

T-Rev. 16/62

T
16
108

UNIVERSIDAD DE GRANADA
INSTITUTO DE PARASITOLOGIA Y BIOMEDICINA LOPEZ-NEYRA
C.S.I.C

TESIS DOCTORAL

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 13-05-96
ENTRADA NUM. 968

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR
DEL GEN E DE LA FAMILIA GLICOPROTEÍNA-P DE
Leishmania tropica

Esther Lafuente Duarte
Granada, 1996

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento 019690344
Nº Copia 121243579

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento
Nº Copia

UNIVERSIDAD DE GRANADA
29 ABR. 1996
COMISION DE DOCTORADO

**CARACTERIZACION MOLECULAR DEL GEN E
DE LA FAMILIA GLICOPROTEINA-P
DE
*Leishmania tropica***

Directores de Tesis

Dr. Francisco Gamarro Conde



Dr. Santiago Castanys Cuello



Memoria presentada por la licenciada
Esther Lafuente Duarte para optar al
grado de Doctor en Ciencias Biológicas
por la Universidad de Granada. 1996

I. INTRODUCCION.	1
I.1 INTRODUCCION	1
I.2. CARACTERISTICAS GENERALES DE <i>Leishmania</i>.	2
I.3. BIOLOGIA MOLECULAR DE <i>Leishmania</i>.	4
I.3.1. El genoma de <i>Leishmania</i> .	4
I.3.2. El kinetoplasto: estructura y función.	5
I.3.3. Procesamiento del ARN mensajero.	5
I.3.3.1 "Trans-splicing".	6
I.3.3.2 Poliadenilación del extremo 3' de los mensajeros.	7
I.3.4. Corrección del ARN mitocondrial.	7
I.4. CARACTERISTICAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS EN <i>Leishmania</i>.	8
I.4.1. Características nutricionales.	8
I.4.2. Regulación del volumen celular	9
I.4.3. Regulación del pH intracelular.	10
I.4.4. Particularidades en la defensa frente a estrés oxidativo.	11
I.5. LEISHMANIOSIS: TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD.	13
I.5.1 Leishmaniosis.	13
I.5.2. Tratamiento de la enfermedad.	14
I.6. MECANISMOS DE RESISTENCIA A FÁRMACOS.	15
1.6.1. Amplificación génica.	15
1.6.2. Cambios estructurales y/o funcionales en la proteína blanco de acción de fármacos.	16
1.6.3. Alteración del transporte de fármacos.	17
1.6.4. Multirresistencia a fármacos (MDR).	17
I.7. LA SUPERFAMILIA DE TRANSPORTADORES ABC.	18
1.7.1. Organización estructural de los transportadores ABC.	19
1.7.1.1. Estructura y función de los dominios de transmembrana.	22
1.7.1.2. Estructura y función de los dominios de unión a ATP.	23
1.7.2. Función de los transportadores ABC.	26
I.8. LA FAMILIA MULTIGÉNICA DE LAS GLICOPROTEÍNAS-P.	27
1.8.1. Estructura de la glicoproteína-P.	28

1.8.1.1. Los dominios transmembrana.	28
1.8.1.2. Los dominios de unión a ATP.	30
I.9. MODIFICACIONES COVALENTES DE LA GLICOPROTEÍNA-P.	31
I.9.1. Glicosilación.	31
I.9.2. Fosforilación.	32
I.10. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA GLICOPROTEINA-P	33
I.11. PAPEL FUNCIONAL DE LA GLICOPROTEINA-P.	34
I.11.1. Transporte de compuestos xenobióticos.	34
I.11.2. Canal de Cl ⁻ o regulador de canales de Cl ⁻ .	36
I.11.3. Modificador de pH intracelular.	37
I.12. GLICOPROTEINAS-P EN PARASITOS.	38
I.12.1. Glicoproteínas-P en <i>Plasmodium falciparum</i> : el gen <i>pfmdr1</i> .	39
I.12.2. La familia de glicoproteínas-P en <i>Leishmania ssp.</i>	40
I.12.2.1. La <i>pgpA</i> y glicoproteínas-P relacionadas.	41
I.12.2.2. Las glicoproteínas-P <i>mdr</i> en <i>Leishmania</i> .	42
I.12.3. Glicoproteína-P en <i>Trypanosoma cruzi</i> : El gen <i>tcpgp2</i> .	43
I.13. OTROS TRANSPORTADORES ABC.	43
I.13.1. La proteína asociada a multirresistencia a fármacos: MRP.	43
I.13.2. El gen CFTR.	44
I. MATERIAL Y METODOS	46
II.1. MATERIAL.	46
II.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO.	46
II.1.1.1. Parásitos.	46
II.1.1.2. Bacterias y levaduras.	46
II.1.2. REACTIVOS QUÍMICOS.	46
II.1.2.1 Medios de cultivo.	47
II.1.2.1.1. Medio de cultivo para parásitos	47
II.1.2.1.2. Medio de cultivo para bacterias.	48
II.1.3. ANTIBIÓTICOS Y FÁRMACOS.	48
II.1.4. TAMPONES Y SOLUCIONES.	49
II.1.5. VECTORES DE CLONAJE Y EXPRESIÓN.	51
II.1.5.1. Construcción molecular del vector de transfección pKSNEOA.	51
I.1.6. PATRONES DE PESOS MOLECULARES	54

II.1.6.1. Electroforesis de DNA.	54
II.1.7. OLIGONUCLEOTIDOS.	54
II.1.8. INSTRUMENTACION Y "SOFTWARE".	56
II.1.8.1. Instrumentación.	56
II.1.8.1.1. Para el cultivo de parásitos.	56
II.1.8.1.2. Para el cultivo de bacterias.	56
II.1.8.1.3. Centrífugas.	56
II.1.8.1.4. Para eletroforesis.	56
II.1.8.1.5. Otros.	57
II.2. METODOS.	58
II.2.1. CULTIVO DE CELULAS.	58
II.2.1.1 Cultivo y mantenimiento de <i>Leishmania</i>	58
II.2.1.1.1. Cultivo "in vitro" de <i>Leishmania tropica</i> .	58
II.2.1.1.2. Criopreservación y Descongelación.	59
II.2.1.2. Cultivo y preservación de bacterias	59
II.2.1.2.1. Cultivo de bacterias.	59
II.2.1.2.2. Mantenimiento de bacterias.	60
II.2.1.3. Cultivo de levaduras.	60
II.2.2. MANIPULACIÓN DE BACTERIAS.	60
II.2.2.1. Preparación de células competentes mediante el método del CaCl ₂ .	60
II.2.2.2. Transformación de bacterias competentes.	60
II.2.2.3. Infección de bacterias con el fago lisogénico M13.	61
II.2.2.4. Infección de bacterias con el fago lítico λ EMBL3.	61
II.2.2.4.2. Preparación de un lisado líquido de bacterias con λ EMBL3.	62
II.2.2.4.2. Preparación de un lisado líquido de bacterias con λ EMBL3.	62
II.2.3.1. Obtención de placas de lisis no confluyentes.	63
II.2.3.2. Transferencia de los fagos a filtros de nitrocelulosa e hibridación.	63
II.2.3.3. Aislamiento y almacenamiento de los clones positivos.	64
II.2.4. AISLAMIENTO DE ACIDOS NUCLEICOS.	64
II.2.4.1. Aislamiento de ADN.	64
II.2.4.1.1 Aislamiento del ADN de la forma promastigote de	

<i>Leishmania.</i>	64
II.2.4.1.2. Aislamiento del ADN plasmídico.	65
II.2.4.1.2.1. Obtención de ADN plasmídico a pequeña escala.	65
II.2.4.1.2.1.1. Método de lisis alcalina.	65
II.2.4.1.2.1.2. Minipreparación de Litio.	66
II.2.4.1.2.1.3. "Magic Miniprep [®] ".	66
II.2.4.1.2.2. Obtención de ADN plasmídico a gran escala.	66
"Magic Maxiprep [®] ".	
II.2.4.1.3. Aislamiento de ADN del bacteriófago M13.	67
II.2.4.1.4. Aislamiento de DNA del bacteriófago λ EMBL3.	67
II.2.4.2. Aislamiento de ARN	67
II.2.4.2.1. Aislamiento de ARN total de <i>Leishmania tropica</i> .	67
II.2.5. CUANTIFICACION DE ACIDOS NUCLEICOS.	68
II.2.6. TRATAMIENTO ENZIMATICO DEL ADN.	68
II.2.6.1. Digestiones con endonucleasas de restricción.	69
II.2.6.2. Tratamiento del DNA con T4 DNA polimerasa.	69
II.2.6.3. Tratamiento del DNA con fosfatasa alcalina.	69
II.2.6.4. Reacción de ligamiento.	69
II.2.7. ELECTROFORESIS DE ACIDOS NUCLEICOS.	70
II.2.7.1. Electroforesis de ADN en geles horizontales de agarosa.	70
II.2.7.2. Electroforesis de ARN en geles horizontales de agarosa.	71
II.2.7.3. "CHEF electroforesis".	71
II.2.7.3.1. Preparación de muestras para CHEF.	71
II.2.7.3.1.1. Preparación de muestras de <i>Leishmania</i> para CHEF .	71
II.2.7.3.1.2. Preparación de marcadores de levadura para CHEF.	72
II.2.7.3.1.3. Condiciones de electroforesis.	72
II.2.8. AISLAMIENTO Y LIMPIEZA DE FRAGMENTOS DE ADN.	73
II.2.9. MARCAJE RADIATIVO DEL ADN CON [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP.	73
II.2.10. TRANSFERENCIA DE ACIDOS NUCLEICOS A SOPORTE SOLIDO.	74
II.2.10.1. Transferencia del ADN a filtros de nylon. ("Southern blot").	74

II.2.10.2. Transferencia del ARN a filtros de nylon. ("Northen blot").	74
II.2.11. HIBRIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS CON SONDAS RADIATIVAS.	74
II.2.12. REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).	75
II.2.13. REACCION DE RT-PCR.	76
II.2.14. SECUENCIACION DEL ADN.	77
II.2.14.1. Secuenciación del ADN mediante Sequenase® v.2.0.	77
II.2.14.2. Secuenciación del ADN por PCR.	78
II.2.15. TRANSFECCION EN <i>Leishmania tropica</i> .	78
II.2.16. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS INHIBITORIA 50 (DI ₅₀).	79
II.2.17. OBTENCIÓN DE PROTEINAS TOTALES DE <i>Leishmania</i> .	80
II.2.18. OBTENCION DE PROTEINAS DE MEMBRANAS EN <i>Leishmania</i> .	80
II.2.19. CUANTIFICACION DE PROTEINAS.	80
II.2.20. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS: SDS-PAGE.	81
II.2.21. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANAS 81 DE NYLON.	82
II.2.22. PURIFICACION DE PROTEINAS RECOMBINANTES.	82
II.2.22.1. Obtención de la fracción soluble proteica de un lisado bacteriano.	82
II.2.22.2. Preparación de las columna de afinidad Sepharosa 4B-GSH.	82
II.2.22.3. Purificación de la proteína de fusión.	82
II.2.23. PREPARACION DE ANTICUERPOS POLICLONALES EN CONEJO.	83
II.2.24. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	84
II.2.25. PURIFICACION DE ANTICUERPOS DE CONEJO.	84
II.2.26. CONJUGACION DE PROTEINAS A CNBr-Sepharosa 4B.	85
II.2.27. INMUNODETECCION EN MEMBRANAS. "WESTERN BLOT"	86
II.2.28. DETERMINACION DE AMINOACIDOS POR EL METODO DE LA FLUORESCAMINA.	86
II.2.28.1 Determinación de la liberación dependiente de tiempo de aminoácidos al medio tras choque hipotónico.	86

II.2.28.2 Determinación de la concentración de aminoácidos intracelulares tras choque hipotónico en <i>L. tropica</i> .	87
II.2.29. DETERMINACION DE LA COMPOSICION DE AMINOACIDOS POR HPLC.	88
II.2.30. MEDIDA DE pH CITOPLASMATICO.	88
II.2.30.1. Medida de pH citoplasmático.	88
II.2.30.2. Calibración del pH.	89
III. OBJETIVOS	
IV. RESULTADOS	
IV.1. PRESENCIA DE UNA FAMILIA DE GENES GLICOPROTEINA-P EN <i>L. tropica</i> LRC-L39.	90
IV.2. AISLAMIENTO DEL GEN <i>ltrpgpE</i> DE <i>L. tropica</i> .	91
IV.3. CLONAJE Y SECUENCIACION DEL GEN <i>ltrpgpE</i> DE <i>L. tropica</i> .	93
IV.4. ANALISIS DE LA SECUENCIA DE AMINOACIDOS DEL GEN <i>ltrpgpE</i> .	99
IV.5. ANALISIS DE LA ESTRUCTURA PREDICTIVA DEL GEN <i>ltrpgpE</i> .	100
IV.6. ORGANIZACION GENOMICA DEL GEN <i>ltrpgpE</i> DE <i>L.tropica</i> .	101
IV.7. LOCALIZACION CROMOSOMICA DEL GEN <i>ltrpgpE</i> DE <i>L. tropica</i> .	103
IV.8. TRANSFECCION DEL GEN <i>ltrpgpE</i> .	104
IV.8.1. Construcción de plásmidos para transfección conteniendo secuencias del gen <i>ltrpgpE</i> .	106
IV.8.1.1. Obtención del plásmido pSBE.	106
IV.8.1.2. Obtención del plásmido pX-E 5'Δ.	109
IV.8.1.3. Obtención del plásmido pKSN-E.	109
IV.8.2. Transfección de <i>Leishmania tropica</i> LRC-I39	112
IV.8.2.1. Electroporación de <i>Leishmania tropica</i> LRC-L39	112
IV.8.3. Análisis molecular de las formas promastigotas transfectadas de <i>Leishmania tropica</i> .	113
IV.8.3.1 Localización de secuencias de los plásmidos de	

transfección en <i>Leishmania tropica</i>	113
IV.8.4.3 Análisis de restricción del plásmido pKSN-E en los parásitos transfectados.	115
IV.8.4.2 Análisis cromosómico en los parásitos transfectados.	117
IV.8.3.3. Análisis de la expresión de los plásmidos transfectados en <i>Leishmania</i> .	119
IV.9. LOCALIZACIÓN DEL ACEPTOR DEL MINIEXON DEL GEN <i>ltrpgpE</i> .	121
IV.10. OBTENCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES DIRIGIDOS FRENTE AL PRODUCTO DEL GEN LTRPGPE	124
IV.10.1. Amplificación del fragmento de ADN que codifica para el péptido de unión.	124
IV.10.2. Análisis de la expresión de la proteína de fusión.	126
IV.10.3. Purificación de la proteína de fusión.	126
IV.10.4. Obtención de sueros inmunes de conejo.	127
IV.10.5. Purificación de anticuerpos policlonales de conejo.	128
IV.11. ANALISIS FUNCIONAL DE <i>pgpE</i> .	128
IV.11.1. Estudios de resistencia a fármacos en <i>Leishmania tropica</i> transfectada con el gen <i>ltrpgpE</i> .	129
IV.12 ANALISIS DE LA RESPUESTA REGULADORA DEL VOLUMEN INTRACELULAR FRENTE A CHOQUE HIPOTONICO EN DIFERENTES LINEAS DE <i>L. tropica</i> .	131
I.V.13 MEDIDA DEL pH INTRACELULAR EN DIFERENTES LINEAS DE <i>Leishmania tropica</i> .	139
IV.13.1. Calibración y medida del pH intracelular en <i>L. tropica</i> .	139
 V. DISCUSION	 142
 V.1.INTRODUCCION.	 142
V.2. ORGANIZACION GENOMICA DEL GEN <i>ltrpgpE</i> .	143
V.3. LOCALIZACION CROMOSOMICA DEL GEN <i>ltrpgpE</i> .	144
V.4. ANALISIS DE LA SECUENCIA NUCLEOTIDICA DEL GEN <i>ltrpgpE</i> .	145
V.5. ANALISIS DE LA SECUENCIA DE AMINOACIDOS DEL GEN <i>ltrpgpE</i> .	148

V.6. ANALISIS DE LA ESTRUCTURA PREDICTIVA DEL GEN <i>ltrpgpE</i>.	148
V.7. IMPLICACION DEL GEN <i>ltrpgpE</i> EN MECANISMOS REGULADORES DE VOLUMEN CELULAR.	150
VI. CONCLUSIONES.	153
V.II. BIBLIOGRAFIA.	154

INTRODUCCION

I. INTRODUCCION.

I.1 INTRODUCCION

Hace algunos años la leishmaniosis constituía un intrincado y escasamente definido grupo de enfermedades consideradas más como una curiosidad que como un problema de salud pública. Hoy por hoy, la leishmaniosis es una de las principales enfermedades parasitarias que junto a tripanosomiasis y malaria afectan a millones de personas en el mundo. Según estimaciones se originan al año unos 400.000 nuevos casos, siendo unos 270 los millones de personas expuestas a la misma (Ashford y col, 1992). Ampliamente distribuida, la enfermedad se encuentra en extensión siendo cada vez más frecuente la aparición de nuevos focos que afectan sobre todo a pacientes inmunodeprimidos: bajo inmunoterapia, transplantados y enfermos de SIDA (Bouree y col., 1993).

El fallo en la prevención de la enfermedad, que supondría una mejora de la calidad de vida, la falta de una vacuna capaz de proporcionar una larga y duradera inmunidad, junto a la carencia de un tratamiento terapéutico eficaz, hacen que la leishmaniosis así como su agente causal, el protozoo parásito *Leishmania*, esten cada vez más en el punto de mira de bioquímicos, parasitólogos, entomólogos y especialistas en salud pública.

Uno de los graves problemas a los que se enfrenta el tratamiento de las enfermedades parasitarias es el fallo en el tratamiento terapéutico. Si bien la accesibilidad del fármaco al parásito y la biotransformación del mismo por el hospedador son dos factores a tener en cuenta, hay que destacar el hecho de que cada vez es más frecuente la aparición de resistencia adquirida a los fármacos de elección. Se han descrito resistencias a fármacos en afecciones como leishmaniosis, malaria, tripanosomiasis, giardiasis, trichonomiasis, amebiasis y helmintiasis destacando en muchas de ellas la expresión en el parásito de glicoproteínas-P, homólogas a las de células tumorales.

El objeto de estudio de la presente tesis es la caracterización molecular y funcional de un gen glicoproteína-P en *Leishmania tropica* con el fin de esclarecer el papel funcional de dicha proteína en el desarrollo de resistencia a fármacos en parásitos.

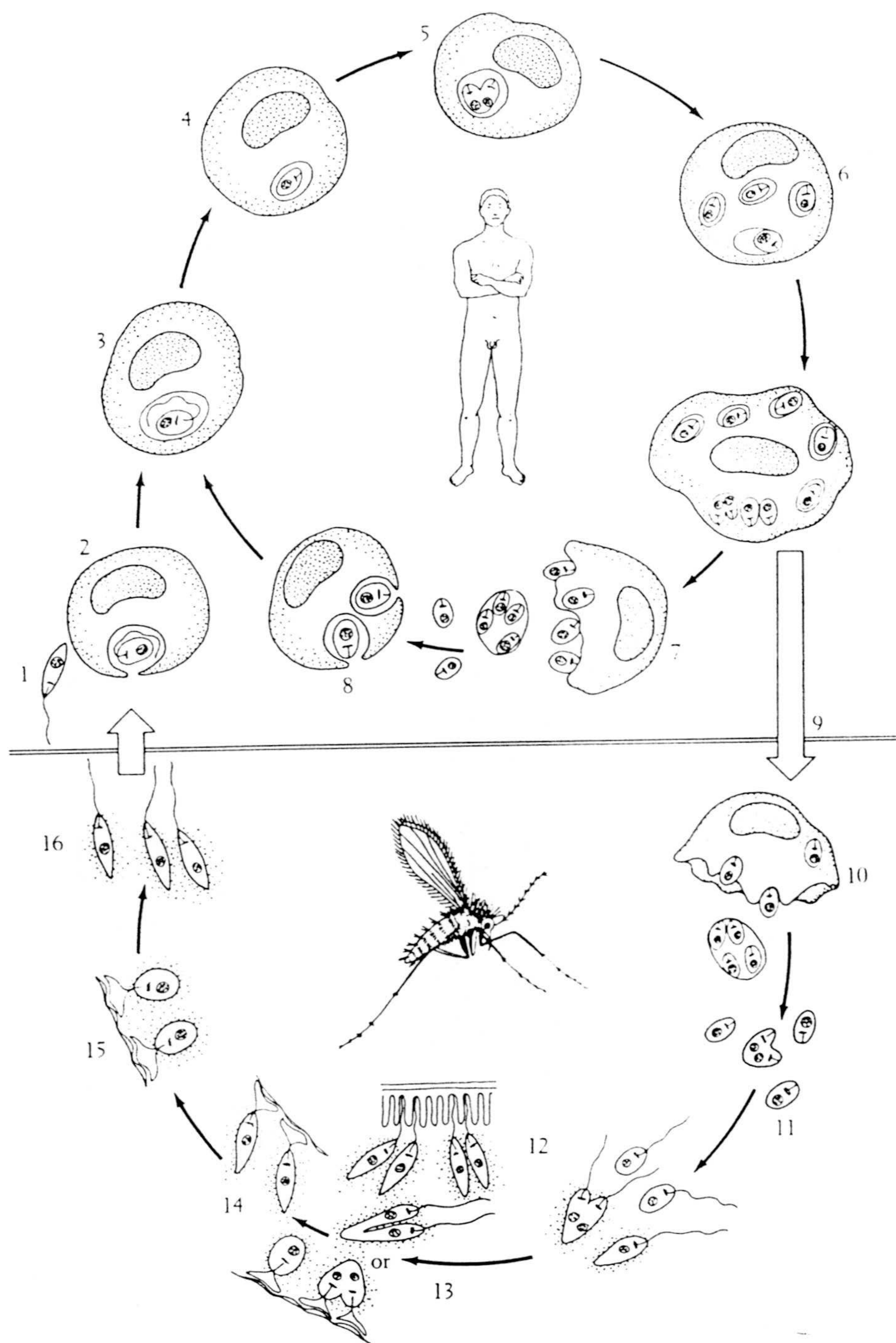


Figura I.1: Ciclo de vida de *Leishmania*: (1) Liberación de promastigotes en el hospedador vertebrado por la picadura del insecto vector. (2) Unión y fagocitosis del promastigote por el macrófago. (3) Unión del fagosoma, que contiene al promastigote, con el lisosoma. (4) Diferenciación del promastigote a amastigote. (5) y (6) Multiplicación del amastigote en la vacuola parasitófora. (7) Ruptura de los macrófagos parasitados y liberación de los amastigotes. (8) Fagocitosis de amastigotes por los macrófagos. (9) Ingestión de los macrófagos parasitados por el vector tras picar a un vertebrado parasitado. (10-16) Desarrollo de los promastigotes en el tracto intestinal del vector.

I.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *Leishmania*.

Los miembros del género *Leishmania* constituyen un grupo de protozoos parásitos unicelulares pertenecientes a la familia Triponosomatidae, orden Kinetoplastida, que presentan un ciclo de vida heterogéneo. *Leishmania* puede existir bajo dos formas distintas: la forma promastigote, que reside en el tracto digestivo del insecto vector y que se caracteriza por ser extracelular, flagelada y móvil; y la forma amastigote que es intracelular, reside en los macrófagos del hospedador vertebrado, no flagelada e inmóvil (Chang y col, 1985).

El ciclo de vida de *Leishmania* se inicia cuando la hembra del insecto vector, (género *Phlebotomus* y *Lutzomya*) se infecta al picar a un hospedador vertebrado generalmente un canino o roedor, y ocasionalmente un hombre. Durante la ingestión, los macrófagos cargados de parásitos se rompen liberando amastigotes en el tracto intestinal del insecto, donde en los próximos días se convertirán en promastigotes flagelados. Los promastigotes, aún formas no infectivas del vertebrado hospedador (formas procíclicas), se anclan al epitelio intestinal del vector y se replican de forma exponencial por fisión binaria hasta madurar hacia formas infectivas (metacíclicas). El promastigote maduro se libera del epitelio intestinal y migra hacia la proboscide del vector donde espera para transmitirse en la próxima picadura. Una vez dentro del huesped, el parásito es fagocitado por los macrófagos dentro de la vacuola parasitófora donde se transforma en la forma amastigota aflagelada, y es en este ambiente altamente oxidativo, de bajo pH, rico en proteínas catiónicas e hidrolasas, donde el amastigote continúa replicándose por fisión binaria (Bry y Alexander, 1987). Cuando la célula inicialmente infectada está cargada de parásitos, se rompe liberando amastigotes que son de nuevo fagocitados por macrófagos, iniciándose así un nuevo ciclo de infección y replicación. El ciclo de vida se completa cuando el insecto vector ingiere monocitos o macrófagos infectados durante una ingesta de sangre (Leiby y col, 1994).

Se conocen más de 20 especies y subespecies del género *Leishmania* de las cuales la O.M.S distingue 7 especies como causantes de leishmaniosis en el hombre: *L. donovani*, *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiópica*, *L. mexicana*, *L. brasiliensis* y *L. peruviana*. Esta clasificación se ha realizado en base a criterios clínicos de la enfermedad, criterios ecológicos, biológicos, bioquímicos e inmunológicos. Los esfuerzos actuales en la clasificación de especies en *Leishmania* se dirigen cada vez más al aspecto bioquímico y molecular del parásito. En este sentido los avances en la Biología Molecular del parásito en los últimos años, han permitido conocer la localización cromosómica de distintos marcadores génicos, que puede ser utilizada para el estudio cariotípico de cada especie. Así mismo, se han podido obtener sondas de ADN,

procedentes de los minicírculos del kinetoplasto, capaces de diferenciar entre distintas subespecies de *Leishmania*. Por tanto el conocimiento de la Biología Molecular de *Leishmania* podrá proporcionar una técnica más certera en la clasificación de especies, facilitando el diagnóstico de la enfermedad.

I.3. BIOLOGIA MOLECULAR DE *Leishmania*.

Desde el punto de vista molecular, los Kinetoplastidos, presentan características moleculares únicas como son la presencia del kinetoplasto, la variación antigénica mediada por la reorganización génica, y mecanismos de procesamiento de ARN mensajero inusuales, como son la adición de una secuencia "leader" en el extremo 5' por "trans-splicing" y la corrección de los ARNs mitocondriales.

I.3.1. El genoma de *Leishmania*.

Leishmania presenta un genoma pequeño, con un tamaño que oscila, según la especie, entre 10^7 y 10^8 pares de bases (pb), con un alto porcentaje de G+C y localizado en dos compartimentos: por un lado el ADN cromosomal y episomal localizado en el núcleo celular, y por otro el kinetoplasto, un ADN de localización mitocondrial.

El DNA cromosómico se distribuye formando de 25 a 30 cromosomas pequeños, que no condensan durante el ciclo celular. Este hecho ha impedido llevar a cabo un estudio citogenético de *Leishmania* y el análisis cariotípico no ha sido posible hasta el desarrollo de la técnica de electroforesis en campo pulsante. Mediante electroforesis en campo pulsante, los cromosomas de *Leishmania* se desarrollan como bandas lineales con tamaños que oscilan entre 200 Kb y más de 3 Mb. Los elementos episomales o ADN extracromosomales, de frecuente aparición en stocks del parásito y durante el desarrollo de resistencia a fármacos, migran como pequeñas moléculas de ADN, de forma anómala, con independencia de tiempo de pulso. El ADN del kinetoplasto queda retenido en los pocillos del gel (Lighthall y Giannini, 1992).

El estudio cromosómico de diferentes especies de *Leishmania* ha revelado un significativo polimorfismo, tanto a nivel de tamaño como a nivel de localización génica. Así, por ejemplo, se

ha visto que el gen de la α -tubulina mapea en cromosomas de distinto tamaño en diferentes aislados, y que el gen de la β -tubulina no solo mapea en cromosomas que presentan diferencia de tamaño entre aislados, sino que también existe variación en el número de cromosomas que contienen secuencias homólogas (Comeau, 1986). En cuanto a la dotación genética del parásito, aún existe controversia acerca de si *Leishmania* es un organismo haploide o diploide, aunque los datos disponibles indican que el parásito es diploide en la mayoría de sus loci, siendo aneuploide para otros (Lighthall y col., 1992; Cruz y col., 1993).

I.3.2. El kinetoplasto: estructura y función.

Además del ADN nuclear, *Leishmania* tiene el típico ADN mitocondrial llamado kinetoplasto, que representa del 10% al 15% del ADN de la célula. Está constituido por dos tipos de moléculas de ADN circular, los maxicírculos y los minicírculos, que se disponen concatenados originando una estructura en forma de red. La razón de esta compleja estructura podría ser permitir el mantenimiento de la heterogeneidad del genoma mitocondrial, evitando los riesgos de segregación mitótica de minicírculos y maxicírculos (Borst, 1991).

Los maxicírculos constituyen el ADN mitocondrial del parásito, tienen un tamaño que oscila entre 20 y 30 kb, se encuentran en un número de aproximadamente 50 copias por célula y codifican para ARN ribosómicos y algunos genes estructurales de la mitocondria (Thiemann y col., 1994). Los minicírculos con un tamaño aproximado de 900 pb constituyen el 10% del ADN celular encontrándose repetidos entre 10.000 a 100.000 veces por kinetoplasto. Codifican algunos, sino todos, los ARNs guía requeridos para la edición de los transcritos del maxicírculo (Sturm y Simpson, 1991). Una característica del ADN de los minicírculos es la heterogeneidad de sus secuencias incluso dentro de un mismo kinetoplasto, y esta heterogeneidad se correlaciona con el número de ARNs guías que se requieren para la completa edición del ARN codificado por los maxicírculos (Hajduk y col., 1993).

I.3.3. Procesamiento del ARN mensajero.

La transcripción en Tripanosomatidos, al igual que en procariotas, es policistrónica. Muchas de las unidades de transcripción policistrónicas contienen genes repetidos en tandem cabeza cola, con cortas regiones espaciadoras no codificantes, que no deben confundirse con

intrones. Pero la transcripción policistrónica no es exclusiva de alineaciones en tandem, sino que también se produce en genes de copia única ligados físicamente.

Los ARNs policistrónicos son procesados en el núcleo para dar lugar a ARN monocistrónicos que serán traducidos a proteínas en el citoplasma. Las señales necesarias para el procesamiento de los pre-ARNm es decir, los sitios de poliadenilación de los genes situados cadena arriba y los sitios para el "trans-splicing" de los genes situados cadena abajo, se localizan en las regiones intergénicas (González y col., 1985; Landfear y col., 1986). Aún no han sido identificados promotores en *Leishmania* y se cree que, siendo la transcripción policistrónica, estos se encuentren localizados cadena arriba de las alineaciones en tandem (González y col., 1985).

La maduración de los pre-ARNm involucra dos procesos: "trans-splicing" de una molécula de 35 ribonucleótidos en el extremo 5' del pre-ARNm y; poliadenilación de los mensajeros en su extremo 3'.

I.3.3.1 "Trans-splicing".

La maduración post-transcripcional del ARNm se lleva a cabo, en Tripanosomatidos, por la unión al extremo 5' de todos los pre-ARNm nucleares, de una secuencia de 35 ribonucleótidos conocida como "spliced leader" o mini-exón.

Esta secuencia "spliced leader" es codificada en *L. enriettii*, por un gen de 438 pb alineado en tandem, de aproximadamente 200 copias, que se transcribe en un precursor de 85 nucleótidos que contiene los 35 nucleótidos de la secuencia "leader" (revisado por Wirth, D.). En *Trypanosoma* ha sido descrito que el mini-exón presenta una serie de modificaciones en su extremo 5' como son: una estructura en caperuza, 7-metil-guanosina; modificaciones en los residuos de ribosa de los 4 primeros nucleótidos, y modificaciones en las bases nitrogenadas de los nucleótidos 1 y 4 (Laird y col., 1989; Agabian y col., 1990).

La secuencia "leader" está unida a una secuencia consenso, situada en el extremo 5' del sitio de inicio de translación del pre-ARNm, por un complejo mecanismo de "trans-splicing". Comparaciones entre secuencias de distintos ARNm de Tripanosomatidos parecen indicar que el sitio aceptor de "splicing" en el pre-ARNm es el dinucleótido universal 5'AG3', situado a una distancia variable del codón de iniciación, siendo una señal también importante para el "trans-

splicing" la presencia de una zona rica en pirimidinas situada cadena arriba del sitio AG (Curotto de Lafaille, 1992).

En el proceso de "trans-splicing" intervienen el llamado "spliceosoma" constituido por el mini-exón, el preARNm y unos pequeños ARNs nucleares homólogos a los U2, U4, U6 y recientemente U5, descritos en "cis-splicing" (Tschudi y Ullu, 1990; Palfi y col., 1994), así como proteínas asociadas a los ARNs U, al igual que ocurre en el "cis-splicing".

Desde el punto de vista funcional, el "trans-splicing" parece desempeñar un papel en el mantenimiento de la estabilidad de los ARNm, como muestran experimentos en los que los ARNm inmaduros son inestables cuando el "trans-splicing" está inhibido (Tschudi y Ullu, 1990). Por otra parte la eficiencia en el "trans-splicing" podría jugar un importante papel en el control de los niveles de ARNm (Curotto de Lafaille, 1992).

I.3.3.2 Poliadenilación del extremo 3' de los mensajeros.

La poliadenilación de los ARN mensajeros en su extremo 3' ocurre de una forma muy similar a como tiene lugar en los restantes eucariotas: formación de un corte endonucleolítico y adición de restos de adenosina. Sin embargo la señal de poliadenilación AAUAAA, que se encuentra de -15 a -30 bases por encima del punto de corte en los mensajeros eucariotas, no ha sido localizada en los mensajeros de tripanosomátidos (Borts y col., 1986; Kapler y col., 1990). La adición de la cola de adenosina en Tripanosomatidos, tiene una función reguladora de la expresión génica, al determinar la estabilidad de los mensajeros y por consiguiente sus niveles en la célula (Hugh y col., 1993).

Estudios realizados en la región intergénica de la enzima DHFR-TS de *L. major*, muestran que el sitio de poliadenilación no está determinado por motivos consensus sino por su distancia al próximo aceptor de "splicing" funcional cadena abajo. De hecho, análisis de regiones intergénicas de *Leishmania*, muestran que el sitio de poliadenilación tiene tendencia a localizarse a una distancia fija del próximo aceptor de "splicing", entre 85 y 660 nucleótidos. (LeBowitz y col., 1993)

I.3.4. Corrección del ARN mitocondrial.

La corrección del ARN ("editing") se define como una serie de eventos que intervienen en el procesamiento del ARN y que resultan en la producción de un ARNm que difiere en la secuencia de nucleótidos del gen codificante (Simpson y col., 1989). Aunque ha sido descrita en otros organismos, en Kinetoplastidos constituye un mecanismo especial cuya función es la formación de ARNms traducibles, así como un mejor control de la regulación de las actividades mitocondriales (Hajduk y col., 1993).

Consiste en la adición y delección postranscripcional de residuos de uridina en los ARNs mensajeros, que conduce a la formación de codones de iniciación para la traslación mitocondrial, la formación de marcos abiertos de lectura, y cambios de fase de traducción. La información necesaria para la inserción y delección de uridinas en el ARNm se encuentra en pequeños transcritos mitocondriales llamados ARNs guía (ARNgs), codificados en su mayor parte en los minicírculos, aunque en *Leishmania tarentolae* han sido descritos al menos 7 ARNgs codificados por los maxicírculos del kinetoplasto (Hajduk y col., 1993).

El análisis de la corrección del ARN mitocondrial ha sido utilizado para establecer las distancias evolutivas dentro del orden Kinetoplastida (Maslov y col., 1994). Desde el punto de vista evolutivo, una corrección completa del ARN parece ser más antigua que la corrección del RNA tan solo en 5'. El género *Leishmania* tiene una corrección de su ARN mitocondrial tan solo en el extremo 5', y es considerado junto a *Crithidia fasciculata*, el género más evolucionado del orden Kinetoplastida.

I.4. CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS EN *Leishmania*.

Además de sus características moleculares, *Leishmania* junto a otros miembros del orden Kinetoplastida, presentan una serie de peculiaridades a nivel bioquímico y fisiológico que los diferencian del resto de eucariotas y procariotas. Entre otras destacan las siguientes:

I.4.1. Características nutricionales.

Leishmania utiliza los azúcares, sobre todo glucosa, como fuente principal de carbono y energía. La glucosa es transportada a través de la membrana en contra del gradiente de concentración y catabolizada en los **glicosomas**, orgánulos característicos de Kinetoplastidos que contiene la mayoría de los enzimas de la ruta glucolítica. Se ha propuesto que el sistema de transporte de glucosa es un simporte azúcar/H⁺ conducido por la fuerza protón motriz generada por una H⁺-ATPasa (Zilberstein, 1993).

Otra fuente principal de energía para *Leishmania* es la proporcionada por los aminoácidos que pueden ser catabolizados hasta CO₂. El principal aminoácido de la hemolinfa de muchos insectos es la L-prolina que puede ser usada como fuente de carbono por la forma promastigote de *Leishmania* tan eficientemente como glucosa. Gran parte de la L-prolina que es acumulada en el parásito es degradada a CO₂ (50%), mientras que el resto es convertida a L-alanina, uno de los aminoácidos mayoritarios del parásito.

I.4.2. Regulación del volumen celular

Los organismos vivos están expuestos a un ambiente cambiante tanto en composición química como en tonicidad del medio. En general, las células animales cuando son expuestas a un medio hipotónico sufren un hinchamiento debido a la entrada de agua que va seguido de una recuperación del volumen celular, esta disminución reguladora del volumen se conoce como RVD ("Regulatory Volume Decrease"). En la mayor parte de los casos esta respuesta va asociada a la activación de canales de K⁺ y Cl⁻, lo cual conduce a una salida pasiva de KCl con la concomitante pérdida de H₂O (Sarkadi y col., 1991; Hoffman y Simonsen, 1989). En otras células animales y vegetales, la RVD va acompañada de liberación al medio de pequeños compuestos orgánicos solubles que actúan como osmolitos, por ejemplo en eucariotas inferiores la glutamina, alanina, glicina y taurina (Moo Kwon, 1993) y en eucariotas superiores aminoácidos, polioles y metilaminas intervienen en la regulación del volumen celular (Haussinger y col., 1994; Goldstein y col., 1994). Este transporte de osmolitos orgánicos parece ser llevado a cabo por un canal aniónico sensible a volumen (Strange y col., 1995).

La forma promastigote de *Leishmania* está expuesta a un medio cuya composición y tonicidad depende de los hábitos alimenticios del insecto vector. Los mecanismos implicados en

la regulación del volumen intracelular en *Leishmania* son poco conocidos, pero varios son los datos que apuntan a que los aminoácidos libres actúan como osmolitos regulando el volumen celular: **1)** Se sabe que bajo condiciones de crecimiento *in vitro*, las formas promastigotes de *Leishmania* crean un "pull" de aminoácidos libres relativamente alto, mantenido por un mecanismo dependiente del potencial de membrana y que de todos, la L-alanina es el aminoácido mayoritario (Vieira y col., 1995a). **2)** El "pull" de aminoácidos puede ser rápida y específicamente movilizado tras el hinchamiento provocado por un choque hipotónico (Dairling y col., 1990). **3)** *Leishmania* utiliza la L-alanina como un tampón osmótico en condiciones de choque hipertónico (Burrows y Blum, 1991).

Recientemente Vieira y col. (1996) han demostrado que en *L. major* y especies relacionadas, la liberación de aminoácidos al medio es utilizada para corregir el aumento de volumen que sigue a la exposición del parásito a la hipotonicidad del medio. Posiblemente, esta liberación de aminoácidos es llevada a cabo por un canal aniónico llamado HAAC por "hypotonic-activated amino acid channel", poco selectivo ya que libera al medio aminoácidos ácidos y neutros, preferentemente alanina, en respuesta a choque hipotónico. Este mecanismo por sí solo podría explicar la recuperación del volumen celular ya que se han detectado concentraciones de aminoácidos liberados al medio de hasta 264 mM.

I.4.3. Regulación del pH intracelular.

Leishmania debido a su ciclo de vida digenético se encuentra expuesta a un medio externo cambiante. Mientras que la forma promastigote del parásito se propaga en la naturaleza en el tracto digestivo del vector cuyo pH es alcalino (7-9), la forma amastigote reside en los fagolisosomas de macrófagos de mamíferos cuyo medio es muy ácido (4,5-5,5). A pesar de los cambios de pH a los que se ve expuesto, el parásito es capaz de mantener su pH intracelular próximo a la neutralidad. Estudios llevados a cabo en cultivos *in vitro* en un medio con pH 7,4, muestran que las formas promastigotes de *Leishmania* presentan un pH interno moderadamente ácido 6,73 (Zilberstein, 1989), 6,75 (Vieira y col., 1994a) o moderadamente alcalino 7,2 (Glaser y col., 1988).

Posiblemente, el mantenimiento de la homeostasis del pH interno puede ser debido a la acción de una bomba de protones electrogénica, localizada en la membrana plasmática que, además de mantener el potencial electroquímico necesario para el transporte de nutrientes, proporcione un mecanismo de extrusión de los H⁺ producidos metabólicamente. En membranas plasmáticas de *L. donovani* se ha detectado un componente que reacciona con anticuerpos

dirigidos frente a la H⁺-ATPasa de *S. cerevisiae*, y ha sido clonado un gen que presenta una alta homología con otras H⁺-ATPasa de tipo-P en varios sistemas (Meade y col., 1987).

Recientemente, Vieira y col. (1994b) ha mostrado que la actividad de esta bomba electrogénica esta regulada por el movimiento de iones Cl⁻ a través de la membrana. Bajo carga ácida debida a factores ambientales o más frecuentemente a la producción de H⁺ resultado del metabolismo, la actividad de la bomba de protones podría requerir un movimiento electrogénico de Cl⁻ para el mantenimiento de la electroneutralidad y el gradiente electroquímico del H⁺, generado por la bomba. Este eflujo de Cl⁻ originaría una deplección de la concentración intracelular del ion que podría ser restaurada mediante la entrada de Cl⁻ a la célula por mecanismos electroneutrales o electrogénicos. Estos autores proponen que posiblemente un intercambiador aniónico Cl⁻/HCO₃⁻ o Cl⁻/OH⁻, puedan ser los encargados de llevar a cabo tanto la entrada como el eflujo del ion Cl⁻.

Todos estos estudios han sido llevados a cabo en medios libres de CO₃H⁻, sin embargo la forma promastigote de *Leishmania* se propaga en un ambiente muy alcalino, rico en HCO₃⁻/CO₃⁼, donde la carga ácida de la célula solo proviene del medio interno por producción metabólica de H⁺. Estudios llevados a cabo en medios que contienen HCO₃⁻, indican que bajo estas condiciones el papel principal en la regulación del pH interno es llevado a cabo por un transportador de HCO₃⁻, probablemente un transportador Cl⁻/HCO₃⁻ y que la bomba de H⁺ tan solo actuaría en el mantenimiento del potencial de la membrana (Vieira y col., 1995b)

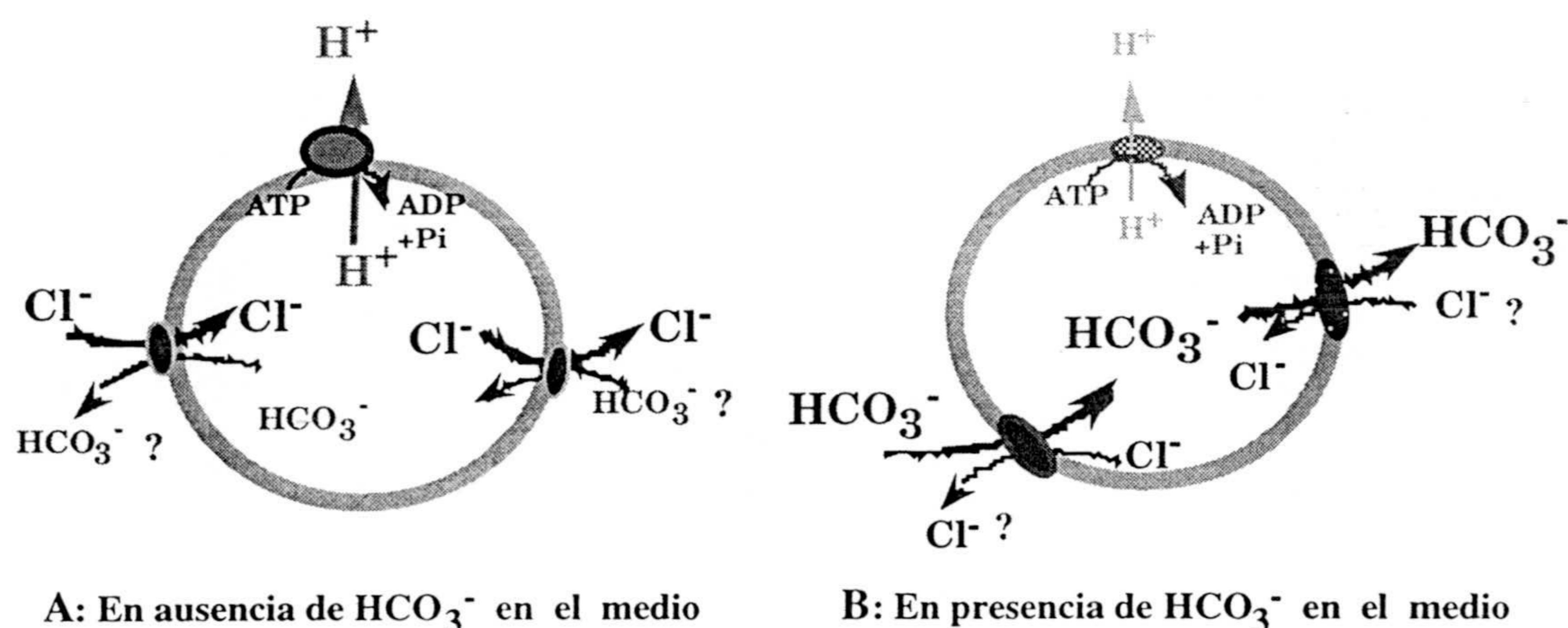


Figura I.2 Posibles mecanismos que interviene regulando el pHi en *Leishmania*. A. En ausencia de HCO_3^- , el principal sistema que opera en la regulación del pHi es la H^+ -ATPasa (círculo rojo), cuya actividad es soportada por el eflujo de Cl^- , llevado a cabo por un transportador aniónico posiblemente $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. Para mantener los niveles de Cl^- intracelulares es necesaria la entrada de Cl^- (comentarios en el texto). B. En presencia de HCO_3^- , el principal sistema que regula el pHi es un transportador de HCO_3^- , probablemente $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (círculo azul). Las flechas indican la entrada y salida de iones.

I.4.4. Particularidades en la defensa frente a estres oxidativo.

Los Tripanosomátidos se encuentran expuestos a un ambiente aerobio muy oxidante y a especies reactivas del oxígeno tales como el anión superóxido, peróxido de hidrogeno, y radicales hidroxilo. Todos estos compuestos son generados externamente como defensas del sistema inmune del hospedador, internamente a partir de cofactores (flavinas reducidas, tioles, quinonas..) y como resultado del metabolismo de fármacos.

Para defenderse frente a este estres oxidativo, los Tripanosomátidos, presentan algunas particularidades enzimáticas como son la presencia de una ferro superoxido dismutasa (Fe-SOD) citosólica que difiere de las Cu, Zn-, y Mn-SOD de mamíferos, pero muy similar a la encontrada en plantas, hongos y bacterias; carecen de catalasa y de glutatión peroxidasa (Fairlamb y Cerami, 1992).

Los Tripanosomátidos han desarrollado un sistema especial para el mantenimiento de un ambiente reductor basado en la capacidad de conjugar el tripéptido glutatión (GSH) con la

en su forma ditiol (T[SH]₂), junto a una flavoproteína dependiente de NADPH, la tripanotión reductasa (TR), sustituyen al glutatión y la glutatión reductasa de mamíferos. Desde el punto de vista biosintético ambos constituyentes del tripanotión, el glutatión y la espermidina, parecen ser sintetizados en Tripanosomátidos de una forma similar a mamíferos. En el caso de espermidina, esta es sintetizada a partir de ornitina y metionina. En el caso del glutatión no se conoce mucho acerca de su biosíntesis en el parásito, pero el BSO (bationina sulfoximida), inhibidor específico de la L- γ -glutamil-L-cisteína sintasa en mamíferos, inhibe también la biosíntesis de glutatión en varios Tripanosomátidos.

La tripanotión reductasa (TR) es la enzima homóloga a la glutatión reductasa de mamíferos. Se encarga de mantener los niveles celulares de T[SH]₂ utilizando como fuente donadora de electrones el NADPH. Esta enzima ha sido muy estudiada como posible blanco de acción de fármacos en *Trypanosoma africano* y se ha descrito que es inhibida por compuestos derivados de arsénico (III), debido a que el tripanotión forma un complejo ditioarsenato con estos compuestos que compite con el T[S]₂ por el sitio de unión a la enzima (Fairlamb y col., 1989, 1992)

Desde el punto de vista funcional, el tripanotión y las enzimas relacionadas están involucrados en la defensa frente al daño por agentes oxidantes, ciertos metales pesados, compuestos xenobióticos, mantenimiento de la estructura de proteínas y regulación de los niveles de poliaminas.

I.5. LEISHMANIOSIS: TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD.

I.5.1 Leishmaniosis.

La leishmaniosis origina al año 400.000 nuevos casos, estimándose en unos 270 millones las personas expuestas a la misma (Ashford, 1992). La enfermedad en sus distintas formas, se extiende en el Nuevo Mundo por América Latina y en el Viejo Mundo por la cuenca Mediterránea, Oriente Medio, Asia y parte del Este y Norte Africano. Desde el punto de vista clínico, las distintas manifestaciones de leishmaniosis en el hombre se agrupan en cuatro tipos:

I. Leishmaniosis cutánea local o Botón de Oriente. Producida por *L. tropica*, y *L. major* en el Viejo Mundo y por *L. braziliensis* y algunas subespecies de *L.*

mexicana en el Nuevo Mundo. Es la forma más común y menos severa originando ulceraciones en la piel, a veces mutilantes.

II. Leishmaniosis cutánea difusa. Es causada por *L.tropica* en el Viejo Mundo y por *L.mexicana* en el Nuevo Mundo. Se asocia con metástasis cutáneas producidas a partir de una lesión en la piel.

III. Leishmaniosis mucocutánea o espundia. Causada por *L. braziliensis* o *L. panamensis*. Se caracteriza por su tendencia a producir metástasis en tejidos mucosos, originando lesiones necróticas y crónicas.

IV. Leishmaniasis visceral o kala-azar. Es la forma más severa de la enfermedad, en la que los casos no tratados suelen evolucionar hacia la muerte. Suele cursar con fiebre ondulante, inmunodepresión, anemia, diarreas hepatoesplenomegalia e hipergammaglobulinemia. Producida por *L. donovani*, *L. chagasi* y *L. infantum*.

Desde el punto de vista epidemiológico, muchas de las leishmaniosis son zoonosis y la intrusión del hombre en el ciclo selvático, que es frecuente en el Nuevo Mundo, conlleva una mayor exposición al flebótomo y un mayor riesgo de infección. En el Viejo Mundo, por el contrario, la mayor parte de las leishmaniosis se contraen en zonas rurales áridas o en la periferia de ciertas ciudades.

I.5.2. Tratamiento de la enfermedad.

Tres tipos de medicamentos pueden ser utilizados en el tratamiento de las leishmaniosis: los derivados del antimonio, las diamidinas y anfotericina B.

I. Los derivados del antimonio. En todas las formas de la enfermedad el medicamento de elección en primera instancia, es el antimonio pentavalente, en forma de antimoniato de meglumina (Glucantime®) o en forma de estiboglucanato de sodio (Pentostan®). Se cree que inhiben las rutas glucolítica y de oxidación de ácidos grasos que tiene lugar en el

glicosoma y mitocondria, orgánulos en los que se ha visto una mayor acumulación de Pentostan. Ambos fármacos se inyectan por vía venosa o intramuscular, siendo la dosis de 20 mg/Kg/día de Sb^V, hasta un máximo de 850 mg/día con una duración promedio de 20 días (O.M.S., 1990). Cuando el Sb^V es mal tolerado, se producen recaídas en la enfermedad o existe fracaso terapéutico, se ha de pasar a la segunda línea de fármacos.

II. Las diamidinas. Se utilizan dos sales de pentamidina: el mesilato de pentamidina (Lomidine®) o el isotiocianato de pentamidina. La tolerancia no siempre es buena y produce complicaciones de orden general. El isotiocianato de pentamidina parece más activo y menos tóxico, actualmente es usado en curas más cortas (Davison y col, 1993).

III. Anfotericina B.(Fungizone®) es selectivamente tóxica, intercalandose con los precursores del ergosterol del parásito y no con los del hospedador. La tolerancia al fármaco es mediocre debido a su toxicidad renal y cardiaca. Se han sintetizado formas menos tóxicas del fármaco como anfotericina B metil ester (Hoeprich, 1992) y 16 hidroximetil anfotericina B (Hunter y col., 1992) pero su eficacia no ha sido aún evaluada en leishmaniosis.

Otros fármacos usados son:

- **Allopurinol** (Zyloric®). análogo estructural de la hipoxantina que es modificado por el parásito e incorporado a la síntesis de ARN. Un inconveniente en su uso es su rápida metabolización por el hombre a oxopurinol menos activo que el allopurinol.

- **Ketoconazol** (Nizoral®) derivado del Imidazol que inhibe la síntesis de ergosterol, el esteroles más abundante de la membrana de Tripanosomatidos. Su toxicidad se atribuye a alteraciones en la permeabilidad y modificación de la actividad de proteínas de membrana. Su eficacia *in vivo* aún no esta demostrada.

Para la mejora del sistema de administración de fármacos, se han utilizado liposomas como transportadores coloidales de fármacos, que son facilmente captados por las células

fagocíticas y acumulados en los órganos del sistema retículoendotelial. (Croft y col., 1991; Davidson y col., 1991; Berman y col., 1992).

1.6. MECANISMOS DE RESISTENCIA A FÁRMACOS.

Un hecho a destacar, es el progresivo aumento en el número de casos en los que aparecen resistencia al fármaco de elección en el tratamiento de la enfermedad. Han sido descritas resistencias a antimonio pentavalente en diferentes aislados clínicos, observándose en general, que los parásitos procedentes de pacientes no tratados son más sensibles al fármaco que aquellos que proceden de pacientes previamente tratados; y que en algunos casos las leishmanias presentan resistencia natural a Sb^V, puesto que nunca han sido expuestas al mismo (Jackson y col., 1990; Grögl y col., 1992).

Los parásitos bien de forma independiente o simultáneamente, pueden desarrollar alguno de los siguientes mecanismos de resistencia a fármacos: **1).** Amplificación de genes implicados en la síntesis de proteínas blanco de acción de fármacos. **2).** Cambios estructurales y/o funcionales en la proteína blanco de acción de fármacos. **3).** Alteración del transporte de fármacos. **4)** Multirresistencia a fármacos.

1.6.1. Amplificación génica.

Es frecuente que *Leishmania* responda ante la presión de un fármaco amplificando parte de su genoma, lo que conlleva a la sobreproducción de la proteína producto del gen.

En diversas especies de *Leishmania* resistente a MTX se han descrito dos tipos de amplificaciones génicas en forma de elementos extracromosomales circulares; **la región R** que contiene el gen de la DHFR-TS y la **región H** que contiene dos genes implicados en resistencia a fármacos: El gen *ltdh* que codifica para una enzima involucrada en una ruta alternativa para la reducción de folatos (Papadopoulos y col., 1992, Chiquero y col., 1994); y el gen glicoproteína-P *pgpA* involucrado en resistencia a metales pesados (Callahan y Beverley, 1991) y en bajos niveles de resistencia a arsenito, antimonio trivalente y antimonio pentavalente (Papadopoulos y col., 1993)

En *L. donovani* resistente a vinblastina se ha descrito la amplificación del gen *ldmdr1* responsable de la resistencia a vinblastina puromicina y daunorubicina. No ha sido descrita que la amplificación del gen este acompañada de la formación de elementos extracromosomales (Henderson y col. 1992; Hendrickson y col., 1993). Sin embargo en *Leishmania enrietti* resistente a vinblastina ha sido descrita la amplificación del gen *lemdr1*, homólogo al *ldmdr1*, en forma de elemento extracromosomal circular, el llamado **círculo-V** (Chow, 1993).

Otras amplificaciones descritas en *Leishmania ssp* son las surgidas frente a el ácido micofenólico (Wilson y col., 1991, 1992), (Hanson y col., 1992a, 1992b); frente a tunicamicina (TUN), amplificación que contiene la N-acetilglucosamina-1-fosfo transferasa (Liu y Chang, 1992); y frente a inosina dialdehído y tubercidina que originan una amplificación extracromosomal que confiere resistencia a los nucleosidos tóxicos formicina B y allopurinol ribonucleósido (Kerby, 1993).

1.6.2. Cambios estructurales y/o funcionales en la proteína blanco de acción de fármacos.

Las alteraciones en los enzimas blanco de la acción del fármaco se originan como consecuencia de mutaciones puntuales, ocasionadas bajo la presión del fármaco, en los genes que codifican para estas proteínas (Zolg y col., 1989, Foote y col., 1990). Arrebola y col., (1994) han demostrado que una mutación puntual en el dominio DHFR de la enzima bifuncional DHFR-TS de *L. major* es capaz de conferir por sí sola una resistencia a MTX, 1000 veces superior que la conferida por la enzima silvestre. Este hecho es debido a que la metionina mutada forma parte del sitio de unión del MTX al dominio DHFR de la enzima .

1.6.3. Alteración del transporte de fármacos.

El transporte del fármaco al interior celular es un importante determinante tanto de la quimioterapia como de la resistencia a fármacos. Alteraciones en el transporte de fármacos han sido descritas en *Plasmodium* resistente a cloroquina (Krogstad y col. , 1987), *Trypanosoma brucei* resistente a compuestos derivados de arsénico (Carter y Fairlamb, 1993), en *Crithidia fasciculata*, (Dewes y col., 1986), *Leishmania major* (Elleberger y col., 1987b), *Leishmania donovani* (Kaur y col., 1988) y en *Leishmania.tropica* resistente a MTX (Gamarro y col., 1994).

En esta última línea, Gamarro y col. han descrito alteraciones en el transporte de MTX con una reducción de la velocidad máxima de influjo del fármaco, que en ausencia de amplificación de genes involucrados en el metabolismo de folatos, conlleva a un acúmulo menor del 3% de MTX en los parásitos resistentes con respecto a los silvestres. Estudios de acumulación de antimonio trivalente (Sb^{III}) en líneas transfectadas de *L. major* con el gen *lmpgpa* muestran que el menor acúmulo de Sb^{III} en los parásitos transfectados es debido a una reducción en la captación del Sb^{III} con respecto a los parásitos silvestres y no a un mayor eflujo del mismo (Callahan y col., 1994).

Además de la alteración de la captación de fármacos mediada por transportadores, al igual que en células tumorales, en *Leishmania tropica* resistente a daunomicina se han detectado cambios a nivel de fluidez en la membrana plasmática que parecen desfavorecer la interacción del fármaco a la superficie celular y el paso del mismo a través de la bicapa lipídica por difusión pasiva (Chiquero y col., 1996 comunicación personal).

1.6.4. Multirresistencia a fármacos (MDR).

En los 10 últimos años se ha avanzado mucho en el estudio de la resistencia pleotrópica o MDR, sobre todo a nivel de células tumorales, sin embargo muchos de los hallazgos conseguidos en este campo pueden trasladarse al ámbito de la parasitología y microbiología. Algunos de estos mecanismos de multirresistencia, sobre todo los relativos a expresión de glicoproteínas-P han sido descritos en diversos parásitos *Plasmodium falciparum*, *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis* y en *Leishmania ssp.*

En diversas especies de *Leishmania*, fue descrita la existencia de un fenotipo de resistencia cruzada a fármacos hidrofílicos como terbinafina, primaquina, MTX y arsenito (Ellenberger y col., 1989; Katakura y col., 1989; Ouellette y col., 1990, 1991). Todas estas líneas llevan amplificada la región H, que contiene el gen glicoproteína-P *pgpA*. Sin embargo, estas líneas resistentes de *Leishmania* no desarrollan un auténtico fenotipo MDR, por varias razones: 1) El acúmulo de MTX no está modificado en líneas celulares resistentes no seleccionadas con MTX, estando amplificada la región H; 2) Transfección de estos genes confieren resistencia cruzada a metales pesados pero no a MTX ni a los fármacos hidrofóbicos, sustratos típicos de la glicoproteína-P de mamíferos; 3) Este fenotipo de resistencia cruzada no revierte con inhibidores típicos del MDR como verapamil y bloqueadores de canales de Ca^{2+} .

Recientemente se ha descrito en *L.amazonensis* (Gueiros-Filho y col., 1992), *L. donovani* (Henderson y col., 1992), *L.enrietti* (Chow y col., 1993) resistentes a vinblastina y *L. tropica* resistente a daunorubicina la presencia de un fenotipo *mdr*, similar al de células tumorales, en los que la resistencia es dirigida exclusivamente frente a fármacos hidrofóbicos. Se ha detectado una reducción en el acúmulo de fármaco con respecto a las líneas parentales sensibles, aunque este menor acúmulo no es revertido por verapamil (Henderson y col., 1992). Se ha descrito en estos parásitos multirresistentes, la amplificación de genes homólogos al gen *mdr* de mamíferos.

I.7. LA SUPERFAMILIA DE TRANSPORTADORES ABC.

Son muchas las proteínas transportadores que han sido descritas en nuestros días, lo que ha llevado a establecer entre ellas relaciones basadas en la homología de secuencia y en el mecanismo molecular desencadenado para llevar a cabo su función. Esto ha permitido establecer diferentes grupos o familias de transportadores, siendo quizás la **superfamilia ABC** una de las familias de proteínas mas amplia y diversa.

La característica común a todos los transportadores ABC es la de mediar el movimiento de moléculas a través de la membrana en contra de un gradiente de concentración, utilizando la energía liberada en la hidrólisis de ATP y por la presencia de una secuencia altamente conservada en sus dominios de unión a nucleótido o "ATP-Binding Cassette", el rasgo que da nombre a esta superfamilia de ATPasas transportadoras.

La superfamilia ABC se encuentra muy representada en el reino procariota, siendo los sistemas de captación de bacterias o también llamados sistemas de transporte dependientes de unión a proteína, los primeros transportadores ABC que fueron descritos y caracterizados, (Ames, 1986). Hoy en día se conocen más de 100 transportadores ABC y cada vez son más los transportadores eucariotas que se incorporan a la misma. A la largo de toda la escala biológica se han descrito en:

- Bacterias donde llevan a cabo el transporte de sustratos como azúcares, aminoácidos, iones inorgánicos, péptidos, polisacáridos y proteínas.
- Levaduras, siendo el mejor estudiado el transportador STE6, cuya función es llevar a cabo el transporte al exterior de la ferormona llamada factor-**a**

- En Protozoos, han sido descritos los genes glicoproteína-P de *P. falciparum*, especies de *Leishmania*, *E. histolytica* y recientemente *Trypanosoma cruzi*.
- En Nematodos, como los genes glicoproteína-P de *Caenorhabditis elegans*
- En Insectos, donde se han descrito los genes MDR de *D. melanogaster*, y los transportadores del sistema "White-Brown" que tiene por sustrato pigmentos oculares.
- En Plantas de las cuales aún no se conoce su función.
- En Animales, donde se han descrito el producto del gen CFTR, gen de la fibrosis quística, que actúa como un canal de cloro; los genes MDR, que intervienen en el transporte de fármacos hidrofóbicos y sustancias tóxicas; y proteínas TAP1 y TAP2 que intervienen en el transporte de péptidos implicados en la presentación de antígeno a los linfocitos T-citotóxicos.

El interés suscitado por estos transportadores debido no solo por su intervención en procesos biológicos fundamentales, sino por su implicación en problemas de importancia clínica, ha hecho que sean muchos los estudios realizados y los avances obtenidos en el conocimiento, tanto a nivel molecular como funcional de los mismos. Hoy por hoy se conoce la secuencia de todos los transportadores ABC descritos y son muchas las hipótesis propuestas entorno a su posible estructura, sin embargo son muchas las incógnitas que quedan por resolver en torno a los mecanismos intrínsecos que intervienen en el transporte de los sustratos.

1.7.1. Organización estructural de los transportadores ABC.

Todos los transportadores ABC son estructuralmente muy parecidos, formados por 4 dominios que interaccionan con la membrana: dos de ellos muy hidrofóbicos, los dominios transmembrana (TM), y los otros dos muy hidrofílicos, los dominios de unión a ATP. Cada dominio TM está constituido por lo general por 6 segmentos transmembrana encargados de la unión al sustrato y de la correcta integración y acoplamiento a la membrana del transportador. Los dominios de unión al nucleótido contienen los sitios de unión a ATP, en ellos tiene lugar la hidrólisis del ATP y el acoplamiento de la energía liberada para el proceso de transporte. El modelo general que predice la topología de los transportadores ABC viene representado en la siguiente figura.

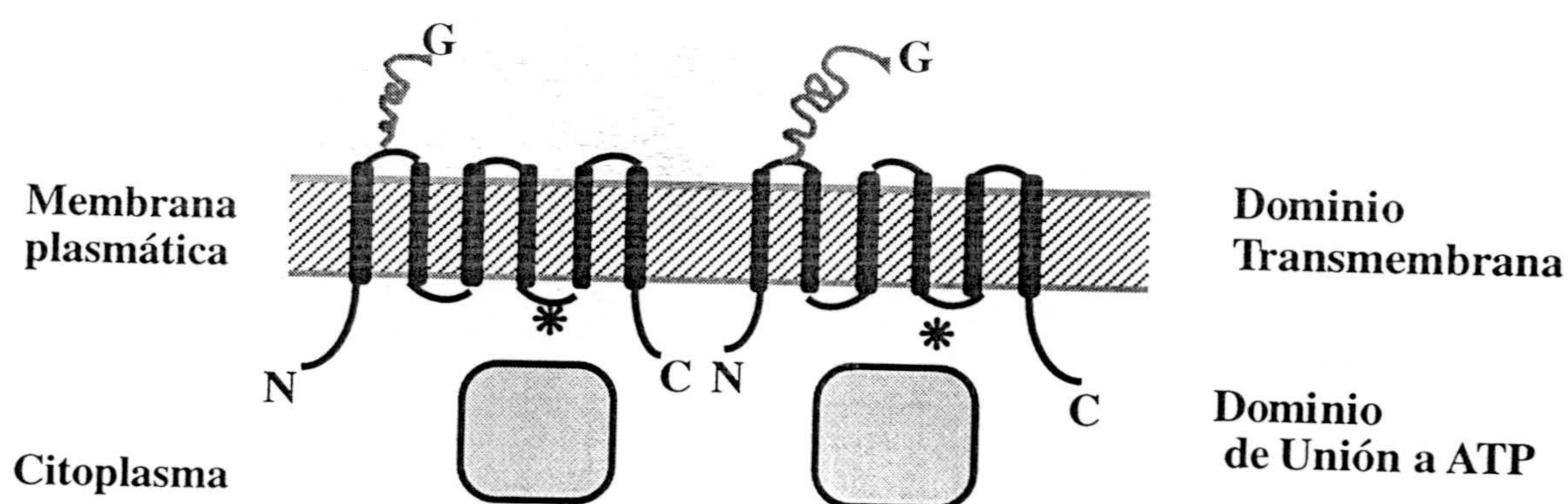


Figura I.3: Esquema básico de la organización de un transportador ABC. Los dominios están representados como polipéptidos independientes. Con G se marcan los potenciales sitios de N-glicosilación. N y C corresponden a los extremos amino- y carboxilo-terminal, respectivamente. El asterisco señala la secuencia "linker" conservada en segmentos transmembrana de transportadores ABC bacterianos (ver texto).

En algunos transportadores, particularmente en especies procariotas, los 4 dominios son sintetizados como polipéptidos independientes que luego se organizan a nivel de membrana para formar el transportador, este es el caso de la permeasa de oligopéptidos de *S. typhimurium* (Hiles y col., 1987). Sin embargo en otros transportadores los dominios se encuentran fusionados en largos polipéptidos multifuncionales. Por ejemplo en *E. coli* el transportador de la ribosa es sintetizado como 3 polipéptidos, dos de ellos correspondientes a los dominios hidrofóbicos transmembrana y otro que contiene a ambos dominios de unión a ATP fusionados (Coulton y col., 1987). En el mismo organismo, el transportador de hidroxomato férrico supone el caso contrario, los dominios de unión a ATP aparecen como polipéptidos independientes estando los dominios transmembrana codificados por un solo polipéptido. En el caso del transportador de péptidos del MHC existe solo dos polipéptidos, cada uno contiene un dominio hidrofóbico en la región amino que conforma los segmentos transmembrana y un dominio hidrofílico en la porción carboxilo que contiene el sitio de unión a ATP (Spies y col., 1990). En otros casos los 4 dominios están fusionados en un solo polipéptido, este es el caso de las glicoproteínas-P (Chen y col., 1986) y del producto del gen CFTR, aunque en este último existe un quinto dominio, el dominio R citoplasmático, que interviene regulando la actividad del transportador (Cheng y col., 1991, Rich y col., 1991). Un resumen gráfico de las diferentes organizaciones que presentan los transportadores ABC aparece en la figura I.4.

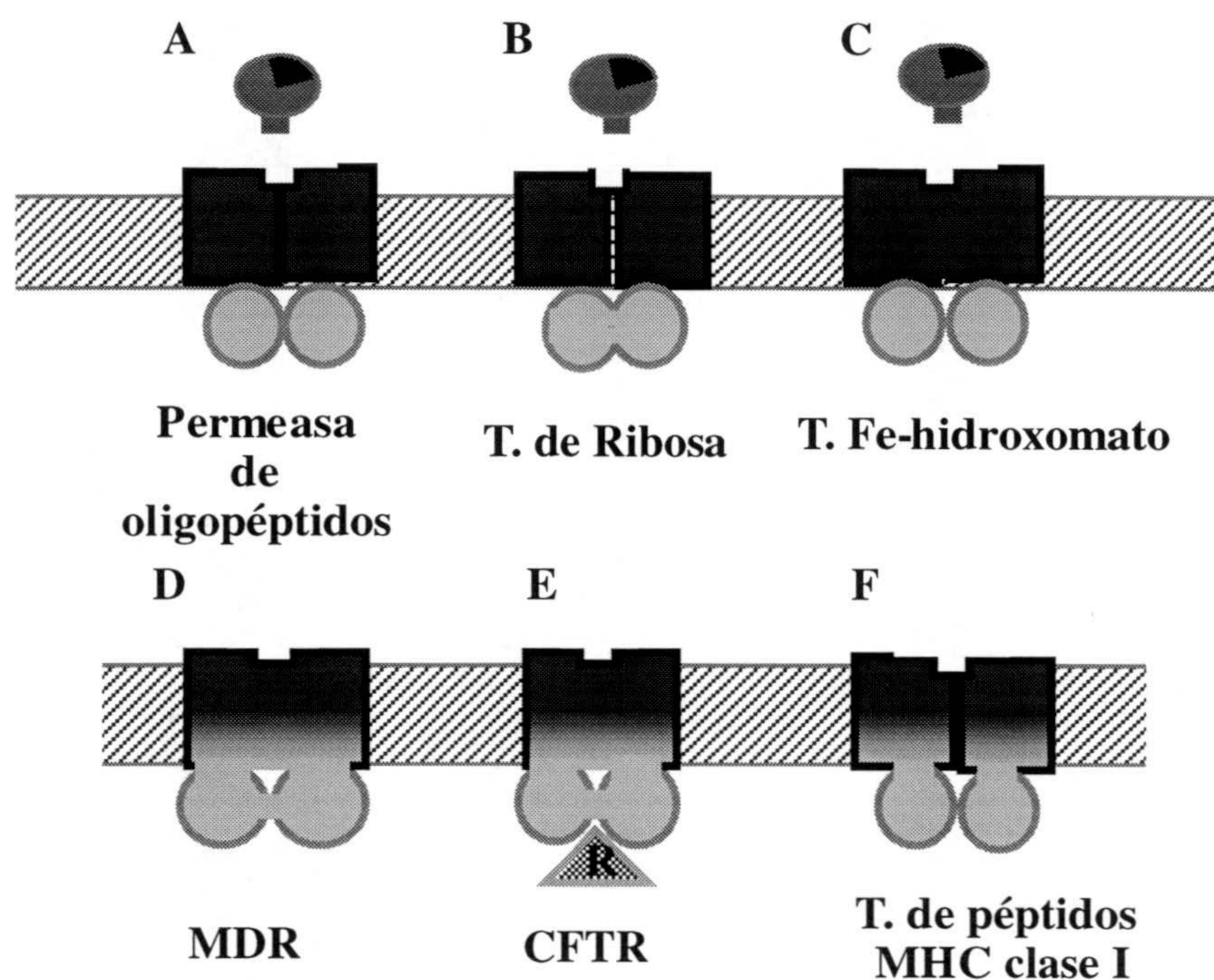


Figura I.4. Organización de diferentes transportadores ABC. Los dominios transmembrana vienen representados en rectángulos azules, y los dominios de unión a nucleótido en círculos verdes. Los transportadores bacterianos **A**, **B** y **C** van acompañados de un componente periplásmico, en rojo. En el caso de la proteína CFTR existe un dominio adicional, la región R, representada por un triángulo. **A**. Los cuatro dominios son polipéptidos independientes. **B**. Los dominios de unión a ATP están codificados por un solo polipéptido. **C**. Los dominios transmembrana están fusionados en un solo polipéptido. **D** y **E** Todos los dominios están fusionados. **F**. El transportador está formado por dos polipéptidos, cada uno codifica un dominio transmembrana y un dominio de unión a ATP.

Aunque estos 4 dominios son suficientes para proporcionar la maquinaria que media la translocación del soluto a través de la membrana, ciertos transportadores ABC presentan un dominio adicional que tiene función reguladora, tal es el caso del producto del gen CFTR, o alguna función periférica no asociada al proceso de transporte en sí, como es la función enzimática adicional que presenta el transportador Mal K (Reild y col., 1989).

Es importante mencionar que en el caso de todos los transportadores ABC bacterianos, que llevan a cabo la captación de solutos, es requerida una proteína que une el sustrato y que está localizada en el espacio periplásmico. Esta proteína, en sí misma, no interviene en el paso de la molécula a través de la membrana pero es esencial para la función del transportador al que se encuentra asociada.

1.7.1.1. Estructura y función de los dominios de transmembrana.

Según predicciones estructurales basadas en la secuencia de aminoácidos, en los transportadores ABC, los dos dominios hidrofóbicos de transmembrana se disponen formando múltiples segmentos que cruzan varias veces la membrana. En la mayoría de los transportadores ABC cada dominio hidrofóbico consta de 6 segmentos en α -hélice (un total de 12 por transportador), con el extremo N- y C-terminal localizado en la cara citoplasmática de la membrana, unidos entre si por tres bucles extracelulares y dos intracelulares. Sin embargo, se han descrito y confirmado experimentalmente casos de algunos transportadores que presentan un número de segmentos transmembrana que difiere del modelo general. Este es el caso del Mal F que tiene 8 segmentos transmembrana en el primer dominio, estando los dos segmentos adicionales en la región N-terminal. Sin embargo la pérdida de estos segmentos no provoca pérdida de función (Ehrmann y col., 1990).

La mayoría de las pruebas experimentales son consistentes con estas predicciones. Mediante el uso de pruebas bioquímicas y genéticas se han identificado experimentalmente los 6 segmentos transmembrana de cada dominio hidrofóbico en la permeasa de oligopeptidos de *S. typhimurium* (Pearce y col., 1992). Los estudios de localización inmunoquímica en la glicoproteína-P de mamíferos apoyan igualmente esta predicción estructural.

Desde el punto de vista funcional, los segmentos de transmembrana juegan un importante papel estructural. Ellos son los responsables del plegamiento, anclaje y de la orientación que adopta la cadena polipeptídica del transportador en la membrana. Pero también se les atribuye un papel funcional en la selección del sustrato. Se han descrito mutaciones en los dominios transmembrana que modifican la selectividad del transportador por el sustrato. Entre los muchos ejemplos descritos citaremos el caso del transportador de histidina en *S. typhimurium* en el que una delección de 4 aminoácidos en un segmento transmembrana origina un cambio de selectividad de L-histidina a L-histidinol (Payne y col., 1985). Mutaciones en el segmento transmembrana 11 (TM 11) de la glicoproteína-P cambia la especificidad por el sustrato (Gros y col., 1991), igualmente en el gen *pfmdr1* se han detectado cambios en este mismo segmento relacionados con la resistencia a cloroquina en *P. falciparum* (Foote y col., 1990). Se ha conseguido mediante mutagénesis dirigida en segmentos transmembrana, alterar la selectividad del producto del gen CFTR por el ion (Anderson y col., 1990).

En general, los dominios transmembrana de los transportadores ABC guardan entre sí poca homología. Ya que los requerimientos estructurales pueden ser satisfechos por diferentes combinaciones de una variedad de aminoácidos, esta escasa similitud en secuencia explicaría la

variedad de sustratos que estos transportadores pueden movilizar a través de las membranas. Tan solo a nivel de transportadores ABC procariotas se ha encontrado un corto motivo conservado, localizado en un bucle citoplasmático próximo al dominio de unión a ATP. Se cree que este motivo podría interaccionar con el dominio de unión a ATP y a través de esta interacción podría tener lugar la transmisión de la energía liberada en la hidrólisis del ATP, requerida para el proceso de transporte (Pearce y col., 1992).

1.7.1.2. Estructura y función de los dominios de unión a ATP.

Son los dominios más característicos y conservados en los transportadores ABC. Entre los distintos transportadores de la superfamilia los porcentajes de homología oscilan entre el 30 y 50 %. Cada dominio de unión a ATP tiene aproximadamente 200 aminoácidos que contiene dos motivos Walker (Walker, 1982) asociados también a otras ATPasas. Sin embargo en los transportadores ABC la homología se extiende más allá de estos motivos, hecho que diferencia a los miembros de esta superfamilia de cualquier otra ATPasa.

Los dominios de unión a ATP son altamente hidrofílicos y, según predicciones estructurales, se encuentran localizados en la cara citoplasmática de la membrana interaccionando con ella. Esta topología se ve apoyada por pruebas experimentales basadas en estudios de inmunolocalización y digestión con proteasas. Los dominios de unión a ATP en la glicoproteína-P de mamíferos solo son accesibles desde la cara citoplasmática de la membrana al marcaje con anticuerpos. Igualmente mediante el uso de proteasas, se ha comprobado que los dominios de unión a ATP en los transportadores bacterianos son menos accesibles a proteólisis desde el exterior de la célula que desde el citoplasma.

Los dominios de unión a ATP tienen por función llevar a cabo la hidrólisis del ATP acoplándola al proceso de transporte. Previas sugerencias apuntaban hacia un papel del gradiente electroquímico en la función de los transportadores ABC que podría explicar el alto grado de acumulación de los sustratos en las células, sin embargo nunca ha sido detectado un movimiento de protones junto al transporte del sustrato y el uso de desacopladores en vesículas excluye totalmente el papel del gradiente electroquímico en la función de transportadores ABC (Bishop y col., 1989). Actualmente todos los datos apuntan a que la hidrólisis del ATP soporta la actividad del transportador. No solo los transportadores unen ATP, sino que es necesaria su hidrólisis para que se lleve a cabo el movimiento de solutos. Cuando el ATP es sustituido por análogos no hidrolizables el transportador es incapaz de funcionar (Ames y col., 1989).

Ambos dominios parecen ser necesarios para llevar a cabo la función del transportador ya que mutaciones realizadas en alguno de los dominios de unión a ATP de la glicoproteína-P o del transportador STE6 reducen drásticamente la actividad en ambos. En el caso de la permeasa de *S. typhimurium*, ambos dominios son idénticos en estructura lo que indica una equivalencia funcional en el transporte. La estequiometría de dos moléculas de ATP hidrolizadas por molécula transportada indica que ambos dominios son simétricos funcionalmente (Mimmack y col., 1989). En cambio en el gen CFTR se han descrito mutaciones que afectan al dominio de unión a ATP localizado en la mitad carboxilo de la proteína y que no afectan a la función del canal (Gregory y col., 1991). Recientemente se ha visto que mutaciones en los residuos de lisina de los motivos Walker del gen CFTR, producen efectos distintos en ambos dominios de unión a ATP. Mutaciones en la lisina del dominio amino (K464), reducen la frecuencia de apertura del canal, mientras que en el dominio carboxilo (K1074) aumentan el tiempo de apertura del mismo. Esto apunta hacia una asimetría funcional de ambos dominios (Carson y col., 1995).

El modo en que estos dominios acoplan la hidrólisis del ATP al proceso de transporte aun es desconocido. No han sido detectados intermediarios fosforilados de la proteínas transportadoras, por lo que en general se asume que la unión y la hidrólisis del ATP inducen cambios conformacionales en los dominios de unión a nucleótido que son transmitidos por medio de interacción dominio-dominio a los segmentos transmembrana.

Para comprender como se lleva a cabo este proceso se han propuesto modelos basados en predicciones estructurales. Estos modelos proponen que cada dominio de unión a nucleótido, además de contener los dos motivos Walker para la unión del ATP, contiene motivos hidrofóbicos en forma de α -hélices y hojas- β que conforman el soporte estructural del dominio. Los motivos Walker estan asociados a la unión del nucleótido y su hidrólisis. El motivo Walker B contiene un residuo de aspártico muy conservado al cual se uniría el nucleótido, precedido de aminoácidos hidrofóbicos que forman un entorno hidrofóbico para la adenina del nucleótido. El motivo Walker A parece llevar a cabo la hidrólisis del ATP ya que esta es inhibida por mutación de un residuo de lisina muy conservado. Este motivo se encuentra localizado en un bucle rico en glicinas que presenta una localización óptima para interactuar con el ATP, mediando la transferencia del grupo fosforilo. Estos modelos proponen que algunos bucles estructurales podrían jugar un importante papel en la transmisión de la energía liberada en la hidrólisis del ATP, via cambios conformacionales, interaccionando directamente con otros dominios (Hyde y col., 1990; Mimura y col., 1991). Este papel ha sido atribuido al llamado péptido "linker" constituido por una secuencia rica en glutamina y glicina muy conservada en transportadores ABC localizada próxima al sitio al que se une el ATP (Walker B). Mutaciones en este péptido dan lugar a un desacoplamiento entre la hidrólisis del ATP y el proceso de transporte.

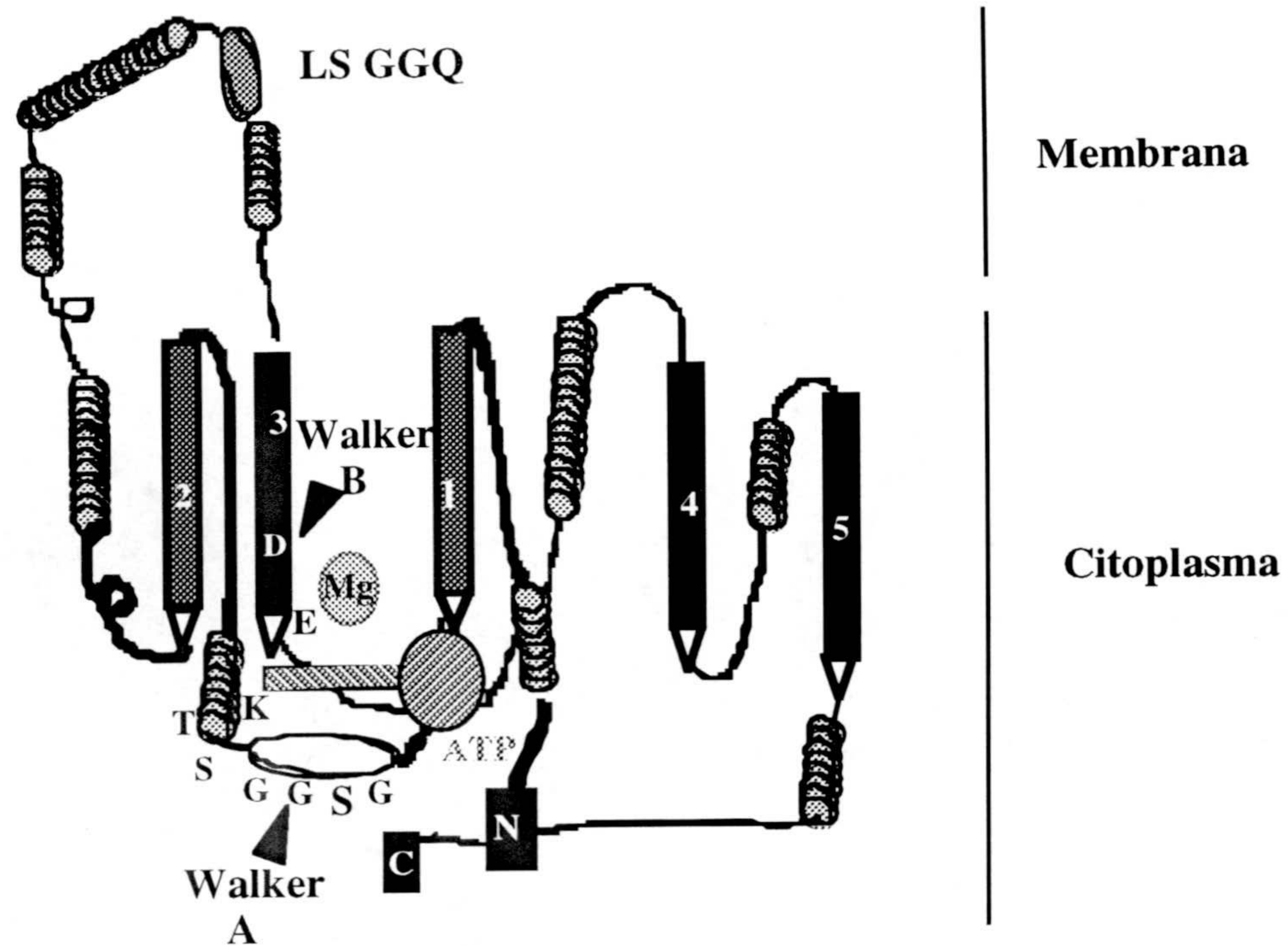


Figura I.6 Topología del dominio de unión a ATP en los transportadores ABC. La predicción de la estructura del dominio de unión a ATP esta basada en los dominios de unión a ATP de los transportadores de maltosa y de histidina de bacterias. En esta figura se representan las helices α como apilamiento de círculos y las hojas β como rectángulos. Los motivos Walker A y B están indicados con flechas. En el motivo Walker A se representa la región rica en glicinas y en el motivo Walker B se resalta el aspártico que interviene en la formación del bolsillo hidrofóbico. La secuencia del péptido "linker" también aparece indicada. Se ha representado la posición que ocuparía el ATP y el Mg^{2+} .

1.7.2. Función de los transportadores ABC.

Las funciones de los transportadores ABC viene dada por la amplia variedad de sustratos que pueden transportar, no solo desde el punto de vista químico sino también por su tamaño. Se han descrito transportadores para azúcares, aminoácidos, péptidos, oligopéptidos, iones inorgánicos, polisacáridos e incluso proteínas.

Gran parte de los transportadores ABC descritos en procariotas, tiene por función servir al sistema de captación de nutrientes. No es sorprendente puesto que desde el punto de vista energético supone menos gasto transportar los nutrientes que sintetizarlos.

Estos transportadores ABC se caracterizan por su alta afinidad y porque son capaces de almacenar altas concentraciones de sustrato en contra del gradiente de concentración. La selectividad del sustrato en estos casos es llevada a cabo, en su mayor parte, por una proteína periplásmica que une sustrato. Sin embargo, el transportador en si parece mantener selectividad hacia el sustrato como se demuestra en mutantes proteína periplásmica independientes (Petronilli y Ames, 1991). En transportadores ABC eucariotas aun no se ha descrito ninguno relacionado con las funciones de nutrición.

Las proteínas ABC juegan también un papel importante en el transporte de proteínas y péptidos a través de la membrana, tanto en células procariotas como eucariotas. Estos transportadores ABC suponen una vía alternativa para aquellas proteínas que no siguen las vías convencionales de secreción, es decir, que carecen del péptido señal que dirige su paso a través de la membrana. Un claro ejemplo en procariotas sería la hemolisina de *E. coli*, un polipeptido que es codificado en un "cluster" junto a su transportador ABC, HlyB. En el caso de eucariotas el ejemplo más conocido es el del transportador STE6 de levaduras que media el transporte de una feromona, el factor *a*, que carece de péptido señal.

Muchos de los transportadores ABC descritos interviene en procesos de detoxificación celular bombeando al exterior compuestos tóxicos para la célula. En procariotas algunas de las resistencias a fármacos y antibióticos estan mediadas por transportadores ABC, por ejemplo el transportador MnR que media la resistencia a eritomicina en *Staphylococcus*. (Ross y col., 1990). En levaduras se han descrito algunos transportadores responsables de resistencia a compuestos tóxicos como el transportador NSQ2 de *S. cerevisiae* que confiere resistencia al agente mutágeno 4-nitroquinolino óxido y a cicloheximida (Servos y col., 1993). El YCF1 o "Yeast Cadmium Factor" que confiere resistencia a metales pesados, cadmio y levemente a níquel. Esta proteína presenta homología con los genes CFTR y HuMRP humanos (Szczyпка y

col., 1994). Por último los genes glicoproteína-P y MRP intervienen en mecanismos de multirresistencia a fármacos, aspectos que serán tratados en detalle más adelante.

Pero la superfamilia ABC no incluye solo transportadores, algunos de sus miembros pueden actuar como canales aniónicos. Este es el caso del producto del gen CFTR que funciona como un canal de Cl⁻ voltaje-dependiente, regulando a su vez la función de otros canales iónicos. Una función similar a la del gen CFTR ha sido propuesta para la glicoproteína-P de mamíferos. Las características y funciones de ambos transportadores serán descritas en detalle en próximos apartados.

1.8. LA FAMILIA MULTIGENICA DE LAS GLICOPROTEINAS-P.

Las glicoproteínas-P son transportadores ABC cuya función es la eliminación de compuestos citotóxicos fuera de la célula. Su existencia fue puesta de manifiesto cuando Dano en 1973 propuso como mecanismo de resistencia en células tumorales resistentes a daunorubicina, la extrusión activa de fármacos. Desde entonces hasta nuestros días las glicoproteínas-P han sido descritas a lo largo de toda la escala biológica: en bacterias, protozoos parásitos, nematodos, insectos, plantas y en mamíferos.

Ha sido en mamíferos y concretamente en células tumorales donde más ampliamente han sido estudiadas, describiéndose distintas isoformas de glicoproteínas-P que a pesar de presentar una estructura muy similar llevan a cabo diferentes funciones. Esto llevo a proponer que las glicoproteínas-P forman en si una pequeña familia de genes muy conservada dentro de la superfamilia ABC.

Desde un punto de vista evolutivo, se ha propuesto que la familia de las glicoproteínas-P ha surgido a partir de la duplicación en tandem de un gen ancestral ABC perteneciente a procariotas (Ames y col., 1986, 1992). Estas especulaciones están basadas en la estructura muy conservada de la glicoproteína-P y en el alto grado de homología que mantienen entre sí las dos mitades de una misma glicoproteína-P, siendo mayor que la homología observada con los mismos dominios de diferentes miembros de la familia.

1.8.1. Estructura de la glicoproteína-P.

Son muchos los análisis estructurales que se han realizado en los últimos años en un intento de conocer mejor el mecanismo por el cual las glicoproteínas-P llevan a cabo su función. La mayor parte de estos estudios se han basado en el uso de anticuerpos, marcaje por fotoafinidad, mutagénesis dirigida y traducción *in vitro* de la proteína. La glicoproteína-P de mamíferos ha sido el foco de interés y la gran mayoría de los datos, sino todos, que se presentan en este apartado están referidos a las glicoproteínas-P de roedores o de humanos.

Con un tamaño que oscila entre los 1280 Aa de la glicoproteína-P humana y los 1557 Aa descritos en el gen *Tcpgp2* de *Trypanosoma cruzi* (Dallagiovanna y col. 1996), las glicoproteínas-P presentan la estructura típica de un transportador ABC, estando constituidas por dos motivos que se repiten en tandem, cada uno formado por un dominio hidrofóbico y un dominio hidrofílico. Topológicamente se ha propuesto que tanto el extremo NH-terminal y CH-terminal de la proteína se localizan en el citoplasma celular. Las α -hélices de los segmentos transmembrana cruzarían la membrana formando 3 lazos extracelulares y 2 lazos citoplasmáticos en cada uno de los dominios hidrofóbicos, mientras que los dominios hidrofílicos estarían localizados en el citoplasma interactuando con la cara interna de la membrana plasmática.

Este modelo basado en predicciones estructurales ha sido apoyado por numerosos datos experimentales. Anticuerpos dirigidos frente a los dominios de unión a ATP y a los extremos NH y CH-terminal solo son capaces de marcar la glicoproteína-P si las membranas están permeabilizadas, lo que indica la localización intracelular de los epítomos a los que van dirigidos (Yoshimura y col., 1989; Georges y col., 1990).

1.8.1.1. Los dominios transmembrana.

La disposición de los segmentos transmembrana según el modelo predictivo ha sido apoyada por diversas pruebas experimentales. Mediante inserción de pequeños péptidos antigénicos en los bucles que unen segmentos transmembrana y localización de los mismos con el anticuerpo específico, Kast y col. (1995), confirman la localización extracelular e intracelular de algunos de los bucles de la glicoproteína-P. Loo y Clarke (1995), obtienen resultados similares aplicando una técnica de marcaje por biotilación de determinadas cisteínas en bucles intra y extracelulares de la glicoproteína-P. Sin embargo, recientemente experimentos de síntesis *in vitro* y reconstitución de glicoproteína-P en membranas microsomales, así como expresión de

la proteína en ovocitos de *Xenopus laevis*, aportan nuevos datos que difieren del modelo predictivo. Básicamente las diferencias residen en que algunos de los propuestos segmentos transmembrana estarían dispuestos en el citoplasma celular o bien extracelularmente (Zhang y col., 1991, 1993; Skach y col., 1993, 1994). Sin embargo, estos modelos podrían ser resultado de errores introducidos por la metodología empleada en la síntesis y reconstitución *in vitro* de la proteína.

Desde el punto de vista funcional existen numerosos datos que apoyan la hipótesis de que en los dominios transmembrana tiene lugar la unión del sustrato y que en ellos reside la especificidad para la amplia gama de sustratos que presentan las glicoproteínas-P:

-El uso de análogos fluorescentes de fármacos así como de revertidores del fenotipo MDR han permitido el marcaje por fotoafinidad de la glicoproteína-P. Este marcaje puede ser inhibido por otros sustratos de la proteína, fármacos y quimiosensibilizadores como verapamil, azidopina (Gottesman y Pastan, 1988), lo que parece indicar que estos sustratos compiten por el sitio de unión al transportador. En general, el marcaje de la glicoproteína-P con análogos fotoactivos seguido de digestión con proteasas, origina fragmentos marcados que han sido identificados con secuencias pertenecientes a regiones comprendidas entre los TM6-TM7 y TM11-TM12 (Bruggemann y col., 1989; Bech y col., 1992; Greenberger, 1993; Morris, 1994). Esto puede ser interpretado bien como la existencia de dos sitios de unión a cada uno de estos compuestos en la glicoproteína-P, o bien como el reflejo de una interacción entre estos dominios para formar el sitio de unión al sustrato .

-Se ha descrito mutantes espontáneos de la glicoproteína-P en los que mutación en solo un residuo altera el perfil de resistencia a fármacos. En células de humanos seleccionadas con colchicina, un cambio de la Val₁₈₅ a Gly aumenta la resistencia a colchicina y reduce el transporte de vinblastina y actinomicina D (Choi y col., 1988). En células multirresistentes seleccionadas con actinomicina D, la mutación de Gly₃₃₈ a Ala, y de Ala₃₃₉ a Pro en el TM6 de la glicoproteína-P, aumentan la resistencia a actinomicina D y reduce la resistencia al resto de los fármacos, lo cual implica fuertemente a dicho segmento transmembrana en la unión y eflujo del fármaco (Devine y col., 1992).

-Mediante mutagénesis dirigida se han introducido modificaciones en la glicoproteína-P que modulan la especificidad por el sustrato, así el cambio de Ser a Phe en el TM11 de las glicoproteína-P *mdr1* y *mdr3* de ratón retiene la resistencia a vinblastina mientras que anula la resistencia a adriamicina (Gros y col., 1991). La mutación de 13 residuos de Pro a Ala a lo largo de la glicoproteína-P humana muestra que solo las mutaciones que afectan a los TM4 y TM10 alteran el perfil de resistencia a fármacos (Loo y Clarke, 1993a). Similar experimento, mutando

31 residuos de Phe a Ala a lo largo de la glicoproteína-P, muestra que aquellas mutaciones que afectan a los TM6 y TM12 altera el perfil de resistencias (Loo y Clarke, 1993b).

1.8.1.2. Los dominios de unión a ATP.

Los dominios de unión a ATP son dominios muy conservados, de carácter hidrofílico localizados en la cara citoplasmática de la membrana e interaccionando con la misma (Georges y col., 1990; Yoshimura y col., 1991). Presentan una estructura muy similar a la descrita para otros transportadores ABC, con los motivos Walker A (GX₄GKS/T) y Walker B (R/KX₆-gLHd₄D), donde *Hd* son los residuos hidrofóbicos que crean el microambiente para alojar al residuo de adenina. La mutación del residuo de Lys a Arg y la mutación de Gly a Ala, localizados ambos en el motivo Walker A, inhiben la hidrólisis del ATP aunque no la unión de 8-azido ATP (Azzaria y col., 1989). Se cree que esta lisina interviene en la transferencia del grupo fosforilo del ATP. Además de los motivos Walker, presentan el motivo del péptido "linker" descrito en otros transportadores ABC, y se cree que la región localizada entre este y el motivo Walker A pueda tener algún papel en el acoplamiento de la energía liberada en la hidrólisis del ATP al proceso de transporte.

Numerosas mutaciones introducidas en los dominios de unión a ATP conllevan una gran reducción o pérdida total de la actividad de la glicoproteína-P, esto es debido a la imposibilidad de acoplar la energía al proceso de transporte. Incluso se han descrito algunas mutaciones en los dominios de unión a ATP que alteran la especificidad por el sustrato, por lo que posiblemente estos dominios estén involucrados directa o indirectamente con la interacción con el sustrato (Beaudet y Gros, 1995).

Mediante expresión independiente de cada una de las mitades de la glicoproteína-P se ha comprobado que ambos dominios de unión a nucleótido son funcionales llevando a cabo la hidrólisis de ATP (Loo y col., 1994) y parece ser que llevan a cabo una función cooperativa para el funcionamiento de la glicoproteína-P, ya que inhibición de la función de alguno de los dominios conlleva a la pérdida de función de la glicoproteína-P (Georges y col., 1991). Aunque ambos dominios guardan entre sí un alto grado de homología, entorno a un 80%, no son lineales funcionalmente y aquellas quimeras en las que la proteína expresa dos dominios de unión a ATP iguales, no son funcionales (Beaudet y Gros, 1995). Sin embargo uno de los dominios puede ser sustituido por el mismo dominio de otra glicoproteína-P funcionalmente distinta sin que se perjudique la función de la glicoproteína-P (Buschman y col., 1991). Esta suma de hechos parece indicar que ambos dominios de unión a ATP puedan ser funcionalmente diferentes o bien

que requieran expresarse en un entorno específico que es proporcionado por las secuencias de los segmentos transmembrana correspondiente a cada mitad de la molécula.

I.9. MODIFICACIONES COVALENTES DE LA GLICOPROTEÍNA-P.

La glicoproteína-P se encuentra modificada covalente mediante fosforilación y glicosilación. Estas modificaciones suelen tener un papel regulador en la actividad de las proteínas a las que modifican, sobre todo en organismos eucariotas. Los estudios llevados a cabo en la glicoproteína-P de mamíferos, tanto humanos como roedores, indican que la glicosilación no parece ejercer un papel regulador no ocurriendo lo mismo con la fosforilación de la proteína.

I.9.1. Glicosilación.

La glicoproteína-P de humanos se encuentra glicosilada posiblemente durante su tráfico a través del retículo endoplasmático. Aunque la glicosilación de la glicoproteína-P ha sido demostrada por métodos enzimáticos, no existe aun una evidencia directa del lugar en el que se produce su glicosilación. Parece que la porción glicosilada se encuentra en el primero de los seis bucles extracelulares, donde existen varias secuencias consenso para N-glicosilación.

Varios datos indican que esta glicosilación no parece contribuir a la actividad de la glicoproteína-P ya que la eliminación de la porción glicosilada por métodos bioquímicos o mediante mutación del sitio de glicosilación no afecta a la función de la glicoproteína-P (Germann y col., 1990). También se han aislado mutantes de glicoproteína-P en células resistentes a lecitinas que carecen de la porción glicosilada y que mantienen la función (Ling y col., 1982). Se cree que la porción glicosilada estaría ejerciendo algún papel estabilizador de la estructura de la glicoproteína-P, interviniendo en la correcta orientación de la proteína en la membrana. Mediante experimentos de transfección de glicoproteína-P con mutaciones en los sitios de glicosilación del primer bucle extracelular, se observó que la producción de clones con bajos niveles de expresión de glicoproteína-P mutada era mayor que el número de clones transfectados con la proteína parental (Schinkel y col., 1993).

I.9.2. Fosforilación.

Ha sido demostrado que una gran variedad de líneas celulares MDR expresan glicoproteína-P que sufre modificación por fosforilación (Roy y col., 1985; Hamada y col., 1987; Chambers y col., 1992). Sin embargo, aun no se conoce en que extensión la fosforilación puede modular la actividad de la glicoproteína-P. Existen evidencias de que la fosforilación estimula el transporte de ciertos fármacos y que activadores de la protein kinasa C (PKC) como el ester de forbol, 12-miristato 13-acetato forbol (TPA), que aumentan la fosforilación de la glicoproteína-P, reducen la acumulación intracelular de fármacos. A su vez inhibidores de la PKC como estaurosporina y calphostin C inhiben efectivamente la fosforilación de la glicoproteína-P causando un incremento en el acúmulo de fármacos (Chambers y col., 1992; Bates y col., 1993). Sin embargo hay que tomar con cautela estos resultados ya que no pueden ser completamente atribuidos al efecto ejercido sobre el estado de fosforilación de la glicoproteína-P, porque TPA incrementa los niveles de ARNm de la glicoproteína-P (Chaudhary y Roninson, 1992) y la estaurosporina y otros inhibidores de PKC se unen a la glicoproteína-P compitiendo con los fármacos.

Todos los posibles sitios de fosforilación han sido localizados en la llamada región "linker" o péptido de unión, localizada entre las dos mitades homólogas de la glicoproteína-P. Esta región ha sido funcionalmente relacionada con la región R de CFTR que tiene una actividad reguladora mediada por protein kinasa A (PKA) dependiente de cAMP. La región "linker" al igual que la región R de CFTR, presenta un alto contenido de aminoácidos cargados y sitios consenso para fosforilación mediada por PKC y PKA. En glicoproteína-P humana se han identificado mediante análisis mutacional y fosforilación *in vitro* de la región "linker" expresada en bacterias, dos sitios de fosforilación para PKC, la Ser₆₆₁ y Ser₆₇₁ y un tercer sitio, la Ser 667 (Chambers y col., 1995). En la glicoproteína-P *mdr1b* de ratón, se han identificado también sitios de fosforilación para PKC y PKA (Orr y col., 1993)

I.10. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA GLICOPROTEINA-P

La glicoproteína-P actúa como una bomba que lleva a cabo el transporte de sustancias a través de la membrana en un proceso que requiere la hidrólisis de nucleótidos trifosfato. Esta

actividad ATPasa ha sido estudiada en células con un alto grado de expresión de glicoproteína-P, así como en vesículas de membrana plasmática obtenidas a partir de células MDR (Horio y col., 1988;) y se ha comprobado que su actividad es estimulada por la presencia de fármacos de la glicoproteína-P así como revertidores del fenotipo MDR .

Se ha propuesto que la energía liberada en la hidrólisis del ATP es transmitida a la porción hidrofóbica de la proteína mediante interacción dominio-dominio, posiblemente a través del péptido "linker" con los dominios de transmembrana, originando un cambio conformacional que medie la translocación del sustrato.

Los diferentes modelos propuestos para explicar la conformación que adopta la glicoproteína-P en el transporte de sustancias aparecen en la figura I.6.

A. Modelo de poro. Los segmentos transmembrana de la proteína se orientan formando un poro o canal que atraviesa la membrana, proporcionando un microambiente hidrofílico para el paso de los sustratos. La unión del sustrato a la proteína desencadena en la misma, vía hidrólisis del ATP, un pequeño cambio conformacional que permite la translocación del sustrato a través del canal.

B. Modelo "hydrophobic vacuum cleaner". Propuesto por Gottesman y Pastan (1993), propone que los sustratos de la glicoproteína-P interaccionan desde el ambiente hidrofóbico de la bicapa lipídica, siendo eliminados de la misma en el mismo momento en que tiene lugar su entrada en la célula por difusión pasiva. Son varios los datos experimentales que apoyan esta hipótesis basados en el uso de marcadores fluorescentes de membrana, por ejemplo Rhodamina 123, que es un conocido sustrato de la glicoproteína-P. En células sensibles a fármacos el espectro de fluorescencia obtenido se localiza en un ambiente hidrofóbico de la membrana, mientras que en células resistentes que expresan glicoproteína-P, la fluorescencia se encuentra en un ambiente hidrofílico lo que indica que la Rhodamina 123 ha sido eliminada desde la membrana por la glicoproteína-P (Kessel y col., 1989). Otros datos que favorecen a este modelo han sido encontrados en otros transportadores ABC cuyos sustratos son relativamente hidrofóbicos e incluso en el caso de transportadores ABC que tienen por sustrato sustancias hidrofílicas, como en el caso del transportador de glucosa, el sitio de unión al sustrato parece ser accesible desde la bicapa lipídica.

C. Modelo "Flipasa". Sería una variante del modelo anterior, en el cual se propone que la proteína unida a su sustrato, interacción que tiene lugar en la bicapa lipídica,

mediante un movimiento rápido transloca el sustrato de la cara interna de la membrana hacia la cara externa (Higgins y Gottesman, 1992). Recientemente se ha descrito que la glicoproteína-P producto del gen *mdr2* de ratón puede actuar translocando lípidos entre la capa externa e interna de la bicapa lipídica. Esta translocación es dependiente de ATP y Mg^{2+} , y se inhibe por vanadato y verapamil, inhibidores de la glicoproteína-P. Este mecanismo de translocación de lípidos apoya el modelo "flipasa" propuesto como modo de acción (Ruetz y col., 1994, Higgins y col., 1994).

Los modelos B y C implicarían que la glicoproteína-P debería estar dividida en un plano paralelo a la membrana para ser adecuada desde la bicapa lipídica. Ambos modelos pueden acoger también la posibilidad de que la glicoproteína-P se disponga en la membrana en forma multimérica.

I.11. PAPEL FUNCIONAL DE LA GLICOPROTEINA-P.

I.11.1. Transporte de compuestos xenobióticos.

La sobreexpresión de la glicoproteína-P en numerosas líneas de células tumorales con fenotipo de multirresistencia a fármacos, **MDR**, ha sido bien establecida y su implicación en este fenotipo ha quedado patente mediante experimentos de transfección en los que la expresión de la glicoproteína-P es suficiente para conferir multirresistencia a fármacos (Gros y col., 1986, Ueda y col., 1987, Pastan y col., 1988).

La principal característica de este fenotipo es precisamente la capacidad de conferir resistencia cruzada a una amplia variedad de compuestos tóxicos para la célula, no relacionados ni estructural ni funcionalmente, sin embargo estos compuestos suelen compartir la característica común de ser sustancias anfipáticas y solubles en lípidos (Gottesman y Pastan, 1993). En segundo lugar, la resistencia a los fármacos es debida a un menor acúmulo del mismo en el citoplasma, consecuencia de un aumento en el eflujo del fármaco. Relacionado con este mayor eflujo, son numerosas las descripciones del incremento en la expresión de la glicoproteína-P en células multirresistentes. Por último, el fenotipo MDR puede ser revertido por bloqueadores de los canales de calcio, como el verapamil, o inmunosupresores como ciclosporina A y FK506 (Gottesman y Pastan, 1993).

Entre los sustratos de la glicoproteína-P se encuentran fármacos antitumorales, antibióticos, inmunosupresores, ionóforos, péptidos e incluso proteínas. La capacidad de los ionóforos e inmunosupresores de revertir el fenotipo de resistencia se basa precisamente en que estos compuestos compiten por el fármaco por el sitio de unión al sustrato (Kessel y col. 1986).

La distribución de la glicoproteína-P en tejidos normales esta en concordancia con la hipótesis de que el papel fisiológico de la glicoproteína-P es la eliminación de compuestos tóxicos. Mediante técnicas inmunohistoquímicas, la glicoproteína-P ha sido localizada en la membrana apical de tejidos con función secretora: corteza adrenal, riñón, hepatocitos, conductos pancreáticos, mucosa intestinal (Thiebaut y col., 1987, 1989). Se cree que en estos tejidos la glicoproteína-P tiene por función eliminar los productos del metabolismo tóxicos, así como toxinas exógenas. Se han encontrado expresadas en las barreras sanguíneas, como la hematoencefálica. Recientemente se ha descrito su papel protector en ratones transgénicos deficientes homocigóticos para el gen *mdr1a*. Estos ratones acumulan altas concentraciones de ivermectina, compuesto neurotóxico, en plasma, corazón, cerebro, riñón, hígado debido a que en ausencia de glicoproteína-P los fármacos se acumulan fácilmente y llegan a pasar al cerebro atravesando la barrera hematoencefálica (Schinkel y col., 1994).

Este papel detoxificador de la glicoproteína-P ha sido descrito también en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, donde se cree que la glicoproteína-P estaría protegiendo al animal de los productos tóxicos producidos por plantas y microorganismos del suelo (Broecks y col., 1995)

La expresión de glicoproteína-P en la glándula suprarrenal y endometrio de ratón sugiere un posible papel en el transporte de hormonas esteroideas (Thiebaut y col., 1987, Arceciy col., 1988). Apoyando esto se ha visto que la progesterona compite por los sitios de unión a la glicoproteína-P (Yang, y col., 1990) y que esta puede transportar cortisol (van Kalken y col., 1992).

I.11.2. Canal de Cl⁻ o regulador de canales de Cl⁻.

Cuando las células son expuestas a cambios de osmolaridad, en muchos caso y en mamíferos, estas reducen su volumen celular acoplado la salida de agua al transporte de osmolitos (RVD), generalmente K⁺ y Cl⁻. Aunque principalmente son las células de riñón y epitelio intestinal las que estan sometidas a mayores cambios de volumen, se han descrito canales de Cl⁻ en otros muchos epitelios y tejidos. Los canales de Cl⁻, no presentan un motivo estructural muy conservado, tampoco son inhibidos muy específicamente por fármacos, por tanto cada

presunto canal de Cl^- debe ser objeto de un análisis muy detallado. Actualmente se ha propuesto que la glicoproteína-P pueda actuar como canal aniónico o regulador de canales Cl^- , sin embargo existen numerosos datos a favor y en contra de esta hipótesis.

Valverde y Gill, en 1992 mediante experimentos de "patch clamp" encontraron que cuando sometían a condiciones hipotónicas a células de fibroblastos NIH-3T3 tranfectadas con el gen MDR1, estas respondían al hinchamiento celular activando corrientes de Cl^- cuya magnitud era mayor que las observadas en las células control. Estas corrientes de Cl^- fueron inhibidas por fármacos sustratos de glicoproteína-P, verapamil, forskolin y otros revertidores. Se determinaron los requerimientos energéticos y se observó que la activación de estas corrientes requería la unión de ATP aunque no su hidrólisis (Gill y col., 1992). Basándose en estos hechos, en la distribución de glicoproteína-P en tejidos que también expresan canales de Cl^- , y en la existencia de un transportador ABC que actúa como canal de Cl^- , el CFTR, estos autores propusieron que la glicoproteína-P podría actuar como una proteína bifuncional que además llevar a cabo el eflujo de fármacos pudiera actuar, en determinados tipos celulares, como un canal de Cl^- . Estos autores proponen que el transporte de Cl^- requiere tan solo la unión de ATP a la glicoproteína-P, unión que produce el cambio conformacional necesario para que la glicoproteína-P pueda funcionar como canal, y que bajo esta conformación la proteína no puede actuar como bomba en el eflujo de fármacos, es decir, ambas funciones son excluyentes.

Sin embargo, algunos estudios han indicado que hay una falta de correlación entre los niveles de expresión de glicoproteína-P y las corrientes de Cl^- generadas por choque hipotónico (Luckie y col., 1994; Rosala y col., 1994). Células de adenocarcinoma de colon T8-1, que expresan glicoproteína-P muestran niveles similares de eflujo de vinblastina en ausencia o presencia de corrientes de Cl^- (McEwan y col., 1992). Ehring y col., (1994) describen que, en estudios llevados a cabo en células NIH-3T3 tranfectadas con el gen MDR1 y en células multirresistentes a fármacos que expresan glicoproteína-P, tanto la línea parental como la tranfectada y multirresistente, muestran amplias corrientes de Cl^- activadas por volumen de similar intensidad. Por otra parte estudian el acúmulo de Rodamina-123 mediante microscopia confocal, encontrando que este no se ve afectado por choque hipotónico. El uso de bloqueadores de canales de Cl^- no afectan a la capacidad de transporte de la glicoproteína-P.

Recientemente se ha propuesto que la glicoproteína-P no actúa en sí como un canal de Cl^- , sino que posiblemente actúe como un regulador de canales de Cl^- . Para demostrar esta hipótesis, Hardy y col. (1995) utilizan la línea celular HeLa que presenta corrientes de Cl^- activables por choque hipotónico, muy similares desde el punto de vista farmacológico y electrofisiológico a las observadas en células NIH 3T3 tranfectadas con el gen MDR1. Sin embargo, las corrientes de Cl^- activadas por volumen en la línea celular HeLa no están reguladas

por PKC, como ha sido descrito previamente para células NHI 3T3 transfectadas con el gen MDR1. Se ha observado que cuando células HeLa son transfectadas con el gen MDR1, las corrientes activables por volumen se vuelven susceptibles a ser reguladas por PKC. Esta regulación es inhibida cuando se mutan los residuos de Ser/Thr en los sitios consenso de fosforilación de la glicoproteína-P. Cuando estos sitios son reemplazados por glutámico, para simular la carga negativa proporcionada por el grupo fosfato, se mimetiza el efecto de la regulación por PKC sobre la activación del canal. En base a esto se propone que posiblemente la glicoproteína-P no actúe como canal de Cl^- sino que esté regulando la actividad de algún canal aniónico ampliamente distribuido y de naturaleza por ahora desconocida.

I.11.3. Modificador de pH intracelular.

Una característica que frecuentemente ha sido observada en líneas tumorales MDR es la alcalinización del pH citosólico (Keizer, 1989, Boscoboinik, 1990), observándose una correlación entre el grado de alcalinización citosólica y los niveles de resistencia a fármacos. La alcalinización del citosol conduce a un menor acúmulo intracelular del fármaco y el tratamiento con verapamil revierte parcialmente la alcalinización del pH.

El mecanismo por el cual un cambio de pH intracelular puede modificar el acúmulo intracelular de fármacos, puede ser explicado porque la mayoría de los fármacos antitumorales son bases débiles o moléculas cuya unión a estructuras celulares es dependiente de pH. En su forma neutra son hidrofóbicos y atraviesan fácilmente las membranas, una vez en el citoplasma se protonan dificultándose su paso a través de membranas. Su distribución relativa entre forma cargada y neutra dependerá de la concentración de H^+ , por lo que en células tumorales resistentes donde el pH citosólico es más alcalino, la proporción de fármaco no protonado es mayor saliendo fácilmente a través de la membrana (Simon y col., 1994).

Se ha descrito que esta alcalinización del pH intracelular puede estar relacionada con la expresión de la glicoproteína-P, y que los cambios de pH están relacionados con los niveles de expresión de la proteína (Roepe y col., 1993). Experimentos de transfección muestran que basta la expresión de la glicoproteína-P para generar la alcalinización del pH intracelular, y que la expresión de una glicoproteína-P no funcional no produce el mismo efecto (Luz y col., 1994). Estos autores proponen que la glicoproteína-P pueda estar alterando la actividad de un canal aniónico, posiblemente $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, basándose en que las células que expresan glicoproteína-P funcional se recuperan tras la acidificación citoplasmática, causada por deplección de Cl^- , de forma menos rápida a como lo hacen las células que no expresan glicoproteína-P. Además no

detectan una disminución en los niveles de expresión de intercambiadores aniónicos $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ que explique la menor actividad de los mismos. La hipótesis que proponen estos autores esta en concordancia con la posible actividad reguladora de la glicoproteína-P sobre canales de Cl^- .

Sin embargo no todos los datos pueden reconciliarse con esta hipótesis ya que han sido descritas líneas MDR que expresan glicoproteína-P y que no presentan diferencias en pH intracelular con respecto a las líneas parentales (Altenberg y col., 1993).

I.12. GLICOPROTEINAS-P EN PARASITOS.

Cada vez son mas frecuentes los casos descritos de presencia de glicoproteínas-P en parásitos y su relación con la resistencia a fármacos. En protozoos parásitos las glicoproteínas-P se presentan como una familia multigénica, al igual que en mamíferos, habiendose caracterizado en *P. falciparum*, *E. histolytica*, *T. cruzi*, y en diferentes especies de *Leishmania*.

En *Entamoeba histolytica* resistente a emetina se ha descrito la existencia de un fenotipo mdr caracterizado por: 1) La resistencia cruzada a fármacos hidrofóbicos como colchicina, iodoquinol y diloxanida usados en el tratamiento de amebiasis. 2) Un menor acúmulo de emetina en las formas resistentes. 3) Una reversión del fenotipo por revertidores clásicos del MDR y 4) La sobreexpresión de un mensajero de 5 kb que es reconocido por secuencias mdr (Orozco y col, 1985, Ayala y col. 1990).

Se han caracterizado parcial o totalmente 6 genes glicoproteína-P en *Entamoeba histolytica* . La secuencia de dos de ellos, los genes Ehpgp1 y Ehpgp2, muestra una gran homología con el gen mdr1 humano y de ratón, sin embargo debido a la carencia de un sistema de transfección en amebas, no se conoce aun la función. Se les ha atribuido un posible papel en el transporte de sustancias hidrofóbicas a las que el parásito esta expuesto en el colon humano, y una posible implicación en la resistencia a fármacos hidrofóbicos (Descoteaux y col., 1992).

I.12.1. Glicoproteínas-P en *Plasmodium falciparum*: el gen *pfmdr1*.

En *Plasmodium falciparum* ha sido descrita la existencia de dos miembros de la familia glicoproteína-P, los genes *pfmdr1* y *pfmdr2* (Foote y col., 1989, Wilson y col., 1989). El gen *pfmdr1* ha sido implicado en resistencia a cloroquina (CQ) y mefloquina y codifica para la glicoproteína-P llamada Pgh1 localizada en la vacuola fagocítica del parásito (Cowman y col., 1991). El gen *pfmdr2* no parece estar implicado en resistencia a CQ, no habiéndose descrito incremento en la expresión del mismo en aislados de malaria. Presenta una gran homología con un gen de levaduras involucrado en resistencia a cadmio (Zalis y col., 1993).

La resistencia a cloroquina en malaria se asocia con un eflujo del fármaco 50 veces mayor que en aislados sensibles (Krogstad y col., 1987), es revertida por verapamil y otros inhibidores del fenotipo *mdr* de células tumorales (Martin y col., 1987) y va acompañada de la expresión de la proteína Pgh1. La localización de varias mutaciones naturales del gen *pfmdr1* relacionados con la resistencia a CQ han reforzado la hipótesis de que esta glicoproteína-P pudiera ser la responsable de la resistencia a CQ en los aislados de parásitos resistentes al fármaco. Sin embargo, existen una serie de datos que ponen en duda la relación entre *pfmdr1* y la resistencia a cloroquina observada en *P. falciparum*: 1) Se ha visto en cruces sexuales llevados a cabo entre formas resistentes y no resistentes a cloroquina, que la resistencia a CQ no cosegrega con el gen *pfmdr1* (Wellems, 1990). 2) El aumento de resistencia a CQ suele ir acompañado de un descenso en la resistencia a mefloquina y una reducción de los niveles de mensajero y proteína Pgh1 (Barnes y col., 1992). 3) Por el contrario la resistencia a mefloquina va acompañada de un aumento en la expresión de *pfmdr1* y una mayor resistencia cruzada a halofantrina y quinina, así como una reducción de los niveles de resistencia a cloroquina (Cowman y col., 1994). La resistencia a mefloquina acompañada de la expresión del gen *pfmdr1* ha sido también descrita en aislados de campo.

Experimentos de transfección del gen *pfmdr1* en células de ovario de hamster chino (CHO), han mostrado una mayor sensibilidad a CQ en las células transfectadas debido a un mayor acúmulo del fármaco en los compartimentos lisosomales. Por el contrario, la transfección de los alelos mutantes del gen no originan este fenotipo en las células transfectadas (van Es y col., 1994a). Se ha comprobado que la expresión del gen *pfmdr1* origina un descenso en el pH lisosomal de las células transfectadas, que podría explicar el acúmulo de CQ en los lisosomas en base a su tropismo por los compartimentos ácidos (van Es y col., 1994b). La mayor acumulación de CQ en los lisosomas puede ser revertida mediante el uso de inhibidores de la H⁺ ATPasa o mediante cualquier otro método que alcalinice su pH. Este conjunto de datos ha inducido a

pensar que el mecanismo de acción del gen *pfmdr1* es la modificación del pH de los compartimentos en los que se localiza.

Recientemente el gen *pfmdr1*, así como dos polimorfismos del gen relacionados con resistencia a CQ, fueron expresados en levaduras deficientes para transportar el factor **a**, debido a una mutación en el gen *STE6*. Estos experimentos mostraron que el gen *pfmdr1* silvestre puede complementar funcionalmente al gen *STE6* actuando como un transportador, mientras que ambos polimorfismos no complementaron la función (Volkman y col., 1995). La hipótesis que se baraja actualmente es que el gen silvestre *pfmdr1* sea responsable del mecanismo de resistencia observado frente a mefloquina, halofantrina y otras quininas, y de la mayor sensibilidad del parásito a CQ. La localización del gen determina el acúmulo de estos fármacos en la vacuola fagocítica, por lo cual el resultado de este transporte dependerá del sitio y blanco de acción del fármaco (Borts y Ouellette, 1995)

I.12.2. La familia de glicoproteínas-P en *Leishmania ssp.*

La existencia de glicoproteínas-P en *Leishmania* fue descrita por primera vez cuando Ouellette y col. (1990) identificaron el gen *ltgpgA* en la región H de *L. tarentolae* resistente a MTX. Actualmente dentro del género *Leishmania* ha sido descrita una familia multigénica de glicoproteínas-P constituida al menos por 6 miembros (Légaré y col., 1994). Esta familia de glicoproteínas-P puede ser dividida en dos grupos: las glicoproteínas-P relacionadas con la *pgpA*, y las glicoproteínas-P *mdr*, más relacionadas con glicoproteína-P de mamíferos.

I.12.2.1. La *pgpA* y glicoproteínas-P relacionadas.

El gen *pgpA* fue por primera vez aislado y caracterizado a partir de *L. tarentolae* resistente a MTX. La amplificación del gen en forma de círculo extracromosomal y el carácter de transportador de fármacos atribuido a las glicoproteínas-P hizo pensar que este gen era responsable de la resistencia a MTX observada en estos parásitos. Hoy se sabe que la resistencia a MTX en *Leishmania ssp.* que amplifican la región H es debida a la amplificación del gen llamado LTDH, HMTXR o PTR1, siendo la sobreexpresión de la *pgpA* consecuencia de un proceso de coamplificación.

El gen *pgpA* ha sido relacionado con resistencia a arsenito ya que han sido descritos mutantes que amplifican la región H con resistencia cruzada a MTX y arsenito (Ellenberger y Beverley, 1989), y este compuesto es un potente inductor de su amplificación (Grondin y col., 1993). Mediante experimentos de transfección de fragmentos de la región H de *L. major* se comprobó que solo aquellos fragmentos que contenían el gen *ImpgpA* completo conferían resistencia a arsenito y a compuestos derivados de antimonio III, pero no a antimonio V, metales pesados y típicos sustratos de la glicoproteína-P de mamíferos (Callahan y col., 1991). La transfección del gen *ltpgpA* de *L. tarentolae* procedente de mutantes altamente resistentes a arsenito, confirió tan solo bajos niveles de resistencia a arsenito y derivados de antimonio III y V, no llegando a alcanzar los niveles observados en las líneas resistentes (Papadopoulou y col., 1993). Esta resistencia a arsenito que va acompañada de un descenso en el acúmulo intracelular del mismo, no siempre conlleva amplificación del gen *ltpgpA* y se ha demostrado que es debida a un mayor eflujo del fármaco, por lo que estos autores proponen algún mecanismo alternativo (Dey y col., 1994).

Mediante el uso de una sonda específica para el dominio de unión a nucleótido del gen *ltpgpA*, se ha caracterizado en *Leishmania tarentolae*, la presencia de una serie de genes que parecen estar estrechamente relacionados con el gen *pgpA*, los genes ***pgpB***, ***pgpC***, ***pgpD*** y ***pgpE***. Estos genes están localizados en dos locis diferentes, los genes *pgpA*, *pgpB* y *pgpC* se encuentran en un cromosoma de 800 kb, mientras que los genes *pgpD* y *pgpE* se localizan en un cromosoma de 1500 kb. Los genes que han sido hasta ahora secuenciados, *ltpgpA*, *ltpgpB* y *ltpgpE*, muestran una gran homología entre sí y a pesar de que presentan una estructura típica de una glicoproteína-P mantiene mayor homología con genes ABC, como el MRP y CFTR, que con glicoproteínas-P *mdr*. Por ahora tan solo es conocida la función del gen *pgpA* desconociéndose la del resto de los genes, a pesar de encontrarse ampliamente distribuidos en el género (Légaré y col., 1994). Recientemente se ha propuesto que el mecanismo de acción de la *pgpA* sea muy similar al descrito para la proteína MRP, sin bien aun no ha sido aportado ningún dato que apoye esta hipótesis (Borts y Ouellette, 1995).

I.12.2.2. Las glicoproteínas-P *mdr* en *Leishmania*.

Junto a los genes relacionados con *pgpA* se han descrito en diferentes especies de *Leishmania*, genes glicoproteína-P de tipo *mdr* que presentan una alta homología con glicoproteínas-P de mamíferos. Estos genes suelen ser amplificados como consecuencia de selección de resistencia a fármacos hidrofóbicos sustratos típicos de la glicoproteína-P. En *L. amazonensis* (Gueiros-Filho y col., 1992, 1996), *L. donovani* (Henderson y col., 1992), *L.*

enrietti (Chow y col., 1993) y *L. tropica* (Chiquero y col., 1996) se han descrito resistencias cruzadas a fármacos como vinblastina, puromicina y antraciclinas pero no a compuestos hidrofílicos del espectro de resistencias que presentan los genes *pgpA*. El mecanismo de resistencia es debido a una reducción en el acúmulo de fármaco con respecto a las líneas parentales sensibles, aunque este menor acúmulo no es revertido por verapamil (Henderson y col., 1992). Experimentos de transfección de los genes *ldmdr1* de *L. donovani* y *lemdr1* de *L. enrietti* han probado su implicación en el fenotipo de multirresistencia a fármacos que presentan estos parásitos.

I.12.3. Glicoproteínas-P en *Trypanosoma cruzi*: El gen *tcpgp2*.

Recientemente ha sido aislado y caracterizado un gen glicoproteína-P en *Trypanosoma cruzi* llamado *tcpgp2* (Dallagiovanna y col., 1996). Este gen que presenta una gran homología con el gen *ltpgpA* y genes relacionados, parece formar parte de una familia de glicoproteínas-P en *Trypanosoma*, al igual que ha sido descrito para *Leishmania*, *Plasmodium* y *Entamoeba*.

El gen que se expresa de forma constitutiva presenta una expresión diferencial a lo largo de su ciclo de vida, existiendo diferencias en el tamaño y características de los transcritos. Mientras que en la fase replicativa el mensajero aparece como un transcrito poliadenilado de 5 kb, tamaño esperado en función del número de nucleótidos del gen, en la fase no replicativa los transcritos, con un tamaño de 10 kb, no se encuentran poliadenilados (Dallagiovanna, Tesis doctoral).

Mediante experimentos de transfección del gen *tcpgp2* en *Leishmania* se ha mostrado que esta glicoproteína-P no está implicada en resistencia a fármacos inductores de multirresistencia, metales pesados o fármacos antichagásicos. Sin embargo parece que este gen podría desempeñar algún papel modificando el pH de la vacuola del parásito ya que en *Leishmanias* transfectadas con *Tcpgp2* se ha observado una mayor sensibilidad a cloroquina (CQ), una base débil con afinidad por compartimentos ácidos, respecto a los parásitos control. Esta mayor sensibilidad a CQ es revertida mediante tratamiento con ClNH_4 , compuesto que alcaliniza el pH intralisosomal.

Este conjunto de datos sugieren un cierto paralelismo entre el efecto causado por la expresión del gen *tcpgp2* en un sistema heterólogo como es *Leishmania* y la expresión del gen *pfmdr1* en células CHO. La localización de la proteína producto de este gen en vacuolas o

membrana citoplasmática y la medida de pH lisosomal en *Leishmania* transfectada con el gen podrá arrojar más luz acerca de la posible función de esta glicoproteína-P.

I.13. OTROS TRANSPORTADORES ABC.

I.13.1. La proteína asociada a multirresistencia a fármacos: MRP.

Otro de los transportadores ABC implicado en el fenotipo de multirresistencia a fármacos es la proteína MRP ("MDR-Related Protein"). Esta proteína de 1522 aminoácidos codificada por el gen HuMRP, tiene una alta homología de secuencia con el gen HuCFTR y el gen LtpgpA, encontrándose más alejada de las glicoproteínas-P MDR. A nivel de secuencia se han encontrado diferencias con glicoproteínas-P asociadas a MDR en los espacios que separan los motivos Walker de los dominios de unión a ATP, y se ha llegado a proponer que los genes MRP, HuCFTR y LtpgpA forman un grupo aparte dentro de los transportadores ABC con un origen evolutivo común (Cole y col., 1992).

En experimentos de inmunolocalización usando anticuerpos policlonales dirigidos frente a la región "linker" y carboxilo de la proteína, indican que parece localizarse en la membrana citoplasmática aunque no se descarta una localización en membranas subcelulares, posiblemente retículo endoplasmático (Zaman y col., 1994).

En general, el fenotipo que acompaña a la expresión de la proteína MRP se caracteriza por una resistencia cruzada a fármacos hidrofóbicos, debido a un menor acúmulo intracelular de fármaco tanto en células resistentes como transfectadas con el gen HuMRP. El menor acúmulo de fármaco se debe a un aumento en el eflujo del mismo en las líneas resistentes que no es revertido por ciclosporina A. No ha sido detectada una alcalinización del medio interno en células que expresen MRP. Todos estos datos apuntan a que la proteína MRP actúa de forma similar a como lo hace la glicoproteína-P, bombeando activamente los fármacos al medio extracelular de manera dependiente de ATP.

Recientemente se ha descrito que el transporte de fármacos por la proteína MRP está regulado por los niveles intracelulares de glutatión. El uso de butationa sulfoximida (BSO), un inhibidor de la síntesis de glutatión, revierte parcialmente el fenotipo MDR en células que expresan MRP originando un incremento en el acúmulo intracelular de daunorubicina y

rodamina-123. La adición de glutathion etil ester a las células tratadas con BSO restaura el déficit en los niveles intracelulares de los fármacos (Versantvoort y col. 1995).

I.13.2. El gen CFTR.

El producto del gen CFTR (**C**ystic **F**ibrosis **T**ransmembrane conductance **R**egulator) presenta una estructura de un transportador ABC con los cuatro dominios típicos y un dominio citoplasmático adicional, el dominio R, que contiene numerosos sitios de fosforilación para la PKA y PKC y que está involucrado en la regulación de la proteína (Riordan y col., 1984).

Se han descrito más de 200 mutaciones que afectan al gen CFTR y que causan fibrosis quística (FC), enfermedad que se caracteriza principalmente por un transporte de Cl^- defectivo a través de los epitelios (Welsh y Smith, 1993). Gran número de evidencias sugieren que el producto del gen CFTR es un canal de Cl^- voltaje dependiente, la transfección del gen CFTR silvestre en células que normalmente no expresan esta proteína y en sistemas heterólogos siempre ha dado lugar a la formación de corrientes de cloro inducibles por AMPc (Kartner y col., 1991). Mutaciones de residuos transmembrana alteran la permeabilidad del CFTR a iones Cl^- , I^- y Br^- (Anderson y col., 1991) y proteína CFTR purificada incorporada a bicapas lipídicas genera corrientes de Cl^- activadas por PKA y ATP (Bear y col., 1992).

El modelo funcional propuesto implicaría a los dominios transmembrana en la formación de un canal o poro para el flujo de iones y en la selectividad de los mismos. Los dominios de unión a ATP obtendrían la energía necesaria para la apertura y mantenimiento del canal, mediante la hidrólisis del ATP mientras que el dominio R intervendría en la regulación del canal mediante fosforilación por PKA. Mutaciones que afecten a este dominio, o bien su eliminación completa hacen que el canal se encuentre continuamente activado.

Se ha propuesto que el canal CFTR pueda estar modulando la actividad de otros canales iónicos de distinta naturaleza presentes en la membrana. Existen varias evidencias que apoyan esto: **1)** Se ha descrito que en células con FC existe un canal de Cl^- , ORCC ("**O**utwardly **R**ectifying **C** Cl^- **C**hannel"), que sufre una regulación anormal. El OCRR está regulado por PKA a través del CFTR, y esta regulación puede ser mimetizada en sistemas reconstituidos (Egan y col., 1993; Jovo y col., 1995; Schiebert y col., 1995). **2)** Se ha descrito un incremento en la absorción de Na^+ en las vías respiratorias de pacientes con FC, y que la actividad de un canal de Na^+ se encuentra alterada (Chinet y col., 1994). **3)** Existe un canal de Cl^- que es activado por Ca^{2+} , que en células con FC se encuentra sobreestimulado. La transfección de células con fibrosis quística,

del canal, mediante la hidrólisis del ATP mientras que el dominio R intervendría en la regulación del canal mediante fosforilación por PKA. Mutaciones que afecten a este dominio, o bien su eliminación completa hacen que el canal se encuentre continuamente activado.

Se ha propuesto que el canal CFTR pueda estar modulando la actividad de otros canales iónicos de distinta naturaleza presentes en la membrana. Existen varias evidencias que apoyan esto: **1)** Se ha descrito que en células con FC existe un canal de Cl^- , ORCC ("Outwardly Rectifying Cl^- Channel"), que sufre una regulación anormal. El OCRR esta regulado por PKA a través del CFTR, y esta regulación puede ser mimetizada en sistemas reconstituidos (Egan y col., 1993; Jovo y col., 1995; Schiebert y col, 1995). **2)** Se ha descrito un incremento en la absorción de Na^+ en las vías respiratorias de pacientes con FC, y que la actividad de un canal de Na^+ se encuentra alterada (Chinet y col., 1994). **3)** Existe un canal de Cl^- que es activado por Ca^{2+} , que en células con FC se encuentra sobreestimulado. La transfección de células con fibrosis quística, con el gen CFTR restaura las actividades normales de los canales de Na^+ y Cl^- activados por Ca^{2+} . (Johnson y col, 1995; Stutts y col., 1995).



MATERIAL Y METODOS

II. MATERIAL Y METODOS

II.1. MATERIAL.

II.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

II.1.1.1. Parásitos.

Todos los estudios realizados se llevaron a cabo sobre la cepa de *Leishmania tropica* LRC-L39, aislada y tipificada por el Dr. L. F. Schnur (Hebrew University, Hadassah Medical School, Jerusalem, Israel).

II.1.1.2. Bacterias y levaduras.

Las líneas celulares de bacterias y levaduras que fueron utilizadas durante el desarrollo de este trabajo así como su genotipo, aparecen reflejadas en la siguiente tabla.

Células	Genotipo	Referencia
<i>E. coli</i> XL1-Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, supE44, relA1, lac, [F' proAB, lacI ^q , ZAM15, Tn10 (tet ^r)]	Bullock y col., 1987
<i>E. coli</i> P2393	R55 (P2)F ⁻ e14 ⁻ (mcrA ⁻) hsdR514 (r _k ⁻ m _k ⁺) supE44 supF58 lacY1 or Δ(lacIZY)6 galK2 galT22 metB1 trp	Ausubel y col., 1989
<i>S. cerevisiae</i>	α1, trp1, his3, kil, 0. Línea haploide.	Martin Sanchez, 1980

II.1.2. REACTIVOS QUÍMICOS.

Los reactivos químicos empleados fueron suministrados por las casas comerciales Bio-Rad, Boehringer Mannheim, Gibco, Merck, Molecular Probes, Pharmacia, Promega, Sigma, Stratagene.

II.1.2.1 Medios de cultivo.

II.1.2.1.1. Medio de cultivo para parásitos

El cultivo "in vitro" de las formas promastigotas de *L. tropica* se realizó en medio RPMI 1640 enriquecido con vitaminas y aminoácidos y suplementado con un 20% de SBF, inactivado por calor a 56°C durante 30 min (Jackson y col., 1986). Para la preparación del medio, los concentrados de RPMI así como de vitaminas y aminoácidos fueron disueltos en las proporciones indicadas. El pH del medio de cultivo fue ajustado a un pH 7,2 y esterilizado por filtración a través de membranas de 0,2 μm (Sistema de filtración VacuCap™, de Gelman Sciences). A continuación se indican las cantidades de cada uno de los componentes usadas en la preparación del medio de cultivo, así como la composición de los concentrados de vitaminas y aminoácidos usados.

RPMI 1640 modificado	RPMI 1640 (10X)	70ml
	Glutamina	0,210g
	Hepes	0,417g
	Bicarbonato sódico	0,770g
	Solución de aminoácidos, ac.orgánicos y azúcares (10X)	100ml
	Solución de vitaminas (100X)	2ml
	Agua bidestilada c.s.p	800ml

Solución de vitaminas (100X)	Pantotenato cálcico	10mg
	Cloruro de colina	10mg
	Ac. fólico	10mg
	I-Inositol	20mg
	Clorohidrato de piridoxal	10mg
	Riboflavina	1mg
	Clorohidrato de tiamina	10mg
	Agua bidestilada c.s.p.	100ml

Solucion de aminoácidos, ac.orgánicos y azúcares (10X)		
	Arginina	4,4g
	Cisteina	0,8g
	Glutamato	2,5g
	Glutamina	16,4g
	Prolina	69g
	L-ornitina	1g
	Glucosa	7g
	Fructosa	4g
	Malato	6,7g
	α -cetoglutarato	3,7g
	Fumarato	0,55g
	Succinato	0,6g
	Agua bidestilada c.s.p.	1000ml

Los concentrados de medio y suero bovino fetal fueron de Gibco; los tampones, aminoácidos y vitaminas de Sigma.

II.1.2.1.2. Medio de cultivo para bacterias.

LB (Luria Bertani) líquido:	Bactotripton	10%
	Extracto de levadura	5%
	NaCl	5%.

NZY:	NZ amina	10%
	NaCl	5%
	Extracto de levadura	5%
	MgSO ₄ .7H ₂ O	2%.

LB-agar: Medio LB líquido y agar 15% p/v.

NZ-agar: Medio NZ líquido y agar 15% p/v.

NZ top agar: Medio NZ líquido y agar 7% p/v.

NZ top agarosa: Medio NZ líquido y agarosa 7% p/v.

II.1.2.13. Medio para levaduras.

Medio YPD:	Extracto de levadura	1%
	Peptona	2%
	Dextrosa	2%

La preparación de los medios de cultivo tanto para bacterias como para levaduras fue llevada a cabo según Sambrook y col. (1989).

II.1.3. ANTIBIOTICOS Y FARMACOS.

- **Geneticina** (G418). Fue suministrado por Sigma (St. Louis, MO), y preparada en una solución stock de 20 mg/ml.

- **Metotrexato** (MTX). Fue suministrado por Cyanamid Iberica, División Lederle (España) y preparado en una solución stock de 1mM disuelto en medio de cultivo.

- **Glucantime** (GLU). Fue suministrado por Rhône-Poulenc Farma (España). Este fármaco es comercializado bajo forma inyectable a una concentración de 85 mg/ml.

- **Doxorubicina** (DOX). Fue suministrada por Farmitalia Carlo Erba, (España) y preparada en una solución stock de 1mM en medio de cultivo.

- **Puromicina** (PUR). Fue suministrada por Sigma (St. Louis, MO) y preparada en una solución stock de 1mM en medio de cultivo.

- **Arsenato sódico**, ($[\text{Na}_2 \text{HAsO}_4]$). Fue suministrado por Sigma (St. Louis, MO) y preparado en una solución stock de 1mM en H_2O bidestilada.

- **Tartrato de Antimonio (III)**, ($\text{KOOOC}(\text{CHOH})_2\text{COOSbO}$). Suministrado por Sigma (St. Louis, MO) y preparado en una solución 1mM en medio de cultivo

- **Antimonio (V)** (SbCl_5). Suministrado por Sigma (St. Louis, MO) y preparado en una concentración 10mM en etanol absoluto.

- **Cloruro de Cadmio** (Cd Cl_2). Suministrado por Sigma (St. Louis, MO) y preparado en una solución stock de 5mg/ml disuelto en H_2O bidestilada.

- **Cloruro de Zinc** (Zn Cl_2). Suministrado por Sigma (St. Louis, MO) y preparado en una solución stock de 5mg/ml disuelto en H_2O bidestilada.

- **Cloruro de Cobre** (Cu Cl_2). Suministrado por Sigma (St. Louis, MO) y preparado en una solución stock de 5mg/ml disuelto en H_2O bidestilada.

Todas estas sustancias fueron preparadas en el mismo día de su uso y filtradas a través de membranas con un diametro de poro de $0,2 \mu\text{m}$ (Millipore, Bedford, USA).

II.1.4. TAMPONES Y SOLUCIONES.

-**Bromuro de Etidio**: Fue preparado a una concentración stock de 10 mg/ml.

-**Cloroformo**: Fue utilizado solo o en mezcla cloroformo:alcohol isoamílico en proporciones 24:1 ó 49:1

-**Denhardt's 50 x**: BSA 1%, Ficoll 400 1% y polivinilpirrolidona 1%

-**Fenol**. Saturado en Tris-HCl 0,1 M pH 7,5 o en agua bidestilada, con un 1% de hidroxiquinoleina.

-**Formamida desionizada**: La formamida fue desionizada mezclando 50 ml de formamida con 5 g de resina de intercambio iónico (Bio-Rad AG501-X8), en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente.

-**HBS**: Hepes 21 mM, NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Na_2HPO_4 7 mM, glucosa 6mM, pH7,4

-**LET**. Tris-HCl 10 mM, pH 7.5; EDTA 0,5 M, β -ME 7,5%

-**Medio Cloruro Completo**. NaCl 136,89 mM, KCl 2,68 mM, KH_2PO_4

1,47 mM, Na₂HPO₄ 8,46 mM, pH 7,4, suplementado con HEPES 20 mM, glucosa 11,1 mM, CaCl₂ 1 mM, MgSO₄ 0,8 mM

-Medio Cloruro rico en K⁺. KCl₂ 140 mM, SO₄Mg 0,8 mM, Cl₂Ca 0,5 mM, HEPES 10 mM, pH 7,8

-Medio Gluconato Completo. Gluconato sódico 136,89 mM Gluconato potásico 2,68 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM, Na₂HPO₄ 8,46 mM, pH 7,4 suplementado con HEPES 20 mM, glucosa 11,1 mM, MgSO₄ 0,8 mM.

-Medio Isotonico con Cl (Iso-Cl). NaCl 136,89 mM; KCl 2,68 mM; KH₂PO₄ 1,47 mM; Na₂HPO₄ 8,46 mM, MOPS 20 mM, suplementado con glucosa 11,1 mM, pH 7,4.

-MNE 10x. MOPS 0,2 M, NaAcO 50 mM, EDTA 10 mM, pH 7,4.

-NDS. Tris 0,01 M, EDTA 0,5 M, 1% lauril sarcosina, pH 9,5.

-PBS ("Phosphate Buffered Saline"). NaCl 0,14 M, KCl 2,6 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, pH 7,4.

-PBS-glucosa. NaCl 136,89 mM, KCl 2,68 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM, Na₂HPO₄ 8,46 mM, HEPES 20 mM, suplementado con glucosa 11,1 mM, pH 7,4.

-PBS-T. PBS 1X, Tween 20 al 1%.

-Solución tratada con DEPC. Para tratar una solución acuosa con DEPC se mezcla con éste hasta una concentración final del 0,1-0,2%, se agita y se deja reposar la solución varias horas. Finalmente, el DEPC se inactiva autoclavando la solución.

-Solución de hibridación. Formamida 50%, Denhardt's 5x, SSC 5x, ADN de esperma de salmón 1%, EDTA 5 mM, pH 8,0.

-SM. Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 0,1 M, MgSO₄ 10 mM.

-SSC 20x. NaCl 3 M, citrato sódico 0,3 M, pH 7,0.

-TAE 10x. Tris-acetato 0,4 M, EDTA 10 mM, pH 8,0.

-Tampón A. Tris-HCl, 0,2M, pH 8,0, EDTA 0,1 M.

-Tampón de carga 6x. 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol, 30% glicerol.

-Tampón de fosfatasa alcalina. Tris-HCl 0,1 M, pH 9,5, ClNa 0,1M, Cl₂Mg 5 mM.

-Tampón de lisis. Tris-ClH 10 mM, EDTA 1 mM, DTT 5 mM, PMFS 1 mM.

-Tampón de muestra 2x. Tris-ClH 0,135 M, pH 6,8, SDS 6%, glicerol 20%, β-Mercaptoetanol 10%.

-TBE 10x. Tris 0,89 M, ácido bórico 0,89 M, EDTA 20 mM, pH 8,0.

-TE. Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM, pH 8.

-TELT. LiCl 2,5 M, Tris-HCl 50mM, pH 8,0, EDTA 62,5 mM, Triton X-100 4% p/v.

-Tris-glicina 10x. Tris 0,25 M, glicina 1,92 M, SDS 1%, pH 8,3.

II.1.5. VECTORES DE CLONAJE Y EXPRESION.

Los vectores utilizados para el desarrollo de este trabajo aparecen reflejados en la siguiente tabla junto a su tamaño y la aplicación dada a los mismos.

Vector	Tamaño	Aplicación	Referencia
pUC18	2686 pb	Clonaje y secuenciación de ADN de cadena doble	Vieira y Messing, 1982
M13mp18	7250 pb	Clonaje y secuenciación de fragmentos de ADN en cadena sencilla	Messing, 1983
pBluescript KS	2958 pb	Clonaje y secuenciación de fragmentos de ADN en cadena doble	Stratagene
pGEM-T	3003 pb	Clonaje de productos de PCR	Promega
pGEX 2T	4900 pb	Vector para expresión de proteínas de fusión GST	Pharmacia
pX	6138 pb	Vector de transfección para <i>Leishmania</i>	LeBowitz, 1990
pX63NEO	6062 pb	Vector de transfección para <i>Leishmania</i>	LeBowitz, 1991

II.1.5.1. Construcción molecular del vector de trasfección pKSNEOA.

La dificultad que ofrece el clonaje de genes de gran tamaño en vectores de transfección de limitado polilinker, nos llevó a construir un nuevo vector de transfección que permitiera el clonaje el gen *ltrpgpE* de una forma más cómoda. El nuevo vector de transfección, al que llamamos pKSNEOA, se construyó a partir de dos vectores de transfección procedentes de la región R de *L.*

major, pX y pX63NEO. Ambos vectores presentan características similares difiriendo tan solo en el vector bacteriano y el polilinker que contienen. Así mientras que en pX el fragmento que procede de la región R está insertado en el polilinker del plásmido pBSKS-, en pX63NEO este fragmento está insertado en el vector pSP6-T3 de BRL (LeBowitz y col., 1991).

En el diseño de pKSNEOA se intentó mantener al máximo la integridad de las secuencias del vector pX insertadas en pBluescript KS-. Para ello las secuencias del marcador de selección NEO/DHFR y el sitio aceptor de el mini-exón permanecieran intactas, ya que estas secuencias son factores determinantes para la selección de los parásitos transfectados, en el caso de NEO/DHFR y para la correcta expresión del gen integrado, siempre que este no aporte su propio aceptor de "splicing".

Como se muestra en la figura II.1 para la construcción de pKSNEOA se partió del vector pX63NEO del que se extrajo mediante digestión con EcoRI un fragmento que contenía el híbrido NEO/DHFR, las secuencias que aportan el aceptor del mini-exón y parte del "polilinker" del vector. Este fragmento EcoRI fue insertado en el sitio EcoRI del vector pUC18 dando el plásmido pUCNEO.

El plásmido pUCNEO fue digerido con KpnI-NcoI, liberando un fragmento que contenía parte de la secuencia del híbrido NEO/DHFR. Paralelamente, a partir del vector pX mediante digestión con las enzimas KpnI-NcoI, se extrajo un fragmento que contenía además del sitio de poliadenilación, la secuencia que se eliminó en el plásmido pUCNEO. El fragmento KpnI-NcoI procedente de pX se insertó en pUCNEO obteniendo la construcción a la que se llamó pUCNEOPLUS.

pUCNEOPLUS fue digerido con BamHI liberando el vector pUC18 que fue sustituido por el vector pBluescriptKS- dando el plásmido pKSNEOA, un vector de transfección de características idénticas a las de sus precursores pX y pX63NEO.

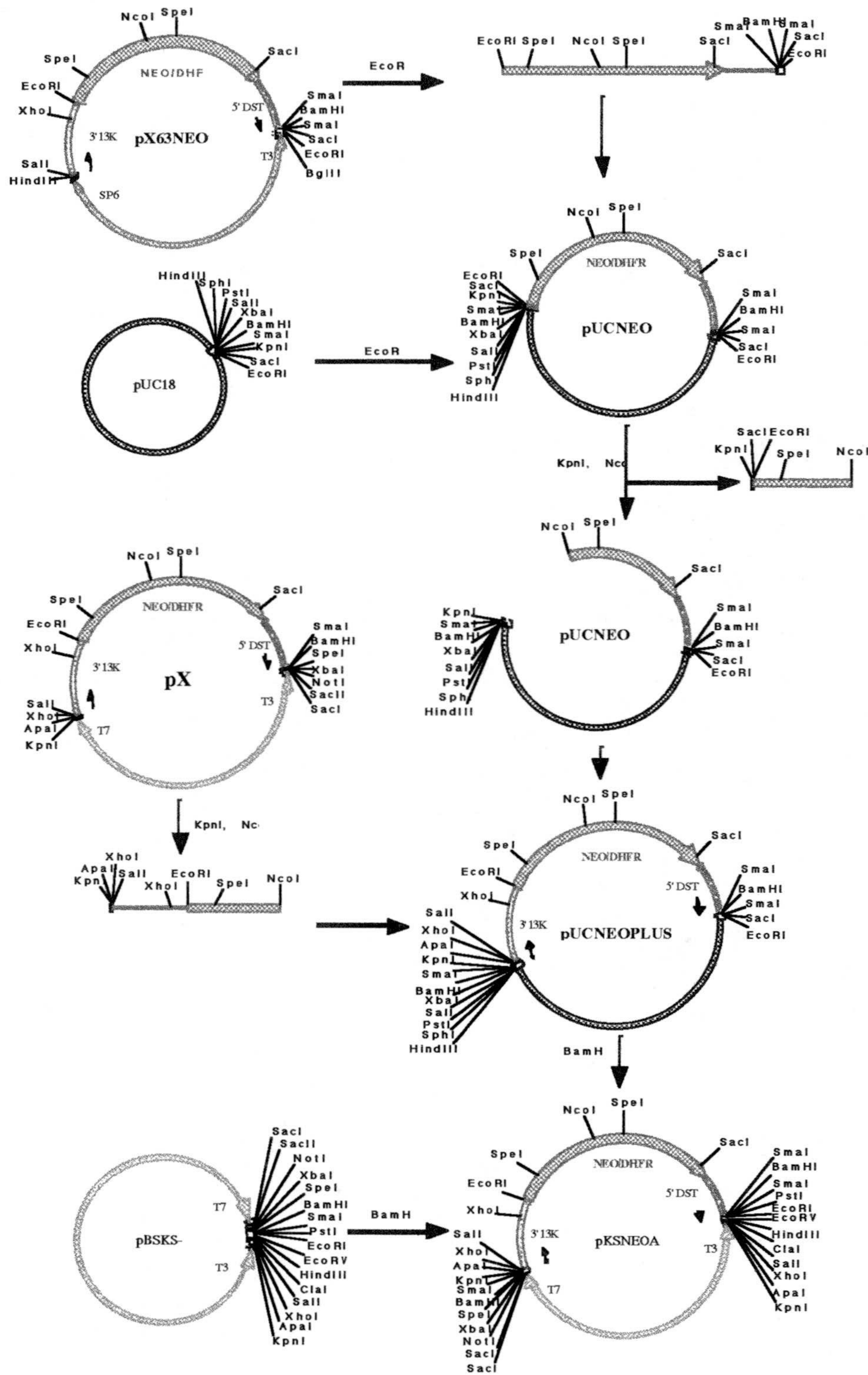


Figura II.1. Estrategia seguida para la construcción del vector pKSNEOA. En la figura han sido utilizadas las mismas claves de color y símbolos usados en el esquema del plásmido pX (figura IV.). Las digestiones realizadas en cada plásmido viene indicada por la enzima utilizada y una flecha azul que indica el producto de la digestión o el producto del clonaje resultante. Dentro de cada plásmido el vector bacteriano viene indicado por una línea verde en el caso de pBSKS y por una línea azul en el caso de pUC18.

II.1.6. PATRONES DE PESOS MOLECULARES

II.1.6.1. Electroforesis de DNA.

-**Marcadores cromosómicos.** Para determinar el tamaño de los cromosomas de *Leishmania* se utilizaron como marcadores de peso molecular los cromosomas de una cepa haploide de *S. cerevisiae* cuyos tamaños son de 2194, 1571, 1285, 1146, 1047, 991, 948, 864, 763, 709, 635, 495, 311, 225, 198 kb, respectivamente.

-**Marcadores de alto peso molecular.** Se utilizaron los fragmentos resultantes de la digestión del ADN del fago λ con la enzima de restricción HindIII cuyos tamaños en pares de bases son: 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 y 165 .

-**Marcadores de bajo peso molecular.** Se utilizaron los fragmentos que resultan de la digestión del ADN del fago ϕ X174 con la enzima HaeIII y cuyos tamaños son: 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 y 72 pb, respectivamente.

II.1.6.2. Electroforesis de proteínas.

Como marcadores de peso molecular para proteínas se usaron los standards de alto y bajo peso molecular para SDS-PAGE de Bio-Rad que consisten en una mezcla de las siguientes proteínas:

-**Marcadores de alto peso molecular:** Miosina con 200 KDa, β -Galactosidasa con 116 KDa, Fosforilasa b con 97 KDa, Seroalbúmina con 66 KDa, y Ovoalbúmina con 45 KDa.

-**Marcadores de bajo peso molecular:** Fosforilasa b con 97 KDa, Seroalbúmina con 66 KDa, Ovoalbúmina con 45 KDa, Anhidrasa carbónica con 31 KDa, Inhibidor de tripsina con 21 KDa y Lisozima con 14 KDa.

II.1.7. OLIGONUCLEOTIDOS .

Los siguiente tabla muestra la secuencia de los oligonucleótidos diseñados en el presente trabajo, así como su aplicación. Todos estos oligonucleótidos fueron sintetizados en el Instituto de Parasitología y Biomedicina (C.S.I.C.), Granada.

NOMBRE	SECUENCIA	APLICACION
AspE	5'CAGCAGACGGTGGGAA3'	Secuenciación y RT-PCR
ON6E	5'GAAAATCCAGCCAGAGCG3'	Secuenciación
P600R1	5'GATGCAGCGCCCCTGTCCC3'	Secuenciación
P600U1	5'CGAAACACAACGTCCTC3'	Secuenciación
P1300R1	5'CAACAAGCAGTACCACG3'	Secuenciación
P1300R2	5'CTACCAGCTCTATGTGTTG3'	Secuenciación
P1300R3	5'CATCACCTCCACATCAGTACTC3'	Secuenciación
P1300U1	5'GTTCCCACGACATAAACTTC3'	Secuenciación
P1300U2	5'CGGAGCGAGGAGACGAATAG 3'	Secuenciación
P1300U3	5'GGTCTTCTTCCAGTTCAACG3'	Secuenciación
1nbsE2	5'CTTCCTCAGAGCCCTTG3'	Secuenciación
1nbsE1	5'TGGACCATGAACGCAACG3'	Secuenciación
1nbsE3	5'CTCCAGCAGCACAACCAGGTC3'	Secuenciación
P500 ON1	5'AGCTGTCAACGTAGTGTC3'	Secuenciación
P500 ON2	5'CATCTACGTCGGCCTTTCC3'	Secuenciación
P387 ON1	5'ATACGCACAGAAAGCCAGAG3'	Secuenciación
P387 ON2	5'CTCTCCCTCAGTCTCACC3'	Secuenciación
2nbsE2	5'CTCATCCGTCAATCAGGC3'	Secuenciación
2nbsE3	5'AGAAGGTGGGCGTTG3'	Secuenciación
2nbsE1	5'TAGTCGCGAAAGGTGTGC3'	Secuenciación
ON1E	5'GCTAGTCGACGATGTGGCAGCAGTGCTA3'	PCR
ON3E	5'GCTAGTCGACCAAAGTAAAGCGCCACAC3'	PCR
RL-E5'	5'ATTGGATCCACTCACCAGGTCAGCG3'	PCR
RL-E3'	5'ATTGAATTCCTCCACCTCTGAGACA3'	PCR
mELei	5' AACGCTATATAAGTATCAG3'	RT-PCR
AspE	5' CAGCAGACGGTGGGAA3'	RT-PCR

II.1.8. INSTRUMENTACION Y "SOFTWARE".

II.1.8.1. Instrumentación.

II.1.8.1.1. Para el cultivo de parásitos.

- Cabinas estériles de flujo laminar vertical AV-10 de Telstar S. A., Cytair 125 y Supcris Model. A de Equipments Scientifiques et Industriels. S. A. Flufrance.
- Incubador con agitación orbital para cultivo de parásitos, Lab-Line® Orbit environ-shaker. Lab-Line Instruments Inc.
- Incubador Edelstahl RostFrei. Memmert.
- Microscopios de objetivo invertido Leitz (Labovert) y Olympus CK2.

II.1.8.1.2. Para el cultivo de bacterias.

- Incubador con agitación orbital Controlled Environment. G25. Environmental Incubator Shaker. New Brunswick Scientific Co. Inc.

II.1.8.1.3. Centrífugas.

- Centrífugas refrigeradas RC5C de Sorvall .
Rotores de Sorvall® ss-34 y GSA.
- Ultracentrífuga Beckman L8-M. Rotores de Sorvall® 70 Ti y AH650
- Centrífugas de mesa Beckman GPR y Kubota KS-8000.
- Microcentrífuga de mesa Beckman, Microfuga E™.

II.1.8.1.4. Para electroforesis.

- Minicubetas para electroforesis horizontal para DNA convencional de Sigma.
- Cubeta de electroforesis ADN 2012 Maxiphor de LKB.
- Sistema para electroforeis CHEF de LKB -Bromma con controlador de pulsos (2015-Pulsaphor Plus Control Unit) y sistema de refrigeración (2219 Multitemp II Thermostatic Circulator).
- Sistema para mini-electroforesis Mini-PROTEAN II electrophoresis cell de Bio-Rad y Sigma.
- Cubeta para secuenciación de BRL Modelo S2.

- Fuentes de alimentación de EC-105 de E-C Apparatus corporation, y 3000Xi Computer Controlled de Bio Rad
- Sistema de electroporación ECM 600[®] de BTX.

II.1.8.1.5. Otros.

- Baños termostatzados sin agitación: Unitronic 320 OR de Afora S. A. y Precistern de P Selecta.
- Transiluminadores de luz ultravioleta FOTODYNE y UVP modelos 6-3002 y TM-36, respectivamente.
- Secador de geles: Slab Gel Dryer SGD 4050 de Savant.
- Evaporador: AS160 Automatic Speed Vac[®] de Savant.
- Video densitómetro Modelo 620 de Bio-Rad laboratories en interface con un ordenador PC compatible AT 286 de Inves.
- Contador de centelleo 1209 Rackbeta Liquid Scintillation Counter de LKB-Wallac.
- Termociclador para PCR de **Pharmacia LKB modelo Gene ATQ controller.**
- Sonicador Vibra Cell de Sonics and Materials Inc.
- Agitador orbital Gyrotory[®] Shaker-Model G2, New Brunswick Scientific Co. Inc.
- Espectrofotómetro de haz simple Beckman DU-40 al que se acopló un módulo de "software" Soft-Pac[®] Module (Kinetics) y un espectrofotómetro de diodos Hewlett Packard 8452A en interface con un ordenador personal, Compaq PC modelo Deskpro 286N.
- Cámara fotográfica Polaroid modelo MP-4 LAND CAMERA.
- Cámara fotográfica impresora GELPRINTER modelo 00-GELPRIN.
- Revelador automático Agfa modelo Curix 60.

El análisis de los datos obtenidos se realizó en ordenadores Macintosh, Classic, LC III LC 475 y Quadra 650 dotados del sistema operativo 7.1. El "software" empleado fue el siguiente:

- **DNA strider[®]**, versión 1.1 (1989). Ch. Marck and C. E. A.
- **Kaleidagraph[®]**, versión 3.0 (1991). Abelbeck Software.
- **Gene Construction Kit[®]**, versión 1.03.1 (1990). Textco, Inc.
- **Microsoft Excel[®]**, versión 4.0 (1992). Microsoft Corporation.

- **Gel Fragment Sizer**® , versión 1.4 (1989). D. G. Gilbert. DogStar Software Bloomington, Indiana and Biology Dept. Indiana University.
- **OLIGO**®, versión 4.03 (1992). Wojciech Dychlik.

Se usó además el siguiente "software" para PC IBM compatible:

- "- **1-D Analyst Software**, versión 2.01, para la transferencia de datos desde el Video Densitómetro al ordenador PC compatible. "
- **HP 89542A** UV-Visible General Scanning Software.
- **HP 89532K** UV-Visible General Kinetic Software.

Además se emplearon varios programas correspondientes al paquete GCG.

II.2. METODOS.

Hemos excluído de esta tesis una descripción detallada de los protocolos de uso rutinario en el campo de la Biología Molecular. Una descripción exhaustiva de estos procedimientos se encuentra en manuales como el de Sambrook y col. (1989), y los editados por Ausubel y col., (1987-1993) en "Current Protocols in Molecular Biology".

II.2.1. CULTIVO DE CELULAS.

II.2.1.1 Cultivo y mantenimiento de *Leishmania*

II.2.1.1.1. Cultivo "in vitro" de *Leishmania tropica*.

Las formas promastigotes de las líneas de *L. tropica* silvestre y transfectadas fueron cultivadas a 28°C con o sin agitación, en medio RPMI modificado suplementado con un 20% (V/V) de suero bovino fetal inactivado. En el caso de las diferentes líneas de *L. tropica* transfectadas, fue añadida al medio la concentración correspondiente de G418 como marcador de selección. Para el mantenimiento de las células en fase logarítmica de crecimiento los cultivos fueron realizados en frascos estériles de 25 cm² (Costar), mediante la siembra de 4x10⁶ parásitos/ml en 2 ml de medio de cultivo fresco, cuando las células alcanzaron su densidad máxima (aproximadamente, 30x10⁶ cel/ml). Para el crecimiento de grandes volúmenes de parásitos (aproximadamente 200 ml) se utilizaron frascos de vidrio de

500 ml estériles. Partiendo de inóculos de aproximadamente 10 ml, con una densidad celular de 30×10^6 cel/ml, los parásitos fueron diluidos sucesivamente en medio fresco al 50%, y crecidos en agitación a 28°C hasta alcanzar el volumen deseado de parásitos en fase logarítmica de crecimiento.

Las curvas de crecimiento de cada una de las líneas de *L. tropica* obtenidas en este trabajo, fueron determinadas mediante recuento diario del número de parásitos en una cámara hemocitométrica de Neubauer, usando alícuotas del medio de cultivo diluidos al 50% en formaldehído al 2% en PBS.

II.2.1.1.2. Criopreservación y Descongelación.

Para la conservación de los parásitos durante largos periodos de tiempo, las células fueron almacenadas a -80°C y en Nitrogeno líquido a -120°C en alícuotas de 1-1,5 ml en medio de cultivo con glicerol al 15% en viales Bio-Freeze[®] de 2 ml de Costar. Cuando fue necesario, los parásitos fueron activados de nuevo mediante descongelación de las células por calentamiento rápido de los viales de congelación a 37°C. Para eliminar el glicerol del medio, los parásitos fueron centrifugados a 3000 rpm durante 10 min y resuspendidos en 2 ml de medio de cultivo fresco.

II.2.1.2. Cultivo y preservación de bacterias

II.2.1.2.1. Cultivo de bacterias.

Los cultivos rutinarios de bacterias fueron realizados en medio líquido LB o NZY, en función de la cepa bacteriana utilizada, con agitación y a 37°C. Cuando fue necesario se añadió ampilina al medio, a una concentración de 100 µg/ml, para el caso de células transformadas con plásmidos con marcadores de resistencia al antibiótico. Igualmente se añadió tetraciclina al medio a la concentración de 10 mg/ml para seleccionar la cepa bacteriana XL-1Blue sin transformar durante el cultivo de la misma. Para el mantenimiento y selección de las bacterias estas fueron cultivadas en medio semisólido LB-agar con o sin antibiótico según fuera necesario.

II.2.1.2.2. Mantenimiento de bacterias.

Las bacterias fueron conservadas a -80°C en medio LB con un 15% de glicerol en viales de congelación viales Bio-Freeze[®] de 2 ml de Costar o a temperatura ambiente en alicuotas de 1,5 ml de medio LB suplementado con 0,6% de agar.

II.2.1.3. Cultivo de levaduras.

Las células de *S. cerevisiae* utilizadas para la preparación de marcadores de DNA cromosómico fueron cultivadas en medio YPD a 28°C con agitación.

II.2.2. MANIPULACIÓN DE BACTERIAS.

II.2.2.1. Preparación de células competentes mediante el método del CaCl_2 .

Existen diversos métodos para desarrollar el estado de competencia en bacterias, proceso durante el cual las células pueden captar ADN del medio permitiendo así la entrada de las distintas construcciones plasmídicas, durante la transformación. Todos ellos tienen por objeto la modificación de la membrana bacteriana. Nosotros hemos empleado en este trabajo el método del CaCl_2 descrito por Hanahan (1983).

Según este método las bacterias son crecidas hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento ($\text{D.O.}_{590} = 0.375-0.4$) para ser recolectadas y tratadas con MgCl_2 0,1 M y con CaCl_2 0,1 M, sucesivamente, a una temperatura que nunca debe exceder los 4°C . Por último, las células son conservadas a -80°C en glicerol al 15% para el mantenimiento del estado de competencia.

II.2.2.2. Transformación de bacterias competentes.

Una vez establecido el estado de competencia en las bacterias procedemos a su transformación. Para ello hemos utilizado ADN plasmídico circular, conteniendo un origen de replicación y un marcador para la selección de las bacterias transformadas. Siguiendo el procedimiento descrito por Hanahan (1983), 100 μl de las células competentes fueron incubadas con 10-100 ng del ADN plasmídico, en hielo durante 30 min. Posteriormente la mezcla ADN-bacterias competentes es sometida a un breve choque térmico de 2' a 42°C , con

el fin de facilitar la entrada del ADN al citoplasma de las células. Seguidamente las células son enfriadas 2 min en hielo y se permite la recuperación de las mismas incubándolas en medio LB no selectivo (300-500 μ l) a 37°C con agitación durante 1 hora. Finalmente, se siembra en placas de LB semisólido con 100 μ g/ml de ampicilina.

II.2.2.3. Infección de bacterias con el fago lisogénico M13.

M13 es un bacteriofago filamentoso con ADN circular monocatenario. Una vez que el ADN del fago entra al citoplasma de la célula, es replicado por la ADN polimerasa bacteriana para dar un ADN de cadena doble, conocido como forma replicativa del fago (FR), que es funcionalmente análoga a un ADN plasmídico. Para la formación de nuevas partículas virásicas el ADN se replica en la forma de círculo rodante originando ADN de cadena simple, forma SS, que rodeado de las proteínas de la capsida es liberado de forma continua al medio como partícula virásica madura.

La transformación de células competentes con la forma replicativa de M13 fue hecha siguiendo el protocolo descrito para DNA plasmídico. Para obtener una amplificación del número de partículas virásicas, se añadió a las bacterias transformadas nuevas células en fase logarítmica de crecimiento susceptibles de ser infectadas. Ambos tipos de células fueron mezcladas con NZY top agar fundido, X-gal (0,03% concentración final) e IPTG (0,05 mM concentración final) y fueron extendidas sobre placas de medio NZY sin antibiótico e incubadas a 37°C. La selección de las placas de lisis transformantes positivas se llevo a cabo por el sistema de la β -galactosidasa.

Para amplificar el numero de partículas virásicas conteniendo el ADN con secuencias de interés, bastó con adicionar bacterias en fase logarítmica de crecimiento a los sobrenadantes de células portadoras de M13 ya que estos son fuentes relativamente puras de partículas maduras de M13.

II.2.2.4. Infección de bacterias con el fago lítico λ EMBL3.

La infección de bacterias con el fago lítico λ EMBL3 puede realizarse bien en placa de medio NZY para el aislamiento y selección de placas de lisis o bien en medio NZY líquido para la amplificación del número de fagos. En ambos casos se ha usado la cepa de *E. coli* P2392, capaz de sufrir un crecimiento lítico del fago λ EMBL3. Una descripción

detallada de ambos protocolos se encuentra en "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel y col., 1987-1993).

II.2.2.4.1. Plaqueo del bacteriófagos λ EMBL3: obtención de placas de lisis.

Las bacterias de la cepa P2392 crecidas hasta la fase logarítmica de crecimiento ($D_{0.590} = 1.0$), fueron incubadas en proporción 1:1 (v:v) con la dilución adecuada de los fagos en buffer de almacenamiento SM (II.1.3), a temperatura ambiente y durante 20 min. Para permitir la adsorción del fago a las células, estas fueron previamente recolectadas y resuspendidas en 0.5 volúmenes de $MgSO_4$ 10 mM. Seguidamente le fue añadido NZ-top agarosa a la mezcla de bacterias y fagos, que fue vertida en placas de NZ-agar previamente equilibradas a 37°C. Las placas de lisis se observaron tras incubar las placas a 37°C durante la noche.

II.2.2.4.2. Preparación de un lisado líquido de bacterias con λ EMBL3.

La cepa hospedadora, P2392, fue crecida en medio LB líquido hasta saturación y posteriormente infectada con una concentración de partículas de fago entre 10^5 y 10^8 fagos/ml. Para permitir la adsorción del fago a la bacteria, la mezcla de células y fagos fue incubada con un volumen igual de $MgCl_2/CaCl_2$ (1:1) 10 mM, durante 15 min a 37°C. Esta mezcla fue transferida a 50 ml de un medio rico como el NZY (II.1.4.2) y se incubó con agitación vigorosa a 37°C hasta que el medio se clarificó como consecuencia de la lisis celular. Finalmente se agregaron unas gotas de cloroformo para completar la lisis de las células y para eliminar los restos celulares, la solución rica en fagos fue centrifugada a 10000 rpm durante 10 min (rotor ss34 de Sorvall®). El sobrenadante obtenido fue almacenado a 4°C con unas gotas de cloroformo, constituyendo una fuente relativamente pura de fagos.

II.2.3. SELECCION DE BACTERIOFAGOS λ EMBL3 DE INTERES. "SCREENING" DE GENOTECAS.

En la realización de este trabajo se ha llevado a cabo el aislamiento de secuencias de interés a partir de una genoteca de ADN genómico del parásito *L. tropica* LRC-L39

resistente a 1 mM MTX. Para la selección de los fagos que contuvieran dichas secuencias, se llevo a cabo un rastreo de la genoteca o "Screening", cuya metodología puede dividirse en tres etapas:

II.2.3.1. Obtención de placas de lisis no confluyentes.

La obtención de placas de lisis no confluyentes tiene por objeto facilitar la selección y aislamiento de los aquellos fagos que contengan secuencias de interés. Para ello y en primer lugar, se determinó el título de la genoteca de *L. tropica* resistente a MTX plaqueando diferentes diluciones de la misma, según el método descrito en el apartado anterior (II.2.2.4.1). Cuando el título fue determinado se plaquearon aproximadamente 24000 unidades formadoras de placa distribuidas en diferentes placas petri de 90 mm de diámetro con una densidad de 6000 fagos/ placa.

II.2.3.2. Transferencia de los fagos a filtros de nitrocelulosa e hibridación.

Una vez que los fagos fueron plaqueados, se obtuvieron de cada una de las placas Petri dos réplicas idénticas en filtro de nitrocelulosa. La transferencia de los fagos al filtro se realizó por adsorción, colocando un filtro de nitrocelulosa sobre las placas de lisis y manteniéndolo sobre las mismas aproximadamente 1 min. Para poder establecer la correspondencia entre las placas de lisis transferidas al filtro y las localizadas en la placa, ambos, filtros y placa, fueron marcados. Se realizaron punciones en el filtro con una aguja gruesa que se hicieron coincidir con marcas de rotulador en la base de la placa y, sirviéndonos de las marcas de la placa, se obtuvo una segunda réplica que fue también orientada pinchando con la aguja en los lugares señalados previamente bajo la placa.

Para desnaturalizar el ADN de los bacteriófagos, los filtros fueron tratados secuencialmente en las siguientes soluciones: 5 min en NaOH 0,5 N, NaCl 1,5 M; 5 min en Tris-HCl 1M pH 7.5, NaCl 1.5 M; y 20 min en SSC 20x. El tratamiento se hizo en bandejas sobre papeles Watman 3 MM empapados en las soluciones indicadas, manteniendo siempre hacia arriba la cara del filtro a la cual habían sido adsorbidos los fagos.

Para fijar el ADN de los fagos a los filtros, las réplicas fueron incubadas durante 2 horas en un horno a 80°C. Los filtros fueron posteriormente hibridados (II.2.14) utilizando

sondas radiactivas específicas marcadas por "random priming" (II.2.10) y expuestas a película autorradiográfica.

II.2.3.3. Aislamiento y almacenamiento de los clones positivos.

Una vez reveladas las películas autorradiográficas, estas se superpusieron a los filtros hibridados y se marcaron con rotulador las posiciones de cada una de las punciones realizadas en los filtros. Valiendonos de estas marcas, se hicieron coincidir las autorradiografías de las réplicas de cada placa, entre sí y fueron seleccionados los clones positivos considerados como aquellos fagos que hibridaron con la sonda en las dos réplicas obtenidas de cada placa. Al coincidir las marcas practicadas en los filtros con las señaladas bajo la placa pudimos identificar y recoger los clones positivos de la calva de lisis. La recolección de los fagos positivos se hizo extrayendo la calva de lisis seleccionada con pipetas "pasteur" estériles y vertiendo la misma en 1 ml de SM, tampón en el cual se preservan los fagos a 4°C.

A partir de los clones aislados se realizaron dos nuevas rondas de plaqueo y selección con el fin de aislar los clones positivos de otros, posibles contaminantes del proceso de recolección, que no lo fueran. Para ello se hicieron diferentes diluciones de los fagos conservados en tampón SM a fin de obtener placas de lisis lo suficientemente separadas como para facilitar el aislamiento de las que fuesen positivas.

II.2.4. AISLAMIENTO DE ACIDOS NUCLEICOS.

II.2.4.1. Aislamiento de ADN

II.2.4.1.1 Aislamiento del ADN de la forma promastigote de *Leishmania*.

Para la extracción del ADN de las formas promastigotas de *Leishmania* se siguió el método descrito por Coderre y col. (1983). Los parásitos crecidos hasta la fase estacionaria (30×10^6 células/ml) son centrifugados a 3000 g, 15 min a 4°C y lavados tres veces con PBS. A continuación las células son resuspendidas en tampón A y lisadas con SDS 0,5% y proteínasa K 0,1 mg/ml, dejando la mezcla incubarse a temperatura ambiente toda la noche. Seguidamente se añade ClNa 0,15 M a las células lisadas y se realiza una extracción fenólica. Los ácidos nucleicos, contenidos en la fase acuosa, son precipitados con dos

volumenes de etanol, resuspendidos en tampón TE y sometidos a tratamiento con RNAsa A durante toda la noche a temperatura ambiente para la digestión del RNA. Por último, se realiza una nueva extracción con fenol-cloroformo 1:1, y precipitación etanólica de la fase acuosa (Sambrook y col., 1989). El DNA se resuspende en agua desionizada estéril.

II.2.4.1.2. Aislamiento del ADN plasmídico.

Los diferentes protocolos existentes para el aislamiento del ADN plasmídico se basan en la característica organización del mismo. Gracias a su forma superhelicoidal circular cerrada y a su grado de compactación puede ser separado del ADN cromosómico bacteriano mediante centrifugación subsiguiente a una lisis celular suave, en la que el ADN cromosómico es precipitado junto a las proteínas bacterianas quedando el ADN plasmídico en solución.

II.2.4.1.2.1. Obtención de ADN plasmídico a pequeña escala.

Para el aislamiento de ADN plasmídico a pequeña escala partimos de un cultivo en fase estacionaria de bacterias transformadas con el plásmido que queremos aislar. Los procedimientos seguidos en esta tesis han sido básicamente tres, uno de ellos comercial que proporciona un ADN plasmídico de gran pureza apto para secuenciación. A continuación se describen los métodos usados aunque una descripción detallada aparece en Sambrook y col. (1989) y Ausubel y col. (1987-1994).

II.2.4.1.2.1.1. Método de lisis alcalina.

En este procedimiento las células, recogidas por centrifugación, son lisadas con una solución alcalina NaOH-SDS y posteriormente neutralizadas con acetato sódico. En estas condiciones el ADN plasmídico se renaturaliza, pero el ADN cromosómico permanece desnaturalizado precipitando como un complejo proteína-DNA-SDS. La suspensión de ADN plasmídico puede ser sometida a extracción fenólica para la eliminación de proteínas bacterianas y tratamiento de la fase acuosa con RNAsa A, seguido de nueva extracción fenólica y precipitación etanólica de la fase acuosa para la obtención de un ADN plasmídico de mayor pureza.

II.2.4.1.2.1.2. Minipreparación de Litio.

En este caso, las células son lisadas con una solución alcalina (TELT) que contiene Litio y Triton X-100, como detergente. El DNA cromosómico es extraído junto a las proteínas con un volumen de fenol:cloroformo (1:1), y en la fase acuosa el ADN plasmídico es sometido a una precipitación etanólica (He y col, 1990).

II.2.4.1.2.1.3. "Magic Miniprep[®]".

Partiendo de 1 ml de cultivo bacteriano, se procede a una lisis alcalina tratando a las células con SDS 1%, NaOH 0.2 N, seguida de una neutralización con KAcO. A continuación, el ADN cromosómico es precipitado por centrifugación junto a las proteínas, y el ADN plasmídico del sobrenadante es retenido en una resina, lavado, y por último, eluido con H₂O a 65 °C (Promega, Biological Research Products).

II.2.4.1.2.2. Obtención de ADN plasmídico a gran escala.

"Magic Maxiprep[®]".

Para obtener DNA plasmídico a gran escala se utilizó un método comercial de alto rendimiento (1-2 mg de ADN). Partiendo de grandes volúmenes de bacterias transformadas, del orden de 100 a 500 ml, se siguió un protocolo descrito por la casa comercial (Promega, Biological Research Products), similar al previamente descrito en el apartado anterior para "Magic Miniprep[®]".

II.2.4.1.3. Aislamiento de ADN del bacteriófago M13.

Partimos de un cultivo de bacterias infectadas con M13 (apartado II.2.2.3), el cual fue sometido a centrifugación para recoger las bacterias portadoras de la forma replicativa del fago, separándolas de las partículas virásicas que permanecen en el sobrenadante.

A partir del precipitado de bacterias y siguiendo un método de lisis alcalina similar a los usados para la extracción de ADN plasmídico, se pudo llevar a cabo la extracción de la forma replicativa del fago. Para la extracción del ADN monocatenario del fago recurrimos al sobrenadante y seguimos el procedimiento descrito por Messing (1983).

Este procedimiento consiste en una precipitación de los fagos facilitada por una mezcla de polietilenglicol 8000 y ClNa, seguida de una extracción fenólica para desnaturalizar las proteínas de la capsida y separarlas del ADN virásico. Posteriormente el ADN es precipitado en frío, con etanol absoluto y NH₄AcO, y resuspendido en H₂O desionizada esteril. Este ADN de cadena sencilla circular y cerrada fue empleado como ADN molde en la secuenciación por el método de Sanger.

II.2.4.1.4. Aislamiento de DNA del bacteriófago λ EMBL3.

Para el aislamiento de ADN de los bacteriófagos λ EMBL3 se partió de volúmenes de 50 ml de un lisado líquido de bacterias con los correspondientes fagos, obtenidos según describe el apartado II.2.4.4.2. Estos fueron incubados durante una hora a 37°C con 1 μ g/ml de ADNasa y 5 μ g/ml de ARNasa para eliminar los contaminantes de ARN y ADN bacteriano. A continuación al sobrenadante con los fagos se le añadió 3,5g de ClNa y 6 g de PGE 6000, para facilitar su precipitación. Tras dejar la mezcla reposar toda la noche a 4 °C, los fagos fueron precipitados centrifugando a 3000 g, 30 minutos a 4 °C.

Una vez que se dispuso de los fagos, el ADN de λ EMBL3 fue obtenido mediante digestión de las proteínas de la capsida con una mezcla de 0,2% SDS, 10 mM EDTA, pH 8 y proteínasa K. Tras separar las proteínas del ADN por extracción fenólica, este fue precipitado con 0,1 vol. de NaAcO 3M y 2,5 vol. de etanol absoluto, observándose la formación de una madeja de ADN que fue recogida, lavada con etanol al 70%, secada al vacío y resuspendida en H₂O.

II.2.4.2. Aislamiento de ARN

II.2.4.2.1. Aislamiento de ARN total de *Leishmania tropica* .

Para el aislamiento del ARN de las formas promastigotas de *Leishmania*, seguimos el protocolo descrito por Chomczynsky y col.(1987). En el proceso de extracción de ARN todo el material así como soluciones usadas fueron tratados con dietilpicrocarbamato (DEPC) y posteriormente autoclavados. El DEPC es un reactivo que se une al grupo amino de las proteínas inactivándolas irreversiblemente, de esta forma se previene la degradación del ARN por posibles ARNasas contaminantes.

El ARN total se extrajo a partir de un cultivo de promastigotes de *L. tropica* en fase logarítmica de crecimiento. Aproximadamente 1×10^9 parásitos fueron recogidos centrifugando 15 min a 3000g a 4°C e inmediatamente resuspendidos en 4 ml de una solución desnaturante que contiene tiocianato de guanidina 4 M, Na-citrato 25 mM, pH 7,0; β -ME 0,1 M, y lauril sarcosina 0,5%. El homogenado fue tratado con 0,1 volúmenes de NaAcO 2M, pH 4,0, y se realizó una extracción fenólica con 1 volumen de fenol saturado con agua y 0,2 volúmenes de cloroformo:alcohol isoamílico 49:1, previa incubación de la mezcla en hielo durante 15 min. El ARN se precipitó con 1 volumen de isopropanol, incubando 30 min a -20 °C y centrifugando 10 min, a 10000 g, a 4°C. El precipitado se resuspendió en 1,2 ml de solución desnaturante y de nuevo se precipitó con 1,2 ml de isopropanol. El ARN precipitado se lavó durante 15 min a temperatura ambiente con etanol al 70%. Por último, se disolvió en DDW tratada con DEPC en un baño a 65°C. El ARN se conservó alicuotado en agua bidestilada con DEPC a -80°C.

II.2.5. CUANTIFICACION DE ACIDOS NUCLEICOS.

La concentración del ADN y ARN aislados, así como la pureza de la muestra se determinó espectrofotométricamente a longitudes de onda de 260 y 280 nm. Considerando que a 1mg/ml de ADN corresponde una $D.O._{260} = 20$ y que a 1mg/ml de ARN corresponde una $D.O._{260} = 25$, podemos determinar la concentración de ac. nucleico de la muestra problema:

$$X \text{ mg/ml ADN} = D.O._{260\text{nm}} \times 1 \text{ mg/ml} \times \text{factor de dilución} / 20$$

$$X \text{ mg/ml ARN} = D.O._{260\text{nm}} \times 1 \text{ mg/ml} \times \text{factor de dilución} / 25$$

La lectura a 280 nos indica la contaminación de proteínas presentes en la muestra, de forma que para que la muestra de ácido nucleico sea considerada pura, el cociente $D.O._{260}/D.O._{280}$ debe estar entre 1,8 y 2 (Sambrook y col, 1989).

II.2.6. TRATAMIENTO ENZIMATICO DEL ADN.

Una vez que el ADN ha sido aislado y cuantificado, se puede proceder a la manipulación enzimática del mismo. Las enzimas que aparecen en este apartado fueron empleadas para los mapeos de restricción, fragmentación de ADN, y en el proceso de clonado de fragmentos de ADN en los vectores mencionados en el apartado de material. Las enzimas fueron suministrados por Boehringer, Promega y Pharmacia.

II.2.6.1. Digestiones con endonucleasas de restricción.

Las digestiones de DNA se hicieron en general, en un volumen final de 20-50 μ l empleando para ello de 1 a 10 U de enzima por cada μ g de DNA. Las reacciones se llevaron a cabo en el tampón recomendado por la casa comercial para cada enzima, diluido en H₂O desionizada esteril, durante un tiempo máximo de 2 horas a la temperatura que la casa comercial recomienda para la máxima actividad de la enzima.

II.2.6.2. Tratamiento del DNA con T4 DNA polimerasa.

La ADN polimerasa del fago T4 cataliza la polimerización del ADN de cadena sencilla añadiendo un desoxinucleosido 5'-trifosfato al extremo 3' hidroxilo del ADN. Por tanto, esta enzima puede ser utilizada para producir extremos romos en ADN de cadena doble digerido con enzimas de restricción que proporcionan extremos 5' prominentes. En presencia de desoxinucleosido 5'-trifosfatos, y de un ADN molde adecuado la enzima lleva a cabo la actividad polimerasa 3'-5', preferentemente, en ausencia de estos factores la enzima actúa como exonucleasa 3'.

Las reacciones para la producción de extremos romos con esta enzima se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones de la casa comercial (Boehringer Mannheim Biochemica).

II.2.6.3. Tratamiento del DNA con fosfatasa alcalina.

Con objeto de minimizar el religamiento de vectores linearizados con enzimas de restricción durante los experimentos de transformación, sometimos a dichos vectores a tratamiento con fosfatasa alcalina. Esta enzima hidroliza el grupo fosfato en 5' del ADN evitando que tenga lugar la formación de un enlace fosfodiéster con el grupo hidroxilo del extremo 3' del propio vector. Se empleó la fosfatasa alcalina aislada de intestino de vaca ("Calf Intestinal Phosphatase", CIP) en las condiciones indicadas por el fabricante.

II.2.6.4. Reacción de ligamiento.

La reacción de ligamiento permite incorporar fragmentos de ADN en vectores linearizados siempre que ambos presenten extremos compatibles (romos o prominentes). Esta reacción es llevada a cabo por una ligasa que cataliza la formación de enlaces

fosfodiéster entre los extremos yuxtapuestos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo de un ADN de cadena doble.

Para la reacción de ligamiento se utilizó la T4 ligasa que permite unir tanto extremos romos como cohesivos. En general, las reacciones de ligamiento fueron realizadas en un volumen entre 20 y 30 μ l bajo las condiciones recomendadas por el fabricante, aunque en algunos casos el tampón de reacción suministrado por la casa comercial fue suplementado con 5 mM de ATP. La cantidad de inserto y vector fue optimizada en cada caso, siendo por lo general la cantidad de inserto 10 veces superior a la del vector en la mezcla de ligamiento. Las reacciones de ligamiento se hicieron durante toda la noche a 15°C

II.2.7. ELECTROFORESIS DE ACIDOS NUCLEICOS.

II.2.7.1. Electroforesis de ADN en geles horizontales de agarosa.

Para llevar a cabo la separación de fragmentos de ADN, así como para determinar la integridad del mismo se realizaron electroforesis en geles horizontales de agarosa. En estos geles la separación del ADN de cadena doble tiene lugar en base al tamaño y al estado que presente la molécula. Así, en el caso de fragmentos de ADN lineal la migración es proporcional al tamaño del ADN, en cambio en el caso de ADN circular la migración depende no solo del tamaño de la molécula sino también del estado de enpaquetamiento que presente la misma.

En el desarrollo de este trabajo se utilizaron geles con porcentajes de agarosa que oscilaron entre el 0,6 y el 2%, dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar. Los geles fueron preparados con tampón TAE 1x o TBE 1x y el desarrollo de la electroforesis se hizo en el mismo tampón utilizado en la preparación del gel. Se aplicaron voltajes entre 20 y 100 V durante tiempos que oscilaron entre 1 hora y toda la noche en función del voltaje aplicado y el desarrollo electroforético que se desee obtener. La muestra de ADN se preparó añadiendo tampón de carga 6x (1x concentración final). Finalmente el ADN fue visualizado mediante examen directo bajo luz ultravioleta, a longitud de onda de 300 nm, del gel teñido con 0.5 μ g/ml de bromuro de etidio (BrEt). Como marcadores de peso molecular se utilizaron los fragmentos del ADN del fago λ digerido con HindIII, y los del DNA del fago Φ X174 digerido con HaeIII.

II.2.7.2. Electroforesis de ARN en geles horizontales de agarosa.

La migración del ARN en geles horizontales de agarosa obedece los mismos principios que la electroforesis del ADN. En este caso para evitar la formación de estructuras secundarias en el ARN, que afecten a la migración de la molécula, se utilizaron geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes. Los geles fueron al 1% de agarosa y se prepararon en MNE 1x y 2 M de formaldehído. El desarrollo electroforético del ARN se llevo a cabo en MNE 1x aplicando voltajes de 60-100 voltios durante 2-3 horas. Las muestras de ARN se prepararon desnaturalizando el ARN en presencia de formaldehído 2M, formamida 50%, y MNE 1x, calentando 10 minutos a 65°C. Después de la desnaturalización se añadió tampón de carga 6x (1x concentración final) y BrEt 10 mg/ml (1 µg/ml concentración final). Como patrones de peso molecular se tomaron los RNA ribosómicos de ratón.

II.2.7.3. "CHEF electroforesis"

Esta técnica de electroforesis en campo pulsado denominada "Clamped Homogeneous Electric Field (CHEF) electrophoresis" (Chu y col., 1986) permite resolver moléculas de DNA de hasta 2000 kb en un gel de agarosa en base al tamaño molecular de las mismas. Para ello se emplea un circuito con electrodos agrupados en forma hexagonal que generan cambios periódicos en la dirección del campo eléctrico. La inercia de las moléculas de ADN a orientarse en cada uno de estos cambios es menor cuanto mayor es su masa, sufriendo un retardo diferencial que es proporcional al tamaño de la misma.

II.2.7.3.1. Preparación de muestras para CHEF.

II.2.7.3.1.1. Preparación de muestras de *Leishmania* para CHEF .

En la preparación de las muestras de ADN cromosómico se utilizan parásitos enteros que son em bebidos en bloques de agarosa y sometidos a un tratamiento que lisa al parásito permitiendo la liberación del ADN cromosómico sin que este sufra algún daño.

Los bloques de agarosa fueron preparados mediante el procedimiento descrito por Garvey y Santi (1986). Aproximadamente 8×10^7 de parásitos fueron lavados 3 veces con PBS y resuspendidos en 0,3 ml de PBS. Los parásitos fueron mezclados con igual volumen

de agarosa de bajo punto de fusión (Bio-Rad) fundida al 1,2% en PBS y se distribuyeron en moldes para los bloques. Una vez solidificados, los bloques fueron incubados a 50°C durante dos días en una solución de EDTA 0,5 M, pH 8,0, 1% de N-laurosil-sarcosina y 0,1% de proteinasa K. Para eliminar los restos de detergente, los bloques fueron lavados a 50°C con una solución 0,2 M de EDTA, pH 8,0 y conservados a 4°C en la misma solución.

II.2.7.3.1.2. Preparación de marcadores de levadura para CHEF

Como marcador de electroforesis se usaron los cromosomas de una cepa haploide de *S. cerevisiae*, S13 cedida por el Dr Luis M. Ruiz Perez. La preparación de los bloques de levadura se hizo según el procedimiento descrito por Carle y Olson (1984), en el cual aproximadamente 4×10^6 células en fase estacionaria son tratadas con una solución que contiene liticasa (liticasa 2 mg/ml, Na_2HPO_4 0,01M; glicerol 50%), durante 20 min a 37°C. Esta mezcla es posteriormente embebida en bloques de agarosa de bajo punto de fusión al 0.625% que tras solidificar son tratadas con tampón LET a 37°C durante 16 horas y seguidamente en tampón NDS con 1mg/ml de Proteínasa K a 50°C durante toda la noche. Los bloques son conservados en este tampón a 4 °C hasta su empleo.

II.2.7.3.1.3. Condiciones de electroforesis.

En cuanto a las condiciones de electroforesis se utilizaron geles de agarosa al 1,5% en tampón de electroforésis TBE 0,5 x. El tamaño de las moléculas que se separan dependió de la duración del pulso aplicado en cada dirección:

- Para la separación de los cromosomas de *L. tropica* se utilizaron tres ciclos de pulsos de 100 seg, 12 horas; 200 seg, 24 horas; y 300 seg, 12 horas a 160V durante 48 horas. Bajo estas condiciones conseguimos separar al menos 17 cromosomas de *Leishmania*.

- Para separar los elementos extracromosomales de los cromosomas de *Leishmania* se aplicaron pulsos de 4 seg a 360 V durante 16 horas. Bajo estas condiciones los cromosomas lineales de *Leishmania* no se separan sino que quedan agrupados, permitiendo establecer la presencia de elementos extracromosomales circulares, ya que estos no migran en función de su tamaño sino en forma independiente de tiempo de pulso.

Para visualizar el ADN, los geles fueron teñidos en H_2O desionizada con BrEt 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 30 min.

II.2.8. AISLAMIENTO Y LIMPIEZA DE FRAGMENTOS DE ADN.

Los fragmentos de ADN separados electroforéticamente en geles de agarosa fueron aislados mediante extracción del trozo de gel que contiene la banda de ADN de interés con BrEt intercalado.

Para eliminar la agarosa y el BrEt del fragmento de ADN se utilizó el kit comercial "GeneClean[®]" (BIO101). Siguiendo las instrucciones proporcionadas por la casa comercial, el gel fue disuelto a 55°C en una solución saturada de NaI y el ADN unido a una resina inorgánica de sílice (Glass Milk[®]). El ADN ligado a la resina fue sometido a varios lavados con una solución que contiene etanol y finalmente eluido de la resina con agua o un tampón de baja fuerza iónica. El ADN limpiado por este procedimiento queda listo para su uso bien en la reacción de ligamiento con el vector, o bien para el marcaje del mismo como sonda radiactiva.

II.2.9. MARCAJE RADIATIVO DEL ADN CON [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP.

El ADN utilizado como sonda en los experimentos de hibridación fue marcado radiativamente usando el método de "random priming" (Feinberg y Vogelstein, 1983). Este método se basa en la hibridación del ADN a marcar con una mezcla de hexanucleótidos que actúan como cebadores en la síntesis del ADN. La polimerización del ADN es llevada a cabo por el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, el cual requiere la presencia de dNTPs en la mezcla de reacción, estando uno de ellos marcado radiativamente con ^{32}P en posición α , concretamente el dCTP (Amersham corp.). La longitud de los fragmentos de ADN a marcar no influye en la reacción y permite el marcaje de pequeñas cantidades de ADN (10 ng).

Las reacciones de marcaje se realizaron en un volumen de 20-30 μl conteniendo 50-200 ng de ADN, 0.025 mM (excepto dCTP), una mezcla de hexanucleótidos, 50 μCi de [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP y 2 U del fragmento klenow. El ADN marcado fue purificado de los nucleotidos radiativos no incorporados, mediante extracción fenólica y precipitación con tRNA, LiCl y etanol absoluto, o mediante cromatografía en una columna de 1 ml de Sephadex G-50 (Sambrook y col., 1989).

El número de cuentas por min (cpm) incorporadas al ADN se determinó en un contador de centelleo, tomando 1 μl de la solución del ADN radiactivo y mezclándolo con 4 ml de líquido de centelleo.

II.2.10. TRANSFERENCIA DE ACIDOS NUCLEICOS A SOPORTE SOLIDO.

II.2.10.1. Transferencia del ADN a filtros de nylon. ("Southern blot").

La transferencia del ADN separado electroforéticamente a soporte sólido mediante la técnica de "Southern blot" (Southern, 1975), permite su uso posterior en reacciones de hibridación y detección de fragmentos génicos que contienen secuencias de interés.

Para las transferencias de ADN a soporte sólido se utilizaron filtros de nylon (Hybond-N®, Amersham). La transferencia se hizo por capilaridad colocando sobre el gel el filtro de nylon y sobre este varias capas de papel absorbente empleando SSC 20x como fase móvil. Previamente los geles fueron sometidos a varios tratamientos para facilitar la transferencia. En primer lugar el ADN fue irradiado con luz U.V en presencia de BrEt para producir roturas en el mismo. Posteriormente el ADN fue sucesivamente parcialmente depurinizado en una solución de HCl 0,25 M durante 15-30 min, dependiendo del tamaño del ADN a transferir; desnaturalizado e hidrolizado en una solución de NaOH 0,5 M y ClNa 1,5 M durante 30 min-1 hora; y finalmente neutralizado en Tris-HCl 0,5 M, NaCl 1,5 M durante 1 hora. Finalizada la transferencia, el filtro fue lavado en SSC 2x y el ADN fijado al filtro por exposición a luz ultra violeta (300 nm).

II.2.10.2. Transferencia del ARN a filtros de nylon. ("Northern blot").

La transferencia del ARN desarrollado electroforéticamente de los geles a la membranas de nylon se hizo de forma similar a la empleada para transferir el ADN, por capilaridad y empleando como fase móvil SSC 20x, preferentemente tratado con DEPC. El gel en cambio, fue sometido a un tratamiento diferente evitando la incubación con HCl. Sucesivamente el gel fue incubado con NaOH 50 mM, 15 min; con Tris-ClH 0.1 M, pH 7,5, 30 min y finalmente 20 min con SSC 20x. Una vez realizada la transferencia el ARN fue fijado al filtro por exposición a luz UV (360 nm) durante 5 min.

II.2.11. HIBRIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS CON SONDAS RADIATIVAS.

Los ácidos nucleicos transferidos a filtros de nylon o de nitrocelulosa fueron hibridados en condiciones de alta astringencia con sondas específicas marcadas por el método de "random priming" (II.2.9). Las membranas fueron prehibridadas a 42°C durante 3-6 horas en bolsas de plástico termoselladas, a las que se añadió 0,2 ml de solución de hibridación (II.1.3) por cada cm² de filtro. Posteriormente la solución de hibridación que bañaba las membranas fue renovada, (0.05 ml de solución/cm² de filtro) y el filtro fue hibridado con la sonda radiactiva desnaturalizada por calor (10⁶ cpm de sonda por ml de solución de hibridación) a 42°C durante 12-18 horas en agitación.

Para eliminar la sonda unida de forma inespecífica, los filtros fueron sometidos a dos lavados, el primero con una solución de SDS 0,1% y SSC 2x a 42°C durante 20 min, y el segundo con una solución SDS 0,1% y SSC 0,2x a 65 °C durante 30 min, ambos lavados en agitación. Los filtros fueron secados a temperatura ambiente y expuestos a películas de autorradiografía X-OMAT® AR (Kodak) -80°C, utilizando pantallas amplificadoras de DuPont.

II.2.12. REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la amplificación enzimática "in vitro" de un segmento de ADN localizado entre dos secuencias conocidas (Arnheim y Erlich, 1992). Durante la PCR, el ADN molde es sometido diferentes ciclos consistentes en una desnaturalización térmica del ADN en un exceso molar de los cebadores, un descenso de temperatura para permitir la hibridación de los oligonucleotidos al ADN, para continuar con una fase en la que la ADN polimerasa sintetiza las nuevas hebras de ADN en presencia de los cuatro dNTPs. Esta técnica requiere el uso de una DNA polimerasa termoestable que pueda soportar distintos ciclos de temperatura a los que son sometidos el ADN. En nuestro caso utilizamos la Taq polimerasa aislada de *Thermus aquaticus*. Es de principal importancia el correcto diseño de los oligonucleotidos utilizados como cebadores en la reacción.

Las mezclas de reacción para PCR fueron llevadas a cabo en un volumen final de 50 μ l, conteniendo:

#ADN	10-50 ng
# dNTPs	0,4 mM
# ON sentido	50 pmol
# ON antisentido	50 pmol
# Tampón de PCR 10x	5 μ l,
# Taq polimerasa	2,5 U

Los parámetros de los ciclos de la PCR fueron optimizados para cada caso, en especial en lo referente a la temperatura de hibridación de los cebadores. En general, se aplicaron 32 ciclos formado cada uno de las 3 etapas de desnaturalización a 94°C, 1 min; hibridación de cebadores: 45-65°C, 1 min; y extensión: 72°C, 1-2 min. El resultado de la PCR fue visualizado en geles de agarosa al 3%, para los cuales se utilizó una mezcla de agarosa (1%) y agarosa de bajo punto de fusión (2%), teñidos con BrEt. Como marcadores de peso molecular se utilizó el ADN de Φ X174 digerido con Hae III

II.2.13. REACCION DE RT-PCR.

Mediante la reacción de RT-PCR podemos amplificar fragmentos correspondientes a un ARN mensajero. El procedimiento se lleva a cabo en dos etapas bien diferenciadas. En la primera, tiene lugar la síntesis de un ADN copia (cDNA) del mensajero de interés, empleando para ello un oligonucleótido específico antisentido que sirve de cebador a la retrotranscriptasa. En la segunda etapa, el ADN copia es amplificado mediante PCR, utilizando como cebadores el oligonucleótido empleado en la síntesis del cDNA junto con otro oligonucleótido sentido que aparea en una secuencia corriente arriba con respecto a donde lo hace el antisentido.

La reacción de retrotranscripción (RT) se hizo utilizando como molde el ARN total de *L. tropica* transfectada con el plásmido pKSN-E. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 30 μ l, conteniendo:

# ARN total	1 μ g
# dNTPs	0,4 mM
# oligonucleótido antisentido	0,1 μ M
# Tampón RT-PCR 5x	6 μ l
# ARNsina (proteína inhibidora de ribonucleasas)	20 U
# Retrotranscriptasa AMV ("Avian Myeloblastosis Virus")	20 U

La reacción se desarrollo a 42°C durante 30 min y fue detenida mediante incubación a 95 °C durante 10 min. Los híbridos ARN-ADN fueron sometidos a una desnaturalización alcalina seguida de una precipitación con 0,1 volumen de AcNa 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto. El ADN precipitado fue lavado con etanol al 80% y resuspendido en 30 µl de agua desionizada.

Para la síntesis de la cadena complementaria al ADN copia y la amplificación del mismo se realizó una PCR cuya mezcla de reacción con un volumen de 50 µl contenía 10 µl de la reacción de RT, 50 pmol de cada uno de los cebadores sentido y antisentido, 0,4 mM de la mezcla de dNTPs, 5 µl de tampón PCR 10 x y 1 U de Taq polimerasa.

Las condiciones de la PCR, después de ser optimizadas fueron: 5 min a 94°C (1 ciclo); 1 min a 94°C, 2 min a 50°C, 45 seg a 72°C (32 ciclos); y 10 min a 72°C (1 ciclo). El producto de PCR fue visualizado en geles de agarosa.

II.2.14. SECUENCIACION DEL ADN.

Los métodos de secuenciación utilizados en este trabajo estan basados en el método enzimático de terminación de cadena descrito por Sanger y col. (1977). Se realizó secuenciación usando una enzima derivada de la T7 polimerasa llamada Sequenase® (U.S.B.), y secuenciación mediante PCR utilizando la Taq polimerasa "Secuencing grade" (Promega).

El método de Sanger se basa en la síntesis de una hebra de ADN a partir de un ADN molde de cadena doble o sencilla, un cebador, una ADN polimerasa y una mezcla de nucleótidos formada por los dNTPs y en menor proporción los 2',3'-didesoxinucleótidostrifosfato (ddNTP). Los ddNTPs carecen del OH en 3' necesario para la formación del enlace fosfodiéster con el siguiente nucleótido, de forma que al ser incorporados ocasionan una parada en la elongación de la hebra de ADN. La incorporación de ddNTPs se produce al azar de forma que todas las moléculas de ADN no detengan su síntesis en la misma base, esto origina una mezcla de moléculas de la misma secuencia pero con diferentes tamaños.

II.2.14.1. Secuenciación del ADN mediante Sequenase® v.2.0.

La reacción de secuenciación fue realizada utilizando una variante de la polimerasa del fago T7, la Sequenase® versión 2.0 comercializada por USB. Se utilizaron moldes de

ADN tanto de cadena doble como sencilla y los cebadores universales comerciales así como otros de diseño. Para obtener una información completa acerca de la secuencia, se realizan 4 reacciones paralelas cada una con la mezcla de los cuatro dNTPs y uno de los ddNTPs. Para llevar a cabo el seguimiento de la reacción se utilizó [$\alpha^{35}\text{S}$]dATP (1355 Ci/mmol, Amersham corp.) que fue incorporado a la cadena de nueva síntesis permitiendo el marcaje de todas las moléculas de ADN sintetizadas.

Los fragmentos de ADN originados fueron separados en electroforesis de alta resolución utilizando geles de poliacrilamida desnaturalizantes, cuya composición fue: 5% poliacrilamida, 0,2% bisacrilamida, 41% urea, 0,035% persulfato amónico, 4 mM TEMED, todo ello en tampón TBE 1x. El desarrollo se hizo en tampón de electroforesis TBE 1x a una potencia constante de 40 W. Tras la electroforesis el gel fue adherido a papel Whatman 3MM y secado a 80°C en vacío durante una hora. El gel fue expuesto a temperatura ambiente con películas autorradiográficas X-OMAT® AR (Kodak).

II.2.14.2. Secuenciación del ADN por PCR.

En este caso la reacción de secuenciación fue llevada a cabo en presencia de la Taq polimerasa " Sequencing Grade" (Promega). Se realizaron 4 reacciones paralelas de PCR cada una de ellas conteniendo ADN molde, un cebador y una mezcla formada de los cuatro dNTPs y uno de los ddNTPs en las concentraciones indicadas por la casa comercial. Para la detección de las moléculas de ADN generadas, se utilizó un cebador marcado en su extremo 5' con fluoresceína. La separación electroforética de las moléculas de ADN, la visualización de la reacción, así como el análisis de los resultados se hizo en un secuenciador Base Station DNA Sequencer de Millipore.

II.2.15. TRANSFECCION EN *Leishmania tropica*.

La técnica de transfección permite la incorporación de elementos génicos en células eucariotas permitiendo su replicación y expresión de forma estable, siendo una herramienta poderosa para el estudio funcional de genes.

Se utilizaron promastigotes de *Leishmania tropica* que fueron transfectados mediante electroporación según un procedimiento previamente descrito por Kapler y col. (1990). Los parásitos en fase logarítmica fueron recogidos por centrifugación y lavados dos veces con tampón HBS siendo finalmente resuspendidos en el mismo tampón a una concentración de 10^8 células/ml. Las células repartidas en alícuotas de 400 μl fueron

mezcladas con 100 µg de DNA plasmídico, aislado por "Magic Maxiprep[®]", e incubadas en hielo durante 10 minutos. La electroporación se llevo a cabo en un sistema de electroporación ECM600[®] de BTX bajo las siguientes condiciones: 450V, 1300 µF, 13 ohm. Como control negativo de electroporación se utilizaron células electroporadas en ausencia de ADN. Seguidamente las células electroporadas fueron incubadas en hielo 10 min, transferidas a 10 ml de medio de cultivo sin fármaco e incubadas durante 24 horas a 28°C. El medio fue suplementado con gentamicina a una concentración final de 1mg/ml a fin de evitar cualquier posible contaminación. Los parásitos transformados fueron seleccionados en medio líquido con 16 µg/ml de geneticina (G418). Una vez establecidos los cultivos resistentes a 16 µg/ml de G418, se aumentaron progresivamente las concentraciones a 50, 100, 250, 500 y finalmente 1000 µg/ml.

II.2.16. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS INHIBITORIA 50 (DI₅₀).

La dosis inhibitoria 50, **DI₅₀**, se define como aquella concentración de fármaco que inhibe el crecimiento celular en un 50%, medido cuando el control sin fármaco está en fase logarítmica tardía de crecimiento.

Para la determinación de la DI₅₀ frente a los diferentes fármacos a los que fueron expuestos los parásitos transfectados, se partieron de preinóculos de 4 x10⁶ células/ml que fueron cultivados en tubos estériles de polipropileno en 2 ml de medio con diferentes concentraciones del fármaco ensayado. Se hicieron duplicados para cada una de las concentraciones y se incubaron los parásitos a 28°C durante 48 horas sin agitación, momento en el que los parásitos fueron contados en cámaras de Neubauer.

Para calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento, **%IC**, se aplicó la siguiente fórmula:

$$\%IC = 100 \times [N_c - N_p] / N_c$$

donde:

N_c= número de parásitos/ml en el cultivo control

N_p= Número de parásitos/ml en el cultivo problema expuesto al fármaco.

La dosis inhibitoria 50 fue aquella dosis de fármaco que originaba un %IC igual a 50.

II.2.17. OBTENCIÓN DE PROTEINAS TOTALES DE *Leishmania*.

Para la obtención de proteínas totales de *L. tropica* se partieron de cultivos de promastigotes en fase logarítmica de crecimiento. Los parásitos fueron recolectados mediante centrifugación a 3000 rpm durante 10 min a 4°C y lavados tres veces en PBS frío. Finalmente los parásitos fueron resuspendidos a una concentración de 10⁸ células/ml en tampón de lisis frío y conservados en alicuotas a -80°C hasta su posterior utilización.

II.2.18. OBTENCIÓN DE PROTEINAS DE MEMBRANAS EN *Leishmania*.

Partimos de un cultivo de 10⁹ promastigotes de *L. tropica* en fase logarítmica de crecimiento los cuales fueron recolectados mediante centrifugación, en las condiciones anteriormente descritas: 3 lavados en PBS frío y resuspendidos en 1 ml de un tampón hipotónico (Tris-ClH 1mM pH8, EDTA 5mM), suplementado con una mezcla de los inhibidores de proteasas: leupeptina 1µg/ml, pepstatina 1µg/ml, PMFS 1mM. Los parásitos fueron congelados a -80°C durante al menos 10 minutos para producir la rotura parcial de las membranas en el proceso de congelación-descongelación e incubados 30 minutos en hielo. Posteriormente los parásitos fueron sonicados aplicando 3 ciclos de 30 seg con intervalos entre cada ciclo para evitar el calentamiento de la muestra, y centrifugados en microfuga 10 seg para desechar los restos celulares (núcleos) y células intactas.

El sobrenadante conteniendo proteínas totales, fue sometido a ultracentrifugación a 35000 rpm a 4°C durante 45 min en un rotor AH-650 de Beckman. Las proteínas de membrana precipitadas fueron resuspendidas en un tampón de Tris-HCl 10 mM pH 7,6 suplementado con la mezcla de inhibidores de proteasas, y almacenadas a -80°C.

II.2.19. CUANTIFICACION DE PROTEINAS.

La concentración de proteínas totales y de membrana se determinó usando el kit de **Bio-Rad** basado en el método colorimétrico desarrollado por Lowry y col (1951)). En todo momento se siguió el protocolo indicado por la casa comercial utilizando como patrón una curva construída con concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA) y las correspondientes adsorbancias a 750 nm.

II.2.20. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS: SDS-PAGE.

Las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE, en electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida y SDS, de acuerdo con el método de Laemmli (1970). En estos geles las proteínas migran hacia el polo positivo debido a que al unirse al SDS adquieren una carga neta negativa. Bajo esta unión las proteínas quedan desnaturizadas migrando a través de la matriz de poliacrilamida en función del tamaño de la cadena polipeptídica. La electroforesis se llevó a cabo en geles discontinuos que constaron de: un gel superior que fue de composición constante, con un pH ligeramente ácido que contribuye al almacenamiento de todas las proteínas; y un gel inferior de pH alcalino, el separador, cuyo porcentaje de acrilamida/bis-acrilamida fue modificado en función del tamaño de las proteínas a separar.

La composición del gel superior almacenador fue de Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8; SDS 0,1%, acrilamida 4,5%, bisacrilamida 0,1%, persulfato amónico 0,04% y 0,1% TEMED. La composición del gel inferior separador fue Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8; SDS 0,1%, persulfato amónico, 0,04% TEMED, 0,05, y un porcentaje de acrilamida-bisacrilamida que fue del 8 y 12,5%.

Las muestras fueron preparadas en un volumen de tampón de muestra 2x y azul de bromofenol 0.02%, hirviéndolas durante 3 min y centrifugadas 5 min antes de ser cargadas en el gel. Se usaron como marcadores de peso molecular los marcadores de alto y bajo peso molecular de Bio-Rad. La electroforesis se realizó a una corriente constante de 20 mA en tampón Tris-glicina 1x. Los geles fueron fijados y teñidos con una solución de Azul coomassie (Azul coomassie 0,2% en 40% MetOH, 10% Ac. acético) y desteñidos con una solución de 25% metanol-10% Ac. acético hasta visualizar las proteínas teñidas.

II.2.21. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANAS DE NYLON.

Las proteínas separada mediante electroforesis desnaturizante SDS-PAGE, fueron transferidas a mebranas de nylon Inmobilon-P (Milipore) en una transferencia semihúmeda usando un aparato Semi-Phor TE70 (Hoefer Sci..Inst). El emparedado de transferencia se realizó con varias capas de papel Watman 3M entre las que se colocó el gel de proteínas y el filtro de Inmobilon-P todo ello previamente equilibrado durante 30 minutos en un tampón de transferencia (Tris 0,025 M; Glicina 0,15M; metanol 20%; SDS 1%). La electrotransferencia se realizó durante 2 horas a un voltaje constante de 20 V tras lo cual el filtro fue teñido con Rojo Ponceau para comprobar la eficiencia de la transferencia.

II.2.22. PURIFICACION DE PROTEINAS RECOMBINANTES.

Para la purificación de proteínas de fusión con glutathion transferasa (GST) se partió de bacterias XL1-Blue transformadas con el vector de expresión pGEX-2T siguiendo las indicaciones recomendadas por la casa comercial (Pharmacia). A grosso modo, el proceso consistió en la obtención de un lisado de bacterias que expresan la proteína de fusión soluble, a partir del cual la fracción proteica soluble fue transferida a columnas de Sepharosa-GSH. En estas columnas la proteína de fusión GST quedó retenida por afinidad con el GSH, siendo posteriormente eluida por competición con exceso molar de GSH.

II.2.22.1. Obtención de la fracción soluble proteica de un lisado bacteriano.

A partir de una colonia aislada de bacterias transformadas con el vector de expresión se inocularon 20 ml de LB con ampicilina (100 mg/ml) y se crecieron toda la noche en agitación a 37°C. Este cultivo sirvió como preinóculo para un cultivo en 1 litro de medio LB que fue crecido a 37°C en agitación durante aproximadamente 1 hora, siempre en presencia de ampicilina, hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0,3. En este momento, se añadió al cultivo IPTG a una concentración final 100 µM, para inducir la expresión de la proteína de fusión, manteniendo la incubación en presencia de IPTG durante dos horas a 37°C.

Las bacterias fueron centrifugadas a 5500 rpm en rotor GSA (Beckman) durante 15 minutos a 4°C, lavadas con PBS y resuspendidas en 10 ml de PBS-Triton X-100 al 1%. Las células fueron lisadas en 3 ciclos de 9 minutos de sonicación y centrifugadas a 7000 rpm en rotor GSA (Beckman) a 4°C durante 20 minutos. De esta forma conseguimos separar los restos celulares y el material insoluble que quedó en el precipitado, de las proteínas solubles bacterianas que quedaron en el sobrenadante.

II.2.22.2. Preparación de la columna de afinidad Sepharosa 4B-GSH.

Se utilizó una columna de 2 ml de Sepharosa 4B-GSH (Pharmacia) que son suministradas por la casa comercial en un tampón de PBS con etanol al 20% como agente bacteriostático. Antes de su uso, la columna fue lavada con abundante PBS para eliminar los restos de etanol y equilibrada con 20 ml de PBS-Triton X-100 al 1% a la temperatura de 4°C.

II.2.22.3. Purificación de la proteína de fusión.

Una vez que la columna de Sepharosa 4B-GSH fue equilibrada se procedió a pasar por ella el sobrenadante obtenido en el apartado II.2.17.1, previamente filtrado a través de filtros de 0,2 μm de poro (Millipore). El paso del sobrenadante por la columna se repitió de 6 a 7 veces para permitir la adhesión por afinidad de la mayor cantidad de proteína de fusión posible y se realizó a 4°C para evitar la degradación de la misma. Finalmente la columna fue lavada con 20 ml de PBS-Triton X-100 al 1% .

La elución de la proteína de fusión GST se realizó en un tampón Tris-ClH 50 mM, pH 8 con exceso molar de GSH (5 mM). La elución se hizo incubando la columna con 10 ml de tampón de elución en agitación durante 1 hora a 4°C, proceso que se repitió al menos tres veces. El eluido de la columna conteniendo la proteína de fusión, fue concentrado en un volumen de aproximadamente 1 ml en concentradores con tamaño de poro de 3kDa "Centriprep" de Amicon ®. La concentración de la proteína de fusión purificada fue determinada mediante el Kit de Bio-Rad "Protein Assay", y almacenada a -80°C en alícuotas hasta su uso.

II.2.23. PREPARACION DE ANTICUERPOS POLICLONALES EN CONEJO.

Previo a la inmunización del animal con la proteína de fusión purificada se extrajo suero preinmune para su uso como control de los ensayos serológicos.

Se inmunizó un conejo de la cepa New Zealand White mediante inoculación por vía subcutánea de la proteína de fusión. Se realizaron tres inoculaciones de aproximadamente 400 μg de la proteína cada una según el siguiente protocolo:

Una primera inoculación en la que se inyectó en tres sitios diferentes la proteína de fusión diluida en un volumen de 500 μl de PBS y emulsionada con un volumen igual de Adyuvante Completo de Freund (Sigma).

Tras dos semanas se procedió a la segunda inoculación via subcutánea con idéntica cantidad y volumen de proteína esta vez emulsionada con un volumen igual de Adyuvante Incompleto de Freund.

A las dos semanas se realizó la tercera inoculación de igual manera a la segunda. Tras una semana se extrajo 2 ml de sangre del animal y se midió el título de anticuerpos en el suero mediante la técnica de ELISA. La sangría final se realizó una semana más tarde mediante extracción, en la vena marginal de la oreja, de 50 ml de sangre durante 3 días a intervalos de 4 días.

II.2.24. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

El antígeno en solución salina de NaHCO₃ 0,1 M pH 9,5 fue incubado en microplacas de 96 pocillos con fondo plano (p96, Nunc Maxisorp). Cada pocillo se tapizó con 1 µg de proteína en un volumen de 200 µl mediante incubación durante 5 horas a 37°C, eliminando la proteína no adsorbida a la superficie de plástico mediante tres lavados con una solución de PBS-T. Los pocillos de la placa fueron bloqueados durante toda la noche a 4°C con 200 µl de PBS-T más 5 µg/ml de BSA para evitar la posterior unión inespecífica de proteínas. Por último las placas son secadas y guardadas a -20°C hasta su uso.

Para realizar el ensayo, previamente los micropocillos de la placa fueron lavados tres veces con 200 µl de PBS-T, a continuación se añadió a cada uno de ellos 200 µl de las correspondientes diluciones del anticuerpo a ensayar en PBS-T, por duplicado, y se incubó a 37°C durante 1 hora. El resto de anticuerpo fue eliminado mediante tres lavados con PBS-T y se agregó 100 µl de anticuerpo de cabra anti IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma) en una dilución 1:5000, incubándose a 37°C 1 hora. Los pocillos fueron lavados tres veces con PBS-T para eliminar el exceso de anticuerpo secundario y reveladas con 200 µl de para-nitrofenilfosfato (1mg/ml) en una solución de dietanolamina 20 mM pH 9,5 y MgCl₂ 10 mM. Finalmente la reacción se detuvo añadiendo a cada pocillo 50 µl de EDTA 0,5 M y llevando a cabo la lectura a la D.O.₄₀₅ en un lector de placas Titertek.

II.2.25. PURIFICACION DE ANTICUERPOS DE CONEJO.

La purificación de los anticuerpos policlonales del suero del conejo se realizó mediante pases a través de una columna de afinidad de Sepharosa CL-4 ligada a proteína A de *Staphilococcus.aureus* Esta proteína tiene afinidad por la fracción variable (Fc) de las inmunoglobulinas de mamíferos en general, uniendo mayoritariamente IgG aunque también puede unir minoritariamente otras como IgA e IgM.

La columna fue preparada y equilibrada según las recomendaciones de la casa comercial (Pharmacia) con un lecho de columna de 3 ml a través del cual fue pasado el suero de 6 a 7 veces. Finalmente las inmunoglobulinas fueron eluidas con un volumen de 3 ml de una solución a pH 3 de glicina 0,1 M, a las que se añadió inmediatamente 100 µl de Tris-ClH pH 9 para evitar la inactivación de los anticuerpos a pH ácido.

II.2.26. CONJUGACION DE PROTEINAS A CNBr-Sepharosa 4B.

Para eliminar la actividad inespecífica de los anticuerpos policlonales purificados de sueros inmunes se construyeron columnas de Sepharosa 4B activada con bromuro de cianógeno a las que se conjugó la preparación de proteína oportuna, según el caso. Esta conjugación es posible gracias a los grupos amino libres que quedan en las cabezas de Sepharosa 4B. Se utilizó la resina proporcionada por la casa comercial Pharmacia y el proceso de conjugación se realizó en base a las recomendaciones de dicha casa comercial.

Aproximadamente 0,5 gr de resina fue disuelta en una solución de ClH 1 mM y lavada con 200 ml de la misma solución. La proteína a conjugar (6 mg/ml de resina) fue diluida en tampón de acoplamiento (NaHCO₃, 0,1 M, pH8,5; ClNa 0,5 M) y concentrada mediante centrifugación en "centripep" con 3 kDa de poro hasta un volumen de 2,5 ml.

El acoplamiento de la resina y la proteína se hizo en un volumen final de 5 ml mediante agitación suave a 4°C durante toda la noche. Tras el acoplamiento la resina fue centrifugada a 200 g, 30 seg y el sobrenadante retirado eliminando el exceso de ligando mediante lavados de la resina con tampón de acoplamiento. Para bloquear los posibles grupos amino que hubieran quedado libres en las cabezas de Sepharosa 4B, se incubó la resina durante una noche a 4°C en agitación suave con Tris-ClH 0,1 M, pH 8,4. Finalmente, la resina se lavó en tres ciclos alternantes con una solución de AcNa 0,1 M pH4, y una solución de Tris-ClH 0,1 M a pH 8,4.

Una vez preparada, la resina fue empaquetada en columnas (Pharmacia) siendo compactada con un tampón a pH neutro (Tris-ClH 0.50 mM, pH 7) a una velocidad de flujo que fue el 133% del flujo de la muestra. La columna fue equilibrada a 4°C con el mismo tampón en el que se encuentra la muestra previo al paso de la misma.

II.2.27. INMUNODETECCION EN MEMBRANAS. "WESTERN BLOT"

Las membranas de Immobilon-P fueron incubadas durante toda la noche en una solución de PBS con 0,02% de azida sódica y 5% de leche desnatada para bloquear los espacios del filtro a los que no se transfirieron proteínas, evitando así la unión inespecífica del anticuerpo. A continuación el filtro fue lavado 3 veces con PBS-T en agitación e incubado con la dilución en PBS-T del anticuerpo a ensayar durante 3 horas, a temperatura ambiente y en agitación. El exceso de anticuerpo fue eliminado con 3 lavados de PBS-T y el filtro fue incubado, durante 1 hora en agitación, con el segundo anticuerpo anti IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina (Sigma) en una dilución 1:5000 en PBS-T. El exceso de anticuerpo fue eliminado tras un nuevo ciclo de 3 lavados en PBS-T y la membrana equilibrada con tampón fosfatasa durante 5 minutos. Finalmente el revelado se realizó con una solución de NBT-BCIP (Boehringer Mannheim) tras un periodo de incubación de unos 10-15 minutos en el que la reacción fue detenida con solución de parada (Tris-ClH 2M pH7,5; ClNa 4 M; EDTA 20 mM).

II.2.28. DETERMINACION DE AMINOACIDOS POR EL METODO DE LA FLUORESCAMINA.

La fluorescamina, 4-fenilespiro[*furano-2(3H),1'ftaleno*]3,3'-diona, es un reactivo utilizado para la detección de aminoácidos, péptidos y proteínas (Weigele y col, 1972). Se une de forma casi instantánea a aminas primarias, en medio acuoso y a temperatura ambiente, siendo capaz de detectar concentraciones en el rango de picomoles. La fluorescamina y sus productos de degradación no fluorescen, tan solo cuando este compuesto reacciona con un grupo amino origina un compuesto altamente fluorescente, estable por varias horas, que excitado a 390 nm tiene un pico de emisión máxima a 475 nm.

Entre las ventajas que proporciona el uso de este compuesto en la determinación de la concentración de aminoácidos se encuentra: 1.- Una rápida formación del compuesto fluorescente ($t_{1/2}$ de 100-500 msec); 2.- La formación del compuesto fluorescente es proporcional a la concentración de amina presente en el medio; 3.- Detecta concentraciones en el rango de picomoles; 4.- La reactividad de la fluorescamina con la amina primaria depende del pH, a pH 9 la máxima fluorescencia es debida a la interacción del compuesto con aminoácidos, mientras que a pH 7 la máxima fluorescencia se debe a su unión a péptidos.

II.2.28.1 Determinación de la liberación dependiente de tiempo de aminoácidos al medio tras choque hipotónico.

Para determinar la concentración de aminoácidos liberados al medio bajo choque hipotónico a lo largo del tiempo en las diferentes líneas de *L. tropica*, silvestre y las transfectadas generadas en el transcurso de este trabajo, se siguió el protocolo descrito por Vieira y col, 1996.

Para ello, los parásitos en fase logarítmica de crecimiento fueron recolectados mediante centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos y lavados en medio isotónico con Cl, (Iso-Cl) al menos 3 veces. Los parásitos fueron resuspendidos en 1 ml de este medio con la osmolaridad deseada, en general 150 mOsm para el medio hipotónico y 300 mOsm para el medio isotónico control, e incubados durante distintos tiempos a 30°C. Para detener la liberación de aminoácidos al medio, los parásitos fueron recolectados mediante centrifugación en microfuga durante 15 segundos, el sobrenadante fue transferido a un tubo fresco y los parásitos fueron resuspendidos en medio isotónico. Alternativamente se detuvo la liberación de aminoácidos al medio exponiendo los parásitos a medio isotónico a 0°C.

Para cuantificar la concentración de aminoácidos, se mezcló 900 µl del medio al que los parásitos fueron expuestos, libre de células, con 100 µl de 0,2 N Borato Sódico pH 9 y añadiendo a la mezcla 500 µl de fluorescamina (0,2 mg/ml en acetona). La intensidad de fluorescencia fue determinada en un aparato SPEX FluorologII (DM1B) a una excitación de 390 y una emisión de 475 nm. Como curva patrón se utilizaron concentraciones conocidas de una mezcla de aminoácidos (concentrado de medio RPMI) al que se realizó el mismo tratamiento que a las muestras problema.

II.2.28.2 Determinación de la concentración de aminoácidos intracelulares tras choque hipotónico en *L. tropica*.

Para medir la concentración de los aminoácidos que quedan en los parásitos tras el choque hipotónico, el precipitado de células obtenido en el paso anterior fue tratado con 0,5 N HClO₄ durante 1 hora en hielo para extraer los aminoácidos. Tras centrifugación en microfuga el botón con los restos celulares fue utilizado para determinar concentración de proteínas usando el método micro BCA y el sobrenadante fue neutralizado con KOH 5 N. El extracto neutralizado fue de nuevo centrifugado y el sobrenadante fue usado para determinar la concentración de aminoácidos libres siguiendo el método de la fluorescamina mezclando en esta ocasión 900 µl de 0,2 N borato sódico pH 9 con 100 µl del sobrenadante.

II.2.29. DETERMINACION DE LA COMPOSICION DE AMINOACIDOS POR HPLC.

Para determinar la concentración y composición de los aminoácidos que tras un choque hipotónico permanecen en los parásitos, se utilizaron aproximadamente 800 µl del sobrenadante obtenido en el apartado II.2.28.2. El análisis de aminoácidos fue llevado a cabo por HPLC

II.2.30. MEDIDA DE pH CITOPLASMÁTICO.

II.2.30.1. Medida de pH citoplasmático.

Para la medida del pH citoplasmático se utilizó el marcador fluorescente BCECF o 2',7'-bis-(carboxietil)-5,6-carboxifluoresceína en su forma acetoximetil ester. Los parásitos en fase exponencial de crecimiento fueron recolectados y lavados una vez con PBS frío. Aproximadamente, 1×10^8 parásitos/ml se resuspendieron en medio cloruro completo o en medio gluconato y fueron incubados en AM-BCECF a una concentración final de 5 µg/ml, durante durante 30 minutos a 30°C. Después de la incubación, las células fueron lavadas dos veces en la misma solución de incubación para eliminar el exceso de AM-BCECF no incorporado y resuspendidas en la misma solución a una densidad de 2×10^8 parásitos/ml. Aproximadamente $0,5 \times 10^7$ parásitos/ml fueron transferidos a una cubeta de cuarzo que contenía 2 ml de medio. El medio de la cubeta fue sometido a agitación magnética constante y la temperatura fue mantenida a 30°C.

Las medidas de fluorescencia fueron llevadas a cabo en una estación de fluorescencia PTI (PTI, GmbH, Wedwl, Germany) bajo la configuración ratio fotométrica Oscar. La excitación a (440 y 490 nm) y la emisión (535 nm) fueron seleccionadas con una apertura de banda de 5 y 8 nm, respectivamente. La señal de fluorescencia a 490 nm, 440 nm y razón 490/440, fueron continuamente recogidas y almacenadas para la posterior manipulación de los datos. Los cambios de pH intracelular fueron independientes de la densidad celular, de la concentración intracelular del marcador fluorescente o de la fuga del marcador o "bleaching"

II.2.30.2. Calibración del pH.

La relación entre la razón de fluorescencia del BCECF (F 490/440), y el pH intracelular (**pHi**), fue determinada mediante tratamiento de las células con el ionóforo H⁺/K⁺ nigericina en medio rico en K⁺ con diferentes pH.

Las células cargadas con BCECF, según se ha descrito en el apartado anterior, son colocadas en una cubeta con 2 ml de medio cloruro rico en K⁺, pH 7,8, sometidas a agitación magnética y a temperatura constante de 30°C. Tras añadir a los parásitos nigericina a una concentración de 5 µg/ml, el pH del medio fue acidificado por adición de pequeñas alícuotas de una solución 1M de MES a pH 5. Las medidas de pH se realizaron en un pHmetro El-Hama con un microelectrodo Cole-Palmer.

III. OBJETIVOS

Los estudios previos realizados en el laboratorio sobre una línea de *Leishmania tropica* LRC-L39 resistente a 1 mM de metotrexato, mostraron la existencia de un fenotipo de resistencia cruzada a una serie de compuestos entre ellos antimoniales, arsenicales y otros fármacos hidrofóbicos típicos sustratos MDR (Gamarro y col., 1994). Esta línea resistente a metotrexato presentaba, de forma paralela al fenotipo de multirresistencia, una alteración a nivel molecular consistente en un aumento en los niveles de expresión de un transcrito. Este ARNm era reconocido por una sonda procedente de un gen glicoproteína-P de *Leishmania tarentolae*, el gen ltpgpE.

En *Leishmania tarentolae* y *Leishmania major* ha sido puesto de manifiesto mediante experimentos de transfección que otro gen glicoproteína-P, el gen pgpA, está relacionado con bajos niveles de resistencia a compuestos derivados del antimonio y arsenito.

En base a estos antecedentes, los objetivos marcados en el presente trabajo han sido:

1.- El aislamiento y caracterización molecular del gen cuya expresión se encuentra amplificada en la línea de *Leishmania tropica* resistente a 1 mM de metotrexato, homólogo al gen ltpgpE de *L. tarentolae*.

2.- Estudiar la función que desempeña este gen glicoproteína-P, aislado a partir de la línea de *Leishmania tropica* resistente a 1 mM de metotrexato, mediante ensayos de transfección en *Leishmania tropica* silvestre LRC-L39 clon 1. Estos estudios se basarán principalmente en:

A.- Determinar la capacidad de este gen para generar resistencia a compuestos tóxicos, sobre todo los derivados de antimonio y arsénico y aquellas sustancias relacionadas con la resistencia cruzada a diversos compuestos, observada en la línea de *L. tropica* resistente a 1 mM de MTX.

B.- Determinar si en parásitos existe la relación encontrada en células tumorales entre la expresión de glicoproteína-P y alcalinización del citoplasma, así como entre la modulación de canales aniónicos implicados en la regulación del volumen celular y expresión de glicoproteína-P.

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

IV.1. PRESENCIA DE UNA FAMILIA DE GENES GLICOPROTEÍNA-P EN *L. tropica* LRC-L39.

Los análisis llevados a cabo en el laboratorio sobre *L. tropica* LRC-L39, previos a esta tesis doctoral, mostraron que en esta cepa se encontraban representados seis genes pertenecientes a la familia glicoproteína-P. Estos análisis consistieron en experimentos de hibridación del ADN genómico del parásito con una sonda que reconoce una región muy conservada en los genes de la familia, el primer dominio de unión a ATP. Esta sonda llamada nbsA procede del gen *ltpgpA* de *L. tarentolae* y fue cedida a nuestro laboratorio por el Dr Marc Ouellette (Ouellette y col., 1990). El resultado de la hibridación con la sonda nbsA proporcionó indicios de que en esta cepa de *Leishmania* existían seis genes glicoproteína-P. Posteriormente, el mismo análisis fue realizado con las sondas A, B-C, D y E específicas para los genes glicoproteína-P *ltpgpA*, *ltpgpE*, *ltpgpD* y la sonda B-C que reconoce inespecíficamente a los genes *ltpgpB* y *ltpgpC* descritos en *L. tarentolae*, todas ellas cedidas igualmente por el Dr. Marc Ouellette (Légaré y col., 1994). Este análisis reveló que en *L. tropica* LRC-L39 estaban representados los genes glicoproteína-P homólogos a los genes *ltpgpA*, *ltpgpB*, *ltpgpC*, *ltpgpD* y *ltpgpE* descritos en *L. tarentolae*. El sexto gen glicoproteína-P se corresponde con un gen *mdr*, y es reconocido por una sonda específica del gen *mdr* de *L. amazonensis*, la sonda pLa06 (Gueiros-Filho y col., 1992).

Los análisis de transcripción realizados con la fracción poliadenilada del ARN del parásito, hibridada con cada una de las sondas específicas de los genes *ltpgpA*, *ltpgpE*, *ltpgpD* y la sonda B-C que reconoce a los genes *ltpgpB* y *ltpgpC*, no permitieron detectar la expresión constitutiva de ninguno de los genes glicoproteína-P existentes en *L. tropica* LRC-L39. Sin embargo, los mismos estudios realizados sobre la línea de *L. tropica* resistente a 1mM de MTX, mostraron la expresión de un transcrito de 6 kb que era reconocido por la sonda específica del gen *ltpgpE* (Gamarro y col., 1994).

Esta línea de *L. tropica* resistente a MTX se caracterizó por presentar: **1)** Una alteración en el transporte de MTX, consistente en una disminución de la velocidad de captación del fármaco, mecanismo de resistencia que puede explicar por sí solo los niveles de resistencia a MTX observados. **2)** Resistencia cruzada a fármacos hidrofóbicos sustratos típicos de la glicoproteína-P y a derivados de arsenito. **3)** Incremento en la expresión del gen glicoproteína-P homólogo al *ltpgpE* de *L. tarentolae*. **4)** Localización de una coproteína en la

membrana plasmática de las formas promastigotes del parásito mediante inmunofluorescencia indirecta y "western blot" con el anticuerpo monoclonal C219, dirigido frente al dominio de unión a ATP de la glicoproteína-P de mamíferos.

El interés de la presente tesis fue la caracterización molecular del gen, al que llamamos *ltpgpE*, que se encuentra sobreexpresado en esta línea de *L. tropica* LRC-L39 resistente a 1 mM de MTX y analizar si existe alguna relación entre esta sobreexpresión y el fenotipo de resistencia a fármacos descrito en estos parásitos.

IV.2. AISLAMIENTO DEL GEN *ltpgpE* DE *L. tropica*.

Para llevar a cabo el aislamiento del gen *ltpgpE* se recurrió a una genoteca del ADN genómico de *L. tropica* LRC-L39 resistente a 1mM de MTX que fue construida en nuestro laboratorio sobre los brazos del fago λ EMBL3. Para ello disponíamos de una sonda específica, un fragmento de 300 pb procedente del gen *ltpgpE* de *L. tarentolae*, localizado entre el primer y segundo dominio de unión a ATP de dicho gen (Légaré y col., 1994).

De los 24.000 fagos que fueron plaqueados y transferidos a filtros de nitrocelulosa, 13 fueron reconocidos por la sonda E de *L. tarentolae*. Estos clones fueron aislados y conservados, seleccionando 5 de ellos para realizar dos nuevos ciclos de purificación hasta que todos los fagos de cada placa fueron positivos.

Con el objeto de seleccionar algún clon que pudiera contener el gen *ltpgpE* completo, se llevo a cabo un mapeo con enzimas de restricción de tres clones positivos a los que nombramos como E 131-2, E 322-1 y E 344-3. El ADN de estos clones fue aislado y digerido con BamHI, Sall, y con ambas enzimas de restricción. El resultado de las digestiones fue visualizado en un gel de agarosa, transferido e hibridado con la sonda específica para el gen E. Como resultado de la hibridación, la sonda E reconoció en cada uno de los clones del fago, fragmentos Sall de 1,1 kb y un fragmento BamHI de 6,8 kb en el clon E 322-1 (Fig. IV.1). Este fragmento de 6,8 kb tenía un tamaño lo suficientemente grande como para contener un gen codificante para una glicoproteína-P, cuyo tamaño oscila entre las 3,8 kb y las 5,1 kb para el ADNc del gen MDR de mamíferos y el gen *ltpgpE* de *L. tarentolae*, respectivamente.

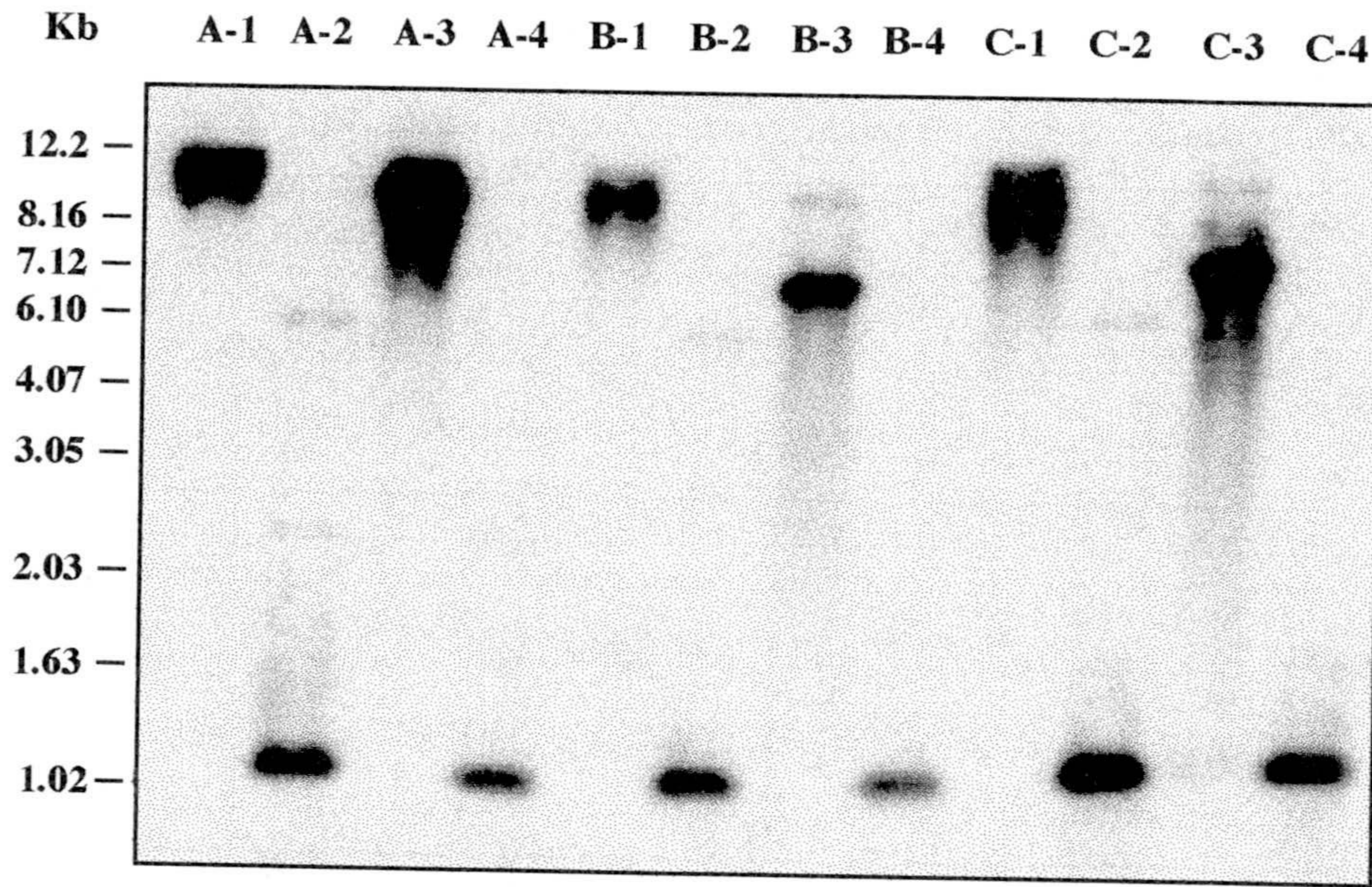


Fig IV.1. Análisis de restricción de algunos clones del fago λ EMBL3 conteniendo secuencias del gen *ltrpgpE*. El ADN de los clones E 131-1, E 322-1 y E 344-3 fue digerido con SalI, BamHI y SalI-BamHI conjuntamente. El resultado de la digestión fue separado en un gel de agarosa al 0.8%, transferido a nylon e hibridado con la sonda E. En la autorradiografía de la figura aparece: **A**, **B** y **C** ADN de los clones E 131-2, E 322-1 y E 344-3 respectivamente. Los carriles **1**, **2**, **3**, y **4** contienen, respectivamente ADN sin digerir, ADN digerido con SalI, ADN digerido con BamHI y ADN digerido conjuntamente con BamHI-SalI.

El mapeo de restricción del clon E 322-1 con las enzimas BamHI, HindIII, BglII y SmaI nos indicó la ubicación del fragmento de 6.8 kb reconocido por la sonda E en el inserto de 14,2 kb del fago (Fig. IV.2).

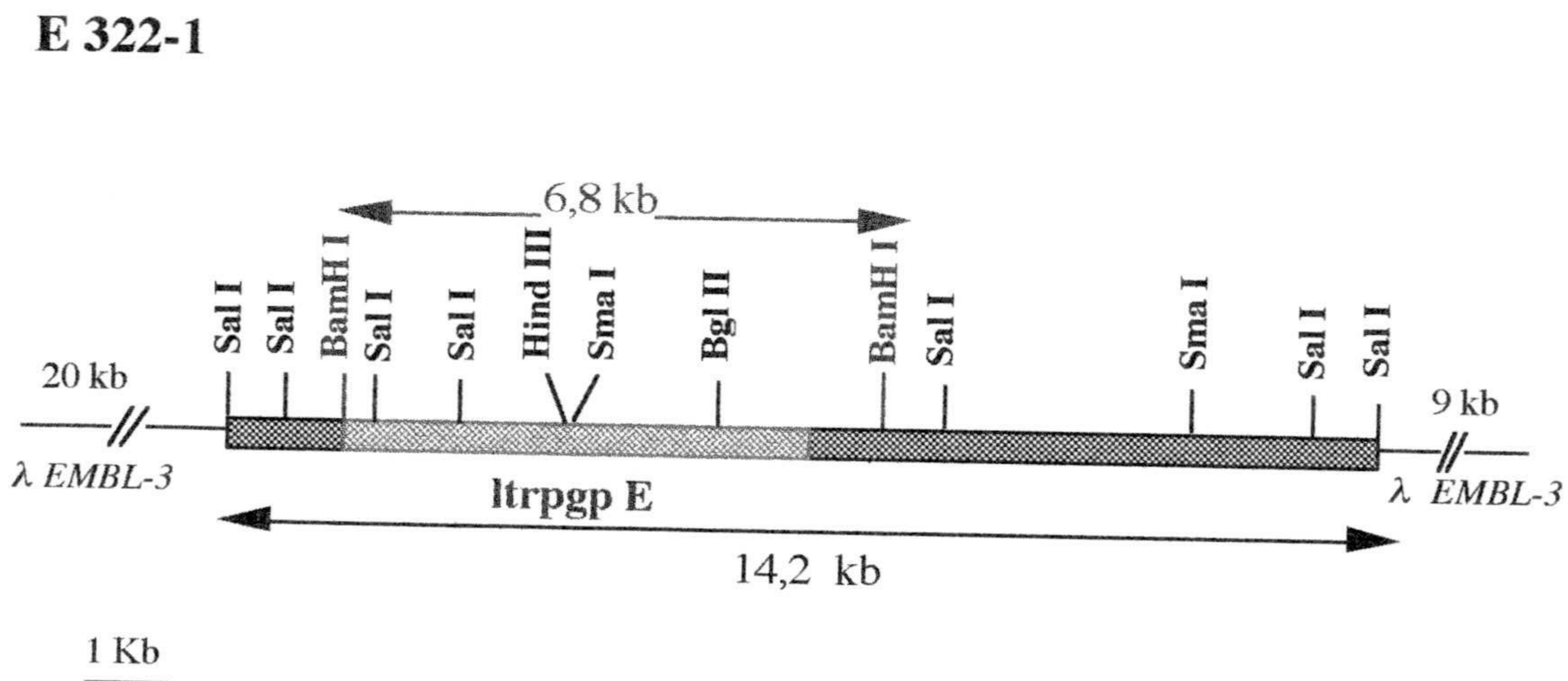


Figura IV.2. Mapa de restricción del clon E 322-1. El inserto de 14,2 kb, representado en azul, contiene el gen *ltrpgpE* que viene representado en verde. Los brazos del fago aparecen como una línea azul.

Para determinar si el gen *ltrpgpE* estaba completo dentro del fragmento BamHI de 6,8 kb así como la orientación del gen en el mismo, se realizaron hibridaciones con dos sondas procedentes del gen *ltrpgpA* de *L. tarentolae*: la sonda *nbsA* que reconoce el primer dominio de unión a ATP localizado en el extremo amino de la proteína y la sonda PM12 que reconoce el segundo dominio de unión a ATP, localizado en el extremo carboxilo de la misma (Papadopolus y col.). Como resultado de la hibridación las sondas reconocieron dos fragmentos de ADN cuya posición aparece indicada en la estrategia de subclonado del gen, marcados con rayas oblicuas azules para la sonda *nbsA* y con rayas oblicuas rojas para la sonda PM12 (Fig. IV.3). Esto nos permitió deducir la orientación del gen *ltrpgpE* dentro del inserto del clon E 322-1, el cual presentaba el extremo 5' orientado hacia el brazo de 9 kb y el extremo 3' próximo al brazo de 20 kb de λ EMBL3 (Fig. IV.3).

La proximidad del segundo dominio de unión a ATP del gen al sitio BamHI del clon mpE-2,8 (Fig. IV.3, Tabla I) indicaba que *ltrpgpE* no se encontraba completo dentro del fragmento BamHI de 6,8 kb y que por razones de continuidad física, el extremo 3' del gen se encontraría en el fragmento adyacente de ADN del fago. El fragmento de ADN adyacente al sitio BamHI fue subclonado, clon mpE-1,6 (Fig. IV.3, Tabla IV.I), y secuenciado con los cebadores universales en dirección BamHI-SmaI encontrando el codón stop del gen a una distancia de 83 pb del sitio de corte BamHI.

IV.3. CLONAJE Y SECUENCIACION DEL GEN *ltrpgpE* DE *L. tropica*.

Para llevar a cabo la secuenciación del gen *ltrpgpE* se utilizó la combinación de dos estrategias: **A)** el subclonado de fragmentos génicos en vectores como M13mp18, pUC18 y pBluescript KS- usando los plásmidos resultantes como ADN molde para la reacción de secuenciación y como cebadores los universales comerciales y **B)** el uso de cebadores internos de diseño que permitieron avanzar a lo largo de la secuencia en los fragmentos génicos.

Para la secuenciación del gen *ltrpgpE* se obtuvieron una serie de subclones a partir del clon E322-1. La estrategia seguida en la obtención de cada uno de los subclones viene representada en la figura IV.3, y la información correspondiente al nombre, tamaño de inserto, procedencia, vector de clonaje y sitios de inserción en el vector para cada uno de los clones viene resumida en la Tabla IV. I.

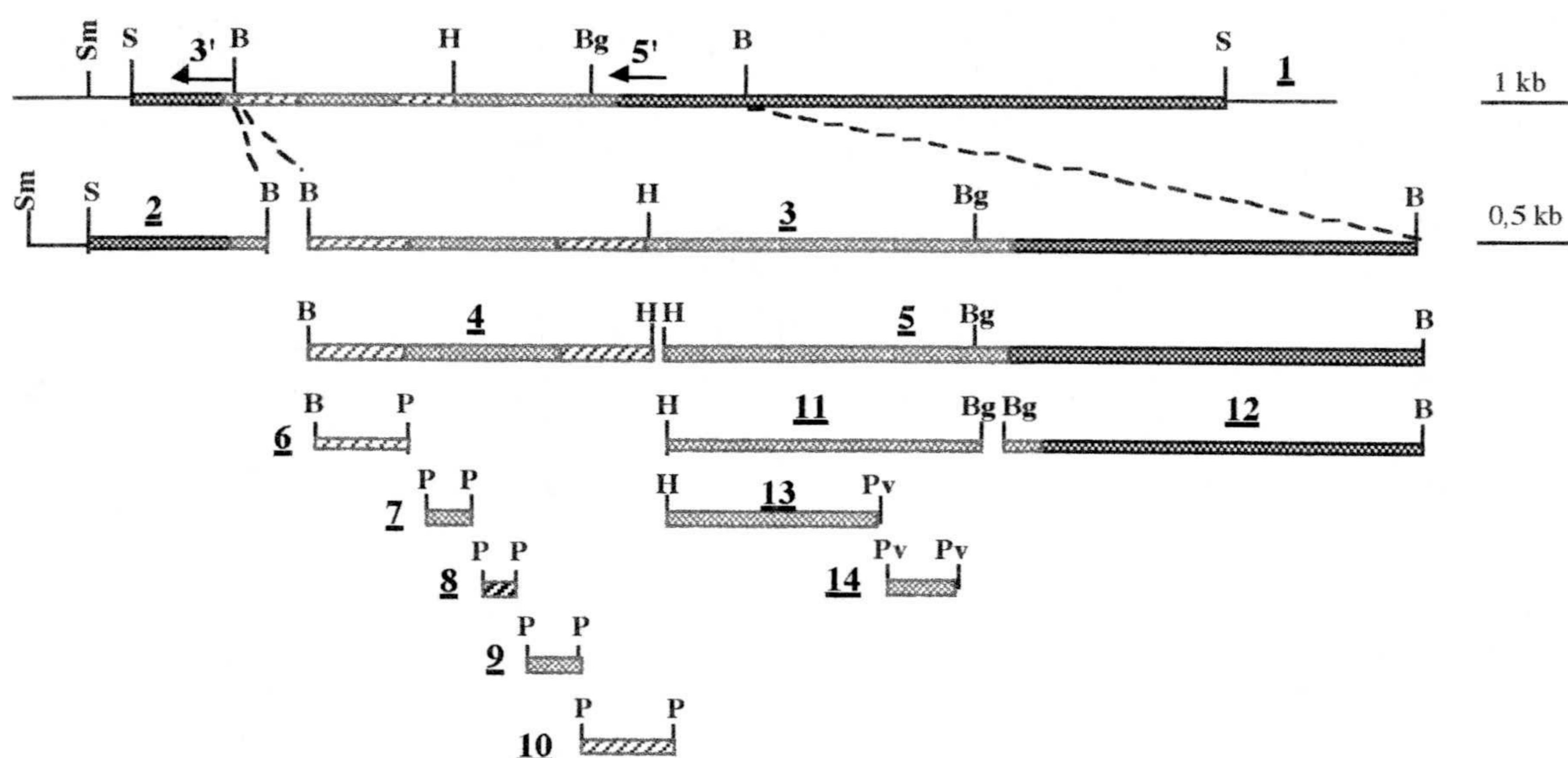


Figura IV.3. Esquema de los subclones obtenidos a partir del clon E 322-1 para la secuenciación del gen *ltrpgpE*. En la figura aparecen representados como rectángulos cada uno de los subclones obtenidos a partir del clon E322-1 (1). Cada rectángulo va acompañado de un número que se corresponde con el número del clon indicado en la Tabla II. Con un rectángulo azul se representa el inserto del clon E322-1, con líneas azules los brazos de λ EMBL3. En verde se representan la secuencia codificante para el gen *ltrpgpE*. Las zonas marcadas con líneas oblicuas azules y rojas se corresponde a la localización del 1º y 2º dominio de unión a ATP, la zona marcada con líneas oblicuas negras se corresponde con la secuencia homóloga a la sonda E de *L. tarentolae*. 5' y 3' indican la orientación del gen dentro del inserto del clon E 322-1. Las líneas azules de trazo discontinuo indican la procedencia de los clones 2 y 3. S, Sall; B, BamHI; H, HindIII, Bg, BgIII; Sm, SmaI; P, PstI Pv, PvuII.

El ADN correspondiente a cada uno de los plásmidos fue utilizado como molde para la secuenciación en hebra doble y en hebra simple en clones de M13mp18, cuando fue posible. En ambos casos se siguió el método enzimático descrito por Sanger y col. (1977), empleándose cebadores universales comerciales así como cebadores de diseño para el acceso a la secuencias internas del gen *ltrpgpE*. Para comprobar la continuidad entre la secuencia génica que contenía cada uno de los subclones, se utilizaron cebadores de diseño en reacciones de secuenciación en las que se empleó como molde el ADN del clon pE-6,8. La secuencia de estos cebadores viene indicada en el apartado II.1.7 de Material y Métodos.



TABLA IV.1

Nº	Nombre	Tamaño del inserto	Procedencia	Vector	Sito de inserción
1	E 322-1	14,2 kb	ADN genómico	λ EMBL3	Sall
2	mpE-1,6	1,6 kb	E 322-1	M13mp18	SmaI-BamHI
3	pE-6,8	6,8 kb	E322-1	pBSKS-	BamHI
4	mpE-2,8	2,8 kb	pE-6,8	M13mp18	BamHI-HindIII
5	mpE-4	4 kb	pE-6,8	M13mp18	HindIII-BamHI
6	pnbs2-E	0,83 kb	mpE-2,8	pUC18	BamHI-PstI
7	pE-0,4	0,4 kb	mpE-2,8	pUC18	PstI
8	pE-E	0,3 kb	mpE-2,8	pUC18	PstI
9	pE-0,5	0,5 kb	mpE-2,8	pUC18	PstI
10	pnbs1-E	0,8 kb	mpE-2,8	pUC18	PstI
11	pE-2	2 kb	mpE-4	pBSKS-	HindIII-BglII
12	pE-2,2	2,2 kb	mpE-4	pBSKS-	BglII-BamHI
13	pE-1,3	1,3 kb	pE-2	pUC18	HindIII-SmaI
14	pE-0,6	0,6 kb	pE-2	pUC18	SmaI

Tabla.IV.I. *Subclones obtenidos a partir del clon E 322-1, para la secuenciación del gen *ltrpgpE*.* En la tabla se indica el nombre del subclon, el tamaño del inserto, su procedencia, el vector en el que ha sido clonado y los sitios de inserción en el mismo. Cada uno de los subclones va acompañado de un número de orden que aparece indicado en la figura IV.3.

Se secuenciaron aproximadamente 6.640 pb, entre las que se encontró un marco abierto de lectura de 5.031 pb codificante para una glicoproteína-P, con un tamaño de 1677 aminoácidos y un peso molecular estimado de 182.891 Da (DNA Strider © 1.1). La secuencia del gen *ltrpgpE* aparece en la figura IV.4 junto a los oligonucleótidos sintéticos empleados en la obtención de la misma.

Resultados

1618	CAG	CAG	GCC	ATC	ATG	ATG	GTC	TTC	TTC	CAG	TTC	AAC	GCG	ACG	CCG	GGC	TTC	GTC	ATT	GCC
540	Gln	Gln	Ala	Ile	Met	Met	Val	Phe	Phe	Gln	Phe	Asn	Ala	Thr	Pro	Gly	Phe	Val	Ile	Ala
P1300U3																				
1678	AGC	GTC	TTC	TTC	ACG	TTC	AGC	GTG	ACC	GGC	CAC	ACC	CTA	ACG	CCC	ACT	ATT	GTT	TTC	CCA
560	Ser	Val	Phe	Phe	Thr	Phe	Ser	Val	Thr	Gly	His	Thr	Leu	Thr	Pro	Thr	Ile	Val	Phe	Pro
1738	GCC	ATT	GCG	CTG	TTC	AAC	CTG	CTT	ATG	GGC	CTC	GTC	TCC	ATG	TTA	CGT	CTT	GCA	CTG	CAG
580	Ala	Ile	Ala	Leu	Phe	Asn	Leu	Leu	Met	Gly	Leu	Val	Ser	Met	Leu	Arg	Leu	Ala	Leu	Gln
1798	CTC	ATG	ACG	AAG	CTA	TTC	GTC	TCG	CTC	CGG	CGC	TTG	AAT	ATG	TTC	TTC	GAC	GCC	GAC	GAT
600	Leu	Met	Thr	Lys	Leu	Phe	Val	Ser	Leu	Arg	Arg	Leu	Asn	Met	Phe	Phe	Asp	Ala	Asp	Asp
P1300U2																				
1858	GAG	CTG	GTG	CCG	GCC	GTC	GAA	GAC	ATT	CCC	CTC	GCA	GCG	AGT	CGT	GCG	ATG	CCC	ACG	GAC
620	Glu	Leu	Val	Pro	Ala	Val	Glu	Asp	Ile	Pro	Leu	Ala	Ala	Ser	Arg	Ala	Met	Pro	Thr	Asp
1918	GTC	TCC	CGG	GCA	GCA	GGT	GCC	GCG	ACC	GCC	CAG	CAG	CAG	ACA	CCG	TCA	TTC	ATT	CTA	ATT
640	Val	Ser	Arg	Ala	Ala	Gly	Ala	Ala	Thr	Ala	Gln	Gln	Gln	Thr	Pro	Ser	Phe	Ile	Leu	Ile
1978	CAT	GAC	GTT	GCA	GCC	GAG	TTT	GTG	CAC	GCA	GAC	CTC	AGC	ACA	TAT	GCT	GCT	CAA	GAG	CTT
660	His	Asp	Val	Ala	Ala	Glu	Phe	Val	His	Ala	Asp	Leu	Ser	Thr	Tyr	Ala	Ala	Gln	Glu	Leu
2038	AAG	AAA	ACG	GAT	GGC	GCA	CTG	GAG	GCA	AAG	TCA	GCG	GAG	ACC	GCT	GCC	GAT	CGC	GCA	CCG
680	Lys	Lys	Thr	Asp	Gly	Ala	Leu	Glu	Ala	Lys	Ser	Ala	Glu	Thr	Ala	Ala	Asp	Arg	Ala	Pro
2098	CTA	CCC	GAA	GCA	GAA	GCT	TTC	CTG	CCA	GAT	CGC	CAG	CCC	TCA	TCC	TCA	TCT	GCA	GCG	CCA
700	Leu	Pro	Glu	Ala	Glu	Ala	Phe	Leu	Pro	Asp	Arg	Gln	Pro	Ser	Ser	Ser	Ser	Ala	Ala	Pro
2158	CGT	CCA	GCA	GGT	CCA	GTG	ACG	GAA	CCC	TTG	AAC	GCT	AAG	GGC	AGT	CAT	ACA	GGC	CAC	GGA
720	Arg	Pro	Ala	Gly	Pro	Val	Thr	Glu	Pro	Leu	Asn	Ala	Lys	Gly	Ser	His	Thr	Gly	His	Gly
2218	GAC	GCT	GCC	GCT	TCC	TCA	GAG	CCC	TTG	TCG	TCG	TCT	GCC	CAG	AAA	AGC	ACC	GCT	GAA	ATA
740	Asp	Ala	Ala	Ala	Ser	Ser	Glu	Pro	Leu	Ser	Ser	Ser	Ala	Gln	Lys	Ser	Thr	Ala	Glu	Ile
1nbsE2																				
2278	ACC	TTC	AAC	GAG	GAC	TCC	ATC	TAC	GTT	CTA	AAG	ACA	AAG	ACG	CTG	CTG	GCG	GAT	GTG	GAC
760	Thr	Phe	Asn	Glu	Asp	Ser	Ile	Tyr	Val	Leu	Lys	Thr	Lys	Thr	Leu	Leu	Ala	Asp	Val	Asp
2338	CTG	CGC	GTG	CCG	CGC	GGG	CGG	CTG	ACG	GTG	GTG	CTG	GGA	CCG	ACG	GGC	AGC	GGC	AAG	TCC
780	Leu	Arg	Val	Pro	Arg	Gly	Arg	Leu	Thr	Val	Val	Leu	Gly	Pro	Thr	Gly	Ser	Gly	Lys	Ser
2398	ACG	CTG	CTG	GAC	GCA	CTG	ATC	GGC	GCG	CTG	GCG	GTG	ACC	GGC	GGC	CGC	GTG	GCG	TGC	TCG
800	Thr	Leu	Leu	Asp	Ala	Leu	Ile	Gly	Ala	Leu	Ala	Val	Thr	Gly	Gly	Arg	Val	Ala	Cys	Ser
2458	CGC	AGG	CTG	GCC	TAC	GTG	CCG	CAG	CAG	CCG	TGG	ACC	ATG	AAC	GCA	ACG	CTG	CGC	GAC	AAC
820	Arg	Arg	Leu	Ala	Tyr	Val	Pro	Gln	Pro	Trp	Thr	Met	Asn	Ala	Thr	Leu	Arg	Asp	Asn	
1nbsE1																				
2518	GTC	ATC	TTC	TTC	GGC	GCG	CCG	GAC	GCG	GCC	GCC	TTC	GAG	CGC	GCG	GTG	CGG	AGC	AGC	CAG
840	Val	Ile	Phe	Phe	Gly	Ala	Pro	Asp	Ala	Ala	Ala	Phe	Glu	Arg	Ala	Val	Arg	Ser	Ser	Gln
2578	CTG	GCC	TCG	GAC	CTG	GCG	CTG	CTG	GCG	GAC	GGC	GCG	GAG	ACG	GAG	ATC	GGC	GAG	AAC	GGC
860	Leu	Ala	Ser	Asp	Leu	Ala	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Ala	Glu	Thr	Glu	Ile	Gly	Glu	Asn	Gly
2638	ATC	AAC	CTG	AGC	GGC	GGG	CAG	AAG	GCG	CCG	GTG	AGT	CTA	GCG	CGC	GCC	GTG	TAC	GCG	GAC
880	Ile	Asn	Leu	Ser	Gly	Gly	Gln	Lys	Ala	Pro	Val	Ser	Leu	Ala	Arg	Ala	Val	Tyr	Ala	Asp
2698	CGC	GAC	GTG	TAC	TTG	CTG	GAC	GAC	CCG	CTG	TCG	GCA	CTG	GAC	GCG	CAG	GTG	GGC	GAG	GCC
900	Arg	Asp	Val	Tyr	Leu	Leu	Asp	Asp	Pro	Leu	Ser	Ala	Leu	Asp	Ala	Gln	Val	Gly	Glu	Ala
2758	GTG	ATG	CGC	GAG	TGC	GTG	TGC	GGC	GCG	CTG	GCC	GGC	AAG	ACG	CGC	GTG	CTG	GCC	ACT	CAC
920	Val	Met	Arg	Glu	Cys	Val	Cys	Gly	Ala	Leu	Ala	Gly	Lys	Thr	Arg	Val	Leu	Ala	Thr	His
2818	CAG	GTC	AGC	GCC	GCC	CTA	CGC	GGA	CCT	GGT	TGT	GCT	GCT	GGA	GGC	CGC	GTC	GCG	TTC	
940	Gln	Val	Ser	Ala	Ala	Leu	Arg	Gly	Pro	Gly	Cys	Ala	Ala	Gly	Gly	Gly	Arg	Val	Ala	Phe
1nbsE3																				
2878	CAA	GGG	AGT	GGT	GAG	GCC	TAC	TAC	AAG	GAT	CAC	CTA	GCG	CGG	CAA	GTG	AGC	CAA	CGC	GGC
960	Gln	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Tyr	Tyr	Lys	Asp	His	Leu	Ala	Arg	Gln	Val	Ser	Gln	Arg	Gly
2938	GCC	GCA	TCC	AGT	GAT	GAC	ACT	GAG	GGG	GCT	GCA	GAG	AAG	GAA	GCA	CCC	GTG	GCG	AAC	ATC
980	Ala	Ala	Ser	Ser	Asp	Asp	Thr	Glu	Gly	Ala	Ala	Glu	Lys	Glu	Ala	Pro	Val	Ala	Asn	Ile
2998	ACA	GCA	GAG	AAG	AAG	TTG	AGT	GAT	TTG	ATG	GAG	GAA	GAG	CCT	CCG	GCA	GCG	GAC	ACT	ACG
1000	Thr	Ala	Glu	Lys	Lys	Leu	Ser	Asp	Leu	Met	Glu	Glu	Glu	Pro	Pro	Ala	Ala	Asp	Thr	Thr
3058	TTG	ACA	GCT	GTC	TCA	GAG	GTG	GAG	GGG	CGC	GCC	ATA	GAA	AAC	AAA	GGA	AAG	CTG	CTG	ACG
1020	Leu	Thr	Ala	Val	Ser	Glu	Val	Glu	Gly	Arg	Ala	Ile	Glu	Asn	Lys	Gly	Lys	Leu	Leu	Thr
P5000N1																				
3118	GAA	GAG	GAG	CGC	TTC	CGG	GGA	GGG	GTG	GGG	TGG	GAC	GTG	TAC	GTG	CGT	TAC	ATG	AAG	GCG
1040	Glu	Glu	Glu	Arg	Phe	Arg	Gly	Gly	Val	Gly	Trp	Asp	Val	Tyr	Val	Arg	Tyr	Met	Lys	Ala
3178	TGC	GGC	GGC	GTC	GGC	GCG	TGT	GTT	AGT	ATC	ATG	GCA	CTC	TAT	CTC	GCT	ACG	GAG	GTG	GTC
1060	Cys	Gly	Gly	Val	Gly	Ala	Cys	Val	Ser	Ile	Met	Ala	Leu	Tyr	Leu	Ala	Thr	Glu	Val	Val
3238	ATG	ATG	TCG	ACT	TCC	ATA	TGG	CTG	GCG	CTG	TGG	TCC	ACC	AAG	TGG	CTT	CCG	CTA	TCC	GCG
1080	Met	Met	Ser	Thr	Ser	Ile	Trp	Leu	Ala	Leu	Trp	Ser	Thr	Lys	Trp	Leu	Pro	Leu	Ser	Ala
3298	ACG	CAG	TAC	AGT	TTC	ATC	TAC	GTC	GGC	CTT	TCC	TTT	GCC	AGC	GCG	CTG	GCA	ACG	CCA	CTC
1100	Thr	Gln	Tyr	Ser	Phe	Ile	Tyr	Val	Gly	Leu	Ser	Phe	Ala	Ser	Ala	Leu	Ala	Thr	Pro	Leu
P5000N2																				
3358	CGC	TAC	TGG	CTT	TCA	ATG	AGC	ATG	ATG	CGG	CGA	GCC	AGT	CGG	GAA	GTG	CAC	CAG	GAG	CTC
1120	Arg	Tyr	Trp	Leu	Ser	Met	Ser	Met	Met	Arg	Arg	Ala	Ser	Arg	Glu	Val	His	Gln	Glu	Leu
3418	CTC	CGC	CTC	CTC	GCG	TGC	GCC	ACG	CTG	CAG	TTT	TTT	GAC	ACG	ACG	CCG	CTC	GGC	CGC	ATT
1140	Leu	Arg	Leu	Leu	Ala	Cys	Ala	Thr	Leu	Gln	Phe	Phe	Asp	Thr	Thr	Pro	Leu	Gly	Arg	Ile
3478	GTC	AAC	CGT	TTT	ACC	AAT	GAC	ATG	AGC	AAT	ATC	GAC	AGC	GAC	CTG	CAA	GGC	AGC	TAC	AGC
1160	Val	Asn	Arg	Phe	Thr	Asn	Asp	Met	Ser	Asn	Ile	Asp	Ser	Asp	Leu	Gln	Gly	Ser	Tyr	Ser
3538	TAT	CTC	CTC	TCC	ACC	ATC	TCA	GCG	TTC	TTC	TCG	ACC	GTG	GCG	ATG	ATG	GTG	GCA	ACG	CAA
1180	Tyr	Leu	Leu	Ser	Thr	Ile	Ser	Ala	Phe	Phe	Ser	Thr	Val	Ala	Met	Met	Val	Ala	Thr	Gln

3598 **GTT TTC GTG CTT GGT ATC CTT ATA CCC TGC ATG GTG GCG TAC TAC TAC CTT CTG AAA TTC**
 1200▶ Val Phe Val Leu Gly Ile Leu Ile Pro Cys Met Val Ala Tyr Tyr Tyr Leu Leu Lys Phe
 3658 **TAC GCC AGG GCC AAC CGC GAG ATC AAG CGC CTA GTG AAT CGA GTC AAC TCC CCA ATG CTT**
 1220▶ Tyr Ala Arg Ala Asn Arg Glu Ile Lys Arg Leu Val Asn Arg Val Asn Ser Pro Met Leu
 3718 **TCT GTC CTG CAG GAA GCG ATT GGC GGT CGT TGG ACG GTG CAA GCG TAC GGC GCG GCG CCG**
 1240▶ Ser Val Leu Gln Glu Ala Ile Gly Gly Arg Trp Thr Val Gln Ala Tyr Gly Ala Ala Pro
 3778 **GCG GTG ATC CAG AAG GCT CTT CAA TGT GCA GAT GTC GTC TAC ACC TGC TCG TAT CTG CAA**
 1260▶ Ala Val Ile Gln Lys Ala Leu Gln Cys Ala Asp Val Val Tyr Thr Cys Ser Tyr Leu Gln
 3838 **CTC GGC GCG GAA CTC TGG CTT TCT GTG CGT ATC CAG ATG CTG AGC GCG TCC ATT ACT GTT**
 1280▶ Leu Gly Ala Glu Leu Trp Leu Ser Val Arg Ile Gln Met Leu Ser Ala Ser Ile Thr Val
 ← **P387ON1** →
 3898 **GCC GTG GCA CTG GGC GCC GTC GCG GCC ATG CAC CTC TCG TTT CTG CCG TCG CAC ATC GGC**
 1300▶ Ala Val Ala Leu Gly Ala Val Ala Ala Met His Leu Ser Phe Leu Pro Ser His Ile Gly
 3958 **CTT CTC TCC CTC AAT CTC ACC CTG GCC CTC GAG ATC AGC AGC CTC CTG GAC GGC ATC GTC**
 1320▶ Leu Leu Ser Leu Ser Leu Thr Leu Ala Leu Glu Ile Ser Ser Leu Leu Asp Gly Ile Val
 → **P387ON2** ←
 4018 **ACT GTG CTC GCC TCC GTG GAG GCA GAT ATG AAC AGC ATT GAA AGT GTC TTT TAT ATG ACA**
 1340▶ Thr Val Leu Ala Ser Val Glu Ala Asp Met Asn Ser Ile Glu Ser Val Phe Tyr Met Thr
 4078 **GAC CAC ATT GAG CAT GAG GAC CTG CAG GAG GCC GCT GCA GCG GAG GTT CAG CGC ATC ACC**
 1360▶ Asp His Ile Glu His Glu Asp Leu Gln Glu Ala Ala Ala Glu Val Gln Arg Ile Thr
 4138 **GAG GGT GCG CAC GGC CCT GAG CGA CGT TGT GCA GAG ACC TTG GCA GAG AGT GAG GAG CCT**
 1380▶ Glu Gly Ala His Gly Pro Glu Arg Arg Cys Ala Glu Thr Leu Ala Glu Ser Glu Glu Pro
 4198 **TCT GGC CTG GAT AAC TGG AGC TCG CCG CTT CTC ATC CGT CAA TCA GGC AAC ACC CAG TTC**
 1400▶ Ser Gly Leu Asp Asn Trp Ser Ser Pro Leu Leu Ile Arg Gln Ser Gly Asn Thr Gln Phe
 → **2nbsE2** ←
 4258 **GGA GCG CTT GTG CTG GAG CCA GTG GAC ATG CGG TAC CGG CCG GGG CTG CCG CTG GTG CTG**
 1420▶ Gly Ala Leu Val Leu Glu Pro Val Asp Met Arg Tyr Arg Pro Gly Leu Pro Leu Val Leu
 4318 **CGC GAC GTG TGC TTC GCG GTG GGC CCG GGG CAG AAG GTG GGC GTT GTG GGG CGC ACC GGT**
 1440▶ Arg Asp Val Cys Phe Ala Val Gly Pro Gly Gln Lys Val Gly Val Val Gly Arg Thr Gly
 → **2nbsE3** ←
 4378 **AGC GGG AAG TCG ACG CTG CTG CTG GCC TTC CTG CCG CTG GTG GAG GTG TGC GGC GGC CCG**
 1460▶ Ser Gly Lys Ser Thr Leu Leu Leu Ala Phe Leu Arg Leu Val Glu Val Cys Gly Gly Pro
 4438 **ATG CTC GTG TGC GCG GGC GAC GCC GGC GAC TAC GGC GTG CCG GAC CTG CCG CTC TTC**
 1480▶ Met Leu Val Cys Ala Gly Asp Ala Gly Asp Tyr Gly Val Arg Asp Leu Arg Ala Leu Phe
 4498 **TCG ACG ATC CCG CAG GAC CCG CTG CTG TTC GAG GGC ACG GTG CCG AGC AAC GTG GAC CCC**
 1500▶ Ser Thr Ile Pro Gln Asp Pro Leu Leu Phe Glu Gly Thr Val Arg Ser Asn Val Asp Pro
 4558 **TTT GGC TGC TGC GGC GAC GCG GCG GTG TGG CGC GCG CTG CCG CAG GTG GGG ATG GAG GAG**
 1520▶ Phe Gly Cys Cys Gly Asp Ala Ala Val Trp Arg Ala Leu Arg Gln Val Gly Met Glu Glu
 4618 **CGC GTG CCG GGC GAG GCG GGC GGA CTG GAC GGG CCG GTG CAG GAG GGC GGC GCA AAC TAC**
 1540▶ Arg Val Arg Gly Glu Ala Gly Gly Leu Asp Gly Arg Val Gln Glu Gly Gly Ala Asn Tyr
 4678 **AGC GTG GGC CAG CCG CAG CTG CTG TGC CTG GCG CCG GCG CTG CTC AAG CCG GGC AGC GCC**
 1560▶ Ser Val Gly Gln Arg Gln Leu Leu Cys Leu Ala Arg Ala Leu Leu Lys Arg Gly Ser Ala
 4738 **TTC CTG CTC ATG GAC GAG GCA ACC GCA AAC GTC GAC CCC GCG CTC GAC CCG CAG ATC CAG**
 1580▶ Phe Leu Leu Met Asp Glu Ala Thr Ala Asn Val Asp Pro Ala Leu Asp Arg Gln Ile Gln
 4798 **CGC ACG GTG CAG CAC ACC TTT CCG GAC TAC ACC GTC GTC ACC ATC GCG CAC CCG CTG CAC**
 1600▶ Arg Thr Val Gln His Thr Phe Arg Asp Tyr Thr Val Val Thr Ile Ala His Arg Leu His
 ← **2nbsE1** →
 4858 **ACC GTC GCC GCC TGC GAC GTC ATC CTC GTC ATG GAC CAG GGC CCG GTT CTC GAG TTC GGC**
 1620▶ Thr Val Ala Ala Cys Asp Val Ile Leu Val Met Asp Gln Gly Arg Val Leu Glu Phe Gly
 4918 **TCG CCG CCG GAG CTG GTG GAG CCG CAG GGA TCC GCT TTC GGC GCG CTG GTG AAG TCG CTC**
 1640▶ Ser Pro Arg Glu Leu Val Glu Arg Gln Gly Ser Ala Phe Gly Ala Leu Val Arg Ser Leu
 4978 **GGC CGT GAT GGT GAA CAG CTT TTC AAG GAG GCG ATG CGA AAT GCT TTA CGA GAG TAG CCG**
 1660▶ Gly Arg Asp Gly Glu Gln Leu Phe Arg Glu Ala Met Arg Ser Ala Leu Arg Glu ***
 5038 **ATGAGGAGACGCACCACTGGGCTGCGAGCGAGTGGTGGACGTGTGGCGCTTTACTTTGTGTGTGTGTGTGTGTGCTG**
 5117 **AGTGAAGCACTTTTCGCTGGCGTGGGGGAATACGGCGAGACGTGCCTCGCGCATGGTTGAGTGGCGTGCATGACGATGCT**
 5196 **CACGATGCCTTACATGTGAGGAAAGAGGGCAGATGCGTGAAGTGCATATTGGCATAACGCAGATACTTATCTGGTGTATGAT**
 5275 **GGACGGCTTCTGTTTCTCAGCGCTCACGACGTGGTGAACGACGGAGGGGTGACACTGGCCATAGCGTGTCTCTCTCT**
 5354 **TCTCCTGCTGCAAGGGCATAACCGACACGCCCAATCCAGCTGTGACGGTACTCTGACGTTATCGACACTTGACCGCTGT**
 5433 **GGCTTCATGCT**

Figura IV.4. Secuencia codificante del gen *ltrpgpE* de *L. tropica*. En la figura se representa las 6.640 pb secuenciadas entre las que se encuentra el marco abierto de lectura para el gen *ltrpgpE*. La numeración tiene como valor 1 el codón de iniciación. Se ha destacado el dinucleótido AG del aceptor del mini-exón. Las flechas indican la orientación de los oligonucleótidos utilizados en la secuenciación del gen marcando la secuencia con la que aparecen.

IV.4. ANALISIS DE LA SECUENCIA DE AMINOACIDOS DEL GEN *ltpgpE*.

A través de los bancos de datos y mediante el programa TFASTA del paquete GCG se establecieron homologías entre la secuencia de aminoácidos del gen *ltpgpE* con la secuencia de aminoácidos de otros genes. Como muestra la Tabla IV.2 se encontraron valores significativos de homología tan solo con transportadores ABC.

Homología entre el gen ltpgpE y otros transportadores ABC

	Identidad(%)	Similaridad(%)
<i>ltpgpE</i>	79,6	87,2
<i>ltpgpA</i>	42,0	62,3
<i>ltpgpB</i>	41,3	61,5
<i>lemdr</i>	33,6	50,3
YCF1	29,6	52,7
HuMRP	28,4	52,6
HuCTFR	26,4	52,9
EcMDL	25,9	49,6
<i>ldmdr1</i>	22,8	48,7
<i>pfmdr1</i>	20,6	45,0

Tabla IV.2. *Homología del gen ltpgpE con otros transportadores ABC.* Las homologías han sido establecidas a nivel de la secuencia de aminoácidos con otros genes del banco de datos usando el programa UWGCG GAP (Devereux y col., 1984). ***ltpgpE***, ***ltpgpA*** y ***ltpgpB*** (*L. tarentolae*), ***lemdr*** (*L. enriettii*), **YCF1**, (*S. cerevisiae*), **MRP**, **HuCFTR** (humano), **EcMDL** (*E. coli*), ***ldmdr1*** (*L. donovani*), ***pfmdr1*** (*P. falciparum*). Se han expresado la identidad y la similitud en aminoácidos como un porcentaje. Los criterios de similitud seguidos fueron: (I, L, V, M), (D, E), (K, R).

Como se aprecia en la Tabla IV.3 las principales homologías del gen *ltpgpE* se mantiene con aquellos genes de la familia glicoproteína-P relacionados con la proteína *pgpA* (*ltpgpA*, *ltpgpB* y *ltpgpE*), siendo la más alta homología la establecida con su homólogo el gen *ltpgpE* de *L. tarentolae*. Con los restantes miembros de la familia ABC, el gen mantiene menores porcentajes de homología, inferiores al 40%.

Los transportadores ABC se caracterizan porque sus dominios de unión a ATP se encuentran muy conservados a lo largo de toda la superfamilia. La homología que mantiene el gen *ltpgpE* a nivel de los dominios de unión a ATP con otros transportadores ABC aparece representada en la Tabla.IV.3. Los porcentajes de homología encontrados tanto a

nivel de identidad como similitud son superiores a un 30% de homología. Estos valores se encontraban dentro de los márgenes de porcentajes de homología obtenidos al comparar entre sí dominios de unión a ATP de diferentes transportadores ABC, es decir entre un 30 y un 50% (Higgins, 1992).

ltrpgpE		
	ATP-Amino	ATP-Carboxilo
ltrpgpE	82,0 (89,5)	91,5 (95,0)
ltrpgpA	53,2 (72,6)	65,2 (80,6)
ltrpgpB	53,2 (72,6)	65,2 (80,6)
HuMRP	39,8 (63,2)	44,0 (66,0)
YCF1	39,8 (63,2)	48,0 (70,0)
HuCFTR	34,3 (55,7)	37,2 (63,8)
ldmdr1	32,6 (57,8)	30,6 (58,3)
lemdr1	32,5 (55,5)	32,2 (58,8)
EcMDL	31,2 (57,3)	36,4 (58,3)

Tabla V.3. Análisis de homología del gen *ltrpgpE* a nivel de los sitios de unión a ATP, con otros transportadores ABC. Las homologías han sido establecidas a nivel de la secuencia de aminoácidos con otros genes del banco de datos usando el programa UWGCG GAP (Devereux y col., 1984). **ltrpgpE**, **ltrpgpA** y **ltrpgpB** (*L. tarentolae*), **YCF1**, (*S. cerevisiae*), **MRP**, **HuCFTR** (humano), **ldmdr1** (*L. donovani*), **lemdr1** (*L. enriettii*), **EcMDL** (*E. coli*). Se han expresado la identidad y la similitud en aminoácidos (entre paréntesis) como un porcentaje. Los criterios de similitud seguidos fueron: (I, L, V, M), (D, E), (K, R).

V.5. ANALISIS DE LA ESTRUCTURA PREDICTIVA DEL GEN *ltrpgpE*.

La estructura predictiva del gen *ltrpgpE* es característica de las proteínas de la superfamilia ABC. Los análisis de hidrofobicidad de la secuencia de aminoácidos usando el algoritmo de Kyte y Doolittle (1982) muestran que este gen, al igual que otras glicoproteínas-P, puede ser dividido en dos mitades con una estructura homóloga, cada una de ellas con una región hidrofóbica y una región hidrofílica.

A través del perfil de hidrofobicidad de la proteína se ha podido distinguir en cada región hidrofóbica, 6 segmentos muy hidrofóbicos con un tamaño que oscila entre los 18 y 21 aminoácidos. El carácter altamente hidrofóbico y el tamaño de estos segmentos, suficiente para atravesar la membrana, nos lleva a proponer que estos 12 segmentos se corresponden con los 12 segmentos transmembrana de una glicoproteína-P. Para la localización de estos segmentos se utilizó el algoritmo de Kyte y Doolittle usando una ventana de 9 aminoácidos.

Los alineamientos de la secuencia de aminoácidos que comprende la región hidrofílica, con otros transportadores ABC, han permitido localizar las secuencias conservadas de los dominios de unión a ATP. Tanto en los dominios de unión a nucleótido de la mitad amino como de la carboxilo de la proteína, se han podido identificar claramente los motivos Walker A, formados por las secuencias **791GPTGSGKST800** para el dominio amino y **1456GRTGSGKS1463** para el carboxilo, y los motivos Walker B formados por las secuencias **902VYLLDD907** en el dominio amino y **1580FLLMDE1585** para el carboxilo. También ha sido localizado en ambos dominios de unión a ATP un motivo muy conservado dentro de los miembros de la superfamilia ABC, situado entre los dos motivos Walker, y que es considerado como la firma o el sello de la superfamilia. Este motivo viene representado por la secuencia **882LSGGQK887** en el dominio amino y **1558YSVGQRQLLCL1569** en el dominio carboxilo del gen *ltrpgpE*.

En cuanto a la presencia de otros motivos a lo largo de la proteína *ltrpgpE* se han encontrado 5 posibles sitios de N-glicosilación determinados por la secuencia Asn-X Thr/Ser en donde "X" es cualquier aminoácido. De acuerdo con el modelo predictivo todos estos sitios de N-glicosilación están dirigidos hacia el citoplasma o bien están localizados en segmentos transmembrana

IV.6. ORGANIZACION GENOMICA DEL GEN *ltrpgpE* DE *L.tropica*.

Es frecuente en Tripanosomátidos que la distribución de los genes dentro del genoma tenga lugar en forma de repeticiones en tandem, aunque también han sido descritos genes que aparecen con una sola copia por genoma haploide.

Para determinar la organización del *ltrpgpE* dentro del genoma de *Leishmania tropica* se llevó a cabo un análisis de restricción del ADN tanto de la línea silvestre de *L. tropica* LRC-L39 como de la línea resistente a 1mM de MTX, a partir de la cual fue aislado este gen. Los enzimas usados en el análisis de restricción fueron escogidos en función de que o bien presentaran un único sitio de corte en la secuencia del gen o bien no cortaran dentro del mismo. En base a este criterio se seleccionaron las enzimas BamHI, BglII, HindIII, KpnI, SmaI y XhoI cuyos sitios de corte dentro de la secuencia codificante del gen aparece indicado en la figura IV.5 y ApaI cuya secuencia de corte no aparece dentro de la secuencia codificante del gen.

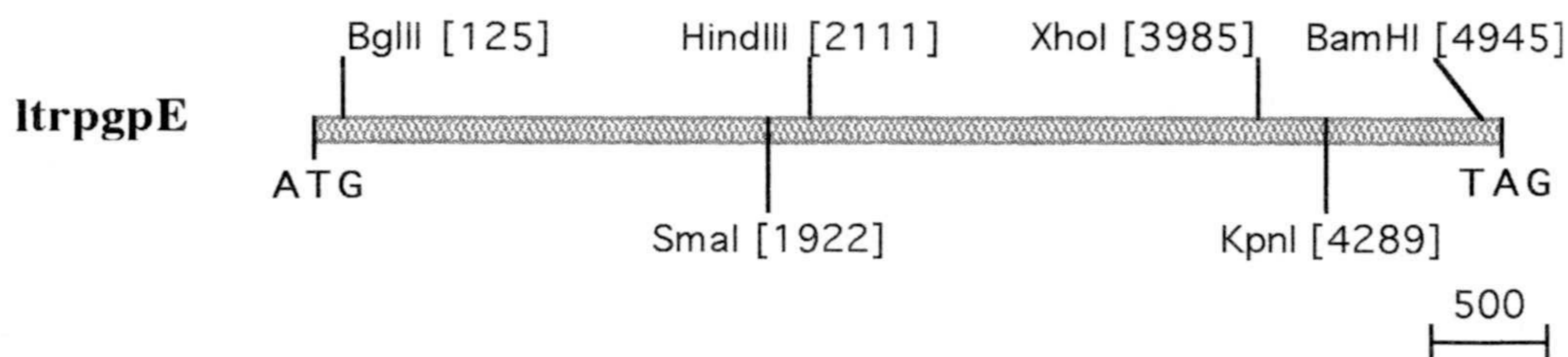


Figura IV.5. Mapa de restricción de la secuencia codificante del gen *ltrpgpE*. Se han representado las dianas de las enzimas de restricción que cortan en la secuencia codificante del gen acompañadas del número que indica su posición en la secuencia tomando como origen el sitio de iniciación. En negrita aparece el codón de iniciación y terminación del gen. La escala viene dada en pb .

El ADN de las formas promastigotas de *L. tropica* silvestre y resistente a MTX fue digerido con las enzimas anteriormente indicadas, separado mediante electroforesis en gel de agarosa y transferido a membrana de nylon para ser posteriormente hibridado con la sonda **pltrE**. La sonda **pltrE**, específica para el gen *ltrpgpE*, se obtuvo a partir del plásmido pE-E (Fig. IV.3, Tabla I) mediante digestión con PstI que liberó un fragmento de 230 pb cuya secuencia es homóloga a la secuencia de la sonda E de *L. tarentolae*, utilizada en el aislamiento del gen

El resultado de la hibridación del ADN digerido de la línea salvaje y resistente con la sonda **pltrE** aparecen en la figura IV.6. Como se puede apreciar en todas las digestiones la sonda **pltrE** reconoció una única banda lo que indica que el gen *ltrpgpE* es un gen de copia única. También son apreciables las diferencias existentes en el patrón de restricción del gen *ltrpgpE* entre las líneas de *L. tropica* salvaje y mutada.

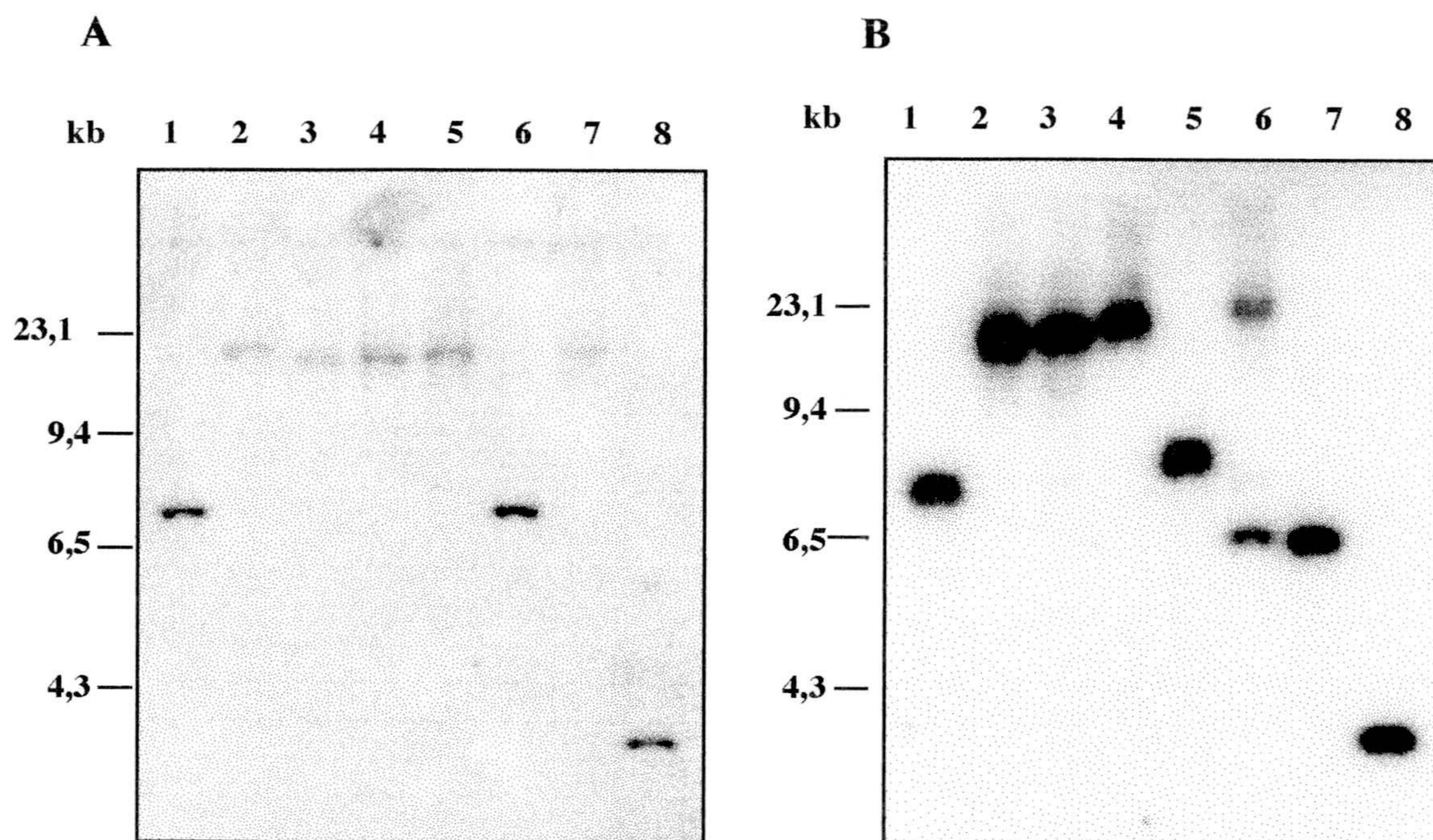


Figura IV.6. Organización genómica del gen *ltrpgpE* de *L. tropica*.

Aproximadamente 3 μ g del ADN genómico de las líneas de *L. tropica* silvestre (Panel **A**) y resistente a MTX (Panel **B**) fue digerido con las enzimas de restricción BamHI (pocillo **1**), ApaI (pocillo **2**), BglII (pocillo **3**), EcoRI (pocillo **4**), HindIII (pocillo **5**), KpnI (pocillo **6**), SmaI (pocillo **7**) y XhoI (pocillo **8**). El resultado de la digestión fue separado en un gel al 0,8% de agarosa y transferido a membrans de nylon para su posterior hibridación con la sonda pltrE.

IV.7. LOCALIZACION CROMOSOMICA DEL GEN *ltrpgpE* DE *L. tropica*.

Para deteminar la localización cromosómica del gen *ltrpgpE* en *L. tropica*, los cromosomas de las formas promastigotas del parásito silvestre y resistente a 1mM de MTX, fueron separados mediante electroforesis en campo pulsante (CHEF) según se describe en Material y Métodos. Con las condiciones de pulso empleadas se consiguieron separar al menos 17 cromosomas los cuales fueron transferidos a membrana de nylon e hibridados con la sonda pltrE (Fig. IV.7).

Como previamente ha sido descrito por Amador Trujillo (Tesis doctoral, U. de Granada, 1993) el gen *ltrpgpE* fue localizado por la sonda del gen *ltrpgpE* de *L. tarentolae* en una banda de aproximadamente 1500 kb, observandose una ligera diferencia de tamaño entre el cromosoma reconocido por la sonda en la línea silvestre y el cromosoma reconocido en la

línea resistente. Esta variación de tamaño puede ser apreciada igualmente en el gel teñido con Bromuro de Etidio (Fig. IV.7).

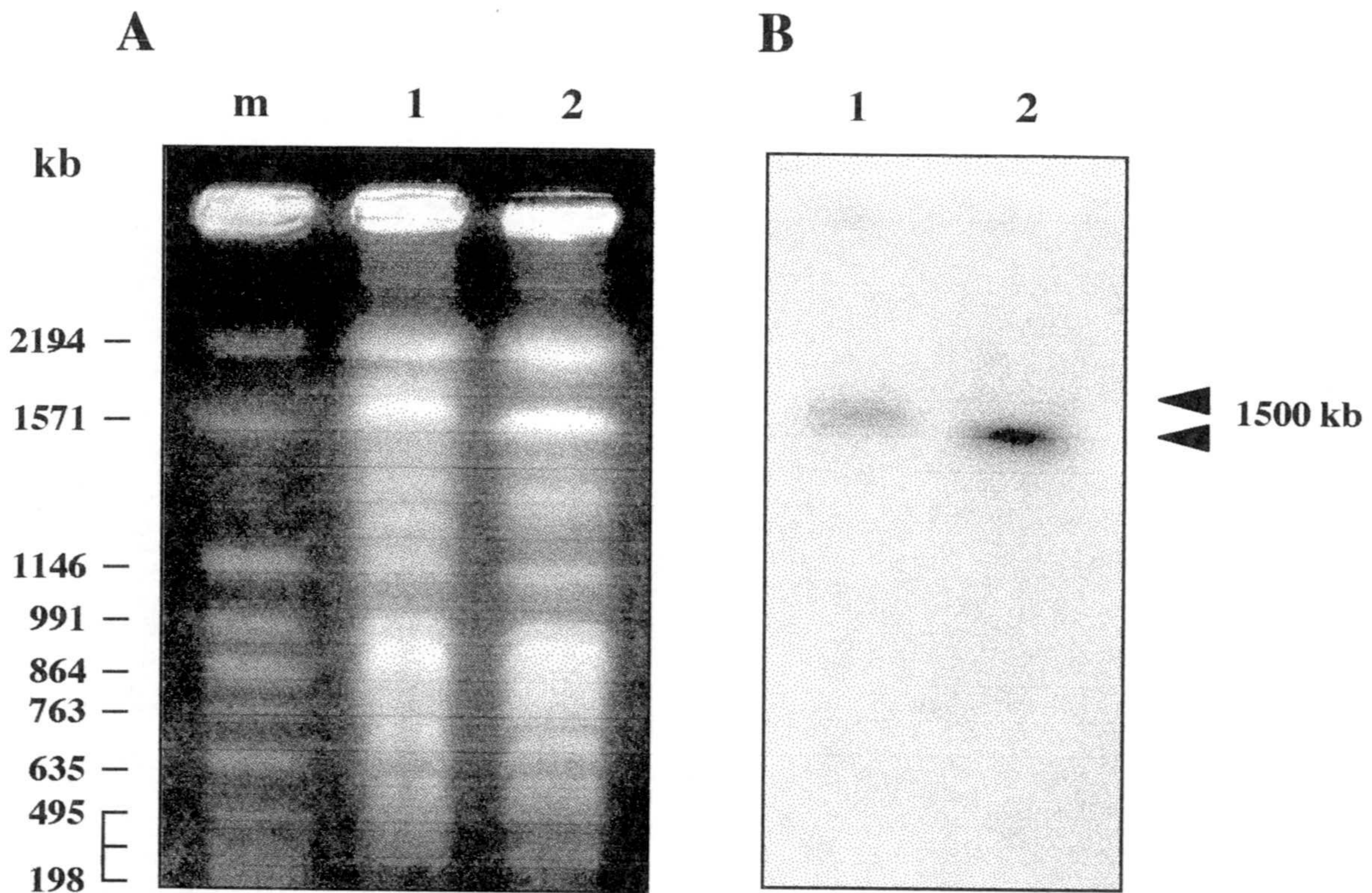


Figura IV.7. Localización cromosómica del gen *ltrpgpE*. CHEF electroforesis de las formas promastigotas de *L. tropica* salvaje (1) y resistente a 1mM de MTX (2). Panel A: Gel teñido con bromuro de etidio donde aparece el patrón cromosómico de ambas líneas celulares. Panel B: Autorradiografía del gel transferido a nylon e hibridado con la sonda *ltrpE*.

IV.8. TRANSFECCION DEL GEN *ltrpgpE*.

Una de las formas de estudiar la función de un gen es llevar a cabo ensayos de transfección en los que el gen, clonado en un vector de transfección, es introducido dentro de una célula. En *Leishmania*, la transfección génica estable puede ser conseguida de forma que la construcción molecular del gen más vector queden como un elemento episomal. Los vectores de transfección disponen de capacidad autoreplicativa manteniéndose en la célula en un alto número de copias, que pueden ser incrementadas al aumentar la concentración del producto selector. Esto permite obtener altos niveles de expresión del gen objeto de estudio.

Para la transfección estable del gen en formas promastigotas de la cepa clonada de *Leishmania tropica* LRC-R39 silvestre se utilizaron dos vectores de transfección, uno de

ellos el plásmido pX y el otro el plásmido pKSNEOA cuya construcción esta descrita detalladamente en el apartado I.1 de Material y Metodos.

El vector pX procede de la región R de *L. major*, una amplificación génica extracromosomal de 30 kb que contiene al gen de la enzima bifuncional DHFR-TS, así como todos los elementos necesarios para una replicación y transcripción autónoma independiente de un locus cromosomal, característica que hace de esta amplificación una buena herramienta para la transfección estable en *Leishmania*.

En pX un fragmento de 3,34 kb SalI-XbaI procedente de la región R de *L. major* ha sido insertado en pBSKS-. En este fragmento la secuencia codificante de la enzima DHFR-TS ha sido sustituida por la secuencia del gen *neo* codificante para la neomicina fosfotransferasa, que actua como marcador de selección confiriendo resistencia a aminoglucósidos tales como G418. Las secuencias 5' y 3' no codificantes de la DHFR-TS han sido conservadas en pX y flanquean al gen *neo* de forma que permiten la expresión del mismo dentro del parásito. Por otra parte, pX proporciona un sitio aceptor del minixon procedente de los genes DST localizados cadena abajo del gen DHFR-TS y un sitio de poliadenilación procedente del transcrito de 13 kb que mapea en la región R cadena arriba de la enzima. Ambas secuencias reguladoras flanquean los sitios de clonaje del vector en los que se han de insertar las secuencias que van a ser introducidas al parásito.

Por último, pX puede ser introducido con alta eficiencia y de forma estable en promastigotes de *Leishmania* en los que permanece como elemento extracromosomal con un alto número de copias, manteniendo altos niveles de expresión bien directamente o al aumentar la presión de geneticina (G418) (LeBowitz y col., 1990).

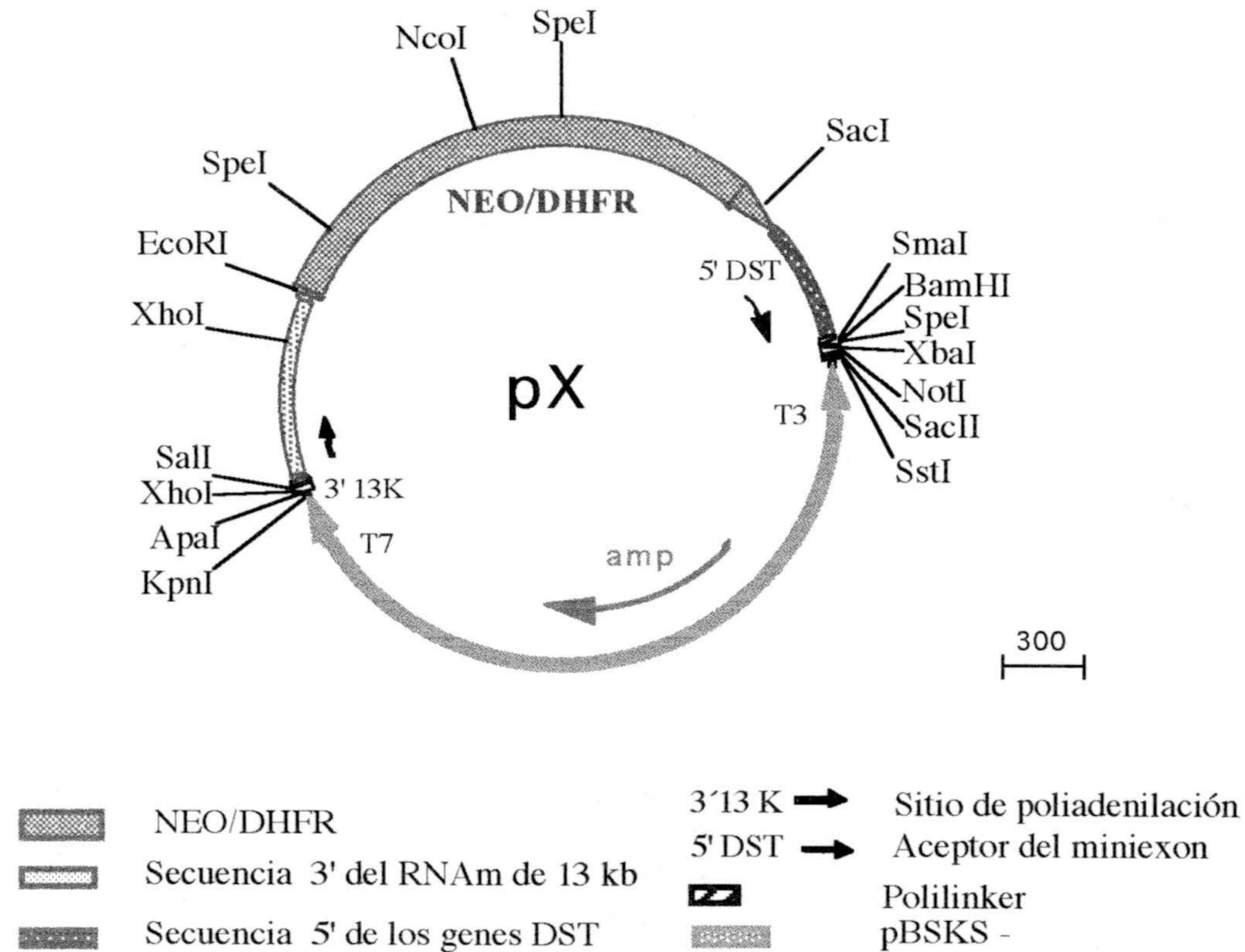


Figura IV.8. Esquema del vector de transfección pX. En morado se representan las secuencias que proceden de la región R de *L. major*. Con línea gruesa se representa al híbrido NEO/DHFR, la flecha indica la orientación del mismo. Las flechas negras indican la posición del aceptor de "splicing" de los ARNm DST y el sitio de poliadenilación del ARN de 13 kb. En verde aparece la secuencia del vector pBluescriptKS- indicando la orientación del gen de resistencia a ampicilina y de los promotores T7 y T3.

IV.8.1. Construcción de plásmidos para transfección conteniendo secuencias del gen *ltrpgpE*.

Se realizaron dos tipos de construcciones moleculares portadoras de secuencias del gen *ltrpgpE*. Por una parte, el gen deleciónado en la región codificante 5' fue clonado en pX dando la construcción pX-E 5' Δ , por otra el gen completo se clonó en pKSNEOA para dar la construcción pKSN-E. Previamente a la construcción de los plásmidos de transfección fue necesario clonar el gen *ltrpgpE* completo en un vector bacteriano para poder ser extraído e insertado en los vectores de transfección.

IV.8.1.1. Obtención del plásmido pSBE.

Para la clonaje del gen *ltpgpE* usamos dos plásmidos que contenían secuencias parciales del gen. Por una parte el plásmido pE-6,8 que contiene la mayor parte de la región codificante del gen, así como aproximadamente unas 2 kb de secuencias no codificantes situadas cadena arriba del mismo, y por otra el plásmido mpE-1,6 que contiene el extremo 3' del gen, con el codon de terminación situado a una distancia de 90 pb del sitio BamHI, así como las secuencias no codificantes cadena abajo del gen (Fig. IV.3, Tabla IV.I). La estrategia diseñada para el clonaje del gen *ltpgpE* en el vector pBluescriptKS- aparece en la figura IV.9.

La construcción del plásmido al que llamamos pSBE se realizó partiendo de los clones mpE-1,6 y pE-6,8 anteriormente descritos. La digestión del clon mpE-1,6 con las enzimas Sall-BamHI liberó un fragmento de 0,490 kb que contenía el extremo 3' codificante del gen y que fue clonado en pBSKS- para dar el plásmido pE-3'. Por otra parte la digestión de pE-6,8 con BamHI liberó un fragmento de 6,8 kb que contenía el resto de la secuencia del gen *ltpgpE*, así como secuencia región 5' no codificante del mismo. Este fragmento BamHI se ligó al plasmido pE-3' linearizado con BamHI para dar la construcción pSBE.

Tras transformación en células XL1-Blue se comprobó en distintos transformantes, tanto mediante mapeo de restricción como con el uso de las sondas específicas, que dentro del plásmido pSBE la orientación del inserto BamHI al unirse al plásmido pE-3 era la correcta.

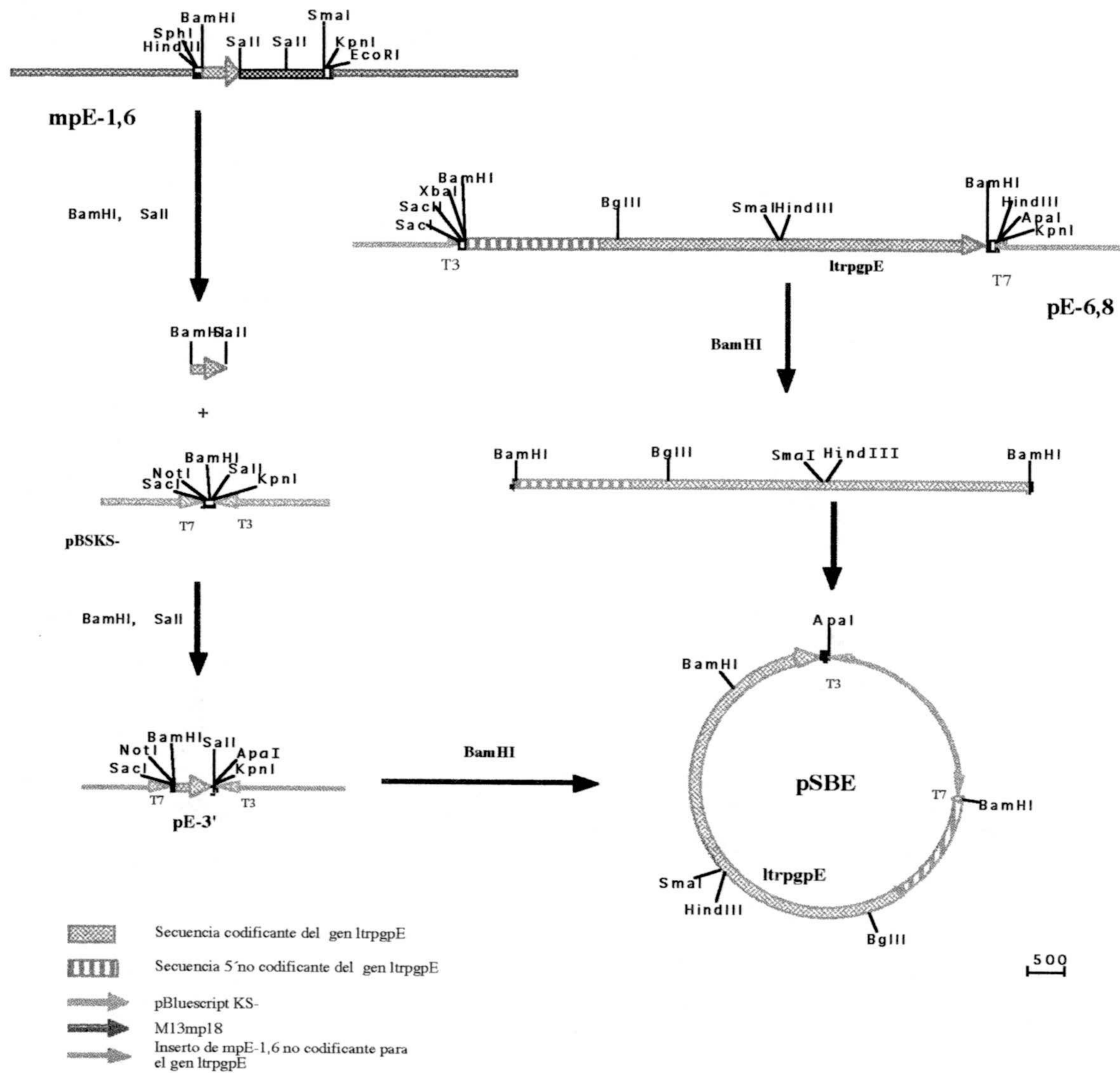


Figura IV.9. Obtención del plásmido pSBE. En la figura se muestra la estrategia de clonaje seguida para el clonaje del gen *ltrpgpE* completo dentro del vector pBSKS-. La escala viene dada como nucleótidos por cm. Las digestiones realizadas en cada plásmido vienen indicadas por la enzima utilizada y una flecha azul que indica el producto de la digestión, o el producto del clonaje resultante.

IV.8.1.2. Obtención del plásmido pX-E 5'Δ.

A partir del clon pSBE se extrajo un fragmento que contenía el gen *ltrpgpE* delecionado en 5' mediante digestión en primer lugar con *ApaI*, enzima localizada en el polilinker de pSBE. El producto de la digestión fue tratado con la ADN polimerasa del fago T4 para hacer romos los extremos prominentes proporcionados por la digestión con dicha enzima y el resultado fue digerido esta vez con *BglII*, enzima que tiene la secuencia de corte dentro del gen en posición 125. El resultado de esta digestión fue ligado al plásmido pX digerido con *XbaI*, sometido a tratamiento con la ADN polimerasa del fago T4, para hacer romos, y digerido de nuevo con *BamHI*, enzima que presenta una secuencia de corte compatible con *BglII*. La construcción resultante, a la que se llamó pX-E Δ 5', tiene el gen *ltrpgpE* 5' delecionado orientado en la misma dirección que el gen híbrido NEO/DHFR y que el gen de resistencia a ampicilina del vector (Figura IV.10)

IV.8.2.3. Obtención del plásmido pKSN-E.

Para integrar el gen *ltrpgpE* en un vector de transfección, se utilizó la construcción pKSNEOA anteriormente descrita en el apartado de Material y Métodos. Puesto que prácticamente todas las enzimas del polilinker de pKSNEOA estaban presentes en la secuencia del gen y otras como *EcoRI* no permitían extraer el gen completo del plásmido pSBE, diseñamos la siguiente estrategia de clonaje:

Del vector pKSNEOA se extrajo mediante digestión con *ApaI* un fragmento que contenía todas las secuencias reguladoras de la expresión, así como el marcador de selección NEO/DHFR. Este fragmento fue ligado al plásmido pSBE previamente linearizado con *ApaI*. De esta forma se obtuvo la construcción pKSN-E en la cual el plásmido pSBE no solo aporta la secuencia codificante del gen *ltrpgpE* y las secuencias 5' y 3' no codificantes que flanquean al gen, sino que también aporta el vector bacteriano pBSKS- que forma parte de los vectores de transfección (Fig. IV.11).

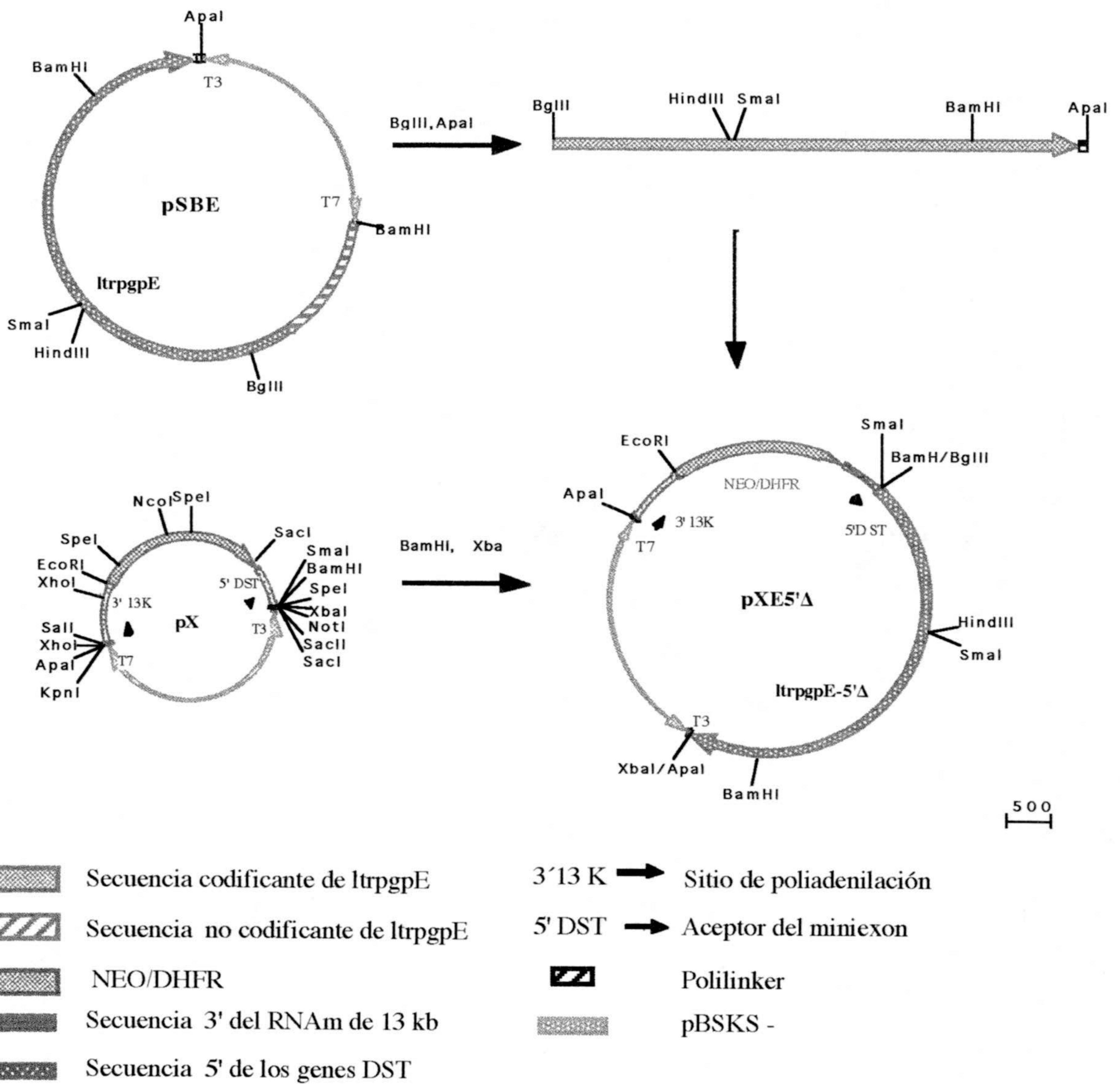


Figura IV.10 Estrategia seguida en la obtención del plásmido pX-E Δ 5'.

Las digestiones llevadas a cabo en cada uno de los plásmidos vienen indicadas por la enzima utilizada y por una flecha azul que indica el resultado de la digestión, o bien el producto resultante de clonaje. La escala viene dada en pares de bases.

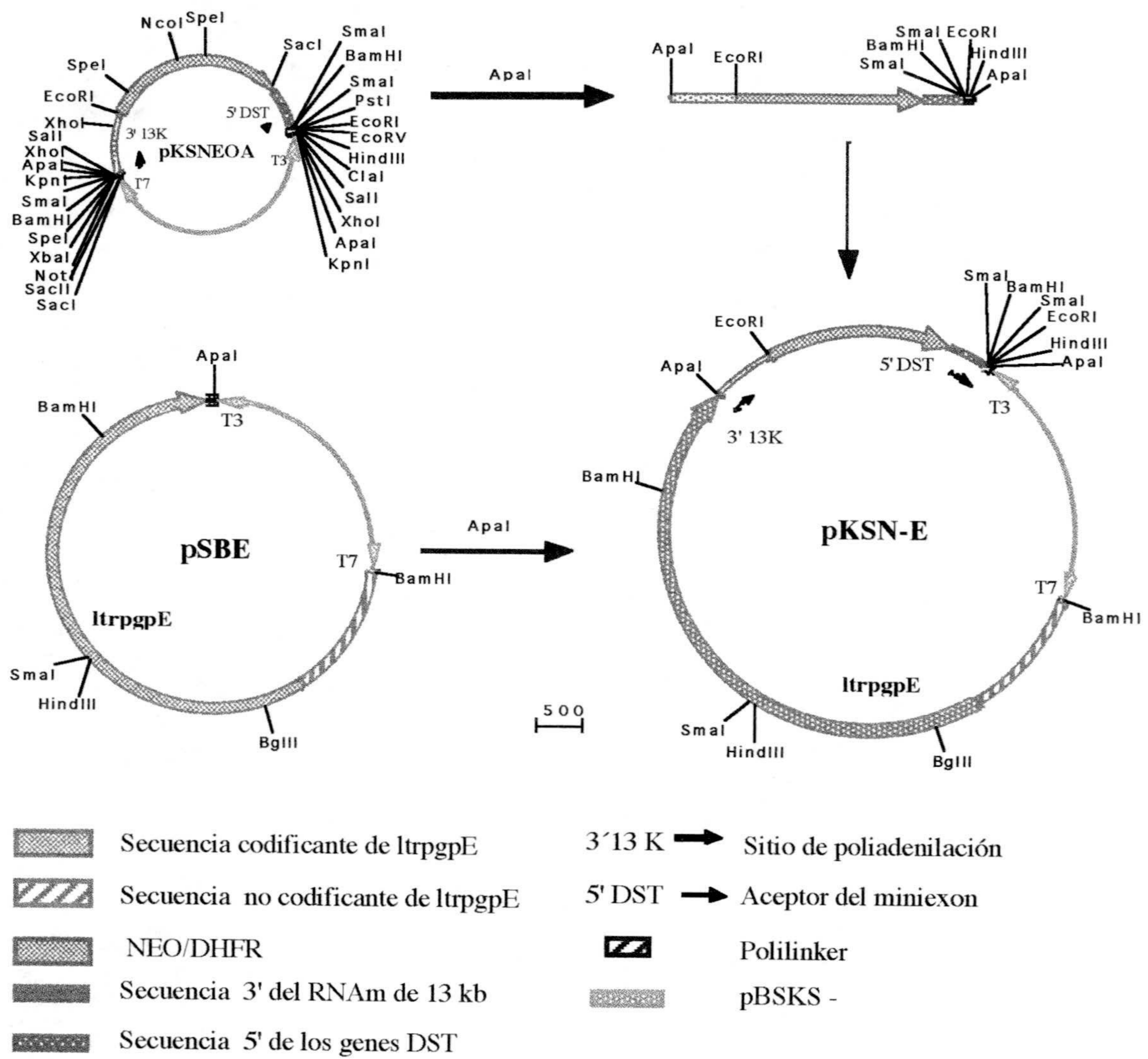


Figura IV.11 Estrategia seguida para la obtención del plásmido pKSN-E. Las digestiones realizadas sobre cada uno de los plásmidos viene indicada por la enzima utilizada y por una flecha azul que indica el producto de la digestión o bien el plásmido resultante del clonaje. La escala viene dada en pares de bases.

Una vez conseguidas las construcciones moleculares que iban a ser introducidas en las formas promastigotas de *Leishmania*, se aislaron cantidades del orden de mg del ADN de los distintos plásmidos. Para ellos se partió de 500 ml de cultivo en fase estacionaria de células *E. coli* XL1-Blue, transformadas con los vectores de transfección pX, pKSNEOA y las construcciones portadoras de secuencias del gen, pX-E 5' Δ y pKSN-E. El ADN plasmídico fue extraído por el procedimiento de Magic-Maxiprep® descrito en Material y Métodos, comprobando la identidad de cada uno de los plásmidos y su grado de pureza mediante análisis de restricción y electroforesis en gel de agarosa.

IV.8.2. Transfección de *Leishmania tropica* LRC-139

IV.8.2.1.- Electroporación de *Leishmania tropica* LRC-L39

Para la transfección se empleó la línea silvestre y clonada de *Leishmania tropica* LRC-L39. La transfección en esta línea silvestre tiene sentido desde el punto de vista de que nuestro principal objetivo es comprobar el carácter funcional del gen *ltrpgpE*, gen que ha sido aislado a partir de una genoteca de ADN genómico de la misma cepa resistente a fármacos. Por tanto para comprobar la función del gen es necesario que éste se exprese en un receptáculo celular que no haya desarrollado un fenotipo que interfiera en la interpretación de los resultados.

La transfección se realizó por electroporación, según una modificación del protocolo de Kapler (1990), empleándose pulsos simples de 2.25 kV/cm a 500 μ F, en un sistema de electroporación ECM 600® de BTX. Cada experimento de transfección se realizó por duplicado, utilizando 50 millones de parásitos en fase logarítmica de crecimiento y 100 μ g de ADN plasmídico por transfección. El ADN plasmídico fue introducido sin linearizar, en su forma superenrollada, condiciones en las cuales el plásmido queda como elemento extracromosomal dentro de la célula. Esto permite que el parásito transfectado, sometido a la presión del fármaco de selección, pueda generar un alto número de copias del plásmido que le ha sido introducido.

Fueron transfectadas las construcciones pX-E 5' Δ , pKSN-E y los vectores correspondientes pX y pKSNEOA como control de transfección. Como control de la electroporación se utilizaron células electroporadas en ausencia de plásmido. En estas condiciones se observó una letalidad celular de aproximadamente el 50%, indicio de que las condiciones empleadas fueron las adecuadas para la introducción del ADN extraño (Long y Dawid, 1980).

Después de la electroporación, los parásitos fueron incubados en medio líquido RPMI modificado con un 20% SBF en ausencia de G418 durante una noche, tiempo suficiente para que las células que sobrevivieron al choque eléctrico pudieran recuperarse. Posteriormente las células fueron diluidas 1:10 en medio con 16 $\mu\text{g/ml}$ de G418, concentración que permitía la recuperación de las células transfectadas y evitaba la aparición de mutantes espontáneos resistentes al mismo.

Una vez que se consiguió obtener parásitos transfectados seleccionados con 16 $\mu\text{g/ml}$ de G418, los parásitos fueron transferidos a medio fresco y sometidos a sucesivos pases de medio con concentraciones crecientes de G418: 25, 100, 250, 500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$, siendo mantenidos en cada una de las concentraciones de fármaco al menos durante tres pases de cultivo antes de un nuevo incremento de la concentración de G418.

IV.8.3. Análisis molecular de las formas promastigotas transfectadas de *Leishmania tropica* .

IV.8.3.1 Localización de secuencias de los plásmidos de transfección en *Leishmania tropica*.

El análisis que se realizó a continuación tenía por objeto comprobar que los parásitos transfectados con las distintas construcciones y seleccionados con G418 no eran falsos transformantes y contenían las secuencias de los plásmidos electroporados.

Para ello se extrajo el ADN genómico de los parásitos transformados con pX-E 5' Δ , pKSN-E y los vectores pX y pKSNEOA seleccionados con 250 $\mu\text{g/ml}$ de G418. El ADN fue digerido con enzimas de restricción que tuviesen un solo sitio de corte dentro de cada uno de los plásmidos, de forma que éstos quedaran linearizados. Aproximadamente 1 μg del ADN genómico de los parásitos transfectados con pX y pX-E 5' Δ fue digerido con EcoRI, enzima del polilinker de pX que se mantiene en la construcción pX-E 5' Δ , mientras que ADN genómico de los parásitos transfectados con pKSNEOA y pKSN-E fue digerido con HindIII, enzima que tiene un sitio de corte en el polilinker del vector y con BglII que presenta un punto de corte único en la secuencia del gen *ltrpgpE*, respectivamente. Para poder determinar el número de copias de las construcciones que contenían secuencias del gen *ltrpgpE*, se utilizó como referencia la copia genómica del gen, por ello 1 μg del ADN

genómico de los parásitos sin transfectar fue digerido con las enzimas EcoRI, HindIII y BglII. Las distintas digestiones fueron desarrolladas en gel de agarosa y transferidas a membranas de nylon para ser hibridadas con una sonda específica pltrE.

La sonda pltrE reconoció en cada una de las digestiones del ADN de los parásitos no transfectados un fragmento, de tamaño variable en función de la enzima utilizada, que se correspondía con la copia genómica del gen ltrpgpE. En las digestiones de pX-E 5' Δ con EcoRI y pKSN-E con BglII, la sonda reconoció fragmentos de 11,3 kb y 13 kb, respectivamente. Estos tamaños eran acordes con los esperados para los plásmidos linearizados, que incluso podían ser observados como una banda más intensa en el gel teñido con el agente intercalante BrEt (Fig. IV.12).

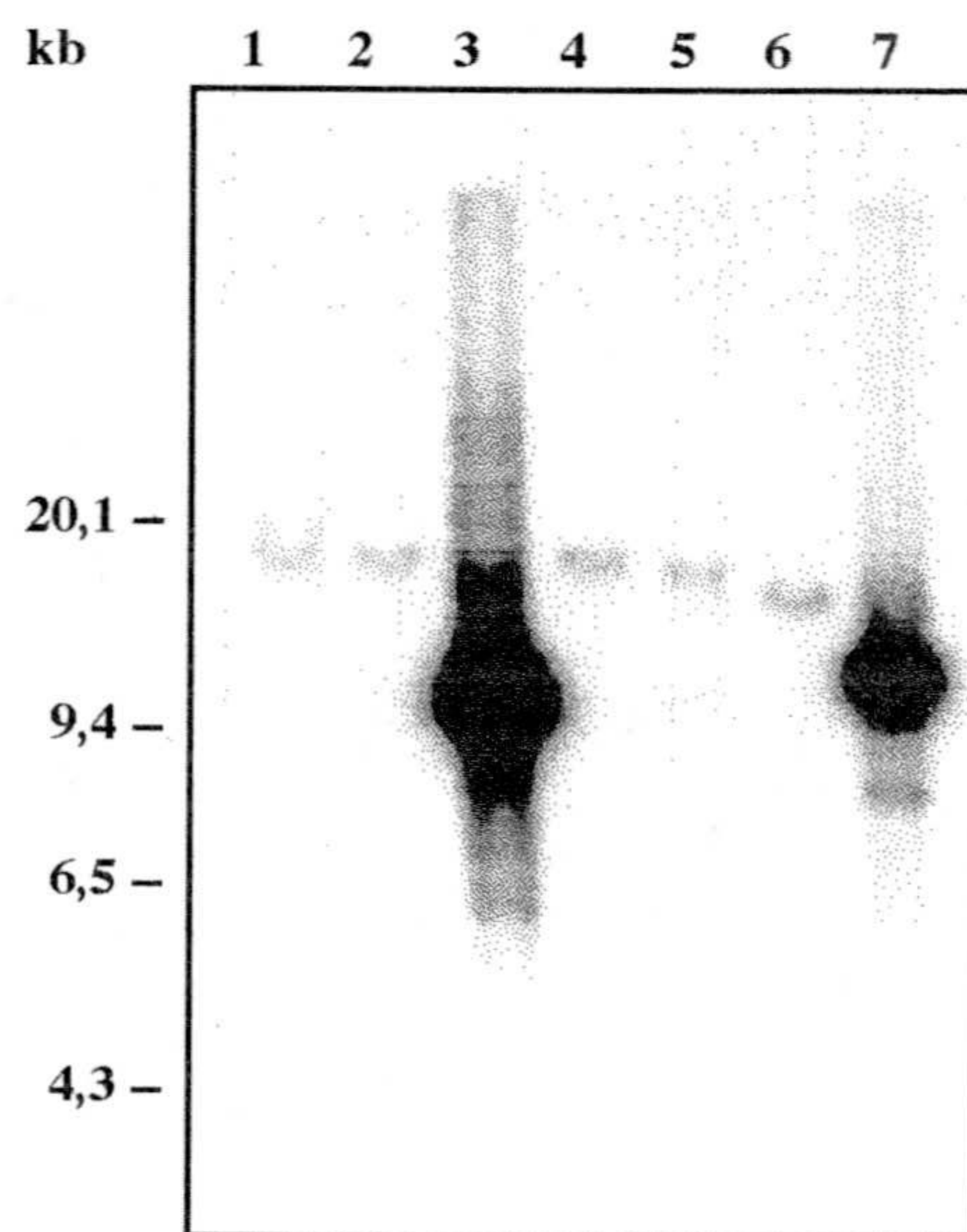


Figura IV.12. Análisis de restricción del ADN genómico de los parásitos trasfectados. Aproximadamente 1 μ g de ADN de parásitos transfectedados y parásitos silvestres fue digerido con las enzimas EcoRI, HindIII y BglII. El gel de agarosa fue transferido e hibridado con la sonda pltrE. **1, 4 y 6** ADN de los parásitos silvestres digerido con EcoRI, HindIII y BglII, respectivamente. **2 y 3** digestión con EcoRI del ADN de los parásitos transfectedados con pX y pX-E 5' Δ , respectivamente. **5** ADN de los parásitos transfectedados con pKSNEOA digerido con HindIII. **7** ADN de los parásitos transfectedados con pKSN-E digerido con BglII.

IV.8.4.2 Análisis cromosómico en los parásitos transfectados.

A pesar de que el análisis mediante "Southern blot" del ADN genómico de los parásitos transfectados indicaba que los plásmidos introducidos no habían sido integrados en el genoma del parásito, quisimos realizar un análisis a nivel cromosómico mediante CHEF electroforesis y reconfirmar la permanencia de los plásmidos transfectados como elementos extracromosomales en el parásito.

Para la realización del CHEF, los bloques de ADN de parásitos silvestre y transfectados con los plásmidos pX, pXE5' Δ , pKSNEOA y PKSN-E, fueron preparados según el procedimiento descrito en Material y Métodos, aumentando el número de parásitos utilizados a 360 millones de células por bloque. La electroforesis se realizó en geles de agarosa al 1,5% , bajo dos tipos de condiciones de pulso:

A. Los cromosomas fueron separados a 160V durante 48 horas sometidos a tres ciclos de pulsos de 100 s.,12 horas; 200 s., 24 horas; y 300 s.,12 horas . Bajo estas condiciones conseguimos separar al menos 17 cromosomas de *Leishmania*. El gel teñido con BrEt que aparece en la figura fue transferido a membrana de nylon e hibridado con la sonda pltrE, que como resultado de la hibridación reconoció en todos los carriles la copia cromosómica del gen ltrpgpE localizada en el cromosoma de 1500 kb. Además la sonda reconoció en los carriles que contenían los cromosomas de *Leishmanias* transfectadas con pXE5' Δ y pKSN-E, bandas adicionales que se corresponden con los plásmidos transfectados.

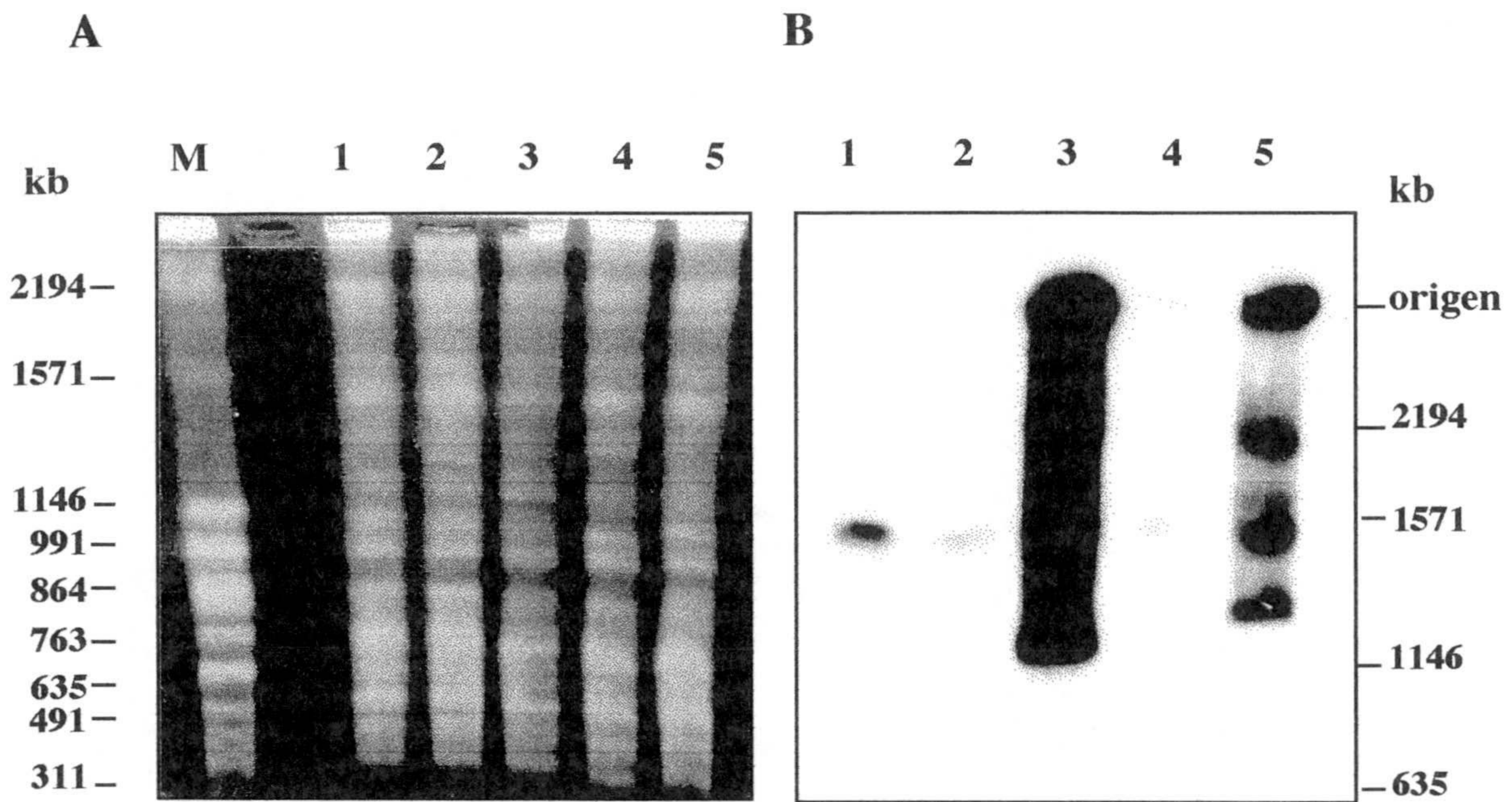


Figura IV.13. Análisis cromosómico de diferentes líneas de *L. tropica*. En el panel **A** se muestra un gel teñido con BrEt con los cromosomas de diferentes líneas transfectadas de *L. tropica*, separados bajo condiciones de pulso indicadas en el texto. En el panel **B** se muestra en mismo gel transferido a nylon e hibridado con la sonda pltrE. **M**, cromosomas de levadura; **1**, *L. tropica* silvestre; **2, 3, 4** y **5**, *L. tropica* transfectada con pX, pX-E5'Δ, pKSNEOA y pKSN-E, respectivamente.

B. Los cromosomas fueron sometidos durante 16 horas a pulsos de 100 s a 360V. Bajo estas condiciones los cromosomas lineales de *Leishmania* no se separan sino que quedan agrupados permitiendo establecer la presencia de elementos extracromosomales circulares, ya que estos no migran en función de su tamaño sino de forma independiente del tiempo de pulso. En la figura IV.14 aparece el gel teñido con BrEt y la transferencia del mismo a filtro de nylon hibridado con la sonda pltrE. En el gel teñido se observan en todos los carriles los cromosomas agrupados, observándose además los plásmidos introducidos en los parásitos transfectados, como elementos extracromosomales. En la autorradiografía la sonda pltrE reconoce en todos los carriles la copia cromosómica del gen localizada en el agrupamiento de cromosomas, además reconoce los plásmidos de los parásitos transfectados con pXE5'Δ y pKSN-E.

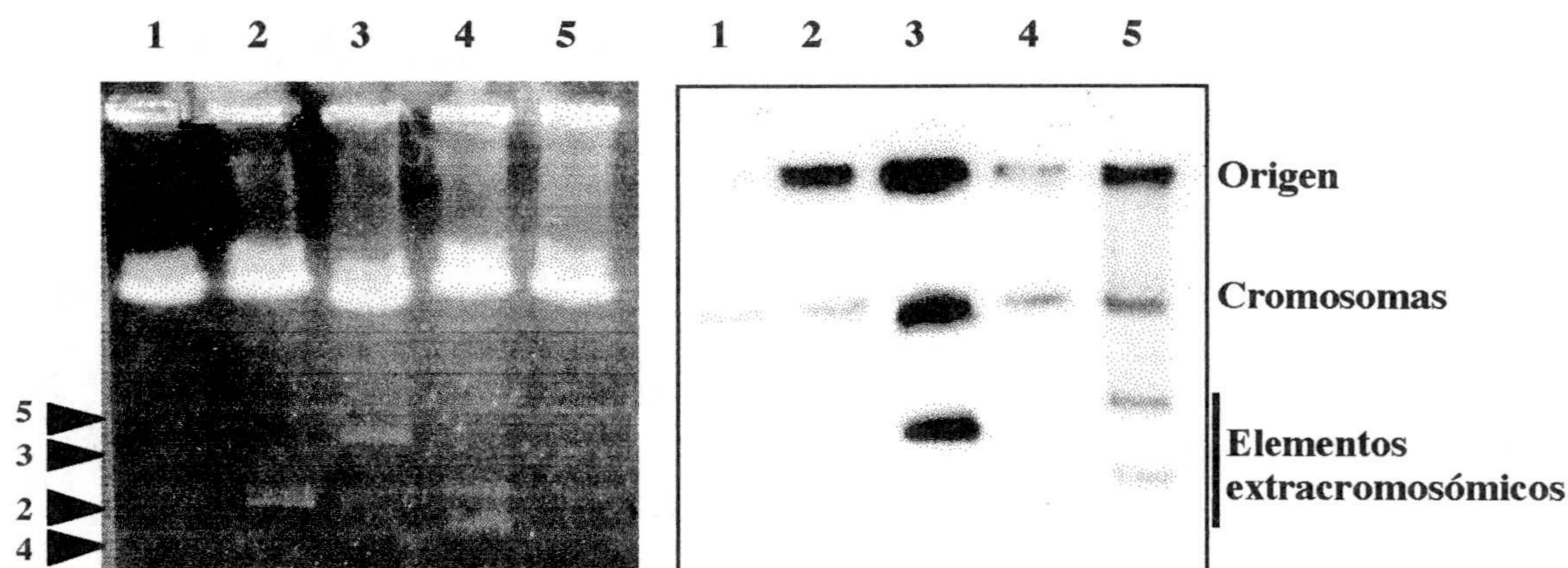


Figura IV.14. *Análisis cromosómico de diferentes líneas de L. tropica.* En el panel **A** se muestra un gel teñido con BrEt con los cromosomas de diferentes líneas transfectadas de *L. tropica*, separados bajo condiciones de pulso indicadas en el texto. En el panel **B** se muestra en mismo gel transferido a nylon e hibridado con la sonda pltrE. Los pocillos del gel aparecen marcada como origen junto a la autorradiografía. **1**, *L. tropica* silvestre; **2**, **3**, **4** y **5**, *L. tropica* transfectada con pX, pX-E5'Δ, pKSNEOA y pKSN-E, respectivamente

IV.8.4.3 Análisis de restricción del plásmido pKSN-E en los parásitos transfectados.

A fin de determinar que el plásmido pKSN-E no había sufrido ningún tipo de reordenamiento causado por la maquinaria molecular de los parásitos en que había sido introducido, la construcción se mapeó con enzimas de restricción que originasen fragmentos de tamaño conocido y permitiesen conocer el grado de integridad del plásmido. Para ello 1 μ g de ADN genómico de las leishmanias transfectadas con pKSN-E fue digerido con las enzimas EcoRI, HindIII, ApaI, BglII, y digestión doble con HindIII- EcoRI, BglII-ApaI. Paralelamente la misma cantidad de ADN de parásitos silvestres fue digerida con las mismas enzimas de restricción. El ADN digerido fue desarrollado electroforéticamente en gel de agarosa, transferido a nylon e hibridado con la sonda pltrE. En la figura IV.15 se muestra el plásmido pKSN-E linearizado con los tamaños esperados en las distintas digestiones y en la figura IV.17 se muestra el resultado de la hibridación con la sonda.

El número de copias en las que se encontraban los plásmidos pXEΔ5'y pKSN-E fue determinado en un biodensitómetro comparando las señales de hibridación correspondientes a cada uno de los plásmidos y la señal de hibridación de copia cromosómica del gen ltrpgpE. El número de copias de pKSN-E y pXE5'Δ, referidas a la copia cromosómica del gen, fue de 12 y 21 copias para cada uno de los plásmidos, respectivamente.

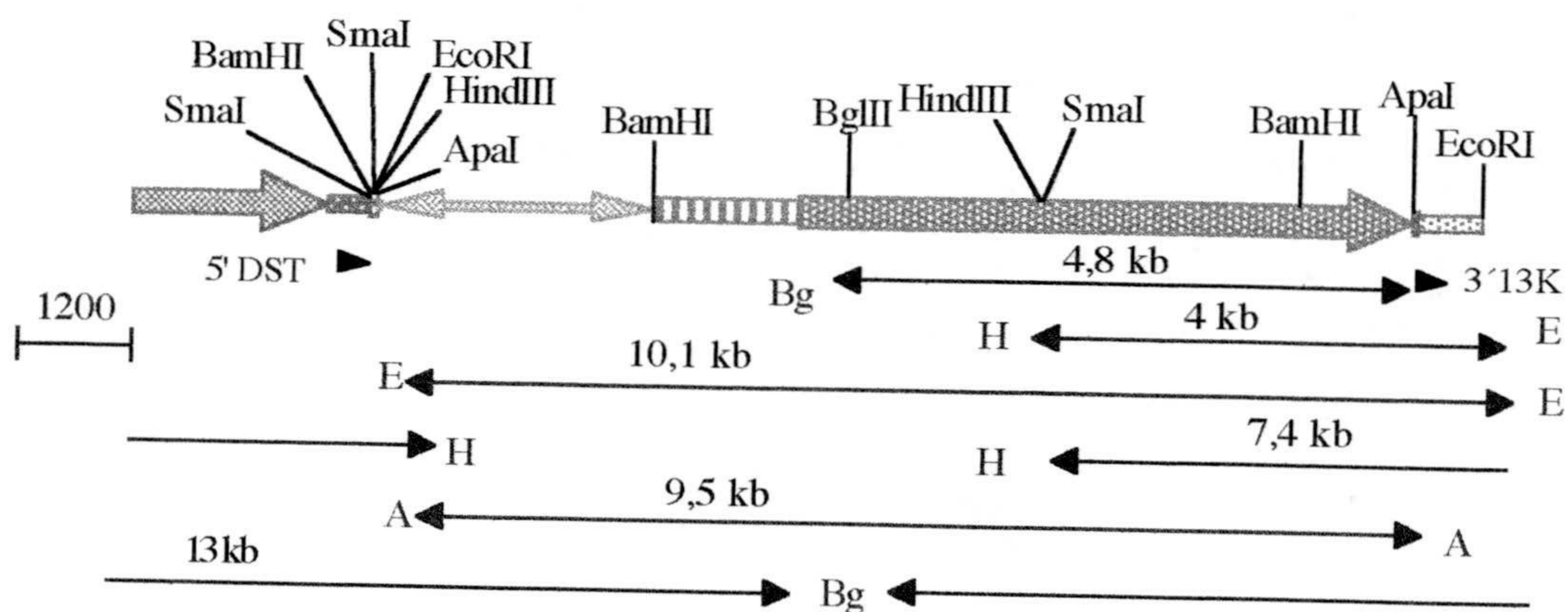


Figura IV.15. Mapa del plásmido pKSN-E linearizado. En la figura se representan los fragmentos resultado de las digestiones del plásmido pKSN-E con BglII, (**Bg**); ApaI, (**A**); HindIII, (**H**); EcoRI, (**E**); ApaI-BglII; HindII-EcoRI, que hibridaron con la sonda pltrE. La escala del mapa de restricción viene dada como nucleótidos por cm.

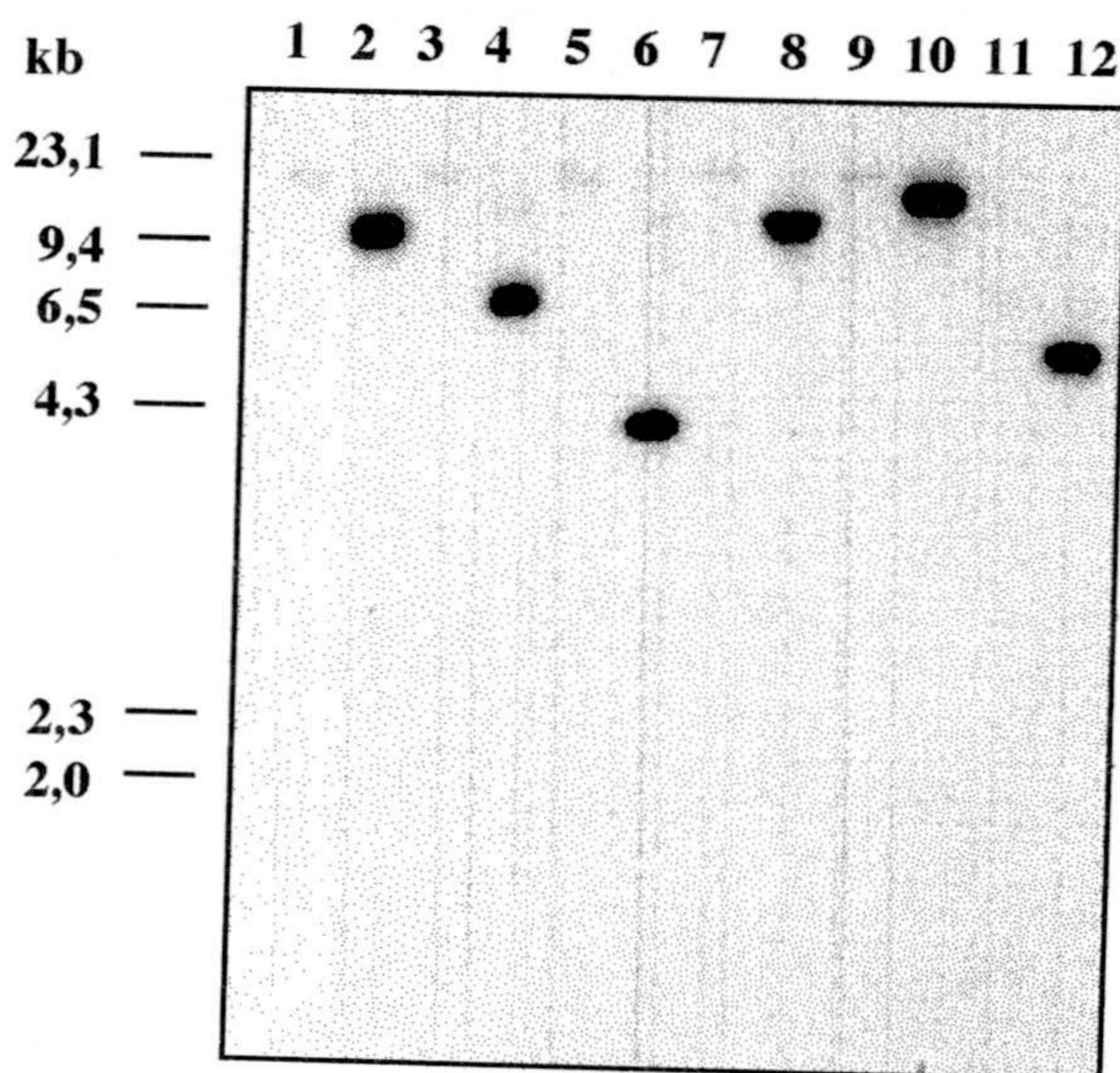


Figura. IV.16. Mapeo de la construcción pKSN-E en los parásitos transfectados. Aproximadamente 1 μ g de ADN genómico de *L. tropica* silvestre, carriles impares, y transfectada con el plásmido pKSN-E, carriles pares, fueron digeridos y separados electrofóticamente en un gel de agarosa al 0,8%. El gel fue transferido a nylon e hibridado con la sonda pltrE. EcoRI (1 y 2), HindIII (3 y 4), EcoRI-HindII (5 y 6), ApaI (7 y 8), BglII (9 y 10), BglII-ApaI (11 y 12).

IV.8.3.3. Análisis de la expresión de los plásmidos transfectados en *Leishmania*.

Una vez que se había comprobado que cada uno de los plásmidos que habían sido transfectados en *L. tropica* se encontraban en forma de elementos extracromosomales y que el plásmido que contenía el gen *ltrpgpE* completo no había sido modificado por los parásitos, llevamos a cabo el análisis de la expresión tanto del gen *ltrpgpE* como de cada uno de los plásmidos transfectados.

Para ello se extrajo el ARN total de los parásitos transfectados con pX, pXE5' Δ , pKSNEOA y pKSN-E, así como el ARN total de los parásitos silvestres. Aproximadamente 10 μ g de ARN total fue desarrollado electroforéticamente en gel desnaturizante de agarosa con formamida, transferido a membrana de nylon, según se describe en Material y Métodos, e hibridado con la sonda *pltrE*. Como muestra la autorradiografía que aparece en la figura IV.17, y como previamente ha sido descrito (Gamarro y col., 1994), no se observó expresión constitutiva del gen en los parásitos salvajes, tampoco se observó expresión en los parásitos transfectados con la construcción que tiene el gen deleccionado en 5'. La sonda tan solo reconoció, en los parásitos transfectados con pKSN-E, un transcrito de aproximadamente 6 kb que es el tamaño esperado para el gen *ltrpgpE* y que previamente ha sido descrito en *L. tropica* resistente a MTX (Gamarro y col., 1994).

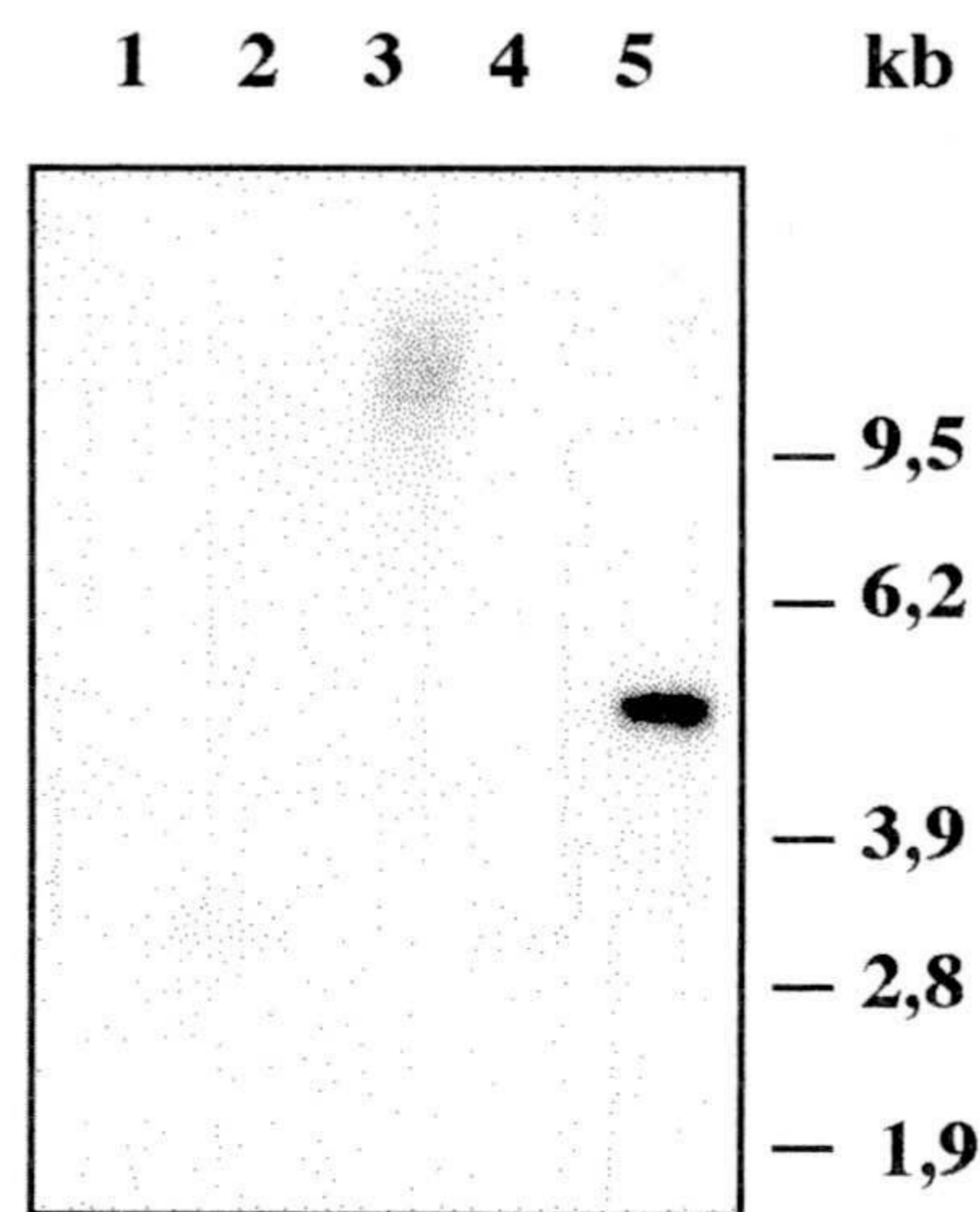


Figura IV.17 Análisis de la expresión del gen *ltrpgpE* en *Leishmanias* transfectadas. Aproximadamente 10 μ g de ARN total de parásitos silvestres *L.tropica* LRC-L39, clon 1 (carril 1) y de los parásitos transfectados con pX (carril 2), pXE 5' Δ (carril 3), pKSNEOAA (carril 4), y pKSN-E (carril 5), fueron separados electroforéticamente en gel de agarosa al 1% en

presencia de formamida. El ARN fue transferido a nylon e hibridado con la sonda específica para el gen *ltpgpE*.

Para el análisis de los transcritos resultantes de la expresión del híbrido NEO/DHFR en las distintas construcciones se realizó una nueva electroforesis con 10 μ g de ARN total de los parásitos transfectados, cuyo desarrollo electroforético fue menor al del gel anterior (Fig. IV.17), a fin de evitar la pérdida de los transcritos NEO/DHFR con un tamaño esperado próximo a 2,4 kb. Tras la transferencia del ARN a nylon, el filtro fue hibridado con la sonda específica para el gen *neo*. La obtención de esta sonda se realizó mediante digestión del vector pX con la enzima SphI que liberó un fragmento de aproximadamente 900 pb, correspondiente a la secuencia codificante del gen de la neomicina fosfotransferasa.

En la figura IV.18 se muestra el resultado de la hibridación, en la que la sonda reconoció los transcritos procedentes de cada uno de los plásmidos de los parásitos transfectados, no reconociendo expresión del gen *neo* en los parásitos control, *L. tropica* silvestre. En todos los carriles que contienen ARN de células transfectadas, la sonda reconoce un transcrito de aproximadamente 2,4 kb que es el tamaño esperado para el híbrido NEO/DHFR y coincide con el descrito para pX por LeBowitz. En los carriles con ARN total de parásitos transfectados con pX se observan además transcritos de 3,4 kb, 6,6 kb y transcritos de más de 9 kb. En el carril con ARN total de parásitos transfectados con pXE5' Δ , la sonda detecta una menor cantidad del transcrito de 2,3 kb que en el resto de los transfectantes, reconociendo de forma más intensa dos transcritos de más de 9 kb. En el carril que contiene ARN de parásitos transformados con pKSNEOA, además del transcrito de 2,3 kb, aparece debilmente un transcrito de 6,2 kb, mientras que en el carril que contiene ARN de parásitos transformados con pKSN-E no se observa ningún transcrito adicional al del híbrido NEO/DHFR.

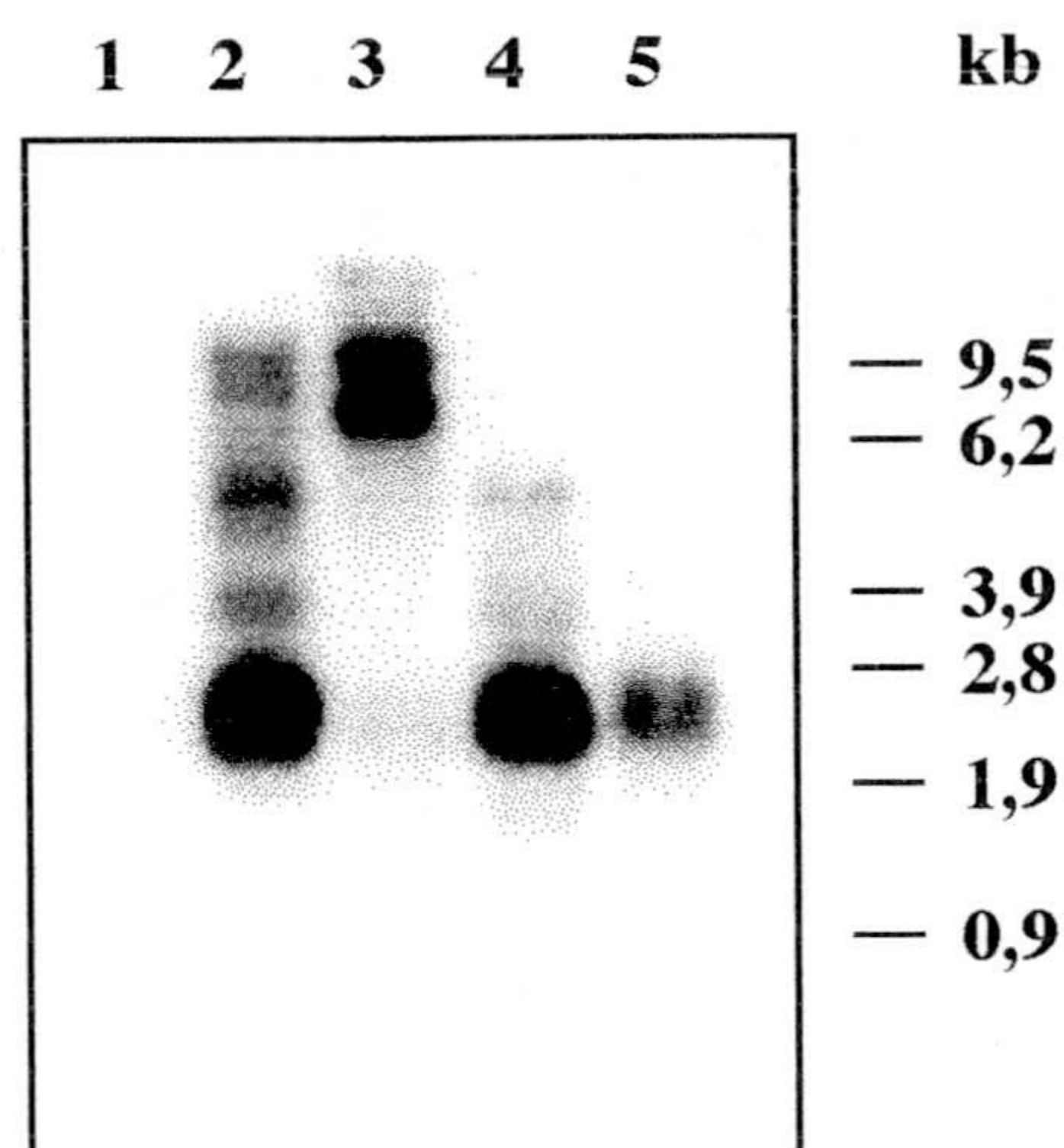


Figura IV.18. *Análisis de la expresión del híbrido NEO/DHFR en los parásitos transfectados.* Aproximadamente 10 μ g de ARN total de parásitos silvestres *L. tropica* LRC-L39, clon 1 (carril 1) y de los parásitos transfectados con pX (carril 2), pXE 5' Δ (carril 3), pKSNEOA (carril 4), y pKSN-E (carril 5), fueron separados electroforéticamente en gel de agarosa al 1% en presencia de formamida. El ARN fue transferido a nylon e hibridado con la sonda neo cuya procedencia se indica en el texto.

IV.9. LOCALIZACIÓN DEL ACEPTOR DEL MINIEXON DEL GEN

ltrpgpE.

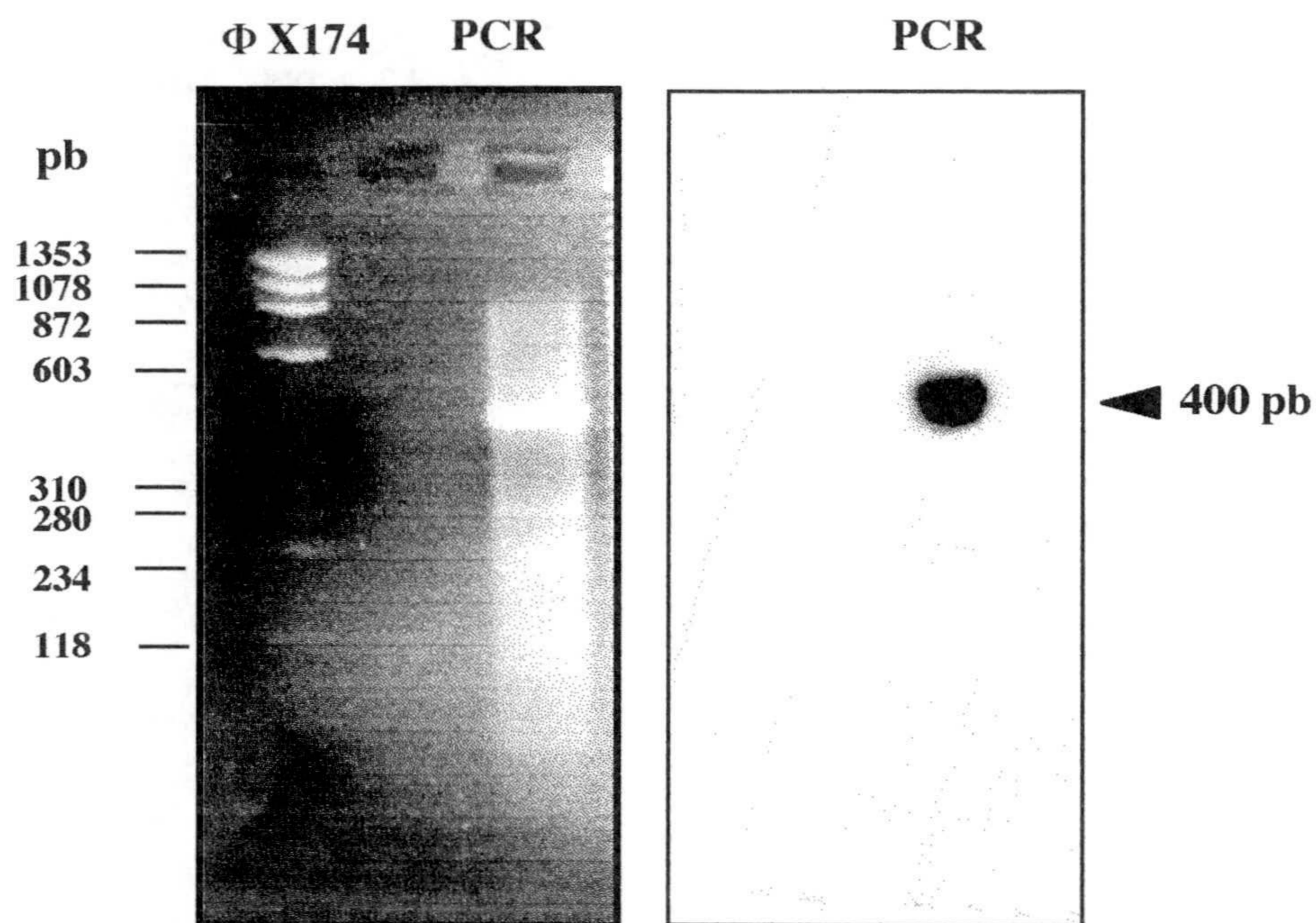
Como se dijo anteriormente el gen *ltrpgpE* no se expresa constitutivamente, al menos a los niveles detectables por "northern blot" a partir de la fracción poliadenilada del ARN. Los experimentos de transfección llevados a cabo permitieron obtener altos niveles de expresión del gen *ltrpgpE* en parásitos transfectados, hecho que no solo nos permitió llevar a cabo estudios de tipo funcional de la proteína codificada por el gen, sino que también nos permitió completar la caracterización molecular del mismo, determinando el sitio aceptor del miniexón.

Para localizar el sitio al cual se une el mini-exón durante la maduración del mensajero seguimos la técnica de RT-PCR. En primer lugar se obtuvo un ADNc de la región 5' del gen *ltrpgpE* usando como molde el ARN total de los parásitos transfectados con la construcción pKSN-E. La reacción se llevó a cabo en las condiciones descritas en materiales y métodos usando como transcriptasa reversa, la retrotranscriptasa AMV y un oligonucleótido antisentido interno a la secuencia del gen *ltrpgpE* como cebador, el oligonucleótido ON6E que fue utilizado previamente en la secuenciación del gen.

A continuación se llevó a cabo la amplificación del cDNA obtenido mediante una PCR, usando como cebadores el mismo oligonucleotido antisentido ON6E y el oligonucleótido mLei que contiene parte de la secuencia del miniexón de *Leishmania*. El resultado de la PCR fue separado mediante electroforesis en geles de agarosa al 3%, observándose la existencia de fragmentos con tamaños entorno a las 600 y 100 pb. El ADN fue transferido a nylon e hibridado con el fragmento BglII-BamHI de 2,2 kb procedente del plásmido pE-2,2 que contiene el extremo 5' del gen *ltrpgpE* (Figura IV.3 Tabla I), marcado radiactivamente. La sonda reconoció de todos los fragmentos tan solo uno de aproximadamente 400 pb.

Para eliminar los productos inespecíficos de PCR se realizó una reamplificación del ADN de la PCR utilizando esta vez como cebador antisentido el oligonucleotido AspE que aparee con una secuencia interna del gen *ltrpgpE*, localizada cadena arriba del oligonucleotido antisentido ON6E y por tanto más cercana al codon de iniciación y el mini-exón. Aunque mediante reamplificación de la PCR no se consiguió eliminar totalmente las amplificaciones inespecífica, si se consiguió amplificar una banda más intensa de 400 pb que fue reconocida por la sonda anteriormente usada (Fig. IV.19). En cada uno de los pasos de amplificación de ADN por PCR se utilizó como control negativo reacciones llevadas a cabo en identicas condiciones pero sin ADN molde.

Esta banda fué aislada y ligada al vector linearizado pGEM-T, que facilita el clonaje de productos de PCR. Este vector se caracteriza por llevar una timidina libre en cada uno de sus extremos que aparee con la adenina libre añadida por la Taq polimerasa a los extremos 5' y 3' de las moléculas de ADN amplificadas por PCR. El resultado del ligamiento fue transformado en células XL1-Blue, obteniendo distintos clones. Uno de los clones fue aislado y secuenciado, localizando en él tanto la secuencia del mini-exón de *Leishmania* como la secuencia 5' del gen *ltrpgpE*. Comparando esta secuencia con la secuencia 5' no codificante del gen *ltrpgpE*, obtenida a partir de ADN genómico, localizamos el dinucleótido AG aceptor del mini-exón situado a una distancia de 302 pb del ATG. La secuencia 5' no codificante del gen *ltrpgpE* así como la localización del aceptor del mini-exón aparecen en la figura IV.20



B

```

-873 TGCCGGCACCTGCGAGATGCTCGTTGTGGGGTGCGGTTGAGCTAAGCTCCCGG
-820 CCGGCCCGCTCTTTGATGACCCAGATTGGCCGGTGCCCCCTGCGTTGTTCTC
-767 CTCGCCTCCGGTTGCCTGCTGTGTGACTCCGCCTCGCATCGTGGGTTCTGCTT
-714 CCTGCTTGGCCCTTGGTGTCCAAAACGTCTGGGTTCCCCCACCTTGTTTCAAG
-661 CTGTTGTAAGCAACGTCACCCCCCTCCCCAATCTTGTTTCGCCCTCCTCCCG
-608 CTTGCTTTCTTCTTGCAGGTGGGGGGGTTGCACCCTACCCAGGACGTATTTCG
-555 GACTTTGTGTCGGCGCGGGCGGTTGACAAGAACCCCGTCCTTTCCCCTCCGCC
-502 ATCATTGTGCCTGCGGGCGGTTCTCAGGTTAGCCCGTAACGCATCCCTTCAGCA
-449 TCCTGGGCGTGCTCTCCGCCCTTTTGTGTTGTTGTTGATAGACTGTGCGCCGTT
-396 TGCTCTGTTTCTGAGGCCGCTGTTGCGTGACCTATAACTCACTCACTCGCTA
-343 TATACCCATATCTATATATATCTATATATATATATATATATATATATATATAG
-290 GCACATGTATAACTGTACGTATACCGATATATATATATATATATATATATATATG
-237 CTCATCTATATAAACGTATTTGGCAGACCTATCCGAGCTCTACACGCGCACAA
-184 ACGTGCAGCCACACGCGGGTGGGACTGCTCGGCGATCCACTCCGCTAAGAGCC
-131 ACTCAAGCAGTCTATACTGGCGGCGAACGTTTGTAGCGTCCGCTCTTCGTCAT
-78 TTCTTGCACTCGCTGCTCGACAATTTGCCTTGGCGCTGCCCATAGGAGCAACA
-25 CCTTGTCCCTGTTCTACTTCGGCGCATG
      1 Met
    
```

Figura IV.20. Amplificación del extremo 5' del transcrito de *ltrpgpE*.

Panel A: Gel teñido con bromuro de etidio y "Southern blot" del gel de PCR hibridado con la sonda que hibrida con el extremo 5' del gen *ltrpgpE*, ver texto. (1) Marcador DE ADN Φ X174. (2) Control negativo de la reacción de PCR. (3) Reacción de PCR a partir de ADN obtenido por retrotranscripción.

Panel B: Secuencia de la región 3' no codificante del gen. Se han representado el aceptor del mini-exón y la metionimna de iniciación

IV.10. OBTENCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES DIRIGIDOS FRENTE AL PRODUCTO DEL GEN LTRPGPE.

Una vez que se comprobó que la expresión del gen *ltrpgpE* a nivel de ARN mensajero tenía lugar en los parásitos tranfectados pKSN-E, nos propusimos localizar en estos parásitos la expresión de la proteína producto del gen, a la que llamamos *pgpE*. Para ello obtuvimos anticuerpos policlonales dirigidos frente a la región "linker" o péptido de unión de la *pgpE*, que se caracteriza por ser una región poco conservada dentro de la familia de glicoproteínas-P, por consiguiente bastante específica, y que según predicciones estructurales es una región de carácter hidrofílico localizada en la cara citoplasmática de la membrana.

La estrategia seguida para la obtención de anticuerpos policlonales fue en primer lugar la expresión de la región "linker" de la *pgpE* en bacterias. Como sistema de expresión se utilizó el vector pGEX-2T que permite la expresión en *E. coli* de polipéptidos como proteínas de fusión con la glutatión-S-transferasa (GST). La expresión de la proteína de fusión esta bajo la regulación del promotor Tac, por lo que puede ser inducida mediante IPTG, y su purificación puede ser realizada en un solo paso por cromatografía de afinidad en columna de Sephadex 4B conjugada a glutatión reducido (GSH). El sistema de expresión presenta además la posibilidad de eliminar la GST de la proteína de fusión y la purificación del polipéptido de interés, ya que existe un sitio de corte para trombina próximo al polilinker del vector entre la GST y el sitio de clonaje del inserto de ADN que codifica el polipéptido a expresar.

IV.10.1. Amplificación del fragmento de ADN que codifica para el péptido de unión.

Se diseñaron dos oligonucleótidos que alineaban con secuencias que flanquean la región "linker" de la *pgpE* de *L. tropica*. La secuencia de la región amplificada que aparece en la figura IV.21, se localiza entre el primer dominio de unión a ATP y el séptimo dominio transmembrana de la proteína, y se caracteriza por su predominio en aminoácidos cargados y su alto grado de hidrofilia, característica que favorece la solubilidad de la proteína de fusión con la GST.

IV.10.2. Análisis de la expresión de la proteína de fusión.

La expresión de la proteína de fusión fue analizada en los diferentes clones aislados mediante inducción con 100 μM de IPTG. En todos ellos se observó buenos niveles de expresión de una proteína, ausente en los clones no seleccionados con IPTG, con un tamaño de aproximadamente 37 kDa, tamaño esperado para la proteína de fusión GST (27 kDa)-péptido de unión de la pgpE (10 kDa). Seleccionamos uno de los clones, el clon RL6, y lo indujimos a concentraciones crecientes de IPTG durante dos horas, para determinar la concentración de IPTG que proporcionaba mayor rendimiento en la expresión de la proteína de fusión. Los niveles de expresión más altos se alcanzaban a concentraciones de IPTG 50 μM y se mantenían a 75, 100 y 200 μM (figura IV.22)

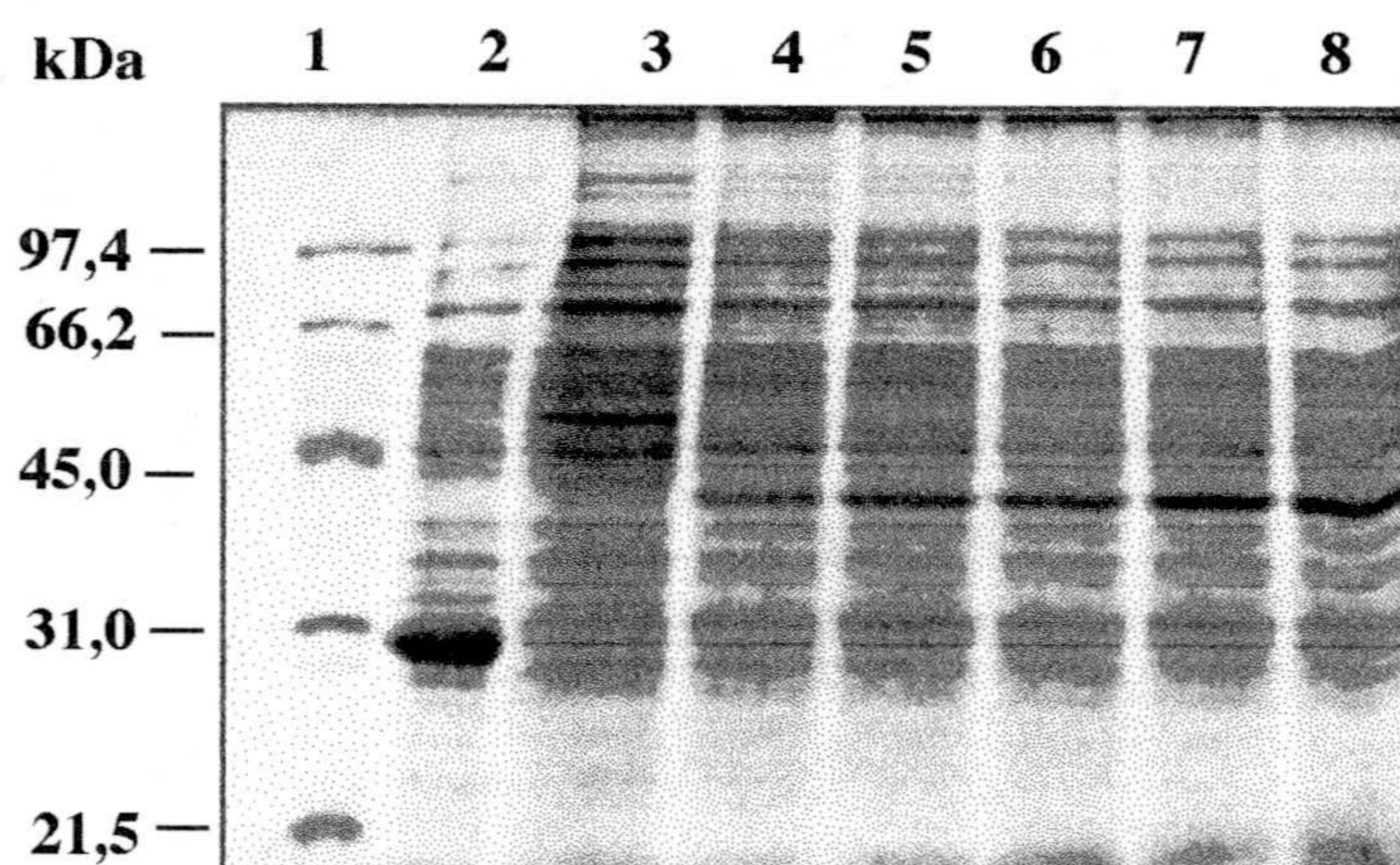


Figura IV.22. *Inducción de la expresión de la proteína de fusión con diferentes concentraciones de IPTG.* Aproximadamente 40 μg de proteína total de bacterias fueron separadas por SDS-PAGE en un gel al 12,5% y teñidas con Comassie Blue. Carril 1 marcadores de bajo peso molecular. Carril 2, bacterias que expresan GST inducida con 100 mM de IPTG. Expresión de la proteína de fusión inducida en el clon RL6 con diferentes concentraciones de IPTG: 0 μM , 25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM , 200 μM . Carriles 3, 4, 5, 6, 7 y 8, respectivamente.

IV.10.3. Purificación de la proteína de fusión.

Una vez optimizadas las condiciones de cultivo e inducción de la expresión de la proteína de fusión, se procedió a su purificación a gran escala. Para ello se partió de un volumen de 4 litros de LB que fue inducido con 50 μM de IPTG, durante 2 horas a 37 °C. Las células fueron lisadas en PBS-Triton X100 y sonicadas según se describe en Material y Métodos. La purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad, pasando la fracción

soluble del lisado bacteriano a través de columnas Sepharosa con GSH conjugado. La proteína de fusión fue eluida de la columna de GSH tratando con GSH libre en exceso, que compite por el sitio de unión a la GST con el GSH conjugado a columna. Se obtuvieron aproximadamente 3,2 mg de la proteína de fusión por litro de cultivo bacteriano que fue visualizada en un gel desnaturalizante de poliacrilamida como una banda de 37 kDa (Figura IV.23).

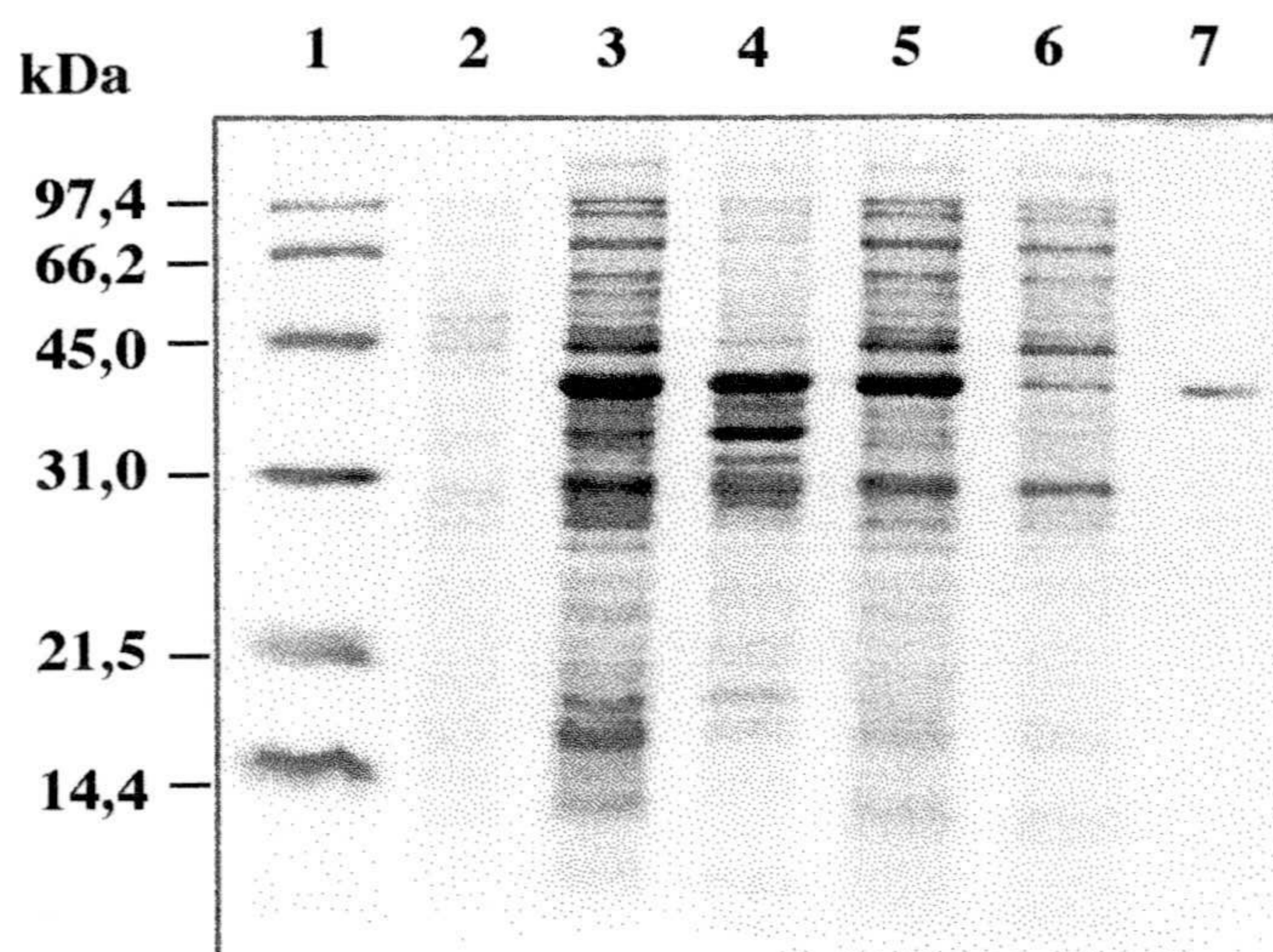


Figura IV.23. Purificación de la proteína de fusión. Alicuotas de proteína tomadas de diferentes pasos de purificación de la proteína de fusión fueron separados en gel al 12,5% SDS-PAGE. En el carril 1 marcadores de proteína cuyo peso molecular viene indicado en kDa. Carriles 2 y 3: Proteínas totales de bacterias no inducidas con IPTG e inducidas con IPTG. Carriles 4 y 5: Fracción insoluble y soluble, respectivamente, de bacterias que expresan la proteína de fusión. Carril 6: Eluido de la columna Sepharosa -GSH. Carril 7: Proteína de fusión purificada.

IV.10.4. Obtención de sueros inmunes de conejo.

Para obtener anticuerpos policlonales dirigidos frente a la proteína pgpE, inmunizamos con la proteína de fusión un conejo de la cepa New Zeland White. La inmunización fue realizada como se indica en el apartado Métodos, mediante tres inmunizaciones con 400 μg de la proteína con intervalos de tiempo entre ellas de dos semanas. Previa a la inmunización se extrajo suero del conejo que fue utilizado como control en las pruebas de titulación.

Las pruebas de titulación fueron realizadas una semana después de la última inmunización usando la técnica de ELISA, en la que se incubó suero preinmune y suero inmune a diferentes diluciones con 1 μg /pocillo de proteína de fusión. Los resultados

obtenidos, comparados con el suero preinmune, mostraron valores positivos en el suero inmune hasta una dilución 1/20.000.

IV.10.5. Purificación de anticuerpos policlonales de conejo.

La purificación de los anticuerpos del suero inmune de conejo se realizó en 3 pasos de cromatografía. En primer lugar se concentraron las inmunoglobulinas del suero inmune por cromatografía de afinidad utilizando una columna de Sepharosa CL-4 conjugada la proteína A de *Stafilococcus aureus*, que une inmunoglobulinas de mamíferos debido a su afinidad por la fracción variable o Fc. Tras sucesivos pases a través de esta columna, las inmunoglobulinas fueron eluidas a pH ácido según se describe en Métodos.

Dado que el conejo había sido inmunizado con la proteína de fusión completa, era previsible que en el suero inmune hubiera una alta proporción de anticuerpos dirigidos contra GST. Para eliminar los anticuerpos anti-GST se realizó un segundo paso de purificación por cromatografía de afinidad negativa. Para ello los anticuerpos eluidos de la columna de Sepharosa CL-4 ligada a proteína A, fueron pasados a través de una columna de un extracto crudo de bacterias que expresan GST. Tras varios pases por la columna los anticuerpos dirigidos frente a GST quedarían unidos por afinidad a la columna, mientras que los dirigidos frente a la pgpE pasarían a través de la columna junto a otros anticuerpos del suero quedando en el eluido.

Finalmente en un tercer paso de purificación, el eluido de la columna de Sepharosa 4B acoplada al lisado de bacterias que expresan GST, fue pasado a través de una columna de afinidad de CNBr-Sepharosa 4B conjugada a la proteína de fusión. Mediante este paso, todos aquellos anticuerpos generados frente a la pgpE quedarían retenidos por afinidad en la columna quedando en el eluido el resto de anticuerpos no específicos. Para eluir los anticuerpos ligados a la columna, se utilizó glicina 0,1 M a pH 3. Los anticuerpos eluidos fueron neutralizados con Tris-ClH a pH 9 para evitar su desnaturalización a pH ácido.

IV.11. ANALISIS FUNCIONAL DE pgpE.

Como anteriormente se dijo en el apartado Introducción, las glicoproteínas-P descritas hasta la fecha han sido relacionadas con dos posibles funciones : por un lado están implicadas en la resistencia a fármacos descrita tanto en células tumorales como en parásitos, por otro se ha atribuido un segundo papel funcional en relación con el mantenimiento de la

homeostasis del medio intracelular tanto a nivel de regulación del volumen celular como del pH intracelular.

Nosotros iniciamos el análisis funcional de la proteína pgpE estudiando en primer lugar su posible implicación en resistencia a fármacos y en segundo lugar quisimos realizar un acercamiento al estudio de un posible papel regulador del gen en la homeostasis del medio intracelular.

IV.11.1. Estudios de resistencia a fármacos en *Leishmania tropica* transfectada con el gen *ltrpgpE*.

Para llevar a cabo los estudios de resistencia a fármacos en *Leishmania tropica* transfectada con el gen *ltrpgpE*, seleccionamos una serie de compuestos de diversa naturaleza que cubrían un amplio espectro de acción desde fármacos antineoplásicos hasta metales pesados. Entre estas sustancias se encontraron:

- Fármacos antineoplásicos como el **Metotrexato** que había sido utilizado para la obtención de la línea *L.tropica* LRC-L39 resistente a 1mM de MTX, a partir de la cual se construyó la genoteca de ADN genómico utilizada en el aislamiento del gen *ltrpgpE*.

- Leishmanicidas o fármacos empleados en la quimioterapia de Leishmaniosis, como el **Glucantime®**.

- Fármacos hidrofóbicos tales como **puromicina** y **doxorubicina**, inductores del fenotipo de multirresistencia a fármacos descrito en parásitos y células tumorales, y típicos sustratos de genes MDR.

- Arsenicales y Antimoniales tales como **arsenito**, **arsenato**, **antimonio trivalente** y **antimonio pentavalente** a los cuales confieren resistencia tanto el gen *ltrpgpA* de *L.tarentolae* como el gen *lmpgpA* de *L.major*.

- Metales pesados tales como **Zinc**, **Cadmio**, **Cobre** al los que confiere resistencia el gen YCF1, un gen de la superfamilia ABC, descrito en *S. cerevisiae*.

El análisis de resistencia se realizó mediante determinación de la dosis inhibitoria 50 de crecimiento (DI₅₀) que se define como aquella concentración del compuesto que hace

disminuir el número de células en un 50% cuando el cultivo control libre del compuesto se encuentra en fase logarítmica de crecimiento.

La determinación de la DI_{50} se llevo a cabo sobre los parásitos transfectados con el plásmido pKSN-E frente a distintas concentraciones de cada una de las sustancias que se han mencionado anteriormente. Para poder determinar si el comportamiento del parásito transfectado frente a las distintas sustancias es debido a la expresión del gen *ltrpgpE* y no a ningún otro factor relacionado con el vector de transfección, se llevó a cabo de forma paralela el estudio de la DI_{50} de los parásitos transfectados solo con el vector pKSNEOA.

Hay que destacar que los parásitos transfectados con el gen *ltrpgpE* alcanzan la fase estacionaria con un menor número de células/ml que los parásitos silvestres y transfectados con el vector. Fue fundamental en todos los casos que las células estuvieran muy activas y en fase logarítmica de crecimiento para que los resultados fueran repetitivos. El valor de DI_{50} fue determinado como media de 3 experimentos independientes.

Para evitar que las concentraciones de cada uno de las sustancias ensayadas frente a los parásitos transfectados no fuesen altamente letales causando la muerte rápida de los parásitos, se calculó la DI_{50} de cada una de ellas frente a los parásitos silvestres. Este valor nos sirvió como referencia, de forma que las concentraciones de partida de cada fármaco fuesen siempre menores a la DI_{50} .

En la Tabla IV. 4 se representan las DI_{50} de los parásitos transfectados con el gen *ltrpgpE* y los parásitos transfectados con el vector pKSNEOA, frente a cada uno de las sustancias ensayadas, así como el índice relativo de resistencia (IR).

Dosis Inhibitoria 50				
Sustancias	pKSNE OA	pKSN- E	IR	
MTX	16,7 ± 1,4	21,1 ± 2,1	1,26	
GLU	600 ± 52	712 ± 60	1,19	
DOX	14,1 ± 1,2	12,0 ± 1,1	0,9	
PUR	13,8 ± 2	12,7 ± 1,2	0,92	
Arsenito III	14,5 ± 1,4	16,2 ± 1,8	1,1	
Arsenato Sódico V	39,3 ± 2,6*	44,3 ± 6,6*	1,1	
Tartrato de antimonio (III)	27,7 ± 2,6	24,7 ± 3,7	0,9	
SbCl ₅	90 ± 13,5	75 ± 11,2	0,8	
CdCl ₂	62 ± 9,4*	54,5 ± 8,1*	0,87	
CuCl ₂	44 ± 6,6*	70 ± 10,5*	1,59	
ZnCl ₂	1011 ± 115*	1200 ± 180*	1,18	

Tabla IV.4. Resistencia a diferentes sustancias en parásitos tranfectados con pKSNEOA y pKSN-E. En la tabla se indica la Dosis Inhibitoria 50 (IC₅₀) y el Índice de Resistencia (IR) de cada una de las líneas de parásitos tranfectados frente a las diferentes sustancias. Las concentraciones de los fármacos son expresadas en mM salvo los marcados con (*) que están expresados en µg/ml.

IV.12 ANALISIS DE LA RESPUESTA REGULADORA DEL VOLUMEN INTRACELULAR FRENTE A CHOQUE HIPOTONICO EN DIFERENTES LINEAS DE *L. tropica*.

Se ha atribuido a las glicoproteínas-P un papel regulador de canales iónicos que interviene en la regulación del volumen intracelular tras un choque hipotónico. En *Leishmania* ha sido descrito recientemente la existencia de un canal aniónico activado por volumen que es el principal responsable de la respuesta RVD ("Regulatory Volume

Decrease") en estos parásitos. Este canal llamado HAAC (Hypotonic activated Amino Acid Channel") lleva a cabo la liberación de aminoácidos negativos y neutros que son usados como osmolitos en la regulación del volumen celular.

Para determinar si los parásitos transfectados con el gen *ltrpgpE* que expresan la glicoproteína-P *pgpE*, llevan a cabo un papel regulador sobre estos canales, las líneas de parásitos transfectados *pKSN-E* y *pKSNEOA*, así como *L. tropica* LRC-L39 silvestre fueron expuestos a choque hipotónico con diferentes osmolaridades del medio.

En primer lugar se comprobó que *L. tropica* tenía un comportamiento similar al descrito en *L. major* por Vieira y col., 1996. Siguiendo el protocolo descrito en Material y Métodos apartado II.2.28.1, aproximadamente 1×10^8 parásitos/ml de *L. tropica* silvestre fueron expuestos durante tiempos que oscilaron desde los 5 segundos a los 10 minutos a medio Iso-Cl (300 mOsm) y al mismo medio con una osmolaridad 150 mOsm. Se determinó la concentración de aminoácidos que los parásitos liberaron al medio por el método de la fluorescamina, así como la concentración de aminoácidos que permanecen en el "pull" intracelular. La concentración de aminoácidos se expresó en nmol/mg de proteína de los parásitos usados en el experimento.

Durante el experimento se comprobó mediante observación al microscopio que los parásitos aumentaban de volumen redondeándose cuando eran expuestos al medio hipotónico y que recuperaban su forma y volumen aproximadamente a los 15-20 minutos, tras la exposición. En el curso de los experimentos se mantuvo la viabilidad celular en un 90% .

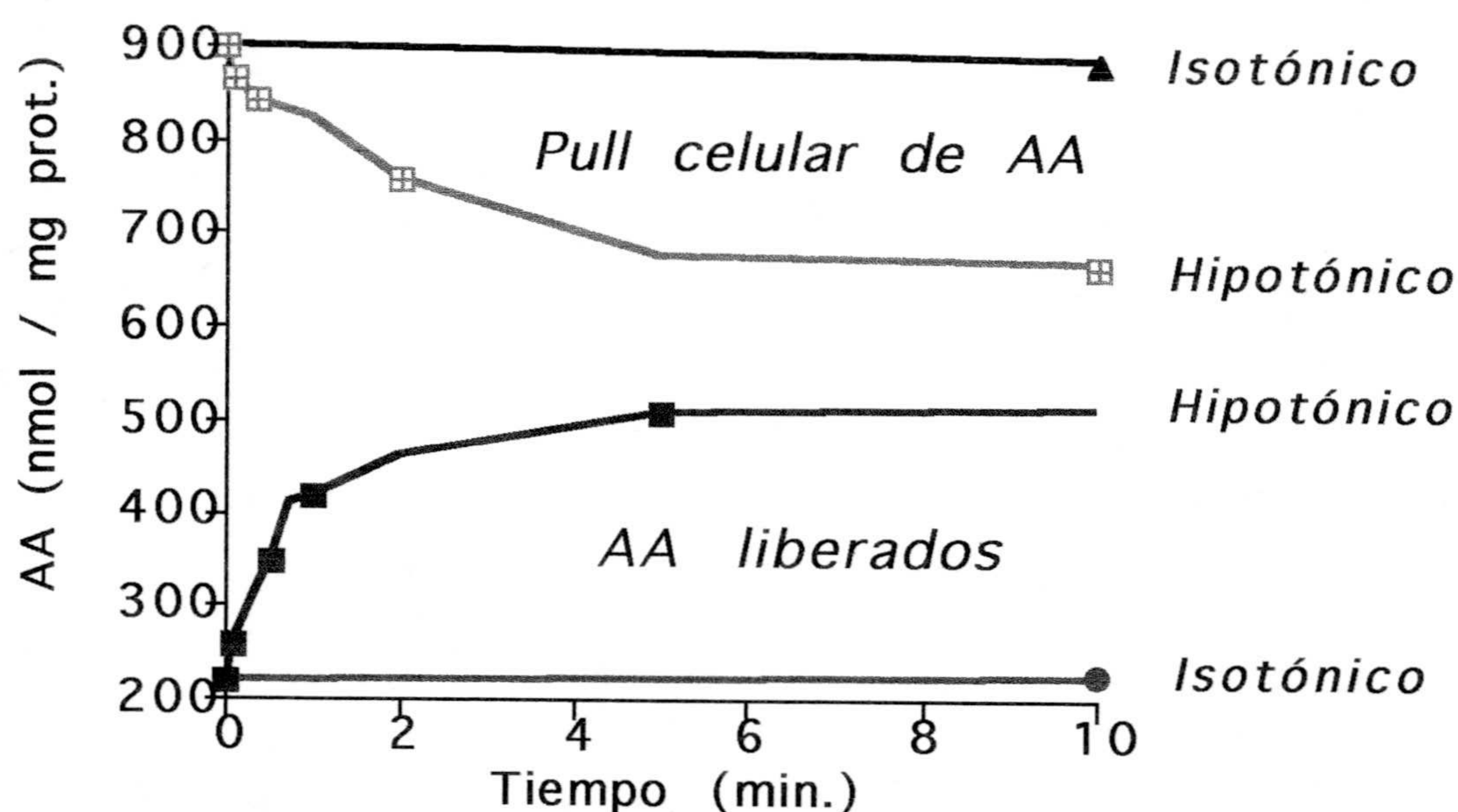


Figura. IV.24 Efecto de la osmolaridad en la liberación de aminoácidos en *L. tropica silvestre*. Los promastigotes de *Leishmania* lavados en medio iso-Cl y resuspendidos en el mismo tampón fueron diluidos con un volumen equivalente de agua destilada. La cantidad de aminoácidos liberados en el medio y la que permanece en la célula fueron medidos a diferentes tiempos. Los datos son representativos de al menos 6 experimentos.

Como se observa en la figura IV. 24, *L. tropica* responde a la hipotonicidad del medio liberando aminoácidos en un comportamiento similar al descrito para *L. major*. por Vieira y col. (1996). Practicamente a los 5 seg de exposición al medio hipotónico ya se pudo observar liberación de aminoácidos frente a choque hipotónico, alcanzando un valor máximo a los 5 minutos.

El mismo experimento fue realizado con los parásitos tranfectados con los plásmidos pKSN-E y el pKSNEOA. Observandose un comportamiento similar al de el parásito silvestre (figura IV. 25 y 26)

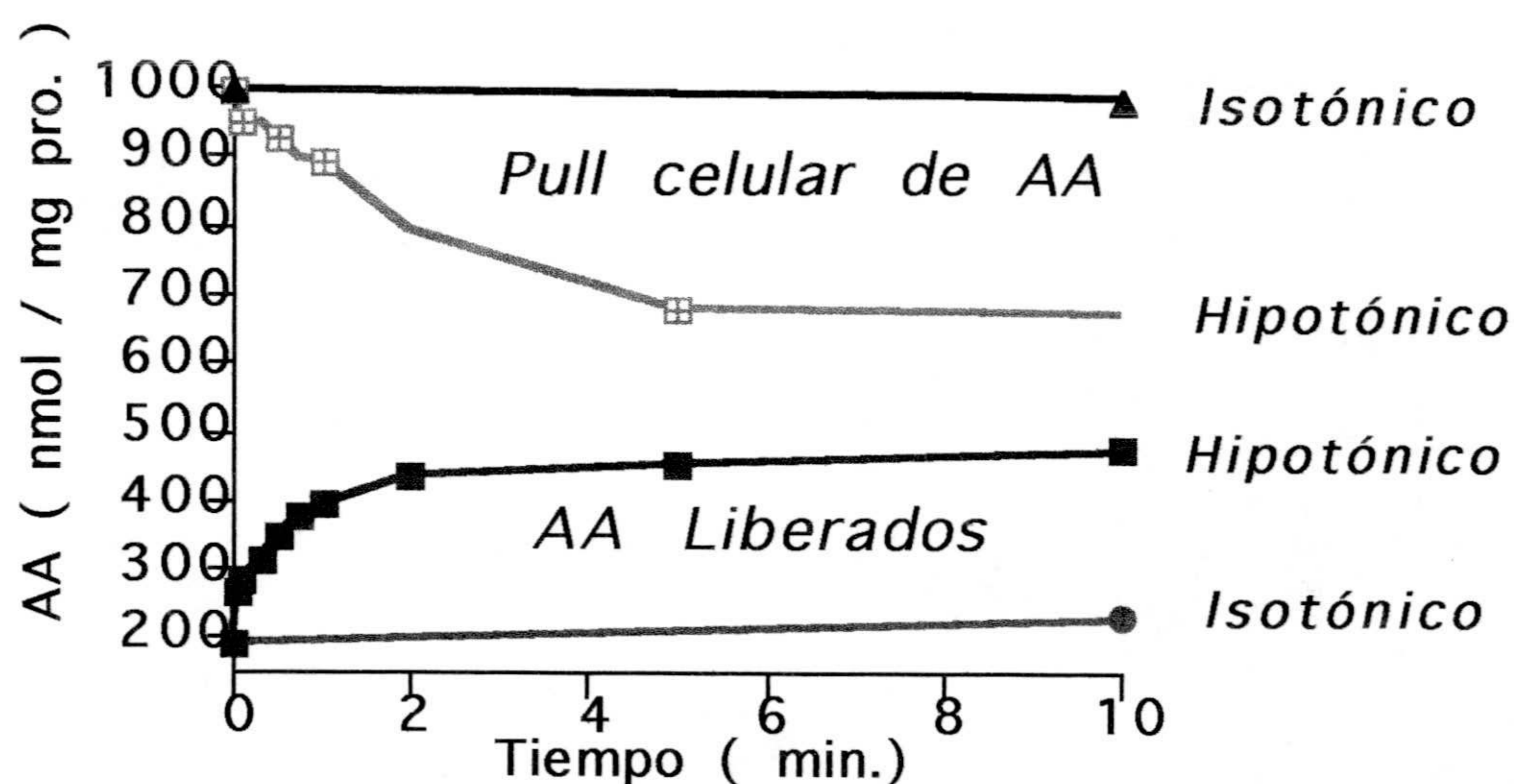


Figura. IV.25 Efecto de la osmolaridad en la liberación de aminoácidos en la línea de *L. tropica* transfectada con *pKSN-E*. Los promastigotes de *Leishmania* lavados en medio iso-Cl y resuspendidos en el mismo tampón fueron diluidos con un volumen equivalente de agua destilada. La cantidad de aminoácidos liberados en el medio y la que permanece en la célula fueron medidos a diferentes tiempos. Los datos son representativos de al menos 6 experimentos.

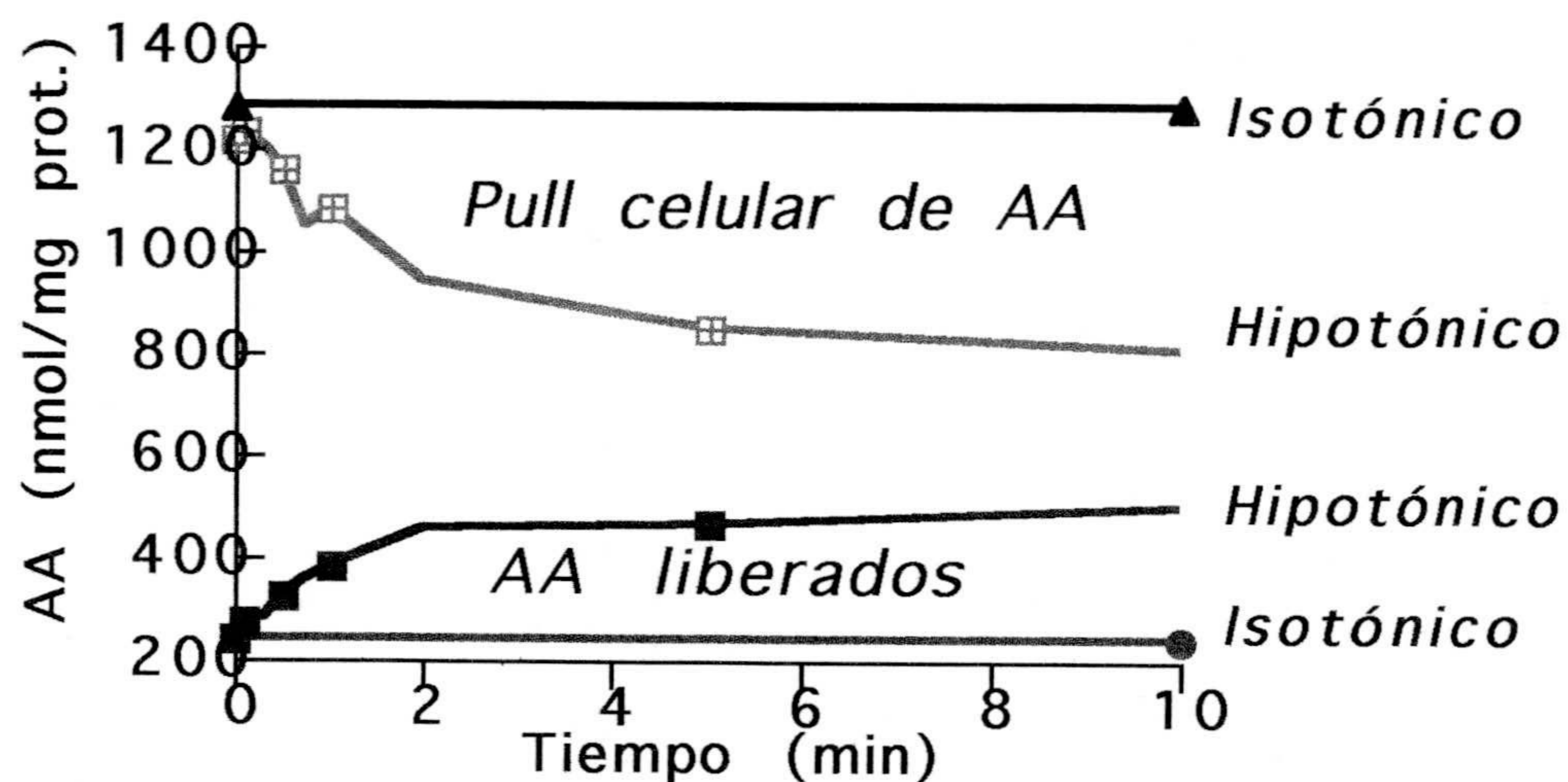


Figura. IV. 26. Efecto de la osmolaridad sobre la liberación de aminoácidos en la línea de *L. tropica* transfectada con *pKSNEOA*. Los fue promastigotes de *Leishmania* fueron expuestos a un medio medio iso-Cl y medio hipotónico 150 mOsm. Los datos son representativos de al menos 6 experimentos.

A fin de comparar el comportamiento de ambas líneas de *Leishmania tropica*, pKSN-E y pKSNEOA, cuando son expuestas a medios con osmolaridad 150 mOsm, representamos los valores de la liberación de aminoácidos en ambas líneas relativos a control pKSNEOA. Para ello se aplicó la siguiente operación a los valores de aminoácidos liberados representados en las gráficas de las figuras IV.25, y IV.26

Ecuación 1:

$$AA_{pKSN-E} = \frac{AA_{pKSN-E}(i) - AA_{pKSN-E}(0)}{AA_{pKSNEO(max)} - AA_{pKSNEO}(0)}$$

$$AA_{pKSNEO} = \frac{AA_{pKSNEO}(i) - AA_{pKSNEO}(0)}{AA_{pKSNEO(max)} - AA_{pKSNEO}(0)}$$

En donde:

- AA_{pKSN-E}, y AA_{pKSNEOA} representan a cada uno de los valores de AA relativos al control, liberados por pKSN-E y pKSNEOA, respectivamente.
- AA_{pKSN-E(i)} y AA_{pKSNEOA(i)} representa cada uno de los valores de AA liberados por pKSN-E y pKSNEOA representados en las Fig. IV.25.y IV.26.
- AA_{pKSN-E(0)} y AA_{pKSNEOA(0)} representa el valor de los AA liberados en medio isotónico por pKSN-E y pKSNEOA, respectivamente.
- AA_{pKSNEOA(max)}, representa el valor máximo de los AA liberados por pKSNEOA en la figura IV.26

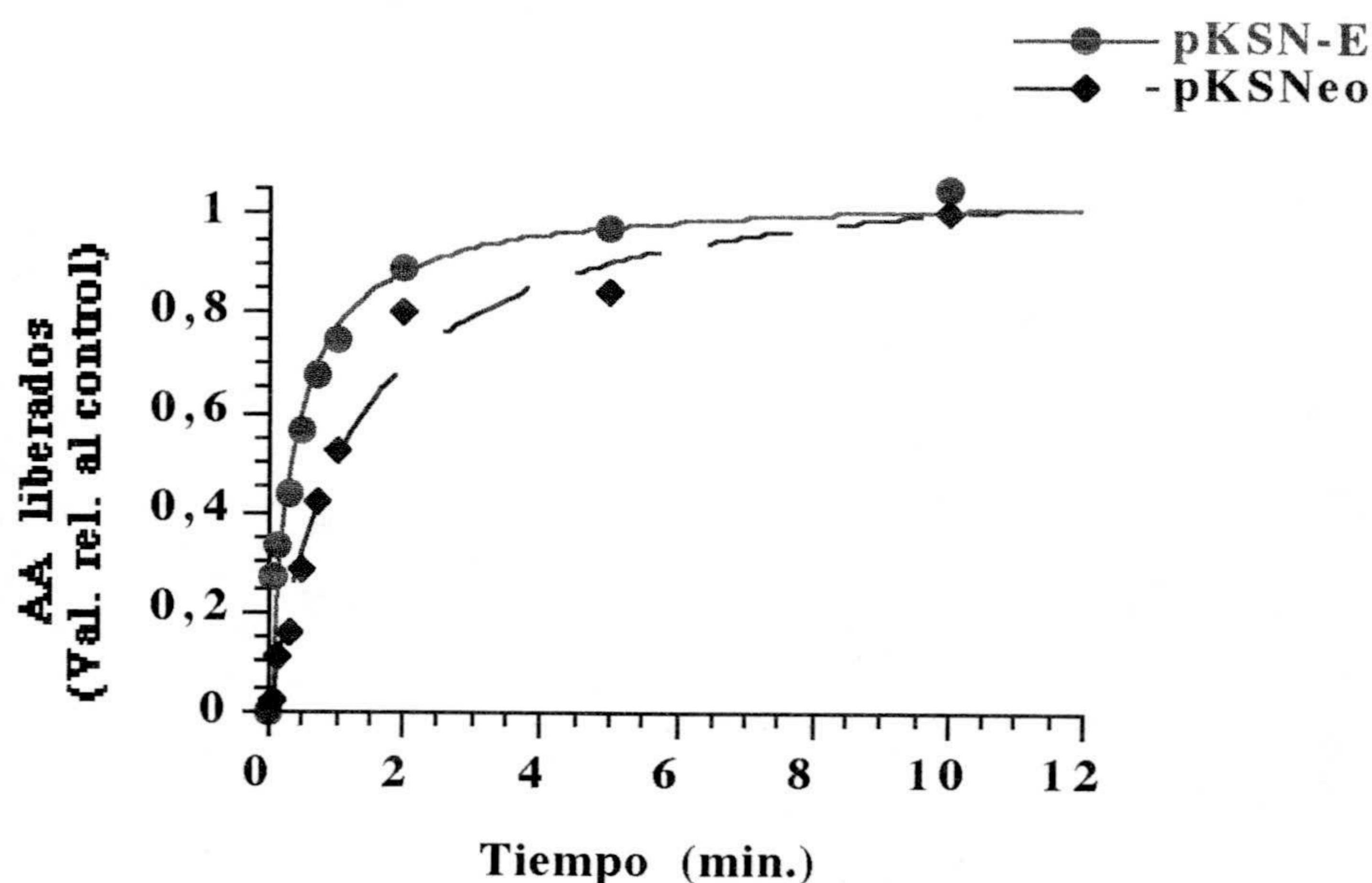


Figura. IV. 27. Efecto de la osmolaridad sobre la liberación de aminoácidos en la línea de *L tropica* transfectada con pKSNEOA y pKSN-E representados como bvalores relativos al control pKSNEOA. Los datos procedentes de la figura IV.25 y IV.26 fueron procesados según se indica en el texto obteniendo los valores relativos al control pKSNEOA, de liberación de aminoácidos frente a medio 150 mOSm. Los valores realtivos de aminoácidos liberados al medio fueron representados en función del tiempo. El ajuste de los valores a la ecuación de una hipérbola aparece representado en la figura.

Los valores relativos al control para cada las líneas de tranfectantes pKSN-E y pKSNEOA, aparecen representados en función del tiempo en la figura IV.27. Los valores obtenidos se ajustan a una hipérbola definida por la siguiente ecuación:

$$\text{Ecuación 2: } y = m1 \times m0 / m2 + m0$$

En donde:

- **m1** es el valor relativo máximo de los aminoácidos liberados bajo choque hipotónico.
- **m2** representa el tiempo en minutos necesario para que la mitad de los aminoácidos sean librerados al medio.

Los valores obtenidos para pKSNEOA y pKSN-E son:

	<i>pKSNEOA</i>	<i>pKSN-E</i>
m1	1,12±0,06	1,04±0,053
m2	1,23±0,2	0,35±0,072

En *L. major* ha sido descrito que el canal aniónico activable por hipotonicidad, HAAC, es un canal poco selectivo que permite el paso a aminoácidos neutros y ácidos. Nosotros quisimos saber si en *L. tropica*, este canal también presenta esta selectividad de aminoácidos de carácter relativamente laxo y si los parásitos transfectados con el gen *ltrpgpE* existía alguna variación relativa al tipo de aminoácidos que eran liberados en la apertura del canal.

Para ello se determinó la concentración y composición del "pull" de aminoácidos celulares que permanecían tras someter a los parásitos a choque hipotónico. Para ello sobre el extracto de células desproteínizado se llevaron a cabo análisis de aminoácidos por HPLC. En la tabla IV.3 se muestran los aminoácidos que forman parte del "pull" celular (nmoles/mg de proteína) tras exposición de los parásitos a medio isotónico e hipotónico durante 1 minuto. En la tabla IV.4, se representan los valores de cada uno de los aminoácidos del "pull" celular en los parásitos transfectados sometidos a choque hipotónico como un porcentaje de los aminoácidos del "pull" celular de los mismos parásitos sometidos a medio isotónico.

<i>L. tropica</i>						
	<i>pKSNEOA</i>		<i>pKSN-E</i>			
AA	Iso	Hipo	Iso	Hipo	Iso	Hipo
Asp	160.5	65.37	66.36	81.72	204.7	186.43
Hyp	231.8	138.9	147.87	80.81	57.3	32.63
Ser	122.3	88.42	169.64	173.8	146.46	106.37
Glu	505.76	233.29	407.14	389.81	241.77	135.87
Thr	159.88	117.78	116.54	96.63	81.43	38.81
Gly	318.7	161.6	308.14	148.5	296.28	131.23
Arg	341.4	286.1	471.1	257.63	708.32	644.12
Ala	2520.7	1230.9	2468.2	1003.0	2966.37	1174.9
Pro	56.8	37.28	486.9	210.87	726.99	225.8
Ile	85.8	56.6	47.78	88.725	49.12	42.47
Leu	70.9	64.8	42.3	78.02	51.24	59.56
Orn	611.5	544.5	1202.6	1298.3	1037.9	1170.3
Lys	315.6	267.7	153.01	128.9	334.5	290.82

Tabla IV. 5. Perfil de aminoácidos en parásitos *L. tropica* silvestre y transfectados con los plásmidos *pKSNEOA* y *pKSN-E*, expuestos a condiciones isotónicas e hipotónicas. Las células expuestas a medio isotónico (Iso) e hipotónico (Hipo) durante 1 minuto a 30°C fueron procesadas para análisis de aminoácidos según se describe en material y métodos. Los datos son dados en nmoles/mg proteína. Los valores son media de 2 experimentos.

% de AA liberados

AA	Silvestre	<i>pKSNEOA</i>	<i>pKSN-E</i>
Asp	59.3	NL	8.6
Hyp	40.53	45.3	56.9
Ser	27.7	NL	27.3
Glu	53.8	4	43.8
Thr	26	17.1	52.3
Gly	49.2	51.8	55.7
Arg	16.1	45.4	9
Ala	51.2	59	60
Pro	34.3	56.7	69
Ile	34	NL	12
Leu	8	NL	NL
Orn	11	NL	NL
Lys	15	15.7	13

Tabla IV.IV. Perfil de aminoácidos liberados en diferentes líneas de *L. tropica*, expresados en valores relativos. Los valores absolutos de la tabla IV.III han sido representados en % de AA liberados en medio hipotónico relativo a los AA liberados en medio isotónico. NL: no liberación de AA.

IV.13 MEDIDA DEL PH INTRACELULAR EN DIFERENTES LINEAS DE *Leishmania tropica*.

Ha sido descrito en diferentes líneas de células tumorales MDR que la expresión de la glicoproteína-P modifica el pH_i produciendo una alcalinización del citosol, y se ha propuesto que esta multirresistencia a fármacos sea una consecuencia de el aumento de pH intracelular. Aunque los experimentos de resistencia a fármacos realizados muestran que la amplificación del gen *ltpgpE* no induce un fenotipo MDR en los parásitos transfectados, nosotros quisimos saber si la expresión de este gen podía modificar el pH intracelular del parásito, al igual que ocurre con la expresión de la glicoproteína-P de mamíferos.

Para determinar el pH intracelular se utilizó un marcador fluorescente sensible a pH, el BCECF, que se caracteriza por tener un pK_a entre 5 y 7 en el rango de pH fisiológico descrito para otras especies de *Leishmania*. Presenta de 4 a 5 cargas negativas a pH fisiológico, lo que facilita su compartimentalización dentro del citoplasma, siendo difícil su paso a través de las membranas y la entrada a otros orgánulos. Bajo la forma acetometoxilester (AM) el BCECF pasa a través de la membrana plásmática entrando al citoplasma fácilmente, una vez allí las esterasas del parásito rompen el enlace ester liberando la forma ácido del marcador. BCECF puede ser excitado con dos longitudes de onda, una a 490 nm, próxima al máximo de emisión, y otra a 440, punto isobéptico del marcador. Esto permite obtener un cociente de la emisión de fluorescencia cuando la molécula es excitada con ambas longitudes de onda que cancelan los posibles errores debidos a número de células, variación en la concentración del marcador, fuga del marcador...etc. Además este marcador, ampliamente utilizado y descrito en la literatura, ha sido usado previamente con éxito en la determinación del pH_i en *Leishmania major* (Vieira y col., 1994).

IV.13.1. Calibración y medida del pH intracelular en *L. tropica*.

Para determinar el pH intracelular (pH_i) en *L. tropica* silvestre y en las diferentes líneas creadas por transfección a lo largo de esta tesis, se obtuvieron en primer lugar curvas de calibración de pH para cada una de las líneas obtenidas, tratando a los parásitos según se describe en Material y Métodos.

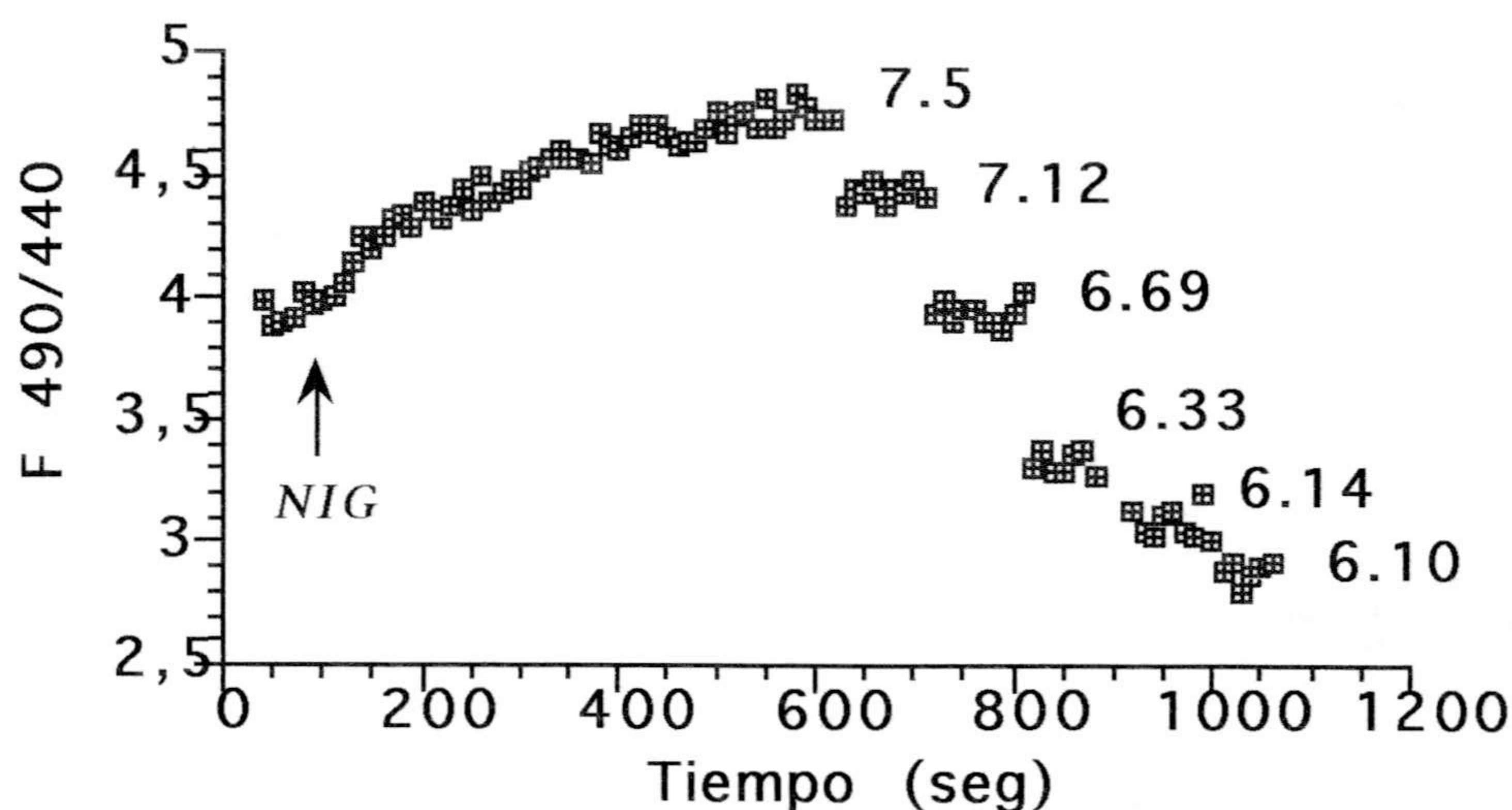


Figura IV.*. Calibración del pH intracelular en *L. tropica silvestre*. Los promastigotes de *Leishmania* cargados con BCECF fueron expuestos a Nigericina $5\mu\text{M}$ (NIG) en medio cloruro rico en K^+ . Las trazas representan la señal de fluorescencia del cociente (490/440 excitación y emisión a 535 nm), obtenido a diferentes pH tras añadir alicuotas de MES 1M. En la curva se representan la fluorescencia de excitación F490/440 emitida a los distintos valores de pH extracelular (pHo) que son alcanzados; $\text{pHo}=\text{pHi}$,

Si representamos los valores de pHi, en función de la fluorescencia del cociente 490/440 (F490/440), obtenemos una recta que puede ser utilizada para determinar los valores de pH que corresponde a la fluorescencia de un determinado cociente de excitación.

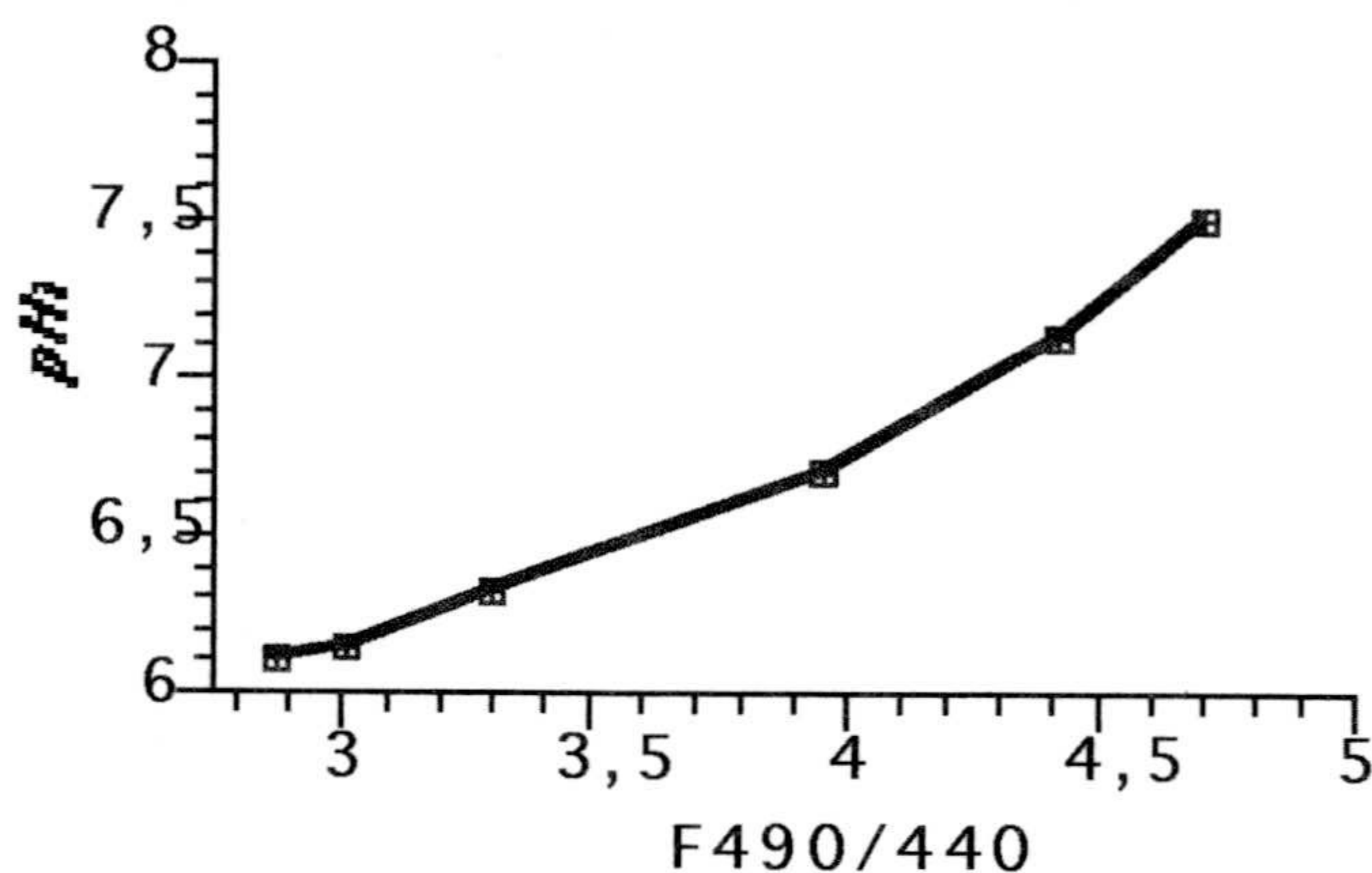


Figura IV. 28. Dependencia del pH que presenta la fluorescencia del cociente de excitación 490/440. Se ha representado en abcisdas el pHi y en ordenadas la fluorescencia de excitación 490/440.

Para cada una de las líneas usadas se realizaron curvas de calibración de pHi siguiendo la misma metodología que para la calibración del pHi de *L. tropica silvestre*.

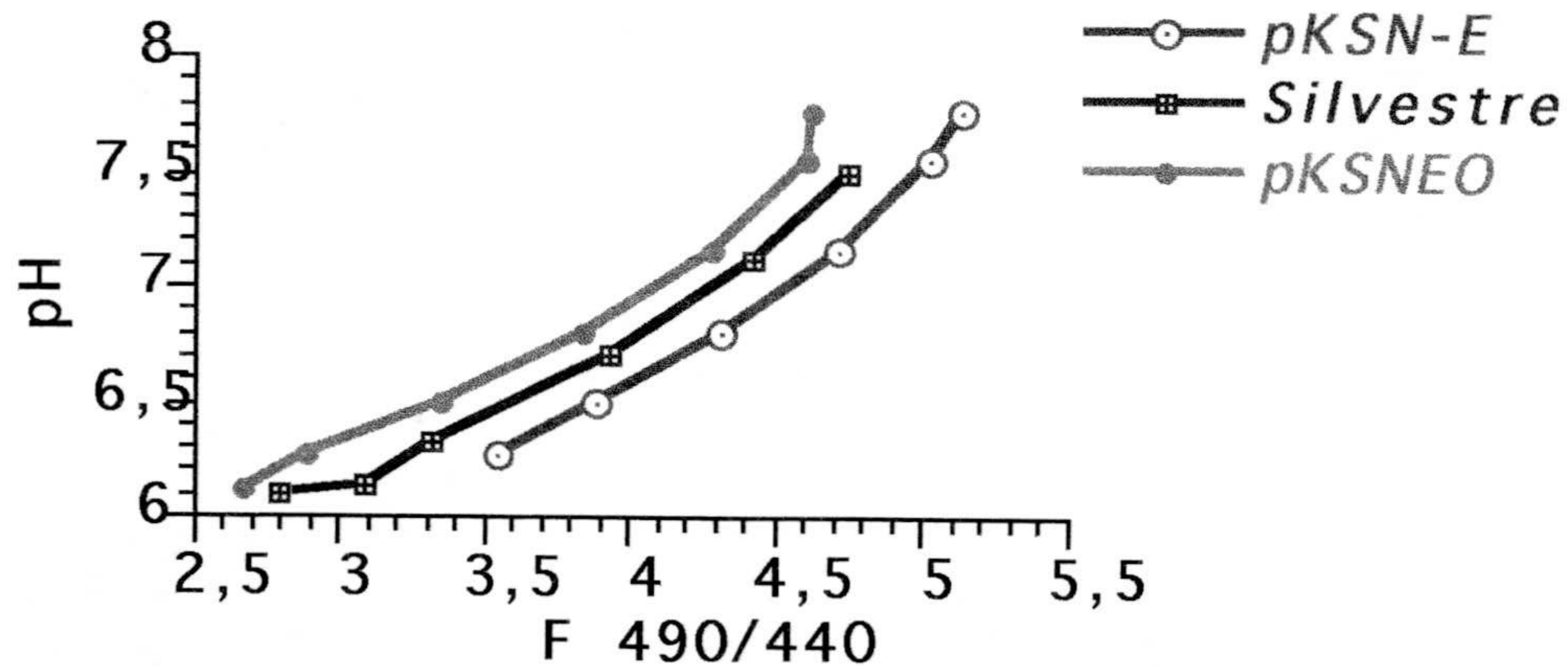


Figura IV.29. Comparación entre las dependencias de pH que presentan las F490/440 de las líneas de *L. tropica* silvestre, pKSN-E y pKSNEOA.

Como muestra la figura IV. 29 existen variaciones entre la dependencia que del pH presenta la F490/440 en las diferentes líneas de parásitos, por lo que se optó por realizar curvas de calibración de pH independientes para cada parásito así como para cada experimento a fin de conseguir una mayor fiabilidad de los resultados.

Los valores de pH_i determinados para cada una de las líneas de *L. tropica* aparecen en la tabla. Cada valor es media de al menos 5 experimentos independientes.

<i>L. tropica</i>	pH _i
Silvestre	6,75 ± 0,06 *
pKSN-E	6,75 ± 0,09*
pKSNEOA	6,85 ± 0,05 *

Tabla.IV. 6 Valores de pH intracelular en diferentes líneas de *Leishmania tropica*. Cada valor es media de al menos 5 experimentos independientes.(*) Desviación standar.

DISCUSSION

V. DISCUSION

V.1.INTRODUCCION.

En los últimos años la superfamilia de proteínas transportadoras ABC ha suscitado un gran interés entre la comunidad científica debido a que sus miembros, distribuidos a lo largo de toda la escala biológica, están relacionados con procesos biológicos tan importantes como el transporte de nutrientes en procariontes, y problemas de interés clínico de la embergadura de la fibrosis quística, la presentación de antígeno y el fenómeno de multirresistencia a fármacos en cáncer. En este último campo, el estudio de la multirresistencia a fármacos (MDR), ha tenido lugar el descubrimiento de una importante y extendida familia de proteínas, las glicoproteínas-P, que han sido descritas no solo en células tumorales de mamíferos, sino también microorganismos como protozoos parásitos responsables de enfermedades de gran importancia a nivel clínico, por el gran número de personas a las que afecta y falta de tratamiento efectivo, y a nivel socioeconómico.

Actualmente existe una nueva tendencia a dividir la familia de las glicoproteínas-P de parásitos en dos grupos, en base a la homología que presentan con genes MDR de mamíferos. En *Leishmania* se han descrito glicoproteínas-P que presentan una alta homología a nivel de secuencia y un paralelismo funcional con las glicoproteínas-P de mamíferos, pero existe un segundo grupo de glicoproteínas-P cuya homología con genes *mdr* es menor que la que mantienen con otros transportadores ABC y cuya función es todavía poco conocida.

Al inicio del presente trabajo, había sido descrita en la literatura la existencia de dos genes glicoproteína-P en *Leishmania*: el gen *pgpA* en *L. tarentolae* y *L. major*, y el gen *mdr*, en *L. enrietti*, y en *L. donovani*. Durante el transcurso de esta tesis, se ha descrito en *L. tarentolae* la presencia de otros genes glicoproteína-P que constituyen una familia, sumándose al ya descrito gen *ltpgpA*, los genes *ltpgpB*, *ltpgpC*, *ltpgpE* y *ltpgpD*. Aunque la secuencia de algunos de ellos es conocida, su función sigue siendo una incógnita ya que los experimentos de transfección parecen no relacionar a estos genes con resistencia a fármacos ni metales pesados.

El objetivo de la presente tesis ha sido la caracterización de un gen glicoproteína-P del parásito *Leishmania tropica*., el gen *ltpgpE*, que aparece sobreexpresado en una línea del parásito resistente a Metotrexato. Aunque nuestros esfuerzos iniciales fueron enfocados a

determinar un posible papel de este gen en resistencia a fármacos, en este estudio hemos intentado abarcar todas aquellas funciones con las que glicoproteínas-P han sido relacionadas, en un intento de conocer mejor la función de estos genes glicoproteínas-P.

V.2. ORGANIZACION GENOMICA DEL GEN *ltrpgpE*.

El patrón de bandas de hibridación obtenido a partir de las digestiones llevadas a cabo en el ADN genómico de *Leishmania. tropica*, sugiere que el gen *ltrpgpE* es un gen de copia única tanto en la línea silvestre como en la línea resistente a metotrexato. Este tipo de organización génica esta en concordancia con lo observado para otros genes glicoproteína-P en diferentes especies de *Leishmania* (Légaré, y col., 1994) y en *Trypanosoma cruzi* (Dallagiovana y col, 1996).

Aunque en Tripanosomátidos es frecuente que muchos de sus genes se encuentren repetidos en el genoma organizados en tanden, en *Leishmania* los genes glicoproteína-P suelen encontrarse en una sola copia por genoma haploide. Sin embargo, cuando estos genes son amplificados bien sometidos a la presión de un fármaco o bien en stocks de laboratorio, su amplificación suele ser consecuencia de la producción de elementos extracromosomales que aparecen en el genoma en numerosas copias. En *Leishmania* se han descrito amplificación del gen *pgpA* en *L. tarentolae* y *L. major* en respuesta a selección con metotrexato y arsenito (Ouellette y col., 1990 y 1991; Callahan y col., 1991; Grodin y col., 1993), así como en stocks de laboratorio no seleccionados (Hightower y col., 1998). Esta amplificación ocurre en forma de elemento extracromosomal y circular de 69 kb conocido como círculo H. Otra amplificación de glicoproteína-P en forma de elementos circulares extracromosomales ha sido descrita en *L.enriettii* resistente a vinblastina, el llamado círculo V de 35-40 kb, que contiene el gen *lemdr1* (Chow, y col., 1993). Tan solo ha sido descrita la amplificación de un gen *mdr*, el gen *ldmdr1* de *L. donovani* resistente a vinblastina, que por ahora no ha sido relacionada con la producción de elementos extracromosomales (Henderson y col., 1992).

En otros parásitos protozoos como *Plasmodium falciparum*, el gen *pfmdr1*, se encuentra amplificado en algunos islados resistentes a cloroquina (Foote y col., 1989) y mefloquina (Wilson y col., 1989; Cowman y col, 1994). Esta amplificación ocurre por duplicación génica en tanden dentro del cromosoma y no por formación de elementos extracromosomales como en *Leishmania*.

Comparando el patrón de bandas obtenido con la sonda pltrE, entre la línea salvaje y resistente a MTX, podemos deducir que ambas líneas tienen un patrón de restricción diferente y que posiblemente este polimorfismo sea una consecuencia del proceso de inducción de resistencia a MTX.

V.3. LOCALIZACION CROMOSOMICA DEL GEN ltrpgpE.

Mediante electroforesis en campo pulsado aplicando las condiciones descritas en Material y Métodos hemos conseguido separar en *Leishmania.tropica* los cromosomas lineales. La transferencia a nylon y posterior hibridación con la sonda pltrE muestra que el gen ltrpgpE se encuentra localizado en un cromosoma de 1500 kb. Esto está en concordancia con lo descrito por Légaré y col., (1994) en *L. tarentolae* en el que el gen ltrpgpE se encuentra en un cromosoma de 1500 kb localizado en un cluster junto al gen ltrpgpD.

Los genes de la familia glicoproteína-P en *L. tarentolae* y otras especies relacionadas, se encuentran repartidos en dos cromosomas de 800 y 1500 kb. Los genes ltrpgpA, ltrpgpB y ltrpgpC se encuentran muy próximos físicamente (**locus I**), en un cromosoma de 800 kb. A pesar de la proximidad física entre estos genes tan solo se encuentra amplificado en el círculo H el ltrpgpA debido a que las secuencias repetidas e invertidas que recombinan entre sí para formar el círculo se localizan entre el gen ltrpgpA y B. Recientemente se ha descrito un largo amplicón que contiene los 3 genes (pgpA, B y C) aislado de mutantes resistentes a arsenito y a metotrexato. Los genes ltrpgpE y D se encuentran en un mismo locus (**locus II**) dispuestos el primero cadena bajo del segundo. Aun no ha sido descrita amplificación de estos genes. El gen mdr hibrida en el mismo cromosoma de 1500 kb que los genes ltrpgpE y ltrpgpD.

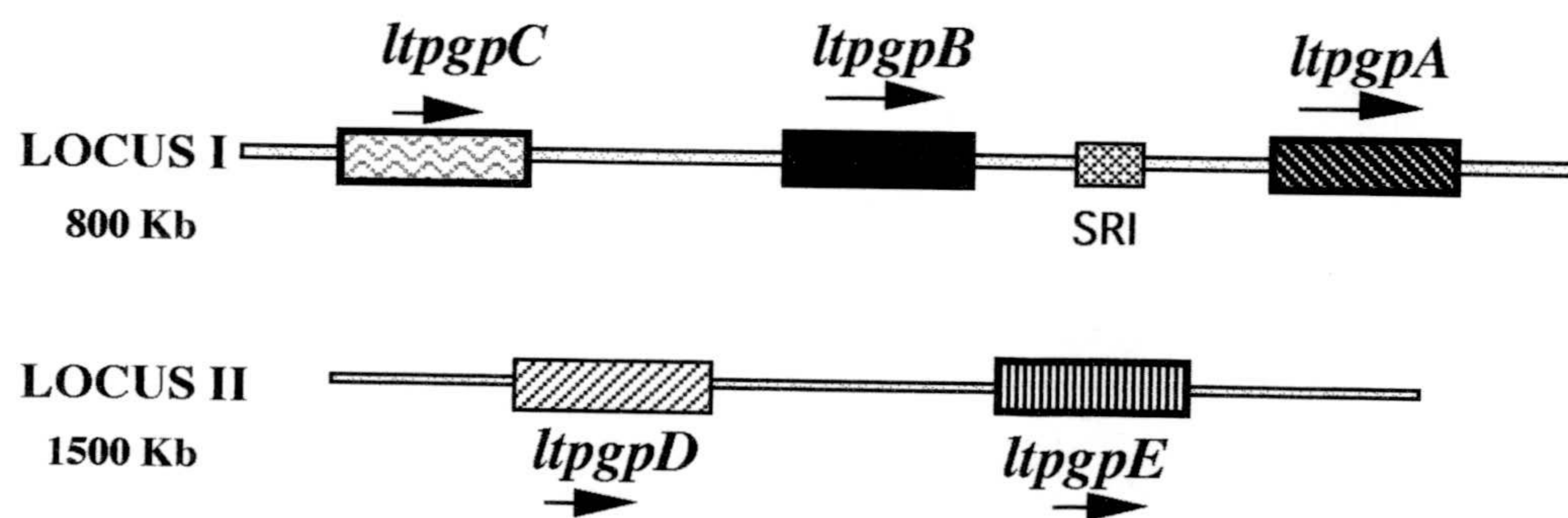


Figura V.1. Organización genómica de los genes glicoproteína-P en *L. tarentolae*. En la figura se representa esquemáticamente los locus I y II localizados respectivamente en los cromosomas de 800 kb y 1500 kb. El rectángulo localizado entre ltrpgpA y ltrpgpB (SRI) representa las secuencias repetidas e invertidas que interviene en la formación del círculo H.

De nuevo a nivel cromosómico podemos observar pequeñas diferencias en el tamaño de la banda reconocida por la sonda específica para el gen *ltpgpE* entre la línea silvestre y resistente a MTX y que pueden ser consecuencia .

V.4. ANALISIS DE LA SECUENCIA NUCLEOTIDICA DEL GEN *ltpgpE*.

A partir de una genoteca de ADN genómico de una línea de *Leishmania tropica* resistente a MTX y usando una sonda específica para el gen *ltpgpE* de *L. tarentolae* se aisló un clon que parecía contener la secuencia completa para el gen homólogo de *Leishmania tropica* al que llamamos *ltpgpE*. Se secuenciaron 6.640 pb entre las que se encontró un marco abierto de lectura de 5.034 pb, que codifica para una proteína con un peso molecular estimado de 182.891 Da (ADN Strider © 1.1).

Estableciendo homologías con otros genes del banco de datos se determinó que este marco abierto de lectura correspondía a un gen codificante para una glicoproteína-P. El tamaño de este gen, 5034 pb, es similar al del grupo de las glicoproteínas-P relacionadas con el gen *ltpgpA* que oscila entre los 4819 pb del gen *ltpgA* y los 5172 pb del gen *ltpgpE* (Légaré y col., 1994). Los genes *mdr* hasta ahora descritos, presentan un tamaño menor, entorno a los 3840 pb del gen *mdr* humano (Chem y col, 1986) y las 4023 pb del gen *ldmdr1* de *L. donovani* (Hendrickson y col., 1993).

Como codón de iniciación se escogió el ATG que generaba el mayor marco de lectura posible. No se encontró ningún ATG cadena arriba que estuviera en fase con el codón escogido como el de iniciación y los ATG presentes, no en fase, conducían a marcos abiertos de lectura muy cortos. La posibilidad de que la metionina localizada en posición 186 pudiera actuar como codón de iniciación ha quedado descartada en los experimentos de transfección donde se muestra que la transfección de una construcción molecular del gen *ltpgpE* delecionado en 5', pXE5' Δ , no permite la transcripción correcta del gen *ltpgpE*.

Analizando la composición de bases del ADN secuenciado, encontramos que el contenido de G+C en las 6.640 pb es de un 58,3%. Este enriquecimiento en G+C es más acusado en la región codificante, (63,4%), siendo menor en las zonas no codificantes 5' y 3' (Tabla.V.2) Este enriquecimiento en G y C frente a A y T, en general a lo largo de la secuencia y en este caso más pronunciado en la región codificante, es una característica que ha sido previamente descrita para otros genes de *Leishmania* y se hace extensible a Tripanosomátidos. Otra característica de los genes de *Leishmania* es la fuerte tendencia a

usar G o C en la tercera posición de sus codones (Langford y col., 1992) y que en el caso del gen *ltrpgpE* se mantiene, ya que este porcentaje representa un 77% del total de codones del gen

Composición nucleotídica del gen ltrpgpE y de las regiones flanqueantes

	Región 5'		Sec. codificante*		Región 3'	
	nt	nt%	nt	nt%	nt	nt%
A	237	28,5	870	17,2	76	18,
C	206	24,8	1528	30,3	96	23,4
G	180	21,6	1661	32,9	135	33,0
T	207	24,9	975	19,3	102	24,9
G+C%		46,4		63,2		56,4

Tabla V.1. *Composición de nucleótidos del gen ltrpgpE así como de las secuencias flanqueantes 5' y 3'.* La composición en nucleótidos de las 6.640 pb ha sido expresada como número total de nucleótidos pertenecientes a cada clase (nt) así como porcentaje de nucleótidos referido al total (% nt). La secuencia ha sido dividida en región codificante en la que se incluye el codón de parada (*), en región flanqueante 5' y 3'.

Respecto al uso de codones del gen *ltrpgpE*, en la Tabla V.2 se ha representado el uso de codones del gen indicándose el número de total de cada tipo de codón usado en la secuencia del gen, el porcentaje de uso de cada uno de los codones del gen *ltrpgpE* y el porcentaje de uso de cada codón considerando 22 genes del género *Leishmania*. (Langford y col., 1992). Como se aprecia todos los codones que codifican para los diferentes aminoácidos están representados en este gen y su uso de codones es muy similar al descrito para otros genes de *Leishmania*, si bien existe de forma generalizable una ligera disminución en el porcentaje de codones usados con G o C en la tercera base.

Uso de codones del gen *ltrpgpE*

Ala GCT 24 12,1 16,4 GCC 52 26,2 31,9 GCA 41 20,7 8,5 GCG 81 40,9 43,2	Arg CGT 16 13 11,5 CGC 69 56,1 62,1 CGA 12 9,7 5,1 CGG 20 16,2 11,7 AGA 1 0,8 2,7 AGG 5 4 6,9	Asn AAT 5 17,3 7,6 AAC 24 82,7 92,4	Asp GAT 18 23,7 20 GAC 58 76,3 80	Cys TGT 5 19,3 13,8 TGC 21 80,7 86,2
Gln CAA 12 17,2 8 CAG 58 82,8 92	Glu GAA 20 20,4 9,6 GAG 78 79,6 90,4	Gly GGT 14 9,6 18,6 GGC 79 54,5 67,2 GGA 16 11,1 4,3 GGG 20 13,8 9,6	His CAT 6 21,5 12,4 CAC 22 78,5 87,6	Ile ATT 16 29,1 18,2 ATC 33 60 79,8 ATA 6 10,9 2
Leu TTA 3 1,6 0,8 TTG 16 8,7 6,3 CTT 20 10,9 11,1 CTC 45 24,6 22,5 CTA 13 7,1 2,7 CTG 86 46,9 56,6	Lys AAA 6 15,4 6,1 AAG 33 84,6 93,9	Met ATG 48 100 100	Phe TTT 19 28 16,7 TTC 49 72 83,3	Pro CCT 7 9,6 12,8 CCC 19 26,1 20 CCA 12 16,4 11 CCG 35 47,9 56,4
Ser TCT 9 6,9 9,9 TCC 28 21,7 22,2 TCA 15 11,6 4,3 TCG 24 18,6 30,4 AGT 16 12,4 5 AGC 37 28,7 28,2	Thr ACT 12 13,6 8,8 ACC 27 30,6 24,7 ACA 10 11,3 6,4 ACG 39 44,3 60,2	Trp TGG 28 100 100	Tyr TAT 9 20,9 7 TAC 34 79,1 93	Val GTT 17 16,03 9,4 GTC 4 3,7 23,8 GTA 3 2,8 5,1 GTG 82 77,3 61,7
				Z* TAG 1 100 43,75 TAA 0 31,25 TGA 0 25

Tabla V.2 *Uso de codones del gen ltrpgpE de Leishmania tropica*. En la tabla se representan los diferentes codones que codifican los 20 aminoácidos del código genético y los codones de parada (Z*). Cada codón viene acompañado de 3 números que representan de izquierda a derecha: 1). El número de veces que cada codón esta representado en el gen *ltrpgE*. 2) El porcentaje de uso de cada codón en el gen *LtrpgpE*. 3) El porcentaje de uso de cada codón considerando 22 genes de *Leishmania*.

V.5. ANALISIS DE LA SECUENCIA DE AMINOACIDOS DEL GEN *ltrpgpE*.

A través de los bancos de datos y mediante el programa TFASTA del paquete GCG se establecieron homologías entre la secuencia de aminoácidos del gen *ltrpgpE* con la secuencia de aminoácidos de otros genes. Como muestra la Tabla IV.3 se encontraron valores significativos de homología tan solo con transportadores ABC.

Las principales homologías del gen *ltrpgpE* se mantiene con aquellos genes de la familia glicoproteína-P relacionados con la proteína *pgpA* (*ltrpgpA*, *ltrpgpB* y *ltrpgpE*), siendo la más alta homología la establecida con su homólogo el gen *ltrpgpE* de *L. tarentolae*. Con los restantes miembros de la familia ABC, el gen mantiene menores porcentajes de homología, inferiores al 40%. Es interesante resaltar que las homologías que mantiene este gen con genes glicoproteína-P *mdr*, son en la mayoría de los casos inferiores a las mantenidas con otros transportadores ABC como el YCF1, un gen que confiere resistencia a cadmio en levaduras, el gen MRP y el gen CFTR. Estos datos están en concordancia con las nuevas tendencias existentes, que consideran a estos genes glicoproteína-P más próximos a genes CFTR y MRP que a los genes *mdr*, formando un grupo aparte dentro de los transportadores ABC (Cole y col., 1992).

Los transportadores ABC se caracterizan por presentar unos dominios muy conservados a lo largo de toda la superfamilia, en estos dominios es donde tiene lugar la unión e hidrólisis de ATP. Los dominios de unión a ATP son característicos de esta superfamilia de transportadores y se diferencian de los de otras ATPasas en que la homología es mantenida más allá de las regiones Walker, entorno a una secuencia de 200 aminoácidos. Si consideramos estas regiones y determinamos la homología que mantiene el gen *ltrpgpE* a nivel de los dominios de unión a ATP con otros transportadores ABC (Tabla.V.4), encontramos que los porcentajes de homología tanto a nivel de identidad como similitud son mayores que los observados a lo largo del gen, superiores a un 30% de homología. Estos valores se encontraban dentro de los márgenes de porcentajes de homología obtenidos al comparar entre sí dominios de unión a ATP de diferentes transportadores ABC, es decir entre un 30 y un 50% (Higgins, 1992).

V.5. ANALISIS DE LA ESTRUCTURA PREDICTIVA DEL GEN *ltrpgpE*.

La estructura predictiva del gen *ltrpgpE* es característica de las proteínas de la superfamilia ABC. La secuencia de aminoácidos muestra que la proteína codificada por este

gen contiene amplias regiones muy hidrofóbicas, lo cual es un indicio de su localización en membrana. Los análisis de hidrofobicidad de la molécula usando el algoritmo de Kyte y Doolittle (1982) muestran que este gen, al igual que otras glicoproteínas-P, puede ser dividido en dos mitades con una estructura homóloga, cada una de ellas con una región hidrofóbica y una región hidrofílica.

A través del perfil de hidrofobicidad de la proteína se ha podido distinguir en cada región hidrofóbica, 6 segmentos muy hidrofóbicos con un tamaño que oscila entre los 18 y 21 aminoácidos. El carácter altamente hidrofóbico y el tamaño de estos segmentos, suficiente para atravesar la membrana, nos lleva a proponer que estos 12 segmentos se corresponden con los 12 segmentos transmembrana de una glicoproteína-P. Para la localización de estos segmentos se utilizó el algoritmo de Kyte y Doolittle usando una ventana de 9 aminoácidos.

El tamaño de los segmentos transmembrana en distintos transportadores ABC quedan encuadrados dentro de el tamaño de los segmentos propuestos para la proteína LtrpgpE. Ouellette y col. (1990) proponen, según análisis predictivos basados en el perfil de hidrofobicidad, que algunos de los segmentos transmembrana de la proteína LtrpgpA tendrían tamaños de 18 aminoácidos, como por ejemplo los segmentos transmembrana I, IV, V, VII, X, mientras que los restantes segmentos tendrían tamaños que oscilarían entre los 19 y 20 aminoácidos. Cole y col. (1992) proponen tamaños para los segmentos transmembrana de la proteína MRP de aproximadamente 17 aminoácidos.

Los alineamientos de la secuencia de aminoácidos que comprende la región hidrofílica, con otros transportadores ABC, han permitido localizar las secuencias conservadas de los dominios de unión a ATP. Tanto en los dominios de unión a nucleótido de la mitad amino como de la carboxilo de la proteína, se han podido identificar claramente los motivos Walker A, formados por las secuencias **791GPTGSGKST800** para el dominio amino y **1456GRTGSGKS1463** para el carboxilo, y los motivos Walker B formados por las secuencias **902VYLLDD907** en el dominio amino y **1580FLLMDE1585** para el carboxilo. También ha sido localizado en ambos dominios de unión a ATP un motivo muy conservado dentro de los miembros de la superfamilia ABC, situado entre los dos motivos Walker, y que es considerado como la firma o el sello de la superfamilia. Este motivo viene representado por la secuencia **882LSGGQK887** en el dominio amino y **1558YSVGQRQLLCL1569** en el dominio carboxilo del gen ltrpgpE.

En cuanto a la presencia de otros motivos a lo largo de la proteína LtrpgpE se han encontrado 5 posibles sitios de N-glicosilación determinados por la secuencia Asn-X Thr/Ser

en donde "X" es cualquier aminoácido. De acuerdo con el modelo predictivo todos estos sitios de N-glicosilación están dirigidos hacia el citoplasma o bien están localizados en segmentos transmembrana. Si bien este modelo es solo una predicción de la estructura de la proteína no respondiendo siempre a la topología de la misma, la posición de los posibles sitios de N-glicosilación hace pensar que probablemente esta proteína no se encuentre glicosilada. En la proteína ItpgpA de *L. tarentolae* de los 9 posibles sitios de N-glicosilación tan solo uno es susceptible de ser glicosilado, el localizado entre los segmentos transmembrana 1 y 2 por su posible orientación al exterior de la membrana citoplasmática (Ouellette y col., 1990) Sin embargo aún no ha sido localizada la proteína desconociéndose su tamaño y posible estado de glicosilación. Hasta ahora solo ha sido descrita glicosilación en la glicoproteína-P de parásitos, tan solo en mamíferos en donde la porción glicosilada de la glicoproteína-P representa unos 30 kDa del peso total de la molécula.

En cuanto a los posibles sitios consenso de fosforilación de la glicoproteína-P por proteína quinasa C o proteína quinasa A, todos han sido descritos a nivel de la llamada región de unión o "linker". Esta región localizada dentro del primer dominio de unión a ATP y el dominio transmembrana 7 actuaría como péptido unión de las dos mitades de la glicoproteína-P, ejerciendo posiblemente un papel similar al descrito para la región R del gen CFTR. Esta región al igual que la región R de la proteína CFTR se caracteriza por su abundancia en residuos cargados. En el gen ItrpgpE también podemos observar en esta región una preponderancia de residuos cargados que representan un 28% del total de los aminoácidos de la región de unión de los cuales el 16% son positivos y el 12% son negativos.

V.9. IMPLICACION DEL GEN ItrpgpE EN MECANISMOS REGULADORES DEL VOLUMEN CELULAR.

La expresión de la glicoproteína-P de humanos (Pgh1) ha sido asociada con la activación de un canal aniónico regulado por volumen. Valverde en 1992 describió la transfección del gen *mdr1* humano en células, que mostraban una actividad mínima de canales aniónicos regulados por volumen, originaba un incremento significativo de la conductancia de aniones activada por volumen.

En un principio se pensó que la glicoproteína-P era la responsable directa de estas corrientes aniónicas, atribuyéndole un carácter bifuncional como transportador de fármacos y como canal de Cl⁻ activable por volumen. Actualmente se ha descartado esta hipótesis y se

ha propuesto que la glicoproteína-P podría estar regulando la actividad de un canal aniónico ampliamente distribuido de naturaleza desconocida. En este sentido se han detectado canales aniónicos en células no transfectadas, incluyendo la línea celular HeLa, de características electrofisiológicas y farmacológicas muy similares a los canales activados por volumen que se detectan en células que expresan glicoproteína-P. El patrón de expresión de glicoproteína-P en tejidos epiteliales aun refuerza más la hipótesis de que la glicoproteína-P este llevando a cabo a la regulación de canales aniónicos que interviene en la regulación del volumen. Esta regulación se ha propuesto que podría ser mediada a través de la regulación que ejerce la PKC sobre la glicoproteína-P.

En protozoos parásitos, la expresión de glicoproteínas-P siempre ha sido relacionada con algún mecanismo de resistencia a fármacos. Hasta ahora no ha sido descrito que exista o no, alguna relación entre glicoproteínas-P y regulación de volumen celular. Nosotros quisimos hacer una aproximación al estudio de la regulación del volumen celular en *Leishmania* y conocer si la expresión de glicoproteína-P inducía algún cambio en la capacidad de regular el volumen de estos parásitos.

Mientras que en células de mamíferos en general, los iones juegan un papel fundamental en la regulación del volumen celular actuando como los principales osmolitos dentro de la célula, en *Leishmania* este papel es ejercido por los aminoácidos. Las células de mamíferos cuando son expuestas a un choque hipotónico regulan su volumen celular, en una respuesta a corto plazo, activando corrientes de Cl^- y K^+ que conducen a la salida neta de ClK , con la concomitante salida de agua y recuperación del volumen celular. Estas corrientes de Cl^- y K^+ a través de la membrana, han sido detectadas principalmente utilizando la técnica del "patch clamping" que consiste en el uso de micropipetas que contactando con la membrana celular pueden detectar las corrientes originadas por la salida y entrada de iones. En *Leishmania* debido a la limitación que supone su pequeño tamaño, esta técnica aun no ha sido usada, pero los estudios llevados a cabo en este parásito indican que la respuesta reguladora que conduce a la recuperación del volumen celular tras un choque hipotónico (RVD), es mediada por el canal aniónico HAAC, que permite la salida de aminoácidos ácidos y neutros al medio.

En primer lugar quisimos conocer si en *L. tropica* se producía la activación por choque hipotónico del canal aniónico HAAC que habia sido descrito en *L. major*. Las formas promastigotas del parásito fueron expuestas a choque hipotónico en medio 150 mOsm, el seguimiento del proceso a microscopio nos permitio comprobar que efectivamente *L. tropica* desarrollaba una RVD, ya que tras aumentar de volumen redondeandose, el parásito recuperaba su volumen normal a los 10-15 minutos. Los resultados mostrados en la

gráfica IV.* indican que los parásitos cuando son sometidos a choque hipotónico responden liberando aminoácidos al medio. Esta respuesta es rápida ya que pueden ser detectados a los 5 segundos de exposición al medio hipotónico, y alcanza prácticamente un máximo a los 5 minutos de exposición.

Los mismos experimentos fueron realizados con los parásitos transfectados pKSNEO como control, y pKSN-E. En ambas líneas celulares se desarrolló una respuesta similar a la observada en *L. tropica silvestre*. A fines analíticos se ha representado en la siguiente gráfica los valores de la liberación de aminoácidos a diferentes tiempos, relativos al valor máximo que es alcanzado a los 10 minutos de exposición al medio.

La función obtenida es una hipérbola típica donde la constante de velocidad k (seg^{-1}) para ambas funciones es muy similar, indicando que ambas líneas de parásitos, los transfectados con el gen *ltrpgpE* y los transfectados con el control, liberan aminoácidos al medio aproximadamente con la misma velocidad. Si representamos la liberación de aminoácidos a lo largo del primer minuto, donde la hipérbola es lineal, podemos observar que parásitos transfectados con el gen *ltrpgpE* responden de forma más rápida en la liberación de aminoácidos al medio que los control, si bien no existe una notable diferencia entre las pendientes de ambas curvas.

Para determinar si existe diferencias entre la cantidad de aminoácidos que son liberados por ambas líneas de parásitos transfectados, representamos los valores relativos de aminoácidos liberados a los diferentes tiempos en pKSN-E y pKSNEO, respecto valor máximo de los aminoácidos liberados en la línea control, pKSNEO, que es alcanzado a los 10 minutos. Como se observa en la gráfica ambas líneas liberan aproximadamente la misma cantidad de aminoácidos.

A la vista de estos resultados podemos concluir que ambas líneas transfectadas de *L. tropica*, pKSN-E y pKSNEO, cuando son expuestas a un medio con una osmolaridad 150 mOsm, responden liberando aminoácidos al medio de forma muy similar tanto en la cantidad de aminoácidos, como en la velocidad con que son liberados al medio.

VI. CONCLUSIONES.

1.-Ha sido caracterizado el gen denominado *ltrpgpE*, procedente de la línea de *Leishmania tropica* LRC-L39 resistente a 1 mM de metotrexato. El gen presenta un tamaño de 5031 pb y codifica para una proteína de con un tamaño de 1677 aminoácidos. Esta proteína presenta homología con miembros de la familia de transportadores ABC, principalmente con la glicoproteína-P, *ltrpgpE*, de *Leishmania tarentolae*.

2.- El gen *ltrpgpE* es de copia única, encontrándose diferencias entre el patrón de restricción entre la línea silvestre de *L. tropica* y la línea resistente a metotrexato. Este gen se encuentra localizado en un cromosoma de 1500 kb.

3.- Los ensayos de transfección en *L. tropica* LRC-L39 silvestre muestran que, bajo nuestras condiciones experimentales, el gen *ltrpgpE* no confiere resistencia a metotrexato, derivados de antimonio y arsénico, así como fármacos inductores de multirresistencia. La ausencia de relación entre la expresión del gen *ltrpgpE* y la resistencia a compuestos tóxicos sugiere que posiblemente el aumento de expresión del gen *ltrpgpE* observado en la línea de *L. tropica* resistente a metotrexato y la resistencia cruzada a diversas sustancias en esta línea sea un epifenómeno.

4.- En *L. tropica* transfectada con el gen *ltrpgpE* no se ha encontrado que exista una variación significativa del pH intracelular, con respecto a parásitos control. Esto sugiere que posiblemente la expresión del gen *ltrpgpE* no este modificando el pH intracelular del parásito.

BIBLIOGRAFIA

- Agabian, N.** (1990). Trans Splicing of Nuclear Pre-mRNAs. *Cell*, 61, 1157-1160.
- Altenberg, G. A., Young, G., Horton, J. K., Glass, D., Belli, J. A. and Reuss, L.** (1993). Changes in intra- or extracellular pH do not mediate P-glycoprotein-dependent multidrug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 9735-9738.
- Amador, M.V.** (1993) Alteración del transporte y fenotipo de multirresistencia en *Leishmania tropica* (LRC-L39) reietente a metotrexato. Universidad de Granada.
- Ames, G. F. L.** (1986). Bacterial periplasmic transport systems: structure, mechanism and evolution. *Annu. Rev. Biochem.*, 55, 397-425.
- Ames, G. F. L., Nikaido, K., Groarke, J. and Petithory, J.** (1989). Reconstruction of periplasmic transport in inside-out membrane vesicles: energization by ATP. *J. Biol. Chem.*, 264, 3998-4002.
- Ames, G. F. L., Mimura, C., Holbrook, S. and Shyamala, V.** (1992). Traffic ATPases: a superfamily of transport proteins operating from *E. coli* to humans. *Adv. Enzymol.*, 65, 1-47.
- Anderson, M. P., Gregory, R. J., Thompson, S., Souza, D. W., Paul, S., Mulligan, R. C., Smith, A. E., and Esh, N. J.** (1991). Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science*, 257, 1701-1704.
- Arceci, R. J., Croop, J. M., Horwith, S. B., and Housman, D.** (1988). The gene encoding multidrug resistance is induced and expressed at high levels during pregnancy in the secretory epithelium of the uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 4350-4354.
- Arrebola, R., Olmo, A., Reche, P., Garvey, E. P., Santi, D.V., Ruiz-Perez, L. M. and Gonzalez-Pacanowska, D.** (1994). Isolation and Characterization of a Mutant Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase from Methotrexate-resistant *Leishmania* Cells. *J. Biol. Chem.*, 269, 10590-10596.
- Ashford, R. W., Desjeux, P. and de Raadt, P.** (1992). Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. *Parasitology today*, 8, 104-105.
- Ayala, P., Samuelson, J., Wirth, D., and Orozco, E.** (1990). *Entamoeba histolytica*: Physiology of multidrug resistance. *Exp. Parasitol.*, 71, 169-175.
- Azzaria, M., Schurr, E., Gros, P.** (1989). Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the *mdr-1* gene abolish its ability to confer multidrug resistance. *Mol. Cell. Biol.*, 9, 5289-5297.
- Barnes, D. A., Foote, S. J., Galatis, D., Kemp, D. J., and Cowman, A. F.** (1992). Selection for high-level chloroquine resistance results in deamplification of the *pfmdr1* gene and increased sensitivity to mefloquine in *Plasmodium falciparum*. *EMBO Journal*, 11, 3067-3075.
- Bates, S., E., Lee, J. S., Dickstein, B., Spolyar, M., and Fojo, A. T.** (1993). *Biochemistry*, 32, 9156-9164.
- Bear, C. E., Li, C., Kartner, N., Bridges, R. J., Jensen, T. J., Ramjeesingh, M. and Riordan, J. R.** (1992). Purification and functional reconstitution of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell*, 68, 809-818.

- Beaudet, L. a. G., P.** (1995). Functional dissection of P-glycoprotein nucleotide-binding domains in chimeric and mutant proteins. *J. Biol. Chem.*, 270, 17159-17170.
- Berman, J. D.** (1985). Experimental chemotherapy of leishmaniasis, a critical review. In K. P. Chang Bray, R.S. eds. (Eds.), *Human parasitic diseases* (pp. 111-138). Amsterdam: Elsevier.
- Berman, J. D.** (1988). Chemotherapy for Leishmaniasis: Biochemicals Mechanisms, Clinical Efficacy, and Futures Strategies. *Reviews of Infectious Diseases*, 10, 560-581.
- Berman, J. D., Edwards, N., and Grögl, M.** (1989). Biochemistry of Pentostam resistant *Leishmania*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 40, 159-164.
- Berman, J. D., Ksionski, G., Chapman, W. L., Waits, V.B. and Hanson, W. L.** (1992). Activity of amphotericin b cholesterol dispersion (Amphocil) in experimental visceral leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36, 978-1980.
- Beverley, S. M., Coderre, J. A., Santi, D.V., Schimke, R.T.** (1984). Unstable DNA amplification in methotrexate-resistant *Leishmania* consist of extrachromosomal circles which relocalize during stabilization. *Cell*, 38, 431-439.
- Borst, P.** (1986). Discontinuous transcription and antigenic variation in tripanosomes. *Annu. Rev. Biochem.*, 55, 701-732.
- Borst, P.** (1991). Why Kinetoplast DNA networks? *Trends Genet.*, 7, 139-141.
- Borst, P. and Ouellete., M.** (1995). New mechanisms of drug resistance in parasitic Protozoa. *Annu. Rev. Microbiol.*, 49, 427-460.
- Boscoboinik, D., Gupa, R. S., and Epanand, R. M.** (1990). Investigation of the relationship between altered intracellular pH and multidrug resistance in mammalian cells. *Br. J. Cancer*, 61, 568-572.
- Bouree, P. a. B., L.** (1993). Leishmaniasis: report of 33 cases and a review of the literature. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 16(4), 251-265.
- Bruggemann, P. E., Germann, A. U., Gottesman, M. M., Pastan, I.** (1989). Two different regions of P-glycoprotein are photoaffinity-labeled by azidopine. *J. Biol. Chem.*, 264, 15483-15488.
- Burrows, C. M., Blum J. J.** (1991). Effects of hyperosmotic stress on alanine content of *Leishmania major* promastigotes. *J. Protozool.*, 38, 47-52.
- Buschman, E., and Gros, P** (1991). Functional anlysis of chimeric genes obtained by exchanging homologous domains of the mouse *mdr1* and *mdr2* genes. *Mol. Cell. Biol.*, 11, 595-603.
- Callahan, H. L., and Beverley, S. M.** (1991). Heavy metal resistance: a new role for P-glycoproteins in *Leishmania*. *J. Biol. Chem.*, 266, 18427-18430.
- Callahan, H. L. a. B., S. M.** (1992). A member of the Aldoketo reductase family confers methotrexate resistance in *Leishmania*. *J. Biol. Chem.*, 266, 18427-18430.
- Callahan, H. L., Roberts, W. L., Rainey, P. M., Beverley, S. M.** (1994). The PGPA gene of *Leishmania major* mediates antimony (SbIII) resistance by decreasing influx and not by increasing efflux. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 68, 145-149.

- Carle, G. F., and Olson, M.** (1986). An electrophoretic karyotype for yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 8360-8364.
- Carter, N. S., and Fairlamb, A. H.** (1993). Arsenical-resistant trypanosomes lack an unusual adenosine transporter. *Nature*, 361, 173-176.
- Chambers, T. C., Zheng, B., and Kuo, J. F.** (1992). Regulation by phorbol ester and protein kinase C inhibitors, and protein phosphatase inhibitor (okadaic acid), of P-glycoprotein phosphorylation and relationship to drug accumulation in multidrug-resistant human KB cells. *Mol. Pharmacol.*, 41, 1008-1015.
- Chambers, T. C., Germann, U. A., Gottesman, M.M., Pastam, I., Kuo, J. K., Ambudkar, S. V.** (1995). Bacterial Expression of the Liker Region of Human MDR1 P-glycoprotein and Mutational Analysis of Phosphorylation Sites. *Biochemistry*, 34, 14156-14162.
- Chang, K.-P., and Bray R. S., eds.** (1985). *Leishmaniasis*. Elsevier Science Publisher.
- Chaudhary, P. M. a. R., I. B.** (1992). Activation of MDR1(P-glycoprotein) gene expression in human cells by protein kinase C agonists. *Oncol. Res.*, 4, 281-90.
- Cheng, S. H., Rich, D. P., Marshall, J. Gregory, R. J., Welsh, M. J. and Smith, A. E.** (1991). Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependant protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell*, 66, 1027-1036.
- Chiquero, M. J., Olmo, A., Navarro, P., Ruiz-Perez, L. M., Castanys, S., Gonzalez-Pacanowska, D., Gamarro, F.** (1994). Amplification of the locus H in *L.infantum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1227, 188-194.
- Choi, K., Chen C.-J., Kriegler, M., Roninson, I. B.** (1988). An altered pattern of cross-resistance in multidrug-resistant cells results from spontaneous mutations in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene. *Cell*, 53, 519-529.
- Chomczynski, P., and Sacchi.** (1987). Single step method of RNA isolation by acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal. Biochem.*, 162, 156-159.
- Chow, L., M. C., Wong, Alexander K.C., Ullman B. and Wirth, F. D.** (1993). Cloning and functional analysis of an extrachromosomally amplified multidrug resistance-like gene in *Leishmania enrietti*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 60, 195-208.
- Chu, G., Vollrath, D. y Davis, W.** (1986). Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric field. *Science*, 234, 1582-1585.
- Coderre, J. A., Beverley, S.M., Schimke, R.T., and Santi, D.V.** (1983). Overproduction of a bifunctional thymidilate sintase-dihydrofolate reductase and DNA amplification in methotrexate-resistant *Leishmania*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 2132-2136.
- Cole, S. P. C., Bhardawaj, G., Gerlach, J. H., Mackie, J. E., Grant, C. E., Almquist, K. C., Stewart, A. J., Kurz, E. U., Duncan, A.M. V. and Deely, R. G.** (1992). Overexpression of a transporter gene in multidrug-resistance human lung cancer cell line. *Science*, 258, 1650-1654.

- Collins, F. S.** (1992). Cystic Fibrosis: Molecular Biology and Therapeutic Implications. *Science*, 256, 774-779.
- Comeau, A. M., S.I. Miller, and D. F. Wirth** (1986). Chromosome localitation of four genes in *Leishmania*. *Molecular Biochemical Parasitology*, 21, 161-169.
- Cowman, A. F., Karcz, S., Galatis, D., and Culvenor, J. G.** (1991). A P-glycoprotein homologue of *Plasmodium falciparum* is localized on the digestive vacuole. *J. Cell Biol.*, 113, 1033-1042.
- Cowman, A. F., Galatis, D. and Thompson, J. K.** (1994). Selection for mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* is linked to amplification of the *pfmdr1* gene and cross-resistance to halofantrine and quinine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 1143-1147.
- Croft, S. L., Davidson, R.N., & Thornton, E.A.** (1991). Liposomal amphotericina B in the treatment of visceral leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 28, B111-B118.
- Cruz, A. K., Titus R., Beverley, S.M.** (1993). Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in *Leishmania* by targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 15, 1599-1603.
- Curotto de Lafaille, M. A., Laban, A.,and Whirth D.F.** (1992). Gene expression in *Leishmania*: Analysis of essential 5' DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 2703-2727.
- Dairling, T., Burrows, C. , Blum, J.J.** (1990). Rapid shape change of ninhydrin-positive substances by *Leishmania major* in response to hypoosmotic stress. *J. Protozool.*, 37, 505-510.
- Dano, K.** (1973). Active outward transport of daunorobicin in resistant Ehelich ascites tumr cels. *Biochim et Biophys Acta*, 323, 466-483.
- Davidson, R. N., Croft S.L., Scott, A.G., Maini, M., Moody, A.H. & Bryceson, A. D. M.** (1991). Liposomal amphotericin B in drug-resistant visceral leishmaniasis. *Lancet*, 337, 1061-1062.
- Davidson, R. N. a. C., S. L.** (1993). Recent Advances in the Tretment of Visceral Leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. and Hyg.*, 87, 130-131.
- Descoteaux, S., Ayala, P., Orozco, E., □and Samuelson, J.** (1992). Primary sequences of two P-glycoprotein genes of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biol. Parasitol.*, 54, 201-212.
- Devereux, J., Haeberli, P. and Smithies, O.** (1984). Improved tools for biological sequece analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 2444-2448.
- Devine, E. S., Ling, V., Melera, W. P.** (1992). Amino acid substitutions in the sixth transmembrane domain of P-glycoprotein alter multidrug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 4564-4568.
- Dewes, H., Ostergaard, H. L. and Simpson, L.** (1986). Impaired drug uptake in methotrexate-resistant *Crithidia fasciculata* without changes in dihydrofolate reductase activity or gene amplification. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 19, 149-161.

- Draper, C. C. H., M., Kilimali, V.A. y Brubaker, G.** (1988). *J. Trop. Med. Hyg.*, 91, 265-273.
- Ehring, G. R., Osipchuk Y. V. and Cahalan, M. D.** (1994). Swelling-activated chloride channels in multidrug-sensitive and-resistant cells. *The Journal of General Physiology*, 104, 1129-1161.
- Ellenberger, T. E. a. B., S.M.** (1989). Multiple drug resistance and conservative amplification of the H region in *Leishmania major*. *J. Biol. Chem.*, 264, 15094-15103.
- Ellenberger, T. E. a. B., S.M.** (1987b). Reductions in methotrexate and folate influx in methotrexate-resistant lines of *L. major* are independent of R or H region amplification. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 13501-13506.
- Fairlamb, A. H., Hendreson, G. B., Bacchi, C.J., Cerami, A.** (1989). Trypanothione is the primary target for arsenical drugs against African trypanosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 86, 2607-2611.
- Fairlamb, A. H., Carter, N. S., Cuningham, M., Smith, K** (1992). Characterisation of melarsen-resistant *Trypanosoma brucei brucei* with respect to cross-resistance to other drugs and trypanothione metabolism. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 53, 213-222.
- Fairlamb, A. H. a. C., A.** (1992). Metabolism and Functions of Trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu. Rev. Microbiol.*, 46, 695-729.
- Feinberg, A. P., and Vogelstein, B.** (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, 132, 6-13.
- Fernandes, A. P., Kimberlyn N., and Beverley S.M.** (1993). Evolution of nuclear ribosomal RNAs in Kinetoplastid protozoa: Perspectives on the age and origins of parasitism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90, 11608-11612.
- Foote, S. J., Thompson, J.K., Cowman, A.F. and Kemp, D.J.** (1989). Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of *P.falciparum*. *Cell*, 57, 921-930.
- Foote, S. J., Thompson, J.K., Cowman, A. F. y Kemp, D.J.** (1990). Amplification. *Nature*, 345, 255-258.
- Foote, S. J., Galatis, D., and Cowman, A. F.** (1990). Aminoacids in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum* involved in cycloguanil resistance differ from those involved in pyrimethamine resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 3014-3017.
- Futscher, B. W., Abbaszadegan, M. R., Domann, F., Dalton, W.** (1994). Analysis of MRP mRNA in Mitoxantrone-selected, multidrug-resistant human tumor cells. *Biochemical Pharmacology*, 47, 1601-1606.
- Gamarro, F., Chiquero, M. J., Amador, M.V., Légaré, D., Oullette M. and Castanys, S.** (1994). P-Glycoprotein Overexpression in Methotrexate-Resistant *Leishmania tropica*. *Biochemical Pharmacology*, 47, 1939-1947.
- Garvey, E. P., and Santi, D.V.** (1986). Stable amplified DNA in drug-resistant *Leishmania* exists as extrachromosomal circles. *Sciences*, 233, 535-540.

Georges, E., Bradley, G., Garipey, J., Ling, V. (1990). Detection of P-glycoprotein isoforms by gene-specific monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 152-156.

Georges, E., Zhang, J.T., Ling, V. (1991). Modulation of ATP and drug binding by monoclonal antibodies against P-glycoprotein. *J. Cell Physiol.*, 148, 479-484.

Germann, U. A., Willingham, M. C., Pastan, I. and Gottesman, M. M. (1990). Expression of the human multidrug transporter in insect cells by a recombinant baculovirus. *Biochemistry*, 29, 2295-2303.

Gill, D. R., Hyde, S. C., Higgins, C. F., Valverde, M. A., Mintening, G. M., Sepulveda, F. V. (1992). Separation of drug transport and chloride channel functions of human multidrug resistance P-glycoprotein. *Cell*, 71, 23-32.

Glaser, T. A., Baatz, J. E., Kreishman, G .P., Mukkada, A. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 7602-7606.

Goldstein, L. a. M., M. (1994). *J. Exp. Zool.*, 268, 133-138.

Gonzalez, A., Lerner, T.J., Huescas, M., Sosa-Pineda, B., Nohgueira, N and Lizardi P. (1985). Apparent generation of segmented m RNA from two separated tandem gene families in *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Research*, 13, 5789-5804.

Gottesman, M. M. a. P., I. (1988). Resistance to multiple chemotherapeutic agents in human cancer cells. *Trends Pharmacol. Sci.*, 9, 54-58.

Gottesman, M. M. a. P., I. (1993). Biochemistry of multidrug resistance mediated by multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.*, 62, 358-427.

Greenberger, L. M. (1993). Major photoaffinity drug labeling site for iodoaryl azidoprazosin in P-glycoprotein are within, or immediately C-terminal to, transmembrane domains 6 and 12. *J. Biol . Cem.*, 268, 11417-11425.

Grondin, K., Papadopulus, B. and Oullette, M. (1993). Homologous recombination between direct repeat sequences yields P-glycoprotein containing amplicons in arsenite resistant *Leishmania*. *Nucleic Acids Research.*, 21, 1895-1901.

Gros, P. G., Croop, J. and Housman, D. (1986). Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicating strong homology to bacterial transport proteins. *Cell*, 47, 371-380.

Gros, P., Dhir, R. Croop, J., Talbot, F. (1991). A single amino acid substitution strongly modulates the activity and substrate specificity of the mouse *mdr1* and *mdr3* drug efflux pumps. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 7289-7293.

Grögl, M., Odula, A. M. J., Cordero, L. D. C., and Kyle, D. E. (1989). *Leishmania* spp: development of Pentostam- resistant clones in vitro by discontinuous drug exposure. *Exp. Parasitology*, 69, 78-90.

Grögl, M., Thomason, T. N. and Franke, E. D. (1992). Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 47(117-126).

Gueiros-Filho, F., Gomes, F.A., Araripe, J.R., Lopes, U.G. (1992). Characterization of multiple drug resistance genes in *Leishmania amazoniensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 87, 42-43.

- Hajduk, S. L., Harris M. E., Pollard, V. W.** (1993). RNA editing in kinetoplastid mitochondria. *FASEB Journal*, 7.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166(557-580).
- Hanson, S., Beverley, S. M., and Ullman, B.** (1992). Unstable amplification of two extrachromosomal elements in alpha-difluoromethylornitina-resistant *Leishmania donovani*. *Mol. Cell. Biol.*, 12, 5499-5507.
- Hanson, S., Adelman, J., Ullman, B.** (1992a). Amplification and molecular cloning of the ornithine decarboxylase gene of *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.*, 264, 2350-2359.
- Hardy, S. P., Goodfellow, H. R., Valverde, M. A., Gill, D. R., Sepulveda, F. V., and Higgins C. F.** (1995). *EMBO J.*, 14, 68-75.
- Haussinger, D., Lang, F., and Wolfgang, G.** (1994). *Am. J. Physiol.*, 80, 938-945.
- He, M., Wilde, A., and Kaderbhai, M. A.** (1990). A simple single procedure for small-scale preparation of *Escherichia coli* plasmids. *Nucleic Acids Research*, 18(1660).
- Henderson, D. M., Sifri C. D., Rodgers, M., Wirth, D.F., Hendrickson N., and Ullman B.** (1992). Multidrug Resistance In *Leishmania donovani* is Conferred by Amplification of a Gene Homologous to the Mammalian *mdr1* Gene. *Mol. and Cell. Biol.*, 12, 2855-2865.
- Hendrickson, N., Sifri, C.D., Allen, T., Wirth, D.F. and Ullman B.** (1993). Molecular characterization of the *ldmdr1* multidrug resistance from *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem, Parasitol.*, 60, 53-64.
- Higgins, C. F. a. G., M. M.** (1992). Is the multidrug transporter a 'flippase'? *Trends biochem. Sci.*, 17, 18-21.
- Higgins, C. F.** (1992). ABC TRANSPORTER: From Microorganisms to Man. *Anu. Rev. Cell. Biol.*, 8, 67-113.
- Hightower, R. C., Ruiz-Perez, L. M., Wong, M.L., Santi D.V.** (1988). Extrachromosomal elements in the lower eukaryote *Leishmania*. *J. Biol. Chem.*, 263, 169970-76.
- Hoepflich, P. D.** (1992). Clinical use of amphotericin B and derivatives: lore, mystique and fact. *Clinical Infectious Diseases*, 14, S114-S119.
- Hoffman, E. a. S., L.** (1989). *Physiol. Rev.*, 69, 315-382.
- Horio, M., Gottesman, M. M. and Pastan, I.** (1988). ATP-dependent transport of vinblastine in vesicles from human multidrug-resistant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 3580-3584.
- Hugh, M., Carruthers, V. B., Hartman, C., Sherman, D.S., Cross, G. M. A. and Clayton C.** (1993). A possible role for the 3'-untranslated region in development regulation in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 61, 87-96.
- Hunter, P., Carter, E., Murdock, P., Willians, L., Scott-Wood, G.** (1992). Comparative activity of a new polyene, BRL 49594A and amphotericin B against fungal

and mammalian cells. In 32nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, (pp. 1049). California.

Jackson, P. R., Lawrie, J.M., Stiteler, J.M., Hawkins, D.W., Wohllhieter, J.A. and Rowtin, E.D. (1986). *Veter. Parasitol.*, 20, 195-215.

Jackson, J. E., Tally, J. D., Elis, W. Y., Mebrahtu, Y. B., Lawyer, P. G., Were, J. B., Reed, S. G., Panisko, D. M., and Limmer, B. L. (1990). Quantitative in vitro drug potency and drug susceptibility evaluation of *Leishmania* spp. from patients inresponsive to pentavalent antimony therapy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 43, 464-480.

Kapler, G. M., Zhang, K., Beverley, S.M. (1990). Nuclease mapping and DNA sequence analysis of transcripts from the dihydrofolate reductase-thymidylate synthetase (R) region of *Leishmania major*. *Nucleic Acids Res.*, 18, 6399-6408.

Karplus, P. A., Pai, E.F., Schulz, G.E. (1989). A crystallographic study of the glutathione binding site of glutathione reductase at 0.3-nm resolution. *Eur. J. Biochem.*, 178, 693-703.

Kartner, N., Hanrahan, J. W., Jensen, T. J., Naismith, A. L., Sun, S., Ackerley, C. A., Reyes, E. F., Tsui, L.-C., Rommens, J. N., Bear, C. E. and Riordan, J. R. (1991). Expression of the cystic fibrosis gene in nonepithelial invertebrate cells produces a regulated anion conductance. *Cells*, 64, 681-692.

Kast, C., Canfield, V., Levenson, R, Gros, P. (1995). Membrane topology of P-glycoprotein as determined by epitope insertion: transmembrane organization of the N-terminal domain of mdr3. *Biochemistry*, 34, 4402-4411.

Katakura, K. y. C., K.P. (1989). H DNA amplification in *Leishmania* resistant to both arsenite and methotrexate. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 34, 189-192.

Kaur, K., Coons, T., Emmett, K., and Ullman B. (1988). Methotrexate-resistant *Leishmania donovani* Genetically Deficient in the Folate-Methotrexate Transporter. *J. Biol. Chem.*, 263, 7020-7028.

Keizer, H. G. a. J., H. (1989). Increased cytosolic pH in multidrug resistance human lung tumor cells: effect of verapamil. *J. Natl. Cancer. Inst*, 81, 706.

Kerbey, B. R., and Detke, S. (1993). Reduced purine accumulation is encoded on an amplified DNA in *Leishmania mexicana amazonensis* resistant to toxic nucleosides. *Mol. Biochem. Parasitol*, 60, 171-185.

Krogstad, D. J., Gluzman, I.Y., Kyle, D.E., Odula. A.M., Martin, S.K., Milhous, W.K. and Schlesinger, P. (1987). Efflux of Chloroquine from *Plasmodium falciparum*: Mechanism of Chloroquine Resistance. *Science.*, 238, 1283-1285.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

Laird, P. (1989). Trans-Splicing in Trypanosomes. Archaism or Adaptation. *Trends in Genetic*, 5, 2204-208.

Landearf, S. M., Miller, S.I. & Wirth, D. F. (1986). *Molecular Biochemical Parasitology*, 21, 235-245.

- Langford, C. K., Ullman, B., Landfeare, S. M.** (1992). Leishmania: Codon Utilization of Nuclear Genes. *Experimental Parasitology*, 74, 360-361.
- Leiby , D. A., Kanesa-thasan N., Scott P. and Nacy C.A.** (1994). Leishmaniasis. In F. K. Zenbaum (Eds.), *Parasitic Infection and the Immune System*
- Légaré, D., Hettema, E., Oullette, M.** (1994). The P-glycoprotein-related gene family in Leishmania. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 68, 81-91.
- Lightall, G. K. a. G. S. H.** (1992). The Chromosomes of Leishmania. *Parasitology Today*, 8, 192-199.
- Ling, V., Kartner, N., Sudo, T., Siminovitch, L., Riordan, J. R.** (1983). The multidrug resistance phenotype in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Treat. Rep.*, 67, 869-874.
- Liu, X., and Chang, K.P.** (1992). The 63-Kilobase Circular Amplicon of Tunicamycin-Resistant *Leishmania amazonensis* Contains a Functional N-Acetylglucosamine-1-Phosphate Transferase Gene That Can Be Used as a Dominant Selectable Marker in Transfection. *Mol. Cell. Biol.*, 12, 4112-4122.
- Loo, T. W., and Clarke, D. M.** (1993b). Fuctional consequences of phenylalanine mutations in the predicted transmembrane domain of P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, 268, 19965-19972.
- Loo, W. T., and Clarke, D. M.** (1993a). Functional consequences of proline mutations in the predicted transmembrane domain of P-glycoprotein. *J.Biol. Chem.*, 268, 3143-3149.
- Loo, T. W. a. C., D. M.** (1994). Reconstitution of drug-stimulated ATPase activity following co-expression of each half of human P-glycoprotein as separate polypeptides. *J. Biol. Chem.*, 269, 7750-7755.
- Loo, T. W. a. C. D. M.** (1995). Membrane topology of a cysteine-less mutant of human glicoproteína-P. *J. Biol. Chem.*, 270, 843-848.
- Loo, T. W. a. C. D. M.** (1995). Associations between domains and between domains and molecular chaperones. *J. Biol. Chem.*, 270, 21839-45.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Lukie, B., Krouse, M. E., Harper, K. L., Law, T. C., and Wine, J. J.** (1994). *Am. J. Physiol*, 267, C650-C658.
- Luz, J. G., Wei, L.-Y., Basu, S., Roepe, P. D.** (1994). Transfection of mu MDR1 inhibits Na⁺-independent Cl⁻/HCO₃⁻ exchange in Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry*, 33, 7239-7249.
- Martin, S. K., Oduola, A.M., y Milhous, W.K.** (1987). *Science*, 235, 899-901.
- Maslov, D. A., Avila, H.A., Lake, J.A.,and Simpsons L.** (1994). Evolution of RNA editing in kinetoplastid protozoa. *Nature*, 368, 345-348.
- McEwan, G. T., Hunter, J., Hirts, B. H., and Simmons, N. L.** (1992). Volume-activated Cl⁻ secretion and trans epithelial vinblastine secretion mediated by P-

glycoprotein are not correlated in cultured human T84 intestinal epithelial layers. FEBS letters, 304, 233-236.

Meade, J. C., Shaw, J., Lemaster, S., Gallanher, G., and Stringer, J. (1987). Mol. Cell. Biol, 7, 3937-3946.

Moo Kwon, H. (1993). In Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation (pp. 383-394). Kevin Strange.

Morris, I. D., Greenberger, L. M., Bruggemann, Cardarelli, C., Gottesman, M. M., Pastan, I, Seamon, B.K. (1994). Localization of the forskolin binding sites to both halves of P-glycoprotein: similarity of the sites labeled by forskolin and prazosin. Mol. Pharmacol., 46, 329-337.

O.M.S. (1990). Lucha contra las leishmaniasis. Ginebra:

Orozco, E., Hernández, F., and Rodríguez, M. A. (1985). Isolation and characterization of *Entamoeba histolytica* mutants resistance to emetine. Mol. Biochem. Parasitol.

Orr, G. A., Han, E. K.-H., Browne, P. C., Nieves, E., O' Connor, B. M., Huang Yang, C.-P., Horwitz, S.B. (1993). Identification of the major phosphorylation domain of murine *mdr1b* P-glycoprotein. J. Biol. Chem., 268, 25054-25062.

Ouellette, M., Fase-Fowler, F., and Borst, P. (1990). The amplified H circle of methotrexate-resistant *Leishmania tarentolae* contains a novel P-glycoprotein gene. EMBO Journal, 9, 1027-1033.

Ouellette, M., Hettema, E., Wüst, D., Fase-Fowler, F., and Borst, P. (1991). Directed and inverted DNA repeats associated with P-glycoprotein gene amplification in drug resistant *Leishmania tarentolae*. EMBO J., 10, 1009-1016.

Palfi, Z., Günzl, A., Cross, M., and Bindereif, A (1991). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88, 9097-9101.

Papadopoulos, B., Roy, G., Ouellette, M. (1992). A novel antifolate resistance gene on the amplified H circle of *Leishmania*. EMBO J., 11, 3601-3608.

Papadopoulos, B., Roy, G., Dey, S., Rosen, B.P., and Ouellette, M. (1993). Contribution of the *Leishmania* P-glycoprotein-related Gene *ltpgpA* to Oxanion Resistance. J. Biol. Chem., 269, 11980-11986.

Peferfferkorn, E. R., Eckel, M.E. and Mc Adams, E. (1989). *Toxoplasma gondii*: The biochemical basis of resistance to Emimycin. Exp. Parasitol., 69, 129-164.

Peterson, D. S., Walliker, D.W. and Wellans, T.E. (1988). Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidilate synthase confers resistance to pyrimethamine in *falciparum* malaria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 9114-9118.

Peterson, D. S., Milhons, W.K., and Wellems, T.E. (1990). Molecular basis of differential resistance to cycloguanil and pyrimethamine in *Plasmodium falciparum*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 87, 3018-3022.

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.*, 5188-5199.
- Rich, D. P., Gregory, R. J., Anderson, M.P., Manavalan, P., Smith, A, E.** (1991). Effect of deleting the R-domain on CFTR-generated chloride channels. *Science*, 253, 205-207.
- Roepe, P. D., Wei, L.-Y., Cruz, J. and Carlson, D.** (1993). Lower electrical membrane potential and altered pHi homeostasis in multidrug-resistant (MDR) cells: Further characterization of a series of MDR cell lines expressing different levels of P-glycoprotein. *Biochemistry*, 32, 11042-11056.
- Rommens, J. M.** (1991). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 88.
- Rosala, A., Galletta, L. J. V., Gruenert, D. C., and Romeo, G.** (1994). Volume sensitive chloride currents in four epithelial cell lines are not directly correlated with the expression of the MDR1 gene. *J. Biol. Chem.*, 269, 1432-1436.
- Ruetz, S. G., P.** (1994). Phosphatidylcholine translocase a physiological role for the *mdr2* gene. *Cell*, 77, 1071-1081.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Sci. USA*, 74, 5463-5467.
- Sarkadi, B. a. P., J.** (1991). *Biochim. Biophys. Acta*, 1071, 407-427.
- Schinkel, A. H., Kemp. S., Dolle, M., Rudenko, G., Wangenaar, E.** (1993). N-Glycosilation and deletion mutants of the human MDR1 P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, 268, 7474-7481.
- Schinkel, A. H., Smit, J. J. M., van Tellingen, O., Beijnen, J. H., Waenaar, E., van Deemter, L., Mol, C. A. A., van der Valk, M. A., Robanus-Maandag, E. C., te Riele, H. P. J., Berns, A. J. M. and Borts, P.** (1994). Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein genes leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*, 77, 491-502.
- Sharma, S. a. R., D. R.** (1995). Cloning, Overexpression, Purification and Characterization of the Carboxyl-terminal Nucleotide Binding Domain of P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, 270, 14085-14093.
- Simon, S., Roy, D., and Schindler, M.** (1994). Intracellular pH and the control of multidrug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 1128-1132.
- Simpson, L. a. S., J.** (1989). RNA editing and the mitochondrial criptogenes of kinetoplastid protozoa. *Cell*, 57, 355-366.
- Skach, W. R., Calayag, M. C. and Lingappa, V. R.** (1993). Evidence for an alternated model of human P-glycoprotein structure and biogenesis. *J. Biol. Chem.*, 268, 6903-6908.
- Skach, W. R., and Lingappa, V. R.** (1994). Transmembrane orientation and topogenesis of the third and fourth membrane-spanning regions of human P-glycoprotein (MDR1). *Cancer Res.*, 54, 3202-3209.
- Southern, E.** (1975). Detection of specific genes among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98, 503.

Strange, M. E. C. y. K. (1989). Anisosmotic cell volume regulation: a comparative view. *Am. J. Physiol*, 257, C159-C173.

Strange, K. a. J., P. (1995). *Kidney Int.*, 48, 994-1033.

Sturm N. R., S., L. (1991). Leishmania tarentolae minicircles of different sequence classes encode single guides RNAs located in the variable region approximately 150 pb from the conserved region. *Nucleic Acids Research*, 19, 6277-6281.

Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I., Willigham, M. C. (1987). Cellular localization of the multidrug resistance gene product in normal human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 7735-7738.

Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M. M., Pastan, I., and Willigham, M. C. (1989). Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: evidence for localization in brain capillaries and cross-reactivity of one antibody with a muscle protein. *J. Histochem. Cytochem.*, 37, 159-164.

Thiemann, M., and Simpson (1994). Disruption of RNA Editing in Leishmania tarentolae by the loss of minicircle- encode guide RNA genes. *EMBO Journal*, 13, 5689-5700.

Tschudi, C. a. U., E. (1990). *Cell*, 61, 459-466.

Ueda, K., Cardarelli, C., Gottesman, M.M., and Pastan, I. (1987). Expression of a full-length cDNA for the human "mdr1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 3004-3008.

Ullman, B., Carrero-Valenzuela, E., and Coons T. (1989). Leishmania donovani: isolation and characterization of sodium stibogluconate (Pentostan)-resistant cell lines. *Exp. Parasitology*, 69, 157-163.

Upcroft, J. A., Upcroft, P. and Boreham P.F.L. (1990). *Int. J. for Parasitol.*, 20, 489-496.

Valverde, M. A., Diaz, M., Sepulveda, F. V., Gill, D. R., Hyde, S. C., and Higgins, C. F. (1992). Volume-regulates chloride channels associated with the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Nature*, 355, 830-833.

van Es, H. H. G., Karcz, S., Chu, F., Cowman, A. F., Vidal, S., Gros, P. and Schurr, E. (1994a). Expression of the plasmidial pfmdr1 gene in mammalian cells is associated with increased susceptibility to chloroquine. *Mole. Cell. Biol.*, 14, 24419-24428.

van Es, H. H. G., Renkema, H., Aerts, H., Schurr, E. (1994b). Enhanced lysosomal acidification lead to increased chloroquine accumulation in CHO cells expressing the pfmdr1 gene. *Mol.Bioch. Parasitol.*, 68, 209-219.

Versantvoort, C. H., Broxterman, H. J., Bagrij, T. Scheper, R. J., Twentyman, P. R. (1995). Regulation by glutathione of drug transport in multidrug-resistant human lung tumour cell lines overexpressing multidrug resistance-associated protein. *Br. J. Cancer*, 72, 82-89.

- Vieira, J., and Messing, J.** (1982). The pUC plasmids, and M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*, 19, 259-268.
- Vieira, L., Lavan, A., Dagger, F., Cabantchik, I. Z.** (1994a). The Role of Anions in pH Regulation of *Leishmania major*. *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 16254-16259.
- Vieira, L., Slotki, I. and Cabantchik, Z.I.** (1994b). Chloride conductive pathways which support electrogenic H⁺ pumping by *Leishmania major* promastigotes. *J. Biol. Chem.*, 270, 5209-5304.
- Vieira, L., and Cabantchik, I.Z.** (1995b). Bicarbonate ions and pH regulation of *Leishmania major* promastigotes. *FEBS Letters*, 361, 123-126.
- Volkman, S. K., Cowman, A.F. and Wirth** (1995). Functional complementation of the *ste6* gene of *Saccharomyces cerevisiae* with the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum*.
- Weigle, M. J., B., J.F.; Teng, J.P.; Czajkowski, R.C.; Leimgruber W.** (1972). *J. Amer. Chem. Soc.*, 94, 4052.
- Wellems, T. E., Panton, L.J., Gluzman, I.Y., do Rosario, V.E., Gwadz, R.W., Walker, J.A., and Krogstad, D.J.** (1990). Chloroquine resistance not linked to *mdr*-like genes in *Plasmodium falciparum* cross. *Nature*, 345, 253-255.
- Welsh, M. J. a. S., A. E.** (1993). Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell*, 73, 1251-1254.
- Wilson, C. M., Serrano, A.E., Wasley, A., Bogenschutz, M.P., Shankar, A.H., and Wirth D.F.** (1989). Amplification of a gene related to mammalian *mdr* genes in drug resistant *Plasmodium falciparum*. *Science*, 244, 1184-1186.
- Wilson, K., Collart, F.R., Huberman, E., Stringer, J.R, and Ullman B.** (1991). Amplification and molecular cloning of the IMP dehydrogenase gene in *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.*, 266, 1665-1671.
- Wilson, K., Beverley, S.M. and Ullman, B.** (1992). Stable amplification of a linear extrachromosomal DNA in mycophenolic acid-resistant *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 55, 197-206.
- Wirth, D. F.** *Molecular Biology of Leishmania*.
- Yoshimura, A., Kuwazuru, Y., Sumizawa, T., Ichikawa, M., Ikeda, S.I.** (1991). Cytoplasmic orientation and two domain structure of the multidrug transporter, P-glycoprotein, demonstrated with sequence specific antibodies. *J. Biol. Chem.*, 264, 16282-91.
- Zalis, M. G., Wilson C. M., Zhang, Y. and Wirth, D. F.** (1993). Characterization of the *pfmdr2* gene for *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 62, 83-92.
- Zaman, G. J. R., Versnatvoort, C. H. M., Smit J. J. M., Eijdens, W. H. M., Haas de, M., Smith, A. J., Broxterman, J., Mulder, N.H., Vries de, E. G. E., Baas, F., and Borst, P.** (1993). Analysis of the expression of MRP, the gene for a new putative transmembrane drug transporter, in human multidrug resistant lung cancer cell lines. *Cancer Research*, 53, 1747-1750.

Zaman, G. J. R., Flens, M. J., Leusden van, M. R., Haas de M., Milder, H. S., Lankelma, J., Pinedo, H. M., Scheper, R. J., Baas, F., Broxterman, H. J. and Borts, P (1994). The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 8822-8826.

Zhang, J.-T. a. L., V. (1991). Study of membrane orientation and glycosylated extracellular loops of mouse P-glycoprotein by in vitro translation. *J. Biol. Chem.*, 266, 18224-18232.

Zhang, J.-T., Duthie, M., Ling, V. (1993). Membrane topology of the N-terminal half of the hamster P-glycoprotein molecule. *J. Biol. Chem.*, 268, 15101-15110.

Zilberstein, D., Philosoph, H., and Geptein, A. (1989). *Mol. Biochem. Parasitol.*, 36, 109-118.

Zilberstein, D. (1993). Transport of Nutrients and Ions across Membranes of Trypanosomatid Parasites. *Advances in Parasitology*, 32, 262-289.

Zolg, J. W., Plitt, J.R., Chen, G-X and Palmer, S. (1989). Point mutations in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene as the molecular basis for pyrimethamine-resistance in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 36, 253-262.