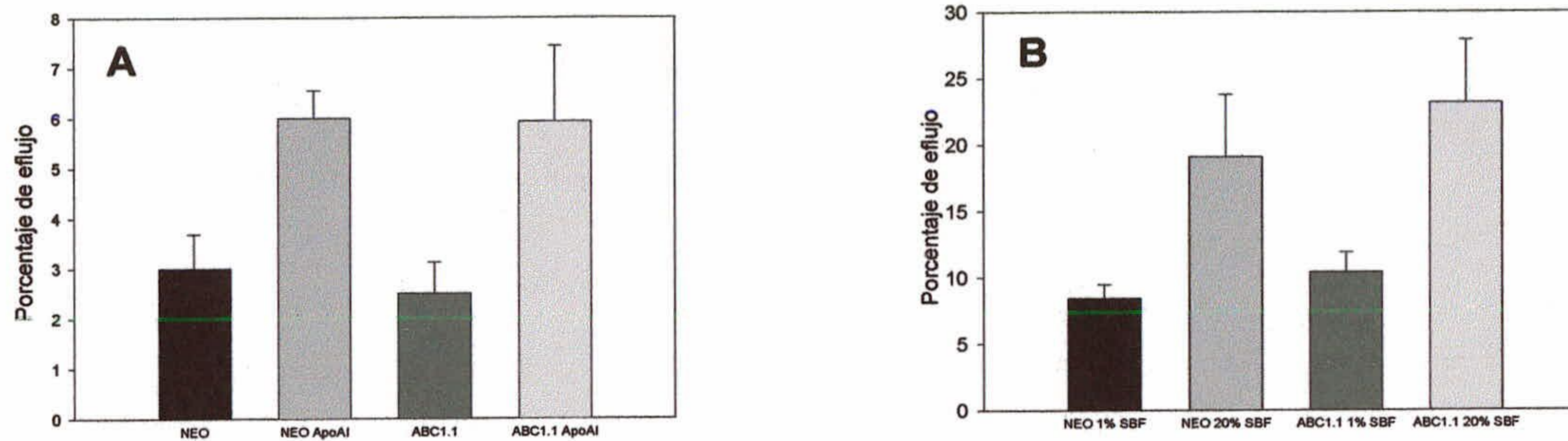


Figura D23. Eflujo de ^3H -colesterol de los parásitos transfectados. Los parásitos fueron incubados en presencia de ^3H -colesterol y tras el cargado se permitió el eflujo al medio. **A.** Eflujo en ausencia o en presencia de 10 µg/ml de apoAI; **B.** Eflujo en presencia de 1% o 20% SBF. El porcentaje de eflujo de colesterol se determinó como la relación existente entre la radiactividad del medio y la radiactividad total (medio + células). Los resultados presentados corresponden a medias de un total de tres experimentos.

6.5. Acumulación de análogos de fosfolípidos fluorescentes

Para investigar una posible función de la proteína ABC1.1 en el transporte de fosfolípidos quisimos determinar si parásitos que sobreexpresan la proteína presentan menor acumulación de fosfolípidos, tras su incubación con análogos fluorescentes. Empleamos análogos de cadena corta fluorescentes de fosfatidilcolina (C_6 -NBD-PC), fosfatidiletanolamina (C_6 -NBD-PE) y fosfatidilserina (C_6 -NBD-PS) en experimentos de acumulación *in vivo* bajo distintas condiciones. Los parásitos fueron previamente incubados en presencia de PMSF 500 µM, el cual se ha descrito que previene la degradación de los análogos fluorescentes. Tras un período de acumulación del análogo fluorescente de 30 min. a 28°C en un tampón que contiene glucosa y en presencia de PMSF 500 µM, los parásitos fueron mantenidos en hielo, lavados 2 veces con PBS y tratados con ditionito 20 mM por 30 segundos. Este tratamiento permite eliminar la fluorescencia que se encuentra en el exterior celular asociada a la cara externa de la membrana. La fluorescencia celular fue analizada y cuantificada mediante citometría de flujo. Cuando empleamos en estos estudios C_6 -NBD-PC y C_6 -NBD-PE observamos que los parásitos transfectados con ABC1.1 acumularon

ligeramente menos fluorescencia (1,2 veces) al compararlos con los parásitos controles (figura D24). Cuando empleamos C₆-NBD-PS, las diferencias de acumulación entre parásitos controles y transfectados fueron aún mayores (2,5 veces) (figura D24).

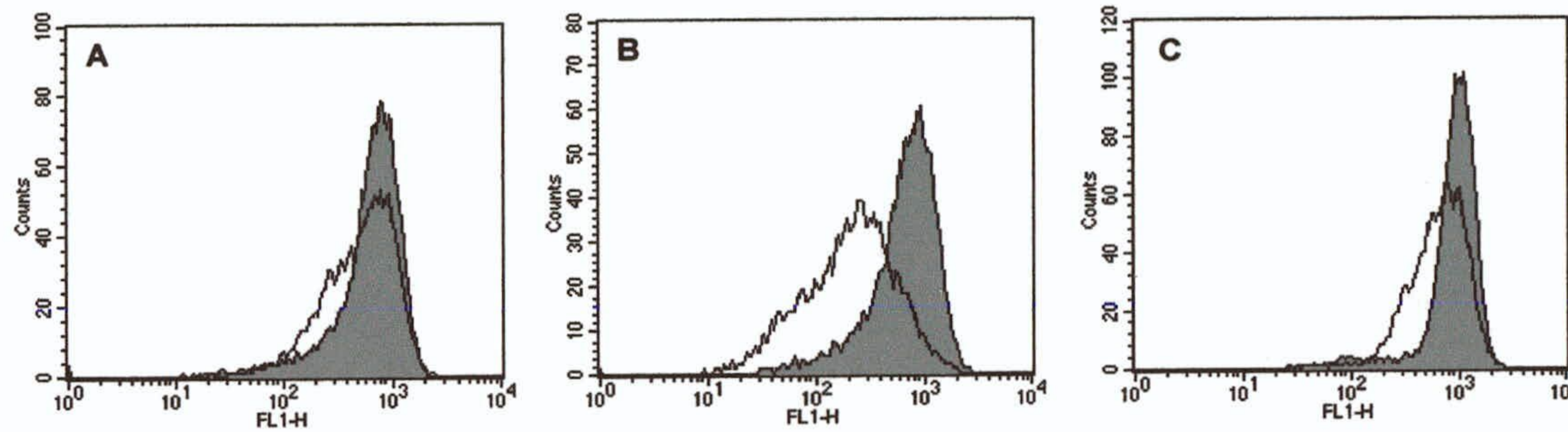


Figura D24. Acumulación de NBD-fosfolípidos. Tras un período de acumulación con los análogos NBD de fosfolípidos, la fluorescencia fue analizada mediante citometría de flujo en un FACScan (Becton Dickinson). En gris está representada la acumulación en los parásitos transfectados con el plásmido control; sin color se representa la acumulación en los parásitos transfectados con LABC1N-3' (el clon 5). A. C₆-NBD-PC; B. C₆-NBD-PS; C. C₆-NBD-PE. Para cada análogo se presenta un histograma representativo de dos experimentos.

Realizamos entonces el mismo experimento de acumulación de C₆-NBD-PS bajo distintas condiciones: 1) en un tampón HPMI conteniendo glucosa, a 28°C; 2) en el mismo tampón, en hielo; 3) en un tampón HPMI sin glucosa y conteniendo azida sódica, a 28°C. Finalizado el período de incubación, todas las muestras fueron colocadas en hielo y su fluorescencia celular fue medida inmediatamente después del tratamiento con ditionito. La figura D25 muestra los histogramas obtenidos de este experimento. Puede observarse que a 28°C y en presencia de glucosa, condiciones que permiten que el transportador sea funcional, los parásitos transfectados presentan una menor acumulación de C₆-NBD-PS (2,3 veces menos) al compararlos con parásitos controles. Al incubar los parásitos en hielo, condición en la cual se inhibe la actividad de las proteínas, la acumulación de C₆-NBD-PS es similar en las dos líneas de parásitos. También realizando la incubación en un tampón con azida sódica, condición que produce depleción del ATP celular y por tanto afecta el funcionamiento de proteínas dependientes de energía, no se observan diferencias de acumulación entre parásitos transfectados y controles. Estos resultados sugieren que la actividad de la proteína ABC1.1, es la responsable de las diferencias de acumulación de fosfolípidos observadas.

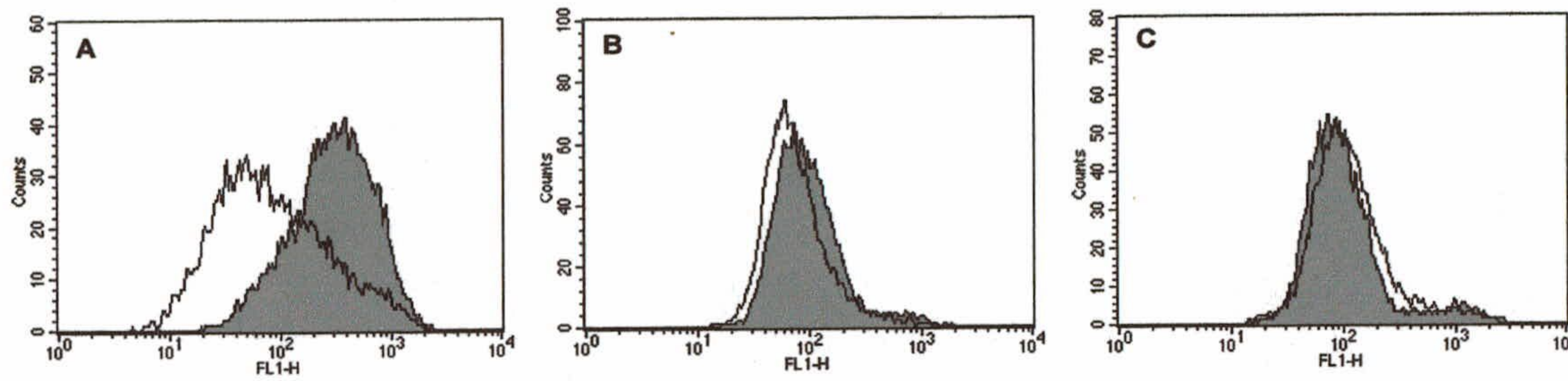


Figura D25. Acumulación de C₆-NBD-PS en los parásitos transfectados. La acumulación se realizó bajo distintas condiciones: en tampón conteniendo glucosa a 28°C (izquierda); en tampón conteniendo glucosa en hielo (centro); en tampón conteniendo azida sódica a 28°C (derecha). La fluorescencia celular fue analizada mediante citometría de flujo. Se presenta los histogramas obtenidos de un experimento representativo de tres experimentos. En gris está representada la acumulación en los parásitos transfectados con el plásmido control; sin color se representa la acumulación en los parásitos transfectados con LABC1N-3' (clon 5).

DISCUSSION

E. DISCUSION

1. LA LEISHMANIASIS: UN PROBLEMA MUNDIAL

Las enfermedades causadas por parásitos protozoarios, entre los que se encuentra *Leishmania*, continúan siendo un problema mundial, ya que afectan a una significativa parte de la población. Entre las enfermedades parasitarias, la leishmaniasis es la segunda causa de muerte, después de la malaria (Hirst y Stapley, 2000). Debido a la ausencia de vacunas efectivas, actualmente se emplea la quimioterapia para combatir estas enfermedades. Sin embargo, en muchos casos los fármacos utilizados no son muy eficientes debido a su toxicidad y además, cada vez con más frecuencia aparecen casos de resistencias (Farault-Gambarelli y col., 1997; Lira y col., 1999). Se ha demostrado *in vitro* que transportadores pertenecientes a la familia ABC están implicados en fenómenos de resistencia a fármacos empleados en la quimioterapia contra la leishmaniasis (revisado por Ouellette y col., 1998; Pérez-Victoria y col., 2001a). Todo ello refuerza la investigación sobre estas proteínas y la búsqueda de compuestos que inhiban su función.

2. TRANSPORTADORES ABC EN LEISHMANIA

Hasta el momento en *Leishmania* se han caracterizado transportadores relacionados con las subfamilias ABCB y ABCC (revisado por Pérez-Victoria y col., 2001b). En la primera se encuentran proteínas que presentan una alta homología con la glicoproteína-P de mamíferos (Pgp), como son los productos de los genes *ldmdr1* de *L. donovani* (Henderson y col., 1992), *lemdr1* de *L. enrietti* (Chow y col., 1993), *lamdr1* de *L. amazonensis* (Gueiros-Filho y col., 1995) y *ltrmdr1* de *L. tropica* (Chiquero y col., 1998). Las proteínas codificadas por estos genes confieren un fenotipo MDR similar al observado en células tumorales de mamíferos. Otros transportadores ABC de *Leishmania*, también implicados en la resistencia a fármacos, están relacionados con la subfamilia ABCC. Este grupo está constituido por 5 genes presentes en dos *loci* en el genoma de *Leishmania*. Su miembro mejor caracterizado, es el que codifica para la PgpA, una proteína estrechamente relacionada con MRP1 de mamíferos y que confiere resistencia a arsenito y antimoniales. La proteína parece reconocer estos compuestos conjugados a tripanotión y los secuestra en el interior de una vacuola (Ouellette y col., 1998).

El proyecto genoma de *Leishmania*, actualmente en marcha, ha mostrado que existen en el genoma del parásito secuencias que codifican para proteínas ABC aún no caracterizadas. Cabe resaltar que la familia ABC se encuentra conservada y bien representada a lo largo de la evolución. Así pues, existen 79 transportadores ABC en bacterias como *E. coli*, 55 en *Drosophila*, 30 en levaduras, y 49 en humanos. Además, miembros de esta familia cumplen, en muchos casos, funciones que son esenciales para la supervivencia de los organismos. Cabe esperar entonces que se identifiquen nuevas proteínas ABC en *Leishmania*, las cuales podrían tener funciones importantes en la biología del parásito así como tener participación en casos de resistencias.

En el presente estudio se describe una nueva subfamilia de transportadores ABC en *Leishmania* y se caracteriza molecular y funcionalmente el primer gen de *Leishmania* relacionado con la subfamilia ABCA de mamíferos. Estas proteínas están siendo intensamente investigadas en humanos debido a que se les ha relacionado con procesos biológicos de gran importancia. Así, la proteína ABCA1 parece estar implicada en procesos relacionados con movimientos de lípidos a través de las membranas, funciones que tienen consecuencias en otros procesos celulares, como pueden ser la apoptosis, el tráfico vesicular, la endocitosis y exocitosis, la transducción de señales, etc (revisado por Schmitz y Langmann, 2001; Santamarina-Fojo y col., 2001).

3. CARACTERIZACION MOLECULAR DE LA SUBFAMILIA ABCA Y DEL GEN *LTRABC1.1*

Las distintas subfamilias de transportadores ABC se distinguen porque presentan entre ellas una mayor homología de secuencia en las regiones conservadas de la familia, como son los NBD. Esta característica puede ser aprovechada para identificar genes que codifican proteínas de una determinada subfamilia. En particular, la búsqueda de secuencias relacionadas con la subfamilia ABCA de transportadores en el genoma de *L. tropica* nos condujo a la identificación del gen que denominamos *LtrABC1.1*. Estudios llevados a cabo mediante Southern blot han mostrado que la subfamilia ABCA está representada por varios miembros en las distintas especies de *Leishmania* analizadas. La existencia de un grado considerable de polimorfismo entre las diferentes especies de *Leishmania* no nos permite, a partir de estos estudios, afirmar con certeza el número exacto de genes. De hecho, se observó un patrón de hibridación diferente en cada especie (ver figura D9), que refleja el grado de diversidad del género. Cabe señalar que en el laboratorio se han identificado otros dos genes

pertenecientes a esta subfamilia, que están siendo estudiados molecular y funcionalmente. Además el proyecto de secuenciación del genoma de *Leishmania* ha mostrado hasta ahora la existencia de varios genes ABCA, lo que está de acuerdo con nuestros resultados. Todos estos datos nos llevan a proponer que existen en *Leishmania*, al menos 4 genes pertenecientes a la subfamilia ABCA.

Los experimentos de localización cromosómica utilizando una sonda correspondiente al NBD2 del gen *LtrABC1.1*, demuestran que esta subfamilia se localiza en dos bandas cromosómicas, de 1,2 Mb y 0,8 Mb. Por otra parte, el empleo de una sonda específica demostró que el gen *LtrABC1.1* se encuentra en la banda de 1.2 Mb.

Las familias génicas en *Leishmania* pueden estar agrupadas, ya sea en un mismo cromosoma o en varios cromosomas, como es el caso de los genes relacionados con la PGPA. Los 5 genes de esta subfamilia están agrupados en dos cromosomas (Legare y col., 1994). También los genes que hemos caracterizado en este estudio, relacionados con la subfamilia ABCA, parecen agruparse en dos cromosomas.

Durante la caracterización del fago recombinante aislado de la librería genómica de *L. tropica*, identificamos una secuencia codificante ubicada corriente arriba del gen *LtrABC1.1*. El alineamiento de dicha secuencia con el gen *LtrABC1.1* mostró que corresponde al extremo 3' de un gen que parece constituir una duplicación. El marco abierto de lectura de esta duplicación carece de los seis tripletes finales al compararlo con la secuencia codificante de *LtrABC1.1*. Además presenta cinco cambios puntuales en la secuencia nucleotídica, uno que es conservativo y cuatro que dan origen a tres cambios de aminoácidos en la secuencia deducida de la proteína (ver figura D2). En el marco de la secuenciación del genoma de *Leishmania major*, uno de los clones recientemente secuenciados contiene el marco abierto de lectura completo de esta duplicación. El alineamiento de esta secuencia con la de ABC1.1 a nivel aminoacídico mostró que entre ellas existe un 86,6 % de identidad. Puesto que estamos comparando las secuencias de dos especies de *Leishmania* (*L. major* y *L. tropica*) es posible que el porcentaje de identidad entre estos dos genes sea aún mayor dentro de cada especie. Ambas secuencias son prácticamente idénticas en sus dos TMD y sus dos NBD y difieren significativamente en el extremo amino-terminal. Los estudios de Southern blot, utilizando una sonda específica que reconoce al gen

LtrABC1.1, revelaron que no existe más que una duplicación de este gen, que corresponde a la secuencia encontrada corriente arriba sobre el mismo cromosoma.

La duplicación génica es un fenómeno muy común en parásitos como *Leishmania* donde existen muchos ejemplos de familias de genes en múltiples copias. En algunos casos se trata de genes idénticos, ordenados en tándem en un cromosoma. Ejemplos de esta organización son los genes que codifican para los antígenos de superficie PSA-2 (Jiménez-Ruiz y col. 1998). En muchos organismos, la repetición en tándem extensa de un gen puede reflejar la necesidad de grandes cantidades de su producto, como en el caso de los genes que codifican para ARN ribosómico o histonas. Sin embargo, la existencia de genes idénticos o muy relacionados, no necesariamente significa que tengan funciones intercambiables; pueden tanto expresarse en distintos momentos de un ciclo de vida o en distintos lugares, como expresarse a muy diferentes niveles. Los genes que codifican para las proteínas de choque térmico de *Leishmania*, se presentan como múltiples copias localizadas en un único locus y organizadas en "clusters" génicos en tándem (Bock y Langer, 1993). Los seis genes *HSP70* de *L. infantum* muestran una alta conservación de secuencia a nivel de sus UTR 5' y regiones codificantes, mientras que a nivel de sus UTR 3', el sexto gen difiere con respecto a los cinco restantes (Quijada y col., 1997). Durante el choque térmico la abundancia de los ARNm de estos cinco genes aumenta, mientras que la del sexto gen permanece sin cambiar. Se ha visto que esta regulación diferencial entre los genes *HSP70* es debida a un elemento presente en los UTR 3' de estos cinco genes, que actúa como un regulador positivo durante el choque térmico (Quijada y col., 2000). Cabe señalar, que las secuencias 3' no codificantes de los dos genes ABCA que hemos identificado, son diferentes. Esta característica puede estar reflejando diferencias en la expresión de ambos genes. Los genes que codifican a los transportadores de glucosa en *L. mexicana*, están ordenados en tándem y sus secuencias codificantes presentan una considerable identidad (Burchmore y Landfear, 1998). Prácticamente difieren en el extremo amino-terminal y en los últimos aminoácidos carboxilo-terminales. Interesantemente, la comparación de las UTR 5' de cada gen, mostró que *LmGT2* y *LmGT3* son idénticas, mientras que la de *LmGT1* no. Por otra parte las UTR 3' de los tres genes son divergentes. Al analizar la expresión de sus ARNm, se observó que presentan una regulación diferencial en el ciclo de vida: los niveles de *LmGT3* aumentan unas 15 veces en promastigotes comparados con amastigotes (Burchmore y Landfear, 1998). En *L. enriettii*, existen dos isoformas de esta permeasa que presentan dos localizaciones distintas en el parásito. ISO1 principalmente se encuentra en la membrana flagelar, mientras que

ISO2 se ubica en la membrana plasmática que rodea el cuerpo celular (Piper y col., 1995). Estas dos isoformas fundamentalmente difieren en sus extremos amino-terminales y por mutagénesis de esta región se ha determinado un motivo de secuencia que determina la localización flagelar (Snapp y Landfear, 1999).

Los genes ABC1, aunque relacionados en secuencia, no son idénticos. Las diferencias se encuentran, como ya hemos señalado, tanto en el extremo 5' de la secuencia codificante como en el extremo 3' de dicha secuencia, manteniéndose prácticamente idéntica la región entre ambos extremos. Así pues, será interesante realizar un estudio comparativo de las secuencias de los genes *LtrABC1.1* y *LtrABC1.2*. Las diferencias en sus secuencias codificantes podrían reflejar tanto diferencias en la actividad o especificidad de estos dos transportadores, como diferencias en sus localizaciones subcelulares.

4. IDENTIFICACION DE UNA SECUENCIA REPETIDA INVERTIDA

Hemos observado la presencia de una secuencia en la región 5' no codificante que se encuentra repetida e invertida en la región 3' no codificante del gen. Esta secuencia de al menos 219 pb, se encuentra 100% conservada a ambos lados del gen, lo que puede sugerir que es de reciente generación. No conocemos la extensión exacta de la repetición puesto que la secuencia que se encuentra en la región 3' no codificante se halla truncada por uno de los brazos del fago en el clon lambda que hemos caracterizado.

Del total de secuencias que constituyen el genoma de *Leishmania* un 12% corresponden a secuencias altamente repetidas, mientras que un 13% son medianamente repetidas. La repetición que encontramos asociada a *LtrABC1.1* podría constituir una familia de secuencias repetidas dispersas por el genoma de *Leishmania*, por lo que decidimos caracterizarla molecularmente. De acuerdo al patrón de bandas obtenido en estudios de Southern blot, utilizando como sonda la secuencia correspondiente a la repetición, pensamos que se trata de una secuencia escasamente representada en el genoma del parásito. La búsqueda de homologías de este repetido con las secuencias del banco de datos del genoma de *Leishmania*, no arroja homologías significativas con ninguna de ellas, lo que está de acuerdo con nuestros resultados. Será interesante conocer si este repetido presenta otras localizaciones y si se encuentra asociado a secuencias codificantes de genes ABCA,

lo que podría evidenciar un origen común y posiblemente una función en la expansión de esta subfamilia.

Resulta tentador especular acerca de posibles funciones de esta secuencia repetida que flanquea el gen *LtrABC1.1*, tomando en cuenta la gran plasticidad que presenta *Leishmania* para reordenar secuencias de ADN y el papel que cumplen las secuencias repetidas en estos procesos, tanto en parásitos como en otros organismos.

En particular, las secuencias repetidas invertidas con varios niveles de homología son comunes en el ADN de muchos organismos y pueden constituir una fuente importante de inestabilidad genética en estos genomas. En procariontes, se ha demostrado que los repetidos invertidos se asocian con la escisión de regiones asociadas a estos repetidos (Collins y col., 1982; Gordenin y col., 1993). Repetidos invertidos largos que forman palíndromes perfectos son extraordinariamente inestables en *E. coli* y se delecionan con mucha frecuencia. En levaduras, se ha demostrado que los repetidos invertidos inducen deleción y recombinación (Gordenin y col., 1992;1993; Lobachev y col., 1998).

Existen sitios preferentes para la ocurrencia de recombinación genética. Por ejemplo, el locus MAT de *S. cerevisiae* (revisado por Haber, 1998) constituye un sitio caliente de recombinación, debido a interacciones específicas entre secuencias en el ADN y proteínas especializadas. Pero también se ha visto que ciertas estructuras en el ADN pueden tener una influencia significativa sobre el intercambio genético. Por ejemplo, estructuras en horquilla, debido a que son estructuras propensas a la rotura de doble hebra, y se ha propuesto que estos cortes estimulan la recombinación homóloga en levaduras (Osman y Subramani, 1998). Las secuencias repetidas invertidas tienen la capacidad potencial de formar estructuras en horquilla, por lo que pueden estar relacionadas con cortes de doble hebra, constituyendo así sustratos preferenciales para la recombinación.

Por otra parte, secuencias repetidas en *Leishmania* están vinculadas a procesos de amplificación de secuencias. La amplificación génica es una respuesta común en *Leishmania* cuando se enfrenta a condiciones que atentan contra su supervivencia, por ejemplo, el tratamiento con fármacos. La amplificación génica origina cepas resistentes a estos tratamientos debido a la amplificación de genes cuyos productos son capaces de interferir con la acción del fármaco. Pero la amplificación génica también ocurre en cepas salvajes no sometidas a ningún tipo de

stress. Frecuentemente se observa que en distintas líneas se amplifican las mismas regiones del ADN que generan estructuras similares, como es el caso de la región R que contiene el gen de la dihidrofolato reductasa-timidilato sintasa (*dhfr-ts*). Se ha observado que seis de nueve amplificaciones independientes de esta región utilizan el mismo sitio. El gen *dhfr-ts* está flanqueado por dos elementos de 600 pb separados por 30 Kb y los círculos amplificados se generan preferencialmente por unión de estos dos elementos (Beverley, 1991).

La región H es otra región que se amplifica en respuesta al tratamiento con metotrexato y otros fármacos, como el arsenito (Ouellette y col., 1991). Este locus del genoma de *Leishmania* tiene una extensión de 40 Kb y el círculo H generado contiene duplicaciones invertidas de 30 Kb separadas por dos segmentos únicos de 5 y 6 Kb. Para explicar la generación de estos círculos, White y col. (1988) propusieron que cada segmento único estaba flanqueado en el genoma por secuencias repetidas invertidas. Dichas secuencias eran capaces de hibridar durante un bloqueo de la replicación y el desplazamiento de la cadena recién sintetizada, serviría como cebador para sintetizar otra copia de la duplicación invertida. Tras la ligación de la cadena simple sintetizada, se generaría un círculo que se convertiría en doble cadena tras una nueva replicación (figura E1). La caracterización del locus H, mostró que efectivamente contiene dos pares de secuencias repetidas invertidas de 198 y 1.241 pares de bases ubicadas en ambos extremos del locus (Ouellette y Borst, 1991; Ouellette y col., 1991).

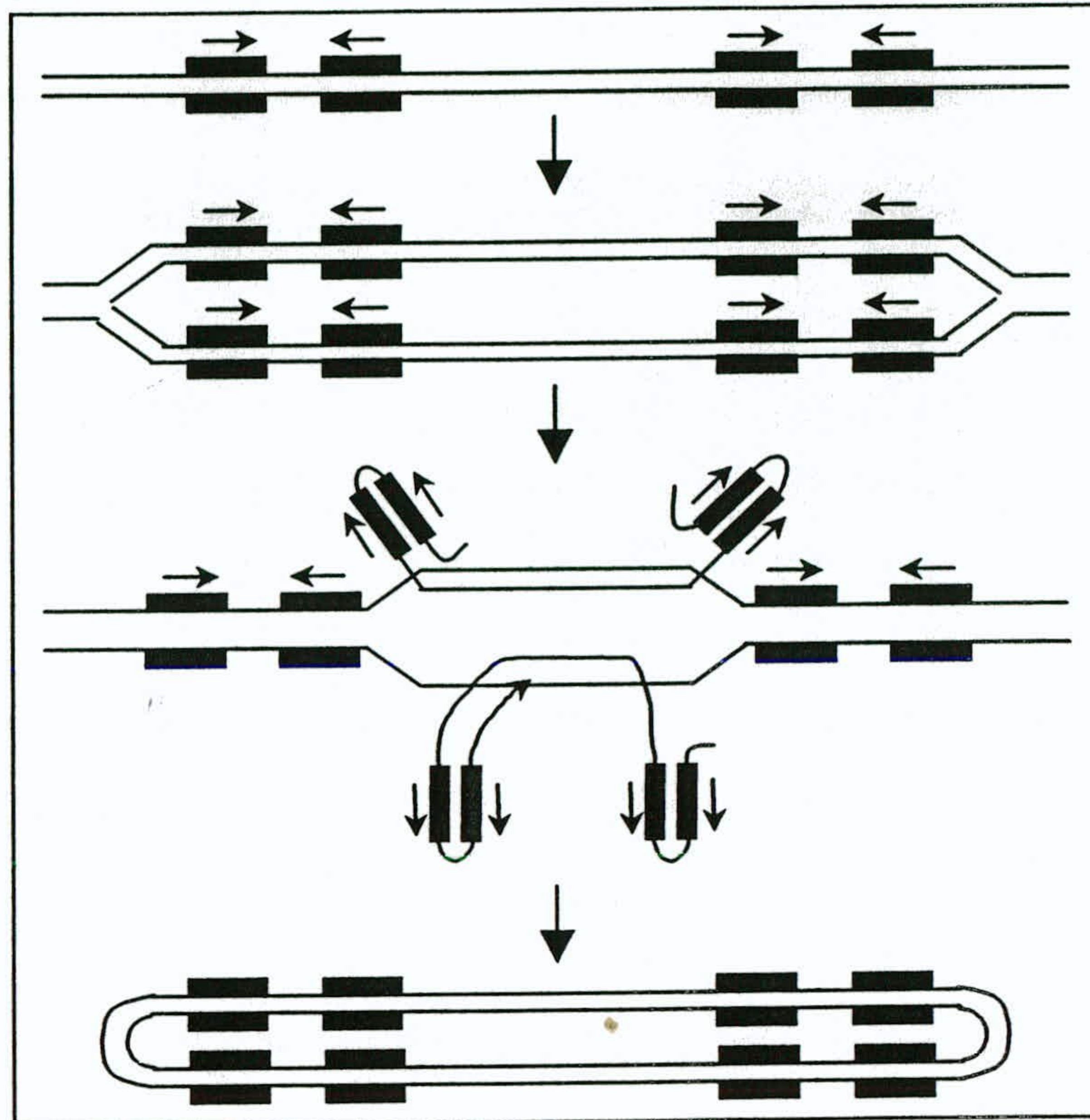


Figura E1. Modelo propuesto para la formación del círculo H. El círculo H se generaría a partir de la región H cromosómica (esquemática en la parte de arriba de la figura). Las barras de color negro con flechas representan las secuencias repetidas invertidas encontradas en dicho locus. Más abajo se representa la horquilla de replicación formada por replicación bidireccional. El modelo propone que un bloqueo en la replicación, produce el desplazamiento de la hebra recién sintetizada, lo que permitiría el apareamiento de las secuencias invertidas. Estas servirían como molde para la síntesis de otra copia de la duplicación invertida. El círculo H se genera tras ligación y síntesis de la hebra complementaria (extraído de White y col., 1988).

En definitiva, la inestabilidad es parte del programa genético que permite la diversidad y la evolución de secuencias. En el caso de *Leishmania*, el reordenamiento de secuencias parece ser un instrumento que le permite generar esta diversidad y evolucionar hacia genomas más adaptados. Estos mecanismos resultan de importancia en parásitos como *Leishmania* debido a que carece de recombinación genética la cual tiene lugar durante la meiosis de los organismos que se reproducen sexualmente. En el caso del gen *LtrABC1.1*, la presencia de secuencias repetidas invertidas a ambos lados sugiere que éstas pueden, bajo determinadas circunstancias, ser empleadas para reordenamientos genómicos que puedan originar amplificaciones extracromosomales conteniendo dicho gen. Tal vez cuando se conozca la función precisa que cumple esta proteína en *Leishmania*, se podrá chequear si en condiciones de crecimiento que requieran mayores niveles de expresión de esta proteína, se generan amplificaciones, y si las secuencias repetidas identificadas en este estudio, tienen un papel en esos eventos.

5. CARACTERIZACION DE LAS SECUENCIAS 5' Y 3' NO CODIFICANTES DEL GEN *LTRABC1.1*

Además de la presencia de una secuencia repetida invertida, la caracterización de las secuencias 5' y 3' no codificantes del gen *LtrABC1.1* nos ha permitido además poner en evidencia otras características. Puesto que no existen elementos promotores evidentes en las regiones 5' de los genes de *Leishmania*, las únicas secuencias conservadas que se han descrito consisten en regiones ricas en polipirimidinas que se ha demostrado determinan la elección del sitio aceptor del miniexón (Matthews y col., 1994). Generalmente esta región polipirimidínica se encuentra a una distancia que parece variable corriente arriba del dinucleótido AG elegido para aceptar la secuencia del miniexón. La importancia de esta secuencia se ha puesto en evidencia en varios estudios. Por ejemplo, se ha visto que la expresión de genes reporteros en *Leishmania* depende de la presencia de regiones ricas en polipirimidinas y de un dinucleótido AG. Por lo general, el sitio aceptor de "trans-splicing" es el primer AG que se encuentra corriente abajo de la región polipirimidínica. Sin embargo existen varias excepciones a esta regla y hay ejemplos donde se elige el segundo o el tercer AG. Mediante RT-PCR, hemos ubicado dos sitios AG que son utilizados para la adición del miniexón durante el procesamiento del transcrito de *LtrABC1.1*. Dichos sitios están ubicados corriente abajo de regiones ricas en polipirimidinas. La existencia de más de un sitio aceptor del "trans-splicing" en transcritos de *Leishmania* también ha sido reportada en algunos casos y demuestra que dicho procesamiento no presenta requerimientos estrictos de secuencia y/o posición.

Un factor importante en la selección del triplete AUG para la iniciación de la traducción es la composición de bases de los nucleótidos que inmediatamente flanquean dicho triplete (Kozak, 1991). En vertebrados, la traducción se inicia más eficientemente en AUGs que están dentro de una secuencia consenso 5'-CC(A/G)CCAUGG (Kozak, 1987). En protozoarios, la secuencia consenso correspondiente ha sido descrita como 5'-AAAAUG(A/G) (Canever y Ray, 1991; Yamauchi, 1991). En el caso del mensajero de *ABC1.1* no encontramos que el contexto de secuencia que rodea el codón de iniciación se ajuste a la secuencia consenso descrita (ver figura D12). Lo mismo ha sido mostrado para otros ARN de tripanosomátidos (Teixeira y col., 1999). Debido al número creciente de secuencias codificantes conocidas en parásitos como *Leishmania* durante estos últimos 10 años, es posible que el establecimiento de una secuencia consenso de iniciación de la traducción, requiera de una re-evaluación. Así fue planteado por ejemplo en el caso de

Toxoplasma gondii, donde más recientemente se redefinió dicha secuencia (Seeber, 1997).

Se conoce que la reacción de "trans-splicing" está acoplada al proceso de poliadenilación en tripanosomátidos (LeBowitz y col., 1993). De hecho, a diferencia de lo que ocurre en eucariotas superiores, el sitio de poliadenilación no está determinado por una secuencia consenso sino por la reacción de "trans-splicing" que ocurre en el gen ubicado inmediatamente corriente arriba. Se han observado en la proximidad de los sitios de poliadenilación potenciales estructuras en horquilla-bucle, sin embargo no se conoce si pueden tener alguna función. Además la selección del sitio de poliadenilación suele ser imprecisa y por lo tanto ocurrir en varios sitios de un mismo transcrito. Mediante RT-PCR hemos identificado dos sitios de adición de la cola poli A en el transcrito de *LtrABC1.1*. Ambos se encuentran a 247 y 249 nucleótidos de distancia con respecto al codón de terminación de la secuencia del gen. Se ha descrito para *Leishmania* que la poliadenilación tiene una fuerte preferencia por sitios que terminan en el residuo adenina, ubicados en regiones conteniendo CAn, GAn o TAn (Stiles, 1999). La poli A polimerasa de eucariotas superiores también prefiere un residuo adenina inicial para unir la cola poli A, principalmente en un dinucleótido CA (Wahle y Keller, 1992). En el mensajero de *ABCA1* de *L. tropica*, ambos sitios caracterizados corresponden a CA y GA.

La caracterización de los sitios de procesamiento de los extremos 5' y 3' del transcrito de *LtrABCA1* nos ha permitido conocer las regiones no traducidas (UTR) de este ARNm. La UTR 5' tiene una extensión de 304-324 nucleótidos sin incluir el miniexón, mientras que la UTR 3' es de 246-249 nucleótidos, sin incluir la región poli A. Por lo tanto, el ARNm resultante debe tener una extensión aproximada de 6.200 nucleótidos. El largo de las UTR refleja sin duda la organización genómica de *Leishmania* y el espaciamiento que existe entre los genes. Pero también en muchos casos refleja la existencia de procesos de regulación génica. En los últimos años se han publicado varios trabajos que demuestran que las UTRs de los genes de tripanosomátidos contienen elementos necesarios para la correcta expresión y para el control de la expresión génica, particularmente en los distintos estadios de desarrollo. Los genes de amastina y tuzina de *T. cruzi* están organizados de a pares alternantes y son transcritos a nivel similar en amastigotes y epimastigotes (Texeira y col., 1994). Sin embargo, el ARNm de amastina en amastigotes es 68 veces más abundante que en epimastigotes, mientras que el ARNm de tuzina se expresa a un nivel igualmente bajo en las dos etapas del ciclo de vida. Coughlin y col. (2000) demostraron que la

mayor abundancia del ARNm de amastina en amastigotes se debe en parte a una mayor estabilidad de su ARNm y propusieron que la región central de su UTR 3' es responsable de esta mayor estabilidad, posiblemente a través de la unión de un factor proteico que actuaría no sólo en la estabilización del mensajero sino también facilitaría su procesamiento. Así, ambos eventos contribuyen a aumentar los niveles del ARNm de amastina. Además este efecto positivo fue dependiente de la distancia a la que se encuentre el elemento central del UTR 3' con respecto al codon de terminación y al sitio de poliadenilación, así como de su orientación (Coughlin y col., 2000), sugiriendo la existencia de requerimientos de posición y orientación que posibilitan la correcta unión de la proteína implicada.

También estructuras secundarias en las UTR 3' están involucradas en la regulación post-transcripcional como fue demostrado en el caso del ARNm de prociclina de *T. brucei*, donde esta estructura modula tanto la estabilidad del transcrito como la eficiencia de la traducción, en etapas específicas del desarrollo del parásito (Furger y col., 1997). Existen también en estas regiones elementos que determinan inestabilidad. Por ejemplo, se han descrito secuencias ricas en AU en las UTR 3' de los transcritos de genes de tipo mucinas de *T. cruzi* que funcionan desestabilizando los ARNm de un grupo de estos genes cuando el parásito se diferencia de epimastigote a tripomastigote (Di Noia y col., 2000). Estas secuencias ricas en AU, conocidas como elementos ARE dirigen la degradación de ARNm de mamíferos durante eventos celulares específicos como son la diferenciación, el crecimiento o la transformación celular (Chen y Shyu, 1995).

6. ANALISIS DE LA SECUENCIA Y DE LA TOPOLOGIA DE LA PROTEINA ABC1.1

La secuenciación del gen *LtrABCA1* nos permitió deducir la secuencia en aminoácidos de la proteína. Se trata de un transportador que contiene dos TMDs y dos NBDs. Cada TMD está constituido por 6 segmentos transmembrana, estando el primero y el séptimo lo suficientemente espaciados con respecto a resto de los segmentos, como para que existan entre ellos largos lazos exocitoplasmáticos. Hemos obtenido anticuerpos específicos contra la región del lazo ubicado entre los segmentos 7 y 8 del TMD2 de la proteína ABC1.1 de *Leishmania*. Puesto que se han propuesto modelos topológicos alternativos para las proteínas ABCA de mamíferos, los cuales difieren en la topología de los segmentos que constituyen los TMDs (ver figura A6), y particularmente en la región elegida por nosotros para obtener anticuerpos, será interesante determinar si esta región en la proteína de *Leishmania* se encuentra

expuesta hacia el exterior celular, o por el contrario no es accesible al reconocimiento por el anticuerpo, en parásitos que han sido fijados.

La N-glicosilación es una modificación post-traducciona que ha sido descrita para algunas proteínas ABC de mamíferos. Esta ocurre en el residuo asparagina dentro de una secuencia consenso (NX(S/T)). La N-glicosilación puede emplearse para localizar los dominios exocitoplasmáticos (extracelulares o lumenales) de proteínas de membranas. Este ha sido el caso para la proteína ABCR, donde la determinación, mediante estudios bioquímicos, de los sitios de glicosilación, ha permitido definir una estructura topológica para la proteína (Bungert y col., 2001). Se ha visto que estos sitios están ubicados en los dos lazos exocitoplasmáticos previstos a partir del modelo planteado por Illing y col. (1997) para esta proteína (ver figura A6), lo que apoya dicho modelo. En la proteína ABC1.1 de *Leishmania* hemos podido observar la existencia de varios sitios consenso para la N-glicosilación, de los cuales 3 se encuentran en el lazo ubicado entre el 1º y 2º segmento transmembrana del TMD1, y 3 se ubican entre el 1º y el 2º segmento del TMD2. A pesar de ser una modificación común en varios transportadores ABC de mamíferos, no se ha descrito la existencia de sitios de N-glicosilación en los lazos exocitoplasmáticos para las proteínas ABC tipo MRP y tipo MDR que se conocen en *Leishmania*. En el caso de ABC1.1, si los sitios identificados fueran realmente utilizados para la adición de cadenas de azúcar, dichas modificaciones post-traduccionales harían cambiar notoriamente la masa molecular de la proteína y por tanto su migración cuando se separa electroforéticamente. No hemos detectado diferencias significativas entre el tamaño teórico de la proteína y el tamaño revelado en los estudios de Western blot, por lo que pensamos que esta modificación no ocurre en la proteína de *Leishmania*. También notamos la presencia de varios residuos de cisteína en los lazos de ambos dominios (5 en el TMD1 y 2 en el TMD2) de la proteína ABCA1. Lo mismo fue observado en la proteína ABCR (Bungert y col., 2001), donde se ha sugerido que participan en la interacción de ambos lazos, a través de puentes disulfuro.

En la secuencia de la proteína ABC1.1 también se reconocen numerosos sitios de fosforilación tanto por proteína quinasa C como por caseína quinasa I y II. Se ha demostrado para algunas proteínas ABC que la fosforilación puede regular su actividad. En el caso de la Pgp, la región de unión entre las dos mitades de la proteína, o región "linker", es potencialmente fosforilable. Se ha estudiado el papel que juegan estas modificaciones post-traduccionales en la actividad de la Pgp, por ejemplo se ha visto que la fosforilación de dicha región "linker" puede regular su actividad ATPasa

(Szabo y col., 1997). Sin embargo otros estudios no han conducido a conclusiones claras. Se ha observado que mutantes de la Pgp que carecen de los residuos fosforilables son capaces de conferir el fenotipo MDR al igual que la proteína salvaje (Germann y col., 1996). En el caso de la proteína CFTR, se ha descrito un dominio regulatorio (dominio R) el cual es altamente fosforilable por proteína quinasa A (PKA) y juega un papel importante en la regulación de su actividad como canal de Cl⁻ (revisado por Schwiebert y col., 1999). Se ha demostrado además, que la proteína ABCA1 es fosforilada *in vitro* por PKA y que la activación de esta quinasa aumenta la actividad transportadora de aniones de ABCA1, lo que sugiere que esta proteína es fosforilada *in vivo* (Becq y col., 1997).

La proteína de *Leishmania* presenta la mayor homología de secuencia con las proteínas ABCA1 y ABCR humanas (33 y 34% de identidad respectivamente). El alineamiento de las regiones más conservadas de la proteína, como son los NBDs, con los correspondientes de las proteínas humanas muestra que, para el NBD1, la proteína ABC1.1 de *Leishmania* alcanza un 50% de identidad con ABCA1 humana y un 47% con ABCR humana, mientras que para el NBD2 estos valores fueron de 48% y 49%, respectivamente. Estos valores de identidad son significativos, tomando en cuenta que los NBD de miembros de esta subfamilia presentan menos de un 30% de identidad con los correspondientes de proteínas pertenecientes por ejemplo a la subfamilia ABCB.

7. EXPRESION DE *LtrABC1* Y LOCALIZACION DE LA PROTEINA

Los estudios sobre la expresión del gen *LtrABC1* mediante Northern blot en parásitos salvajes, no mostraron la presencia de transcritos. Además, experimentos de Western blot con proteínas provenientes de parásitos salvajes revelaron una banda prácticamente imperceptible. No obstante, los estudios de RT-PCR realizados para identificar los sitios de procesamiento en los extremos 5' y 3' indican que el gen *LtrABC1.1* se transcribe en el parásito. Dado que los niveles de ARNm de este gen están por debajo del límite de sensibilidad de la técnica empleada, en este caso, el Northern blot, pensamos que se trata de un gen de baja expresión. Estos bajos niveles de ARNm pueden deberse a una baja tasa de transcripción o a una alta inestabilidad del ARNm. Cabe resaltar que la expresión de otros genes que codifican para transportadores ABC en *Leishmania* tampoco se ha podido detectar por experimentos de Northern blot (Gamarro y col., 1994; Legare y col., 1994; Chiquero y col., 1998).

Durante nuestros estudios, realizamos dos construcciones plasmídicas para la transfección de parásitos. Estas contenían el gen *LtrABCA1* flanqueado por sus UTR 5' y 3' naturales. Seguimos esta estrategia por dos razones. Por un lado la presencia de las UTR 5' y 3' naturales del gen garantizarían su expresión desde su localización episomal. Se conocen casos donde la transfección con plásmidos, que contienen marcos abiertos de lectura carentes de sus secuencias no codificantes flanqueantes, no resulta en la expresión adecuada de estos genes. Por otro lado, al incluir estas secuencias no codificantes en las construcciones, también estarán presentes posibles elementos que jueguen papeles esenciales en la regulación génica. En nuestro caso, los dos plásmidos de expresión construidos contienen idénticas secuencias 5' no codificantes, de 2.171 nucleótidos de extensión. Ya que los sitios aceptores de "transplicing" se encuentran a aproximadamente 300 nucleótidos de distancia del codón de iniciación de la traducción, es previsible que durante la expresión del gen *LtrABCA1* se utilicen sus sitios de procesamiento naturales. Por otra parte, las dos construcciones presentaron diferencias en la extensión de sus secuencias 3' no codificantes. En el caso de la construcción que denominamos LABC1N, la UTR 3' tiene una extensión de 218 nucleótidos, mientras que en la construcción LABC1N-3' es de 1.360 nucleótidos. Al identificar los sitios de adición de la cola poli A en el transcrito de ABC1.1 hemos comprobado que, en el caso del plásmido LABC1N, dichos sitios no han sido incluidos en la construcción.

Los estudios de Northern blot, a partir de ARN proveniente de parásitos transfectados con los dos plásmidos de expresión, mostraron diferencias en los niveles de ARNm. Los parásitos que llevan el plásmido con la UTR 3' más extensa presentan niveles significativamente mayores de ARNm. En consecuencia, estos parásitos expresan mayores niveles de proteína ABC1. Estas diferencias de expresión observadas, tanto a nivel de ARN como de proteína, no son debidas a diferencias en el número de copias de los plásmidos presentes en las dos clases de parásitos transfectados. De Hecho, en los parásitos transfectados con LABC1N, el gen se encuentra amplificado mayor número de veces que en los parásitos que llevan LABC1N-3'. Debido a que ambos tipos de transfectantes difieren únicamente en la extensión de sus UTR 3', es posible que elementos localizados en esta región sean los responsables de esta regulación diferencial. De hecho, como ya hemos mencionado, la construcción LABC1N no incluye en su UTR 3' los sitios de poliadenilación naturales del gen *LtrABC1*. Esto puede llevar a que el procesamiento del ARNm de esta construcción ocurra con menor eficiencia con respecto a la construcción que sí incluyó los sitios de poliadenilación. También es posible que algún elemento presente en la

UTR 3' influya en su expresión, por ejemplo favoreciendo la estabilización de dicho ARNm. Ya hemos descrito que existen numerosos ejemplos de regulación post-transcripcional en genes de *Leishmania* cuyos elementos responsables se ubican en las UTR 3'. Será interesante, en posteriores estudios, caracterizar estos posibles elementos, ensayando los niveles de expresión de genes reporteros ubicados corriente arriba de esta UTR 3' en construcciones plasmídicas.

Los experimentos de inmunofluorescencia indirecta realizados con parásitos promastigotes transfectados y controles, demostraron que la proteína se encuentra ubicada principalmente en la membrana plasmática del parásito, en el bolsillo flagelar, y en el flagelo. Esta localización está de acuerdo con la esperada para una proteína integral de membrana. Resulta interesante señalar que el bolsillo flagelar constituye una región especializada de la membrana del parásito; se cree que presenta composiciones lipídicas y proteicas particulares (revisado por Landfear, 2001). Además, cumple funciones bien definidas. Esta región es responsable de la captura de nutrientes, a través de la endocitosis y de la secreción de compuestos al medio extracelular, a través de la exocitosis. Por lo tanto, la membrana del bolsillo flagelar es un intermediario obligado de las vías de tráfico de moléculas que existen entre las membranas intracelulares y la superficie celular. Consecuentemente, el recambio de membranas en esta zona debe ser muy alto (Overath y col., 1997). Debido a las características de los procesos que tienen lugar en el bolsillo flagelar, cabe esperar que proteínas implicadas en el tráfico de proteínas y de lípidos, se expresen en este sitio. Como veremos más adelante, ABCA1 de mamíferos ha sido implicada en algunos de estos procesos.

8. ESTUDIOS FUNCIONALES DE LA PROTEINA ABC1.1

8.1. Estudios de resistencia a fármacos

Puesto que varios transportadores ABC han sido implicados en fenómenos de resistencia a fármacos en *Leishmania*, investigamos si la sobreexpresión de la proteína ABC1.1, les otorgaba a los parásitos, alguna ventaja en la supervivencia frente a determinados compuestos. Así pues, ensayamos la viabilidad de estos parásitos frente a los alquil-lisofosfolípidos, como la edelfosina y la miltefosina. Este último constituye el primer fármaco de administración oral prometedor contra la leishmaniasis. Ya que son lípidos de cadena corta, análogos de fosfatidilcolina, podían ser potenciales sustratos para la proteína ABC1.1. De hecho, se ha descrito que una

línea resistente a daunomicina de *L. tropica*, que sobreexpresa la proteína tipo Pgp codificada por el gen *Ltrmdr1*, es también resistente a estos alquil-lisofosfolípidos (Pérez-Victoria y col., 2001c). En nuestros ensayos, no observamos diferencias en los niveles de sensibilidad a estos fármacos entre los parásitos transfectados y los controles.

Varios trabajos realizados con la proteína ABCA1 de mamíferos han demostrado que su actividad es inhibida por glibenclamida. Así, se ha descrito que su capacidad transportadora de aniones (Becq y col., 1997), su función en la secreción de IL-1 β (Hamon y col., 1997), su papel en la fagocitosis de células apoptóticas (Moynault y col., 1998; Marguet y col., 1999), y su función en el eflujo de colesterol y fosfolípidos (Fielding y col., 2000; Wang y col., 2001), son todas actividades inhibidas por esta sulfonilurea. Esta también inhibe la actividad de otros transportadores ABC, como CFTR y SUR (Schultz y col., 1996; Inagaki y col., 1995). Por otra parte, se ha descrito que la glibenclamida inhibe el crecimiento de promastigotes de *Leishmania* (Ponte-Sucre y col., 1997; 1998). Sin embargo, en las condiciones en que realizamos nuestros ensayos de viabilidad frente a este fármaco, no observamos inhibición del crecimiento en parásitos de *L. infantum*, tanto transfectados con ABC1.1 como controles. De hecho, a las máximas concentraciones ensayadas (200 μ M), obtuvimos cerca de un 100% de crecimiento en ambas líneas. Es posible que dicha contradicción en nuestros resultados se deba a las distintas condiciones empleadas.

Tampoco observamos, entre los parásitos transfectados y controles, diferencias en la resistencia a compuestos como ácido retinoico y retinol. Ambos compuestos constituyen sustratos de la proteína ABCA4 (ABCR) (Sun y col., 1999) y también se ha descrito que inhiben el crecimiento de *Leishmania* (Mukhopadhyay y Madhubala, 1994).

En resumen, no observamos diferencias en la viabilidad de los parásitos que sobreexpresan ABC1.1, con respecto a los controles, frente a todos los compuestos que hemos ensayado durante este estudio. De hecho hasta ahora, no se ha descrito que ningún fármaco o inhibidor sea transportado por ABCA1 de mamíferos. El avance en la investigación de la función que cumple este transportador en el parásito, permitirá conocer si, como ya hemos señalado, este gen puede ser amplificado bajo determinadas circunstancias, otorgándole al parásito alguna ventaja en su capacidad para sobrevivir.

8.2. ¿Es ABCA1 un transportador de lípidos?

En los últimos años el número de transportadores ABC implicados en procesos de transporte de lípidos celulares ha aumentado significativamente. Estos transportadores, a medida que han sido identificados y caracterizados, se ha demostrado que están involucrados en la patogénesis de numerosas enfermedades hereditarias (ver tabla A2), lo que ha reforzado la investigación que se realiza de la actividad de estos transportadores. En particular, varios miembros de la subfamilia ABCA están relacionados con movimientos de lípidos. La proteína ABCA1 de humanos participa en el eflujo, a través de la membrana plasmática, de fosfolípidos y colesterol (revisado por Schmitz y Langmann, 2001); su expresión es sensible a los niveles de colesterol celular en macrófagos (Langmann y col., 1999), constituyendo así un regulador clave del metabolismo de HDL. La proteína ABCA1 también ha sido relacionada con el proceso de fagocitosis de células apoptóticas durante la muerte celular programada que tiene lugar en el desarrollo (Luciani y Chimini, 1996). Se cree que su función consiste en la translocación de fosfatidilserina hacia la cara externa de la membrana plasmática.

El sistema básico de señalización que conduce a la fagocitosis de células apoptóticas, fue definido en *C. elegans*, mediante estudios genéticos con mutantes defectivos en la remoción de cuerpos apoptóticos durante el desarrollo del nemátodo (Wu y Horvitz, 1998a; 1998b; Lui y col., 1998; Reddien y col., 2000). Existe un complejo de señalamiento, formado por las proteínas CED2, CED5 y CED10, cuyo homólogo en vertebrados es el constituido por CrkII-DOCK 180-Rac1, involucrado en migración celular. CED6 es una proteína adaptadora que podría interactuar con el receptor "scavenger" de clase B, CD36; mientras que aún no se ha identificado la proteína CED1, se cree que es uno de estos receptores. Finalmente, está CED7, cuyo homólogo en vertebrados es ABCA1, que participa reorganizando lípidos de membrana, particularmente exponiendo fosfatidilserina, tanto en la célula fagocítica como en la célula que entra en apoptosis. Se cree que estos cambios de membrana dirigen la unión del fagocito a su célula diana. La exposición de fosfatidilserina en la cara externa debe ser el resultado de la inhibición de la actividad flipasa de la aminofosfolípido translocasa, junto con la activación de una actividad flopasa, dependiente posiblemente de ABCA1. Este cambio en la membrana, parece constituir una señal suficiente para el reconocimiento de las células por macrófagos, puesto que se ha demostrado que la fagocitosis de cuerpos apoptóticos puede ser inhibida por liposomas conteniendo fosfatidilserina y por análogos estructurales de este fosfolípido

(revisado por Fadok y Chimini, 2001). Además, utilizando células HL-60 tratadas con difluorometilornitina (DFMO), las cuales son incapaces de expresar en la cara externa fosfatidilserina, Fadok y col. (2001) demostraron que, tras inducir apoptosis por radiación UV, estas células no fueron fagocitadas por macrófagos, a pesar de mostrar todos los demás cambios morfológicos y bioquímicos de la apoptosis.

Se cree que los mismos mecanismos desarrollados por las células para fagocitar cuerpos apoptóticos, participan también en la fagocitosis de organismos patógenos. De hecho, se ha postulado que la principal función de los receptores fagocíticos es la remoción de células apoptóticas durante el desarrollo y que el reconocimiento de microorganismos a través de los mismos mecanismos, evolucionó como una función adaptativa posterior (Franc y col., 1999). Se ha visto que la fagocitosis de células apoptóticas regula la capacidad de los macrófagos de ejecutar la muerte celular. Por ejemplo, la citólisis de células tumorales por macrófagos activados es inhibida por la ingestión de células apoptóticas (Reiter y col., 1999). Este mecanismo de regulación puede ser aprovechado por parásitos para evadir la muerte dirigida por el macrófago. Por ejemplo, la fagocitosis de células T apoptóticas inhibe la respuesta protectora de producción de óxido nítrico por parte de macrófagos y promueve la invasión de macrófagos por *T. cruzi* (Freire de Lima y col., 2000).

El mecanismo de remoción de células apoptóticas por parte de los macrófagos es un proceso esencialmente no inflamatorio, ya que suprime específicamente la secreción de mediadores inflamatorios, como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Voll y col., 1997) e induce la liberación de citoquinas antiinflamatorias, como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) (Fadok y col., 1998). Así, muchos organismos patógenos podrían evadir las respuestas inmunes del huésped, ya sea expresando fosfatidilserina en sus membranas, ya sea induciendo apoptosis para ser fagocitados junto con células apoptóticas que expresan fosfatidilserina (Fadok y Chimini, 2001).

Por otra parte, se conoce que durante la interacción de parásitos tripanosomátidos y sus células huésped, ocurren significativos cambios en la superficie de ambas células, que implican intercambios de glicoproteínas y de lípidos. Garrido y col. (2000) describieron que ocurren alteraciones en la composición de lípidos durante el período inicial de contacto entre *T. cruzi* y membranas plasmáticas de eritrocitos.

Basados en estos antecedentes, nos preguntamos si la proteína ABC1.1 de *L. tropica* podía tener algún papel en el reconocimiento párasito-célula, a través de su

capacidad de translocar lípidos, durante el proceso de infección. Ya que *Leishmania* entre en macrófagos a través del proceso de fagocitosis, su capacidad invasiva puede ser favorecida al utilizar una señal, como es la exposición de fosfatidilserina en su membrana, la cual desencadena el reconocimiento por parte del macrófago y su fagocitosis a la vez que impide respuestas inflamatorias del huésped.

En este sentido, encaramos los estudios funcionales de la proteína ABC1.1 de *L. tropica*, diseñando y llevando a cabo experimentos tendientes a demostrar su posible participación en tales movimientos de lípidos. Adaptamos a las condiciones metabólicas de los parásitos, un protocolo para ensayar la capacidad de eflujo de colesterol celular, tras un período de acumulación con este esteroide marcado radiactivamente. Si bien el principal esteroide, componente de la membrana de los parásitos, es el ergosterol, se conoce que son capaces de capturar e incorporar en sus membranas, colesterol proveniente del medio extracelular (Haughan y Goad, 1991). Puesto que ABCA1 en mamíferos es responsable del eflujo de colesterol y fosfolípidos, a través del aceptor apoA1, investigamos dicha capacidad de eflujo, comparando los parásitos transfectados con ABC1.1 con los parásitos controles. Los resultados obtenidos muestran que el porcentaje de eflujo se duplica en presencia de apoA1, no existiendo diferencias entre ambas líneas de parásitos. Nos preguntamos entonces si podían existir otros aceptores de colesterol capaces de remover específicamente dicho esteroide de la membrana de los parásitos transfectados. Para ello, realizamos el mismo experimento de eflujo, incubando los parásitos ya sea en presencia de 1% o 20% de SBF. En este caso, observamos una pequeña diferencia en el porcentaje de eflujo obtenido a partir de los parásitos que sobreexpresan ABC1.1 con respecto a los controles. El análisis estadístico de estas diferencias no muestra ser significativo, a pesar de que estas diferencias se mantuvieron de un experimento a otro.

Para conocer si ABC1.1 participa en el transporte de fosfolípidos a través de la membrana, realizamos estudios de acumulación con análogos fluorescentes de fosfolípidos. Nuestros resultados sugieren que la proteína ABC1.1 puede estar implicada en el transporte de fosfatidilserina desde la cara interna a la cara externa de la membrana. Los parásitos transfectados con *LtrABC1.1* presentaron una menor acumulación del análogo fluorescente de fosfatidilserina, C₆-NBD-PS. Dicha acumulación parece ser consecuencia de una actividad de eflujo que requiere energía, puesto que condiciones que disminuyen el ATP celular, incrementaron la acumulación de C₆-NBD-PS a niveles semejantes a los controles. Lo mismo se encontró cuando la

incubación se realizó en frío, condición que impide la actividad de proteínas. Por lo tanto, la menor acumulación de C₆-NBD-PS, observada en los parásitos transfectados, se debe a una actividad proteica dependiente de ATP. Estos datos sugieren que ABC1.1 puede ser responsable de dicha actividad de eflujo aunque esta función deberá ser confirmada en otros estudios. El estudio de la capacidad de translocación de lípidos, pasa tal vez por desarrollar sistemas adecuados para estudiar dicha actividad. Por ejemplo, ensayos que permitan medir el movimiento de los lípidos y sistemas reconstituidos con composiciones de proteínas y lípidos definidas.

Cabe señalar que ABCA1 en humanos ha sido implicado en varios procesos celulares. Así, además de su participación en el eflujo de lípidos celulares y en la fagocitosis de células apoptóticas por macrófagos, ABCA1 parece estar relacionado con el transporte de aniones inorgánicos, con la secreción de IL-1 β , con la regulación de la secreción de apoE en macrófagos, así como con la modulación de interacciones con el citoesqueleto, con componentes del sistema de tráfico vesicular y con sistemas enzimáticos involucrados en el metabolismo de lípidos intracelulares.

Esta multiplicidad de funciones está quizás relacionada con funciones reguladoras más que transportadoras. De acuerdo con esto, se ha visto en ensayos de actividad ATPasa a partir de membranas de células sf9 que sobreexpresan ABCA1, que esta actividad fue insignificante comparada con la de membranas controles (Szakács y col., 2001). Además no hubo cambio de esta actividad cuando a las membranas aisladas que contienen ABCA1 se les agregó liposomas con varias mezclas de colesterol y lípidos o apoAI (Szakács y col., 2001). Estos resultados han llevado a proponer que ABCA1 puede no ser un transportador propiamente dicho sino una proteína reguladora. Experimentos de unión de ATP con la consecuente formación de un intermediario catalítico (oclusión de nucleótido) apoyan esta propuesta. ABCA1 presentó un comportamiento similar al de otras proteínas ABC reguladoras como CFTR y SUR, a diferencia de las proteínas MDR o MRP (Szakács y col., 2001).

Más allá de que los resultados obtenidos en *Leishmania* con análogos fluorescentes de fosfolípidos sugieren que ABC1.1 transporta fosfatidilserina, queda por demostrarse si ABC1.1 es capaz de transportar el fosfolípido natural. Para ello, será necesario realizar otros experimentos. Por ejemplo, mediante el uso de precursores de la síntesis de fosfatidilserina marcados, será posible seguir su metabolismo y distribución en la membrana de *Leishmania*, y comparar esta

distribución en los parásitos que sobreexpresan ABC1.1 con respecto a parásitos controles.

El uso de análogos de lípidos de cadena corta ha sido muy extendido para investigar el transporte intracelular de lípidos (revisado por Bevers y col. 1999). De hecho, se utilizaron análogos de cadena corta, tanto con marcaje spin, como fluorescentes o radiactivos, para demostrar que la asimetría de la membrana era en parte resultado de una actividad aminofosfolípido translocasa desde la cara externa a la cara interna de la membrana (Bevers y col. 1999). Así, muchos estudios han confirmado que el comportamiento de estos análogos de fosfolípidos refleja el de sus contrapartes endógenos, apoyando la idea de que la afinidad de los transportadores por los grupos de las cabezas de los fosfolípidos análogos y de los naturales deben ser similares. Sin embargo, los estudios realizados con las proteínas MDR han arrojado otras conclusiones. El hecho de que Mdr1a sea incapaz de compensar la falta de transporte de fosfatidilcolina en la bilis de un ratón "knockout" para *Mdr2* ha llevado a proponer que, a pesar de que MDR1 es capaz de transportar una gran variedad de fosfolípidos de cadena corta, es improbable que transloque fosfolípidos de cadena larga endógenos (van Helvoort y col., 1996). La misma conclusión se hizo en el caso de MRP1 (Dekkers y col., 1998). Se cree que estos transportadores de múltiples fármacos, reconocen los análogos de cadena corta como xenobióticos, translocándolos al exterior como si fuera un fármaco.

Los movimientos de lípidos en la membrana ocurren en muy variadas situaciones, y en particular la pérdida de asimetría en la distribución de los fosfolípidos con la consecuente exposición de fosfatidilserina, está relacionada con varios procesos celulares de gran importancia. Por lo tanto, si ABC1.1 en *Leishmania* transloca dicho fosfolípido, su función fisiológica podría influir en varios eventos biológicos. Se conoce que la exposición de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana, en parte por su naturaleza aniónica, imparte varios cambios en la propiedad física de la membrana. Estas propiedades pueden tener una función importante en la modulación de las vías de tráfico intracelular (Mukherjee y Maxfield, 2000). Por ejemplo, se ha visto que la estimulación de la aminofosfolípido translocasa, provoca la producción de vesículas de tipo endocíticas en eritrocitos y estimula la endocitosis en células K562. De hecho, se ha propuesto que el transporte activo de lípidos constituye la fuerza directriz por la cual la membrana se pliega durante el proceso de endocitosis (Devaux, 2000). En este sentido, se ha propuesto que ABCA1 tiene una función en la regulación de la endocitosis, ya que la endocitosis mediada por

receptor en fibroblastos provenientes de enfermos de Tangier, está significativamente aumentada. Estos resultados están de acuerdo con las funciones propuestas para cada una de estas proteínas, las cuales tendrían, a través de su capacidad de translocación de fosfatidilserina en distintas direcciones, un efecto opuesto sobre el proceso de endocitosis. Siguiendo el mismo razonamiento, es de esperar que la actividad de ambas proteínas también influya sobre la exocitosis o las curvaturas hacia el exterior de la membrana. De acuerdo con esto, la pérdida de función de ABCA1, la cual conlleva a un aumento de la fosfatidilserina ubicada en la cara interna de la membrana, no sólo suprimiría procesos de protrusión de la membrana, como los que tienen lugar durante la fagocitosis, sino que a su vez facilitarían los procesos de endocitosis. Su localización preponderante en el bolsillo flagelar del parásito apoyaría dicho papel.

La función que proponemos para este transportador en *Leishmania*, está de acuerdo con resultados obtenidos recientemente, los cuales demuestran que este parásito es capaz de aprovechar los mecanismos de la apoptosis desarrollados por los organismos multicelulares, para propagarse dentro de sus células huésped. Formas amastigotes del parásito exponen fosfatidilserina en la superficie celular y dicha señal parece tener una función en la interacción del parásito con el macrófago, ya que el enmascaramiento de esta señal por unión con la proteína anexina V, inhibe significativamente su capacidad infectiva *in vitro* (de Freitas Balanco y col. 2001).

Para concluir, queremos resaltar que este trabajo puede abrir nuevos caminos en la investigación de los transportadores ABC, y en particular en los miembros de esta subfamilia ABCA. Será interesante la continuación de dicha investigación, en particular llevando a cabo experimentos tendientes a demostrar si la proteína ABC1.1 juega un papel importante en la infectividad del parásito y en procesos que son esenciales para su supervivencia. En ese sentido, será valiosa la obtención de mutantes nulos para dicho gen. Puesto que, como hemos demostrado en este estudio, existe en *Leishmania* un conjunto de genes relacionados con la subfamilia ABCA, será necesario para inactivar el gen, recurrir a métodos desarrollados recientemente en tripanosomátidos, como son la metodología de ARN antisentido o ARN de interferencia. Por último, el avance en el conocimiento de la función de esta proteína permitirá desarrollar inhibidores específicos que puedan tal vez ser empleados en el combate frente a enfermedades parasitarias.

CONCLUSIONES

F. CONCLUSIONES

1. Hemos caracterizado un nuevo transportador ABC en *Leishmania tropica*, denominado *LtrABC1.1*. Este gen de 5.529 pb, codifica para un transportador de 1.843 aminoácidos, que está relacionado con la subfamilia ABCA descrita en mamíferos.
2. La caracterización molecular de la subfamilia ABCA en *Leishmania*, muestra que este grupo de transportadores está compuesto por varios miembros, al menos cuatro, en las especies estudiadas. En *Leishmania tropica*, esta subfamilia se agrupa en dos bandas cromosómicas de 1,2 y 0,8 Mb de tamaño.
3. Los estudios de expresión y localización de la proteína ABC1.1 de *Leishmania* mostraron que se trata de un gen de baja expresión, cuya proteína se localiza principalmente en la membrana plasmática y el bolsillo flagelar del parásito.
4. Los estudios sobre la funcionalidad de la proteína ABC1.1 en parásitos que sobreexpresan el gen *LtrABC1.1*, mostraron que no está implicada en la resistencia frente a varios fármacos y compuestos considerados sustratos de proteínas ABC, como son: los alquilisofosfolípidos edelfosina y miltefosina, la sulfonilurea glibenclamida, la doxorubicina y los compuestos retinol y ácido retinoico.
5. Los estudios de acumulación de análogos fluorescentes de fosfolípidos mostraron que los parásitos que sobreexpresan el gen *LtrABC1.1* presentan una significativa menor acumulación de un análogo fluorescente de fosfatidilserina, en un proceso dependiente de energía, lo que sugiere que ABC1.1 podría estar implicado en el transporte de este fosfolípido.

BIBLIOGRAFIA

G. BIBLIOGRAFIA

Abe-Dohmae, S., Suzuki, S., Wada, Y., Aburatani, H., Vance, D.E., Yokoyama, S. (2000). Characterization of apolipoprotein-mediated HDL generation induced by cAMP in a murine macrophage cell line. *Biochemistry* 39: 11092-99.

Adosraku, R.K., Anderson, M.M., Anderson, G.J., Choi, G., Croft, S.L., Yardley, V., Phillipson, J.D., Gibbons, W.A. Proton NMR lipid profile of *Leishmania donovani* promastigotes. (1993). *Mol. Biochem. Parasitol.* 62(2):251-262.

Ahn, J., Wong, J.T., Molday, R.S. (2000). The effect of lipid environment and retinoids on the ATPase activity of ABCR, the photoreceptor ABC transporter responsible for Stargardt macular dystrophy. *J. Biol. Chem.* 275(27):20399-20405.

Alonso, G., Guevara, P., Ramirez, J.L. (1992). Trypanosomatidae codon usage and GC distribution. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 87:517-523.

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

Auland, M.E., Roufogalis, B.D., Devaux, P.F., Zachowski, A. (1994). Reconstitution of ATP-dependent aminophospholipid translocation in proteoliposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(23):10938-10942.

Azarian, S.M., Travis, G.H. (1997). The photoreceptor rim protein is an ABC transporter encoded by the gene for recessive. *FEBS Lett.* 409(2):247-252.

Bassé, F., Stout, J.G., Sims, P.J., Wiedmer, T. (1996). Isolation of an erythrocyte membrane protein that mediates Ca²⁺-dependent transbilayer movement of phospholipid. *J. Biol. Chem.* 271(29):17205-210.

Bastien, P., Blaineau, C., Pages, M. (1992). Molecular karyotype analysis in *Leishmania*. *Subcell. Biochem.* 18:131-87. Review

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 Res.* 28(5):1211-1220.

Baukrowitz, T., Fakler, B. (2000). KATP channels gated by intracellular nucleotides and phospholipids. *Eur. J. Biochem.* 267(19):5842-48. Review

Becq, F., Hamon, Y., Bajetto, A., Gola, M., Verrier, B., Chimini, G. (1997). ABC1, an ATP binding cassette transporter required for phagocytosis of apoptotic cells, generates a regulated anion flux after expression in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.* 272(5):2695-99.

Bellincampi, L., Simone, M.L., Motti, C., Cortese, C., Bernardini, S., Bertolini, S., Calandra, S. (2001). Identification of an alternative transcript of ABCA1 gene in different human cell types. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283(3):590-7.

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

- Beverley, S.M. (1991). Gene amplification in *Leishmania*. *Ann. Rev. Microbiol.* 45:417-444.
- Bisbal, C., Martinand, C., Silhol, M., Lebleu, B., Salehzada, T. (1995). Cloning and characterization of a RNase L inhibitor. A new component of the interferon-regulated 2-5A pathway. *J. Biol. Chem.* 270:13308-13317.
- Bishop, A.L., Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* 348:241-255.
- Biswas, E.E. (2001). Nucleotide binding domain 1 of the human retinal ABC transporter functions as a general ribonucleotidase. *Biochemistry* 40(28):8181-8187.
- Bock, J.H., Langer, P.J. (1993). Sequence and genomic organization of the hsp70 genes of *Leishmania amazonensis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 62(2):187-97.
- Bodzioch, M., Orso, E., Klucken, J., Langmann, T., Bottcher, A., Diederich, W., Drobnik, W., Barlage, S., Buchler, C., Porsch-Ozcurumez, M., Kaminski, W.E., Hahmann, H.W., Oette, K., Rothe, G., Aslanidis, C., Lackner, K.J., Schmitz, G. (1999). The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nature Genet.* 22(4):347-351.
- Borst, P., Zelcer, N., van Helvoort, A. (2000). ABC transporters in lipid transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1486(1):128-144. Review.
- Bortnick, A.E., Rothblat, G.H., Stoudt, G., Hoppe, K.L., Royer, L.J., McNeish, J., and Francone, O.L. (2000). The correlation of ATP-binding cassette 1 mRNA levels with cholesterol efflux from various cell lines. *J. Biol. Chem.* 275(37): 28634-640.
- Bosch, I., Dunussi-Joannopoulos, K., Wu, R.L., Furlong, S.T., Croop, J. (1997). Phosphatidylcholine and phosphatidyletanolamine behave as substrates of the human MDR1 P-glycoprotein. *Biochemistry* 36(19): 5685-5694.
- Brandau, S., Dresel, A., Clos, J. (1995). High constitutive levels of heat-shock proteins in human-pathogenic parasites of the genus *Leishmania*. *Biochem. J.* 310(Pt1):225-232.
- Broccardo, C., Luciani, M.F., Chimini, G. (1999). The ABCA subclass of mammalian transporters. *Biochim. Biophys. Acta* 1461:395-404.
- Brooks-Wilson, A., Marcil, M., Clee, S.M., Zhang, L.H., Roomp, K., van Dam, M., Yu, L., Brewer, C., Collins, J.A., Molhuizen, H.O., Loubser, O., Ouelette, B.F., Fichter, K., Ashbourne-Excoffon, K.J., Sensen, C.W., Scherer, S., Mott, S., Denis, M., Martindale, D., Frohlich, J., Morgan, K., Koop, B., Pimstone, S., Kastelein, J.J., Hayden, M.R., y col. (1999). Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nature Genet.* 22(4):336-345.
- Bungert, S., Molday, L.L., Molday, R.S. (2001). Membrane topology of the ATP binding cassette transporter ABCR and its relationship to ABC1 and related ABCA transporters. *J. Biol. Chem.* 276(26):23539-546.

- Burger, K.N., van der Bijl, P., van Meer, G. (1996). Topology of sphingolipid galactosyltransferases in ER and Golgi: transbilayer movement of monohexosyl sphingolipids is required for higher glycosphingolipid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 271(1):15-28.
- Buschman, E., Gros, P. (1991). Functional analysis of chimeric genes obtained by exchanging homologous domains of the mouse *mdr1* and *mdr2* genes. *Mol. Cell Biol.* 11(2):595-603.
- Canever, D.R., Ray, S.C. (1991). Eukaryotic start and stop translation sites. *Nucleic Acids Res.* 19:3185-3192.
- Cavelier, L.B., Qiu, Y., Bielicki, J.K., Afzal, V., Cheng, J.F., Rubin, E.M. (2001). Regulation and activity of the human ABCA1 gene in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 276:18046-051.
- Chambenoit, O., Hamon, Y., Marguet, D., Rigneault, H., Rosseneu, M., Chimini, G. (2001). Specific docking of apolipoprotein A-1 at the cell surface requires a functional ABCA1 transporter. *J. Biol. Chem.* 276(13): 9955-60.
- Chen, C.A., Shyu, A. (1995). AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem. Sci.* 20(11):465-470. Review.
- Chen, W., Silver, D.L., Smith, J.D., Tall, A.R. (2000). Scavenger receptor-BI inhibits ATP-binding cassette transporter 1-mediated cholesterol efflux in macrophages. *J. Biol. Chem.* 275(40): 30794-800.
- Chen, W., Sun, Y., Welch, C., Gorelik, A., Leventhal, A.R., Tabas, I., Tall, A.R. (2001). Preferential ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)-mediated cholesterol efflux from late endosomes/lysosomes. *J. Biol. Chem.* 276(47):43564-9.
- Chinetti, G., Lestavel, S., Bocher, V., Remaley, A.T., Neve, B., Pineda Torra, I., Teissier, E., Minnich, A., Jaye, M., Duverger, N., Brewer, H.B., Fruchart, J., Clavey, V., Staels, B. (2001). PPAR- α and PPAR- γ activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nature Med.* 7(1):53-58.
- Chiquero, M.J., Perez-Victoria, J.M., O'Valle, F., Gonzalez-Ros, J.M., del Moral, R.G., Ferragut, J.A., Castanys, S., Gamarro, F. (1998). Altered drug membrane permeability in a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line. *Biochem. Pharmacol.* 55(2):131-139.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162(1):156-159.
- Chow, L.M., Wong, A.K., Ullman, B., Wirth, D.F. (1993). Cloning and functional analysis of an extrachromosomally amplified multidrug resistance-like gene in *Leishmania enriettii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 60(2):195-208.
- Clee, S.M., Kastelein, J.J., van Dam, M., Marcil, M., Roomp, K., Zwarts, K.Y., Collins, J.A., Roelants, R., Tamasawa, N., Stulc, T., Suda, T., Ceska, R., Boucher, B., Rondeau, C., DeSouich, C., Brooks-Wilson, A., Molhuizen, H.O., Frohlich J, Genest J Jr, Hayden MR. (2000). Age and residual cholesterol efflux affect HDL cholesterol levels and coronary artery disease in ABCA1 heterozygotes. *J Clin Invest.* 106(10):1263-70

- Collins, J., Volckaert, G., Nevers, P. (1982). Precise and nearly-precise excision of the symmetrical inverted repeats of Tn5; common features of recA-independent deletion events in *Escherichia coli*. *Gene* 19(1):139-146.
- Connor, J., Pak, C.H., Zwaal, R.F., Schroit, A.J. (1992). Bidirectional transbilayer movement of phospholipid analogs in human red blood cells. Evidence for an ATP-dependent and protein-mediated process. *J. Biol. Chem.* 267(27):19412-417.
- Connor, J., Schroit, A.J. (1989). Transbilayer movement of phosphatidylserine in nonhuman erythrocytes: evidence that the aminophospholipid transporter is a ubiquitous membrane protein. *Biochemistry* 28(25):9680-9685.
- Coughlin, B.C., Texeira, S.M., Kirchhoff, L.V., Donelson, J.E. (2000). Amastin mRNA abundance in *Trypanosoma cruzi* is controlled by a 3'-untranslated region position-dependent cis-element and an untranslated region-binding protein. *J. Biol. Chem.* 275(16):12051-12060.
- Coulson, R.M., Connor, V., Chen, J.C., Ajioka, J.W. (1996). Differential expression of *Leishmania major* beta-tubulin genes during the acquisition of promastigote infectivity. *Mol. Biochem. Parasitol.* 82(2):227-236.
- Costet, P., Luo, Y., Wang, N., Tall, A.R. (2000). Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J. Biol. Chem.* 275(36):28240-245.
- Crawford, A.R., Smith, A.J., Hatch, V.C., Oude Elferink, R.P., Borst, P., Crawford, J.M. (1997). Hepatic secretion of phospholipid vesicles in the mouse critically depends on mdr2 or MDR3 P-glycoprotein expression. Visualization by electron microscopy. *J. Clin. Invest.* 100(10):2562-2567.
- Daleke, D.L., Lyles, J.V. (2000). Identification and purification of aminophospholipid flippases. *Biochim. Biophys. Acta* 1486:108-127.
- De Freitas Balanco, J.M., Moreira, M.E., Bonomo, A., Bozza, P.T., Amarante-Mendes, G., Pirmez, C., Barcinski, M.A. (2001). Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. *Curr. Biol.* 11(23):1870-1873.
- de Vree, J.M., Jacquemin, E., Sturn, E., Cresteil, D., Bosma, P.J., Aten, J., Deleuze, J.F., Desrochers, M., Burdelski, M., Bernard, O., Oude Elferink, R.P., Hadchouel, M. (1998). Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(1): 282-287.
- Decottignies, A., Grant, A.M., Nichols, J.W., de Wet, H., McIntosh, D.B., Goffeau, A. (1998). ATPase and multidrug transport activities of the overexpressed yeast ABC protein Yorp1. *J. Biol. Chem.* 273(20):12612-622.
- Dekkers, D.W., Comfurius, P., Schroit, A.J., Bevers, E.M., Zwaal, R.F. (1998). Transbilayer movement of NBD-labeled phospholipids in red blood cell membranes: outward-directed transport by the multidrug resistance protein 1 (MRP1). *Biochemistry* 37(42):14833-7.

- Dekkers, D.W., Comfurius, P., van Gool, R.G., Bevers, E.M., Zwaal, R.F. (2000). Multidrug resistance protein 1 regulates lipid asymmetry in erythrocyte membranes. *Biochem. J.* 350(Pt2):531-535.
- Di Noia, J.M., D'Ors3, I., Sanchez, D.O., Frasch, A.C. (2000). AU-rich elements in the 3'-untranslated region of a new mucin-type gene family of *Trypanosoma cruzi* confers mRNA instability and modulates translation efficiency. *J. Biol. Chem.* 275(14):10218-10227.
- Docampo R., Moreno S.N.J. (2001). The acidocalcisome. *Mol. Biochem Parasitol.* 114(2):151-159. Review.
- Doerrler, W.T., Reedy, M.C., Raetz, C.R. (2001). An *Escherichia coli* mutant defective in lipid export. *J. Biol. Chem.* 276(15):11461-11464.
- Driessen, A.J.M., Rosen, B.P., Konings, W.N. (2000). Diversity of transport mechanisms: common structural principles. *Trends in Biochem. Sci.* 25:397-401.
- Drobnik, W., Lindenthal, B., Lieser, B., Ritter, M., Christiansen Weber, T., Liebisch, G., Giesa, U., Igel, M., Borsukova, H., Buchler, C., Fung-Leung, W.P., Von Bergmann, K., Schmitz, G. (2001). ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) affects total body sterol metabolism. *Gastroenterology* 120(5):1203-11.
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Konowal, A., Freed, P.W., Westcott, J.Y., Henson, P.M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J. Clin. Invest.* 101(4):890-898.
- Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., Henson, P.M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* 148(7):2207-2216.
- Fadok, V.A., de Cathelineau, A., Dalekem D.L., Hensonm P.M., Bratton, D.L. (2001). Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 276(2):1071-1077.
- Fadok, V.A., Chimini, G. (2001). The phagocytosis of apoptotic cells. *Semin. Immunol.* 13(6):365-72
- Faraut-Gambarelli, F., Piarroux, R., Deniau, M., Giusiano, B., Marty, P., Michel, G., Faugere, B., Dumon, H. (1997). In vitro and in vivo resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41(4):827-830.
- Field, M.C., Boothroyd, J.C. (1995). *Trypanosoma brucei*: molecular cloning of homologues of small GTP-binding proteins involved in vesicle trafficking. *Exp. Parasitol.* 81(3):313-320.
- Fielding, P.E., Nagao, K., Hakamata, H., Chimini, G., Fielding, C.J. (2000). A two-step mechanism for free cholesterol and phospholipid efflux from human vascular cells to Apolipoprotein A-1. *Biochemistry* 39: 14113-120.

Fitzgerald, M.L., Mendez, A.J., Moore, K.J., Andersson, L.P., Panjeton, H.A., Freeman, M.W. (2001). ATP-binding cassette transporter A1 contains an NH₂-terminal signal anchor sequence that translocates the protein's first hydrophilic domain to the exoplasmic space. *J. Biol. Chem.* 276(18):15137-45.

Fobker, M., Voss, R., Reinecke, H., Crone, C., Assmann, G., Walter, M. (2001). Accumulation of cardiolipin and lysocardiolipin in fibroblasts from Tangier disease subjects. *FEBS Lett.* 500:157-162.

Franc, N.C., White, K., Ezekowitz, R.A. (1999). Phagocytosis and development: back to the future. *Curr. Opin. Immunol.* 11(1):47-52. Review.

Freire de Lima, C.G., Nascimento, D.O., Soares, M.B., Bozza, P.T., Castro Faria Neto, H.C., de Mello, F.G., DosReis, G.A., Lopes, M.F. (2000). Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* 403(6766):199-203.

Fried, M., Feo, S., Heard, E. (1991). The role of inverted duplication in the generation of gene amplification in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1090:143-155.

Frohlich, J., Genest Jr., J. Hayden, M.R. (2000). Age and residual cholesterol efflux affect HDL cholesterol levels and coronary artery disease in ABCA1 heterozygotes. *J. Clin. Invest.* 106(10): 1263-1270.

Furger, A., Schurch, N., Kurath, U., Roditi, I. (1997). Elements in the 3' untranslated region of procyclin mRNA regulate expression in insect forms of *Trypanosoma brucei* by modulating RNA stability and translation. *Mol. Cell Biol.* 17(8):4372-4380.

Gallie, D.R. (1998). A tale of two termini: a functional interaction between the termini of an mRNA is a prerequisite for efficient translation initiation. *Gene* 216(1):1-11. Review.

Garrido, M.N., Racagni, G. Pereira, B.M., Rodriguez, M.A., Lujan, H.D., Bronia, D.H., Machado-Domenech, E.E. (2000). Changes in *Trypanosoma cruzi* phospholipid turnover induced by parasite contact with cell membranes. *Parasitol. Res.* 86(2):96-100.

Germann, U.A., Chambers, T.C., Ambudkar, S.V., Licht, T., Cardarelli, C.O., Pastan, I., Gottesman, M.M. (1996). Characterization of phosphorylation-defective mutants of human P-glycoprotein expressed in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 271(3):1708-1716.

González-Aseguinolaza, G., Almazan, F., Rodriguez, J.F., Marquet, A., Larraga, V. (1997). Cloning of the gp63 surface protease of *Leishmania infantum*. Differential post-translational modifications correlated with different infective forms. *Biochim. Biophys. Acta* 1361(1):92-102.

Gordenin, D.A., Lobachev, K.S., Degtyareva, N.P., Malkova, A.L., Perkins, E., Resnick, M.A. (1993). Inverted DNA repeats: a source of eukaryotic genomic instability. *Mol. Cell Biol.* 13(9):5315-5322.

Gordenin, D.A., Malkova, A.L., Peterzen, A., Kulikov, V.N., Pavlov, Y.I., Perkins, E., Resnick, M.A. (1992). Transposon Tn5 excision in yeast: influence of DNA polymerases alpha, delta, and epsilon and repair genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(9):3785-3789.

- Gueiros-Filho, F.J., Viola, J.P., Gomes, F.C., Farina, M., Lins, U., Bertho, A.L., Wirth, D.F., Lopes, U.G. (1995). *Leishmania amazonensis*: multidrug resistance in vinblastine-resistant promastigotes is associated with rhodamine 123 efflux, DNA amplification, and RNA overexpression of a *Leishmania* *mdr1* gene. *Exp. Parasitol.* 81(4):480-490.
- Haber, J.E. (1998). A locus control region regulates yeast recombination. *Trends Genet.* 14(8):317-321. Review.
- Haghpasand, M., Bourassa, P., Francone, O.L., Aiello, R.J. (2001). Monocyte/macrophage expression of ABCA1 has minimal contribution to plasma HDL levels. *J. Clin. Invest.* 108(9): 1315-1320.
- Hajduk, S.L., Harris, M.E., Pollard, V.W. (1993). RNA editing in kinetoplastid mitochondria. *FASEB J.* 7(1):54-63. Review.
- Hamon, Y., Luciani, M.F., Becq, F., Verrier, B., Rubartelli, A., Chimini, G. (1997). Interleukin-1 β secretion is impaired by inhibitors of the ATP binding cassette transporter, ABC1. *Blood* 90(8):2911-2915.
- Hamon, Y., Broccardo, C., Chambenoit, O., Luciani, M.F., Toti, F., Chaslin, S., Freyssinet, J.M., Devaux, P.F., McNeish, J., Marguet, D., Chimini, G. (2000). ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nature Cell Biol.* 2:399-406.
- Hanson, P.K., Nichols, J.W. (2001). Energy-dependent flip of fluorescently-labeled phospholipids is regulated by nutrient starvation and transcription factors, *PDR1* and *PDR3*. *J. Biol. Chem.* 276(13):9861-67.
- Haughan, P.A., Goad, L.J. (1991). Lipid biochemistry of trypanosomatids. En *Biochemical Protozoology*. Coombs, G. y North, M. eds. Taylor and Francis, London.
- Henderson, D.M., Sifri, C.D., Rodgers, M., Wirth, D.F., Hendrickson, N., Ullman, B. (1992). Multidrug resistance in *Leishmania donovani* is conferred by amplification of a gene homologous to the mammalian *mdr1* gene. *Mol. Cell Biol.* 12(6):2855-2865.
- Henriques, C., de Souza, W. (2000). Redistribution of plasma-membrane surface molecules during formation of the *Leishmania amazonensis*-containing parasitophorous vacuole. *Parasitol. Res.* 86(3):215-225.
- Herrmann, A., Zachowski, A., Devaux, P.F. (1990). Protein-mediated phospholipid translocation in the endoplasmic reticulum with a low lipid specificity. *Biochemistry* 29:2023-2027.
- Hettema, E.H., van Roermund, C.W., Distel, B., van den Berg, M., Vilela, C., Rodrigues-Pousada, C., Wanders, R.J., Tabak, H.F. (1996). The ABC transporter proteins Pat1 and pat2 are required for import of long-chain fatty acids into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 15(15):3813-3822.
- Hightower, R.C., Wong, M.L., Ruiz Perez, L., Santi, D.V. (1987). Electron microscopy of amplified DNA forms in antifolate-resistant *Leishmania*. *J. Biol. Chem.* 262(30):14618-24.

- Hilley, J.D., Zawadzki, J.L., McConville, M.J., Coombs, G.H., Mottram, J.C. (2000). *Leishmania mexicana* mutants lacking glycosylphosphatidylinositol (GPI):protein transamidase provide insights into the biosynthesis and functions of GPI-anchored proteins. *Mol. Biol. Cell* 11(4): 1183-1195.
- Hirst, S.I., Stapley, L.A. (2000). Parasitology: the dawn of a new millennium. *Parasitol. Today* 16(1):1-3.
- Hopfner, K.P., Karcher, A., Shin, D.S., Craig, L., Arthur, L.M., Carney, J.P., Tainer, J.A. (2000). Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily. *Cell* 101(7):789-800.
- Hung, L.W., Wang, I.X., Nikaido, K., Liu, P.Q., Ames, G.F., Kim, S.H. (1998). Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature* 396:703-707.
- Idriss, H.T., Hannun, Y.A. Boulpaep, E., Basavappa, S. (2000). Regulation of volume-activated chloride channels by P-glycoprotein: phosphorylation has the final say! *J. Physiol.* 524(Pt3):629-636. Review.
- Ilg, T., Handman, E., Stierhof, Y.D. (1999). Proteophosphoglycans from *Leishmania* promastigotes and amastigotes. *Biochem. Soc. Trans.* 27:518-525.
- Ilg, T. (2000). Lipophosphoglycan is not required for infection of macrophages or mice by *Leishmania mexicana*. *EMBO J.* 19(9):1953-1962.
- Ilgoutz, S.C., Mullin, K.A., Southwell, B.R., McConville, M.J. (1999a). Glycosylphosphatidylinositol biosynthetic enzymes are localized to a stable tubular subcompartment of the endoplasmic reticulum in *Leishmania mexicana*. *EMBO J.* 18(13):3643-3654.
- Ilgoutz, S.C., Zawadzki, J.L., Ralton, J.E., McConville, M.J. (1999b). Evidence that free GPI glycolipids are essential for growth of *Leishmania mexicana*. *EMBO J.* 18(10):2746-2755.
- Ilgoutz, S.C., McConville, M.J. (2001). Function and assembly of the *Leishmania* surface coat. *Int. J. Parasitol.* 31:899-908.
- Illing, M., Molday, L.L., Molday, R.S. (1997). The 220-kDa rim protein of retinal rod outer segments is a member of the ABC transporter superfamily. *J. Biol. Chem.* 272(15):10303-10310.
- Iovannisci, D.M., Beverley, S.M. (1989). Structural alterations of chromosome 2 in *Leishmania major* as evidence for diploidy, including spontaneous amplification of the mini-exon array. *Mol. Biochem. Parasitol.* 34(2):177-188.
- Jiménez-Ruiz, A., Boceta, C., Bonay, P., Requena, J.M., Alonso, C. (1998). Cloning, sequencing, and expression of the PSA genes from *Leishmania infantum*. *Eur. J. Biochem.* 251(1-2):389-397.
- Karow, M., Fayet, O., Cegielska, A., Ziegelhoffer, T., Georgopoulos, C. (1991). Isolation and characterization of the *Escherichia coli* *htrB* gene, whose product is essential for bacterial viability above 33 degrees C in rich media. *J. Bacteriol.* 173(2):741-750.

- Kean, L.S., Grant, A.M., Angeletti, C., Mahe, Y., Kuchler, K., Fuller, R.S., Nichols, J.W. (1997). Plasma membrane translocation of fluorescent-labeled phosphatidylethanolamine is controlled by transcription regulators, PDR1 and PDR3. *J. Cell Biol.* 138(2):255-270.
- Kelly, B.L., Nelson, T.N., McMaster, W.R. (2001). Stage-specific expression in *Leishmania* conferred by 3' untranslated regions of *L. major* leishmanolysin genes (GP63). *Mol. Biochem. Parasitol.* 116(1):101-104.
- Klugbauer, N., Hofmann, F. (1996). Primary structure of a novel ABC transporter with a chromosomal localization on the band encoding the multidrug resistance-associated protein. *FEBS Lett.* 391(1-2):61-65.
- Kyte, J., Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157(1):105-32.
- Landfear, S.M., Ignatushchenko, M. (2001). The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 115(1):1-17.Review.
- Langmann, T., Klucken, J., Reil, M., Liebisch, G., Luciani, M.F., Chimini, G., Kaminski, W.E., Schmitz, G. (1999). Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 257(1):29-33.
- Lannert, H., Gorgas, K., Meissner, I., Wieland, F.T., Jeckel, D. (1998). Functional organization of the Golgi apparatus in glycosphingolipid biosynthesis. Lactosylceramide and subsequent glycosphingolipids are formed in the lumen of the late Golgi. *J. Biol. Chem.* 273(5): 2939-2946.
- Lawn, R.M. (1999). The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J. Clin. Invest.* 104:R25-R31.
- LeBowitz, J.H., Smith, H.Q., Rusche, L., Beverley, S.M. (1993). Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes Dev.* 7(6):996-1007.
- Lee, M.H., Lu, K. Hazard, S., Yu, H., Shulenin, S., Hidaka, H., Kojima, H., Allikmets, R., Sakuma, N., Pegoraro, R., Srivastava, A.K., Salen, G., Dean, M., Patel, S.B. (2001). Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nat. Genet.* 27(1):79-83.
- Leon, W., Fouts, D.L., Manning, J. (1978). Sequence of the 16S and 26S rRNA genes in the pathogenic hemoflagellate *Leishmania donovani*. *Nucleic Acids Res.* 5:491-504.
- Lira, R., Sundar, S., Makharia, A., Kenney, R., Gam, A., Saraiva, E., Sacks, D. (1999). Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. *J. Infect. Dis.* 180(2):564-567.
- Liu, Q.A., Hengartner, M.O. (1998). Candidate adaptor protein CED-6 promotes the engulfment of apoptotic cells in *C. elegans*. *Cell* 93(6):961-972.
- Lobachev, K.S., Shor, B.M., Tran, H.T., Taylor, W., Keen, J.D., Resnick, M.A., Gordenin, D.A. (1998). Factors affecting inverted repeat stimulation of recombination and deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 148(4):1507-1524.

Loo, T.W., Clarke, D.M. (1995). Covalent modification of human P-glycoprotein mutants containing a single cysteine in either nucleotide-binding fold abolishes drug-stimulated ATPase activity. *J. Biol. Chem.* 270(39):22957-22961.

Luciani, M.F., Denizot, F., Savary, S., Mattei, M.G., Chimini, G. (1994). Cloning of two novel ABC transporters mapping on human chromosome 9. *Genomics* 21(1):150-159.

Luciani, M.F., Chimini, G. (1996). The ATP binding cassette transporter ABC1, is required for the engulfment of corpses generated by apoptotic cell death. *EMBO J.* 15(2):226-235.

Marcil, M., Brooks-Wilson, A., Clee, S.M., Roomp, K., Zhang, L., Yu, L., Collins, J.A., van Dam, M., Molhuizen, H.O.F., Loubster, O., Ouellete, B.F.F., Sensen, C.W., Fichter, K., Mott, S., Denis, M., Boucher, B., Pimstone, S., Genest Jr., J., Kastelein, J.J.P., Hayden, M.R. (1999). Mutations in the ABC1 gene in familial HDL deficiency with defective cholesterol efflux. *The Lancet* 354(9187): 1341-46.

Marguet, D., Luciani, M.F., Moynault, A., Williamson, P., Chimini, G. (1999). Engulfment of apoptotic cells involves the redistribution of membrane phosphatidylserine on phagocyte and prey. *Nature Cell Biol.* 1:454-456.

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 Dev.* 8(4):491-501.

Medina-Acosta, E., Karess, R.E., Russell, D.G. (1993). Structurally distinct genes for the surface protease of *Leishmania mexicana* are developmentally regulated. *Mol. Biochem. Parasitol.* 57(1):31-45.

McConville, M.J., Turco, S.J., Ferguson, M.A., Schneider, P. (1992). Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *EMBO J.* 11:3593-3600.

McNeish, J., Aiello, R.J., Guyot, D., Turi, T., Gabel, C., Aldinger, C., Hoppe, K.L., Roach, M.L., Royer, L.J., de Wet, J., Broccardo, C., Chimini, G., and Francone, O.L. (2000). High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 97(8):4245-50.

Mendez, A.J., Lin, G., Wade, D.P., Lawn, R.M., Oram, J.F. (2001). Membrane lipid domains distinct from cholesterol/sphingomyelin-rich rafts are involved in the ABCA1-mediated lipid secretory pathways. *J. Biol. Chem.* 276(5): 3158-66.

Mosser, D.M., Karp, C.L. (1999). Receptor mediated subversion of macrophage cytokine production by intracellular pathogens. *Curr. Opin. Immunol.* 11(4):406-411. Review.

Mosser, J., Douar, A.M., Sarde, C.O., Kioschis, P., Feil, R., Moser, H., Poustka, A.M., Mandel, J.L., Aubourg, P. (1993). Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* 361(6414):726-730.

- Moynault, A., Luciani, M.F., Chimini, G.** (1998). ABC1, the mammalian homologue of the engulfment gene *ced-7*, is required during phagocytosis of both necrotic and apoptotic cells. *Biochem. Soc. Trans.* 26(4):629-35.
- Mukherjee, S., Maxfield, F.R.** (2000). Role of membrane organization and membrane domains in endocytic lipid trafficking. *Traffic* 1(3):203-211. Review.
- Mullin, K.A., Foth, B.J., Ilgoutz, S.C., Callaghan, J.M., Zawadzki, J.L., McFadden, G.I., McConville, M.J.** (2001). Regulated degradation of an endoplasmic reticulum membrane protein in a tubular lysosome in *Leishmania mexicana*. *Mol. Biol. Cell* 12(8):2364-2377.
- Oram, J.F.** (2000). Tangier disease and ABCA1. *Biochim. Biophys. Acta* 1529:321-330.
- Oram, J.F., Lawn, R.M.** (2001). ABCA1. The gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. *J. Lipid Res.* 42(8): 1173-9.
- Oram, J.F., Vaughan, A.M.** (2000). ABCA1-mediated transport of cellular cholesterol and phospholipids to HDL apolipoproteins. *Curr. Opin. Lipidol.* 11(3): 253-60. Review.
- Oram, J.F., Lawn, R.M., Garvin, M.R., Wade, D.P.** (2000). ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages. *J. Biol. Chem.* 275(44):34508-511.
- Ordovas, J.M.** (2000). ABC1: the gene for Tangier disease and beyond. *Nutr. Rev.* 58(3 Pt 1):76-9. Review.
- Orso, E., Broccardo, C., Kaminski, W.E., Bottcher, A., Liebisch, G., Drobnik, W., Gotz, A., Chambenoit, O., Diederich, W., Langmann, T., Spruss, T., Luciani, M.F., Rothe, G., Lackner, K.J., Chimini, G., Schmitz, G.** (2000). Transport of lipids from Golgi to plasma membrane is defective in Tangier disease patients and *Abc1*-deficient mice. *Nature Genet.* 24:192-196.
- Osman, F., Subramani, S.** (1998). Double-strand break-induced recombination in eukaryotes. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 58:263-299. Review.
- Ouellette, M., Borst, P.** (1991). Drug resistance and P-glycoprotein gene amplification in the protozoan parasite *Leishmania*. *Res. Microbiol.* 142(6):737-746. Review.
- Ouellette, M., Hetteema, E., Wust, D., Fase-Fowler, F., Borst, P.** (1991). Direct and inverted DNA repeats associated with P-glycoprotein gene amplification in drug resistant *Leishmania*. *EMBO J.* 10(4):1009-1016.
- Ouellette, M., Legaré, D., Haimeur, A., Grondin, K., Roy, G., Brochu, C., Papadopoulou, B.** (1998). ABC transporters in *Leishmania* and their role in drug resistance. *Drug Resistance Updates* 1:43-48.
- Panousis, C.G., Zuckerman, S.H.** (2000). Interferon-gamma induces downregulation of Tangier disease gene (ATP-binding-cassette transporter 1) in macrophage-derived foam cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20(6):1565-71.

Pérez-Victoria, J.M., Parodi-Talice, A., Torres, C., Gamarro, F., Castanys, S. (2001b). ABC transporters in *Leishmania*. *Int. Microbiol.* En prensa.

Pérez-Victoria, J.M., Perez-Victoria, F.J., Parodi-Talice, A., Jimenez, I.A., Ravelo, A.G., Castanys, S., Gamarro, F. (2001c). Alkyl-lysophospholipid resistance in multidrug-resistant *Leishmania tropica* and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 45(9):2468-74.

Petrillo-Peixoto, M.L., Beverley, S.M. (1988). Amplified DNAs in laboratory stocks of *Leishmania tarentolae*: extrachromosomal circles structurally and functionally similar to the inverted-H-region amplification of methotrexate-resistant *Leishmania major*. *Mol Cell Biol.* 8(12):5188-99

Piper, R.C., Xu, X., Russell, D.G., Little, B.M., Landfear, S.M. (1995). Differential targeting of two glucose transporters from *Leishmania enriettii* is mediated by an NH₂-terminal domain. *J. Cell Biol.* 128(4):499-508.

Polissi, A., Georgopoulos, C. (1996). Mutational analysis and properties of the msbA gene of *Escherichia coli*, coding for an essential ABC family transporter. *Mol. Microbiol.* 20(6):1221-1233.

Porsch-Ozcürümez, M., Langmann, T., Heimer, S., Borsukova, H., Kaminski, W.E., Drobnik, W., Honer, C., Schumacher, C., Schmitz, G. (2001). The zinc finger protein 202 (ZNF202) is a transcriptional repressor of ATP binding cassette transporter AT (ABCA1) and ABCG1 gene expression and a modulator of cellular lipid efflux. *J. Biol. Chem.* 276(15):12427-433.

Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., Stafforini, D.M., McIntyre, T.M. (2000). Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu. Rev. Biochem.* 69:419-445. Review.

Pullinger, C.R., Hakamata, H., Duchateau, P.N., Eng, C., Aouizerat, B.E., Cho, M.H., Fielding, C.J., Kane, J.P. (2000). Analysis of hABC1 gene 5' end: additional peptide sequence, promoter region, and four polymorphisms. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 271:451-455.

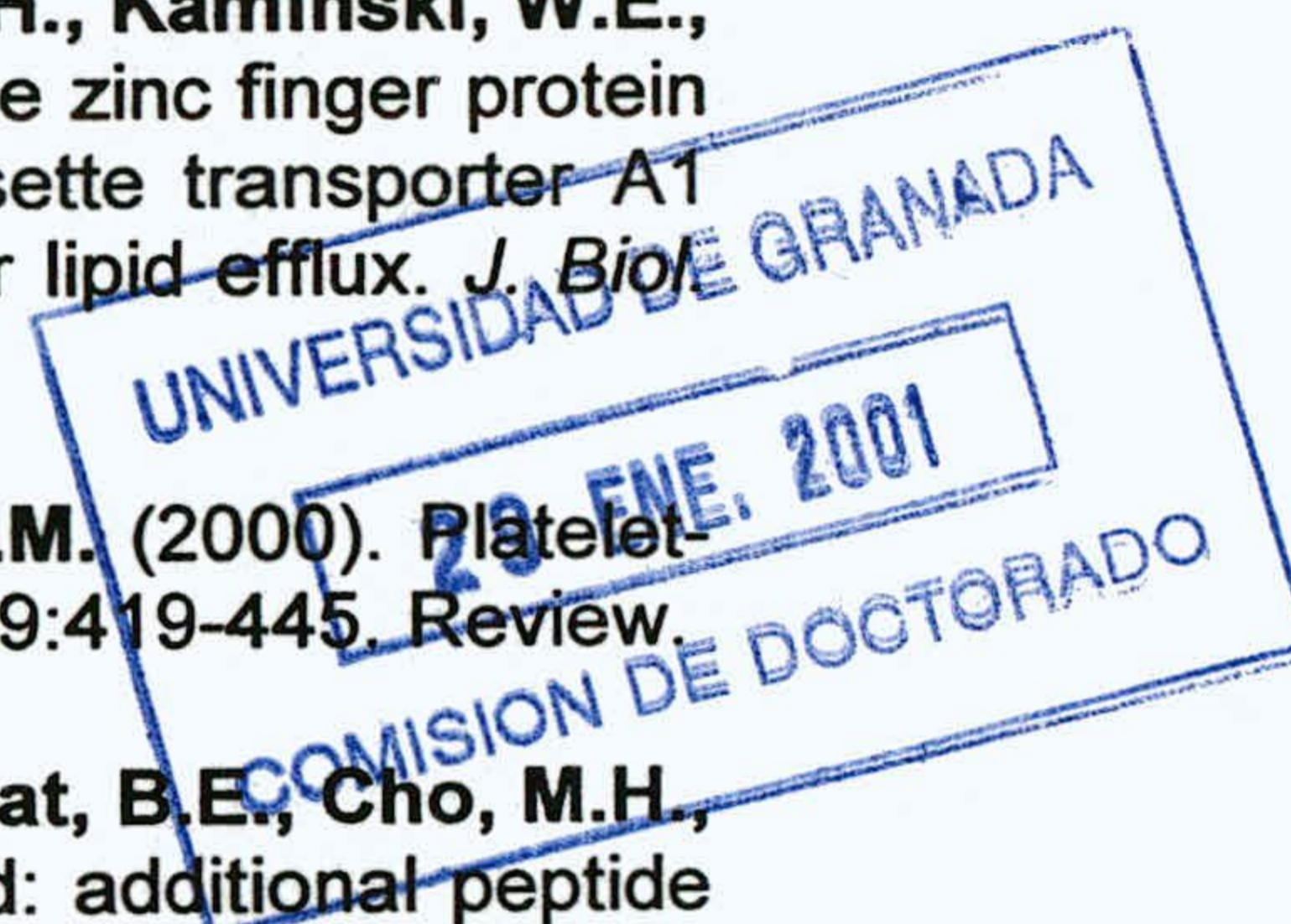
Quijada, L., Soto, M., Alonso, C., Requena, J.M. (1997). Analysis of post-transcriptional regulation operating on transcription products of the tandemly linked *Leishmania infantum* hsp70 genes. *J. Biol. Chem.* 272(7):4493-4499.

Quijada, L., Soto, M., Alonso, C., Requena, J.M. (2000). Identification of a putative regulatory element in the 3'-untranslated region that controls expression of HSP70 in *Leishmania infantum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 110(1):79-91.

Raggers, R.J., Pomorski, T., Holthuis, J.C., Kalin, N., van Meer, G. (2000). Lipid traffic: the ABC of transbilayer movement. *Traffic* 1(3):226-234. Review.

Raggers, R.J., van Helvoort, A., Evers, R., van Meer, G. (1999). The human multidrug resistance protein MRP1 translocates sphingolipid analogs across the plasma membrane. *J. Cell Sci.* 112:415-22.

Raggers, R.J., Vogels, I., van Meer, G. (2001). Multidrug-resistance P-glycoprotein (MDR1) secretes platelet-activating factor. *Biochem. J.* 357(Pt3):859-865.



- Randak, C., Neth, P., Auerswald, E.A., Assfalg-Machleidt, I., Roscher, A.A., Hadorn, H.B., Machleidt, W. (1996). A recombinant polypeptide model of the second predicted nucleotide binding fold of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a GTP-binding protein. *FEBS Lett.* 398(1):97-100.
- Reddien, P.W., Horvitz, H.R. (2000). CED-2/CrkII and CED-10/Rac control phagocytosis and cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Cell Biol.* 2(3):131-136.
- Reiter, I., Krammer, B., Schwamberger, G. (1999). Cutting edge: differential effect of apoptotic versus necrotic tumor cells on macrophage antitumor activities. *J. Immunol.* 163(4):1730-1732.
- Remaley, A.T. (1999). Human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1): genomic organization and identification of the genetic defect in the original Tangier disease kindred. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 96(22):12685-690.
- Repa, J.J., Turley, S.D., Lobaccaro, J.M.A., Medina, J., Li, L., Lustig, K., Shan, B., Heyman, R.A., Dietschy, J.M., Mangelsdorf, D.J. (2000). Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 289:1524-1529.
- Requena, J.M., Soto, M., Quijada, L., Carrillo, G., Alonso, C. (1997). A region containing repeated elements is associated with transcriptional termination of *Leishmania infantum* ribosomal RNA genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 84(1):101-110.
- Ridley, A.J. (2001). Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol.* 11(12):471-477.
- Rittig, M.G., Bogdan, C. (2000). *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitol. Today* 16(7):292-297. Review.
- Rossi, V., Wincker, P., Ravel, C., Blaineau, C., Pages, M., Bastien, P. (1994). Structural organisation of microsatellite families in the *Leishmania* genome and polymorphisms at two (CA)_n loci. *Mol. Biochem. Parasitol.* 65:271-282.
- Ruetz, S., Gros, P. (1994). Phosphatidylcholine translocase: a physiological role for the *mdr2* gene. *Cell* 77:1071-83.
- Russell, D.G., Xu, S., Chakraborty, P. (1992). Intracellular trafficking and the parasitophorous vacuole of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. *J. Cell Sci.* 103:1193-1210.
- Rust, S., Rosier, M., Funke, H., Real, J., Amoura, Z., Piette, J.C., Deleuze, J.F., Brewer, H.B., Duverger, N., Deneffe, P., Assmann, G. (1999). Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat. Genet.* 22(4):352-355.
- Sacks, D.L., Modi, G., Rowton, E., Spath, G., Epstein, L., Turco, S.J., Beverley, S.M. (2000). The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(1):406-411.

- Santamarina-Fojo, S., Peterson, K., Knapper, C., Qiu, Y., Freeman, L., Cheng, J., Osorio, J., Remaley, A., Yang, X., Haudenschild, C., Prades, C., Chimini, G., Blackmon, E., Francois, T., Duverger, N., Rubin, E.M., Rosier, M., Deneffe, P., Fredrickson, D.S., Brewer Jr, H.B. (2000). Complete genomic sequence of the human ABCA1 gene: analysis of the human and mouse ATP-binding cassette A promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(14):7987-92.
- Santamarina-Fojo, S., Remaley, A.T., Neufeld, E.B., Brewer Jr, H.B. (2001). Regulation and intracellular trafficking of the ABCA1 transporter. *J. Lipid Res.* 42:1339-45. Review.
- Schinkel, A.H., Mayer, U., Wagenaar, E., Mol, C.A., van Deemter, L., Smit, J.J., van der Valk, M.A., Voordouw, A.C., Spits, H., van Tellingen, O., Zijlmans, J.M., Fibbe, W.E., Borst, P. (1997). Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking *mdr1*-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 94(8):4028-33.
- Schlame, M., Hostetler, K.Y. (1997). Cardiolipin synthase from mammalian mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1348(1-2):207-213. Review.
- Schmitz G., Kaminski, W.E. (2001). ABC transporters and cholesterol metabolism. *Front. in Biosci.* 6:d505-514. Review.
- Schmitz, G., Kaminski, W.E., Porsch-Ozcurumez, M., Klucken, J., Orso, E., Bodzioch, M., Buchler, C., Drobnik, W. (1999). ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) in macrophages: a dual function in inflammation and lipid metabolism?. *Pathobiology* 67:236-240.
- Schwartz, K., Lawn, R.M., Wade, D.P. (2000). ABC1 gene expression and ApoA-I-mediated cholesterol efflux are regulated by LXR. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 274(3): 794-802.
- Seeber, F. (1997). Consensus sequence of translational initiation sites from *Toxoplasma gondii* genes. *Parasitol. Res.* 83(3):309-311.
- Seigneuret, M., Devaux, P.F. (1984). ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81(12):3751-3755.
- Shiao, Y., Balcerzak, B., Vance, J.E. (1998). A mitochondrial membrane protein is required for translocation of phosphatidylserine from mitochondria-associated membranes to mitochondria. *Biochem. J.* 331:217-223.
- Siegmund, A., Grant, A., Angeletti, C., Malone, L., Nichols, J.W., Rudolph, H.K. (1998). Loss of Drs2p does not abolish transfer of fluorescence-labeled phospholipids across the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273(51):34399-405.
- Siman-Tov, M.M., Aly, R., Shapira, M., Jaffe, C.L. (1996). Cloning from *Leishmania major* of a developmentally regulated gene, *c-lpk2*, for the catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 77(2):201-215.

- Singaraja, R.R., Bocher, V., James, E.R., Clee, S.M., Zhang, L.H., Leavitt, B.R., Tan, B., Brooks-Wilson, A., Kwok, A., Bissada, N., Yang, Y.Z., Liu, G., Tafuri, S.R., Fievet, C., Wellington, C.L., Staels, B., Hayden, M.R. (2001). Human ABCA1 BAC transgenic mice show increased high density lipoprotein cholesterol and ApoA1-dependent efflux stimulated by an internal promoter containing liver X receptor response elements in intron 1. *J. Biol. Chem.* 276(36):33969-979.
- Smit, J.J., Schinkel, A.H., Oude Elferink, R.P., Groen, A.K., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C.A., Ottenhoff, R., van der Lugt, N.M., van Roon, M.A. (1993). Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 75(3): 451-462.
- Smit, J.J., Schinkel, A.H., Mol, C.A., Majoor, D., Mooi, W.J., Jongsma, A.P., Lincke, C.R., Borst P. (1994). Tissue distribution of the human MDR3 P-glycoprotein. *Lab. Invest.* 71(5):638-649.
- Smith, A.J., de Vree, J.M., Ottenhoff, R., Oude Elferink, R.P., Schinkel, A.H., Borst, P. (1998). Hepatocyte-specific expression of the human MDR3 P-glycoprotein gene restores the biliary phosphatidylcholine excretion absent in *Mdr2* (-/-) mice. *Hepatology* 28(2): 530-536.
- Smith, A.J., Timmermans-Hereijgers, J.L., Roelofsen, B., Wirtz, K.W., van Blitterswijk, W.J., Smit, J.J., Schinkel, A.H., Borst P. (1994). The human MDR3 P-glycoprotein promotes translocation of phosphatidylcholine through the plasma membrane of fibroblast from transgenic mice. *FEBS Lett.* 354(3): 263-66.
- Snapp, E.L., Landfear, S.M. (1999). Characterization of a targeting motif for a flagellar membrane protein in *Leishmania enriettii*. *J. Biol. Chem.* 274(41):29543-548.
- Soto, M., Quijada, L., Alonso, C., Requena, J.M. (1997). Molecular cloning and analysis of expression of the *Leishmania infantum* histone H4 genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 90(2):439-447.
- Soto, M., Quijada, L., Alonso, C., Requena, J.M. (2000). Histone synthesis in *Leishmania infantum* is tightly linked to DNA replication by a translational control. *Biochem. J.* 346(Pt1):99-105.
- Soto, J., Toledo, J., Gutierrez, P., Nicholls, R.S., Padilla, J., Engel, J., Fischer, C., Voss, A., Berman, J. (2001). Treatment of American cutaneous leishmaniasis with miltefosine, an oral agent. *Clin. Infect. Diseases* 33(7):E57-61
- Spath, G.F., Epstein, L., Leader, B., Singer, S.M., Avila, H.A., Turco, S.J., Beverley, S.M. (2000). Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(16):9258-9263.
- Stiles, J.K. (1999). Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 93(8):781-807. Review.
- Sun, H., Smallwood, P.M., Nathans, J. (2000). Biochemical defects in ABCR protein variants associated with human retinopathies. *Nat. Genet.* 26(2):242-246.

Szabo, K., Bakos, E., Welker, E., Muller, M., Goodfellow, H.R., Higgins, C.F., Varadi, A., Sarkadi, B. (1997). Phosphorylation site mutations in the human multidrug transporter modulate its drug-stimulated ATPase activity. *J. Biol. Chem.* 272(37):23165-23171.

Szakács, G., Langmann, T. Ozvegy, C., Orso, E., Schmitz, G., Varadi, A., Sarkadi, B. (2001). Characterization of the ATPase cycle of human ABCA1: implications for its function as a regulator rather than an active transporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288(5):1258-1264.

Takada, Y., Takada, Y., Yamada, K., Taguchi, Y., Kino, K., Matsuo, M., Tucker, S.J., Komano, T., Amachi, T., Ueda, K. (1998). Non-equivalent cooperation between the two nucleotide-binding folds of P-glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta* 1373(1):131-136.

Takahashi, Y, Smith, J.D. (1999). Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(20):11358-11363.

Tanaka, A.R., Ikeda, Y., Abe-Dohmae, S., Arakawa, R., Sadanami, K., Kidera, A., Nakagawa, S., Nagase, T., Aoki, R., Kioka, N., Amachi, T., Yokoyama, S., Ueda, K. (2001). Human ABCA1 contains a large amino-terminal extracellular domain homologous to an epitope of Sjogren's Syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283(5):1019-25.

Tang, X.J., Halleck, M.S., Schlegel, R.A., Williamson, P. (1996). A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity. *Science* 272(5267):1495-1497.

Teixeira, S.M., Russell, D.G., Kirchhoff, L.V., Donelson, J.E. (1994). A differentially expressed gene family encoding "amastin," a surface protein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *J. Biol. Chem.* 269(32):20509-516.

Tsukamoto, K., Hirano, K., Tsujii, K., Ikegami, C., Zhongyan, Z., Nishida, Y., Ohama, T., Matsuura, F., Yamashita, S., Matsuzawa, Y. (2001). ATP-binding cassette transporter-1 induces rearrangement of actin cytoskeletons possibly through Cdc42/N-WASP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287(3):757-765.

Ullu, E., Matthews, K.R., Tschudi, C. (1993). Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts. *Mol. Cell. Biol.* 13(1):720-725.

Urbatsch, I.L. Beaudet, L., Carrier, I., Gros, P. (1998). Mutations in either nucleotide-binding site of P-glycoprotein (Mdr3) prevent vanadate trapping of nucleotide at both sites. *Biochemistry* 37(13):4592-4602.

Vaisman, B.L., Lambert, G., Amar, M., Joyce, C., Ito, T., Shamburek, R.D., Cain, W.J., Fruchart-Najib, J., Neufeld, E.D., Remaley, A.T., Brewer, H.B. Jr, Santamarina-Fojo, S. (2001). ABCA1 overexpression leads to hyperalphalipoproteinemia and increased biliary cholesterol excretion in transgenic mice. *J. Clin. Invest.* 108(2):303-309.

- Van Helvoort, A., Giudici, M.L., Thielemans, M., van Meer, G. (1997). Transport of sphingomyelin to the cell surface is inhibited by brefeldin A and in mitosis, where C₆-NBD-sphingomyelin is translocated across the plasma membrane by a multidrug transporter activity *J. Cell Sci.* 110:75-83.
- Van Helvoort, A., Smith, A.J., Sprong, H., Fritzsche, I., Schinkel, A.H., Borst, P., van Meer, G. (1996). MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell* 87(3):507-517.
- Venkateswaran, A., Laffitte, B.A., Joseph, S.B., Mak, P.A., Wilpitz, D.C., Edwards, P.A., Tontonoz, P. (2000). Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR α . *Proc. Nat. Acad. Sci.* 97(22): 12097-102.
- Venkateswaran, A., Repa, J.J., Lobaccaro, J.M., Bronson, A., Mangelsdorf, D.J., Edwards, P.A. (2000). Human white/murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols. *J. Biol. Chem.* 275(19): 14700-707.
- Voll, R.E., Herrmann, M., Roth, E.A., Stach, C., Kalden, J.R., Girkontaite, I. (1997). Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390(6658):350-351.
- Von Eckardstein, A., Langer, C., Engel, T., Schaukal, I., Cignarella, A., Reinhardt, J., Lorkowski, S., Li, Z., Zhou, X., Cullen, P., Assmann, G. (2001). ATP binding cassette transporter ABCA1 modulates the secretion of apolipoprotein E from human monocyte-derived macrophages. *FASEB J.* 15(9):1555-61.
- Voth, B.R., Kelly, B.L., Joshi, P.B., Ivens, A.C., McMaster, W.R. (1998). Differentially expressed *Leishmania major* gp63 genes encode cell surface leishmanolysin with distinct signals for glycosylphosphatidylinositol attachment. *Mol. Biochem. Parasitol.* 93(1):31-41.
- Wahle, E., Keller, W. (1992). The biochemistry of 3'-end cleavage and polyadenylation of messenger RNA precursors. *Annu. Rev. Biochem.* 61:419-440. Review.
- Wain, H.M., White, J.A., Povey, S. (2000). Proposed nomenclature for the human ABC genes, based on sub-family assignments. Abstract number 20. 2nd FEBS Advanced Lecture Course.
- Wang, N., Silver, D.L., Costet, P., Tall, A.R. (2000). Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1. *J. Biol. Chem.* 275(42): 33053-58.
- Wang, N., Silver, D.L., Thiele, C., Tall, A.R. (2001). ABCA1 functions as a cholesterol efflux regulatory protein. *J. Biol. Chem.* 276(26):23742-747.
- Wassef, M.K., Fioretti, T.B., Dwyer, D.M. (1985). Lipid analyses of isolated surface membranes of *Leishmania donovani* promastigotes. *Lipids* 20(2):108-115.
- Webb, J.R., Button, L.L., McMaster, W.R. (1991). Heterogeneity of the genes encoding the major surface glycoprotein of *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 48(2):173-184.

- Weise, F., Stierhof, Y.D., Kuhn, C., Wiese, M., Overath, P. (2000). Distribution of GPI-anchored proteins in the protozoan parasite *Leishmania*, based on an improved ultrastructural description using high-pressure frozen cells. *J. Cell Sci.* 113(Pt24):4587-4603.
- Weixel, K.M., Bradbury, N.A. (2000). The carboxyl terminus of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator binds to AP-2 clathrin adaptors. *J. Biol. Chem.* 275(5):3655-60.
- Weixel, K.M., Bradbury, N.A. (2001). Mu 2 binding directs the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the clathrin-mediated endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 276(49):46251-46259.
- Wen, L., Xu, P., Benegal, G., Carvalho, M.R., Buck, G.A. (2000). PPB1, a putative spliced leader RNA gene transcription factor in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 110(2):207-221.
- Williamson, P., Bevers, E.M., Smeets, E.F., Comfurius, P., Schlegel, R.A., Zwaal, R.F. (1995). Continuous analysis of the mechanism of activated transbilayer lipid movement in platelets. *Biochemistry* 34(33):10448-455.
- Winter, G., Fuchs, M., McConville, M.J., Stierhof, Y.D., Overath, P. (1994). Surface antigens of *Leishmania mexicana* amastigotes: characterization of glycoinositol phospholipids and a macrophage-derived glycosphingolipid. *J. Cell Sci.* 107:2471-2482.
- Wolday, D., Berhe, N., Akuffo, H., Britton, S. (1999). *Leishmania*-HIV interaction: immunopathogenic mechanisms. *Parasitol. Today* 15(5):182-187.
- Wu, Y.C., Horvitz, H.R. (1998a). *C. elegans* phagocytosis and cell-migration protein CED-5 is similar to human DOCK180. *Nature* 392(6675):501-504.
- Wu, Y.C., Horvitz, R.H. (1998b). The *C. elegans* cell corpse engulfment gene *ced-7* encodes a protein similar to ABC transporters. *Cell* 93:951-960.
- Yamauchi, K. (1991). The sequence flanking translational initiation site in protozoa. *Nucleic Acids Res.* 19:2715-2720.
- Yokoyama, S. (2000). Release of cellular cholesterol: molecular mechanism for cholesterol homeostasis in cells and in the body. *Biochim. Biophys. Acta* 1529: 231-244.
- Young, S.G., Fielding, C.J. (1999). The ABCs of cholesterol efflux. *Nat. Genet.* 22: 316-318.
- Yu, M.C., Sturm, N.R., Saito, R.M., Roberts, T.G., Campbell, D.A. (1998). Single nucleotide resolution of promoter activity and protein binding for the *Leishmania tarentolae* spliced leader RNA gene. *Mol. Biochem. Parasitol.* 94:265-281.
- Zha, X., Genest, J., McPherson R. (2001). Endocytosis is enhanced in Tangier fibroblasts: possible role of ATP-binding cassette protein A1 in endosomal vesicular transport. *J. Biol. Chem.* 276(42):39476-83.

- Zhou, Q., Zhao, J., Stout, J.G., Luhm, R.A., Wiedmer, T., Sims, P.J. (1997). Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase. A protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids. *J. Biol. Chem.* 272 (29):18240-244.
- Zhou, Q., Sims, P.J., Wiedmer, T. (1998a). Expression of proteins controlling transbilayer movement of plasma membrane phospholipids in the B lymphocytes from a patient with Scott syndrome. *Blood* 92(5):1707-1712.
- Zhou, Q.S., Sims, P.J., Wiedmer, T. (1998b). Identity of a conserved motif in phospholipid scramblase that is required for Ca^{2+} -accelerated transbilayer movement of membrane phospholipids. *Biochemistry* 37:2356-2360.
- Zhou, Y., Gottesman, M.M., Pastan, I. (1999a). Studies of human MDR1-MDR2 chimeras demonstrate the functional exchangeability of a major transmembrane segment of the multidrug transporter and phosphatidylcholine flippase. *Mol. Cell Biol.* 19(2):1450-1459.
- Zhou, Y., Gottesman, M.M., Pastan, I. (1999b). Studies of human MDR1-MDR2 chimeras demonstrate the functional exchangeability of a major transmembrane segment of the multidrug transporter and phosphatidylcholine flippase. *Mol. Cell Biol.* 19:1450-1459.
- Zhou, Z., White, K.A., Polissi, A., Georgopoulos, C., Raetz, C.R. (1998). Function of *Escherichia coli* MsbA, an essential ABC family transporter, in lipid A and phospholipid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 273(20):12466-12475.
- Zwaal, R.F., Schroit, A.J. (1997). Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 89:1121-1132.