

universidad
del león



ESTUDIO DE LAS REGIONES IMPLICADAS EN LA
FUNCIONALIDAD Y RESISTENCIA A FÁRMACOS DE LA
ADN TOPOISOMERASA IB DE LEISHMANIA

TESIS DOCTORAL

CHRISTOPHER FERNÁNDEZ PRADA



European
Social
Fund



Junta de
Castilla y León

DPTO. CIENCIAS BIOMÉDICAS

MARZO 2013

El presente trabajo se ha podido realizar gracias a la beca de investigación PIRTU de la Junta de Castilla y León y el Fondo Social Europeo, junto con los proyectos AGL2009-11935/GAN y AGL2010-16078/GAN del Ministerio de Ciencia y Tecnología, los proyectos PI09/0448, PI12/00104 y la Red de Enfermedades Tropicales RICET del Instituto de Salud Carlos III, y el proyecto Gr238 de la Junta de Castilla y León.

ÍNDICE

| | |
|---|----------|
| 1.- Revisión bibliográfica | 3 |
| 1.1.- Visión histórica de la leishmaniosis | 3 |
| 1.2.- El género <i>Leishmania</i> | 5 |
| 1.2.1.- El ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp. | 9 |
| 1.2.2.- Leishmaniosis | 13 |
| 1.2.3.- Formas clínicas de la enfermedad | 17 |
| 1.3.- Respuesta inmune del hospedador. Mecanismos de evasión | 20 |
| 1.4.- Tratamiento de la leishmaniosis: quimioterapia actual y nuevas dianas bioquímicas | 24 |
| 1.5.- ADN topoisomerasas: estructura y función | 29 |
| 1.5.1.- Restricciones topológicas del ADN | 29 |
| 1.5.2.- Las ADN Topoisomerasas | 32 |
| 1.6.- La TopIB humana (hTopIB) | 37 |
| 1.6.1.- Estructura | 37 |
| 1.6.2.- Mecanismo de catálisis y relajación | 42 |
| 1.7.- La TopIB de <i>Leishmania</i> | 45 |
| 1.8.- Las TopIB como diana terapéutica | 49 |
| 1.8.1.- La camptotecina (CPT) | 49 |
| 1.8.2.- Derivados poliheterocíclicos no camptotecínicos | 55 |
| 1.8.3.- Otros inhibidores de la TopIB | 57 |

| | |
|---|----|
| 2.- Objetivos | 61 |
| 3.- Material y Métodos | 65 |
| 3.1.- Material biológico | 65 |
| 3.1.1.- Cepas bacterianas | 65 |
| 3.1.2.- Cepas de levaduras | 65 |
| 3.1.3.- Cepas de <i>Leishmania</i> | 66 |
| 3.2.- Vectores | 66 |
| 3.2.1.- pBluescript SK (+/-) | 66 |
| 3.2.2.- pESC-URA GAL | 67 |
| 3.2.3.- pXG-GFP+2 | 67 |
| 3.2.4.- YCpGAL1-hTOP1 | 67 |
| 3.3.- Medios de cultivo | 68 |
| 3.3.1.- Medio Luria-Bertani (LB) | 68 |
| 3.3.2.- Medio YPD | 68 |
| 3.3.3.- Medio S.C. ura- | 68 |
| 3.3.4.- Medio SOC | 69 |
| 3.3.5.- Medio M199 | 69 |
| 3.4.- Mantenimiento de microorganismos | 70 |
| 3.4.1.- Bacterias y levaduras | 70 |
| 3.4.2.- Promastigotes de <i>Leishmania spp.</i> | 70 |
| 3.5.- Reactivos específicos de biología molecular | 70 |
| 3.5.1.- Ácidos nucleicos | 70 |
| 3.5.2.- Enzimas | 71 |
| 3.5.3.- Antibióticos | 71 |

| | |
|--|----|
| 3.5.4.- Isótopos radiactivos | 71 |
| 3.6.- Manipulación del ADN | 71 |
| 3.6.1.- Aislamiento de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> | 71 |
| 3.6.2.- Creación de proteínas truncadas | 72 |
| 3.6.3.- Creación de proteínas mutadas (mutagénesis dirigida) | 73 |
| 3.6.4.- Fusión de proteínas a la GFP | 74 |
| 3.6.5.- Secuenciación de ADN | 75 |
| 3.6.6.- Digestión del ADN con endonucleasas de restricción | 75 |
| 3.6.7.- Purificación de ADN procedente de geles de agarosa | 76 |
| 3.6.8.- Ligación de fragmentos de ADN | 76 |
| 3.6.9.- Electroforesis de ADN en geles de agarosa | 77 |
| 3.7.- Transformación celular | 78 |
| 3.7.1.- Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> | 78 |
| 3.7.2.- Procedimiento de transformación en <i>E. coli</i> | 79 |
| 3.7.3.- Transfección en promastigotes de <i>L. donovani</i> | 79 |
| 3.7.4.- Transformación de levaduras | 80 |
| 3.8. Sobreexpresión y purificación de proteínas | 81 |
| 3.8.1.- Crecimiento e inducción de cultivos | 81 |
| 3.8.2.- Obtención de extractos | 82 |
| 3.8.3.- Purificación de proteínas recombinantes | 82 |
| 3.9.- Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE) | 84 |
| 3.9.1.- Preparación del gel separador | 84 |
| 3.9.2.- Preparación del gel concentrador | 85 |
| 3.9.3.- Preparación de las muestras | 85 |

| | |
|--|------------|
| 3.9.4.- Electroforesis | 86 |
| 3.9.5.- Medida de la concentración de proteínas | 86 |
| 3.10.- Estudios actividad y sensibilidad TopIB <i>in vitro</i> | 86 |
| 3.10.1.- Determinación de la actividad TopIB | 86 |
| 3.10.2.- Inhibición de la actividad de relajación | 87 |
| 3.10.3.- Detección de complejos covalentes en geles de agarosa con un plásmido circular | 88 |
| 3.10.4.- Equilibrio escisión/religación con oligonucleótido | 89 |
| 3.10.5.- Ensayo de equilibrio escisión/religación con ADN dúplex | 93 |
| 3.10.6.- Ensayo de escisión del "oligonucleótido suicida" | 94 |
| 3.10.7.- Ensayo de religación | 95 |
| 3.11.- Estudios actividad y sensibilidad TopIB <i>in vivo</i> | 96 |
| 3.11.1.- Ensayo de sensibilidad a CPT <i>in vivo</i> ("Spot test") | 96 |
| 3.11.2.- Precipitación de CL en presencia de SDS/KCl | 96 |
| 3.11.3.- Ensayo de síntesis de ADN (Incorporación de timidina) | 98 |
| 3.12.- Estudios microscópicos | 98 |
| 3.12.1.- Tinción con diamino-2-fenilindol (DAPI) | 99 |
| 3.12.2.- Fijación con poli-L-lisina | 99 |
| 3.13.- Estudios bioinformáticos | 99 |
| 3.13.1.- Regiones de interacción entre LdTopIL y LdTopIS | 100 |
| 3.13.2.- Ensamblado del complejo LdTopIB-ADN con CPTs | 102 |
| 4.- Resultados | 107 |
| 4.1.- Expresión heteróloga de los genes LdTopIL Y LdTopIS. | |
| Purificación de proteínas | 107 |

| | |
|--|-----|
| 4.1.1.- Obtención de las construcciones | 107 |
| 4.1.2.- Expresión de la LdTopIB y purificación por cromatografía líquida en columna | 108 |
| 4.2.- Caracterización de la actividad LdTopIB | 110 |
| 4.2.1.- Medida de la actividad de relajación | 110 |
| 4.2.2.- Inhibición de la actividad de relajación | 112 |
| 4.2.3.- Equilibrio de escisión/religación | 114 |
| 4.2.4.- Velocidad de escisión | 116 |
| 4.2.5.- Velocidad de religación | 117 |
| 4.3.- Búsqueda de regiones de interacción entre subunidades | 120 |
| 4.3.1.- Modelado por homología de la LdTopIB | 120 |
| 4.3.2.- Análisis mutacional de residuos conservados en el heptapéptido | 123 |
| 4.3.3.- Eliminación de los motivos RPPVV y RS de la LdTopIS | 125 |
| 4.3.4.- Estructura mínima activa y sensible a CPT de la LdTopIS | 130 |
| 4.3.4.- Estructura mínima activa y sensible a CPT de la LdTopIL | 135 |
| 4.4.- Determinación y caracterización de NLS de la LdTopIB | 140 |
| 4.4.1.- Delimitación de motivos NLS en la subunidad LdTopIL | 140 |
| 4.4.2.- Delimitación de motivos NLS en la subunidad LdTopIS | 144 |
| 4.4.3.- Transporte nuclear simultáneo LdTopIL-LdTopIS | 150 |
| 4.4.4.- Estudio confocal de co-localización TopIB-ADN | 153 |
| 4.5.- La TopIB de <i>Leishmania</i> como diana molecular | 153 |
| 4.5.1.- Efecto de derivados CPT sobre la actividad LdTopIB | 154 |
| 4.5.1.1.- CPT | 155 |
| 4.5.1.2.- CPT-N-óxido | 157 |

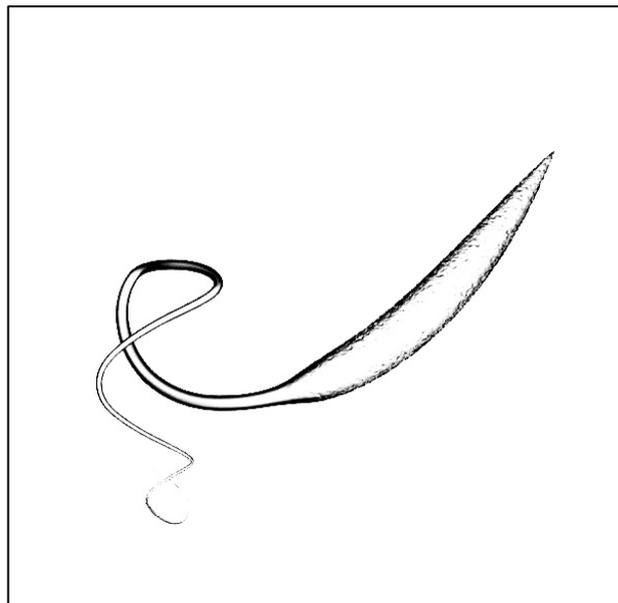
| | |
|--|-----|
| 4.5.1.3.- Topotecan (TPT) | 159 |
| 4.5.1.4.- Irinotecan y su metabolito activo SN-38 | 162 |
| 4.5.1.5.- Gimatecan | 165 |
| 4.5.1.6.- Efecto de los derivados CPT sobre cultivos de <i>Leishmania</i> | 171 |
| 4.5.2.- Efecto de indenoisoquinolinas sobre la LdTopIB | 173 |
| 4.5.2.1.- Efecto sobre la actividad de relajación TopIB | 173 |
| 4.5.2.2.- Estabilización de complejos de LdTopIB-ADN | 177 |
| 4.5.2.3.- Efecto sobre una LdTopIB resistente a CPT | 178 |
| 4.5.2.4.- Inhibición de cultivos e inducción de CL <i>in vivo</i> | 179 |
| 4.5.3.- Efecto de ácidos grasos sobre la actividad LdTopIB | 181 |
| 4.5.3.1.- Estudio de ácidos grasos acetilénicos | 181 |
| 4.5.3.2.- Estudio de ácidos grasos 2-alquinoicos | 186 |
| 5.- Discusión | 195 |
| 5.1.- El dominio <i>linker</i> de LdTopIB: actividad y sensibilidad a CPT | 196 |
| 5.2.- NLSs: transporte citoplasma-núcleo | 202 |
| 5.3.- LdTopIB como diana molecular | 206 |
| 6.- Conclusiones | 217 |
| 7.- Bibliografía | 221 |
| 8.- Anexos | 249 |

RESUMEN

Las leishmaniosis son un complejo de enfermedades causadas por los parásitos del género *Leishmania spp.* y que presentan una elevada prevalencia a nivel mundial; afectando sobretodo a países en vías de desarrollo, aunque recientemente, debido a diversos factores, se ha producido una propagación hacia regiones aparentemente exentas de riesgo. Por todo ello, la OMS considera la leishmaniosis una enfermedad priorizada dentro de su “*Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases*”. Dado que no existen vacunas eficaces contra estas enfermedades y que los tratamientos médicos actuales están basados en fármacos obsoletos con una elevada toxicidad, es vital abrir nuevas vías de lucha frente a este parásito mediante la identificación de nuevas dianas terapéuticas y el consiguiente diseño de inhibidores específicos. Recientemente, se han identificado las ADN topoisomerasas como una nueva y prometedora diana de intervención terapéutica en tripanosomátidos. Estas enzimas están involucradas en resolver los problemas topológicos generados durante la replicación, transcripción y recombinación del ADN. La ADN topoisomerasa IB de *Leishmania spp.* es un complejo heterodimérico con escasa homología con respecto a la proteína del hospedador mamífero, por lo que las regiones no conservadas de la enzima de *Leishmania* constituyen una diana terapéutica altamente selectiva.

En el presente trabajo se ha realizado un estudio exhaustivo de las regiones no conservadas de la ADN topoisomerasa IB de *Leishmania*, identificando las secuencias específicas responsables de las interacciones entre las dos subunidades del heterodímero así como de la conformación del dominio *linker* de la proteína, probando además la importancia de este dominio tanto en la capacidad de relajación de la enzima como en la sensibilidad a diferentes tipos de inhibidores. En segundo lugar se han identificado y caracterizado las tres secuencias responsables de la translocación de la proteína al interior del núcleo; una en el extremo C-terminal de la subunidad grande y dos en la subunidad pequeña. La primera de ellas correspondió con una secuencia de 10 aminoácidos localizados en el extremo

N-terminal, mientras la que la segunda fue delimitada en las inmediaciones del residuo Tyr catalítico del extremo C-terminal. En este estudio no se encontró ninguna señal específica de translocación al kinetoplasto. Finalmente se evaluó la enzima de *Leishmania* como diana molecular de intervención terapéutica con tres familias de compuestos: derivados de la camptotecina, indenoisoquinolinas y ácidos grasos tanto acetilénicos como alquinoicos. Con ello se demostró que varios derivados camptotecínicos e indenoisoquinolínicos, especialmente el gimatecan y el LMP400, son inhibidores preferenciales de la enzima de *Leishmania* frente a la humana, encontrándose una buena correlación entre los ensayos *in vitro* e *in vivo* realizados. De igual manera se demostró el uso potencial de los ácidos grasos insaturados de cadena larga como inhibidores de la ADN topoisomerasa, por un mecanismo de acción diferente al de la camptotecina, en el que dichos ácidos grasos impiden el corte del ADN mediado por la enzima pero no la unión entre ambos.



1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. VISIÓN HISTÓRICA DE LA LEISHMANIOSIS

Con el nombre genérico de leishmaniosis se recoge el grupo de enfermedades causadas por las diferentes especies del género *Leishmania*. Estos protozoos parásitos pueden generar lesiones en la piel, mucosas y órganos internos.

El primer testimonio de una enfermedad productora de lesiones cutáneas podría atribuirse a los denominados “Huacos”, estatuillas antropomorfas halladas en los asentamientos de las culturas Mochica (1330 a.C. - 500 d.C.) y Chimú (1000 - 1400 d.C.), en lo que hoy en día conocemos como Perú y Ecuador. En estas figuras podemos observar las secuelas destructivas y deformantes de la leishmaniosis, apreciándose sobretodo mutilaciones tanto en los labios como en la nariz (Hoepli, 1969; Pessoa y Barreto, 1948).

En el mundo árabe se recogen antiguas descripciones muy precisas de úlceras faciales (botón de Oriente). En el siglo X, Avicena describió la “úlceras de Balkh” procedente del noroeste de Afganistán, además datan también de esta época registros procedentes de asentamientos en Oriente Medio, tales como Bagdad o Jericó, en los que se recogen los nombres locales de esta enfermedad, muchos de ellos todavía en uso.

Para obtener una descripción clínica de la enfermedad se tuvo que esperar hasta el siglo XVI, en la época de la Conquista Española. Fernando de Oviedo (1535), Pedro Pizarro (1571) y Fernando de Santillán (1572) relataron cómo una “lepra blanca” azotaba a los indígenas en la ladera este de la Cordillera de los Andes, así como en los valles calientes y húmedos en los que se llevaba a cabo el

cultivo de la coca (“enfermedad de los valles”). En el Viejo Mundo, los médicos indios utilizaban el término en sánscrito *kala azar* (fiebre negra) para referirse a lo que posteriormente fue identificado como leishmaniosis visceral.

La primera descripción en lengua inglesa de la enfermedad corrió a cargo de Alexander Russel en 1756, en su libro “Historia natural de Aleppo”, en el que se relatan con magnífico detalle los síntomas de un paciente turco aquejado de “Botón de Aleppo”: “Tras el proceso de cicatrización, la enfermedad deja una fea cicatriz que permanecerá en el paciente por el resto de su vida, y que durante muchos meses se caracteriza por un color lívido. Cuando no están irritadas rara vez dan un dolor excesivo”. Pese a la precisión de dicha descripción nadie era capaz de asociar una posible etiología a este proceso por aquel entonces (Herwaldt, 1999; Bray, 1987; Hoare, 1938).

A finales del siglo XIX, Bravo, en 1852, y Cerqueira, en 1885, identificaron la leishmaniosis en el botón de Oriente. El sargento mayor Cunningham, destinado en Calcuta (India), fue el primero en observar “algo sospechoso” en el interior de leucocitos mononucleares procedentes de muestras de tejido obtenidas de pacientes afectados por la fiebre de Delhi (Cunningham, 1885). En 1901, William Leishman, médico de la armada escocesa, identificó mediante tinción de Giemsa y observación microscópica un organismo ovalado en el interior de los macrófagos del bazo de un paciente que había muerto a causa de lo que, posteriormente, Leishman denominó como “fiebre Dum-dum” y que corresponde, como se demostraría años más tarde con la leishmaniosis visceral (Leishman, 1903). En 1903, el profesor de fisiología en la Universidad de Madrás, Charles Donovan, siguió los pasos de Leishman y publicó una detallada descripción de estos mismos parásitos (Donovan, 1903). En honor a ambos se bautizaron los actualmente denominados amastigotes como “cuerpos de Leishman-Donovan”. También en 1903, James Homer Wright demostró por primera vez la infección causada por *Leishmania tropica* (Wright, 1903), si bien es cierto que el mérito inicial debería ser atribuido a Cunningham (1885). Roger (1904) llevó a cabo el primer cultivo de *Leishmania* a partir del bazo de un paciente aquejado de leishmaniosis visceral. Por otra parte, Tamayo (1908) identificó por primera vez las lesiones características de

la "uta", nombre que recibe la leishmaniosis cutánea de los Andes en las cerámicas del Perú pre inca.

En Perú, Escobel (1911) halló leishmanias en un caso de espundia por primera vez. En 1913, la Universidad de Harvard concluyó que la "uta" es una variedad de leishmaniosis cutánea y la espundia otra de carácter mucocutáneo. La asimilación de *Leishmania* y Kala-azar se debe al mayor Ross, quién identificó al parásito *Leishmania donovani* como agente etiológico de esta enfermedad (OMS, 2007).

La idea de la existencia de la participación de un vector responsable de la propagación del parásito surgió de Presat (1905), quien señaló como principales sospechosos a los flebótomos; este hecho fue demostrado en el año 1921 por los hermanos Edmond y Etienne Sergent (Cox, 2002). Posteriormente, se descubrió el papel jugado por los insectos del género *Lutzomyia* (1922) y finalmente en 1966 se consiguió describir el ciclo completo de *Leishmania*.

1.2. EL GÉNERO LEISHMANIA

El género *Leishmania* se clasifica dentro del orden *Kinetoplastida*, familia *Trypanosomatidae*, cuya característica representativa es la presencia de un orgánulo positivo a la tinción de Feulgen denominado kinetoplasto. Todas las especies de *Leishmania* son parásitos digenéticos que comparten las siguientes características (Ashford, 2000): i) poseen un único flagelo que presenta una invaginación, la bolsa flagelar, ii) el kinetoplasto se localiza en el interior de una única mitocondria y iii) poseen una red de microtúbulos sub pelicular que configuran la mayor parte del citoesqueleto. Además, estos parásitos se caracterizan por su capacidad para penetrar e invadir las células del sistema monocítico-fagocitario del hospedador y ser transmitidas por un vector invertebrado, una hembra de díptero de los Gen. *Phlebotomus* (en el Viejo Mundo) o *Lutzomyia* (en el Nuevo Mundo). La forma residente en el insecto se denomina promastigote y es un parásito móvil muy parecido a un hemoflagelado. Por su parte, el amastigote es una forma intracelular

redondeada y carente de flagelo que reside en el interior de células del sistema monocítico fagocitario del hospedador.

En la Fig. 1.1 se muestran las diferentes formas y estadios de los tripanosomátidos, así como la organización de los diferentes orgánulos en su interior. Ambas formas contienen un entramado reticular de ADN circular agrupado en maxi y minicírculos (Fig. 1.2) (ADN de kinetoplasto; ADNk) dentro de la mitocondria.

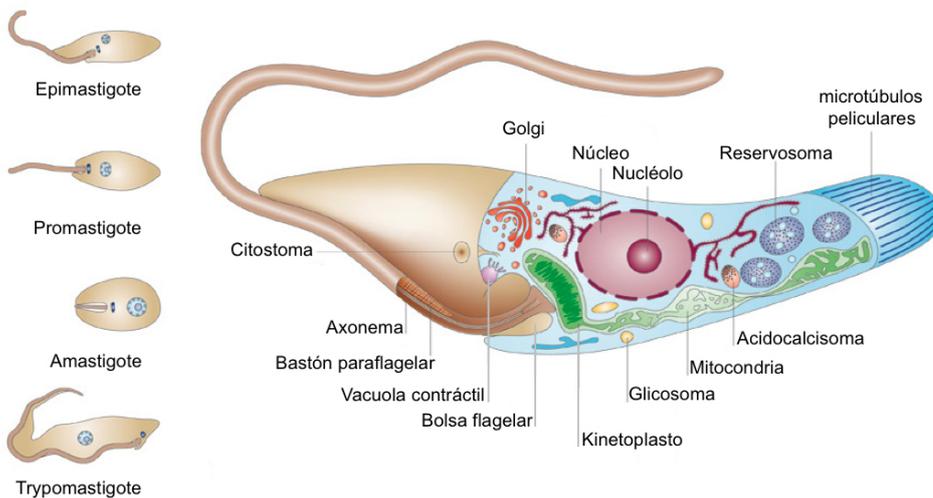


Figura 1.1. Representación esquemática de las diferentes formas de tripanosomátidos y distribución de los orgánulos en su interior. Modificado de Docampo y col. (2005).

Otro aspecto muy importante de estos protozoos es su capa glicoconjugada de lipofosfoglicano (LPG), fuertemente unida mediante un anclaje de ácido fosfoinosítido. Esta unión posee una estructura tripartita constituida por un dominio lipídico, un hexasacárido neutro, y una galactosa-manosa fosforilada, acabando en una capucha neutra. Esta estructura tiene implicaciones muy importantes en la infectividad y supervivencia del parásito.

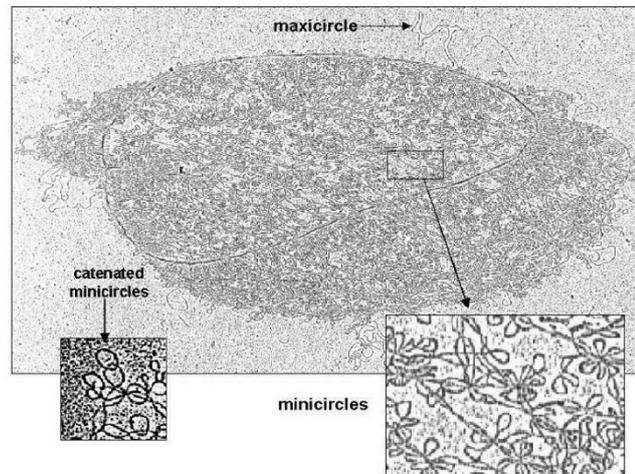


Figura 1.2. Imagen de microscopía electrónica del ADNk de *Leishmania*. El ADNk consiste en una red gigante de minicírculos y maxicírculos concatenados. Cada red está compuesta por aproximadamente 10.000 minicírculos y 50 maxicírculos. Los maxicírculos contienen el ARNr y los genes estructurales.

Los genomas completos de tres de las especies principales de *Leishmania* (*L. major*, *L. infantum* and *L. braziliensis*) han sido secuenciados recientemente, mostrando la existencia de más de 8.300 genes codificadores de proteínas, de los cuales únicamente un 35% tienen asignada una función concreta, así como 900 genes de ARN. Casi el 40% de los genes codificadores de proteínas se pueden clasificar dentro de 662 familias con entre 2 y 500 miembros. Los genes grandes suelen estar dispersos a lo largo de todo el genoma en formaciones en tándem en diferentes *loci*, mientras que la mayoría de familias de genes pequeños forman grupos de uno a tres genes (Myler y Fasel, 2008).

Las especies de *Leishmania* del Viejo Mundo poseen 36 cromosomas, mientras que las del Nuevo Mundo tienen 34 ó 35. *Leishmania spp.* presenta una organización genómica única dentro de los organismos eucariotas: sus genes no poseen intrones, y además, aunque el tamaño de los cromosomas es menor que el de otros organismos, presentan un mayor número de genes altamente empaquetados. Dichos genes se pueden organizar bien en una o en ambas hebras de ADN, formando transcritos policistrónicos a partir de promotores no definidos. El proceso de *trans-splicing* o transempalme está presente en el género *Leishmania*, y éste representa un paso necesario para el procesado de ARNm en los eucariotas

inferiores mediante el empalme de exones de dos transcritos primarios distintos, con la consiguiente formación de un ARN híbrido (Kazemi, 2011).

TABLA 1.1. Nueva propuesta de nomenclatura de *Leishmania* spp. basada en la secuencia del gen *hsp70*. Modificado de Antinori y col. (2012).

| Genero | Complejo | Especie | Distribución geográfica | Especies <i>hsp70</i> | |
|------------------------|------------------------|------------------------|--|---|-----------------|
| <i>L. (Leishmania)</i> | <i>L. donovani</i> | <i>L. donovani</i> | China, subcontinente indio, Etiopía, Sudán, Kenia, Irán, Arabia Saudí, Yemen | <i>L. donovani</i> | |
| | | <i>L. infantum</i> | Albania, Argelia, Francia, España, Grecia, Italia, Marruecos, Portugal, Siria, Túnez, Turquía, Yemen | | |
| | | <i>L. chagasi</i> | Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, El Salvador, Guadalupe, Guatemala, Guayana holandesa, Honduras, Martinica, México, Nicaragua, Paraguay, Venezuela | | |
| | | | <i>L. archibaldi</i> | India, Sudán, Etiopía, Libano, Israel | |
| | <i>L. tropica</i> | <i>L. tropica</i> | Afganistán, Argelia, Azerbaiyán, Grecia, Irán, Irak, Israel, Marruecos, Túnez, Turquía, Yemen | <i>L. tropica</i> | |
| | | <i>L. aethiopica</i> | Etiopía, Kenia | | |
| | | | <i>L. major</i> | Afganistán, Argelia, Chad, Irán, Irak, Israel, Libia, Mauritania, Marruecos, Siria, Sudán | <i>L. major</i> |
| | <i>L. mexicana</i> | <i>L. mexicana</i> | Belice, Colombia, Costa Rica, República Dominicana, Ecuador, Guatemala, Honduras, México, Panamá, Venezuela | <i>L. mexicana</i> | |
| | | <i>L. amazonensis</i> | Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guayana francesa, Panamá, Perú, Venezuela | | |
| | | <i>L. garnhami</i> | Venezuela | | |
| <i>L. (Viannia)</i> | <i>L. guyanensis</i> | <i>L. guyanensis</i> | Brasil, Colombia, Ecuador, Guayana Francesa, Perú, Guayana holandesa, Venezuela | <i>L. guyanensis</i> | |
| | | <i>L. panamensis</i> | Belice, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Honduras, Nicaragua, Panamá, Venezuela | | |
| | | <i>L. naiffi</i> | Brasil, Guayana francesa, Ecuador, Perú | <i>L. naiffi</i> | |
| | <i>L. braziliensis</i> | <i>L. braziliensis</i> | Argentina, Belice, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guatemala, Honduras, Nicaragua | <i>L. braziliensis</i> | |
| | | <i>L. peruviana</i> | Perú | | |

Es muy complicado diferenciar las distintas especies de *Leishmania* mediante los métodos clásicos de diagnóstico, tales como el examen microscópico o el cultivo de los parásitos. Debido a esto, la clasificación histórica de *Leishmania* se ha basado en factores diversos entre los que destacan sobretodo la distribución geográfica y las manifestaciones clínicas (Pratt y David, 1981; Lainson y Shaw, 1987). Recientemente, Fraga y col. (2010) han propuesto una nueva nomenclatura para las diferentes especies de *Leishmania* basándose en la secuencia del gen que codifica la proteína de choque térmico 70 (*hsp70*). Según estos autores, dentro del complejo de *L. donovani* únicamente *L. donovani* mantendría el nivel de especie y *L. donovani infantum* debería ser considerada como una subespecie, tal y como se muestra en la Tabla 1.1.

1.2.1. El ciclo biológico de *Leishmania* spp.

El ciclo vital de los parásitos obligados del género *Leishmania* es relativamente sencillo (Fig. 1.3). En él se diferencian dos fases de desarrollo replicativo, el promastigote (forma móvil) localizado en el interior del intestino de las hembras de los mosquitos de los géneros *Phlebotomus* o *Lutzomyia*, que actúan como vector y los amastigotes, y por otro lado, las formas quiescentes que se localizan en los fagolisosomas en el interior de los macrófagos infectados del hospedador vertebrado.

Podemos establecer el inicio del ciclo en el momento en que las hembras de mosquito transmiten la enfermedad al inocular la forma promastigote en la piel del hospedador al succionar su sangre para alimentarse. La saliva infectiva contiene numerosos compuestos bioactivos bien caracterizados, de los cuales muchos son péptidos o proteínas (Valenzuela y col., 2004). Una de estas proteínas, la maxaladina, un potente vasodilatador, es un péptido de 7 kDa esencial para que el mosquito pueda alimentarse de la sangre. Su modo de acción primario es reducir el Ca^{2+} intracelular del hospedador en el sitio de picadura a través de un mecanismo dependiente de cAMP, lo que causa una marcada dilatación arterial (Moro y Lerner, 1997). Además, la malaxadina induce la secreción de las citoquinas antiinflamatorias IL-6, IL-1 β e IL-10, reprimiendo la producción de linfocitos CD80,

CD86 y CCR7 mediante la inhibición de la producción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-12p40, TNF- α e IFN- γ en las células dendríticas derivadas de monocitos (Soares y col., 1998; Wheat y col., 2008).

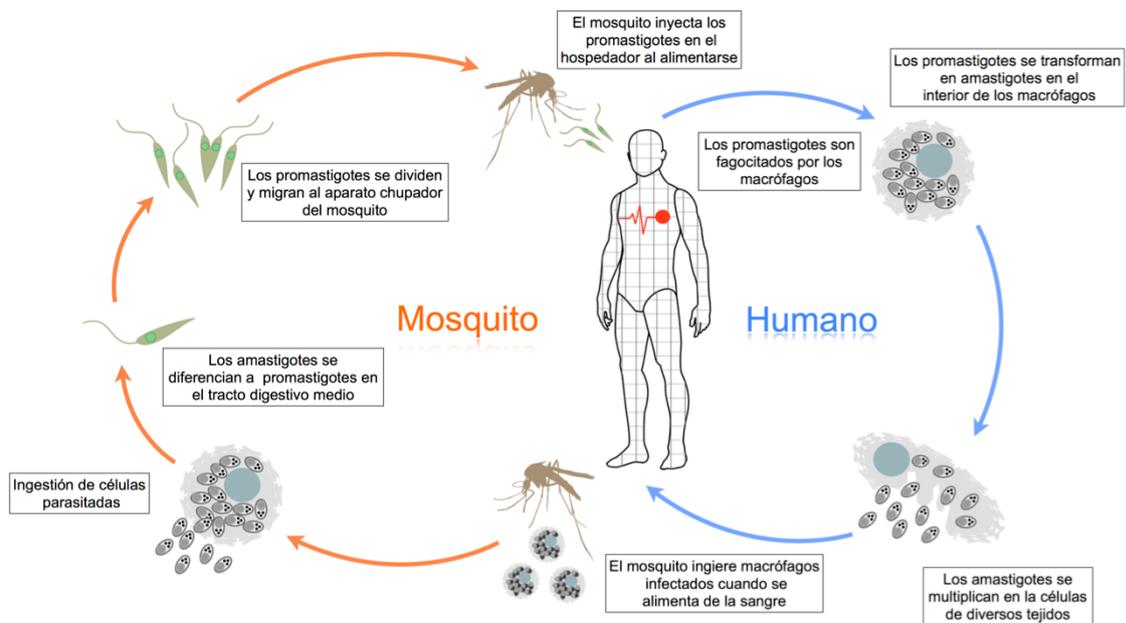


Figura 1.3. Ciclo vital del parásito obligado *Leishmania* spp. En naranja se muestran los acontecimientos desarrollados en el interior del insecto vector, mientras que en azul se representa la etapa en el hospedador mamífero, en este caso en el hombre.

Los promastigotes metacíclicos se encuentran almacenados en la sección anterior del sistema digestivo del flebótomo infectado. La alta densidad que llegan a alcanzar produce el taponamiento de su faringe, por lo que para poder llevar a cabo la succión de la sangre del hospedador, es necesario que el mosquito regurgite este "tapón" infectivo. Estudios de imagen *in vivo* demostraron que la picadura del vector induce una rápida infiltración de neutrófilos y un reclutamiento sustancial de macrófagos en la piel, con independencia de la presencia o la ausencia de parásitos, demostrando por lo tanto que este reclutamiento es producto del daño tisular asociado a la picadura (Peters y col., 2008). Existen varios estudios analizando el número de promastigotes inoculados de forma natural por el mosquito. Rogers y col. (2004) investigaron el número de parásitos de *L. mexicana*

transmitidos durante la picadura utilizando para ello un sistema de alimentación en membrana por el se recolectan los parásitos eyectados por los mosquitos. Los datos mostraron que cada picadura transmite una media de 1.000 parásitos altamente enriquecidos en promastigotes metacíclicos. Otro estudio más reciente demostró que el número de promastigotes de *L. major* inoculados en las orejas de ratones durante la alimentación del mosquito era inferior a 600; existiendo casos de inoculación con valores variables comprendidos entre 1.000 y 100.000 parásitos. Lo interesante de este hecho reside en que los animales infectados con un menor número de parásitos mostraron un proceso patológico limitado, pero a su vez se convirtieron en reservorios infectivos duraderos (Kimblin y col., 2008).

Una vez inoculados, los promastigotes metacíclicos están parcialmente protegidos por los agentes inmunomoduladores presentes en la saliva del insecto (Gillespie y Titus, 2000). La fagocitosis de los parásitos metacíclicos por parte de los neutrófilos se produce por activación del complemento y por rutas dependientes e independientes de opsonina *in vitro* (Ofek y col., 1995; Uthaisangsook y col., 2002). Sin embargo, no se ha demostrado que los promastigotes metacíclicos se diferencien en amastigotes o que se produzca proliferación dentro de neutrófilos (Laufs y col., 2002). El LPG, que presenta cadenas peptídicas de mayor longitud en las formas metacíclicas, es capaz de prevenir la unión de las C5b y C9 del complemento, mientras que la glicoproteína de superficie gp63 es capaz de convertir la proteína C3b en su forma inactiva C3bi, que se une a la superficie del protozoo evitando así el ataque de la proteína C5 del complemento (Sacks y col., 1995). Además, las proteínas C3b y C3bi favorecen la opsonización, atrayendo a los macrófagos hacia los promastigotes, que se unen a los receptores CR1 y CR3 de los macrófagos de los tejidos locales para ser fagocitados, formando una vacuola parasitófora y fusionándose con los lisosomas (Späth y col., 2003).

La visualización de la transferencia de parásitos libres desde neutrófilos apoptóticos a macrófagos (Peters y col., 2008) sugiere que la teoría propuesta por van Zandbergen y colaboradores del caballo de Troya podría no ser correcta (van Zandbergen y col., 2004). De hecho, cada vez cobra más fuerza el modelo del "conejo troyano" propuesto por Ritter y colaboradores que postula la incorporación simultánea de parásitos provenientes tanto de neutrófilos apoptóticos como de

origen externo (Ritter y col., 2009). Existe un segundo tipo de células involucradas en la infección y migración de *Leishmania*, las células dendríticas dérmicas. Estas células se infectan en el sitio de inoculación en la piel y son capaces de migrar a los ganglios linfáticos vecinos drenantes de la región afectada (Ng y col., 2008). Una vez que están dentro de la célula hospedadora, los metacíclicos quedan encerrados en el interior de los fagosomas, rodeados por membrana originada a partir de la célula hospedadora. Seguidamente, el fagosoma madura mediante la fusión a endosomas tardíos y lisosomas con moléculas asociadas, tales como las proteínas de membrana asociadas a lisosomas (LAMP) 1 y 2 y las catepsinas B, D, H y L (Lang y col., 1994).

La diferenciación celular a la forma amastigote en el interior de las células hospedadoras supone marcada reordenación ultraestructural en los parásitos (Akiyama y McQuillen, 1972), incluyendo la pérdida del flagelo y un cambio del LPG de la superficie celular (Moody y col., 1993). La importancia del LPG en la estrategia inmunoelusiva de *Leishmania* ha sido motivo de intenso estudio. El LPG fue detectado por inmunofluorescencia y microscopía confocal en la superficie de macrófagos infectados con *L. donovani* 10 minutos después de la fagocitosis del parásito (Tolson y col., 1990); sin embargo, ha sido imposible establecer el mecanismo por el que se produce este hecho. Otros estudios realizados mediante análisis por imagen sugieren que el LPG inhibe la redistribución de la actina-F inducida por la fagocitosis, retrasando de esta forma el reclutamiento de la proteína quinasa C α , y por lo tanto, aplazando la fusión fagosoma-lisosoma (Scianimanico y col., 1999; Dermine y col., 2000). También se ha sugerido que la inhibición de la fusión fagolisosomal es un factor limitante para que se pueda producir la diferenciación del amastigote, ya que de esta forma existe tiempo suficiente para que se complete el proceso (Holm y col., 2001). Sin embargo, recientes estudios de imagen en tiempo real han demostrado que no existen diferencias entre las cinéticas de reclutamiento de LAMP de fagosomas conteniendo una cepa salvaje de *L. donovani* y los que albergan una cepa deficiente en LPG (Forestier y col., 2011). Además, las diferentes especies de *Leishmania* presentan diversas rutas para salvaguardar la síntesis de ácidos nucleicos (Lodge y Descoteaux, 2005). Las enzimas responsables de estos mecanismos de defensa residen en el interior del

glicosoma (Moyersoén y col., 2004), un orgánulo altamente especializado y único en kinetoplastidos.

Una vez fuera de la célula hospedadora, los amastigotes son capaces de infectar nuevos macrófagos/monocitos en otros tejidos, que a su vez pueden ser succionados por otro mosquito que pique al hospedador infectado. Una vez dentro del vector, el parásito sufre una serie de complejas transformaciones en el intestino medio del insecto, liberándose los amastigotes del interior de las células hospedadoras. La disminución de la temperatura corporal promueve la diferenciación de los amastigotes a promastigotes procíclicos, que tienen morfología fusiforme y flagelo, replicándose en la sangre ingerida encapsulados dentro de una matriz peritrófica secretada por el epitelio intestinal. Tras unos días, los promastigotes procíclicos retrasan su replicación para diferenciarse en promastigotes nectomona, de unos 15-20 μm de longitud y móviles, que se acumulan en la parte anterior de la matriz provocando su ruptura. Los parásitos libres se encaminan en su mayoría hacia el intestino anterior hasta alcanzar el límite con el epigastrio del insecto, donde se unen al epitelio del intestino mediante el LPG. Una vez han alcanzado la válvula estomoidal, los promastigotes nectomona evolucionan a promastigotes leptomona, algo más cortos que aquellos. Cuando los parásitos alcanzan la faringe del insecto se unen a su superficie mediante una estructura derivada del extremo libre del flagelo llamado hemidesmosoma. Finalmente, los promastigotes se diferencian a su forma metacíclica, plenamente infectiva, listos para ser nuevamente inoculados (Kamhawi, 2006).

1.2.2. Leishmaniosis

Actualmente la leishmaniosis es una de las enfermedades priorizadas por la OMS dentro de su "Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases". En realidad, se trata de un complejo de enfermedades prevalente en 4 continentes y 88 países; 22 pertenecientes al Nuevo Mundo y 66 al Viejo Mundo (Alvar, 2001). Esta amplia difusión geográfica junto con su elevada prevalencia (12 millones de casos), hace que la población en riesgo potencial alcance los 350 millones de personas. Existen estimaciones que establecen una incidencia anual de

1,5-2 millones de nuevos casos para la leishmaniosis cutánea (LC) y de 500.000 nuevos casos para la leishmaniosis visceral (LV) (OMS, 2010).

La LC es la más común de estas enfermedades, y a pesar de no tener consecuencias fatales, produce úlceras en la piel sin que exista invasión de los órganos internos. Está causada por las especies del complejo mexicana en el Nuevo Mundo (*L. amazonensis*, *L. mexicana*) y por el complejo major (*L. tropica*, *L. major*) y *L. aethiopica* en el Viejo Mundo (Ashford, 2000). La leishmaniosis mucocutánea, una enfermedad mucho más dañina, está causada por especies del complejo braziliensis y en algunos casos puede resultar mortal. Se trata de una enfermedad altamente deformante ya que promueve la destrucción de la mucosa y cartílagos de la región orofaríngea.

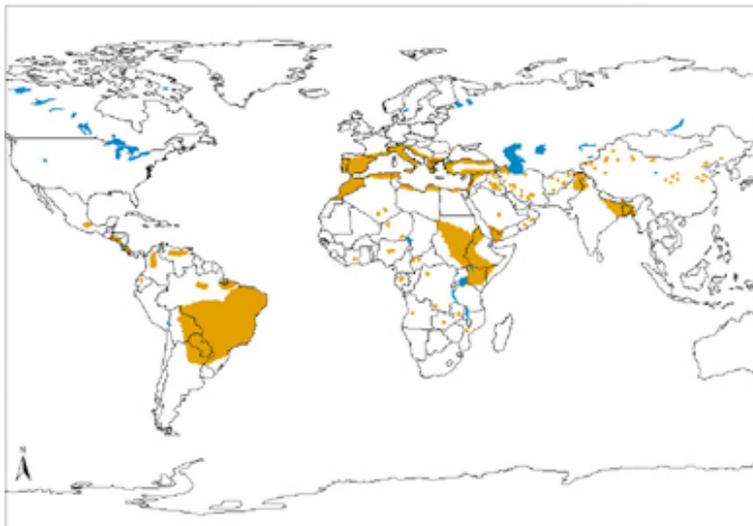


Figura 1.4. Distribución geográfica de la leishmaniosis visceral en el Viejo y Nuevo Mundo. Fuente de datos y producción del mapa: WHO/NTD/IDM HIV/AIDS, Tuberculosis and Malaria (HTM) Organización Mundial de la Salud, 2010.

Por último, en India, Afganistán, China, Kenia, países europeos mediterráneos y Sudamérica (Fig. 1.4), se presenta también la LV (*Kala azar*), causada por *L. donovani* y *L. infantum* que afectan a órganos internos tales como el hígado, el bazo, la médula ósea y los ganglios linfáticos. Es una enfermedad grave e incluso mortal en ausencia de tratamiento. Se estima una mortalidad anual

de 59.000 individuos (35.000 hombres y 24.000 mujeres), si bien es cierto que en algunas áreas, debido a las grandes diferencias sociales y de género, la mortalidad femenina debida a LV puede ser hasta 3 veces mayor (Berman, 2006).

Sin embargo, los datos oficiales de que se dispone subestiman la realidad debido a varios factores limitantes: a) la distribución de las zonas de transmisión en áreas endémicas es frecuentemente discontinua, b) no son diagnosticados o no son declarados numerosos casos, c) la mayoría de los datos oficiales se obtienen exclusivamente a partir de la detección pasiva de los casos, d) el número de personas asintomáticas infectadas es mucho mayor que el de casos clínicos manifiestos (Riera y col., 2008). Desde 1993, lo que parecía una enfermedad de países pobres o en vías de desarrollo, se ha extendido a países del llamado “Primer Mundo” como Francia, Alemania, España, etc. Las grandes urbes rodeadas de cinturones habitacionales superpoblados, carecen de las condiciones higiénico-sanitarias suficientes, y son los lugares óptimos para su expansión, según indica la OMS en su “Weekly Epidemiological Record” (Anónimo, 2002). El cambio climático también tiene su papel en la diseminación de estas enfermedades: el calentamiento global facilita la presencia de los vectores en zonas templadas en las que nunca antes habían sido detectadas (Desjeux, 2001).

En nuestro país la leishmaniosis se presenta tanto en la forma cutánea como en la visceral, producidas en ambos casos por *L. infantum*. Esta enfermedad ha sido de declaración obligatoria hasta 1996, momento en el que cambió el sistema de vigilancia epidemiológica y la dependencia fue transferida a las Comunidades Autónomas. Se declaran entre 800 y 1.200 casos por año, lo que supone una incidencia anual de 0,3 casos/100.000 habitantes, que se concentran mayoritariamente en la Cuenca Mediterránea y la Meseta Central (López-Vélez y Molina-Moreno, 2005). Sin embargo, es manifiesta la subdeclaración de esta infección, especialmente en el caso de los procesos cutáneos que son de evolución benigna. La LV mediterránea ha sido considerada como una enfermedad que afecta principalmente a la población infantil. Debido a que existe una importante subdeclaración – entre el 25-40% de los casos de LV y de casi un 100% de los casos de LC – la incidencia real es desconocida y se calcula que como mínimo es dos veces superior si tenemos en cuenta los casos no declarados (Schönian y col.,

2008). Recientemente, ha surgido un brote de leishmaniosis en Fuenlabrada (Madrid), aumentando su prevalencia rápidamente de 3 casos/100.000 habitantes en 2010 a 55,7/100.000 habitantes en 2011. Lo interesante de este brote es que, tal y como ha sido demostrado, liebres (*Lepus granatensis*) aparentemente sanas pero infectadas con *L. infantum* sirvieron como reservorio silvestre del parásito previo paso al mosquito vector (*P. perniciosus*) (Molina y col., 2012).

La co-infección VIH-Leishmania fue reconocida como una infección emergente en el suroeste europeo, donde el 25-70% de los adultos con LV están coinfectados con VIH (Fig. 1.5) (De Gorgolas y Miles, 1994; Desjeux y Alvar, 2003). Ambos patógenos parecen ejercer un efecto potenciador sinérgico y recíproco sobre la infección del otro, lo que redundaría en una mayor inmunosupresión y una progresión más rápida de ambas enfermedades (Wolday y col., 1999).

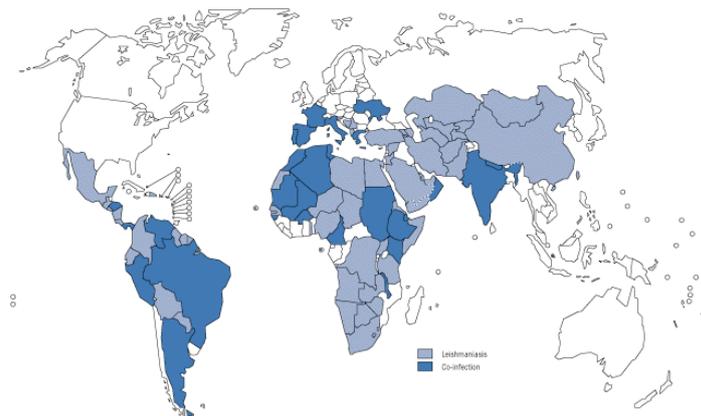


Figura 1.5. Mapa de la distribución geográfica de infección por leishmaniosis (azul claro); y de co-infección SIDA-Leishmaniosis (azul oscuro).

La prevalencia de esta enfermedad oportunista se estima que es del 1,5 al 9% de los pacientes con SIDA. La mayoría de estos casos fueron declarados en España, Francia, Italia y Portugal, correspondiendo a España el mayor número de casos de co-infección (835/1440; 58%) (Desjeux y Alvar, 2003).

Un grupo especialmente expuesto a este tipo de enfermedades es el de las Fuerzas Armadas destinadas en países asiáticos (Afganistán y Líbano) y mediterráneos (Kosovo y Bosnia) en labores de pacificación. Los servicios médicos de éstos han descrito casos tanto de LC y LV en las tropas del contingente de paz de la OTAN en Afganistán y en el ejército EE. UU. en Irak. Durante el periodo 2002-2004 más de 500 soldados norteamericanos, 19 británicos, más de 150 holandeses y 19 alemanes desplazados en Afganistán fueron diagnosticados de una forma especialmente virulenta de leishmaniosis que apenas respondía a los tratamientos convencionales con antimoniales pentavalentes o miltefosina (<http://www.pdhealth.mil/leish.asp>). Un número menor, pero igualmente significativo, fue diagnosticado de LV. Con respecto a las tropas de la misión norteamericana en Irak, los resultados son aún más significantes, con casi 900 afectados de leishmaniosis. El personal médico del “Walter Reed Army Medical Center” (WRAMC) confirmó que el número de casos de leishmaniosis ha aumentado dramáticamente desde esta fecha (Weina y col., 2004; Woodrow y col., 2006). En la actualidad no se dispone de datos de la enfermedad en soldados del contingente español; sin embargo, la exposición al vector y a enfermos de otras nacionalidades, así como las condiciones sanitarias precarias, hacen extremadamente probables los casos de contagio.

1.2.3. Formas clínicas de la enfermedad

Clásicamente se han diferenciado cuatro tipos de leishmaniosis atendiendo a sus respectivos cuadros clínicos, los cuales dependen a su vez de la especie implicada (Tabla 1.2.) y de la localización de los síntomas (Alvar, 2001): LC, LMC, LV y leishmaniosis dérmica post-kala-azar (LDPK).

Sin embargo, es importante tener en cuenta que las manifestaciones clínicas de la leishmaniosis van a depender en gran medida de la respuesta inmune del hospedador (Pintado y col., 2001). De esta forma, la difusión global del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) ha jugado un importante papel en la infección por *Leishmania spp.* El estado de inmunosupresión inducido por el VIH aumenta entre 100 y 1000 veces la probabilidad de desarrollar LV. Esto ha supuesto un cambio en la franja poblacional afectada, pasando de pacientes principalmente pediátricos a individuos adultos. Además, aquellos pacientes infectados de VIH que

no son tratados con terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA), presentan una probabilidad cercana al 90%, de sufrir co-infección por *Leishmania spp.* así como graves recaídas post infección (Kubar y col., 1998).

TABLA 1.2. Clasificación de las principales especies de *Leishmania* en función del cuadro clínico desarrollado en el paciente infectado.

| Leishmaniosis | Organismo | Localización |
|---------------|--|--|
| Cutánea | <i>L. tropica</i> | Cuenca mediterránea, Afganistán |
| | <i>L. major</i> | Oriente Medio, O y N de Africa, Kenia |
| | <i>L. aethiopica</i> | Etiopía |
| | <i>L. mexicana</i> | América Central y cuenca del Amazonas |
| Visceral | <i>L. donovani</i> | China, India, Irán, Sudán, Kenia, Etiopía |
| | <i>L. infantum</i> | Cuenca mediterránea |
| | <i>L. chagasi</i> | Brasil, Colombia, Venezuela, Argentina |
| Mucocutánea | Complejo <i>L. braziliensis</i> | Brasil, Perú, Ecuador, Colombia, Venezuela |

Una de las características de la LC es que existe una correlación entre el número de lesiones y el número de picaduras que ha sufrido el paciente. Dichas picaduras tienden bien a ulcerarse directamente o bien evolucionan a formaciones nodulares que posteriormente se ulceran (Fig. 1.6).



Figura 1.6. Lesiones características de la LC. En la imagen se muestran llagas en la piel que se han transformado en úlceras, lo que provoca que el proceso de curación sea muy lento.

Tras un periodo de incubación que puede durar del orden de 4 a 6 semanas o incluso años, las lesiones hacen aparición con una pequeña pápula que genera una costra bajo la cual emerge la ulceración. Debido a su remisión espontánea se puede considerar de tipo benigno. Sin embargo, existe una complicación en el caso de infección con *L. tropica*, denominada leishmaniosis cutánea recidivante, que consiste en la aparición de microlesiones que se ulceran mientras la lesión principal está cicatrizando. Recientemente, Akilov y colaboradores han propuesto una clasificación de los diferentes tipos de LC atendiendo a la patogénesis del proceso y al análisis histológico (Akilov y col., 2007), distinguiendo entre LC exógena (localizada y diseminada) y LC endógena (recurrente y LDPK), con varias subdivisiones en cada una. Aunque generalmente se observa la diseminación del parásito durante la LC en pacientes infectados por *L. major* y *L. tropica*, recientemente se ha descrito una forma multifocal de LC causada por *L. infantum* en los países mediterráneos (Maniscalco y col., 2007). La manifestación más grave de LC en el Nuevo Mundo es la LMC que se caracteriza por una invasión de los tejidos blandos a partir de una lesión cutánea inicial. El síntoma clave es una elevada deformación morfológica, cursando con destrucción de la piel circundante, faringe, orofaringe y tráquea.

En el año 2009 se mostró la alta prevalencia de leishmaniosis tegumentaria con presentaciones atípicas (53% de incidencia mucocutánea) o localizaciones inusuales (27% en áreas genitales) en pacientes sudamericanos positivos a VIH (Lindoso y col., 2009).

La forma más grave de leishmaniosis es la LV, que castiga principalmente al Viejo Mundo y buena parte de Sudamérica. A diferencia que en el caso de la LC, la LV no presenta curaciones espontáneas, siendo por lo tanto necesario el tratamiento del paciente para evitar su muerte. Tras un periodo de incubación, que puede durar varios meses, los parásitos invaden los órganos diana; bazo, hígado, médula ósea, mucosa intestinal y glándulas suprarrenales, lo que puede desatar un fallo multiorgánico. Se diferencian tres síntomas característicos: fiebre, leucopenia y hepatoesplenomegalia.

Además de la transmisión clásica mediada por vector, recientemente se ha descrito la infección de pacientes a los que se les había trasplantado un órgano, especialmente el riñón. Asimismo, tal y como se observó en pacientes infectados por VIH, los individuos con trasplante renal sufrieron múltiples recaídas, y en muchos casos, presentaron formas atípicas de leishmaniosis, tanto mucosa como cutánea (Simon y col., 2011). En algunos casos, los pacientes que han presentado un cuadro de LV pueden desarrollar LDPK debido, principalmente, a un tratamiento insuficiente. Esta variedad de leishmaniosis, que se concentra principalmente en el subcontinente indio y Sudán, se caracteriza por la presencia de placas hipopigmentadas dispersas por la piel, junto con síntomas leproides. Los individuos afectados se comportan como reservorios del parásito en su fase antroponótica del ciclo. La mayoría de estos casos ocurren tras la infección con *L. donovani* y en menor medida con *L. infantum*. Sin embargo, la LDPK es extremadamente rara en pacientes infectados con *L. chagasi* (Singh y col., 2011). Además, la LDPK ha sido identificada como una manifestación de tipo síndrome inflamatorio de reconstitución inmune (SRI) antileishmania en pacientes VIH-positivos tras la administración de TARGA (Antinori y col., 2007). En el año 2008 se documentó el primer caso de un paciente con SIDA afectado por LDPK debida a *L. chagasi* en forma de SRI (Sinha y col., 2008).

1.3. RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDADOR. MECANISMOS DE EVASIÓN

La infección por los parásitos del género *Leishmania* provoca una respuesta inmune compleja e intrincada que ha dificultado durante años una comprensión completa del proceso infeccioso. Dado que se trata de un patógeno intracelular, es muy importante diferenciar que la resistencia del hospedador a la infección va a estar determinada por una respuesta de tipo Th1, compuesta principalmente por el componente celular, mientras que la susceptibilidad va a estar mediada por una respuesta Th2 caracterizada por una marcada estimulación en la producción de anticuerpos (Kemp, 2000; Spellberg y Edwards, 2001). Tal y como hemos visto, *Leishmania spp.* es un parásito cuya progresión en el hospedador vertebrado se desarrolla en el interior de los macrófagos residentes del sistema inmune. A pesar

de que estos parásitos pueden invadir potencialmente muchos tipos celulares, los macrófagos son las células diana para establecer la infección y para albergar el proceso replicativo de estos microorganismos. Éstos son las células encargadas de presentar los antígenos parasitarios a los linfocitos por medio de las moléculas de las clases I y II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad y, por lo tanto, son los encargados de iniciar la respuesta inmune adaptativa específica.

El destino de los amastigotes en el interior de los macrófagos va a depender de su estado de activación (Alexander y Bryson, 2005). Los linfocitos que participan en la respuesta protectora producen de forma predominante citoquinas pro-inflamatorias Th-1 (productoras de IFN- γ). Los macrófagos activados por la ruta clásica (M1) secretan IL-12 con lo que inducen la producción de IFN- γ en las células *natural killer* (Park y col., 2000). El IFN- γ interacciona con los macrófagos lo que desencadena la liberación de TNF- α . La acción sinérgica de IFN- γ y TNF- α produce la activación de la óxido-nitrico-sintasa (NOS2), generando NO a partir de L-arginina (Muñoz-Fernández y col., 1992). Los ratones de la línea C57BL/6, resistente a la infección por *Leishmania*, desarrollan principalmente una respuesta de tipo pro-inflamatorio Th1, promovida por los altos niveles de IL-12 que provoca la liberación de IFN- γ que a su vez estimula a los macrófagos para que estos eliminen al parásito (de Sá Oliveira y col., 2000). Por otro lado, se ha demostrado que ratones de esta misma línea C57BL/6, pero deficientes en IL-12, se vuelven susceptibles a las infecciones por *Leishmania* mediante el desarrollo de una respuesta tipo Th2 (Chakir y col., 2000).

Los macrófagos activados por linfocitos Th2 promueven una ruta alternativa (M2) mediada por citoquinas entre las que se incluyen TGF- β , IL-4, IL-10 e IL-13, lo que hace que la célula inmune se vuelva permisiva al desarrollo del parásito debido a la activación de la síntesis de poliaminas a partir de la L-arginina. La IL-10 evita que las células Th1 sinteticen citoquinas, especialmente el IFN- γ (Wu y col., 1993). Por el contrario, el IFN- γ inhibe la proliferación de linfocitos Th-2, estimulando la síntesis de TNF- α en los macrófagos infectados (Theodos y col., 1991). Por su parte, el papel de la IL-13 no está del todo claro, sin embargo, se ha visto que esta citoquina podría estar involucrada en la regulación de la liberación de IFN- γ en macrófagos estimulados (Murray y col., 2006).

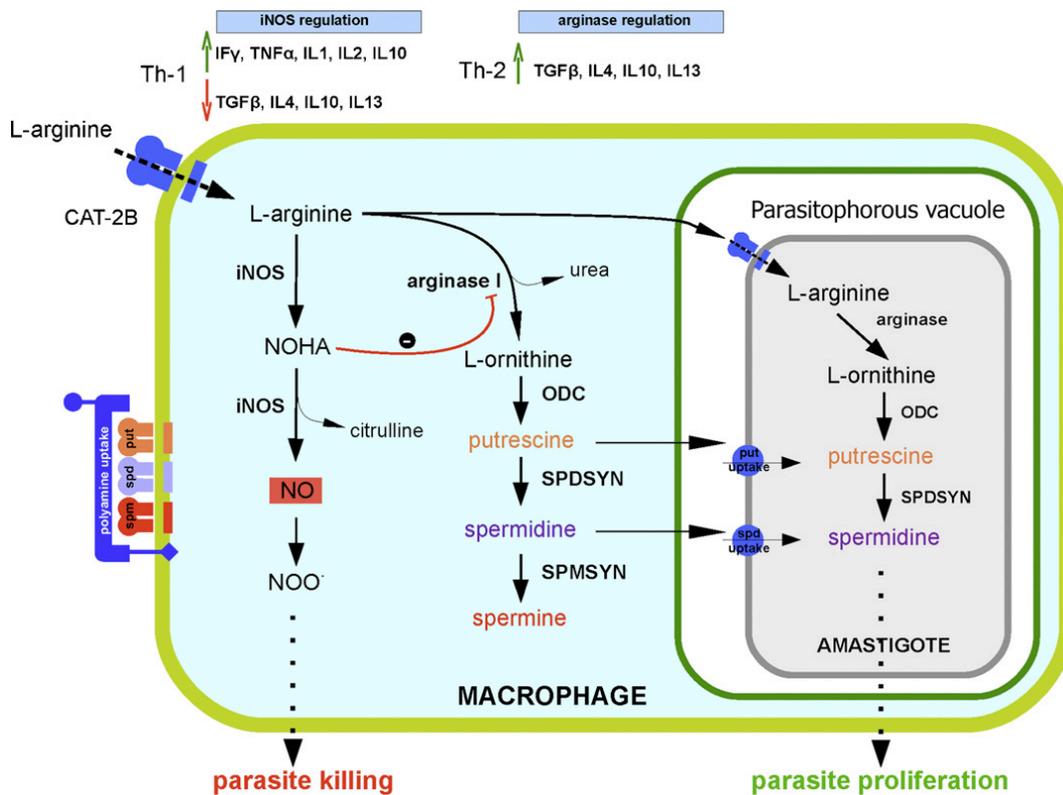


Figura 1.7. Representación esquemática de las rutas metabólicas de la L-arginina en el hospedador y en el parásito. Extraído de Balaña-Fouce y col. (2012a).

Tal y como se muestra en la Fig. 1.7, el metabolismo de la arginina, tanto en el parásito como en el propio hospedador, juega un papel muy importante en la activación del macrófago así como en la supervivencia del parásito durante la infección. La activación M1 induce la actividad NOS2 en los macrófagos que producen NO y citrulina. La producción de NO inducirá la síntesis de otras especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNOS) (Wanasen y Soong, 2008). Además de la regulación transcripcional que llevan a cabo las citoquinas y las interleuquinas sobre el sistema NOS2/arginasa, existe una regulación metabólica a nivel de intermediarios entre ambas enzimas. La N- ω -hidroxi-L-arginina (NOHA) es un intermediario de la degradación de la L-arginina a NO y citrulina, e inhibe de forma competitiva la arginasa, previniendo directamente la formación de ornitina y, como consecuencia, de putrescina (Iniesta y col., 2002). Como resultado final de esta activación Th1 se produce la muerte del parásito, el fin de la infección y el comienzo del proceso de auto curación.

En contraposición, la activación de los macrófagos por linfocitos Th2 causa un aumento de la actividad de la arginasa I del hospedador, dando lugar a la formación de ornitina, uno de los aminoácidos precursores de la síntesis de poliaminas del parásito. Las poliaminas sintetizadas, tanto por el parásito como por el hospedador, son utilizadas por los amastigotes para proliferar dentro de las vacuolas parasitóforas, lo que resulta en la progresión de la infección y en la muerte del hospedador (Muleme y col., 2009). Por lo tanto, es importante que exista un control efectivo por parte del hospedador que sea capaz de limitar el proceso patológico y proveer una respuesta inmune de memoria efectiva.

Además de los elementos de supervivencia ya descritos en el ciclo celular (punto 1.2.1), tales como la secreción de malaxadina por parte del mosquito o la presencia del LPG que evita la unión de las C5b y C9 del complemento, existen una serie de mecanismos de evasión del sistema inmunológico que van a dificultar la curación:

I. *Interferencia con las rutas de señalización en macrófagos.* Un estudio reciente ha demostrado que *L. major* disminuye los niveles de colesterol en el interior de los macrófagos, el cual está involucrado en el ensamblaje de distintos signalosomas CD40 (Rub y col., 2009). La depleción de los niveles de colesterol inhibe el ensamblaje de un signalosoma CD40 inductor de IL-12. Este signalosoma contiene también los adaptadores TRAF 2, 3 y 5, además de estimular al signalosoma CD40 inductor de IL-10. De esta forma, *L. major* limita el desarrollo de la respuesta inmune de tipo Th1.

II. *Inducción de citoquinas inmunosupresoras.* Son varios los estudios que indican como los promastigotes de *L. donovani* inducen la secreción de TGF- β activo en macrófagos derivados de médula ósea (More y Matlashewski, 1994). El aumento de los niveles de TGF- β supone una disminución del proceso inflamatorio. Además, mientras que el TGF- β no inhibe la fagocitosis inducida por estallido respiratorio, sí que suprime la expresión de iNOS, que tal y como ya hemos visto, juega un papel muy importante en la destrucción del parásito (Balaña-Fouce y col., 2012a).

III. *Inducción de Linfocitos T-reguladores (Treg)*. Se trata de una subpoblación especializada CD25⁺ de células T CD4⁺ que actúa suprimiendo la activación del sistema inmunitario, manteniendo así la homeostasis de este sistema y favoreciendo la tolerancia hacia autoantígenos. En estudios llevados a cabo en ratones infectados con *Leishmania* se ha comprobado que el desarrollo de Tregs inducibles es dependiente de la secreción de TGF-β. Ya que *Leishmania* induce la secreción de TGF-β por los macrófagos, el parásito en sí mismo promueve la formación de Tregs. Además, se ha mostrado una clara correlación entre el nivel de Tregs y la baja expresión de CD40 por células dendríticas (Martin y col., 2010). El grupo del Dr. Suffia demostró en 2006 que durante la infección con *L. major*, los Tregs se acumulan a nivel de la dermis, donde suprimen la capacidad de las células efectoras T CD4⁺ CD25⁻ para eliminar al parásito del lugar de infección por mecanismos tanto dependientes como independientes de IL-10 (Suffia y col., 2006).

1.4. TRATAMIENTO DE LA LEISHMANIOSIS: QUIMIOTERAPIA ACTUAL Y NUEVAS DIANAS BIOQUÍMICAS

En la actualidad, la anfotericina B liposomal (L-AMB) es considerada como la droga de elección para el tratamiento de la LV en países desarrollados, sin embargo, debido a su elevado coste, la extensión de este tratamiento se está viendo enormemente frenada en países menos favorecidos; donde esta enfermedad es altamente prevalente debido a su carácter endémico. Recientemente, las empresas farmacéuticas, por mediación de la OMS, han concertado precios más bajos y atractivos, destinados a estos países, lo cual, junto a la implementación de tratamientos de corta duración a dosis elevadas, hace cada vez más factible el uso de L-AMB en países en vías de desarrollo (Sundar y col., 2003; Sundar y col., 2010). Sin embargo, los antimoniales pentavalentes (Sb^V), desarrollados en el año 1945, continúan siendo el tratamiento de elección en la mayor parte del mundo. La eficacia de estos fármacos - Pentostam[®] y Glucantime[®] - ha decrecido dramáticamente, tanto por la aparición y diseminación de cepas resistentes, como por su toxicidad. Las alternativas quimioterapéuticas a los Sb^V, además de la L-AMB, incluyen la pentamidina y el alopurinol que poseen los

mismos problemas asociados, aunque no de forma tan acusada, (Alvar, 2001; Balaña-Fouce y col., 1998), pero requieren de largos tratamientos de administración parenteral (Amato y col., 2008).

En cuanto a la LC, no existe un consenso en torno a cuál es la mejor aproximación terapéutica. Esto se debe a que existen importantes deficiencias en: i) la identificación de las especies causantes, ii) establecer un criterio de curación correcto, iii) el tiempo de seguimiento médico necesario para este proceso infectivo (González y col., 2010). En el año 2007, el Amato y col. (2007) realizaron un exhaustivo estudio de los casos reportados de LMC, incluyendo tanto los tratamientos aplicados como las tasas de curación asociadas observadas. Los datos mostraron que el tratamiento con Glucantime[®] curaba al 88 % de los pacientes, mientras que el Pentostam[®] sólo alcanzaba un porcentaje de curación de apenas el 51 %. Por ello, los autores establecieron que el Glucantime[®] podría ser la droga de elección en el tratamiento de la LMC, ya que además, cuando se comparaban las tasas de curación con las de la L-AMB o de la pentamidina, los valores resultantes eran muy similares. En la Tabla 1.3 se recogen los precios de la principales drogas leishmanicidas en uso con fecha julio de 2011 presentados por den Boer y col. (2011).

Los fármacos leishmanicidas disponibles presentan otro importante inconveniente, la frecuente indeterminación de sus dianas de actuación. Este hecho dificulta enormemente la obtención de modelos simples que permitan el barrido farmacológico de un gran número de compuestos en formato de alto rendimiento (HTS). Esta realidad es aplicable tanto a aquellos fármacos con una amplia acción pleiotrópica, tales como la pentamidina, (Balaña-Fouce y col., 1998; Murray, 2000) como a aquellos que al menos poseen un blanco aparentemente definido.

Metabólicamente los promastigotes utilizan aminoácidos y azúcares como fuente principal de energía en condiciones aeróbicas. Los requisitos óptimos para el crecimiento de estas formas, pH y temperatura, se asemejan a las condiciones ambientales del estómago del flebotomino. A diferencia de los promastigotes, los amastigotes han perdido el flagelo y son por tanto inmóviles creciendo en la vacuola parasitófora de los macrófagos. Un pH ácido (4-5) y 37 °C de temperatura

son las condiciones óptimas para su desarrollo. Las diferencias metabólicas implican igualmente su fuente energética, ya que utilizan ácidos grasos de cadena larga que pueden ser degradados a gran velocidad. A pesar de las diferencias ambientales, los promastigotes y los amastigotes comparten una serie de características que les diferencian claramente de su hospedador vertebrado (Basselin y col., 1998).

TABLA 1.3. Precio de las actuales drogas de uso leishmanicida (julio 2011)

| Compuesto | Fabricante | Información sobre el precio ^a |
|--------------------------------|---|---|
| Anfotericina B deoxicolato | AmBisome® , | Variable, precio medio 7,5 US\$ por vial de 50 mg ^b |
| Anfotericina B liposomal | Gilead, USA. Único proveedor | Precio negociado por la OMS, 18 US\$ por vial de 50 mg ^c |
| Miltefosina | Impavido® , | Precios negociados por la OMS: ^d |
| | Paladin, Canadá. Único proveedor | *Adultos: 45,28-54,92 € por 56 (50 mg) cápsulas *Niños: 35,36-39,3 € por 56 (10 mg) cápsulas |
| Paromomicina | Paromomycin , | Precio aproximado en adultos por un tratamiento de 21 días: 15 US\$ |
| | Gland Pharma, India Único proveedor | |
| Estibogluconato de sodio (SSG) | Pentostam® , GSK | 66,43 GBP por vial de 100 ml, 100 mg/ml ^e |
| SSG genérico OMS | SSG , Albert David, India Único proveedor | 5,65 € por vial de 30 ml de 100 mg/ml |
| Antimoniato de meglumina | Glucantime® , Aventis | Precio negociado por la OMS: |
| | Único proveedor | 1.2 US\$ por vial de 5 ml de 81 mg/ml |

Las listas de precios negociados por la OMS están disponibles en www.who.int/leishmaniasis/research/en.

^a Precios de los fabricantes citados tal y como se establecieron por los propios fabricantes

^b UNICEF. Sources and prices of selected medicines for children, 2^a ed, 2010

^c Precio válido hasta mayo de 2013. El precio será restablecido, con un techo de 20 US\$ por vial

^d El precio depende del tamaño del pedido

^e Precio mostrado en el Formulario Nacional Británico 59

Las enzimas glicolíticas están parcialmente compartimentalizadas en promastigotes y amastigotes. Las primeras enzimas de la ruta glucolítica están englobadas en un orgánulo específico denominado glicosoma, característica común a todos los tripanosomátidos, incluido *Leishmania* (Glew y col., 1988). El Pentostam[®] y la suramina son fármacos de primera línea, cuya acción está dirigida sobre la compartimentalización de la ruta glucolítica de tripanosomátidos (Oppenoes y col. 1984).

La síntesis de esteroides en tripanosomátidos puede ser una importante diana terapéutica. A diferencia del hospedador, en el que el colesterol es el esteroide sintetizado con mayor abundancia, los derivados del ergostano (episterol y 5-hidroxidehidroepisterol) son los principales esteroides producidos por tripanosomátidos y recuerdan al ergosterol sintetizado por los hongos (Berman, 1988). Por esta razón muchos fungicidas (antibióticos poliénicos, ketoconazol) tienen actividad leishmanicida con escasos efectos tóxicos sobre el hospedador (Goad y col., 1984). Sin embargo, a diferencia de los hongos, el colesterol del hospedador puede ser incorporado y utilizado por los amastigotes, produciendo resistencias a dichos antibióticos (Basselin y col., 1998).

El metabolismo de las purinas presenta igualmente diferencias importantes entre el parásito y el hospedador. *Leishmania* carece de la capacidad de sintetizar purinas *de novo* a partir de precursores metabólicos, y debe incorporarlas del medio circundante. En consecuencia, los tripanosomátidos han desarrollado un sistema de transporte de purinas muy eficaz, así como un sistema específico de recuperación de bases púricas y pirimidínicas. El sistema hipoxantina guanina fosforribosil transferasa de los amastigotes puede ser utilizado como diana por el alopurinol, un análogo de la inosina, previa transformación a alopurinol 5'-monofosfato, con elevada actividad leishmanicida (Basselin y col., 1998). Por su parte la ruta de recuperación de pirimidinas en tripanosomas y leishmanias, es controlada por una enzima bifuncional con actividad timidilato sintetasa y dihidrofolato reductasa (Goad y col., 1989) que es inhibida eficazmente por los antiparasitarios pirimetamina, pentamidina y el agente anticancerígeno metotrexato.

Aunque las especies de los Gen. *Trypanosoma* y *Leishmania* contienen pequeñas cantidades de glutatión libre, el principal tiol intracelular de bajo peso molecular es el tripanotión (N^1, N^8 -bisglutathionil espermidina). Los parásitos sintetizan tripanotión por condensación del glutatión con espermidina, mediante dos reacciones de conjugación dependientes de ATP (Grumont y col., 1986). Las funciones del tripanotión son semejantes a las del glutatión en mamíferos, es decir, mantenimiento del equilibrio redox tiólico, defensa contra el estrés oxidativo y frente a los xenobióticos. La enzima tripanotión reductasa (ausente en el hospedador) puede ser inhibida específicamente por fármacos arsenicales trivalentes (óxido de

melarseno) (Fairlamb y Cerami, 1992), naftoquinonas y nitrofuranos, constituyendo una importante diana de acción quimioterapéutica.

Leishmania contiene altos niveles de lípidos-éter, que se encuentran principalmente en los glicolípidos unidos a glicosilfosfatidilinositol y en las glicoproteínas presentes en la superficie del parásito. Lípidos-éter (alquilfosfolípidos) tales como la miltefosina y la edelfosina poseen una importante actividad leishmanicida, tanto *in vitro* como *in vivo* (Varela-M y col., 2012). Estos compuestos, podrían actuar sobre diversas dianas incluyendo el metabolismo y biosíntesis de LPG y glicoproteína gp63 (Fairlamb y col., 1989).

La identificación de las ADN topoisomerasas (Top) como potenciales dianas farmacológicas se basa en los excelentes resultados obtenidos de los ensayos clínicos llevados a cabo con los derivados de la camptotecina (CPT) en la terapia anitumoral (Lux y col., 1996). El descubrimiento de diferencias estructurales importantes entre las Top de tipo I (TopIB) en tripanosomátidos con respecto a sus homólogas de mamífero, ha abierto un nuevo campo de investigación que combina las técnicas de biología molecular con la cristalización de proteínas para poder diseñar nuevos fármacos dirigidos específicamente a su inhibición. Estas enzimas son consideradas como potenciales dianas de intervención terapéutica debido a su posición estratégica en la replicación, transcripción y recombinación del material genético (Pommier, 2006; Balaña-Fouce, 2006).

No cabe duda de que la obtención de una vacuna sería la forma más eficaz de dar una respuesta adecuada a la leishmaniosis y especialmente a la leishmaniosis visceral. La inmunidad desarrollada por los pacientes recuperados de leishmaniosis indica que la generación de vacunas eficaces frente a esta enfermedad es viable (Reguera y col., 2008). Además, recientemente se ha propuesto el uso de una cepa atenuada de *L. infantum* deficiente en la proteína de choque térmico 70-II como vacuna segura y efectiva frente a la LV (Carrión y col., 2011; Calvo-Álvarez y col., 2012). Las evidencias más directas apuntan a que la resistencia contra la leishmaniosis está mediada por células T (Rivier y col. 1999). Se ha postulado que en el modelo murino la susceptibilidad o resistencia a la infección por *L. major* depende del subtipo de linfocitos CD4+ expandidos donde

una respuesta Th1 se correlaciona con protección, mientras que células Th2 promueven la diseminación de la enfermedad. Sin embargo, se ha descrito la exacerbación de la enfermedad tras estimulación de células T secretoras de IFN- γ (Moll y Rollinghoff, 1990). Existen claras evidencias que indican que una vacuna eficaz frente a la infección por *L. infantum* no solo deberá generar una respuesta temprana con producción de citoquinas de tipo Th1, sino que además es necesaria una respuesta de tipo celular citotóxico y la producción de anticuerpos neutralizantes. Así, los estudios que permitan definir los sistemas que inducen resistencia frente a la infección y/o enfermedad causada por *Leishmania*, y la identificación de antígenos capaces de lograr una respuesta mixta, celular y de producción de anticuerpos, constituyen una etapa primordial en el diseño de moléculas capaces de controlar esta parasitosis.

1.5. ADN TOPOISOMERASAS: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

1.5.1. Restricciones topológicas del ADN

La longitud del ADN puede ser miles de veces mayor que las dimensiones de una célula. Así, el genoma completo de una célula humana (3×10^9 pares de bases que corresponden aproximadamente a 1,8 m) se encuentra empaquetado dentro del núcleo. Ya que el diámetro medio de un núcleo es de 6 μm , el ADN debe retorcerse sobre sí mismo. En el año 1965, Vinograd y colaboradores identificaron como una molécula de ADN, bajo ciertas condiciones experimentales, adquiriría una conformación retorcida, muy compacta y que giraba sobre sí misma varias veces (Fig. 1.8) (Vinograd y col., 1965). Esta forma topológica del ADN recibió el nombre de superenrollada (del inglés *supercoiled*) en contraposición a la estructura topológica no retorcida a la que se denominó relajada (del inglés *relaxed*).

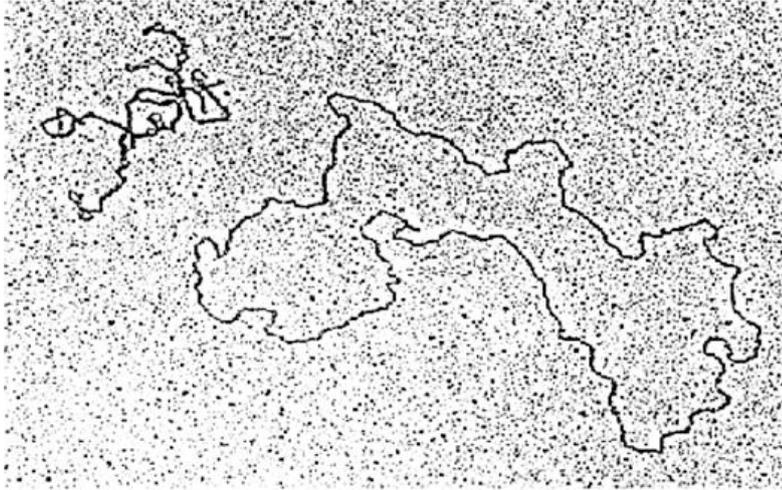


Figura 1.8. Fotografía de microscopía electrónica de los dos estados del ADN. A la izquierda de la imagen se observa el estado topológico superenrollado, mientras que a la derecha se aprecia la misma molécula de ADN en configuración relajada.

En los organismos procariontes el ADN presenta un estado superenrollado plectonómico, lo que permite que su genoma se organice en pequeños cromosomas circulares cerrados (Vologodskii y Cozzarelli 1994). En cambio, en los eucariotas, el superenrollamiento se produce en forma de solenoide, lo que facilita la acción de las histonas ayudando a una compactación más efectiva del ADN (Fig. 1.9).

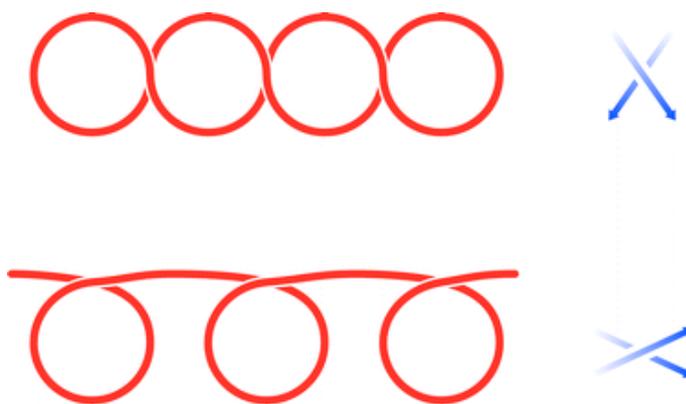


Figura 1.9. Superenrollamientos plectonómicos (superior) y solenoide (inferior). Las flechas muestran que las dos moléculas representadas poseen superenrollamiento negativo a pesar de la diferente orientación.

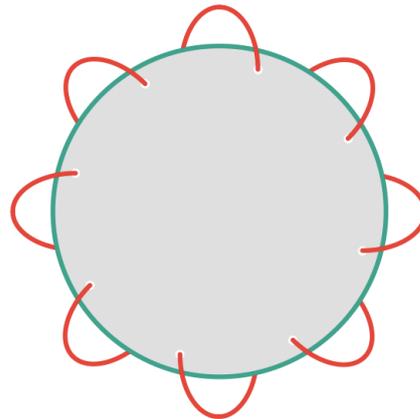


Figura 1.10. El número de enlace representa la suma algebraica de todas las intersecciones de una hebra de ADN a través de la superficie imaginaria generada por la otra hebra. En esta representación esquemática el Lk es +8.

Una propiedad topológica muy importante de una molécula de ADN es el número de enlace o *linking number* (Lk); éste no es más que el número de veces que una única hebra cruza a través de la otra sobre el plano de proyección (Fig. 1.10). El Lk depende de otras dos propiedades geométricas, el giro (Tw) y la torsión (Wr). Tw (del inglés *twist*) cuantifica el número de veces que una hebra de ADN se enrolla alrededor del eje de la doble hélice, mientras que Wr (del inglés *writhe*) indica el número de veces que la trayectoria del eje de la doble hélice se cruza sobre sí misma cuando está dispuesta en un plano; también se puede definir como el número de giros de una superhélice, considerando como superhélice a la formada por ambas hebras. Los cambios en Lk (ΔLk) son siempre números naturales, aunque no los cambios en Tw y Wr, cumpliéndose siempre que la suma de las variaciones en ambos parámetros es una constante: $\Delta Lk = \Delta Tw + \Delta Wr$.

La integridad y la organización física del ADN debe mantenerse en todo momento para garantizar la supervivencia de las células. Aún así, muchos procesos esenciales causan problemas en la estructura topológica del ADN, especialmente cuando se produce la separación de las hebras de ADN en los procesos de transcripción y replicación de los genomas. Dado que el ADN posee una estructura de doble hélice y carece de la capacidad de rotar libremente en el interior de las células, cuando se produce la separación de las hebras por los complejos

polimerasa-helicasa se generan superenrollamientos en las regiones flanqueantes. Como resultado, se forman superenrollamientos positivos por delante de los lugares de replicación o transcripción, y superenrollamientos negativos por detrás (Liu y Wang, 1987).

Sin la acción de las Top, los superenrollamientos positivos detendrían de forma casi inmediata los procesos de replicación y transcripción, mientras que los superenrollamientos negativos favorecerían la formación de estructuras anormales de ADN tales como los D-loops (cuando una hebra sencilla complementaria de ADN queda atrapada en un dúplex), R-loops (cuando se mantiene anclado un ARN a su molde de ADN tras la ARN polimerasa), cuartetos de guanosina, así como estructuras de ADN en forma Z. Todas estas alteraciones interfieren en mayor o menor medida con el funcionamiento normal del ADN (Pommier y col., 2010).

1.5.2. Las ADN Topoisomerasas

Las ADN topoisomerasas (Top) son la maquinaria molecular encargada de controlar los estados topológicos del ADN en la célula. Estas enzimas llevan a cabo su función pasando una hebra del ADN a través de una rotura en la hebra opuesta (TopI) o una región de dúplex de la misma molécula u otra diferente a través de una apertura de doble cadena abierta en el ADN (TopII). Dentro de las diferentes variedades de Top encontramos las que pueden relajar únicamente superenrollamientos negativos, las que relajan tanto superenrollamientos positivos como negativos, las que introducen superenrollamientos negativos en el ADN (ADN girasa bacteriana) y las que introducen giros de signo positivo (girasa reversa). Las Top catalizan la reacción de transesterificación entre un residuo Tyr de su centro activo y un grupo fosfato del ADN; esto conduce a la formación de un complejo intermediario covalente enzima-ADN. Posteriormente el ADN es sellado de nuevo por medio de una segunda reacción de transesterificación (Wang, 2002).

Hasta el momento se han descrito cuatro familias de Top (Tabla 1.4): TopIA, TopIB, TopIIA y TopIIB, con la única excepción de la TopV, descubierta por Alexei

Slesarev en 1993, presente únicamente en una especie, el arquea *Methanopyrus kandleri* (Slesarev y col., 1993; Forterre y col., 2007).

Tabla 1.4. Características y diferencias entre las cuatro familias Top.

| | Tipo I | | Tipo II | |
|--------------------------------|---|-----------------|------------------|------------------|
| | TopIA | TopIB | TopIIA | TopIIB |
| Dominio ATPasa | no | no | si | si |
| Dependencia metálica | Mg ²⁺ | no | Mg ²⁺ | Mg ²⁺ |
| Ruptura del ADN | cadena sencilla | cadena sencilla | cadena doble | cadena doble |
| Polaridad de la ruptura | 5' | 3' | 5' | 5' |
| ΔLk | +1 | ± 1 | ± 2 | ± 2 |
| Enzimas | Top I, Top III y girasa reversa (eubacterias) | Top I, Top V | Top II, girasa | Top VI |

▪ **ADN topoisomerasas de Tipo II (TopII)**

Las TopII son enzimas homodiméricas que llevan a cabo importantes cambios en el estado topológico del ADN, ya sea su relajación, el desanudado o el desencadenado del mismo. Estos procesos son posibles gracias a la ruptura transitoria de las dos cadenas de la doble hélice que va acompañado de gasto energético en forma de hidrólisis de ATP (Wang, 1998). Durante el proceso de ruptura y ligado (Fig. 1.11), se produce un intermediario covalente entre los extremos 5' de cada una de las hebras del ADN y cada una de las subunidades enzimáticas (Bates y col., 2011). Esto origina un cambio conformacional, dejando un espacio abierto, el segmento G, por donde pasa una segunda región de ADN bicatenario, bien de la misma cadena (en casos de relajación, anudado o desanudado) o bien de otra diferente (encadenado, desencadenado), lo que

explicaría porqué el Lk cambia en bloques de dos en dos cuando actúan estas enzimas (Bates y col., 2011).

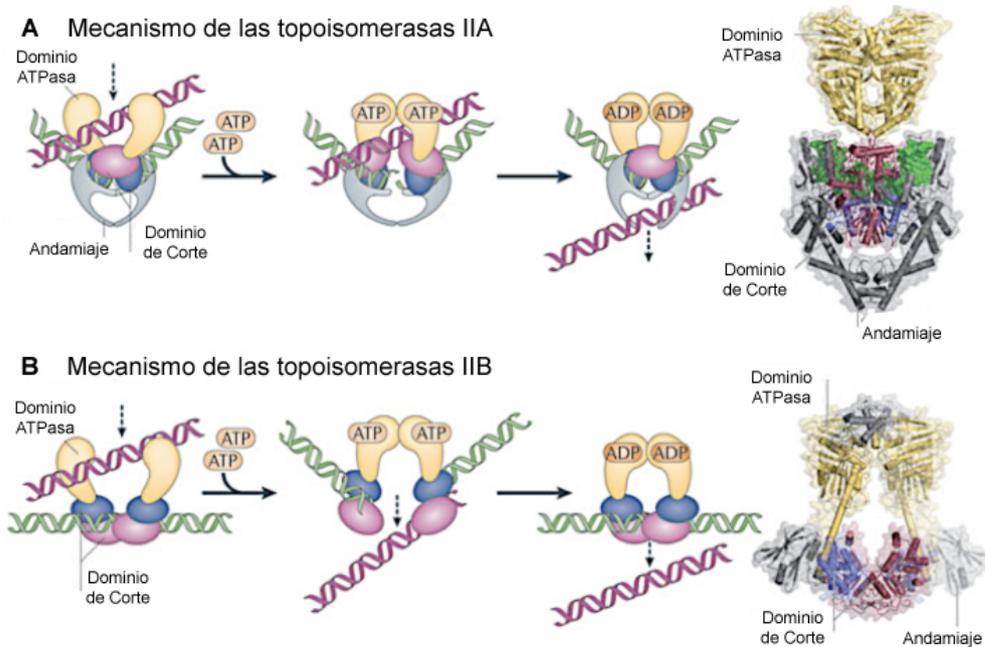


Figura 1.11. (A) Las TopIIA cortan ambas cadenas del dúplex de ADN (verde) y pasan otro dúplex (rosa) a través de la rotura reversible en una reacción asociada al gasto de ATP. Una vez que se ha producido la religación de las hebras los productos son liberados de la enzima. (B) Las TopIIB presentan un mecanismo similar al de las TopIIA y poseen los mismos dominios de corte y ATPasa, pero difieren en toda su estructura terciaria. Modificado de Bates y col. (2011).

De la misma manera que las girasas descritas en *E. coli* (Gellert y col., 1976) las TopII hidrolizan ATP para introducir superenrollamientos negativos en el ADN. Sin embargo, el resto de enzimas TopII (incluyendo las TopIIB) catalizan reacciones que no necesitan coste energético, tales como la relajación, el anudado/desanudado y la encadenado/desencadenado. Recientemente, el grupo del Anthony Maxwell (2011) ha propuesto un modelo en el que la energía liberada por la hidrólisis del ATP es imprescindible para manipular las interacciones proteína-proteína y mantener la configuración dimérica de la enzima durante el paso del dúplex a través del corte (Bates y col., 2011).

Se han identificado y expresado funcionalmente las TopII de varios protozoos parásitos como: *P. falciparum*, *Cryptosporidium parvum*, *T. brucei*, *T. cruzi* y varias especies del Gen. *Leishmania* sin que existan grandes diferencias morfológicas o cinéticas con las de sus correspondientes hospedadores.

- **ADN Topoisomerasas de Tipo I (TopI)**

Las TopI, en contraposición a las TopII, únicamente pueden cortar una de las cadenas que componen la doble hebra de ADN, relajando dicha cadena para acto seguido volver a religarla (Champoux y Dulbecco, 1972). Estas enzimas han sido subdivididas en dos grupos, TopIA y TopIB, que difieren tanto a nivel estructural como mecanicista. Históricamente las TopIA se habían descrito únicamente en procariotas, mientras que las TopIB se relacionaban con organismos eucariotas. Sin embargo, hoy en día este concepto ya no está vigente ya que ambas están presentes en todos los seres vivos. La mayor diferencia entre ellas es que las enzimas TopIA forman el intermediario covalente con el extremo 5' del segmento escindido, mientras que las TopIB lo hacen con el extremo 3'. El intermediario se produce tras el ataque nucleofílico del residuo Tyr característico del centro catalítico sobre un grupo fosfato de la cadena nucleotídica, originando un enlace fosfodiéster transitorio que rompe la cadena de ADN (Pommier, 2009). Esto permite que las TopIB puedan cambiar el Lk del ADN en múltiplos de 1 (n), y en cambio, las TopIA puedan únicamente introducir cambios de 1 en el Lk de una hebra de ADN circular (Leppard y Champoux, 2005).

- **TopIA**

Dentro de la denominación TopIA encontramos todas las enzimas TopI y III pertenecientes a eubacterias, la TopIII de levaduras y mamíferos, así como las girasas reversas de eubacterias y arqueobacterias. Salvo el caso excepcional de la girasa reversa de *Methanopyrus kandleri*, que es un heterodímero, estas enzimas son siempre monoméricas (Kozyavkin y col., 1994). El mecanismo de acción de estas enzimas guarda cierta similitud con las TopIIA, ya que ambas forman un intermediario covalente con el ADN mediante un enlace fosfodiéster 5' con el

residuo Tyr del centro activo. Estas enzimas son también capaces de catalizar el “anudado”, “desanudado” y entrelazado de círculos de ADN de cadena sencilla, así como el “anudado”, “desanudado”, “encadenado” y “desencadenado” de círculos de ADN de cadena doble mellados o rotos.

Además, al igual que las TopII, requieren la presencia de un ión metálico divalente para relajar el ADN, por lo tanto se hace totalmente necesaria la presencia de Mg^{2+} . Sin embargo, existe un aspecto que diferencia claramente estas dos familias, las TopIA no necesitan hidrolizar ATP para llevar a cabo su función (con la única excepción de la girasa reversa).

Existen otra serie de propiedades catalíticas comunes a todos los miembros de la subfamilia TopIA (Champoux, 2001); i) para que estas enzimas se unan al ADN, éste debe poseer un alto contenido de superenrollamientos negativos; ii) necesitan que exista una región que presente ADN de cadena sencilla; iii) nunca consiguen una relajación completa de los superenrollamientos. Durante la relajación del ADN, el Lk sufre cambios en pasos de uno, en contraposición a las TopII que lo variaban en bloques de dos.

- **TopIB**

Las TopIB se encuadran en dos categorías estructurales divergentes. La primera categoría incluye las TopIB virales, siendo la TopI de *Vaccinia* la más estudiada. La segunda categoría incluye las enzimas eucarióticas, tipificadas por la TopIB humana altamente investigada (Leppard y Champoux, 2005). Las TopIB, a pesar de compartir escasa homología con otras Top, se relacionan tanto funcional como estructuralmente con un grupo de enzimas conocido como tirosina recombinasas, que incluyen la Cre del bacteriófago P1, la XerD de *E. coli* y ciertas integrasas de bacteriófagos (Fujimoto y col., 2006). Las TopIB difieren en su funcionamiento de las TopIA (Tabla 1.5) En primer lugar, las TopIB pueden relajar totalmente el ADN superenrollado, tanto positiva como negativamente. No necesitan de la presencia de ADN en forma de cadena sencilla. El enlace covalente que se establece con la cadena de ADN se produce con el extremo 3' de la hebra

escindida en vez de con el 5' como en el caso de las TopIA. Finalmente, estas enzimas no requieren de iones metálicos para relajar ADN.

Tabla 1.5. Clasificación y características cinéticas de las TopI.

| | Procariotas | | | | | Virus | Eucariotas | |
|------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------|
| | TopI | TopIII | Dam TopIII | Girasa Reversa | TopV | TopI | TopI | TopIII |
| Tipo | IA | IA | IA | IA | IB | IB | IB | IA |
| Sustrato | ss | ss | ss | ss | ds | ss | ds | ss |
| Enlace | 5'-P | 5'-P | 5'-P | 5'-P | 3'-P | 3'-P | 3'-P | 5'-P |
| Mg²⁺ | + | + | + | + | - | - | - | - |
| ATP | - | - | - | + | - | - | - | - |
| Actividad | relaja (-) ADNsc | corte de 2 ADNss | relaja (-) ADNsc | introduce sc (+) | relaja (+)(-) ADNsc | relaja (+)(-) ADNsc | relaja (+)/(-) ADNsc | relaja (-) ADNsc |

ss: cadena sencilla
 ds: doble cadena
 sc: superenrollado
 (-): superenrollamiento negativo
 (+): superenrollamiento positivo

1.6. LA TOPIB HUMANA (hTopIB)

1.6.1. Estructura

La TopIB humana (hTopIB) es una enzima monomérica constituida por 765 aminoácidos, con un peso molecular de 91 kDa. Gracias a una caracterización estructural basada en la conservación de la secuencia de aminoácidos entre especies, estudios de sensibilidad a las proteasas, ensayos hidrodinámicos, experimentos de reconstitución funcional de fragmentos (Stewart y col., 1996), y finalmente, análisis cristalográficos (Redinbo y col., 1998) se han conseguido diferenciar cuatro dominios estructurales y funcionales en la hTopIB: el dominio N-terminal, el dominio *core*, el dominio linker y el dominio C-terminal (Fig. 1.12).

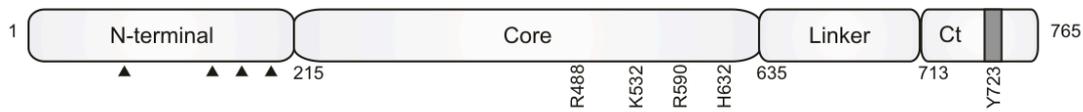


Figura 1.12. Representación lineal de los dominios estructurales de la hTopIB. La hTOPIB se compone de un dominio N-terminal (1-214), un dominio central (core) (215-634), un dominio *linker* (635-712) y un dominio C-terminal (713-765). En el esquema se muestran los cinco aminoácidos que constituyen el centro activo de la proteína. Las señales de localización nuclear (NLS) están representadas por triángulos negros.

Los primeros 214 aminoácidos de la proteína constituyen el dominio N-terminal (Met1-Gly214), cuyo peso aproximado es de 24 kDa. En él se concentran el 72 % de los residuos cargados y el 90 % de los polares dentro de toda la hTopIB. Este dominio no presenta una estructura definida en la conformación final de la proteína, existiendo un grado de conservación filogenéticamente muy bajo, y una elevada sensibilidad a la acción de las proteasas (Redinbo y col., 1999). En los primeros estudios realizados sobre la hTopIB se estableció que los 174 primeros residuos eran prescindibles. En esta región se encuentran dos de las cuatro señales de localización nuclear (NLS) identificadas en la enzima humana. Sin embargo, Mo y colaboradores demostraron en 2000 que la NLS II (situada entre los aminoácidos 148 y 159) era la encargada de conducir a la hTopIB al núcleo, mientras que la NLS IV (aminoácidos 192-198) era responsable de relocalizar la enzima en el nucléolo (Mo y col., 2000). Además, los autores describieron una NLS ácida entre los residuos 117 y 146, con dos residuos Asp responsables de su transporte al núcleo. Dentro del dominio N-terminal también se han descrito posibles secuencias de fosforilación, y regiones de interacción con la nucleolina, con el antígeno SV40, con algunos factores de transcripción y con las proteínas p53 y WRN.

Si bien se ha considerado que los primeros 214 aminoácidos del extremo N-terminal no son necesarios para la actividad catalítica de la enzima, la región comprendida entre los residuos 186 y 210 ha sido sujeto de estudio acerca de su papel en la actividad y sensibilidad a CPT (Alsner y col., 1992). Otro estudio en el que se eliminó el dominio N-terminal completo demostró que debían estar

presentes un número mínimo de residuos para que existiese una correcta función catalítica, ya que son necesarios para establecer interacciones dinámicas con el ADN durante el proceso de relajación. Estas complejas interacciones de control con ADN son de naturaleza no covalente y se establecen corriente abajo del sitio de escisión (Lisby y col., 2001). Más tarde se demostró que la estabilización estructural mediada por los residuos del dominio N-terminal estaba estrechamente relacionada con las estructuras de bisagra del dominio *core* constituida por las interacciones entre los aminoácidos Trp203-His346 y Trp205-206 (Staker y col., 2002).

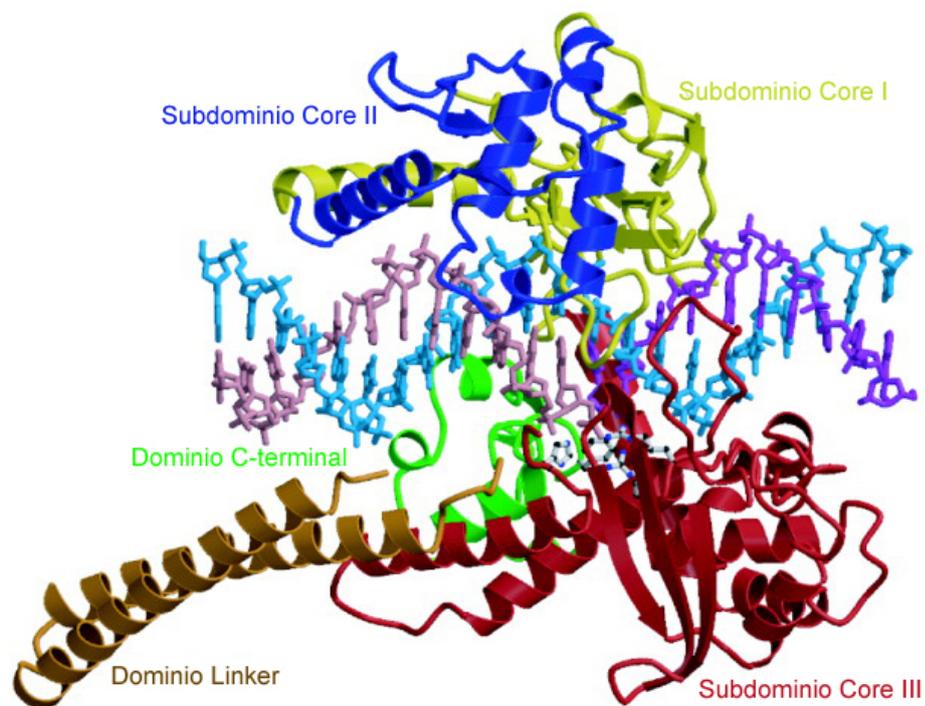


Figura 1.13. Esquema tridimensional obtenido de la estructura del cristal de la forma de 70 KDa de la hTopIB en complejo con un dúplex de ADN de 22 pares de bases (pbs). El dominio *core* ha sido esquematizado en color amarillo, azul y rojo, el dominio linker en naranja y el extremo C-terminal en verde. La hebra intacta del oligonucleótido se muestra en azul y la cadena escindida en morado y rosa, correspondiendo a las regiones corriente abajo y corriente arriba del sitio de corte, respectivamente. Los residuos del centro activo fueron representados mediante un modelo de pares de bases en blanco y negro. Modificado de Redinbo, y col. (1999).

El dominio *core* cuya extensión abarca desde el aminoácido Ile215 a la Ala635 está muy conservado y posee un peso de 54 kDa. Gracias a los estudios cristalográficos se ha podido observar la estructura globular de este dominio, lo que se traduce en una alta resistencia a la actividad digestiva de las proteasas (Stewart y col., 1996). El dominio *core* se divide en los subdominios *core* I (215-232 y 320-433), II (233 y 319) y III (434-635), tal y como se muestra en el esquema de colores de la Fig. 1.13. Uno de los lóbulos de la proteína está formado por los subdominios *core* I y II (amarillo y azul) y constituyen lo que ha sido denominado como "CAP", caracterizado por la presencia de elementos secundarios α y β , incluyendo dos largas hélices α o "nose cone" que se extienden 25 Å del cuerpo de la molécula (Redinbo, y col., 2000). El segundo lóbulo, denominado "CAT" (Fig. 1.14), forma una base alrededor de ADN y está constituido por el subdominio *core* III (rojo) conjuntamente con el dominio C-terminal (verde). Este lóbulo está principalmente compuesto por hélices α que contienen los cinco residuos catalíticos (Arg488, Lys532, Arg590, His632 del subdominio III y la Tyr723 del centro activo, localizada en el dominio C-terminal) responsables de la reacción de escisión y relajación del ADN (Redinbo y col., 1999).

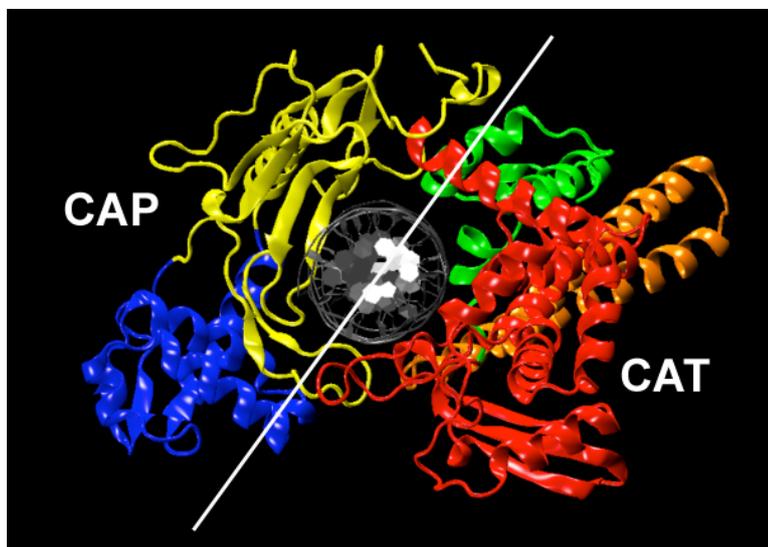


Figura 1.14. Vista 3D de la modelización de la hTopIB en la que se diferencian los dos lóbulos que constituyen la proteína. En la izquierda de la imagen se muestra el CAP, constituido por el subdominio *core* I, representado en amarillo, y el subdominio *core* II, en azul. En la mitad derecha de la figura se delimita el lóbulo CAT, formado por el subdominio *core* III, en rojo, y el extremo C-terminal, en verde.

Ambos lóbulos están conectados entre sí por una región que adquiere estructura de hélice α . En el lado opuesto a esta hélice se encuentran dos lazos contrapuestos denominados labios (*lips*), pertenecientes a los subdominios *core* I y III, que interactúan a través de seis aminoácidos (367-369 del subdominio *core* I y 497-499 del subdominio *core* III), y un puente salino que conecta la región "CAP" con la base de la enzima. Para que la unión al ADN tenga lugar, la enzima debe encontrarse en una conformación "abierta", en la que actuarían la Pro431 y la Lys452 como una "bisagra" (Stewart y col., 1998) además de la Gly437 que gracias a su flexibilidad estructural desempeña un papel importante en la apertura y cierre de la enzima (Redinbo y col., 2000). A pesar de la baja homología en su secuencia, la mayor parte del subdominio *core* III de la hTopIB comparte algunas características estructurales con la región *core* de las enzimas tirosina recombinasas (integrasas de bacteriófagos, la XerD de *E. coli* y las recombinasas Cre del fago P1).

Tras el dominio *core* encontramos el dominio *linker* (636-712), una región altamente sensible a las proteasas y apenas conservado entre las diferentes especies. Esta región de 77 aminoácidos (5 kDa) está cargada positivamente y organizada en dos largas hélices α antiparalelas (α 18 e α 19) que forman una estructura "coiled-coil" que sobresale por la base de la enzima (Fig. 1.13 en naranja) (Redinbo y col., 1999). Las hélices antiparalelas están estabilizadas por tres puentes salinos inter-helicoidales y nueve interacciones hidrófobas que incluyen las cadenas laterales de residuos de Leu así como las largas cadenas laterales alifáticas de los residuos cargados (Stewart y col., 1998). La superficie de este dominio en contacto con el disolvente es generalmente de carácter hidrófila. La región que interactúa con el ADN durante el proceso catalítico muestra una elevada densidad de cargas positivas, aunque solamente se ha identificado el contacto de dos residuos (Lys650 y Arg708) con el esqueleto de azúcar-fosfato del ADN. Las hélices del *linker* no son necesarias para la actividad de relajación de la enzima pero tal y como demostraron Stewart y colaboradores, juegan un papel muy importante manteniendo el equilibrio escisión-religación (Stewart y col., 1997). En concreto, Fiorani y colaboradores descubrieron que la mutación puntual Ala653Pro produce un incremento en la flexibilidad de este dominio, lo que supone un desplazamiento del equilibrio escisión-religación hacia la religación. Además, este

mutante mostró una alta resistencia a la CPT debido a la rápida religación que impide la entrada de la droga en el centro activo (Fiorani y col., 2003).

La aparente flexibilidad del dominio, junto a su proximidad al ADN, la presencia de aminoácidos cargados positivamente, así como la evidencia de que la delección del *linker* resulta en un incremento de la velocidad de rotación *in vitro* durante el proceso de catálisis; demuestran que el *linker* juega un papel esencial en el proceso global ralentizando el paso de religación, lo que permite que la enzima permanezca asociada al ADN durante un mayor número de ciclos de escisión y religación. Este aspecto es de gran importancia, ya que tal y como veremos a continuación, la velocidad de religación de la enzima salvaje permite que ésta sea sensible a CPT, ya que la droga tiene la posibilidad de estabilizar el intermediario covalente proteína-ADN.

Finalmente, la extensión comprendida entre los aminoácidos Gln713-Phe765, de aproximadamente 8 kDa, constituye el dominio C-terminal. Esta región adquiere la disposición de cinco pequeñas hélices α y en su interior se encuentra el residuo Tyr723 que forma parte del centro catalítico. Esta región junto con el dominio *core* forma una cavidad de aproximadamente 20 Å en la que se encaja el ADN. Ésta es la razón por la que el dominio está formado principalmente por residuos con carga positiva, ya que facilitan la interacción con el ADN. En el interior de dicha cavidad están alojados los aminoácidos integrantes del centro activo, constituyendo la "péntada" catalítica (Arg488, Lys532, Arg590, His632 y Tyr723). De hecho, este dominio junto con el dominio *core* representan la estructura mínima capaz de relajar el ADN *in vitro*, tal y como se demostró mediante un ensayo de reconstitución de la actividad enzimática *in vitro* (Stewart y col., 1997).

1.6.2. Mecanismo de catálisis y relajación

Actualmente, el modelo más preciso para explicar el mecanismo de acción de la hTopIB es el conocido como "rotación controlada" (Stewart y col., 1998), ya que el extremo OH 5' libre es capaz de rotar antes del paso de religación controlado por la fricción generada entre el ADN y la cavidad de la propia enzima (Koster y col., 2005). El ciclo catalítico de la hTopIB se compone de cuatro etapas que

suceden de forma secuencial tal y como se observa en la Fig. 1.15: i) unión de la enzima al ADN (Fig. 1.15 B); ii) reacción de *trans*-esterificación de la enzima con el ADN (Fig. 1.15 C); iii) relajación del ADN gracias a la tensión helicoidal acumulada (Fig. 1.15 D-E); iv) sellado del enlace fosfodiéster y liberación del ADN (Fig. 1.15 A).

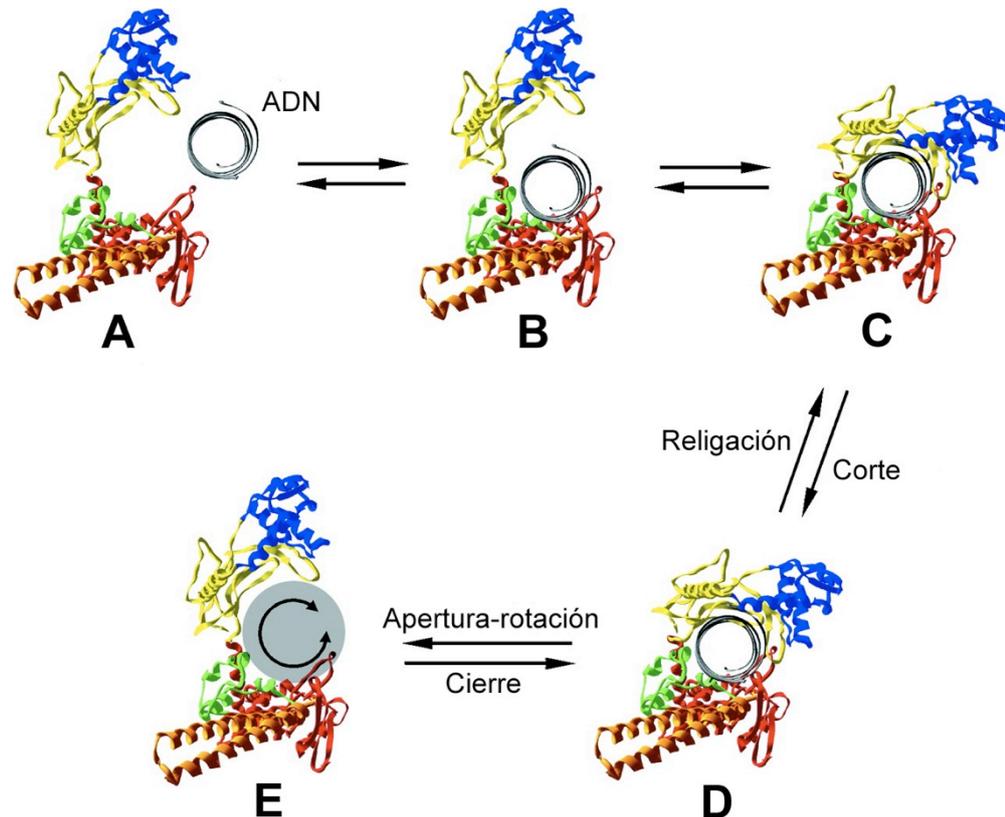


Figura 1.15. Esquema del mecanismo de relajación del ADN mediado por la hTopIB. Tras la unión al ADN (A y B) la forma cerrada de la enzima cataliza el corte de la hebra a escindir (C y D). El ADN cortado rota (E) alrededor de una serie de enlaces en la cadena intacta. Existe la posibilidad de que sucedan múltiples rotaciones antes de que los pasos sean revertidos, y el ADN puede entonces ser cortado de nuevo o liberado. Modificado de Champoux 2001.

La especificidad de sustrato de la hTopIB ha sido caracterizada tanto al nivel de la secuencia de nucleótidos como al nivel de la estructura terciaria del ADN. El grupo liderado por el Dr. Tanizawa realizó un mapeado de los sitios de corte de estas enzimas, utilizando para ello detergentes que atrapan los complejos covalentes (Tanizawa y col., 1993). En estos ensayos se observó que la hTopIB

cortaba el ADN con una preferencia por una combinación específica de nucleótidos que se extiende desde la posición -4 a la -1 del sitio de corte. Los nucleótidos preferentes en la cadena a escindir son 5'-(A/T)(G/C)(A/T)T-3' con la enzima unida covalentemente en el residuo T⁻¹.

En algunas ocasiones podemos encontrar un residuo C en la posición -1. En la estructura del cristal únicamente se puede reconocer un contacto base específico entre la proteína y el ADN. Dicha interacción está constituida por un puente de hidrógeno entre las Lys532 y el O⁻² de la T⁻¹. A pesar de este hecho, parece que interacciones proteína-ADN adicionales desempeñan un papel importante en la selección del sitio de corte. Existen numerosos estudios que apuntan que las TopIB de organismos eucariotas se unen con preferencia a los ADNs de plásmidos superenrollados con respecto a las formas relajadas. En concreto, mediante la sustitución del residuo Tyr del centro activo por Phe (Y723F) se demostró que la enzima tenía una mayor preferencia de unión por el ADN superenrollado con respecto al ADN relajado (Muller, 1985). Ya que estas enzimas se unen preferentemente a superenrollamientos de cualquier signo, todo parece indicar que el motivo estructural reconocido dentro del ADN se corresponde con un fragmento doblado de ADN. Una explicación alternativa sería que las TopIB podrían reconocer el nodo donde dos dúplex de ADN se cruzan, tal y como sucede en el proceso de replicación.

La ruptura de una de las hebras de ADN se produce por el ataque nucleofílico del O⁻⁴ de la Tyr723 sobre el fosfato de la hebra de ADN que va a ser cortada. Esta reacción de *trans*-esterificación genera un enlace fosfodiéster transitorio entre la Tyr 723 y el fosfato en posición 3' de la T⁻¹, liberándose el grupo hidroxilo de la posición 5' del ADN. Basado en las estructuras cristalográficas conocidas se ha observado que los residuos clave en la actividad experimentan diferentes orientaciones, sugiriendo así que durante el ciclo catalítico existen dos estadios diferentes (Champoux, 2001). Cuando en posición -1 de la cadena de ADN se encuentra una T los residuos de Arg488 y Arg590 forman enlaces de hidrógeno con átomos de oxígeno del fosfato que va a ser escindido, mientras la His632 permanece unida a otro oxígeno. En cambio, cuando en posición -1 se encuentra una C el grupo fosfato experimenta una rotación de 75°, llevando a la

Arg488 y a la His632 a estar unidas por enlaces de hidrógeno a los dos mismos átomos de oxígeno, pero siendo ahora la Lys532 y no la Arg590 la que forma un enlace de hidrógeno con el oxígeno. En ambas orientaciones parece que la Tyr723 está perfectamente alineada para el ataque nucleofílico y que los tres aminoácidos básicos mencionados están colocados para estabilizar el estado pentavalente transitorio mediante interacciones con oxígenos del fosfato escindido (Champoux, 2001; Redinbo y col., 1998). Aunque se ha sugerido que el O⁻⁴ de la Tyr723 podría ser activado por la proximidad de una base, las estructuras cristalográficas obtenidas no permiten identificar ningún aminoácido lo suficientemente cercano a la Tyr como para desempeñar este papel. Sin embargo, se ha visto que una molécula de agua permanece unida por un enlace de hidrógeno a la Arg590 solamente a 2.3 Å del mencionado oxígeno (Redinbo y col., 2000) pudiendo así actuar como una base específica aceptando un protón durante la catálisis.

Una vez escindida una de las hebras, se produce una rotación libre del filamento debido a la tensión acumulada en el ADN en forma de superenrollamientos. Las cargas positivas presentes en la superficie del dominio *linker* y de la región del "nose cone" tienen la función de frenar y estabilizar esta rotación, estableciendo lo que Champoux denominó como control de rotación. De esta forma se produce una relajación del ADN superenrollado de una forma distributiva. Una vez relajado el ADN, se produce el resellado del enlace fosfodiéster utilizando para ello la energía almacenada en el complejo covalente intermediario ADN-TopIB. Por este motivo el paso de escisión-religación no precisa de la hidrólisis de ATP, al contrario de lo que ocurre con las TopIA. Bajo condiciones normales, los intermediarios de escisión son transitorios y el proceso de religación está favorecido.

1.7. LA TopIB DE LEISHMANIA

Las TopIB de *Leishmania* (LdTopIB) difieren significativamente del resto de las enzimas homólogas descritas hasta el momento. En 1999, Broccoli y colaboradores identificaron un gen que codificaba para una proteína de 635 aa en *L. donovani* similar a una TopIB, pero carente del motivo "SKxxY" del extremo C-terminal (conservado en todas las TopIB), que contiene la Tyr catalítica. Este

polipéptido recombinante era incapaz de desenrollar el ADN *in vitro*, lo que apuntaba a que se trataba de un pseudogen o a que tenía que existir otro gen que codificase una proteína capaz de completar el extremo C-terminal.

Con posterioridad, Villa y col. (2003) encontraron dentro del cromosoma 4 de *L. major*, un segundo gen que codificaba para una proteína que contenía el centro activo perdido y por tanto, conservaba el motivo “SKxxY” con la Tyr 222 necesaria para la actividad catalítica. Tras clonar ambos genes en un vector bistrónico de expresión en levaduras, se consiguió purificar una enzima recombinante capaz de relajar ADN *in vitro*. Gracias a estos resultados, la LdTopIB fue caracterizada como una enzima heterodimérica compuesta por una subunidad grande de 635 aminoácidos y 73 kDa (LdTopIL) que contenía el extremo N-terminal y el dominio “core” y una subunidad pequeña de 262 aa y 28 kDa (LdTopIS), que conservaba el residuo Tyr catalítico.

En el mismo año se publicaron resultados similares en tripanosomas africanos usando un modelo clásico de purificación de proteínas. Parece que esta singular organización genómica de la TopIB, que combina dos protómeros de diferentes tamaños para construir la enzima activa, es exclusiva de tripanosomátidos (Bodley y col., 2003).

De la comparación estructural de las TopIB de tripanosomátidos con la enzima ortóloga humana, se pueden asignar dominios y subdominios funcionales que aparecen detallados en el esquema de la Fig. 1.16.

La subunidad LdTopIL contiene el extremo N-terminal más corto que el de la enzima humana y muy poco conservado filogenéticamente. El dominio central o *core* sí guarda alta homología con el de otras TopIB y es donde se encuentran la mayoría de aminoácidos que interaccionan con el ADN (Fig. 1.17), como la Arg-314 (Arg-488 en la enzima humana), Lys-352 (Lys-532 en la enzima humana), Arg-410 (Arg-590 en la enzima humana) e His-453 (His-632 en la enzima humana). Finalmente la enzima presenta una extensión C-terminal que carece de homología con otras proteínas ortólogas (Díaz-González y col., 2008).

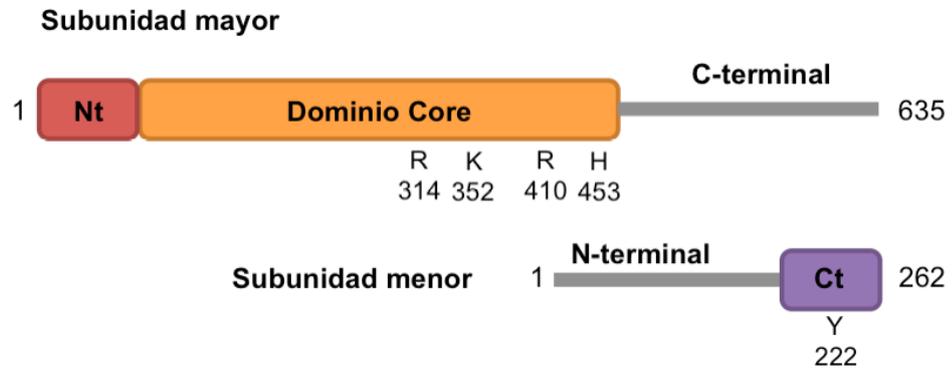


Figura 1.16. Representación esquemática lineal de la LdTopIB. Nt representa el dominio N-terminal y Ct el dominio C-terminal. Los aminoácidos señalados constituyen la péntada catalítica en el centro activo de la enzima.

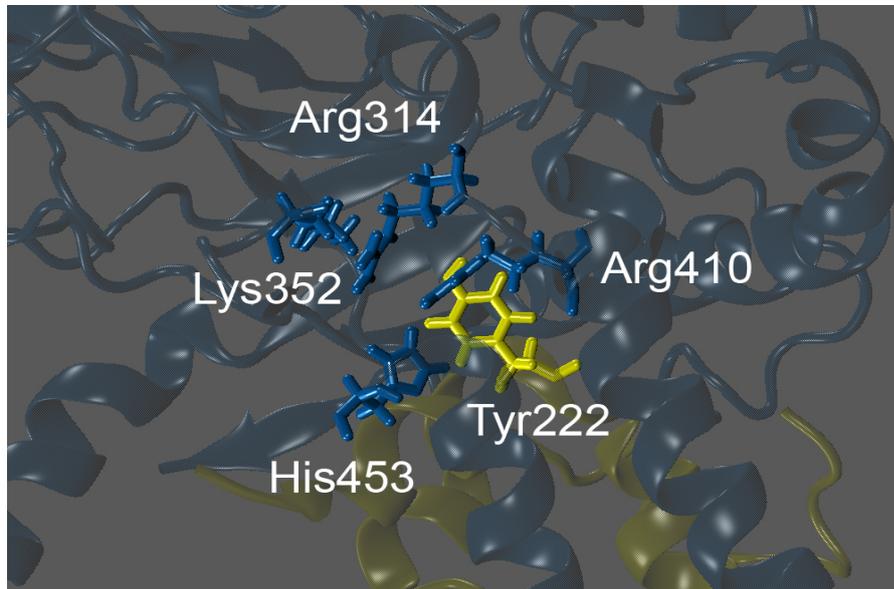


Figura 1.17. Representación tridimensional de los amino ácidos integrantes del centro activo de la LdTopIB dentro del cristal realizado por Davies y col. (2006). Los residuos pertenecientes a la subunidad grande (LdTopIL) están representados en color azul, mientras que la Tyr222 de la subunidad pequeña está esquematizada en color amarillo.

La subunidad LdTopIS contiene un extremo N-terminal largo no conservado y rico en residuos Ser susceptibles de fosforilación, que podrían constituir un mecanismo de regulación post-traducciona. En su extremo carboxilo guarda una alta homología con el extremo C-terminal de otras TopIB y es donde se sitúa la Tyr-222 (Tyr-723 en la enzima humana), esencial para la ruptura transitoria de la cadena nucleotídica del ADN (Reguera y col., 2006).

La localización del *linker* es hasta ahora desconocida. Podría estar formado por parte de los extremos de la dos subunidades que al interaccionar entre sí estabilizarían el conjunto, o podría generarse como consecuencia de modificaciones post-traduccionales que eliminasen parte de los grupos amino y carboxilo de las diferentes subunidades. Das y col. (2004), han sugerido que la pérdida de los primeros 39 aminoácidos del extremo N-terminal de la subunidad grande, disminuyen la velocidad de religación de la enzima, apuntando a su posible papel en la coordinación entre el ADN y otras partes de la enzima. Por otro lado, la pérdida de los 99 primeros aminoácidos del extremo N-terminal, originan la pérdida de la actividad de relajación de la enzima. Estos resultados sugieren que los aminoácidos de las posiciones 40-99 podrían participar en la interacción entre las dos subunidades del heterodímero, colocando correctamente la Tyr del centro activo para su ataque nucleofílico sobre la molécula de ADN sustrato.

A excepción de las levaduras, la Top IB es esencial para los organismos eucariotas. El silenciamiento, mediante técnicas de siARN, de cada una de las subunidades, da como resultado una drástica reducción de la síntesis de ADN y ARN en *T. brucei in vitro*, de forma similar a cuando se tratan las formas intraeritrocitarias de tripanosomas con CPT (Bakshi y Shapiro, 2004). Además, el doble reemplazamiento génico del gen que codifica LdTopIS, origina un fenotipo no viable en *L. major* (Balaña-Fouce y col., 2008).

1.8. LAS TOPIB COMO DIANA TERAPÉUTICA

Para llevar a cabo sus funciones fisiológicas, las Top generan cortes transitorios en el ADN. Consecuentemente, estas enzimas se vuelven altamente vulnerables bajo ciertas condiciones de estrés tanto fisiológico como no fisiológico. Estos factores de estrés (por ejemplo la exposición a venenos Top, pH ácido y estrés oxidativo) pueden convertir las TopIB en nucleasas que rompen el ADN, resultando en la inestabilidad genómica y/o muerte de la célula. Debido a este papel clave en el mantenimiento de la fidelidad de la información genética, su estructura se ha mantenido conservada filogenéticamente, lo que hace que los fármacos diseñado no discriminen entre ellas. Sin embargo, la TopIB de tripanosomátidos difiere enormemente de la de su hospedador, además de presentar un grado de expresión diferente durante los procesos de crecimiento rápido. Todo esto abre una nueva vía hacia el diseño de moléculas que actúen específicamente sobre la enzima del parásito.

Clásicamente los inhibidores de las TopIB se han clasificado en dos categorías (Pommier, 2006): i) los compuestos que estabilizan el complejo de escisión entre la enzima y el ADN se han denominado genéricamente inhibidores de clase I o venenos enzimáticos; ii) por su parte los compuestos que interfieren las funciones catalíticas de la enzima se han denominado inhibidores de clase II.

1.8.1. La camptotecina (CPT)

La reacción de escisión/religación de las TopIB es la diana de algunos de los fármacos anticancerígenos con mayor éxito clínico (Pommier, 2006). Las TopIB son particularmente vulnerables a los inhibidores durante el paso intermediario de escisión (nos referiremos a ellos como complejos CL). A pesar de su frecuencia elevada a lo largo del genoma, los CL son normalmente tan sumamente transitorios que no pueden ser detectados. La camptotecina (CPT) y sus derivados cercanos (Fig. 1.18) son capaces de atrapar de forma específica y reversible los complejos CL. Dado que el paso de religación del complejo CL requiere el ataque nucleofílico del enlace tirosil-ADN-fosfodiéster por parte del extremo del ADN libre (el extremo 5'-hidroxilo), es crucial que el extremo 5'-hidroxilo-ADN esté perfectamente alineado

con el enlace tirosil-fosfodiéster. Se cree que la CPT se intercala entre los pares de bases en el sitio de corte, donde la enzima está enganchada a la doble hélice, lo que promueve una desalineación del extremo 5'-hidroxilo del ADN que incrementa la vida media del complejo (Redinbo y col., 1998).

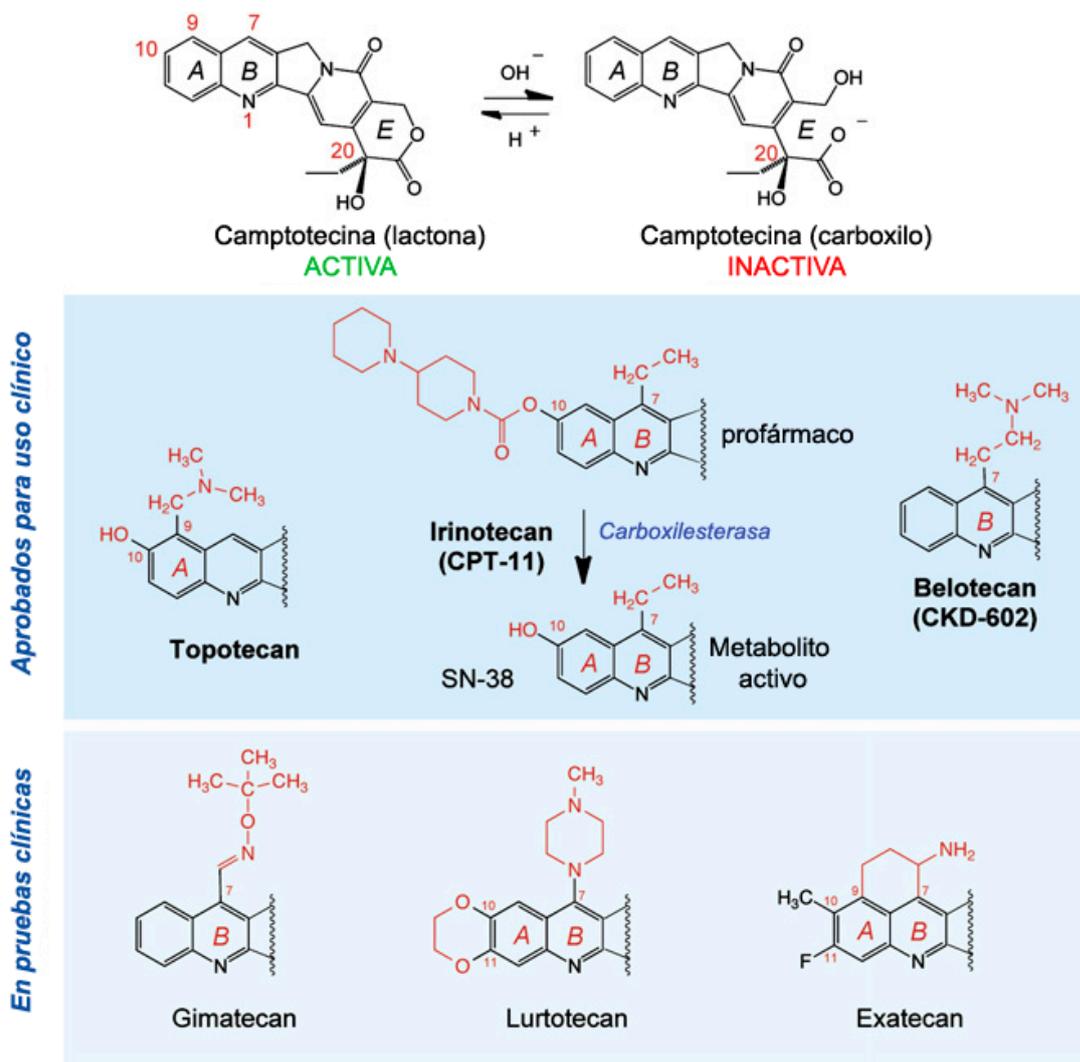


Figura 1.18. Representación esquemática de la CPT y de algunos de sus en fase clínica o ya aprobados para su uso clínico en tratamientos.

El correcto resellado de los complejos de CL es inhibido también por alteraciones comunes en las bases del ADN, tales como oxidación de base,

presencia de sitios abásicos, aductos carcinogénicos y roturas preexistentes en el ADN (Pommier, y col., 2006), ya que todas ellas pueden producir la desalineación de cadenas.

La CPT fue identificada originariamente como un componente antitumoral en el extracto de la planta *Camptotheca acuminata*. En ese momento fue probada clínicamente, mostrando una gran eficacia frente a diversos tumores en pacientes humanos (Pommier, 2006), por lo que fue aprobada por la FDA para tratamientos de cáncer humano, tales como cáncer de ovario, colon o pulmón. Con el transcurso de los años se han desarrollado numerosos análogos de la CPT que aunque presentan una elevada similitud estructural y un mecanismo de acción idéntico tienen diferente comportamiento farmacocinético. Algunos se usan en la clínica del cáncer y otros están en evaluación (Ulukan y Swaan, 2002; Pommier, 2006; Kaufmann y col., 1995; Li, y col., 2003). Tanto el topotecan como el irinotecan se introdujeron en medicina humana en 1997 para el tratamiento de tumores sólidos, más de 30 años después de que se aislara la CPT.

La CPT es un inhibidor no competitivo de la TopIB. Esta droga se une de forma reversible al complejo ADN-TopIB, sin embargo, es incapaz de interactuar con cada uno de estos dos elementos por separado. Los derivados de la CPT (CPTs) son capaces de penetrar rápidamente en el interior de las células de mamífero e interactuar con la TopIB a los pocos minutos de exposición. Los complejos CL estabilizados por la CPT se revierten tras unos minutos de la eliminación de la droga del medio. Por lo tanto, la CPT representa una importante herramienta molecular, ya que tanto la exposición a la droga como la captura de los complejos de CL pueden ser controlados de forma precisa.

Todas las CPTs tienen un anillo de lactona terminal que las hace inestables en soluciones acuosas produciéndose la rápida hidrólisis no enzimática dependiente del pH para formar un anillo abierto de ácido hidroxicarboxílico, un inhibidor menos potente de la TopIB (Hertzberg y col., 1989). A pH neutros o básicos el equilibrio de la reacción se desplaza hacia la formación de especies menos activas, y a pH ácidos se favorece la formación de la lactona activa. La CPT tiene un carbono asimétrico en posición 20 siendo la configuración S la

farmacológicamente activa (Hsiang y col., 1989). Ya que los venenos de la TopIB se unen de forma reversible a los complejos de CL, y la TopIB religa rápidamente el ADN mellado tras la eliminación de la droga, estos compuestos no dañan directamente el ADN.

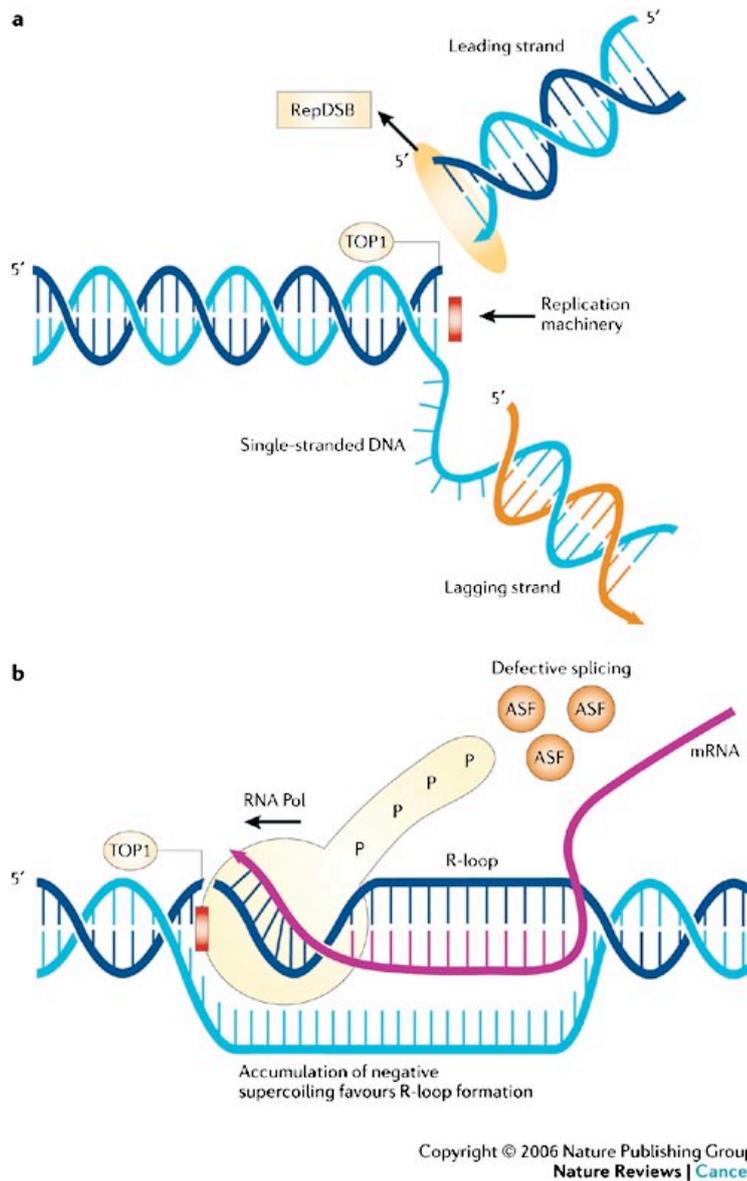


Figura 1.19. Conversión de los complejos CL en daño de ADN por colisión con la horquilla de replicación y durante el proceso de transcripción. A) Cuando la horquilla de replicación colisiona con el complejo CL estabilizado por la CPT se produce una rotura de doble cadena. Además, la colisión provoca la detención de la horquilla, conlleva la formación del complejo irreversible covalente y desencadena la muerte celular. B) Cuando la CPT atrapa el complejo CL en una hebra que se está transcribiendo (azul oscuro), la ARN polimerasa puede chocar con dicho complejo y parar la elongación del ARN. El dúplex ARN-ADN impide la religación del complejo CL produciendo una rotura irreversible de cadena sencilla (Pommier, 2006)

La CPT mata de forma selectiva las células que se encuentran en la fase S de su ciclo celular (Hsiang y col., 1989) por la colisión entre la horquilla de replicación que avanza y los complejos CL (Fig. 1.19). Esta colisión desencadena tanto la muerte celular específica de fase S como un arresto del ciclo celular en fase G2. Además, esto conduce a otros tres acontecimientos importantes: i) formación de una rotura de doble hebra en la horquilla; ii) parada irreversible del movimiento de la horquilla de replicación y iii) la formación de los aductos irreversibles ADN-TopIB.

- Mecanismo de formación del complejo CL

Tras la cristalización de la hTopIB unida covalentemente al ADN y al topotecan (Redinbo y col., 2000; Staker y col., 2005) se estableció un modelo de interacción en el que el derivado de la CPT se intercalaba en el espacio formado por el corte de cadena tras el paso de el ataque nucleofílico del residuo Tyr, mimetizando así la posición de una base nucleotídica.

En este modelo, los anillos planos ocupan el mismo espacio que la base en posición +1, siendo su eje mayor paralelo a los pares de bases. El complejo de unión intercalante se genera por una rotación del enlace fosfodiéster de la hebra intacta, que amplía su ángulo sin necesidad de una rotación de base fuera de la hélice. La posición abierta del fósforo se estabiliza mediante puentes de hidrógeno con las cadenas laterales de los residuos Arg362 y Gly363, al tiempo que la Thr718 forma un puente de hidrógeno en -1 y la Arg364 y Lys532 con el par de bases GC en posición +1. Por su parte, el anillo E del topotecan (Staker y col., 2005) y de la CPT (Stewart y col., 1998) establece contacto con el Asp533, independientemente del estado químico de la droga; en el caso de presentarse como ácido hidroxicarboxílico, se suman la Asn722 y la Arg364 – sólo en el caso de la CPT – como agentes estabilizantes de la droga al establecer contacto con el carbonilo 17 y el N⁻¹, respectivamente (Fig. 1.20).

Como otros compuestos que inducen daños en el ADN, los inhibidores de clase I se comportan como inductores de la muerte celular programada. Sen y col. (2004) demostraron que el efecto leishmanicida inducido por la CPT aparecía

inmediatamente después de que su función mitocondrial fuera inhibida lo que originaba un incremento en su potencial de membrana. Este desacoplamiento iba ligado a un incremento en la concentración de ROS, con el concomitante efecto sobre la peroxidación lipídica de membranas y disminución de la concentración intracelular de glutatión reducido. Como en las células de mamífero, se han descrito que otros marcadores apoptóticos como las proteasas de tipo caspasa, la liberación de Ca^{2+} de los compartimentos intracelulares y la activación de la poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP) eran igualmente producto de la exposición de los promastigotes de *L. donovani* a CPT.

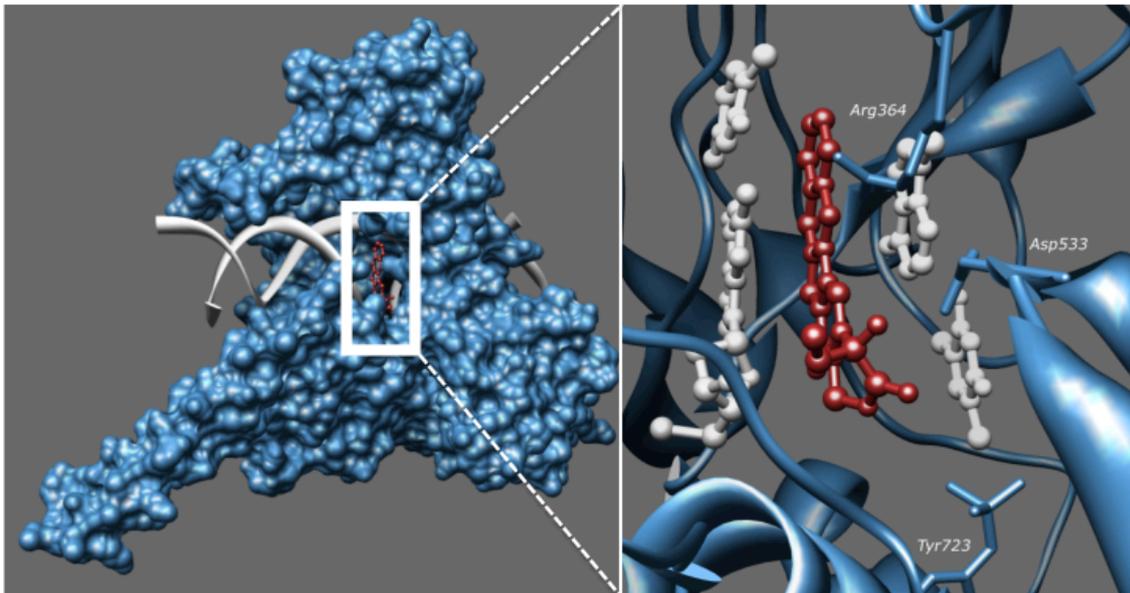


Figura 1.20. Mecanismo de interacción de la CPT con el complejo covalente ADN-TopIB: la droga se intercala entre los pares de bases del ADN interaccionando tanto con la proteína como con el ADN. La imagen de la derecha presenta el mapa de superficie de la hTopIB (azul) en complejo ternario con un fragmento de ADN de 22 pb (blanco) y la CPT (rojo). En la imagen de la izquierda se aprecia con detalle la intercalación de la CPT entre los pares de bases en posición +1 y -1.

Se han realizado muy pocos estudios para determinar la actividad de la CPT y de sus análogos en infecciones experimentales. En 2001 Proulx y col. estudiaron la eficacia de una formulación de CPT encapsulada en liposomas en un modelo murino de leishmaniosis visceral observando una reducción significativa de la carga

parasitaria a la dosis de 2,5 mg/kg peso vivo cuando se administraba por vía intraperitoneal.

1.8.2. Derivados poliheterocíclicos no camptotecínicos

Los compuestos indolocarbazólicos (rebecamicina; REB y derivados) constituyen un prometedor grupo de inhibidores de clase I de la TopIB con estructura poliheterocíclica producidos naturalmente por el actinomiceto *Saccharotrix aerocolonigenes* (Yamashita y col., 1992). Muchos derivados semisintéticos de la REB se han ensayado *in vitro* para evaluar su relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR) frente a multitud de líneas tumorales humanas y de animales que han servido para comenzar algunos ensayos clínicos de importancia. La estructura poliheterocíclica plana de estas moléculas (Fig. 1.21) les permite intercalarse entre los pares de bases de ADN donde finalmente se establecen los complejos ternarios junto con el ADN y la enzima (Prudhomme, 2003). En 2005, Deterding y col. encontraron que la REB presentaba un buen efecto citotóxico frente a tripomastigotes de *T. brucei* a concentraciones sub-micromolares.

Una segunda clase de inhibidores de clase I de las TopIB son los compuestos con estructura indenoisoquinolínica (Fig. 1.21). Igual que los compuestos anteriores, algunas de estas moléculas se encuentran en fase preclínica como agentes antitumorales (Antony y col., 2007), pero presentan una serie de ventajas sobre las CPTs: i) poseen una mayor estabilidad química; ii) estabilizan los complejos CL en sitios diferentes a los de las CPTs, lo que indica que afectan potencialmente genes diferentes; iii) su actividad antiproliferativa es generalmente superior a la de los derivados CPT; iv) no son excretadas por los transportadores de membrana de tipo ABC, capaces de generar resistencia a CPTs. Otros compuestos no camptotecínicos son los derivados de las fenantridinas (ARC-111), los cuales comparten muchas de las ventajas ya descritas para las indenoisoquinolinas. Este hecho no es en absoluto sorprendente si se considera la enorme similitud química existente entre ambas familias de compuestos (Feng y col., 2009).

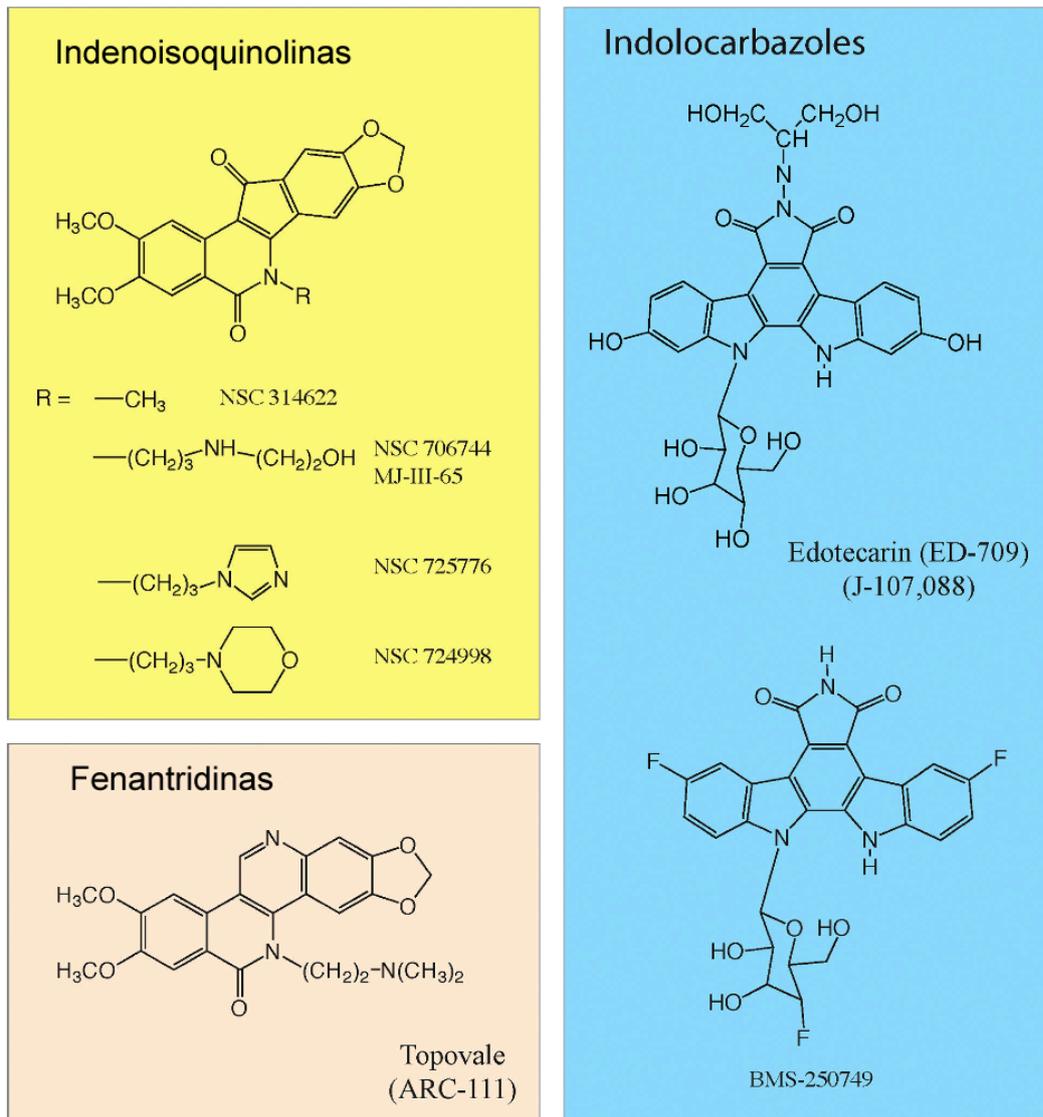


Figura 1.21. Estructura química de los inhibidores TopIB no CPT con relevancia clínica. En la figura se recogen las tres familias químicas más importantes: indenoisoquinolinas (bloque amarillo), indolocarbazoles (bloque azul) y fenantridinas (bloque rosa).

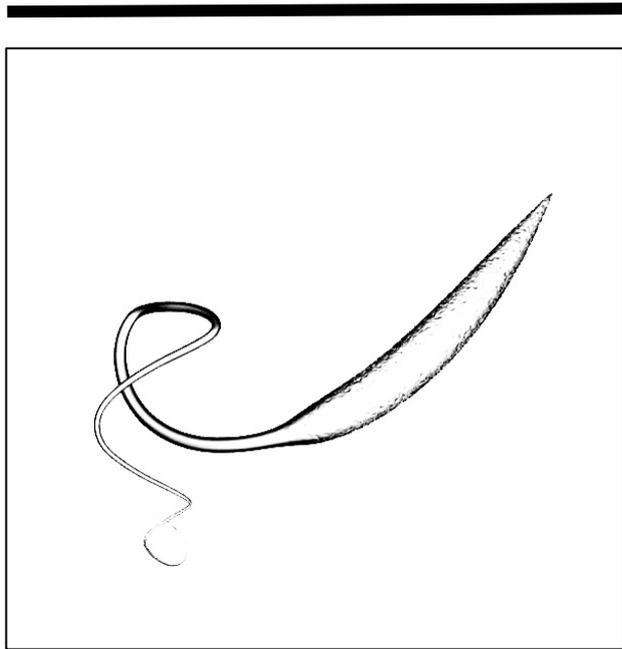
L. donovani es muy sensible a otros fármacos inhibidores de clase I es el derivado naftoquinónico diospirina. La diospirina es un inhibidor relativamente específico de la enzima de *Leishmania*, necesiéndose concentraciones diez veces superiores para producir un efecto semejante en la enzima homóloga de mamífero (Ray y col., 1998). Por su parte, los derivados del ácido betulínico con estructura de triterpenoides pentacíclicos actúan previniendo la formación del complejo binario

enzima-ADN aunque, a diferencia de los compuestos anteriores, no forman parte del mismo (Chowdhury y col., 2003). Este compuesto tiene un efecto drástico sobre el crecimiento de promastigotes de *L. donovani* en los que inducen la marginación de la cromatina y subsiguiente descromatinación, aunque no se han encontrado efectos sobre el ADNk.

La berberina es otro inhibidor de clase I de la TopIB con estructura poliheterocíclica semejante al fármaco antitumoral intercalante benzo[a]acridina (Vennerstrom y col., 1990). La berberina y alguno de sus análogos, han sido estudiados *in vitro* frente a promastigotes de *L. donovani* y formas sanguíneas de *T. brucei* y *T. congolense*, mostrando eficacia en el rango micromolar. Los ensayos en experimentación animal con estos compuestos han mostrado su eficacia en infecciones experimentales de hámster (Marquis y col., 2003).

1.8.3. Otros inhibidores de la TopIB

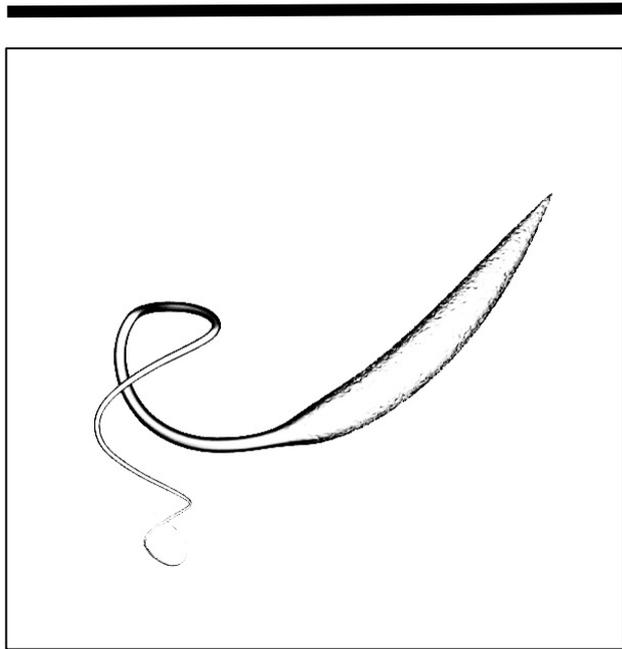
Finalmente, ciertos compuestos que se han venido utilizando desde hace décadas como antiparasitarios, pueden comportarse como inhibidores tipo II de la TopIB en ensayos *in vitro*. Entre estos inhibidores resaltaríamos los fármacos leishmanicidas de elección derivados del antimonio pentavalente; Glucantime® (antimoniato de meglumina) y Pentostam® (estibogluconato de sodio). Estos compuestos estabilizan los complejos binarios de escisión *in vitro* (Walker y Saravia, 2004), aunque no parece que constituya su mecanismo de acción principal *in vivo*. Por otro lado, los compuestos que se unen al surco menor externo del ADN tales como los derivados bis-benzimidazólicos (Ho-33342, Ho-33258) y las diamidinas aromáticas pentamidina y berenil, pueden inhibir la TopIB *in vitro*. Estos compuestos se unen a las regiones del ADN ricas en AT interfiriendo en la catálisis enzimática sin estabilizar los complejos CL de escisión (Chen y col., 1993). Un trabajo reciente demuestra sin embargo que el efecto leishmanicida de estos compuestos está relacionado sólo marginalmente con la inhibición de la TopIB, indicando un comportamiento pleiotrópico más complejo (Jean-Moreno y col., 2006).



2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

1. Determinar las regiones de la LdTopIB implicadas en la interacción entre las dos subunidades que componen la enzima y en la formación de un dominio *linker* funcional.
2. Estudiar la influencia del dominio *linker* en la actividad de relajación de la enzima así como su papel en la sensibilidad a venenos TopIB.
3. Delimitar y caracterizar los posibles motivos de señalización específica hacia núcleo y/o kinetoplasto presentes en ambas subunidades de la LdTopIB.
4. Validar la LdTopIB como diana molecular en el posible tratamiento de las diferentes formas de leishmaniosis mediante el estudio de diferentes derivados de la CPT, indenoisoquinolinas y ácidos grasos sobre la actividad catalítica de la enzima y en cultivos celulares.



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1. Cepas bacterianas

La cepa de *E. coli* DH5 α (Hanahan, 1983) se utilizó en experimentos de transformación para la amplificación de plásmidos (Clontech Laboratories, Inc.; Palo Alto, CA. EEUU). La cepa de *E. coli* XL-1Blue (Holmes y Quigley, 1981) se utilizó para la amplificación de los plásmidos obtenidos por mutagénesis direccional (Agilent Technologies, Inc; Santa Clara, CA. EEUU).

TABLA 3.1. Descripción genotípica de la cepas bacterianas DH5 α y XI-1Blue.

| | Genotipo |
|-------------------------------|---|
| DH5α | <i>deoR endA1 gyrA96 recA1 hsdR17(rk⁻,mk⁺) relA1 supE44 thi-1</i> $\Delta(\text{lacZYA-argFSV169})$ f80 δ lacZDM15 F λ ⁻ |
| XI-1Blue | <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' proAB lacIqZ Δ M15 Tn10(tet ^R)] ^c |

3.1.2. Cepas de levaduras

Para la expresión de las diferentes proteínas recombinantes se utilizaron las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* EKY3 y MBY3. Ambas cepas fueron un regalo de la Dra. Mary A. Bjornsti del St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, EEUU. La ventaja de estas levaduras es que tanto EKY3 como MBY3 son deficientes en TopIB. Además, la cepa MBY3 es especialmente útil ya que presenta

una mutación en el gen *rad52* que la hace deficiente en la reparación del ADN por recombinación homóloga.

TABLA 3.2. Descripción genotípica de la cepas de levaduras utilizadas en este trabajo.

| | Genotipo |
|-------------|--|
| EKY3 | MAT α , <i>ura3-52</i> , <i>his3Δ200</i> , <i>leu2Δ1</i> , <i>trp1Δ63</i> , <i>top1</i> : :TRP1 |
| MBY3 | MAT α , <i>ura3-52</i> , <i>his3Δ200</i> , <i>leu2Δ1</i> , <i>trp1Δ63</i> , <i>top1</i> : :TRP1, <i>rad52</i> : :LEU2 |

3.1.3. Cepas de *Leishmania*

Para la realización del presente estudio han sido empleadas dos cepas de *Leishmania*, una de *L. donovani* y otra de *L. infantum*, ambas cedidas amablemente por Dr. José M. Requena del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC Madrid, España). La cepa de *L. donovani* LEM75 ha sido utilizada para la extracción del ADN genómico así como para los estudios de localización nuclear. La cepa de *L. infantum* (BCN-150) fue empleada en los ensayos de incorporación de [2-¹⁴C] timidina, sensibilidad a fármacos y de precipitación de complejos covalentes *in vivo*.

3.2. VECTORES

3.2.1. pBluescript SK (+/-)

La familia de plásmidos pSK (Stratagene) tienen un tamaño de 2.958 pb. Las secuencias incluyen la presencia de una zona clonado múltiple (MCS), resistencia al antibiótico ampicilina (*bla*), así como el origen de replicación monocatenario del bacteriófago f1. Esto permite la obtención de ADN circular de cadena sencilla, además de la selección por color de los transformantes. Esta selección se consigue gracias al X-gal presente en el medio de cultivo. Si se produce una inserción de ADN exitosa, las células positivas presentarán color

blanco mientras que aquellas en las que no ha habido recombinación crecerán con una tonalidad azulada.

3.2.2. pESC-URA GAL

Los vectores pESC están específicamente diseñados para la expresión y análisis funcional de genes eucariotas en *S. cerevisiae*. El vector pESC-URA es un plásmido de expresión episomal en levaduras (YEp) de 6.631 pbs que toma su esqueleto a partir del fagémido pBluescript II SK(+). Entre las características del vector destacan: i) la presencia del origen de replicación pUC y el gen *bla*, lo que permite la replicación y selección en *E. coli*; ii) contiene el origen de replicación de levaduras, permitiendo así su utilización en *S. cerevisiae*; iii) posee el marcador URA3 que permite la selección y mantenimiento del vector de expresión en auxotrofia; iv) los promotores GAL1 y GAL10 en orientación opuesta, que permite la expresión simultánea de dos genes.

3.2.3. pXG-GFP+2

Este vector perteneciente a la serie pXG de expresión en *Leishmania*, fue amablemente cedido por el Dr. Steve Beverley (Dpt. Microbiology, University of Washington en St. Louis MO, EEUU). Está optimizado para el rastreo de proteínas quiméricas mediante la fusión de polipéptidos en el extremo C-terminal de la proteína verde fluorescente (GFP). La expresión episomal de la GFP en cultivos de *Leishmania spp* se consigue en presencia del antibiótico G418 como marcador de selección y sobreexpresión. En esta construcción en particular, el sitio de clonado múltiple (MCS) está localizado en el extremo C-terminal de la GFP que incluye una serie de mutaciones puntuales dirigidas a aumentar la fluorescencia emitida. Asimismo contiene un marcador *bla* necesario para la construcción de las quimeras.

3.2.4. YCpGAL1-hTOP1

Este vector de 12.400 pbs contiene el ADNc de la hTop1B bajo el control del promotor inducible por galactosa GAL1 y posee el marcador de selección URA3. El YCpGal1-hTop1 fue creado por el Dr. Wang y amablemente cedido por la Dra.

Paola Fiorani (Department of Structural Biology, University of Rome "Tor Vergata", Rome, Italy).

3.3. MEDIOS DE CULTIVO

3.3.1. Medio Luria-Bertani (LB)

Es el medio de cultivo estándar para el crecimiento de las cepas de *E. coli* utilizadas en el estudio (Sambrook y col., 1989). Se preparó disolviendo 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl en 1 L de H₂O, con un pH final de 7,0. Para su utilización como medio sólido se añadieron 10 g de agar por litro de medio de cultivo. La esterilización se realizó en un autoclave Sterilclav-18 (Raypa) durante 20 min a 120 °C.

3.3.2. Medio YPD

El YPD (Yeast Peptone Dextrose) es el medio de cultivo estándar para el crecimiento de *S. cerevisiae*. Para su preparación se disolvieron 10 g de extracto de levadura y 20 g de bactopectona en un volumen de 900 mL de H₂O, para ser inmediatamente esterilizado en el autoclave con un ciclo estándar. Una vez atemperado fue suplementado con ampicilina estéril (50 µg/mL) y 100 mL de glucosa al 20 % (p/v).

3.3.3. Medio S.C. ura-

Las levaduras transformadas con el plásmido pESC-URA deben crecerse en un medio S.C. ura- deficiente en uracilo para mantener la auxotrofia. El S.C. ura- fue suplementado con tres azúcares diferentes a una concentración final del 2% (p/v): i) glucosa, para el crecimiento inicial del cultivo; ii) rafinosa, para eliminar las trazas de glucosa que actúa como represor de los promotores GAL1 y GAL10; iii) galactosa para inducir la expresión de las proteínas recombinantes. Para su preparación se mezclaron 1,7 g de medio para levaduras sin aminoácidos ni (NH₄)₂SO₄ (Difco Laboratories, Detroit, MI), 5 g de (NH₄)₂SO₄, 0,72 g de una mezcla de aminoácidos sin uracilo y 2 mL de NaOH 1 N en 900 mL de H₂O. Tras el

proceso de autoclavado se añadieron 100 mL de la solución del azúcar requerido para dar lugar a una concentración final del 2% (p/v).

3.3.4. Medio SOC

El SOC es un medio de cultivo para la obtención de células competentes de *E. coli* (Inoue y col., 1990). Se preparó disolviendo 20 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 0,5 g de NaCl en 1 L de H₂Odd, con un pH final de 7,0. Para su utilización como medio sólido se añadieron 20 g de agar por litro de medio de cultivo. Se esterilizó en autoclave durante 20 min a 120°C. Inmediatamente antes de ser utilizado, se añadieron 5 mL de MgCl₂ 2M y 20 mL de D-glucosa 1M, ambas soluciones estériles.

3.3.5. Medio M199

Es un medio de cultivo básico para el crecimiento de promastigotes de *Leishmania spp.* Se preparó un stock concentrado 5x para poder partir de él a la hora de preparar medio líquido o en placa para las distintas especies de *Leishmania*. Para ello se disolvieron 53,15 g de M199 (Sigma Aldrich®) en 1 L de H₂Odd, al que se añadió ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazintanosulfónico (HEPES) hasta una concentración final de 25 mM. El pH se ajustó a 6,9. Para esterilizarlo se utilizaron filtros de 0,22 µm de diámetro de poro.

- Medio líquido: Para el crecimiento de cultivos líquidos de *L. donovani*, se diluyeron 100 mL de medio M199 5x en 500 mL de H₂Odd estéril. Se suplementó con 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB) sudamericano (Innogenetics), 40 mM HEPES, 0,1 mM adenina, 5 ‰ (p/v) hemina, 1 ‰ (p/v) biotina, 2 ng/mL de bipterina y 5 mL de un cóctel de antibióticos penicilina (10.000 unidades/mL) y estreptomocina (10.000 µg/mL) (Sigma-Aldrich®).
- Medio sólido: Dado que la selección de colonias aisladas de promastigotes se realiza en placa de Petri, se preparó medio sólido mezclando medio M199 2x con agar noble (Difco®) líquido al 2 % (p/v). El agar noble se preparó mezclando 10 g con 500 mL de H₂Odd, que se autoclavaron para

permitir la completa disolución de la mezcla y al mismo tiempo la esterilidad de la misma; una vez terminado el ciclo de autoclavado, se enfrió a 60 °C y se mezcló a partes iguales con M199 2x previamente calentado a 37 °C y en presencia del antibiótico de selección.

3.4. MANTENIMIENTO DE MICROORGANISMOS

3.4.1. Bacterias y levaduras

Las cepas bacterianas DH5 α y XI-1Blue y las cepas de *S. cerevisiae* EKY3 y MBY3 se almacenaron bien a 4 °C en su correspondiente medio sólido o congeladas a -80 °C tras ser resuspendidas en el medio de cultivo adecuado (SOC para las DH5 α y XI-1Blue; S.C. ura- o YPD para las levaduras) suplementados con DMSO al 10% (v/v).

3.4.2. Promastigotes de *Leishmania* spp.

Los promastigotes de las diferentes especies de *Leishmania* se mantuvieron conservados mediante congelación en tanques de nitrógeno líquido. Para ello se resuspendieron 10^6 células/mL en M199 suplementado con DMSO al 10% (v/v), en ausencia de tampón HEPES y antibiótico.

3.5. REACTIVOS ESPECÍFICOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.5.1. Ácidos nucleicos

El ADN proveniente de espermatozoides de salmón empleado para el proceso de transformación de las levaduras fue adquirido a Sigma-Aldrich. Para la síntesis de oligonucleótidos se recurrió a los servicios de Roche Diagnostics (Basilea, Suiza), Amersham Biosciences (Piscataway, NJ. EE.UU.) y Sigma-Aldrich. Los marcadores de pesos moleculares de ADN se obtuvieron de Amersham Biosciences y Roche Diagnostics.

3.5.2. Enzimas

Para digerir el ADN se emplearon las siguientes endonucleasas de restricción: *BamHI*, *XhoI*, *MunI*, *BglII*, *NotI*, *EcoRI*, *SpeI*, *HindIII*, *DpnI*. Para la realización de los distintos experimentos se utilizaron otras enzimas como, ADN ligasa del bacteriófago T4, polinucleótido-quinasa T4, ADN polimerasa “Klenow”, *Pwo* ADN polimerasa, etc. Todas ellas fueron adquiridas a Amersham Biosciences, Roche Diagnostics, Promega y New England Biolabs (Beverly, MA. EEUU).

3.5.3. Antibióticos

Para la selección y mantenimiento de los cultivos *E. coli* DH5 α y XL-1 Blue se empleó ampicilina a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para el cultivo de los promastigotes se utilizó el antibiótico G418 a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en medio sólido, mientras que en medio líquido se realizó un gradiente progresivo de presión selectiva desde 10 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3.5.4. Isótopos radiactivos

Se utilizó [α - ^{32}P] dGTP (~3.000 mCi/mmol) para el marcado radiactivo del sustrato de ADN de doble cadena de 202 pbs utilizado en el ensayo de equilibrio escisión-religación. Los oligonucleótidos destinados a los ensayos de actividad TopIB se marcaron con [γ - ^{32}P] ATP (~3.000 mCi/mmol). Finalmente, en los ensayos de incorporación de ADN y de precipitación de complejos covalentes con SDS/KCl se empleó [2 - ^{14}C] Timidina (53 mCi/mmol). Todas las fuentes radiactivas fueron adquiridas a Hartmann Analytic (GmbH Deutschland).

3.6. MANIPULACIÓN DEL ADN

3.6.1 Aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli*

Para la obtención del ADN plasmídico se inoculó una colonia de *E. coli* en 3 mL de medio LB con antibiótico de selección. El cultivo se incubó a 37 °C con una agitación de 250 rpm durante toda la noche. Las bacterias se recogieron por centrifugación a 13.000 rpm durante 5 min y se resuspendieron en 250 μL del

tampón P1 Qiagen[®]. A la suspensión obtenida se añadieron 250 μ L del tampón de lisis P2 Qiagen[®] y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. A continuación, la muestra fue neutralizada con 350 μ L del tampón N3 Qiagen[®] y se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue transferido a unas columnas suministradas en el kit y centrifugado durante 1 min a máxima potencia. Tras este paso la solución fue lavada con 750 μ L del tampón PE Qiagen[®] y centrifugada durante 1 min. Tras retirar el flujo eluido se procedió a centrifugar de nuevo durante 5 min y a 13.000 rpm para eliminar los restos de etanol ya que el alcohol residual puede inhibir las reacciones enzimáticas subsecuentes. Finalmente se realizó la elución con 50 μ L de tampón de elución EB Qiagen[®] centrifugando durante 1 min a 13.000 rpm.

Para conseguir el ADN se emplearon kits comerciales como el Miniprep Spin Kit[®] (Qiagen) y el Plasmid Maxi Kit[®] (Qiagen) para la obtención de ADN plasmídico a gran escala. La concentración de ADN obtenido se calculó midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 Uv-Vis[®] (Thermo Scientific, USA). Del mismo modo se analizó su grado de pureza mediante la relación entre los valores de absorbancia obtenidos a 260 y 280 nm.

3.6.2. Creación de proteínas truncadas

Una vez decidida la longitud de las deleciones de cada uno de los dos genes que constituyen el heterodímero de la LdTopIB se diseñaron los oligonucleótidos requeridos en cada caso, portando la secuencia reconocida por las enzimas de restricción escogidas para su clonado en pESC-URA. Cuando se realizaron deleciones en el gen codificante de la subunidad grande LdTopIL, las enzimas escogidas fueron BamHI / XhoI mientras que cuando se realizaron sobre el gen codificante de la subunidad pequeña LdTopIS, se optó por NotI / SpeI, siendo en ambos casos la primera enzima citada la localizada en el extremo N-terminal, y la segunda en el extremo C-terminal.

La amplificación se realizó en un volumen de 50 μ L que contenía: 20 ng de ADN genómico de *L. donovani* que sirve de molde, 125 ng de oligonucleótidos preparados según la descripción del párrafo anterior, 0,1 mM de una mezcla de

dNTPs, 5 μ L de tampón 10 x para la polimerasa y 1 μ L de *Pwo* polimerasa. Antes de añadir la enzima se aplicó un paso inicial de desnaturalización de 5 min a 95 °C. A continuación se realizó el siguiente programa en un termociclador PTC-100 (Master-J Research, EEUU):

- Desnaturalización: 95 °C, 1 min.
- Hibridación: 66 °C, 1 min.
- Elongación: 72 °C, 1min.

Estos tres pasos se repiten cíclicamente 29 veces, momento en el que se mantiene la temperatura a 72 °C durante 10 min.

Una vez terminada la amplificación, se analizó una alícuota de cada reacción de PCR en un gel de agarosa al 0,7 % (p/v) en TAE 1x, excepto cuando el tamaño de los genes era inferior a 700 pb. En este caso, las muestras se analizaron en geles de agarosa al 2 % (p/v). Una vez amplificado el fragmento, se procedió a su extracción y limpieza con los kits comerciales usuales. Una vez que el fragmento era extraído y purificado se le sometió a la digestión de sus extremos con las enzimas de restricción escogidas.

3.6.3. Creación de proteínas mutadas (mutagénesis dirigida)

Para la creación de las mutaciones puntuales y de las deleciones internas, se utilizó el sistema QuickChange[®] (Stratagene). Este sistema se basa en la amplificación por PCR, de las dos hebras de un plásmido circular, utilizando para ello dos iniciadores complementarios entre sí y una ADN polimerasa de alta fidelidad. Los oligonucleótidos, utilizados como iniciadores, contienen la mutación deseada y cada uno de ellos se une, por complementariedad de bases, a una de las cadenas del plásmido, generándose durante los ciclos de amplificación, plásmidos que incorporan la deleción. Éstos poseen mellas y no se encuentran metilados, de modo que no son sustrato de la endonucleasa de restricción *DpnI*, por el contrario, el ADN obtenido de cultivos de *E. coli* se encuentra metilado y puede ser digerido con *Dpn I*.

En un volumen de 50 μL se preparó la siguiente mezcla de reacción: 20 ng del plásmido pSK portando en cada caso los genes LdTopIL o LdTopIS como molde, 125 ng de oligonucleótidos cebadores que contienen la mutación correspondiente, 0,1 mM de cada uno de los siguientes nucleótidos dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 5 μL de tampón 10 x para la polimerasa y 1 μL de *Pwo* polimerasa. Tras la separación de ambas cadenas, como en el apartado anterior, y la adición de la polimerasa, la mezcla de reacción es sometida a un primer ciclo constituido por los siguientes pasos:

- Desnaturalización: 95°C durante 1 min.
- Hibridación: 55°C durante 1 min.
- Elongación: 45 °C durante 1 min/kb de extensión del plásmido molde.

Se realizan una serie de repeticiones de este ciclo incluyendo un gradiente de temperaturas de elongación, que fue aumentándose 5 °C en cada ciclo hasta alcanzar una temperatura de 68 °C. Este ciclo se repitió tantas veces como el tipo de modificación introducida: en el caso de un cambio de aminoácido, se repitió 16 veces, mientras que en el caso de deleciones internas se repitieron hasta un total de 18 veces.

Una vez terminada la amplificación, el producto de PCR se digirió con 2 μL de *DpnI*. Concluida la digestión, las células competentes de *E. coli* XI-1Blue se transformaron con 2 μL de la mezcla de reacción, y una vez obtenidas colonias positivas, se comprobó su idoneidad mediante secuenciación.

3.6.4. Fusión de proteínas a la GFP

Los oligonucleótidos cebadores utilizados para la amplificación de los fragmentos codificantes de las potenciales señales de localización nuclear (NLS), incluyen las secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción *BglII* / *NotI* (gen *LdTopIL*) y *MunI* / *BamHI* (gen *LdTopIS*). En ambos casos, se colocó en marco una secuencia Kozak corriente abajo de la secuencia correspondiente a la enzima de restricción situada en el extremo N-terminal para facilitar el comienzo de la traducción en *L. donovani*.

Antes de añadir la enzima se aplicó un paso inicial de desnaturalización de 5 min a 95 °C. A continuación se realizó el siguiente programa en un termociclador PTC-100 (Master-J Research, EEUU):

- Desnaturalización: 95 °C, 1 min.
- Hibridación: 66°C, 1 min.
- Elongación: 72 °C, 1min.

Estos tres pasos se repiten cíclicamente 29 veces, momento en el que se mantiene la temperatura a 72 °C durante 10 min.

Una vez terminado el programa, se aisló el producto de la reacción mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % (p/v) en TAE 1x y se digirieron sus extremos con las enzimas de restricción mencionadas en cada caso, para su posterior ensamblaje en el plásmido de expresión de *Leishmania spp.*

3.6.5. Secuenciación de ADN

Todas las muestras de ADN, tanto las obtenidas por PCR como las construcciones obtenidas en los vectores plasmídicos, fueron enviadas a Inbiotec (León, España) para su secuenciación analítica usando iniciadores específicos o universales según el caso.

3.6.6. Digestión del ADN con endonucleasas de restricción

Para conseguir la inserción de diferentes fragmentos en los vectores apropiados, ambos han de ser cortados con las enzimas de restricción adecuadas. Para ello se preparó una mezcla que contenía los siguientes componentes:

- ADN
- Tampón de digestión 1X (varía en función de la enzima y normalmente se comercializa a una concentración 10X).
- Agua estéril añadida hasta completar el volumen de reacción.
- Enzima de restricción (2-5 U/ μ g de ADN).

Como norma general el volumen de la enzima no debe superar 1/10 del volumen total de la mezcla de reacción, ya que la alta cantidad de glicerol presente en las soluciones de almacenamiento de las enzimas podría alterar el proceso de digestión enzimática.

La mezcla de reacción se incubó durante 1 h a la temperatura adecuada en función de la enzima (normalmente 37 °C.)

3.6.7. Purificación de ADN procedente de geles de agarosa

Los fragmentos de ADN presentes en una muestra pueden separarse mediante una electroforesis en geles de agarosa. Se recortan las bandas del gel en las que quedan situados y se purifica el ADN atrapado en la agarosa.

La purificación del ADN se realizó mediante el método QIAquick™ Gel Extraction Kit (Qiagen), basado en la unión selectiva de las moléculas de ADN a una membrana con gel de sílice situada en una microcolumna. En presencia de una alta concentración de sales y un pH inferior a 7,5 el ADN se adsorbe eficazmente a dicha membrana.

A continuación se describe el proceso seguido: en primer lugar se disolvió el fragmento del gel. Para ello se utilizaron los tampones e instrucciones proporcionados por el proveedor. La solución obtenida se cargó sobre la microcolumna, que se lavó con los tampones suministrados junto al resto del sistema para eliminar las impurezas. Finalmente el ADN se eluyó utilizando 50 µL de la solución Tris-HCl 10 mM pH 8,0.

3.6.8. Ligación de fragmentos de ADN

Con el fin de unir el vector plasmídico con los distintos fragmentos de ADN que van a ser insertados, se llevó a cabo el proceso de ligación. La enzima utilizada fue la ADN ligasa del bacteriófago T4 (Promega) siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

A 10-40 ng de ADN vector se añadió una cantidad equimolar de ADN inserto, 2 µL de tampón de reacción 10x (concentración final 1x), 1 µL (2 U) de ADN ligasa del bacteriófago T4 y H₂Odd estéril hasta completar un volumen de 20 µL.

La reacción se incubó a 16°C durante 16 h. Las nuevas moléculas generadas en el proceso fueron transformadas en la cepa de *E. coli* adecuada.

- TAMPÓN DE REACCIÓN 10x PARA LA ADN LIGASA DEL BACTERIÓFAGO T4: ATP 10 mM; BSA 500 µg/mL; DTT 200 mM; MgCl₂ 100 mM; Tris-HCl 500 mM pH 7,8.

3.6.9. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Los fragmentos de ADN procedentes de las digestiones enzimáticas, o los sustratos de ADN circular con diferente grado de superenrollamiento, pueden separarse en función de su tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa. Los geles se prepararon disolviendo agarosa (Fisher Scientific) en tampón TAE 1X. Una vez disuelta se añadió bromuro de etidio (BrEt) a una concentración final de 0,1 µg/mL para visualizar las bandas de ADN.

Las muestras se mezclaron con 1/5 de su volumen de solución de carga, y se depositaron en los pocillos del gel. La electroforesis se realizó en cubetas submarinas con tampón TAE 1X, aplicándose una diferencia de potencial de 100 V. Como marcador de peso molecular se utilizó el Molecular Weight Marker X (Roche Diagnostics, Germany), que incluye bandas de peso molecular comprendido entre 0,07 hasta 12,2 kpb. Las bandas de ADN se visualizaron exponiendo el gel sobre un transiluminador de luz ultravioleta.

- TAMPÓN TAE 50X: 242 g Tris base; 57,1 mL ácido acético glacial; 100 mL 0,5 M EDTA pH 8,0.
- SOLUCIÓN DE CARGA: azul de bromofenol 0,25% (p/v); azul de xilenocianol 0,25% (p/v); sacarosa 40% (p/v).

3.7. TRANSFORMACIÓN CELULAR

3.7.1. Preparación de células competentes de *E. coli*

La preparación de células competentes de las cepas de *E. coli* DH5 α y XL1-Blue se realizó por el protocolo descrito por Inoue y col. en 1990, consiguiéndose una alta eficiencia de transformación (5×10^8 transformantes/ μg de ADN).

Para ello, se sembró una placa de medio LB con *E. coli* DH5 α , o una placa de medio LB-tetraciclina en el caso de *E. coli* XL1-Blue. A continuación se procedió a la incubación de las mismas a 37°C durante 12-20 h.

Posteriormente, se aisló una colonia y se creció durante toda la noche un preinóculo en medio SOC a 37°C. Transcurrido este tiempo se inoculó un 1% del preinóculo en 50 mL de medio SOC, cultivándose a 18°C en agitación a 200 rpm, hasta que el cultivo alcanzó una $\text{OD}_{600} = 0,2$ momento en el que se enfrió en hielo durante 10 min.

A continuación, las células se recogieron por centrifugación a 3.000 rpm durante 10 min a 4°C (estas condiciones se mantuvieron en el resto de los pasos siguientes). Después las células fueron resuspendidas en 80 mL de tampón TB frío y mantenidas en hielo durante 10 min. Acto seguido, la suspensión se centrifugó en las condiciones expuestas anteriormente, y el precipitado se resuspendió en 20 mL de tampón TB frío, al que se añadieron 1,4 mL de DMSO (concentración final 7%) como crioconservante.

Finalmente, las células competentes se alicuotaron en tubos de microcentrifuga estériles, y se congelaron en nitrógeno líquido para posteriormente almacenarlas a -80 °C.

- TAMPÓN TB: PIPES 10 mM; CaCl₂ 15 mM; KCl 250 mM; pH 6,7.

3.7.2. Procedimiento de transformación en *E. coli*

El procedimiento de transformación de las células competentes de *E. coli* es el descrito por Hanaham (1983). En un baño de hielo se descongelaron 200 μ L de células competentes y se añadieron 50 ng de ADN. La mezcla se incubó durante 20 min en hielo y seguidamente se la sometió a un choque térmico por inmersión en un baño a 42 °C durante 45 s y posterior enfriamiento rápido en hielo durante 5 min. Después se añadieron 800 μ L de medio SOC y se incubó durante 1 h a 37 °C y 250 rpm. De este modo las bacterias que han incorporado el plásmido, expresan el gen de resistencia al antibiótico utilizado como marcador de selección. Por último, se sembraron alícuotas en placas de medio LB con el antibiótico utilizado para la selección de transformantes.

3.7.3. Transfección en promastigotes de *L. donovani*

El método elegido para introducir el ADN exógeno en los promastigotes de *L. donovani* fue la electroporación. El protocolo seguido fue básicamente el descrito por LeBowitz (1994).

El ensayo se realizó transfectando 10 μ g de ADN plasmídico portador de la construcción a valorar. Se partió de 20 mL de cultivo con una densidad de 1×10^6 parásitos/mL por cada transformación que se desea realizar, y que se recogieron al alcanzar la fase exponencial temprana (5×10^6 parásitos/mL). A continuación se eliminó el medio de cultivo mediante centrifugación a 3.000 rpm durante 10 min a 4°C y se lavó con la solución de electroporación fría (CYTOMIX) por el mismo procedimiento. Las células lavadas se resuspendieron en 0,5 mL de CYTOMIX por cada transformación y se introdujeron en cubetas de electroporación estériles y enfriadas de 4 mm de distancia entre electrodos (Bio-Rad Hercules, CA. Estados Unidos).

La electroporación se llevó a cabo utilizando el electroporador “Gene Pulser® II” con “Capacitance Extender Plus” (Bio-Rad). Los parámetros empleados fueron de 1.500 V/cm (450 V en una cubeta de 4 mm) y 500 μ F de capacitancia.

Tras aplicar el pulso eléctrico, el contenido de las cubetas se transfirió a tubos estériles que contenían 10 mL de medio M199 1X, que se incubaron 20 h a 26°C para su completa recuperación tras el choque eléctrico.

A continuación las células se recuperaron por centrifugación a 3.000 rpm durante 10 min para retirar el medio, y se plaquearon finalmente unos 100 µL del pellet por cada placa de medio sólido (M199 2X, agar noble 2X, G418 10 µg/mL).

- CYTOMIX: *KCl* 120 mM; *CaCl₂* 0,15 mM; *K₂HPO₄* 10 mM; *HEPES* 25 mM; *EDTA* 5 mM; *MgCl₂* 5 mM.

3.7.4. Transformación de levaduras

Para la obtención de las cepas de levaduras transformantes (EKY3 y MBY3) se utilizó el método de transformación por acetato de litio (Ito y col., 1983). En primer lugar se inoculó una colonia en 10 mL de medio YPD suplementado con un 2% (p/v) de glucosa y 50 µg/mL de ampicilina para evitar posibles contaminaciones bacterianas. El cultivo se dejó crecer a 30 °C durante 16 h con una agitación constante de 120 rpm, tras las cuales se ajustó la OD₆₀₀ del cultivo a 0,7 por dilución en medio de cultivo. A continuación se incubó durante 2 h a 30 °C y 120 rpm para que alcanzase una OD₆₀₀ de aproximadamente 1. En este momento las células fueron centrifugadas 10 min a 2.300 rpm y lavadas con la Solución 1 en un 25 % del volumen inicial de cultivo por el mismo procedimiento. El pellet resultante se resuspendió en 300 µL de la Solución 1. Por cada transformación se incubó durante 30 min a 30 °C y 150 rpm la siguiente mezcla:

- 30 µL de células (resuspendidas en la Solución 1)
- 8 µL de ADN de esperma de salmón (6,6 µg/µL)
- 130 µL de Solución 2
- ≥ 100 ng del ADN a transformar

Transcurrida esta incubación, las células fueron sometidas a un choque térmico a 42 °C durante 15 min y acto seguido sembradas en placas de medio S.C.

ura- suplementadas con glucosa al 2% (p/v). Las placas fueron incubadas a 30 °C hasta que las colonias alcanzaron un tamaño adecuado.

- SOLUCIÓN 1: 40 mL H₂Odd; 5mL TE 10X; 5mL LiOAc 10X
- SOLUCIÓN 2: 8 mL PEG 50%; 1mL TE 10X; 1mL LiOAc 10X

3.8. SOBREEXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

3.8.1. Crecimiento e inducción de cultivos

Tanto el plásmido pESC-URA GAL (con los distintos amplicones clonados bajo el control de los promotores GAL1 y GAL10) como el YCpGAL1-hTOP1 tienen como marcador de selección URA3 lo que permite su crecimiento en medio sintético completo carente de uracilo (S.C. ura-). Para la sobreexpresión de las diferentes proteínas, se inoculó una colonia aislada en 10 mL de cultivo S.C. ura-complementado con glucosa al 2 % (p/v) y se creció a 30 °C O/N con agitación continua. Una alícuota del cultivo se diluyó cien veces en medio S.C. ura- con rafinosa al 2 % (p/v) (para eliminar la glucosa remanente en el medio de cultivo, ya que actúa como agente represor de los promotores de GAL) y se incubó durante 24 h. A este cultivo se añadió galactosa de una solución al 20 % (p/v) para alcanzar una concentración final en el cultivo del 2 %, induciéndose así la expresión de los genes clonados bajo su promotor. Tras 6 h de incubación, las células fueron recogidas por centrifugación a 2500 rpm a 4 °C, lavadas dos veces con un volumen de H₂Odd fría y resuspendidas en 15 mL de tampón de lisis.

- TAMPÓN DE LISIS: *tampón TEEG (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, glicerol 10% (p/v) suplementado con KCl 0.2 M y un coctel de inhibidores de proteasas [NaF 1X, bisulfito sódico 1X, Complete[®] EDTA-free (Roche Molecular Biochemicals) 2X].*

3.8.2. Obtención de extractos

La lisis de las células se inició con a un ciclo de congelación-descongelación a -80 °C, seguido de 30 ciclos de agitación de 1 min (30 s agitación / 30 s reposo en hielo cada uno), con bolas de vidrio de 0,5 mm de diámetro (GLASS BEADS BioSpect), a una temperatura de 4 °C. La suspensión se centrifugó a 16.000 rpm a 4 °C durante 45 min, recogiendo el sobrenadante para continuar con la purificación.

3.8.3. Purificación de proteínas recombinantes

La purificación de las proteínas recombinantes, LdTopIB y hTopIB, procedentes de cultivos sobreexpresantes de *S. cerevisiae* se llevó a cabo mediante la precipitación de los extractos de levadura con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y elución en columnas de intercambio iónico (fosfocelulosa P-11) e hidrofobicidad (fenil-Sepharosa CL-4B) (Bjornsti y Fertala, 1999).

Los extractos solubles procedentes de la sobreexpresión en levaduras se precipitaron con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido hasta alcanzar una saturación entre el 35% (p/v) (para precipitar proteínas nucleares que comparten características físico-químicas con la LdTopIB) y el 75% (p/v). Las proteínas precipitadas en este intervalo se recogieron por centrifugación a 10.000 rpm y se resuspendieron en 20 mL de tampón TEEG 1X 0,2 M KCl suplementado con inhibidores de proteasas para la columna de intercambio iónico.

La solución proteica obtenida se aplicó cuidadosamente en la interfase de una columna de polipropileno empaquetada con 5 mL de resina de fosfocelulosa P-11 (Whatman®) (sólo fueron necesarios 2 mL en el caso de la purificación de la hTopIB), equilibrada previamente con 10 mL del tampón TEE 5X G 1X 2 M KCl y 10 mL de TEEG 1X 0,2 M KCl para ajustar la conductividad de la columna. Una vez que la disolución proteica penetró en el gel por gravedad, se efectuaron dos lavados de la resina con 10 mL de TEEG 1X 0,2 M KCl cada uno. Posteriormente se lavó la columna con 5 mL de TEEG 1X 0,4 M KCl. En este gradiente ascendente discontinuo de KCl, la elución de la TopIB se produjo con 0,6 M KCl en el caso de la

enzima de *Leishmania*, mientras que la enzima humana se eluyó a una concentración de 0,8 M KCl.

Las soluciones proteicas enriquecidas en TopIB se aplicaron sobre una columna cromatográfica de interacción hidrofóbica de PSP CL-4B (Sigma-Aldrich, Chemical Co) equilibrada con 10 mL de TEEG 1X 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La columna se lavó con 5 mL de TEEG 1X 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y posteriormente con 3 mL de TEEG 1X 0,8 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Finalmente, se procedió al eluido de la columna con 4 mL de TEEG 1X recogiendo fracciones de 1mL.

El volumen eluido de la columna PSP CL-4B, se colocó en una bolsa de diálisis previamente hervida durante 15 min y lavada con agua fría. Seguidamente se sumergió en un litro de tampón de diálisis durante 2 h, a 4 °C de temperatura. El proceso se repitió tres veces.

La proteína dializada se aplicó en un concentrador centrífugo Amicon Ultra-4 50K (Millipore®) cuyo diámetro de poro permite el paso de proteínas de masa molecular inferior a 50 kDa, lo que permitió un efecto de purificación extra además de la concentración. Las proteínas así concentradas se recogieron. Para su conservación se añadió el mismo volumen de glicerol y se almacenaron -20 °C.

- TEEG 1X: *Tris-HCl 50 mM pH 7,4; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; glicerol al 10 % (v/v); NaF 80 µg/mL; NaSO₃ 10 µg/mL; IP 0,2X [Inhibidor de proteasas Complete Mini® EDTA-free (Roche Molecular Biochemicals)]*
- TEE 5X G 1X: *Tris-HCl 250 mM pH 7,4; EDTA 5 mM; EGTA 5 mM; glicerol al 10 % (v/v); NaF 80 µg/mL; NaSO₃ 10 µg/mL; 0,2 x IP.*
- PRETRATAMIENTO DE LA RESINA DE FOSFOCELULOSA P-11: *una vez tratada según las instrucciones del fabricante, se resuspende el mismo volumen de resina húmeda en tampón de bloqueo (Tris-HCl 50 mM pH 7,4; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; glicerol 50 % (v/v); KCl 1 M). Una vez decantada la resina, se lava dos veces con un tampón reducido en sales (Tris-HCl 50 mM pH 7,4; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; glicerol 50 % (v/v); KCl 0,2 M) y se vierte el volumen deseado en la columna de polipropileno.*

- **PRETRATAMIENTO DE LA RESINA FENIL SEPHAROSA CL4B:** *La resina de PSP CL4B no necesita ser activada. Para su compactación y lavado se procedió de manera similar a la columna P11. Se compactaron 3 mL de la resina y se añadieron cuidadosamente 10 mL de agua fría para eliminar el etanol en el que la resina se presenta resuspendida. Para que la columna compactada estuviese lista para ser utilizada, se hicieron pasar a través de la misma 10 mL de TEEG 1X frío, seguidos de otros 10 mL de TEEG 1X 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ con una mezcla de inhibidores de proteasas.*
- **1X IP:** *1 pastilla de inhibidor de proteasas Complete[®] EDTA-free (Roche Molecular Biochemicals) por cada 50 mL de solución.*
- **TAMPÓN DE DIÁLISIS:** *Tris-HCl 10 mM pH= 7,5; KCl 50 mM; MgCl_2 5 mM; EDTA 0,1 mM; albúmina sérica bovina (BSA) 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$; glicerol 10% (v/v).*

3.9. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES Y REDUCTORAS (SDS-PAGE)

Las muestras de proteínas se analizaron mediante SDS-PAGE basándonos en el protocolo descrito por Laemmli (1970). Esta técnica permite la separación de los distintos péptidos en función de su peso molecular.

3.9.1. Preparación del gel separador

Las cantidades de los distintos componentes necesarios para preparar 10 mL de gel separador varían en función del porcentaje de acrilamida/bisacrilamida, y se reflejan en la Tabla 3.3.

Antes de añadir el persulfato amónico y el TEMED, la mezcla se desgasificó en un baño de ultrasonidos durante 10 min. La polimerización tuvo lugar en 20-30 min.

TABLA 3.3. Cantidades necesarias para preparar 10 mL de gel separador.

| Componente | Concentración de acrilamida/bisacrilamida | | |
|---------------------------------|--|------------|------------|
| | 10% | 12% | 13% |
| H₂Od | 1,9 mL | 1,6 mL | 1,1 mL |
| acrilamida/bisacrilamida | 1,7 mL | 2 mL | 2,5 mL |
| 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 | 1,3 mL | 1,3 mL | 1,3 mL |
| 10% SDS (p/v) | 50 µL | 50 µL | 50 µL |
| 10% persulfato amónico | 50 µL | 50 µL | 50 µL |
| TEMED | 2 µL | 2 µL | 2 µL |

- **ACRILAMIDA/BISACRILAMIDA:** 30 g de acrilamida y 0,8 g de bisacrilamida. Añadir H₂Od hasta 100 mL.

3.9.2. Preparación del gel concentrador

El gel concentrador se preparó utilizando 6,1 mL de H₂Od, 2,5 mL de Tris-HCl pH 6,8, 1,3 mL de acrilamida/bisacrilamida y 100 µL de SDS al 10% (p/v). Tras desgasificar la mezcla en un baño de ultrasonidos durante 10 min, se añadieron 50 µL de persulfato amónico al 10% (p/v) y 10 µL de TEMED. La mezcla se dejó polimerizar durante 15 min.

3.9.3. Preparación de las muestras

Las muestras de extractos proteicos se mezclaron con 1/5 de su volumen de solución de carga, y se hirvieron durante 5 min, tras lo cual se procedió a cargarlas en los pocillos del gel concentrador.

Como marcador de pesos moleculares se empleó el suministrado por Bio-Rad, que incluye los patrones preteñidos de la fosforilasa B (111 kDa), BSA (73 kDa), ovoalbúmina (47,5 kDa), anhidrasa carbónica (33,9 kDa), inhibidor de la tripsina de soja (28,8 kDa) y lisozima (20,5 kDa).

- **SOLUCIÓN DE CARGA:** 4,8 mL de H₂Od; 0,5 mL de azul de bromofenol al 0,05% (p/v); 1 mL de glicerol; 0,5 mL de β-mercaptoetanol; 2 mL de SDS al 10% (p/v); 1,2 mL de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8.

3.9.4. Electroforesis

La electroforesis se llevó a cabo en una cubeta “Mini-Protean II” (Bio-Rad) con tampón de electroforesis, y aplicando una diferencia de potencial de 8 V/cm hasta que el frente penetró en el gel separador. A continuación, el voltaje se incrementó hasta 15 V/cm y se mantuvo hasta que el azul de bromofenol de la solución de carga alcanzó el final del gel separador. Una vez que se corrieron los geles de proteínas se procedió a la tinción con azul de Coomasie durante 20 min en agitación y posterior desteñido.

- TAMPÓN DE ELECTROFORESIS: 14,42 g de glicina; 1 g de SDS; 3,03 g de Tris base; H₂O hasta completar 1 L.
- SOLUCIÓN DE TEÑIDO: 0.1% (p/v) Coomassie Brilliant Blue R-250; 50% (v/v) metanol; 10% (v/v) ácido acético glacial.
- SOLUCIÓN DE DESTENIDO: 40% (v/v) metanol; 10% (v/v) ácido acético glacial en H₂O.

3.9.5. Medida de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas de las muestras se determinó mediante el método de Bradford (1976), utilizando el sistema “Protein Assay” (Bio-Rad). La recta de calibrado se estableció utilizando BSA (Sigma) como estándar.

3.10. ESTUDIOS ACTIVIDAD Y SENSIBILIDAD TopIB *in vitro*

3.10.1. Determinación de la actividad TopIB

La principal reacción de las enzimas TopI es la relajación del ADN superenrollado, el cual posee una movilidad electroforética en un gel de agarosa diferente a la del ADN completamente relajado. Ya que el ADN aislado a partir de la mayoría de organismos está superenrollado negativamente, se puede utilizar cualquier plásmido aislado de *E. coli* para medir la actividad de relajación de la enzima (Martin y col., 1983). El ensayo que se describe a continuación está diseñado para enzimas de tipo IB por lo que ni la TopII ni posibles TopIII son activas bajo estas condiciones experimentales.

Antes de valorar la actividad de los inhibidores de TopIB sobre las diferentes enzimas purificadas, realizamos un ensayo destinado a cuantificar la actividad de la misma sobre el ADN superenrollado. La mezcla de reacción tenía un volumen total de 20 μ L y contenía 2 μ L de tampón TOP 10X, y como sustrato 0,5 μ g de ADN superenrollado circular pBluescript SK- (pSK). A la mezcla se añadieron 0,5 μ g de la proteína purificada, realizándose diluciones 1:3 hasta no observar topoisómeros. Los tubos de reacción se incubaron durante 30 min en un baño a 37 °C a partir del momento de adición del extracto, y posteriormente se digirieron con 2 μ g de proteinasa K y SDS al 1 % (p/v). La visualización de los topoisómeros se realizó tras separarlos mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v) preparada en 200 mL de TBE 1X. La electroforesis se resolvió a razón de 2 V/cm durante 16 h, y se tiñó con una solución de BrEt (0,5 μ g/100 mL) para obtener imágenes digitales usando un sistema de adquisición de geles con transiluminador de luz UV integrado (Sistema de adquisición de imágenes G-Box Syngene UK).

Gracias a este ensayo definimos una Unidad Enzimática TopIB (U) como la cantidad de enzima necesaria para relajar completamente 0,5 μ g de ADN superenrollado en 30 min a 37 °C. Esto permitió normalizar todos los ensayos realizados con las diferentes TopIB recombinantes, tanto de *Leishmania* como humanas.

- TAMPÓN TOP 10X: Tris 100 mM pH 7,5; KCl 150 mM; MgCl₂ 50 mM; EDTA 0,2 mM; 150 μ g/mL BSA.
- TAMPÓN TBE 10X: Tris 890 mM; ácido bórico 890 mM; EDTA 20 mM pH 8,0.

3.10.2. Inhibición de la actividad de relajación

Para comprobar el posible efecto inhibitorio sobre la actividad de relajación TopIB de las diferentes drogas se llevaron a cabo ensayos dependientes de concentración a tiempo fijo, así como ensayos a una concentración fija tomando puntos a diferentes tiempos de reacción. La mezcla de reacción tenía un volumen

total de 20 μL y contenía 2 μL de tampón TOP 10X, 0,5 μg de ADN pSK, 1 U LdTopIB ó hTopIB y 1 μL de las diferentes concentraciones de la droga a estudiar (ensayo dosis dependiente) o una concentración fija de 75 μM a diferentes tiempos de reacción, desde 0.2 a 15 min. Las mezclas fueron incubadas a 37 °C. La reacciones fueron detenidas añadiendo SDS al 1 % (p/v) y posteriormente se digirieron con 2 μg de proteinasa K. Los topoisómeros fueron resueltos en geles de agarosa al 1% (p/v) preparada en 200 mL de TBE 1X a razón de 2 V/cm durante 16 h. Los geles se tiñieron con una solución de BrEt (0,5 $\mu\text{g}/100$ mL) para posteriormente obtener imágenes digitales de los mismos con el sistema G-BOX (Syngene UK). Los resultados fueron analizados y cuantificados con el software de análisis de geles ImageJ (NIH software) y representados gráficamente con el software estadístico SigmaPlot™ 11.3 (Systat Software Inc, UK).

3.10.3. Detección de complejos covalentes en geles de agarosa con un plásmido circular

Tal y como se ha descrito en la introducción algunos inhibidores TopIB son capaces de atrapar los complejos CL, lo que genera la estabilización de ADN mellado (rotura de cadena sencilla) con la proteína unida covalentemente al extremo 5' prima de la rotura (dejando un OH 3'). En este ensayo se utilizó como sustrato el plásmido superenrollado circular pSK. En presencia de un agente estabilizante de complejos CL, la banda correspondiente al ADN mellado se pudo observar únciamente después de que la TopIB desnaturalizada fuera degradada por la acción de la proteinasa K. Otro aspecto importante de este ensayo es que los productos de la actividad TopIB fueron resueltos en presencia de BrEt (agente intercalante) que alteró la forma de las moléculas de ADN circular (cerrado) y por lo tanto, modificó su movilidad electroforética en el gel de agarosa. El agente intercalante no produjocambios en el Lk, sino que indujo un aumento relativo en el Wr. De esta forma se pudo observar el ADN mellado, correspondiente a los complejos covalentes ADN-droga-TopIB (CL), acumulado en una única banda (Hsiang y col., 1985).

Al igual que en el caso del ensayo de inhibición de la relajación, estos ensayos se realizaron en función de concentración de compuesto y en función del tiempo de reacción. La mezcla de reacción (20 μ L) contenía 2 μ L de tampón TOP 10X, 0,5 μ g de ADN pSK, 75-100 U LdTopIB ó hTopIB y 1 μ L de las diferentes concentraciones de la droga a estudiar (ensayo dosis dependiente) o una concentración fija de 75 μ M a diferentes tiempos de reacción. Las mezclas fueron incubadas a 25 °C. Tras detener las reacciones con SDS al 1 % (p/v) se procedió a la digestión de las mismas con 2 μ g de proteinasa K durante 1 h a 37 °C. Seguidamente, se procedió a limpiar las muestras mediante una extracción 1:1 (v/v) con fenol-cloroformo. Finalmente, las muestras extraídas se resolvieron en geles de agarosa al 1% (p/v) en TBE 1X suplementado con una concentración final de BrEt 40 pg/ μ L. La electroforesis se realizó a razón de 4 V/cm hasta que el azul de carga alcanzó el final del gel. Las imágenes de los geles fueron adquiridas con el sistema G-BOX (Syngene UK). Los resultados fueron analizados y cuantificados con el software de análisis de geles ImageJ (National Institutes of Health software). La cantidad de ADN mellado se calculó como el porcentaje de señal obtenido para la banda de mellado dividido por el total de señal del carril. Los resultados fueron representados gráficamente con el software estadístico SigmaPlot™ 11.3 (Systat Software Inc, UK).

3.10.4. Equilibrio escisión/religación con oligonucleótido

Este ensayo permitió determinar la presencia de fragmentos mellados de un ADN sustrato de secuencia conocida debido a la estabilización de complejos de CL. A diferencia del ensayo anterior en el que todos los fragmentos mellados se acumulaban en una única banda, gracias a este procedimiento podemos identificar las secuencias específicas en que el ADN está siendo cortado por la enzima y estabilizado por la droga. En este caso se escogió el protocolo desarrollado por Dexheimer y Pommier (2008).

- Obtención del fragmento de 202 pbs

La reacción de *cleavage* utiliza como sustrato un fragmento de ADN lineal de 202 pb, obtenido mediante amplificación por PCR de una secuencia del vector pSK localizada entre los sitios de restricción *PvuII* y *PstI* del sitio múltiple de clonado. En un volumen de 50 μ L se preparó la siguiente mezcla de reacción:

- 5 μ L Tampón 10X *Taq* ADN polimerasa
- 3 μ L $MgCl_2$ 25 mM
- 1 μ L mezcla dNTPs (10 mM)
- 1,5 μ L pSK sentido (5'-GCCTCTTCGCTATTACGCCAG-3')
- 1,5 μ L pSK antisentido (5'-CGAACTATAGCTTAAGGACGTCGG-3')
- 0,5 μ L pSK (0,5 μ g/ μ L)
- 1 μ L *Taq* ADN polimerasa (5 U/ μ L)
- 36,5 μ L H_2O

Antes de añadir la enzima se aplicó un paso inicial de desnaturalización de 2 min a 95 °C. A continuación se realizó el siguiente programa en un termociclador PTC-100 (Master-J Research, EEUU):

- Desnaturalización: 94 °C durante 10 s.
- Hibridación: 60 °C durante 30 s.
- Elongación: 72 °C durante 1 min.

Se repite este ciclo a partir del segundo paso 25 veces, tras los cuales se mantiene la temperatura a 72 °C durante 5 min y se retira la reacción del termociclador para bajar la temperatura a 4 °C. La idoneidad del fragmento amplificado por PCR se comprobó mediante electroforesis en agarosa al 1% (p/v) en TBE 1X, y se procedió a su aislamiento. Una vez recogido, el fragmento de ADN es purificado del gel mediante un kit comercial (QIAGEN DNA Clean-up system).

- Marcado radiactivo del sustrato

Se procedió a digerir 1 µg del fragmento purificado de 202 pbs con 20 U de *HindIII* durante 16 h a 37 °C. Para conseguir una digestión completa se añadieron 10 U de enzima y se incubó durante otra hora extra. Como resultado, se obtiene un extremo 5' en forma de cadena sencilla, listo para ser marcado radiactivamente. Este extremo se rellenó gracias a la actividad ADN polimerasa 3' → 5' de una enzima *klenow* que incorpora nucleótidos complementarios sobre el molde. La mezcla de reacción incluyó en un volumen final de 52 µL: 5,2 µL de tampón *klenow* 10X, 40 µL del fragmento amplificado y digerido, 3 µL de una mezcla de NTPs – a excepción del dGTP – 3 µL de [$\alpha^{32}\text{P}$]-dGTP y 1 µL de un fragmento *klenow* de la ADN polimerasa I. La reacción se llevó a cabo a 25 °C, deteniéndose a los 15 min con 1,2 µL de EDTA 0,5 M pH 8. Con el fin de eliminar del extremo 3' el exceso de NTPs libres marcados radiactivamente, las muestras fueron purificadas por medio de columnas de Sephadex™ G-50 (Illustra™ ProbeQuant™ 96 G-50 microcolumns) de GE Healthcare (Reino Unido) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En este punto se tomó una alícuota de 1 µL que fue medida en un contador de centelleo (Beckman, LS 6000TA) para garantizar un marcado mínimo ≥ 100.000 cpm/µL.

- Reacción de equilibrio escisión/religación

La mezcla de reacción para el ensayo de equilibrio contenía en un volumen final de 20 µL: 2 µL de tampón TOP 10X, 0,8 µL de DTT 10X, 150.000 cpm de ADN sustrato y ca.100 U TopIB. A esta mezcla se añadieron 2 µL de la dilución deseada de droga o de su diluyente correspondiente. La reacción se incubó durante 4 min a 25 °C, transcurridos los cuales se detuvo con 1,1 µL de SDS al 10 % (p/v). Con el fin de evitar el retraso de banda causado por la unión de la TopIB a los fragmentos de ADN mellado, las muestras se incubaron durante 15 min a 75 °C. De esta forma se desnaturalizó la proteína y se facilitó la posterior digestión con proteinasa K (1 µL de un stock 10 mg/mL) durante 1 h a 37° C. Finalmente, se llevaron a cabo dos precipitaciones con etanol para eliminar del producto la mayor cantidad posible de proteína, evitando así grandes interferencias en la electroforesis.

Se realizó también una variación de este ensayo en la que se estudió la velocidad de reversión en el tiempo de los complejos de CL estabilizados en presencia de una droga identificada previamente como veneno TopIB.

- Análisis de los complejos de CL

Las muestras precipitadas se resuspendieron en el tampón de carga y se hirvieron durante 5 min antes de cargarlas en un gel desnaturalizante de poliacrilamida/urea al 16% para el análisis de los complejos de CL estabilizados. Los geles de secuenciación (33 x 42 x 0,75 mm) se precalentaron durante 30 min mediante una corriente constante de 70 W, hasta que alcanzaron una temperatura de 50-60 °C. Antes de cargar las muestras, se limpiaron cuidadosamente los pocillos para eliminar cualquier resto de acrilamida sin solidificar. Las muestras se corrieron a 70 W durante 3 h hasta que el azul de bromofenol alcanzó en borde inferior de los cristales un sistema de electroforesis vertical (CBS, USA).

Una vez terminada la electroforesis, el gel se despegó cuidadosamente de los cristales con la ayuda de un papel de filtro Whatmann 3MM y se cubrió con una fina capa de plástico transparente, evitando la formación de burbujas que interferirían con la lectura de la señal. El gel se secó al vacío en un sistema de secado para geles de Bio-Rad® formando un sándwich con dos hojas de filtro Whatmann 3MM durante 2 h a 85 °C. El gel ya seco se puso en contacto con una pantalla radiante durante 24 h a -80 °C. Tras el periodo de exposición, la pantalla se analizó mediante el barrido de la luz emitida utilizando un equipo de captación y análisis de muestras radiactivas (phosphorimager; Fujitsu®). Los resultados fueron analizados y cuantificados con el software de análisis de geles ImageJ (NIH software).

- TAMPÓN DE CARGA: 8 mL de formamida al 80% (v/v); 0,5 mL TBE 10% pH 8,3; 20 µL EDTA 1 mM; xilenocianol al 0,1% (p/v); azul de bromofenol al 0,1 % (p/v); H₂O hasta 10 mL.
- COMPOSICIÓN GEL: Acrilamida:bisacrilamida (1:9) al 16 % (p/v); Tampón 1X TBE; Urea 7 M.

3.10.5. Ensayo de equilibrio escisión/religación con ADN dúplex

Una vez identificados secuencias específicas donde la CPT estabiliza los cortes de la TopIB, se pueden diseñar secuencias cortas de ADN de doble cadena que incluyan un único punto de corte. De esta forma se realizaron estudios comparativos de potencia de estabilización de complejos de CL entre la hTopIB y la LdTopIB en presencia de varios derivados camptotecínicos. Como sustrato para este ensayo se utilizó el oligonucleótido CL-25 (5'-GAAAAAAGACTTAGAAAAATTTTTA-3') que fue anillado con su oligonucleótido complementario CP-25 (5'-P-TAAAAATTTTTCTAAGTCTTTTTTC-3') para obtener un dúplex de ADN con un sitio específico de corte TopIB (Stewart y col., 1997).

El primer paso fue marcar el extremo 5' del oligonucleótido CL-25 con [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP. Para ello se incubaron 10 pmol de CL-25 con 50 μCi de [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP, en presencia de 10 U de polinucleótido quinada de T4 (New England) en un volumen final de 50 μL . La incubación se realizó a 37 °C durante 30 min y 5 min adicionales a 65 °C. El volumen incubado fue purificado mediante columnas Sepharex G25 Microspin GE Healthcare (Ilustra™ Microspin™ G25 columns). En este punto se obtuvo el sustrato CL-25* (el asterisco denota que está marcado radiactivamente).

El siguiente paso fue crear un dúplex entre el sustrato CL25* y su complementario sinmarcar (lo que impide que el dúplex religue espontáneamente con este extremo 5' tras el corte de la TopIB). El anillado de los dos oligos se consigue haciendo reaccionar en el tampón de anillado 1X un exceso 2:1 molar de CP-25 sobre CL25* durante 5 min a 95 °C, seguido de un periodo de incubación de 1 h a 37 °C y otro de una noche completa a 4 °C. El sustrato obtenido, que denominaremos ES, se encuentra a una concentración final de 167 nM.

- TAMPÓN DE ANILLADO: *Tris-HCl 100mM pH 7,8; NaCl 1M; EDTA 10mM; DTT 100mM.*

La mezcla de reacción para el ensayo con el sustrato ES contenía en un volumen final de 30 μL : tampón TOP 1X, sustrato ES 20 nM, ca. 100 U TopIB y 2 μL de la dilución deseada de droga o de su diluyente correspondiente. La reacción

se incubó durante 4 min a 25 °C, transcurridos los cuales se detuvo con 6 µL de SDS al 2,5 % (p/v). Una vez detenida la reacción las muestras fueron precipitadas a -20 °C durante 48 h añadiendo a los tubos de ensayo 60 µL de H₂Odd, 10 µL de acetato de sodio 3M y 300 µL de ETOH absoluto (a -20°C). Una vez transcurridas las 48 h de precipitación las muestras fueron sometidas a una doble precipitación con ETOH (absoluto y 70%, respectivamente) y a una digestión de 1 h con tripsina porcina (30 µL de una solución 1 mg/mL) a 37 °C con el fin de eliminar los restos de TopIB unidos al ADN mellado. Transcurrida la hora de digestión se añadieron 30 µL de la solución de carga 0,86X a cada tubo.

Las muestras se homogeneizaron a 50.000 cpm por pocillo y se resolvieron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida/urea al 16% durante aproximadamente 50 min con una corriente constante de 20 mA. El gel resultante fue procesado tal y como se describió en el punto 3.8.3. Los resultados fueron analizados y cuantificados con el software de análisis de geles ImageJ (NIH software).

- SOLUCIÓN DE CARGA 0,86X: *Formamida 96% (v/v); EDTA 20 mM pH 8.0; azul de bromofenol 0,03% (p/v); azul de xilenocianol 0,03% (p/v).*

3.10.6. Ensayo de escisión del "oligonucleótido suicida"

Este ensayo nos permitió averiguar la capacidad que tienen los ácidos grasos para interferir en la actividad de corte de LdTopIB, a diferencia de los derivados CPT que impiden el paso de religación.

Al igual que en el experimento anterior fue necesario obtener un ADN de doble cadena que sirva como sustrato. La peculiaridad de este sustrato consiste en que una de las hebras complementarias está truncada por lo que es un dúplex asimétrico, siendo imposible por lo tanto que la enzima religue el producto de su propia reacción de corte. Para la obtención de este sustrato suicida (SS), se incubaron 20 pmol de CP-25 (5'-P-TAAAAATTTTTCTAAGTCTTTTTTC-3') con 10 pmol del oligonucleótido CL-14* marcado con 50 µCi de [γ ³²P]-ATP en su extremo

5' (5'- ³²P-GAAAAAAGACTTAG -3'). El sustrato SS resultante se encuentra a una concentración de 167 nM.

Para comprobar la capacidad de inhibir la actividad catalítica de la LdTopIB se realizó el ensayo en ausencia de droga (control), en presencia de un exceso de ácido graso (100 µM) con y sin preincubación previa. La mezcla de reacción contenía tampón TOP 1X, sustrato SS 20 nM, ca. 100 U TopIB y 2 µL de la dilución deseada de droga o de su diluyente correspondiente. La reacción se incubó durante 30 min a 25 °C, durante los cuales se retiraron alícuotas a diferentes tiempos que fueron detenidas con 6 µL de SDS al 2,5 % (p/v). El procesamiento de las muestras fue el mismo que el descrito para el ensayo de equilibrio con el sustrato ES.

3.10.7. Ensayo de religación

El ensayo de religación es una extensión del ensayo anterior. Este ensayo se basa en la obtención de un elevado nivel basal de complejos de CL mediante la incubación de un exceso de TopIB en presencia de 20 nM de SS. Una vez obtenido dichos complejos basales se añadió CPT y un fragmento complementario denominado R11 (5'-AGAAAAATTTT-3') para comprobar la capacidad de religación de la enzima salvaje, así como para averiguar la naturaleza del efecto estabilizador de la CPT sobre los CL generados por la enzima de *Leishmania*.

Para la obtención de los complejos basales se incubó durante 1 h a 37 °C una mezcla que contenía tampón TOP 1X, SS 20 nM y ca. 100 U LdTopIB. Se retiró una alícuota de 5 µL de muestra antes de la adición del fragmento R11 que sirve como punto de tiempo cero. En este punto se dividió el experimento en muestras control (DMSO) y muestras con CPT 75 µM. La reacción de religación se inició al añadir un exceso de 200 veces de R11 respecto al dúplex CL-14*/CP-25 (SS). Se retiraron alícuotas de 5 µL a varios tiempos y se paró la reacción con una concentración final de SDS 0,5% (p/v). Las muestras fueron precipitadas con ETOH, digeridas con tripsina y posteriormente resueltas por electroforesis en un gel desnaturante de poliacrilamida/urea al 20% en tampón TBE. Los resultados fueron analizados y cuantificados con el software de análisis de geles ImageJ (NIH

software) y representados gráficamente con el software estadístico SigmaPlot™ 11.3 (Systat Software Inc, UK).

3.11. ESTUDIOS ACTIVIDAD Y SENSIBILIDAD TopIB *in vivo*

3.11.1. Ensayo de sensibilidad a CPT *in vivo* ("Spot test")

Las cepas de *S. cerevisiae* MBY3 transformadas con cada uno de los genes codificantes de *LdTopIB* deletados o mutados en una o ambas subunidades, fueron crecidas en medio S.C. ura- suplementado con glucosa al 2 % (p/v) durante 24 h y ajustadas a una densidad óptica $OD_{595} = 0,3$. Se aplicaron cuidadosamente cinco diluciones decimales en gotas (*spots*) de 5 μ L cada una, sobre placas de agar SC URA- suplementadas con glucosa o galactosa para sobreexpresar las proteínas, y distintas concentraciones de CPT o de su disolvente (DMSO) (Knab y col., 1993). Las placas fueron incubadas durante al menos 4 días a 30 °C antes de ser fotografiadas con el sistema G-BOX.

3.11.2. Precipitación de CL en presencia de SDS/KCl

En este ensayo, realizamos una precipitación selectiva de los CL formados entre la TopIB y el ADN por la acción de determinados venenos de ésta. Dichos venenos estabilizan el CL e impiden el sellado de la brecha abierta en el material genético y por tanto, su posterior religación. Para ello se utilizó un método de precipitación dependiente de KCl y SDS. El SDS es un detergente capaz de disociar las interacciones no covalentes enzima-ADN favoreciendo la precipitación de los CL por KCl, pero no la del ADN libre.

Se prepararon cultivos de promastigotes a una densidad de 10^6 parásitos/mL en medio M199 1X suplementado con FBS al 10% (v/v). Dichos cultivos se incubaron a 26 °C en aireación durante 24-72 h en presencia de 0,04 μ Ci/mL de [2- 14 C] timidina (53 mCi/mmol). Posteriormente, las células se lavaron dos veces con medio, centrifugándose a 3.000 rpm durante 10 min y se resuspendieron en el volumen inicial de medio fresco. Transcurridas 3 h de recuperación, las células se sembraron en medio fresco sin FBS y se expusieron

alícuotas de 1 mL a varias concentraciones del inhibidor, incubándose a 26 °C durante 30-45 min (Bakshi y Shapiro, 2003). En cada experimento, dos alícuotas no fueron expuestas al inhibidor, para calcular el ADN total que había sido marcado y se prepararon controles con el vehículo en el que iba disuelto el inhibidor (DMSO o H₂O). Las células no tratadas con el inhibidor, fueron centrifugadas a 3.500 rpm durante 5 min y lisadas con 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) al 5% (p/v). El lisado se aplicó a filtros Whatman[®] 3MM, previamente humedecidos con PBS. Posteriormente, los filtros se lavaron con 5 mL de PBS, y tras su secado, se colocaron en viales de centelleo líquido a los que añadimos 5 mL del cóctel Optiphase Hisafe III (Perkin Elmer, USA) para su recuento en un contador de centelleo líquido Beckman, LS 6000TA.

Las distintas alícuotas de las muestras tratadas se centrifugaron a 3.500 rpm durante 5 min y se resuspendieron en 1 mL de solución de lisis precalentada en un baño a 65 °C. Tras incubar las muestras durante 10 min en un baño a esa misma temperatura, se detuvo el proceso de lisis celular añadiendo KCl frío hasta una concentración de 65 mM. Las suspensiones se agitaron vigorosamente en vórtex durante 10 s, para asegurar que la fragmentación del ADN fuera reproducible y uniforme. Las muestras se incubaron 1 h en hielo permitiendo la precipitación de los complejos covalentes. Para recuperar estos complejos, se utilizaron filtros Whatman[®] de 25 mm de fibra de vidrio. Todas las soluciones utilizadas se atemperaron a 4 °C antes de realizar el ensayo.

Tras humedecer los filtros con solución de lavado, se añadieron las muestras previamente resuspendidas para mezclar las dos fases formadas durante la precipitación. Se lavaron los filtros 5 veces con 5 mL de solución de lavado cada vez. Para fijar los complejos covalentes a los filtros, se realizaron dos lavados con 10 mL de ETOH al 95% y dos más con 10 mL de ETOH al 70%. Los filtros se colocaron en tubos de centelleo hasta la evaporación del ETOH. Una vez secos, se añadieron 10 mL de cóctel Optiphase Hisafe III (Perkin Elmer, USA) y se analizaron en un contador de centelleo (Beckman, LS 6000TA). Se aplicó la siguiente fórmula a los datos obtenidos para calcular el porcentaje de formación de CL: $[(\text{dpm muestra} - \text{dpm control}) / \text{dpm ADN total}] \times 100$. Los porcentajes fueron representados en forma curvas dosis-respuesta con el software estadístico

SigmaPlot™ 11.3 (Systat Software Inc, UK) lo que permitió el cálculo de la CC₅₀, o lo que es lo mismo, la concentración de compuesto a la que el 50 % del ADN está mellado.

3.11.3. Ensayo de síntesis de ADN (Incorporación de timidina)

Con el fin de comprobar si los compuestos con estructura indenoisoquinolínica interfieren en la síntesis de ADN de promastigotes de *Leishmania*, se realizaron ensayos de incorporación de timidina. Para ello se incubaron 5×10^6 promastigotes de *Leishmania infantum*/mL en un volumen de final de 10 mL de M199 1X libre de timidina en presencia de 0.5 μ Ci/mL [2-¹⁴C] timidina y las indenoisquinolinas a estudiar o DMSO como control. Se tomaron alícuotas a las 2, 4, 8, 10 y 24 h. Para calcular la cantidad de ADN sintetizado en cada uno de los diferentes puntos las células se depositaron en filtros de fibra de vidrio (GF/C; Brandel Inc. MD, USA) y los ácidos nucleicos fueron precipitados utilizando para ello ácido TCA frío (4 °C). Los filtros se lavaron 5 veces con 5 mL de PBS, y una vez con 10 mL de etanol al 90% seguido por otro lavado con 10 mL de etanol al 70 %. Los filtros se colocaron en viales de centelleo y se añadieron 10 mL de cóctel Optiphase Hisafe III (Perkin Elmer, USA) y se analizaron en un contador de centelleo líquido Beckman, LS 6000TA. Como control positivo se utilizó la CPT. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados representados gráficamente con el software estadístico SigmaPlot™ 11.3.

3.12. ESTUDIOS MICROSCÓPICOS

Debido a la alta sensibilidad de la GFP a los tratamientos tradicionales de fijación, tales como el formaldehído o el paraformaldehído, se optó por realizar preparaciones de células *in vivo*. Los promastigotes, transfectados con las diferentes delecciones de cada una de las subunidades fusionadas a la GFP, fueron fijados a la superficie de los pocillos de las placas para microscopía *Slide for Live Cell Analysis*® (IBIDI) con una solución de poli-L-lisina (Sigma Chem. Co.). La localización subcelular de las proteínas LdTop1B-GFP fue determinada en un sistema de microscopía confocal Nikon C1. Las proteínas de fusión GFP fueron excitadas con un laser de argón con una longitud de onda de 488 nm y la

fluorescencia emitida fue registrada con un detector de 509/30 nm. Para los estudios de co-localización de la LdTopIB tanto con el núcleo celular como con el kinetoplasto se realizó una tinción del ADN celular con diamino-2-fenilindol (DAPI).

3.12.1. Tinción con diamino-2-fenilindol (DAPI)

Se partió de 3×10^6 células/mL, las cuales se centrifugaron a 3.000 rpm durante 10 min para eliminar el medio de cultivo y a continuación se lavaron dos veces con PBS. Se centrifugaron las células a las mismas revoluciones y se resuspendieron en 200 μ L de la solución de DAPI 10 μ g/mL y se incubaron durante 30 min en oscuridad. Tras este periodo de incubación se volvió a centrifugar a la misma velocidad y se lavaron con 1 mL de PBS para finalmente resuspender las células en 1 mL del tampón fosfato y añadir 150 μ L al pocillo tratado con poli-L-lisina.

3.12.2. Fijación con poli-L-lisina

Para realizar la fijación *in vivo* de los promastigotes se preparó una dilución 1:10 de poli-L-lisina (Sigma) en H₂Odd. Los pocillos fueron tratados incubando 300 μ L de ésta dilución durante 20 min a temperatura ambiente, pasados los cuales se procedió a retirar el exceso de poli-L-lisina de los pocillos mediante cinco lavados cinco de 500 μ L/pocillo con H₂Odd estéril.

3.13. ESTUDIOS BIOINFORMÁTICOS

La caracterización funcional de la secuencia de una proteína es uno de los problemas más frecuentes en biología. Esta tarea se simplifica enormemente gracias a modelos tridimensionales (3D) de la estructura de la proteína estudiada. Cuando no existe una estructura determinada experimentalmente, el modelado comparativo o modelado por homología puede, en algunos casos, proporcionar un modelo 3D útil para proteínas relacionadas con al menos una estructura proteica conocida. El modelado comparativo predice la estructura 3D de la secuencia de una determinada proteína (diana) basándose para ello su alineamiento con una o más proteínas de estructura conocida (plantillas). El proceso de predicción comprende:

asignación de plegado y selección de la plantilla, alineamiento diana-plantilla, construcción del modelo y finalmente evaluación del modelo. Actualmente es posible modelar, con una precisión "útil", partes significativas de aproximadamente la mitad de las secuencias proteicas conocidas (Pieper y col., 2002).

A pesar del progreso en predicción *ab initio* de proteínas (Baker, 2000), el modelado comparativo continúa siendo el único método que puede predecir de forma fiable la estructura 3D de una proteína con una precisión comparable a una estructura determinada experimentalmente con baja resolución (Marti-Renom y col., 2000). Es importante señalar que incluso los modelos con errores pueden ser útiles, ya que algunos de los aspectos de la función proteica pueden ser predichos a partir de características estructurales superficiales (Baker y Sali, 2001).

3.13.1. Regiones de interacción entre LdTopIL y LdTopIS

Dentro del presente trabajo se realizó una predicción estructural 3D en busca de las posibles regiones de interacción entre las dos subunidades que constituyen la LdTopIB. Para ello se realizó un modelado por homología estructural con servidores de análisis de interacciones proteína-proteína. La LdTopIB (número de entrada Q9NJG8) fue dividida en dos cadenas (correspondientes a las dos subunidades) para realizar la predicción estructural de forma independiente. La LdTopL sirvió como referencia en el modelo ya que mostró cierta similitud cuando se realizó un alineamiento estructural con la subunidad pequeña (Fig. 3.1).

El modelado por homología estructural fue llevado a cabo con el servidor SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>). Este servidor implementa de forma automatizada la selección de plantilla, el alineamiento y la construcción del modelo 3D. Además gracias a su "modo alineamiento" el usuario puede basar todo el proceso de modelado en un alineamiento estructural definido por él mismo (Kiefer y col., 2009). La evaluación de la calidad de los modelos fue evaluada mediante el parámetro E (*e-value*), siendo más significativos aquellos resultados de menor valor E, siendo 0 el mejor resultado posible. Una vez modeladas las dos subunidades, se procedió al estudio de las posibles regiones de interacción.

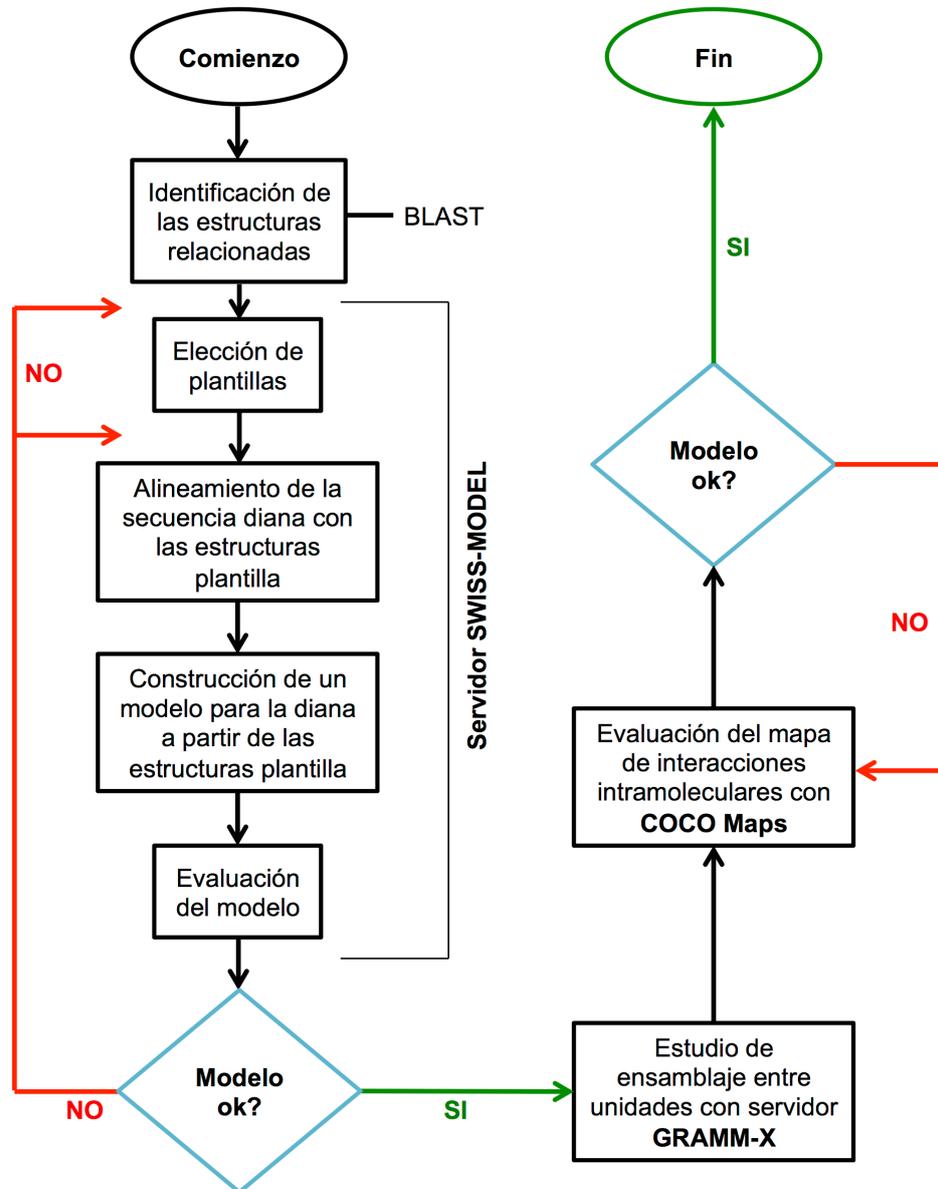


Figura 3.1. Representación esquemática el diagrama de flujo y toma de decisiones del proceso seguido para el modelado por homología de la LdTopIB.

Para determinar la estructura cuaternaria de la proteína LdTopIB se realizó una predicción de ensamblado, entre las dos estructuras previamente modeladas con la ayuda del servidor GRAMM-X (Tovchigrechko y Vakser, 2006). Este servidor calcula las mejores interacciones de superficie entre las moléculas mediante una técnica de correlación basada en el algoritmo de la transformada rápida de Fourier

(FFT). Una de las principales ventajas del uso de GRAMM-X es su capacidad para suavizar la superficie de la proteína representada para explicar el posible cambio conformacional producido tras la unión dentro de la estructura rígida del ensamblado. La elección del mejor resultado se basó en los conocimientos experimentales sobre la proteína, respetando tanto la disposición de los aminoácidos que componen su centro activo como las regiones con una importancia reconocida. Finalmente, se analizó el mapa de contactos intramoleculares con el software COCO Maps (Vangone y col., 2011). Este software genera información detallada sobre: i) las regiones involucradas en la interacción, ii) naturaleza físico-química de la misma, iii) área de la interfaz, y iv) presencia de puentes de hidrógeno intermoleculares. Los resultados obtenidos se representaron como gráficas de interacción entre aminoácidos, sirviendo como guía para el diseño de proteínas mutadas y truncadas.

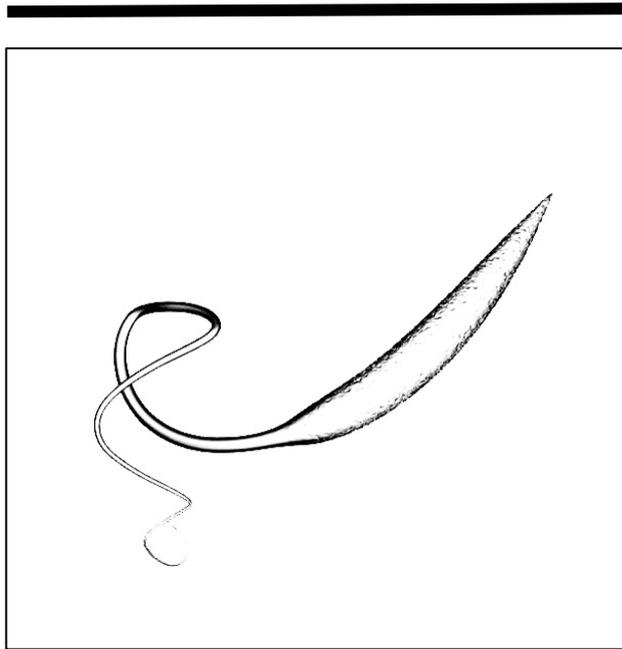
3.13.2. Ensamblado del complejo LdTopIB-ADN con CPTs

Con el fin de comprender la mayor capacidad de inhibición del gimatecan sobre la LdTopIB en comparación con la CPT, se realizaron estudios de ensamblado tomando como diana el complejo LdTopIB-ADN y como ligandos la CPT y el gimatecan.

Para la realización de las aproximaciones de ensamblaje molecular se tomó como referencia la estructura 3D del cristal de LdTopIB, con número de entrada PDB 2BS9. Un paso importante en el proceso fue realizar la transformación de la estructura previamente propuesta por Roy y colaboradores (2011), en la cual el ADN de doble cadena de 22 pbs de la estructura 2B9S fue sustituido por la doble cadena de 22 pbs presente en la estructura con código de entrada 1K4T de la enzima humana. Esta sustitución es esencial, ya que gracias a ella se pudo investigar la capacidad de unión del gimatecan y la CPT con el complejo CL generado por la LdTopIB sobre la doble cadena de ADN.

El ensamblaje molecular se realizó con el software Autodock Vina y el interfaz gráfico PyRx (Trott y Olson, 2010). El software Autodock es capaz de buscar las mejores aproximaciones para ajustar dos moléculas de forma que

constituyan un ensamblaje de alta fiabilidad. El ensamblaje consistió en una serie de búsquedas independientes que dieron lugar a la conformación final del ligando. Dicha conformación equivale a la mínima energía encontrada durante cada búsqueda. Finalmente, el experimento realizado con Autodock incluyó una agrupación de las conformaciones en función de su similitud. Las estructuras de entrada, tanto de los ligandos como del receptor fueron preparadas con la aplicación informática AutodockTools, que también sirvió para determinar el centro del espacio de búsqueda así como las dimensiones 25x25x25. Se ejecutó el software Autodock Vina para ambos ligandos con el sistema de búsqueda de máxima exhaustividad para obtener los diez mejores resultados de ensamblaje (Wolf, 2009). Finalmente, la visualización y análisis de los resultados se realizaron con el software UCSF Chimera (NIH NIGMS P41-GM103311) (Pettersen y col., 2004).



4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LOS GENES *LdTopIL* Y *LdTopIS*. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La LdTopIB presenta una estructura cuaternaria constituida por dos subunidades de diferente tamaño y función, una de 636 aminoácidos (masa molecular teórica: 73 kDa) codificada por el gen *LdTopIL*, situado en el cromosoma 34, y otra de 262 aminoácidos con una masa molecular teórica de 28 kDa, codificada por el gen *LdTopIS* que se encuentra en el cromosoma 43. Ambas subunidades se asocian en proporción 1:1 para reconstituir una enzima catalíticamente funcional.

4.1.1. Obtención de las construcciones

Debido a la naturaleza heterodimérica de la LdTopIB se decidió utilizar el vector bicistónico de expresión en levaduras pESC-URA. Este vector permitió introducir los dos genes constituyentes de LdTopIB en la cepa EKY3 de *S. cerevisiae*. Al existir una coexpresión de los genes se garantizó un correcto plegado de la proteína así como el establecimiento de las interacciones nativas entre ambas subunidades. Inicialmente los genes *LdTopIL* y *LdTopIS* fueron amplificados por PCR utilizando como molde ADN genómico procedente de promastigotes de *L. donovani* con los cebadores recogidos en el Anexo I. El gen *LdTopIL* fue amplificado introduciendo los sitios de restricción *BamHI* y *XhoI*, mientras que para el gen *LdTopIS* se generaron los sitios de corte *NotI* y *SpeI*. Una vez purificado el gen *LdTopIL* a partir del gel de agarosa fue digerido durante 2 h con las enzimas *BamHI* y *XhoI*, de la misma manera que el vector pESC-URA. Tras la reacción de ligado y la transformación, se comprobó la correcta inserción del gen *LdTopIL* en uno de los lugares de clonado múltiple del vector, quedando bajo el control del promotor GAL1. La construcción resultante, pESC-URA-LdTopIL, fue digerida con las enzimas de restricción *NotI* y *SpeI* para posteriormente ser ligada con el inserto

correspondiente al gen *LdTopIS*. Dicho gen quedó regulado bajo el promotor GAL10 (Villa y col., 2003). De esta forma se construyó el vector pESC-URA-LdTopIL-LdTopIS al que a partir de ahora nos referiremos como pESC-wt (Fig. 4.1).

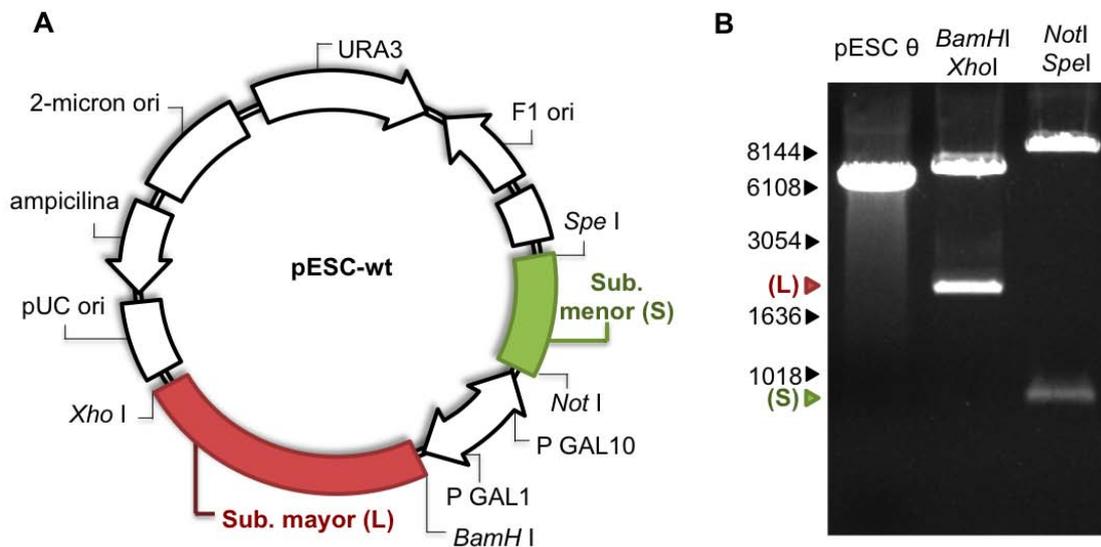


Figura 4.1. Clonado de los genes *LdTopIL* y *LdTopIS* (A) Esquema del vector resultante de la inserción de los genes *LdTopL* y *LdTopS* en el vector de expresión para levaduras pESC-URA. (B) Gel de agarosa mostrando los tamaños obtenidos para los productos de la digestión del vector pESC-wt con los pares de enzimas *BamHI/XhoI* y *NotI/SpeI*, correspondientes a la subunidad grande y pequeña, respectivamente.

4.1.2. Expresión de la *LdTopIB* y purificación por cromatografía líquida en columna

Una vez comprobado que los extractos de las levaduras EKY3 transformadas con el vector pESC-wt sobreexpresaban los dos genes y poseían la capacidad de relajar ADN superenrollado, se procedió a la purificación de *LdTopIB* mediante un sistema de cromatografía líquida en columna precedida por una doble precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Bjornsti y Fertala, 1999). Para ello, una colonia EKY3 pESC-wt fue inoculada en 1 L de medio S.C. ura- suplementado con glucosa al 2 % (p/v), facilitando así un rápido crecimiento de las levaduras durante 24 h. Ya que la glucosa es un represor de la expresión de los promotores GAL1 y GAL10, se añadió al medio de cultivo rafinosa a una concentración final del 2% (p/v). Una vez

las células alcanzaron una OD_{595} mayor a 1 se añadió galactosa (2% final) al cultivo, lo que indujo la sobreexpresión de los genes controlados por ambos promotores GAL. La inducción de los cultivos se mantuvo durante 6 h a 30 °C, transcurridas las cuales las células fueron recogidas por centrifugación y sometidas a un ciclo de rotura por congelación-descongelación a -80 °C que debilitó de forma considerable la pared celular de las levaduras, facilitando la lisis mecánica con bolas de vidrio. Dicho proceso de lisis se realizó en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas para proteger a nuestra enzima de la acción del alto número de agentes proteolíticos generados por la cepa EKY3. El lisado obtenido, a fin de retirar posibles contaminaciones proteicas no deseadas, fue sometido a una doble precipitación con $(NH_4)_2SO_4$ de acuerdo a los protocolos previos desarrollados para la purificación de otras TopI. La primera precipitación se realizó con una saturación del 35 %, lo que facilita la precipitación de las proteínas nucleares con excepción de la topoisomerasa. El sobrenadante obtenido por centrifugación se saturó hasta alcanzar una concentración de $(NH_4)_2SO_4$ al 75 %, durante 18 h (Bjornsti y Fertala, 1999).

El proceso de purificación de las proteínas continuó mediante el paso por dos columnas de cromatografía líquida. La primera de ellas constaba de una matriz de intercambio iónico de fosfocelulosa P-11, la cual está especialmente diseñada para la purificación de proteínas de origen nuclear. Se aplicó un gradiente discontinuo ascendente de KCl (desde 0,2 a 1 M) y se recogieron alícuotas de 0,5 mL de cada una de las fracciones. Éstas fueron estudiadas en ensayos de relajación de ADN, comprobándose que las fracciones más activas correspondían a las eluidas a una concentración 0,6 M KCl. Las fracciones con actividad TopI y sin presencia de actividad endonucleasa fueron sometidas a una segunda purificación mediante cromatografía de interacción hidrofóbica en una resina de phenyl-Sepharose CL-4B[®]. Nuevamente se aplicó un gradiente discontinuo de sales y se comprobó qué fracciones poseían actividad TopI. Una vez identificadas las fracciones activas, se procedió a concentrar la proteína recogida mediante ultrafiltración centrífuga con Amicon Ultra-4 50K (Millipore[®]).

4.2. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD LdTopIB

4.2.1. Medida de la actividad de relajación

Con el fin de valorar la actividad de relajación de la TopIB purificada, así como para establecer el concepto de Unidad enzimática (U/ μ L), se realizaron ensayos de dilución seriada 1/3 partiendo de 0,5 μ g de la proteína total concentrada (Fig. 4.2). Como sustrato de la enzima se utilizaron 0,5 μ g de ADN pSK, cuyo porcentaje de estado superenrollado era al menos de un 90 %. Las diferentes diluciones de enzima se incubaron en presencia de este sustrato plasmídico durante 30 min a 37 °C. Una vez resueltas las reacciones en un gel de agarosa se observaron las bandas correspondientes al ADN superenrollado (SC) y relajado (R). Esto permitió definir la unidades enzimática TopIB (U/ μ L) como la cantidad de TopIB necesaria para relajar completamente 0,5 μ g de ADN superenrollado en 30 min a 37 °C. De esta forma se pudieron normalizar todos los ensayos realizados con las diferentes TopIB recombinantes.

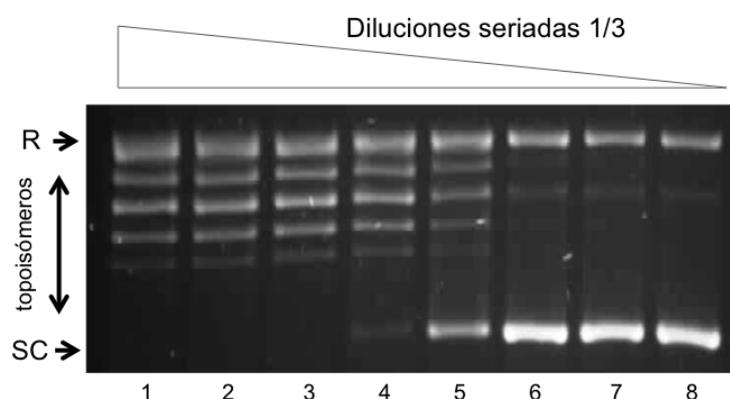


Figura 4.2. Ejemplo de cuantificación de la actividad de la relajación mediante diluciones seriadas 1/3. R: ADN relajado; SC: ADN superenrollado. Como criterio general se entiende que el ADN está totalmente relajado cuando no se encuentra presente la banda de ADN correspondiente al ADN SC.

Con el fin de optimizar la actividad TopIB, se estudió el efecto de la temperatura y de la fuerza iónica en la actividad de relajación de *in vitro*. La actividad enzimática se midió en condiciones estándar en un rango discontinuo de temperaturas desde 5 °C a 50 °C durante 30 min (Fig. 4.3.A panel superior). Se

observó que las temperaturas bajas ralentizaron la relajación del ADN y que aunque la enzima no era capaz de desenrollar el ADN, se pudieron apreciar topoisómeros. A partir de los 26 °C (temperatura óptima de crecimiento de los promastigotes) la enzima fue capaz de relajar completamente el ADN sin observarse grandes cambios en la actividad catalítica incluso hasta los 50 °C (Fig. 4.3.A panel inferior). Igualmente, se determinó la concentración óptima de KCl en el ensayo de relajación a diferentes concentraciones de la sal; (40 a 350 mM) (Fig. 4.3.A panel superior). Los ensayos se realizaron según el procedimiento estándar a 37 °C observándose un máximo de actividad catalítica con una concentración de KCl de 150 mM (Fig. 4.3.A panel inferior), cantidad que fue estandarizada a partir de este momento.

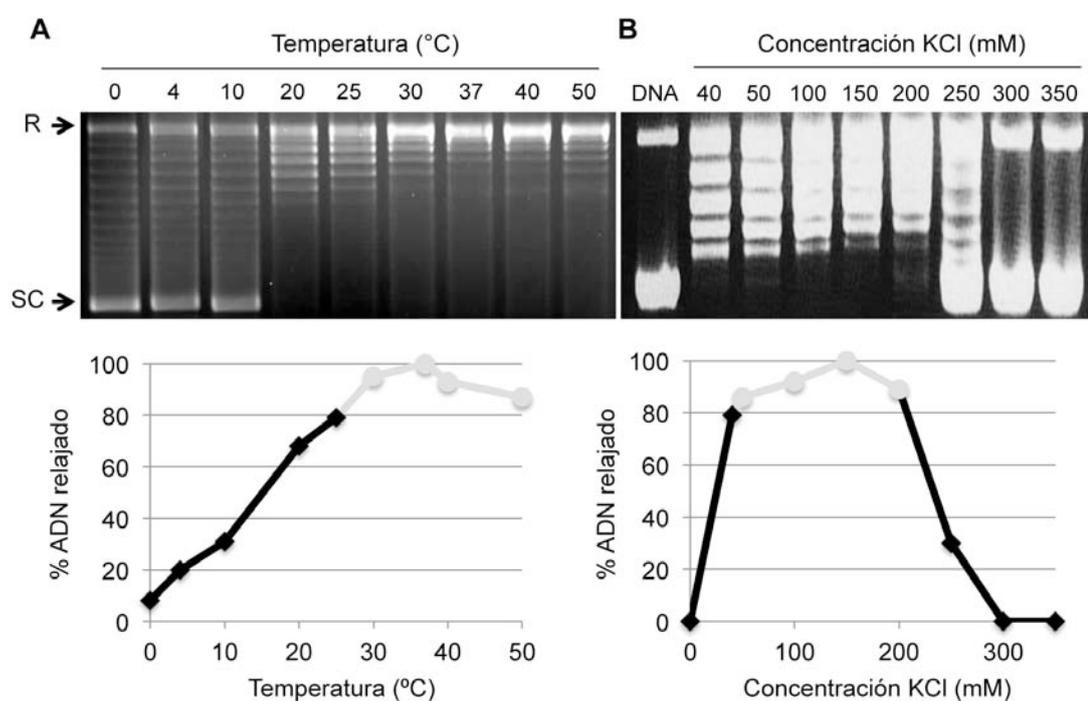


Figura 4.3. Efecto de la temperatura (A) y la concentración de KCl (B) sobre la actividad de relajación de la LdTopIB en geles de agarosa. La cantidad de ADN relajado fue cuantificado en cada uno de los puntos y enfrentado a cada uno de los dos parámetros. Los intervalos óptimos de temperatura (A) y KCl (B) se muestran en color gris en las gráficas.

4.2.2. Inhibición de la actividad de relajación

El método clásico para el estudio de la actividad de relajación de una enzima TopI incluye la utilización de inhibidores. La presencia de estos venenos provoca una ralentización del paso de religación debido a la estabilización transitoria de los complejos covalentes ADN-enzima. Esto permite estudiar con detalle los pasos concretos que conforman el proceso global de relajación. En el presente trabajo se decidió utilizar la CPT para la realización de estos estudios ya que posee un mecanismo de acción sobre la hTopIB perfectamente conocido.

El primer paso por lo tanto, fue comprobar si la CPT era capaz de inhibir la relajación del ADN superenrollado mediada por la LdTopIB. Para ello se incubaron 0,5 μg de ADN pSK y concentraciones crecientes de CPT en presencia de 1 U LdTopIB. En la Fig. 4.4 se muestra como la CPT fue capaz de inhibir de forma muy eficiente la relajación mediada por LdTopIB, comenzándose a observar la banda de ADN superenrollado a concentraciones tan bajas como 10 nM.

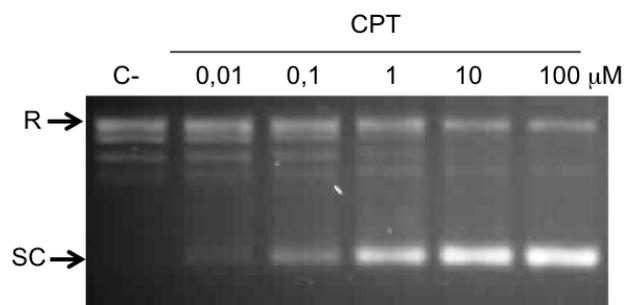


Figura 4.4. Inhibición de la actividad LdTopIB en presencia de concentraciones crecientes de CPT. El carril control (C-) fue incubado en presencia de DMSO. R: ADN relajado; SC: ADN superenrollado.

Una vez comprobada la capacidad de inhibición de la CPT se realizó un estudio para analizar el proceso de relajación del ADN a lo largo del tiempo, tanto en ausencia como en presencia de CPT. Con este fin, se incubó 1 U LdTopIB con 0,5 μg de ADN pSK en presencia de DMSO o CPT 75 μM . Desde el comienzo de la reacción se tomaron alícuotas a diferentes tiempos, desde 0,1 a 30 min. Tras parar las reacciones con SDS se realizó una digestión con proteinasa K, con el fin de visualizar de la banda de ADN mellado ya que elimina la LdTopIB que permanecía

unida al mismo (resultado del corte de la enzima). Finalmente, las muestras se resolvieron en un gel de agarosa que contenía BrEt, el cual al ser un agente intercalante permite diferenciar la banda de ADN relajado de la de ADN superenrollado debido a que induce un aumento relativo en el W_r .

Tal y como se observa en el panel izquierdo de la Fig. 4.5.A, en ausencia de CPT la LdTopIB es capaz de relajar el ADN desde 0,1 min. En cambio cuando incubamos la mezcla de reacción en presencia de CPT 75 μ M (Fig. 4.5.A panel derecho), el proceso de relajación es frenado no alcanzando el ADN un estado de relajación absoluto. Este efecto se observa mucho mejor cuando representamos gráficamente el porcentaje de ADN relajado en función del tiempo (Fig. 4.5.B.), siendo necesarios 4 min para que el ADN alcance la forma relajada.

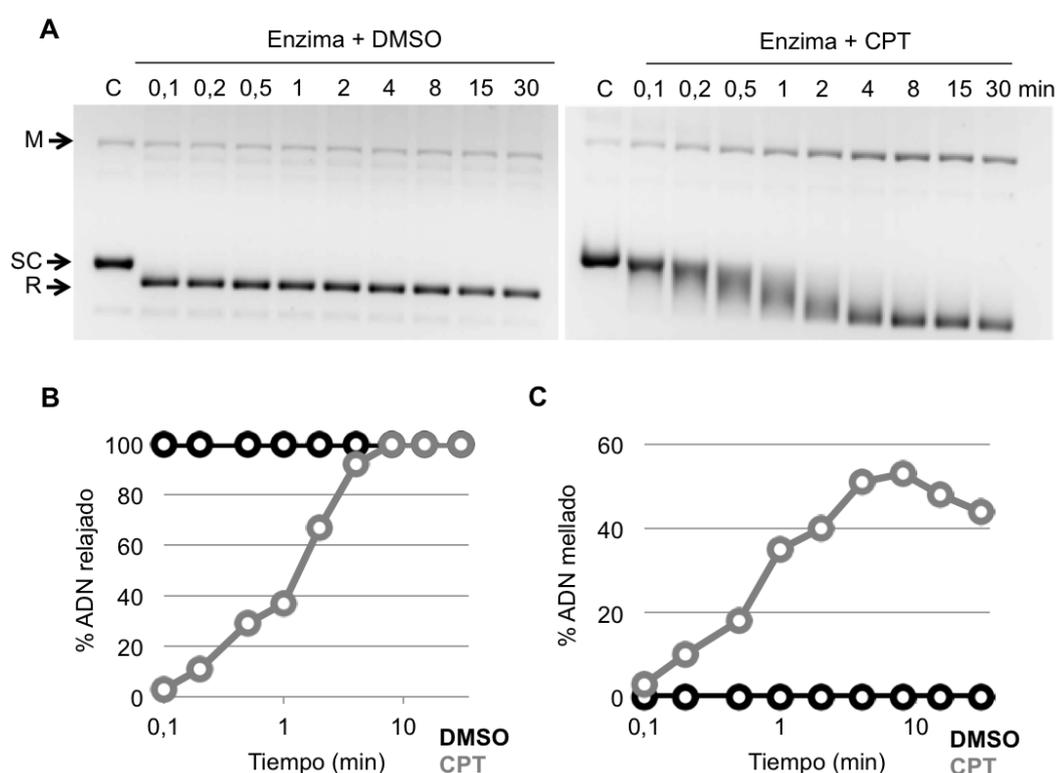


Figura 4.5. (A) Estudio de actividad de la relajación de LdTopIB en función del tiempo en ausencia (izquierda) y en presencia de CPT 75 μ M (derecha). M: ADN mellado; SC: ADN superenrollado; R: ADN relajado. (B) Representación gráfica del porcentaje de ADN relajado en función del tiempo. (C) Representación gráfica del porcentaje de ADN mellado en función del tiempo.

Por lo tanto, la CPT está interfiriendo con la actividad LdTopIB; pero en este punto no se pudo afirmar cuál era el mecanismo que desencadenaba dicho efecto. De este ensayo se obtuvo otro dato importante, la cantidad de ADN mellado estaba claramente aumentada en presencia de CPT con respecto al control de DMSO. La Fig. 4.5.C muestra como la cantidad de ADN mellado aumentó progresivamente hasta los 4 min, momento en el que cesó su crecimiento. La disminución de esta banda se hizo patente a partir de los 8 min de reacción, tratándose por lo tanto de un proceso reversible (Fig. 4.5.D). Este hecho es de gran importancia, ya que un aumento en la banda de ADN mellado está directamente relacionado con la estabilización de los complejos CL.

4.2.3. Equilibrio de escisión/religación

El ciclo catalítico de la TopI se compone de diferentes pasos que incluyen la unión de la enzima al ADN, la escisión de una de las hebras, la rotación de la hebra escindida, la religación y la disociación del complejo ADN-enzima.

Para comprender el efecto estabilizador de la CPT sobre los complejos CL individuales, se decidió realizar un ensayo de equilibrio de escisión/religación con un fragmento lineal de ADN de 202 pbs, el cual está marcado radiactivamente en su extremo 3' e incluye secuencias específicas de corte para la TopIB (Dexheimer y Pommier, 2008). La reacción se llevó a cabo incubando un exceso de LdTopIB y 150.000 cpm de ADN pSK-202 en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de CPT. En ausencia de venenos, la TopIB es totalmente efectiva religando un ADN sustrato. De hecho, el equilibrio entre las dos reacciones opuestas de transesterificación (escisión/religación) favorece de forma sustancial el estado religado, ya que en condiciones normales la fracción de enzima que permanece unida covalentemente al ADN es indetectable. Dado que el máximo de complejos estabilizados observado en el ensayo de agarosa se produjo a los 4 min, por lo que se fijó este tiempo de reacción para el ensayo de equilibrio. Los tubos se incubaron a 25 °C en presencia de 150 mM KCl y posteriormente se precipitaron con ETOH. Seguidamente el ADN de doble cadena fue desnaturalizado y los productos obtenidos se resolvieron mediante una electroforesis en un gel de secuenciación de poliacrilamida/urea al 16%. La Fig. 4.6.A muestra el patrón de

bandas (todas ellas especies de bajo peso molecular) obtenido para la LdTopIB, identificándose en él la estabilización de seis complejos CL, cuyas secuencias específicas se muestran en la Fig. 4.6.C.

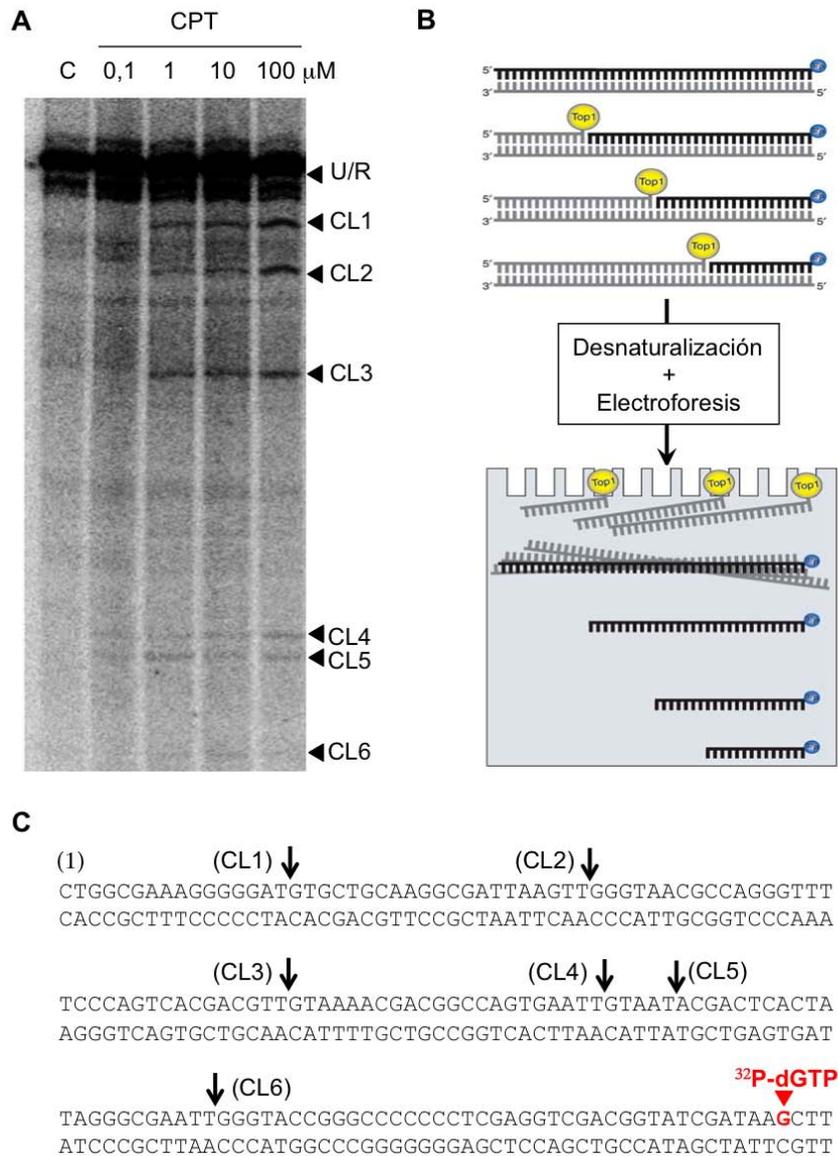


Figura 4.6. (A) Gel de secuenciación al 16 % en el que se observa el patrón de CL obtenido para la enzima salvaje LdTopIB. U/R: ADN no escindido o ya religado; CL: banda correspondiente al complejo ternario ADN-LdTopIB-CPT estabilizado. (B) Representación esquemática de proceso de escisión mediado por la TopIB y posterior separación de los productos en el gel de secuenciación. (C) Secuencia de 202 pbs utilizada para el ensayo marcado radiactivamente en el extremo 3' de una de sus cadenas. Las flechas representan los sitios preferenciales de corte, correspondiéndose con los observados en (A).

Es importante señalar que la intensidad de las bandas obtenidas fue directamente proporcional a la concentración de CPT en la reacción. Esta droga fue capaz de estabilizar complejos CL a concentraciones superiores o iguales a 1 μ M, mostrando claramente su naturaleza de veneno frente a la LdTopIB. Además, entre los 6 complejos CL estabilizados; CL1, CL2 y CL3 mostraron una mayor intensidad de banda, probablemente debido a una mayor afinidad de la CPT hacia el corte ADN-LdTopIB generado en estos puntos. Para los sucesivos ensayos comparativos entre las diferentes LdTopIB truncadas se tomaron como referencia únicamente los complejos CL1, CL2 y CL3.

4.2.4. Velocidad de escisión

El ensayo utilizado para evaluar la velocidad de escisión de la LdTopIB, de forma independiente a la velocidad de religación, supone el uso de un sustrato denominado "suicida" (mostrado en la Fig. 4.7.A). Este sustrato está constituido por el oligonucleótido CL14 (5'-GAAAAAAGACTTAG-3') marcado radiactivamente en su extremo 5', anillado con el oligonucleótido de secuencia complementaria CL25 (5'-TAAAAATTTTTCTAAGTCTTTTTTC-3'), el cual está fosforilado en el 5' con ATP frío, produciendo un dúplex de ADN con una extensión de 11 pb de cadena sencilla. Gracias al diseño de este sustrato se consigue impedir la religación de la cadena, ya que el dinucleótido (AG-3') generado durante la reacción de escisión no puede ser religado al quedar unido el producto suicida de forma covalente a la enzima (Stewart y col., 1999).

Se incubaron aproximadamente 75 U de LdTopIB (un exceso de enzima respecto al ADN) con 20 nM del sustrato suicida en presencia de 150 mM KCl a 25 °C en un volumen final de 20 μ L. Se tomaron alícuotas a tiempos definidos (0,1 a 30 min) por la adición de 4 μ L de SDS 2,5 %. Tras la precipitación con etanol y la digestión con tripsina, los fragmentos de ADN escindidos se resolvieron en un gel desnaturizante de poliacrilamida/urea al 16% (Fig. 4.7.B). El gel muestra como la enzima de *Leishmania* es capaz de escindir el sustrato generando una banda de CL de 12 nucleótidos. Tal y como se observa en la figura, la velocidad de corte fue muy

rápida, alcanzándose el nivel máximo de escisión al cabo de 1 min, momento en que el proceso se estabiliza y la enzima ya no puede cortar más ADN. Al cuantificar las bandas se constató que la enzima fue capaz de cortar entre un 95 y un 98% del ADN total, lo que supone una alta efectividad de procesamiento.

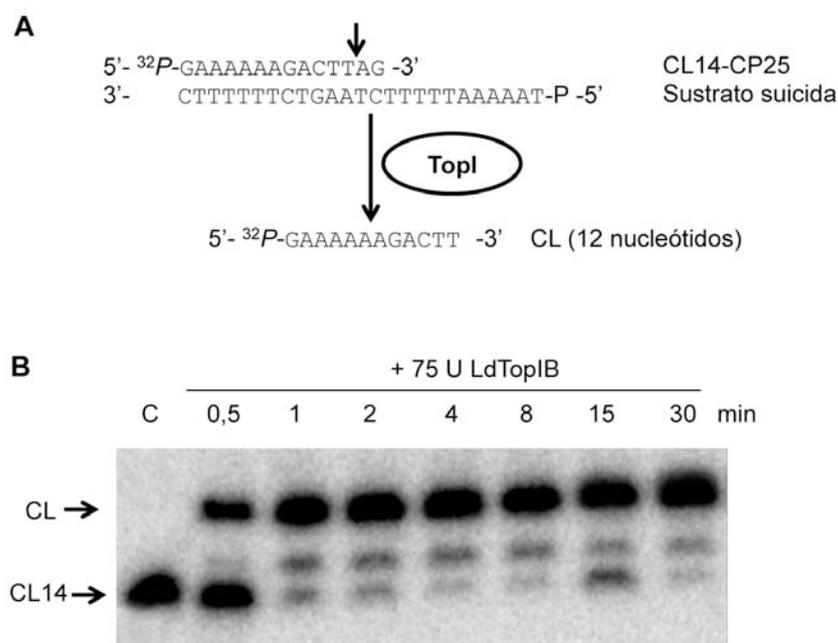


Figura 4.7. Cinética de escisión con el sustrato suicida CL14/CP25 a 150 mM KCl. (A) Sustrato utilizado para el ensayo con el extremo 5' del CL14 está marcado con [γ - ^{32}P]. La flecha indica el sitio de corte preferencial de la enzima. (B) Se hicieron reaccionar aproximadamente 75 U LdTopIB con 20 nM del sustrato. Se tomaron alícuotas a los tiempos descritos y se detuvieron con SDS. Los productos de la reacción fueron analizados mediante electroforesis en un gel desnaturalizante de poliacrilamida/urea al 16%. CL: complejo de cleavage de 12 nucleótidos producto del corte de la LdTopIB sobre el sustrato suicida.

4.2.5. Velocidad de religación

El paso catalítico de religación del ADN fue analizado midiendo la capacidad de la enzima para religar el oligonucleótido R11 (5'-AGAAAAATTTT-3') una vez añadido al complejo covalente de escisión (Fig. 4.8.A). La primera parte del ensayo consistió en incubar un exceso de enzima con el sustrato CL14/CP25 (el mismo que se utilizó para la cinética de escisión), que presenta el sitio de corte preferencial, durante 60 min a 25 °C. De esta forma se consigue la formación del

máximo número de complejos de CL con la enzima unida covalentemente al extremo 3'. Una vez que se produjo la escisión se aumentó la concentración salina a 270 mM KCl, de forma que se evitó que la enzima continuase cortando el sustrato (Yang y Champoux, 2002). La reacción se lleva a cabo en presencia de una elevada concentración de sales, ya que la fuerza iónica afecta selectivamente al proceso de escisión y así se evita que el producto religado vuelva a ser escindido por la enzima. Para comenzar la cinética de religación se añadió el oligonucleótido de religación (R11), el cual es complementario a la región de cadena sencilla de CP25 (Fig. 4.8.A). Las alícuotas tomadas a diferentes tiempos fueron analizadas en un gel desnaturizante al 20 % (Fig. 4.8.B), tal y como se describió en la sección de Material y Métodos, a partir del cual se calculó el porcentaje de complejos de CL restantes analizando la imagen adquirida con el PhosphorImager (Fujitsu) mediante el software ImageJ (NIH).

La cuantificación del porcentaje de productos de escisión fue normalizada en función de la radiactividad total presente en cada carril y representada gráficamente en función del tiempo (Fig. 4.8.C). Del gel y de la gráfica mostrados en la Fig. 4.8 resulta evidente que la velocidad de religación de la enzima disminuyó en presencia de la CPT. En ausencia del inhibidor la LdTopIB fue capaz de religar la totalidad de los complejos escindidos en los primeros 2 min de reacción. La acción estabilizante de la CPT provocó que la banda de religación comenzase a ser visible a partir de los 30 s alcanzando el 100 % en torno a los 8 min de reacción.

Este resultado coincide con el obtenido durante el análisis de la capacidad de relajación en presencia de CPT (Fig. 4.5.A); en ambos ensayos la enzima LdTopIB necesitó entre 4 y 8 min para restablecer su actividad normal. Con todo esto, podemos afirmar que la enzima de *Leishmania* es sensible al efecto del veneno TopIB CPT y que dicha inhibición es debida a la estabilización reversible de los complejos de CL generados por la enzima al cortar el ADN sustrato.

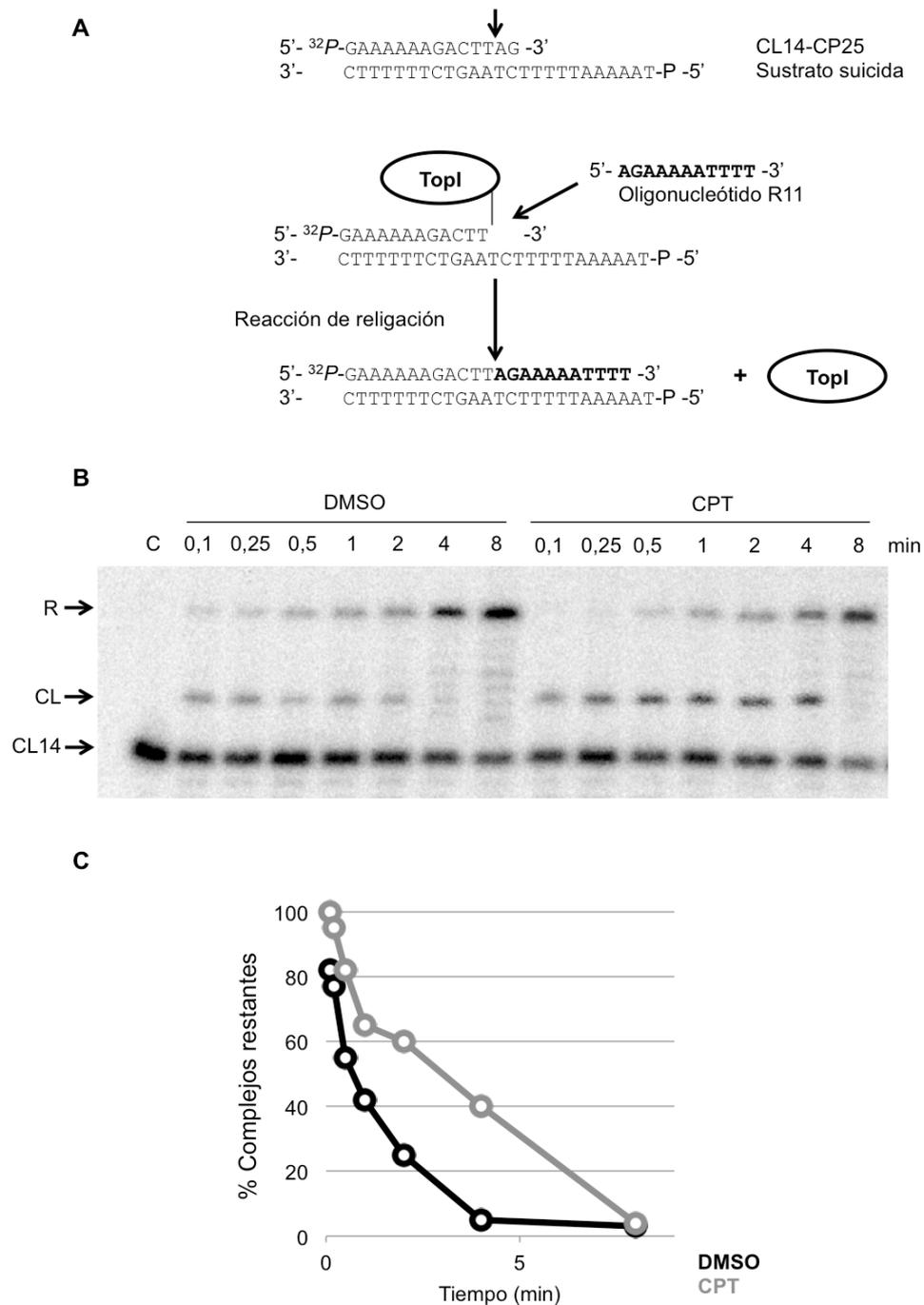


Figura 4.8. Cinética de religación del sustrato suicida CL14/CP25 a 270mM KCl. La proteína fue incubada con el sustrato marcado en el 5' del CL14 con [γ - ^{32}P] (A) Representación esquemática de la reacción de religación. (B) Los productos de reacción fueron analizados con un gel desnaturalizante de poli-acrilamida/urea al 20 %. (C) Gráfica de los porcentajes de productos de CL restantes normalizados por la señal radiactiva total obtenida para cada carril.

4.3. BÚSQUEDA DE REGIONES DE INTERACCIÓN ENTRE SUBUNIDADES

Como ya se ha demostrado en la sección anterior, la LdTopIB es sensible a la acción de la CPT, la cual produce una disminución en la religación impidiendo por tanto que se finalice el proceso de relajación del ADN superenrollado. En el caso de la enzima homóloga humana, son varios los estudios que han señalado la importancia de que exista un dominio *linker* totalmente funcional para que se produzca el envenenamiento por CPT. Este dominio se extiende desde el aminoácido 635 al 713 en la hTopIB, pero esta secuencia carece de homología con la LdTopIB lo que dificulta enormemente la búsqueda de dicho dominio en la enzima de *Leishmania*.

En el presente trabajo se estableció la hipótesis de que las regiones de interacción entre ambas subunidades podrían ser responsables de constituir un hipotético dominio *linker* en la LdTopIB. Con el objetivo de encontrar las regiones de ambas subunidades involucradas tanto en la sensibilidad a CPT como en la interacción entre ambas subunidades, se realizó un estudio bioinformático mediante predicciones por homología. A partir de estos resultados se establecieron las regiones potenciales de interacción y se realizaron estudios tanto de actividad como de sensibilidad a CPT en diferentes estructuras truncadas de ambas subunidades. Los cebadores utilizados para las diferentes mutaciones y deleciones, tanto internas como lineales, están detallados en el Anexo I de la presente memoria.

4.3.1. Modelado por homología de la LdTopIB

La estructura obtenida por Davies y col. (2006) a partir de estudios cristalográficos carece de las regiones no conservadas lo que hace muy difícil la creación de modelos 3D de alta precisión de ambas subunidades de la LdTopIB. Con el fin de identificar las regiones conformantes del posible dominio *linker* se creó una estructura 3D mediante técnicas de modelado por homología y estudios de ensamblaje proteína-proteína.

El modelado de cada una de las subunidades se llevó a cabo con el servidor Swiss-Model, tal y como se describió en la sección de Material y métodos. La subunidad LdTopIL fue modelada con una identidad de secuencia del 39,8 %, y un parámetro E igual a 0, lo que se traduce en un alineamiento de alta calidad. El modelo de la subunidad grande abarcó los aminoácidos comprendidos entre las posiciones 25 y la 633. Por su parte, la subunidad LdTopIS fue modelada con una identidad del 36,7 % y un parámetro E de $4,2 \times 10^{-40}$, lo que permitió el modelado de los residuos comprendidos entre las posiciones 174 y 261 (Fig. 4.9).

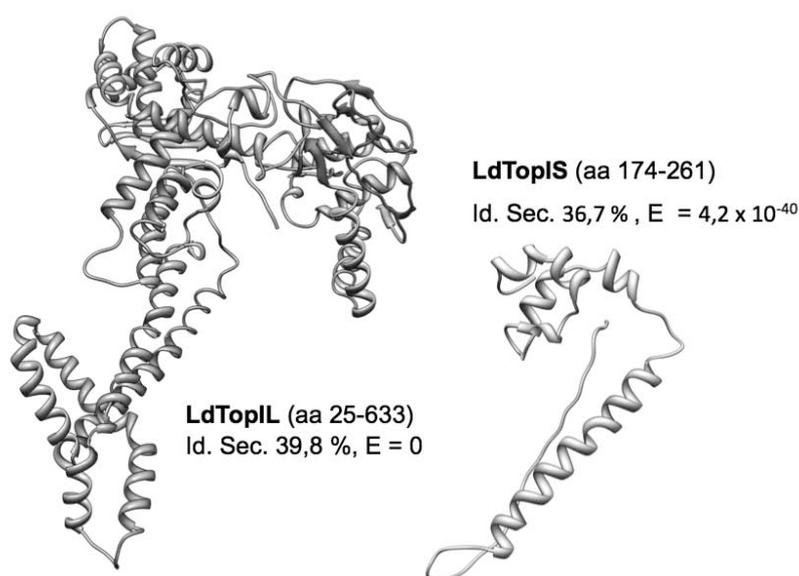


Figura 4.9. Estructura 3D del modelado de las subunidades LdTopIL y LdTopIS de la LdTopIB. La Id. Sec. ó identidad de secuencia indica el grado de homología observado con la plantilla seleccionada para el modelado. El valor del parámetro E sirvió para evaluar la significación de los alineamientos de secuencia, siendo 0 el valor de significación máximo.

Una vez modeladas ambas subunidades se procedió al estudio de ensamblaje de las mismas por medio del servidor GRAMM-X. Los resultados obtenidos se evaluaron teniendo en cuenta las características funcionales de una TopIB y la disposición concreta de los aminoácidos que constituyen el centro activo de la LdTopIB. Finalmente, se analizaron los mapas de contacto intramolecular de los mejores resultados con el software COCO Maps.

La Fig. 4.10 muestra la distancia existente entre los aminoácidos de ambas subunidades (panel izquierdo), así como el número de residuos que se encuentran separados por menos de 5 Å (panel derecho).

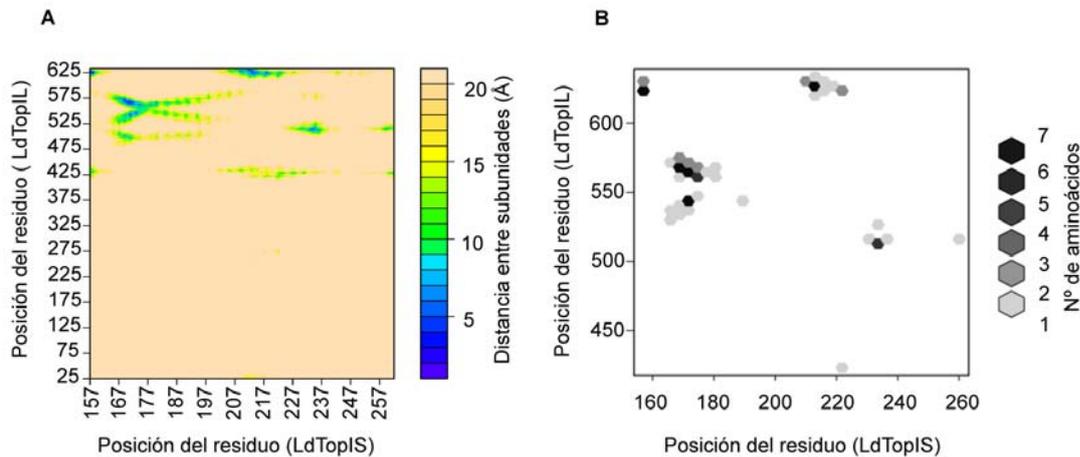


Figura 4.10. Gráficas de distancia entre los residuos de LdTopIL y LdTopIS obtenidos a partir de análisis de los mapas de contacto intramolecular a partir de la estructura 3D modelada. En el panel derecho se representa la distancia entre los residuos 25-625 de la LdTopIL y 157-257 de la LdTopIS. El panel izquierdo muestra los residuos entre ambas subunidades que se encuentran a una distancia menor de 5Å.

A partir de esta aproximación se vio que las posibles regiones de interacción incluían los aminoácidos 525 al 580 de la subunidad grande, ricos en residuos lisina, y los aminoácidos 168 al 185 de la subunidad pequeña. Una vez identificadas estas regiones, se realizaron análisis de pBLAST para encontrar motivos con homología estructural y funcional con otras proteínas TopIB. Estos análisis revelaron la existencia de una pequeña región altamente conservada en todos los tripanosomátidos entre los aminoácidos 174 y 182 de la LdTopIS. El alineamiento parcial de los residuos entre estas posiciones con las especies de *T. brucei* y *T. cruzi* mostró la presencia de un heptapéptido conservado entre prolinas con el patrón RPxxxRSF, donde “xxx” son aminoácidos básicos o neutros. Por otra parte, la región C-terminal de la LdTopIL fue analizada con la base de datos PROSITE que permite reconocer regiones con una función determinada basándose en patrones y perfiles asociados. Este análisis informático identificó una zona con alto

potencial de interacción proteína-proteína entre los residuos 561 al 592, lo que refuerza los resultados obtenidos a partir del modelo 3D.

4.3.2. Análisis mutacional de residuos conservados en el heptapéptido

Para determinar el papel que juegan los aminoácidos conservados en el heptapéptido (Fig. 4.11.A) tanto en la actividad de la enzima como en la sensibilidad a CPT, se sustituyeron por alanina mediante mutagénesis dirigida los residuos Arg-175 (mutación LdTopIL/S^{R175A}) y Arg-180 (LdTopIL/S^{R180A}), eliminando así sus cargas positivas. Además, se mutó también la Ser-181 (mutación LdTopIL/S^{S181A}), lo que eliminó la capacidad de este residuo para establecer puentes de hidrógeno con otros aminoácidos (Fig. 4.11.B).

| A | Alineamiento parcial | Nº de entrada | Organismo |
|----------|---|------------------------|--------------------|
| | 171-LVPP RP PVV RS FP-183 | LdBPK.040070.1 | <i>L. donovani</i> |
| | 182-GKPP RP KFL RS FP-194 | Tb09.160.5070 | <i>T. brucei</i> |
| | 181-GPPP RP PIV RS FP-193 | Tc00.1047053506625.110 | <i>T. cruzi</i> |

| B | Mutación puntual | Nombre de la subunidad | Enzima |
|----------|------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| | 171-LVPPRPPVRS-181 | LdTopIS | LdTopIB (wt) |
| | 171-LVPP A PPVRS-181 | LdTopIS ^{R175A} | LdTopIL/S ^{R175A} |
| | 171-LVPPRPPV A S-181 | LdTopIS ^{R180A} | LdTopIL/S ^{R180A} |
| | 171-LVPPRPPVVR A -181 | LdTopIS ^{S181A} | LdTopIL/S ^{S181A} |

Figura 4.11. Esquema que muestra la conservación filogenética de la región (A) y construcciones planeadas (B) en la enzima de *Leishmania*. (A) Alineamiento parcial del heptapéptido con sus regiones homólogas en los tritryps (tripanosomas africanos y americanos). (B) Mutaciones puntuales llevadas a cabo en el heptapéptido localizado dentro de la LdTopS.

Las mutaciones puntuales se realizaron sobre el vector pSK que incluía el ORF de la LdTopI_S y fueron subclonadas en el vector pESC-URA que contenía el gen *LdTopI_L* intacto. Las construcciones resultante fueron transformadas en la cepa de *S. cerevisiae* EKY3, donde fueron sobreexpresadas y posteriormente purificadas. Una vez obtenidas la proteínas recombinantes, se estudió su capacidad para relajar ADN superenrollado (Fig. 4.12.A).

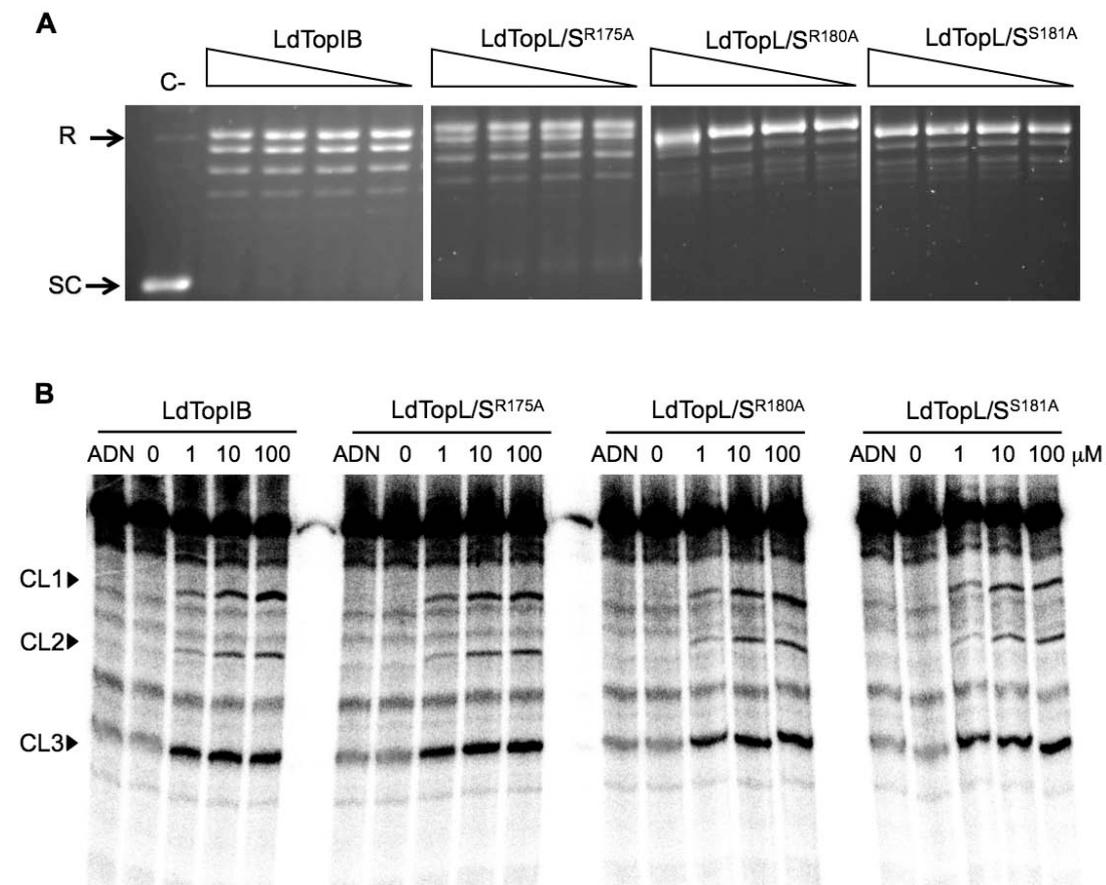


Figura 4.12. Estudio de la actividad y sensibilidad de las mutaciones puntuales de la región conservada. (A) Diluciones seriadas de las enzimas mutantes LdTopI_B en el ensayo de relajación de ADN plasmídico (0,5 μg de pSK) durante 30 min a 37 °. R: ADN relajado; SC: ADN superenrollado. (B) Equilibrio de escisión/religación con un sustrato de 202 pb en presencia de diferentes concentraciones de CPT. Al menos 100 unidades de LdTopI_B y de las enzimas mutantes fueron incubadas con 100.000 cpm del fragmento marcado [³²P] a una concentración final de 150 mM KCl.

La Fig. 4.12.A que muestra las tres mutaciones puntuales fueron capaces de relajar totalmente el ADN plasmídico superenrollado (vector pSK) de forma idéntica a la enzima salvaje. Al no apreciarse diferencias, parece lógico pensar que estos residuos no son indispensables para la actividad de relajación del ADN mediada por LdTopIB.

Para comprobar si estas mutaciones presentaban una sensibilidad a CPT alterada con respecto a LdTopIB se realizaron ensayos de equilibrio escisión/religación. Tal y como se observa en la Fig. 4.12.B, la CPT fue capaz de estabilizar los complejos covalentes de CL establecidos entre las formas mutadas de la LdTopIB y el fragmento de 202 pb del pSK marcado radiactivamente en su extremo 3'. Todas las mutaciones presentaron el mismo patrón de estabilización de complejos, siendo además envenenadas por la CPT dentro del mismo rango de concentraciones. Con estos experimentos, parece que ninguna de las sustituciones realizadas sobre el heptapéptido contribuye de forma visible a inhibir o prevenir la actividad de relajación de la LdTopIB.

4.3.3. Eliminación de los motivos RPPVV y RS de la LdTopIS

Con el objetivo de averiguar el posible papel funcional de este motivo conservado, y ante el poco éxito obtenido con las mutaciones puntuales, se decidió eliminar bloques completos que comprendidos dentro de esta región. Para ello se generaron dos deleciones internas que eliminaron el pentapéptido RPPVV (delección LdTopIL/S^{ARPPVV}) y el dipéptido RS (delección LdTopIL/S^{ARS}), respectivamente (Fig. 4.13.A).

Los resultados mostraron que la delección LdTopIL/S^{ARS} poseía una actividad enzimática similar a la enzima salvaje, mientras que la eliminación del pentapéptido RPPVV de la subunidad pequeña dio lugar a una enzima recombinante truncada sin capacidad de relajación (Fig. 4.13.B). Con los datos obtenidos hasta este momento no se pudo establecer la respuesta a este comportamiento, pudiendo ser debido bien a la incapacidad de la enzima para cortar el ADN o a un problema en el proceso de religación.

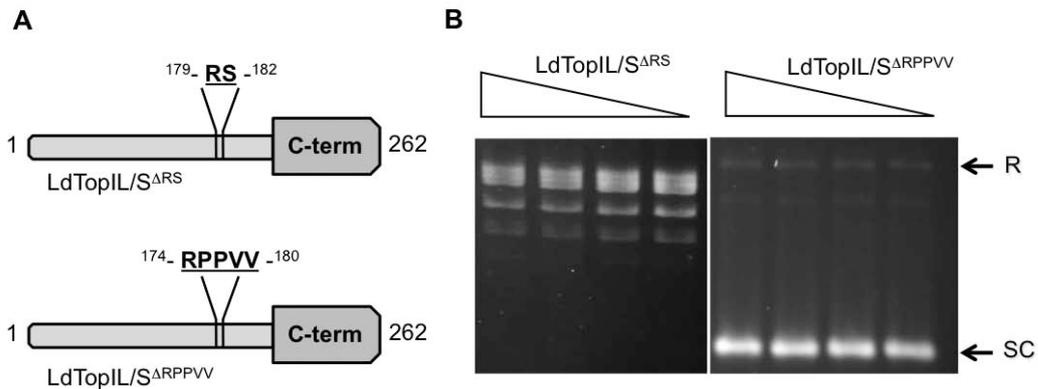


Figura 4.13. Estudio de la actividad de relajación de las deleciones internas de la región conservada. (A) Representación lineal de las deleciones RS y RPPVV realizadas en la LdTopS. (B) Actividad de relajación de las deleciones internas. Gel de agarosa mostrando las diluciones seriadas de las enzimas truncadas LdTopIB en el ensayo de relajación de ADN plasmídico (0,5 μ g de pSK) durante 30 min a 37 °. R: ADN relajado; SC: ADN superenrollado.

El siguiente paso fue determinar de qué forma se veía afectada la capacidad de las enzimas truncadas para eliminar los superenrollamientos negativos del ADN pSK tanto en presencia como en ausencia de CPT. Al realizar el ensayo de actividad de la deleción LdTopIL/S Δ RS en presencia de un plásmido circular se obtuvo un resultado inesperado, la enzima era capaz de relajar el ADN pero necesitó al menos 2 min para relajarlo completamente (Fig. 4.14.A), mientras que la enzima salvaje no requirió más de 0,1 min tal y como vimos en el apartado 4.2.2. de la presente memoria. Además, la CPT afectó de manera clara la actividad de relajación de la enzima truncada, prolongando el tiempo de relajación otros 4 minutos adicionales, por lo que el tiempo total para relajar 0,5 μ g de pSK en presencia de CPT fue de 8 min (Fig. 4.14.B). En cuanto a la formación del ADN mellado, la deleción LdTopIL/S Δ RS presenta también diferencias notables con respecto al tipo salvaje. Mientras que la LdTopIB alcanzó el pico máximo de estabilización de complejos de CL en torno a los 4-8 min, los complejos generados por la LdTopIL/S Δ RS en presencia del plásmido circular registraron el valor más elevado al cabo de 1 min de reacción, disminuyendo lentamente a partir de entonces (Fig. 4.14.C). Es importante señalar que al resolver los productos de la reacción de relajación en el gel de agarosa (Fig. 4.14.A), se observó la presencia

simultánea en el mismo carril de las formas relajada y superenrollada del ADN. Este hecho puede tener su explicación en una posible desestabilización del dominio *linker* involucrado en la rotación controlada de cadena del ADN. Las causas probables de este fenómeno son dos: i) el paso de rotación está acelerado y por lo tanto la enzima es capaz de procesar múltiples superenrollamientos en cada ciclo de escisión/religación ó ii) la enzima está cortando y religando inmediatamente el producto sin que se produzca relajación del ADN.

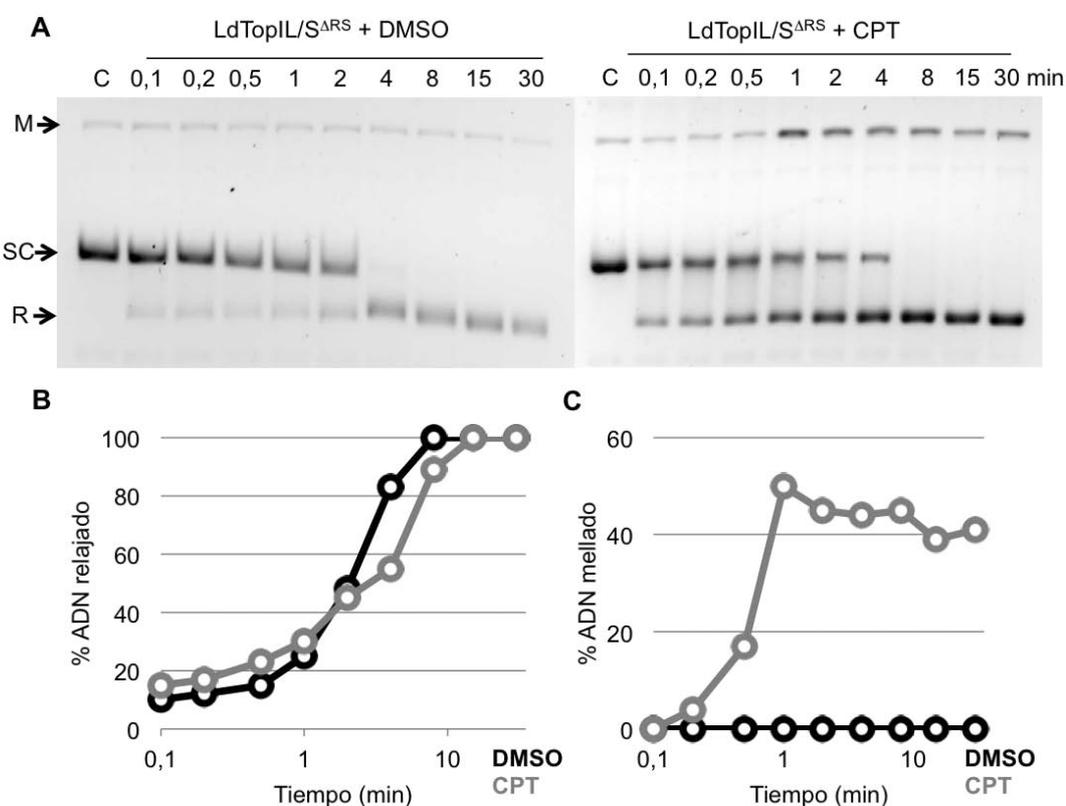


Figura 4.14. (A) Estudio de actividad de la relajación de la delección LdTopIL/S^{ΔRS} en función del tiempo en ausencia (izquierda) y en presencia de CPT 75 μM (derecha). M: ADN mellado; SC: ADN superenrollado; R: ADN relajado. (B) Representación gráfica del porcentaje de ADN relajado en función del tiempo. (C) Representación gráfica del porcentaje de ADN mellado en función del tiempo.

Cuando se realizó el estudio de la capacidad de relajación en función del tiempo de la mutación LdTopIL/S^{ΔRPPVV}, tal y como era de esperar no mostró capacidad para relajar el ADN (Fig. 4.15.A). Este hecho nos indica que la conformación de la enzima puede haberse visto alterada por la eliminación del pentapéptido. Esto indica que la capacidad de corte está abolida, ya que tal y como

muestra el panel izquierdo de la Fig. 4.15.A no existe un aumento de la banda de mellado, no pudiendo intercalarse la CPT en el hipotético complejo covalente LdTopIL/S^{ΔRPPVV}-ADN.

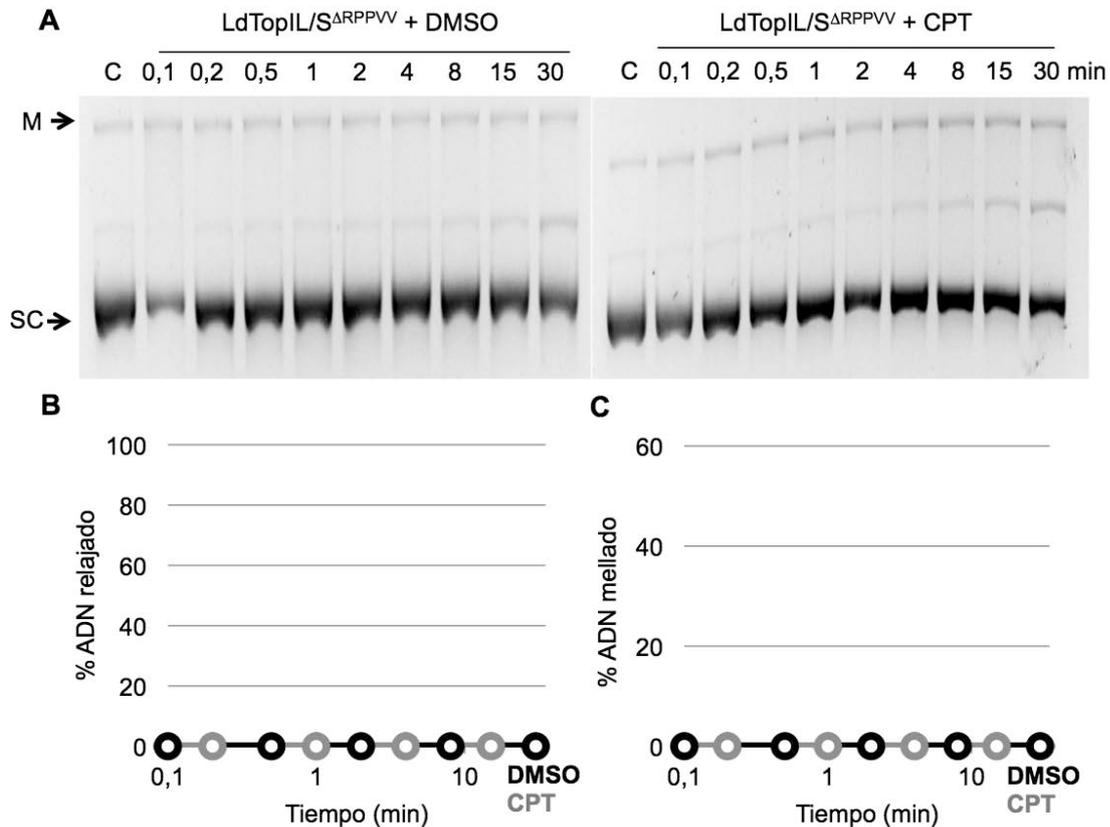


Figura 4.15. (A) Estudio de la actividad de relajación de la truncación interna LdTopIL/S^{ΔRPPVV} en función del tiempo en ausencia (izquierda) y en presencia de CPT 75 μM (derecha). M: ADN mellado; SC: ADN superenrollado; R: ADN relajado. (B) Representación gráfica del porcentaje de ADN relajado en función del tiempo. (C) Representación gráfica del porcentaje de ADN mellado en función del tiempo.

Con el fin de estudiar la sensibilidad de las proteínas truncadas a concentraciones variables de CPT, así como para confirmar que la acción de la droga se produce mecanismo de envenenamiento que estabiliza los complejos de escisión, se llevó a cabo el ensayo de equilibrio escisión/religación en presencia de ambos mutantes en comparación con el tipo salvaje. La autorradiografía del gel

correspondiente a la truncación LdTopIL/S^{ARPPVV} (Fig. 4.16) muestra que no se produjo la estabilización de ningún complejo CL, confirmando por lo tanto que esta enzima es insensible a la CPT debido a que no se produce un corte efectivo del ADN. De forma contraria, la construcción LdTopIL/S^{ARS} mostró un patrón de estabilización de complejos de CL similar a la enzima salvaje. Sin embargo, se necesitaron concentraciones 10 veces mayores para que la bandas fueran apreciables, probablemente por una reducción en la afinidad de la CPT hacía el complejo covalente LdTopIL/S^{ARS}-ADN. Además, la banda correspondiente a CL2 fue únicamente perceptible y muy tenuemente a una concentración de 100 μ M, lo que indica, bien una disminución en la preferencia de LdTopIL/S^{ARS} hacia este sitio de corte en la secuencia o bien una menor afinidad de la CPT por el este lugar de CL.

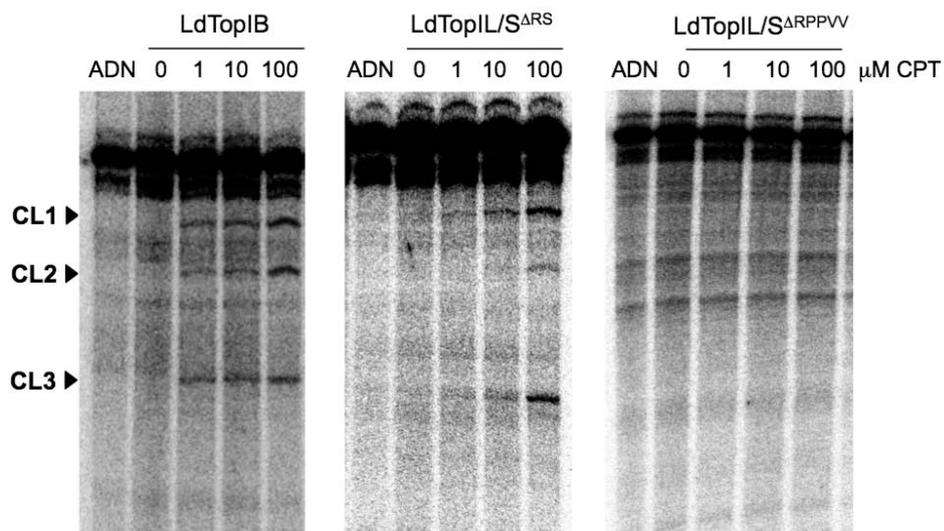


Figura 4.16. Equilibrio escisión/religación con un sustrato de ADN de 202 pb en presencia de diferentes concentraciones de CPT. Los mutantes LdTopIL/S^{ARS} (panel central) y LdTopIL/S^{ARPPVV} (panel derecho) fueron incubados con 100.000 cpm de un fragmento de pSK marcado radiactivamente en su extremo 3' con una concentración final de 150 mM KCl. El gel desnaturizante muestra la ausencia o presencia de estabilización de los complejos de escisión estabilizados (CL1, CL2 y CL3) por las formas mutantes de la LdTopIB en comparación al tipo salvaje.

4.3.4. Estructura mínima activa y sensible a CPT de la LdTopIS

En trabajos previos de nuestro grupo de investigación se demostró que los aminoácidos anteriores a la Pro-169 dentro de la subunidad pequeña no son necesarios para que la LdTopIB relaje completamente el ADN superenrollado. Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió evaluar la actividad de relajación y la sensibilidad a CPT de las tres delecciones lineales esquematizadas en la Fig. 4.17.: LdTopIL/S^{169end} (que incluye el heptapéptido conservado), LdTopIL/S^{175end} (que comienza en el motivo RPPVV) y LdTopIL/S^{180end} (que no incluye ya ningún residuo del motivo conservado), utilizando para ello una aproximación mecanicista.

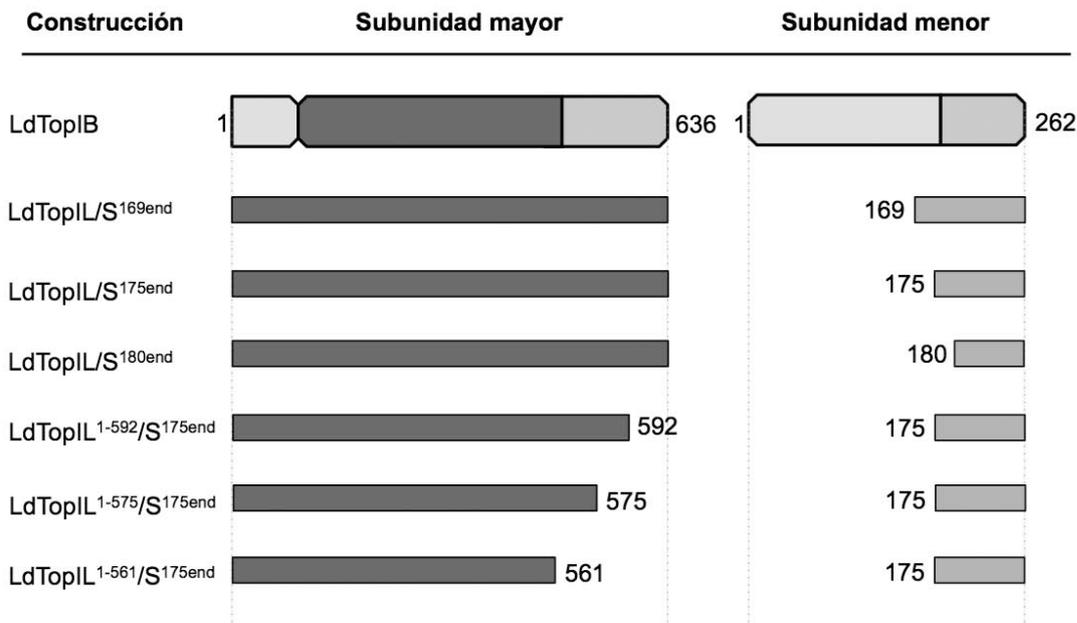


Figura 4.17. Representación esquemática de las diferentes construcciones creadas para determinar la estructura mínima con capacidad de relajación y sensibilidad a CPT.

Tal y como se ha indicado, los primeros 169 aminoácidos de la LdTopIS no parecen ser necesarios para la actividad de relajación del ADN. Este hecho se vio confirmado cuando se comparó la cinética de relajación de la delección LdTopIL/S^{169end} con respecto al tipo salvaje en ausencia de CPT (Fig. 4.18.A panel izquierdo).

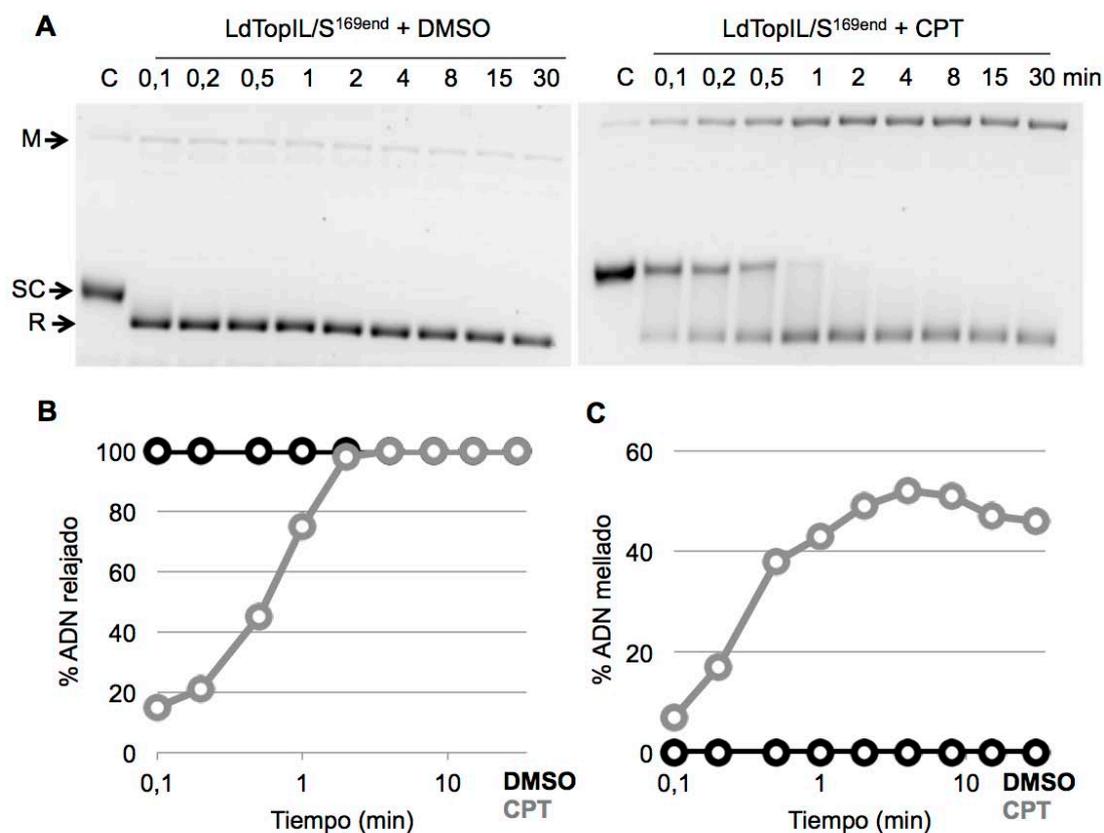


Figura 4.18. (A) Estudio de actividad de la relajación de la truncación LdTopIL/S^{169end} en función del tiempo en ausencia (izquierda) y en presencia de CPT 75 μ M (derecha). M: ADN mellado; SC: ADN superenrollado; R: ADN relajado. (B) Representación gráfica del porcentaje de ADN relajado en función del tiempo. (C) Representación gráfica del porcentaje de ADN mellado en función del tiempo.

Al igual que la enzima salvaje, la delección LdTopIL/S^{169end} fue capaz de relajar 0,5 μ g de ADN pSK en 0,1 min. Sin embargo, cuando se realizó el mismo experimento en presencia de CPT 75 μ M, la actividad de la enzima LdTopIL/S^{169end} fue inhibida durante 1-2 min (Figura 4.18.B), aproximadamente la mitad del tiempo que necesitó LdTopIB (4 min). Esto significa que la enzima a pesar de poseer una actividad de relajación completamente funcional, presenta una sensibilidad disminuida a CPT.

Seguidamente se evaluó la construcción LdTopIL/S^{175end} utilizando la misma metodología que en los casos anteriores, y tal como se esperaba, esta forma

truncada fue capaz de relajar el ADN superenrollado en 0,1 min en ausencia de CPT (Fig. 4.19. A y B. Sin embargo, la adición del inhibidor únicamente fue capaz de retrasar la relajación apenas 0,5 min (Fig. 4.19.A), aproximadamente 8 veces menos que la enzima salvaje. Además, la intensidad máxima de ADN mellado se alcanzó entre 0,5-1 min, mientras que la enzima nativa necesitó de 4 min para observar una intensidad similar (Fig. 4.19.C).

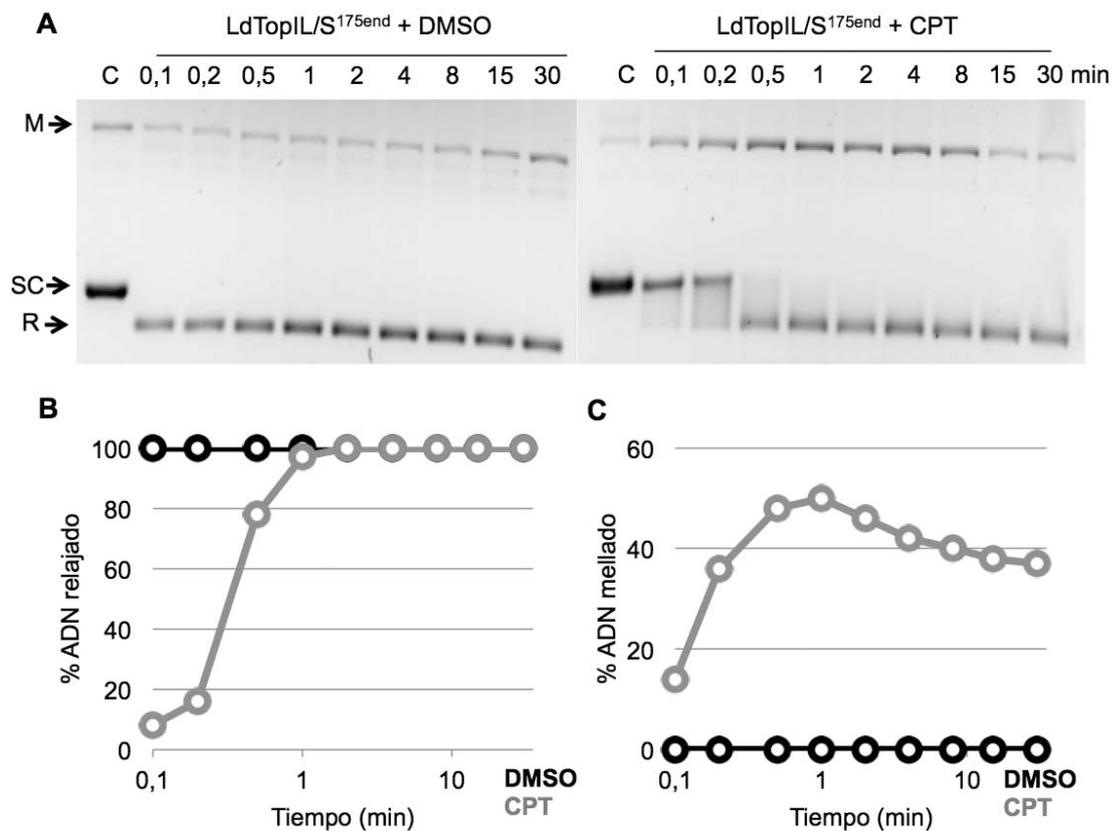


Figura 4.19. (A) Estudio de actividad de la relajación de la delección LdTopIL/S^{175end} en función del tiempo en ausencia (izquierda) y en presencia de CPT 75 μ M (derecha). M: ADN mellado; SC: ADN superenrollado; R: ADN relajado. (B) Representación gráfica del porcentaje de ADN relajado en función del tiempo. (C) Representación gráfica del porcentaje de ADN mellado en función del tiempo.

Finalmente, para confirmar estos resultados se desarrolló una construcción desprovista de los primeros 179 aminoácidos de la LdTopIS. La truncación obtenida LdTopIL/S^{180end} carecía del motivo RPPVV, que ya se había observado indispensable en los estudios previos. Cuando se realizaron los estudios cinéticos

de relajación se observó que la enzima era capaz de relajar el ADN superenrollado inmediatamente, tanto en ausencia como en presencia de CPT (Fig. 4.20. A y B). Además tal y como se observa en la Fig. 4.20.C, la CPT únicamente pudo estabilizar en torno a un 5% de complejos CL, mientras que en las mismas condiciones la LdTopIB alcanzó valores cercanos al 60%. La única diferencia de esta enzima con la LdTopIL/S^{175end} es la ausencia del motivo RPPVV, por lo que todo apunta a que este pentapéptido es esencial para que la enzima sea sensible a CPT.

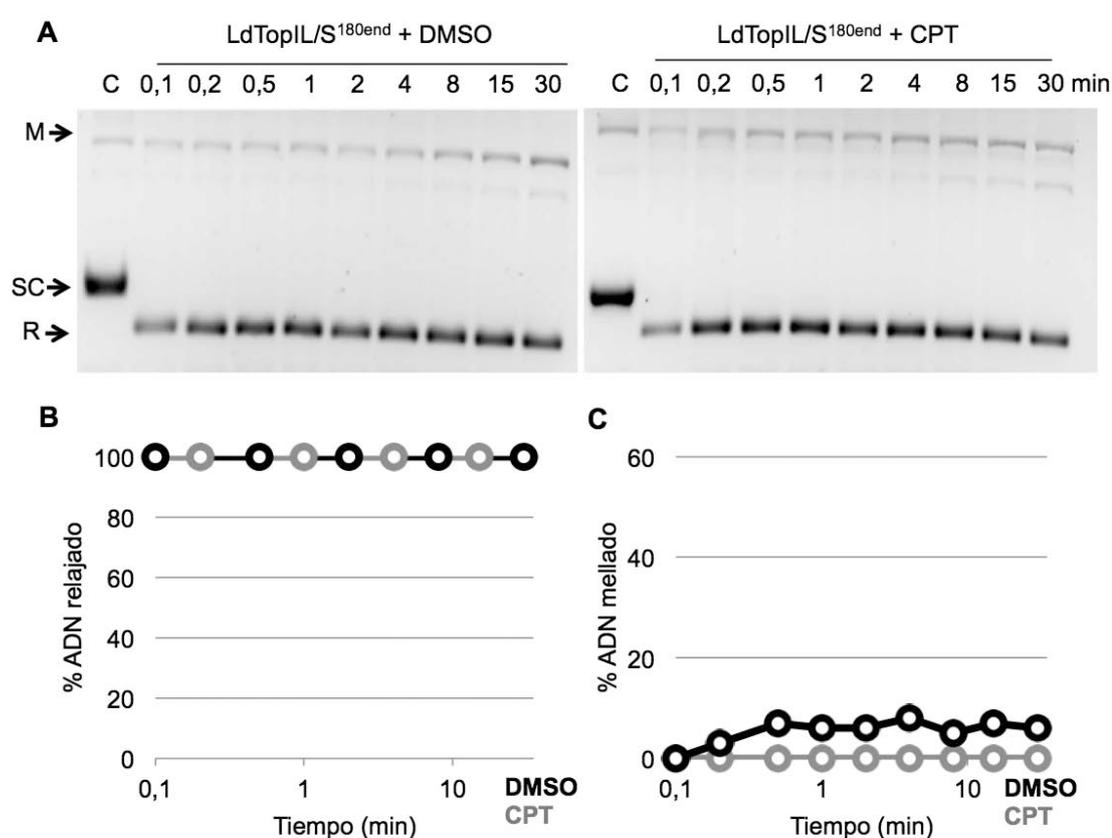


Figura 4.20. (A) Estudio de actividad de la relajación de la truncación LdTopIL/S^{180end} en función del tiempo en ausencia (izquierda) y en presencia de CPT 75 μ M (derecha). M: ADN mellado; SC: ADN superenrollado; R: ADN relajado. (B) Representación gráfica del porcentaje de ADN relajado en función del tiempo. (C) Representación gráfica del porcentaje de ADN mellado en función del tiempo.

Una vez estudiadas tanto la actividad de relajación como la inhibición de la misma por CPT, se llevaron a cabo estudios de equilibrio escisión/religación para

comprobar la estabilización de los complejos enzima-ADN generados por estas truncaciones lineales en presencia de concentraciones crecientes de CPT (Fig. 4.21). Los resultados de la truncación LdTopIL/S^{169end} mostraron algunas diferencias con la LdTopIB. A diferencia de la proteína salvaje, esta enzima no fue capaz de estabilizar el CL3 con concentraciones de CPT inferiores a 10 μ M. Este hecho es importante, ya que indica que aunque los primeros 168 aminoácidos de la subunidad pequeña no son esenciales para la actividad de relajación, sí podrían estar involucrados en la estabilización de ambas subunidades para la conformación del heterodímero. En el caso de la LdTopIL/S^{175end} se obtuvieron resultados similares a los observados en los experimentos de relajación; la estabilización de los complejos enzima-ADN por la acción de la CPT se produjo únicamente a la concentración más elevada. Esta alteración en la sensibilidad a la CPT puede deberse a una menor afinidad de la droga por los complejos LdTopIL/S^{175end}-ADN, ya que si se hubiese producido un cambio de los sitios preferentes de corte, no se hubiese encontrado el patrón de estabilización CL1-CL2-CL3 a ninguna de las concentraciones ensayadas.

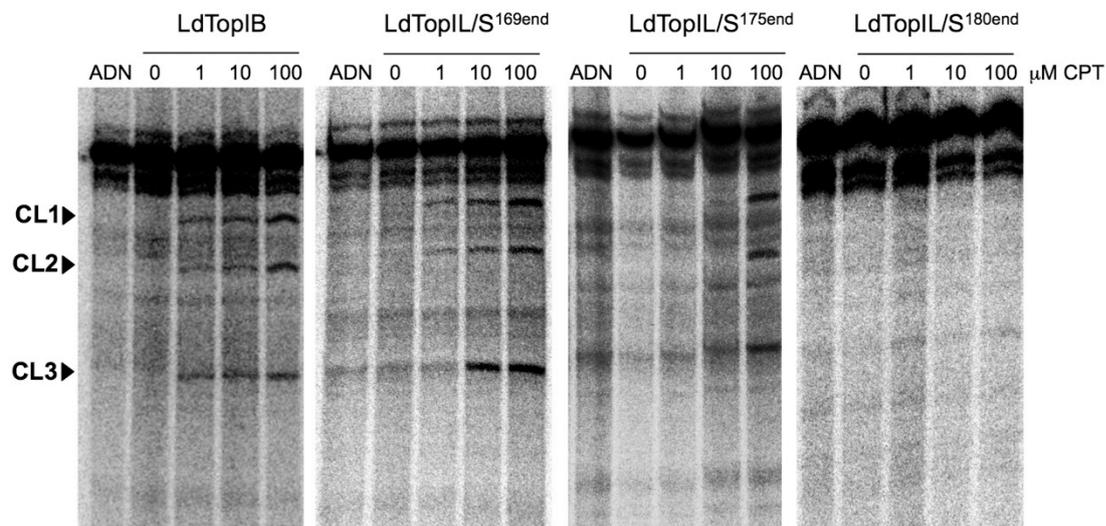


Figura 4.21. Equilibrio escisión/religación con un sustrato de ADN en presencia de diferentes concentraciones de CPT. Las enzimas truncadas fueron incubadas con 100.000 cpm de un fragmento de pSK marcado radiactivamente en su extremo 3' con una concentración final de 150 mM KCl. El gel desnaturante muestra la ausencia o presencia de estabilización de los complejos de escisión (CL1, CL2 y CL3) por las formas truncadas de la LdTopIB en comparación al tipo salvaje.

Finalmente, tal y como se observa en el panel derecho de la Fig. 4.21, los complejos generados por la delección LdTopIL/S^{180end} no fueron estabilizados por la CPT a ninguna de las concentraciones estudiadas.

4.3.5. Estructura mínima activa y sensible a CPT de la LdTopIL

Una vez determinada la estructura mínima de la LdTopIS activa y sensible a CPT, se realizó un estudio delecional de la subunidad grande buscando la secuencia más pequeña capaz de interactuar con la delección lineal LdTopIS^{175end} manteniendo sensibilidad a CPT. Para ello, se crearon tres construcciones doblemente truncadas cubriendo diferentes extensiones del extremo C-terminal no conservado, teniendo como base de criterio la predicción de la estructura 3D realizada para el presente trabajo. Las construcciones generadas fueron: LdTopIL^{1-561/S^{175end}}, LdTopIL^{1-575/S^{175end}} y LdTopIL^{1-592/S^{175end}}, respectivamente (esquemáticas en la Fig. 4.17).

La Fig. 4.22. muestra los resultados obtenidos para la doble truncación LdTopIL^{1-561/S^{175end}}. Esta enzima presentó una actividad catalítica muy escasa, siendo incapaz de relajar el ADN superenrollado con normalidad (Fig. 4.22.A). El porcentaje máximo de ADN relajado se obtuvo a los 30 min de incubación, no superando el 25 % en ninguno de los experimentos llevados a cabo con esta proteína. La CPT tuvo un efecto residual sobre la capacidad de relajación de la LdTopIL^{1-561/S^{175end}}, reduciendo el porcentaje máximo de ADN relajado en 30 min al 17 % (Fig. 4.22.B). El efecto de la CPT fue tan débil que no se pudo observar un incremento en la banda de ADN mellado, aunque a los 2 min de reacción, tal y como muestra el gráfico C de la Fig. 4.22 se observó un leve incremento del 8 %, lo que indicaría la existencia de complejos de escisión estabilizados. Esta estabilización tuvo un carácter transitorio y una vida media de residencia de los complejos de justo unos pocos minutos.

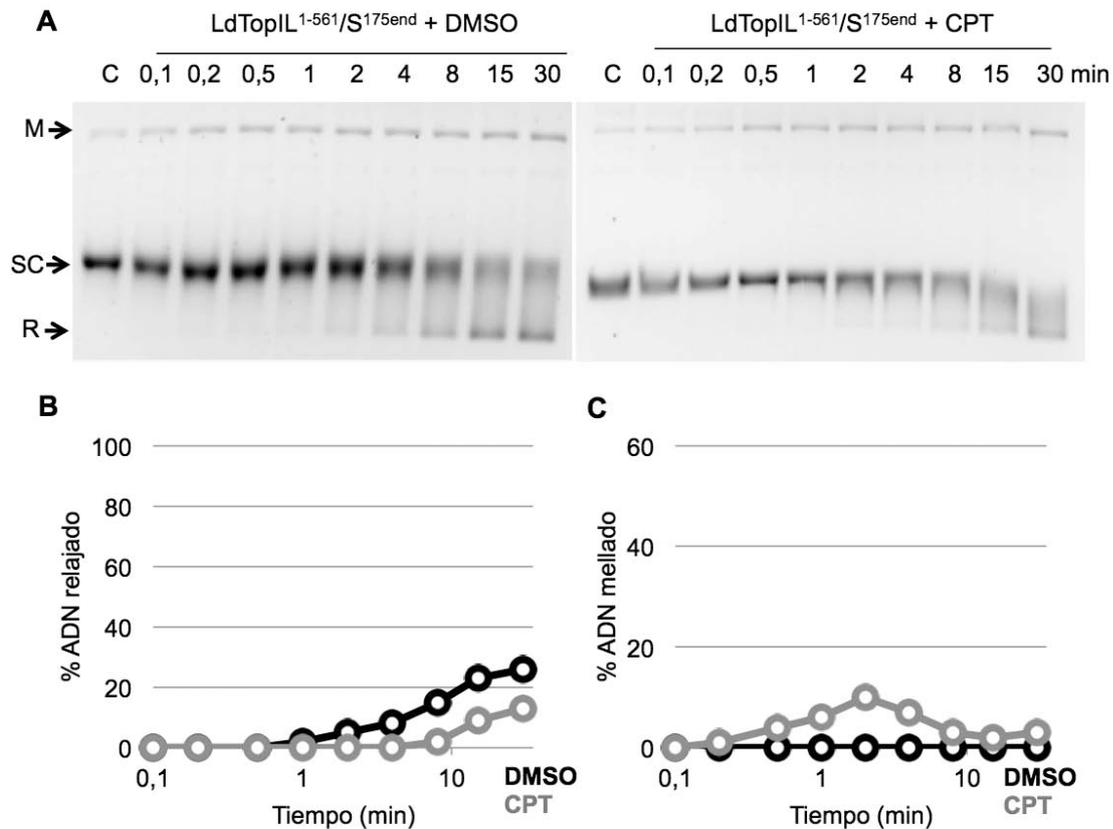


Figura 4.22. (A) Estudio de actividad de la relajación de la truncación LdTopIL¹⁻⁵⁶¹/S^{175end} en función del tiempo en ausencia (izquierda) y en presencia de CPT 75 μ M (derecha). M: ADN mellado; SC: ADN superenrollado; R: ADN relajado. (B) Representación gráfica del porcentaje de ADN relajado en función del tiempo. (C) Representación gráfica del porcentaje de ADN mellado en función del tiempo.

La siguiente construcción en ser analizada fue la LdTopIL¹⁻⁵⁷⁵/S^{175end}. El análisis electroforético de los productos de reacción reveló que la presencia de los 14 aminoácidos comprendidos entre los residuos 562 y 575 en la subunidad grande supone un incremento importante de la capacidad de relajación de esta enzima con respecto a la LdTopIL¹⁻⁵⁶¹/S^{175end} (Fig. 4.23.A), ya que al cabo de 30 min de incubación se alcanzaron porcentajes de ADN relajado cercanos al 100 %. Además, tal y como muestra el gráfico B, la enzima -con una actividad de relajación alterada- fue claramente afectada por la presencia de CPT, aunque, al igual que en el caso de la truncación LdTopIL¹⁻⁵⁶¹/S^{175end}, la formación de complejos CL fue muy baja y apenas pudo mellar el ADN (Fig. 4.23.C).

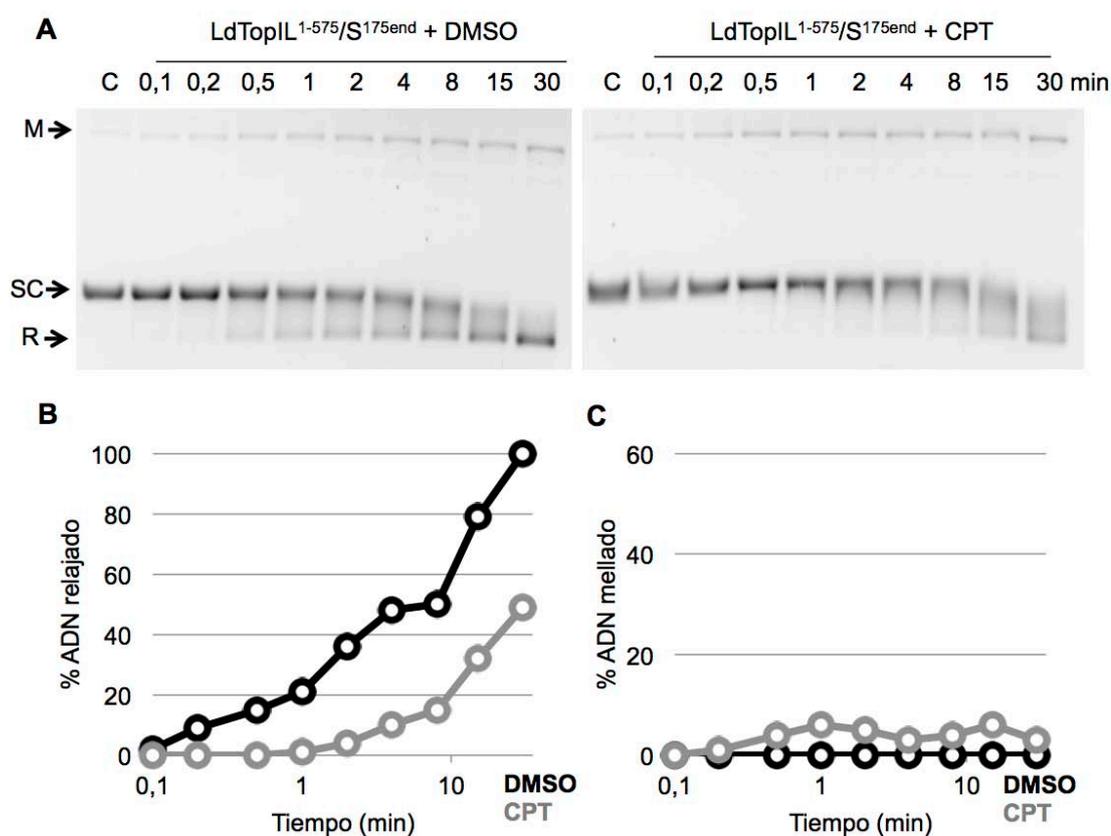


Figura 4.23. (A) Estudio de actividad de la relajación de la truncación LdTopIL¹⁻⁵⁷⁵/S^{175end} en función del tiempo en ausencia (izquierda) y en presencia de CPT 75 μ M (derecha). M: ADN mellado; SC: ADN superenrollado; R: ADN relajado. (B) Representación gráfica del porcentaje de ADN relajado en función del tiempo. (C) Representación gráfica del porcentaje de ADN mellado en función del tiempo.

Por último se creó una construcción que abarcaba desde la Met inicial al residuo 592 de la subunidad grande. Al igual que en los casos anteriores, el inserto resultante se ligó en el vector pESC-URA que contenía la modificación LdTopIS^{175end} de la subunidad pequeña. La Fig. 4.24.A muestra como en ausencia de CPT la enzima LdTopIL¹⁻⁵⁹²/S^{175end} es capaz de relajar completamente el ADN en torno a los 4 min de incubación, de forma muy similar a lo ya observado para la construcción LdTopIL/S^{ARS}. Además, esta truncación mostró ser sensible a la CPT, alcanzando el mayor porcentaje de complejos de CL en torno a los 8 min. Éste fue similar al obtenido para la enzima salvaje con valores en torno al 57 % del ADN total (Fig. 4.24.C).

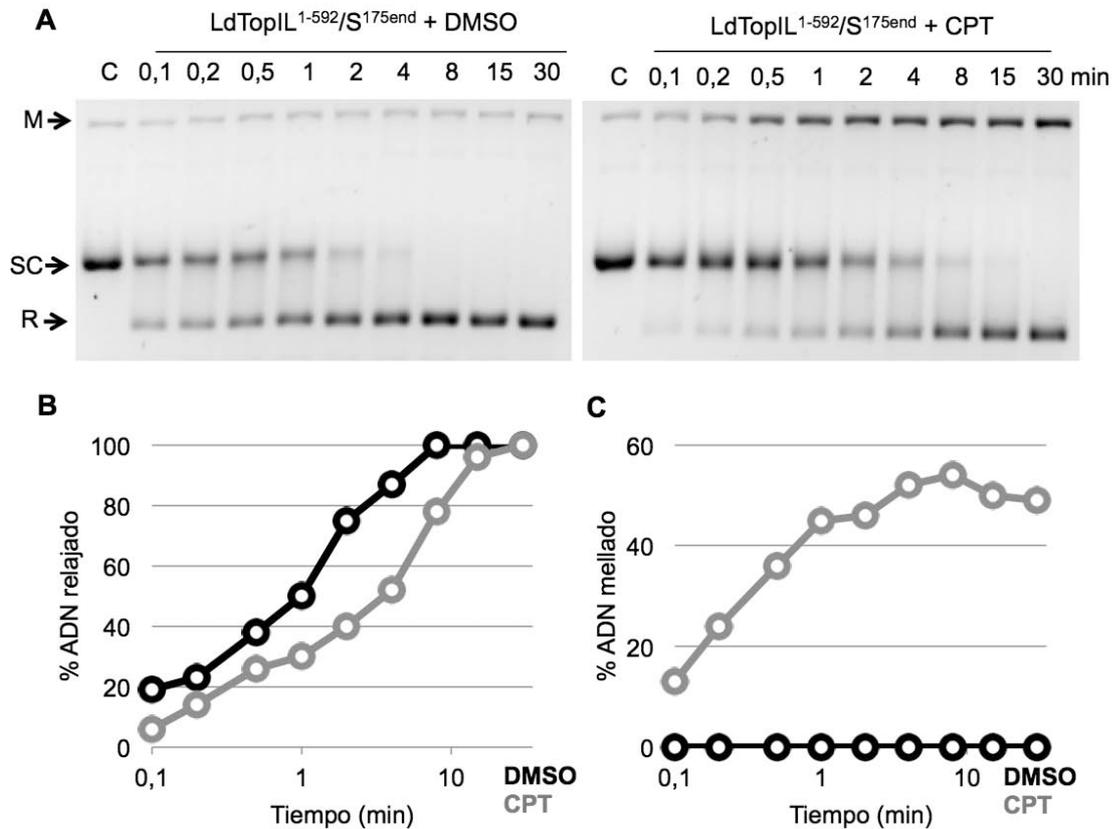


Figura 4.24. (A) Estudio de actividad de la relajación de la truncación LdTopIL¹⁻⁵⁹²/S^{175end} en función del tiempo en ausencia (izquierda) y en presencia de CPT 75 μ M (derecha). M: ADN mellado; SC: ADN superenrollado; R: ADN relajado. (B) Representación gráfica del porcentaje de ADN relajado en función del tiempo. (C) Representación gráfica del porcentaje de ADN mellado en función del tiempo.

Finalmente, se estudió la afinidad de la CPT por los complejos TopIB-ADN generados por estas enzimas. Los gels de secuenciación de la Fig. 4.25 muestran como únicamente la construcción LdTopIL¹⁻⁵⁹²/S^{175end} fue capaz de generar complejos de escisión que pudieron ser estabilizados por la acción de la CPT. Además, las bandas de CL fueron únicamente apreciables a una concentración de 100 μ M, tal y como sucedió en el caso de la delección lineal en la subunidad pequeña LdTopIL/S^{175end} sin cambiar la estructura de la grande.

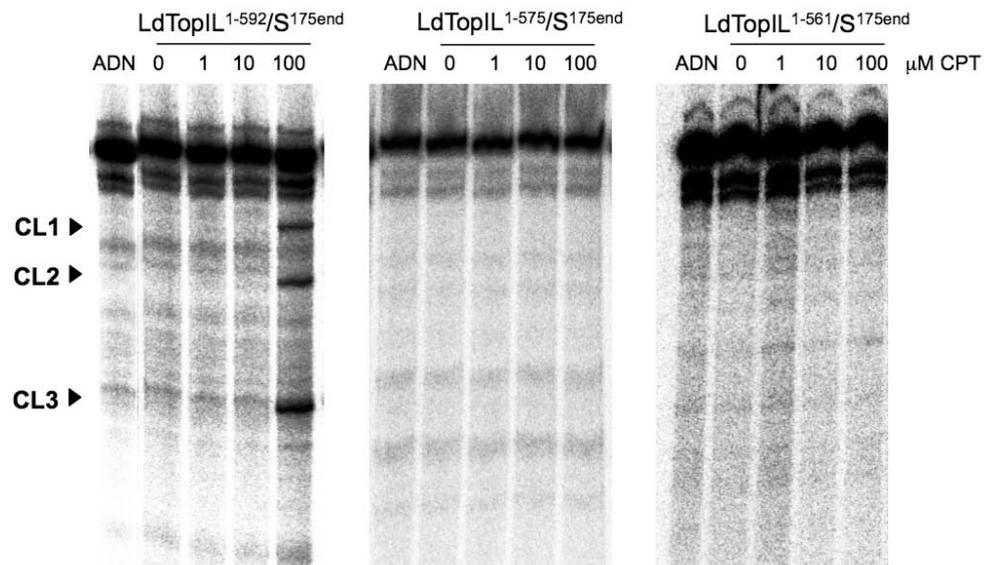


Figura 4.25. Equilibrio escisión/religación con un sustrato de ADN en presencia de diferentes concentraciones de CPT. Las enzimas truncadas fueron incubadas con 100.000 cpm de un fragmento de pSK marcado radiactivamente en su extremo 3' en una concentración final de 150 mM KCl. El gel desnaturizante muestra la ausencia o presencia de estabilización de los CL (CL1, CL2 y CL3) por las formas truncadas de la LdTopIB.

Todos estos resultados experimentales concuerdan con las predicciones obtenidas del análisis 3D y nos permitieron establecer como estructura mínima funcional y sensible a CPT aquella formada por los primeros 592 aminoácidos de la subunidad grande y los residuos 175-262 de la pequeña, ya que si eliminamos el motivo RPPVV obtenemos una enzima capaz de relajar con normalidad el ADN superenrollado pero carente de sensibilidad a CPT. Identificando por lo tanto estos 5 aminoácidos como un elemento esencial enmarcado dentro un hipotético dominio *linker* en la enzima de *Leishmania*.

4.4. DETERMINACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NLS DE LA LdTopIB

Al tratarse de una enzima que desempeña su función en el interior del núcleo, se decidió buscar y analizar las posibles secuencias de NLSs de la LdTopIB responsables de su translocación citoplasma-núcleo. Debido a la escasez de estudios describiendo NLS funcionales en *Leishmania*, no es posible identificar una secuencia común responsable de transporte nuclear de proteínas en estos parásitos. En el presente trabajo la identificación de las secuencias NLS se ha realizado mediante mutaciones y deleciones de fragmentos variables de la secuencia de ambas subunidades fusionados a un vector de expresión GFP, para posteriormente valorar mediante análisis microscópico la localización subcelular de las diferentes construcciones. La lista completa de cebadores utilizados para el estudio de NLSs están detallados en las Tablas 3 y 4 de los Anexos de la presente memoria.

4.4.1. Delimitación de motivos NLS en la subunidad LdTopIL

Estudios previos de nuestro grupo de investigación han demostrado que el extremo C-terminal de la LdTopIL puede contener motivos NLS capaces de conducir la proteína al núcleo (Reguera y col., 2006). Para determinar la presencia de las posibles NLS de la LdTopIL, se expresó la subunidad completa fusionada por su extremo N-terminal al vector de expresión en *Leishmania* pXG-GFP+2. Una vez clonada esta primera quimera de fusión (TopL1) se procedió a la transfección en promastigotes de *L. donovani*. Tal y como se esperaba, los estudios microscópicos mostraron una clara localización nuclear de TopL1, no existiendo indicios de acumulación de fluorescencia verde en el citoplasma (Fig. 4.26).

Para identificar la/s secuencia/s específica/s que produce/n la translocación nuclear de la subunidad LdTopIL, se dividió la proteína en cuatro grandes fragmentos que fueron fusionados a la GFP. El primer fragmento, TopL2 (residuos 1 al 170) que incluye el dominio N-terminal -corto y sin conservación filogenética- así como los primeros 125 aminoácidos del dominio *core*. Ya que las NLSs de la hTopIB se encuentran localizadas en su dominio N-terminal, se esperaban

encontrar resultados similares para la LdTopIL. Sin embargo, cuando se analizó la expresión de TopL2, la fluorescencia estaba repartida por todo el citoplasma, y por lo tanto, se dedujo que la región carecía de NLS alguna. Las construcciones TopL3 y TopL4 abarcaron las regiones comprendidas entre los residuos 171-337 y 338-548 respectivamente. La principal característica de TopL3 es la presencia de la Arg-314, que es uno de los cinco residuos que componen el centro catalítico de la enzima. Por su parte, TopL4 representa la región más conservada de la proteína, conteniendo los otros tres aminoácidos catalíticos presentes en la LdTopIL: Lys-353, Arg-410 e His-453.

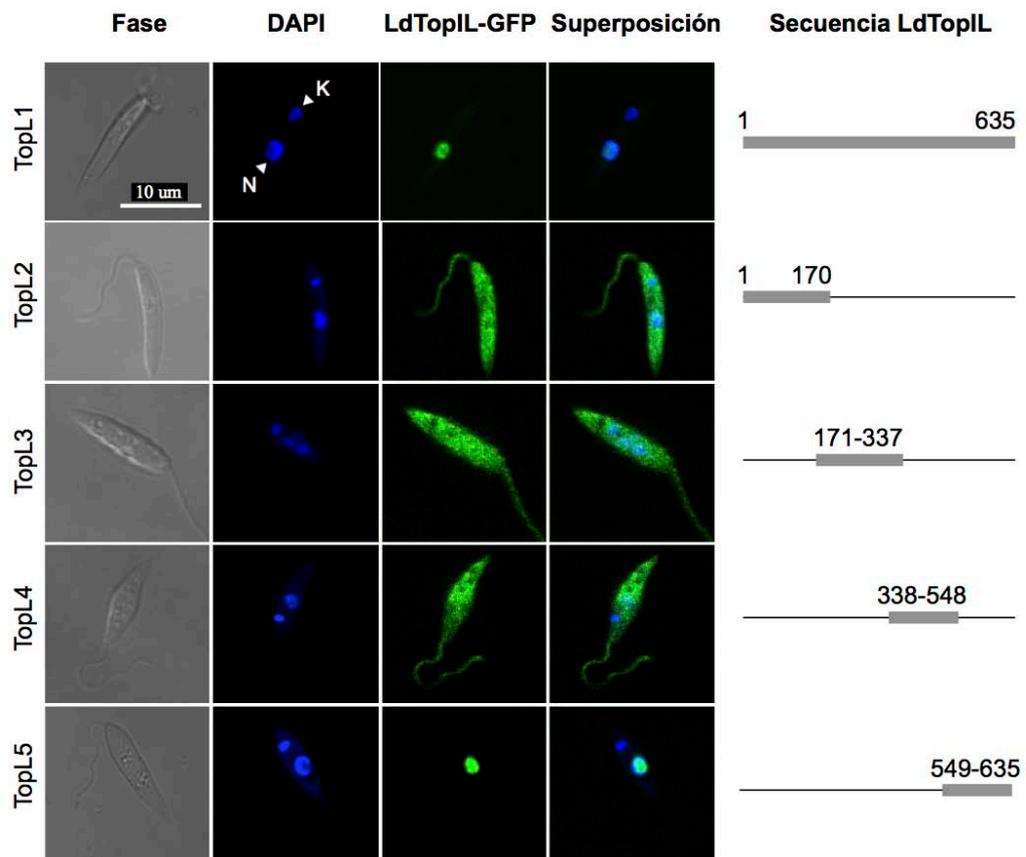


Figura 4.26. Resultado de los análisis realizados por microscopía confocal de las diferentes quimeras LdTopIL-GFP. La colocalización del núcleo (N) y kinetoplasto (K) con respecto a la LdTopIL se realizó mediante tinción del ADN con DAPI.

Tal y como se muestra en la Fig. 4.26, TopL3 y TopL4 presentaron una clara localización citoplasmática cuando se examinaron por fluorescencia directa, y por lo tanto, cualquier NLS presente en la LdTopIL debería estar localizada en su extremo C-terminal. Cuando este último fragmento fue fusionado a la GFP (TopL5), la construcción resultante se localizó de forma inequívoca en el núcleo de los promastigotes transfectados.

Una vez identificada de forma preliminar la región responsable de la translocación nuclear de la LdTopIL, se procedió a definir con mayor precisión dicha NLS mediante el estudio de las construcciones mostradas en la Fig. 4.27. El extremo C-terminal con la NLS putativa, rico en residuos básicos, fue dividido en dos regiones, TopL6 y TopL7. TopL6 fue diseñada como una elongación de la quimera TopL4, que incluye los aminoácidos 548-566 contando con ocho residuos Lys. Por otra parte, TopL7 abarca los residuos de la secuencia comprendida entre la posición 566 y el final de la proteína, incluyendo una agrupación de once Lys en el comienzo de la misma. Cuando se analizó la localización subcelular de la señal GFP, ambas quimeras mostraron una clara acumulación nuclear.

Dado que esta aproximación no permitió una delimitación precisa de la NLS, se clonaron y fusionaron a la GFP dos nuevas construcciones que denominamos TopL8 y TopL9. TopL8 se extendía desde el aminoácido 578 al 635, mientras que TopL9 comenzaba en el residuo 592 y terminaba en el final de la proteína. En la cuarta fila de la Fig. 4.27 se ve como los 43 últimos aminoácidos de la LdTopIL son dispensables para su localización nuclear, mientras que los residuos entre las posiciones 578 y 592 son suficientes para transportar al núcleo la GFP (fila 3 de la Fig. 4.27).

Hasta ese momento, se consiguió definir una región rica en aminoácidos básicos (549-592) capaz de vehicular la subunidad completa al interior del núcleo.

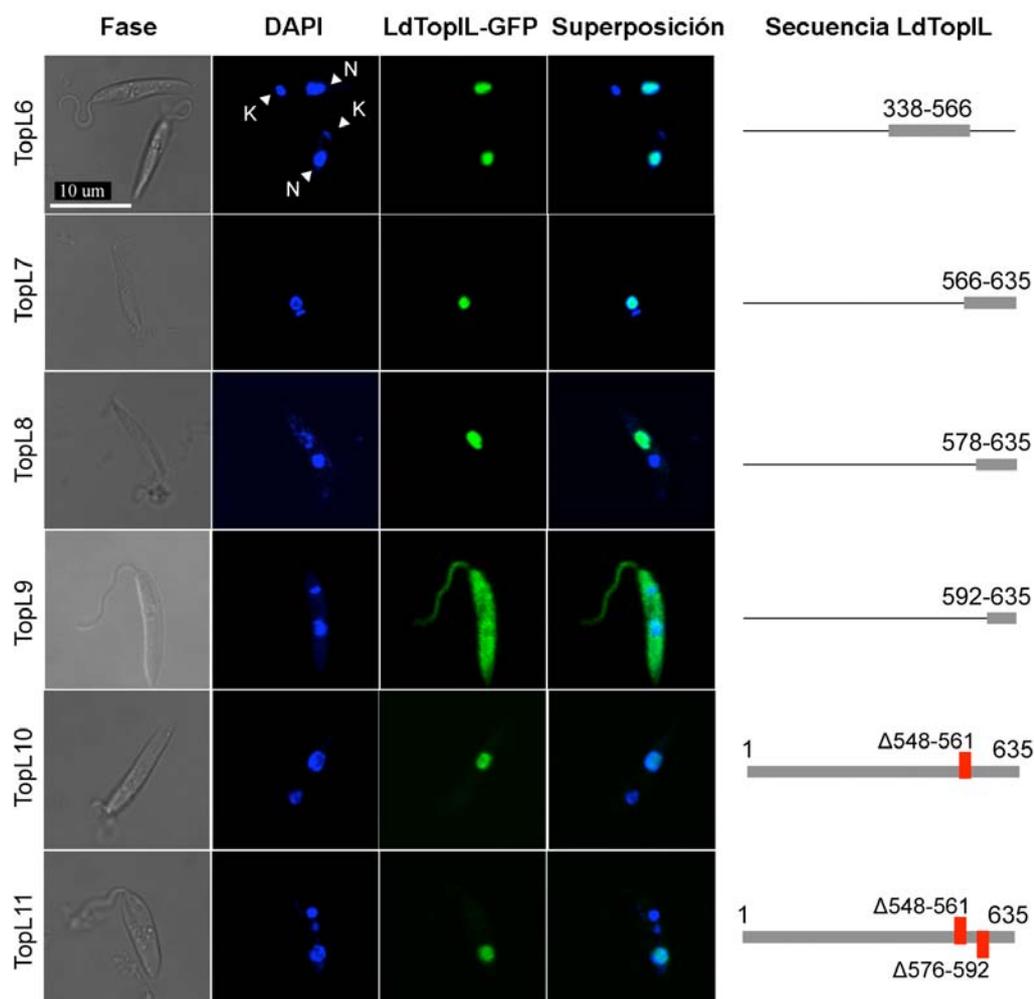


Figura 4.27. Resultado de los análisis realizados por microscopía confocal de las diferentes quimeras LdTopIL-GFP. La colocalización del núcleo (N) y kinetoplasto (K) con respecto a la LdTopIL se realizó mediante la tinción del ADN con DAPI.

Si se analizan todas estas construcciones en conjunto, es lógico pensar que las regiones 548-566 y 578-592, con numerosos residuos de Lys, podrían constituir sendas NLS. Sin embargo, queda por definir el papel que juegan los aminoácidos comprendidos entre esas dos regiones. Para resolver este puzle, se realizaron dos deleciones internas consecutivas eliminando en primer lugar la región 548-566 (TopL10), mientras que un segundo Quickchange sobre la TopL10, eliminando los residuos 578-592, dio lugar a la quimera TopL11. El análisis confocal de esta última reveló una clara localización nuclear de la LdTopL, y por lo tanto esta secuencia de

14 aminoácidos (562-575) puede actuar como NLS en ausencia de las regiones flanqueantes. Por lo tanto se podría especular sobre la existencia de 3 motivos NLS en la secuencia de LdTopIL. No obstante, dada la contigüidad de las secuencias y la alta densidad de residuos básicos se definió la región completa como un complejo NLS (NLS1 549-592), en el que varias extensiones de la secuencia pueden asumir el papel de NLS en ausencia de las demás. Este hecho hizo imposible delimitar un fragmento menor de secuencia como único responsable del transporte citoplasma-núcleo de la LdTopIL.

4.4.2. Delimitación de motivos NLS en la subunidad LdTopIS

Desde el descubrimiento de la LdTopIB algunos autores hipotetizaron que el transporte del heterodímero era responsabilidad absoluta de la subunidad grande, y por lo tanto la subunidad pequeña debería carecer de motivos NLS propios (BoseDasgupta y col., 2008).

Por este motivo fue muy sorprendente observar cómo la subunidad completa LdTopIS fusionada por su extremo N-terminal a la GFP (TopS1; residuos 1-262) se acumuló en el núcleo, sin indicio alguno de difusión en el citoplasma (Fig. 4.28). Este hallazgo nos incitó a crear nuevas estructuras para definir de forma precisa la localización y extensión de la secuencia específica responsable de transporte nuclear de esta proteína.

La extensión N-terminal (residuos 1-210) de la LdTopIS contiene un motivo no conservado entre los residuos 85 y 136, rico en serinas, y con un pentapéptido entre las posiciones 175 y 180 que confiere sensibilidad a la CPT a toda la enzima, tal y como demostramos en el apartado 4.3.3 (Prada y col., 2012). El dominio catalítico (residuos 211-262) está filogenéticamente conservado y contiene el sitio activo "SKxxY" en el que la Tyr-222 es responsable del ataque nucleofílico que escinde una de las cadenas de ADN. Otros dos elementos destacables presentes en la secuencia de la LdTopIS son: i) la región ácida comprendida entre los residuos 110 y 117, que guarda un cierto parecido con la NLS ácida descrita en la hTopIB; ii) la secuencia APPPKVRRVE (86-96) que podría compartir cierta semejanza con la NLS PKKKRKV del virus 40 vacuolado del simio (SV40).

Para llevar a cabo una primera aproximación, se crearon cuatro construcciones que fueron fusionadas al vector pXG-GFP+2 al final del ORF de la GFP (Fig. 4.27): TopS2 (residuos 1-86), TopS3 (residuos 86-136), TopS4 (residuos 135-171) y TopS5 (residuos 171-262).

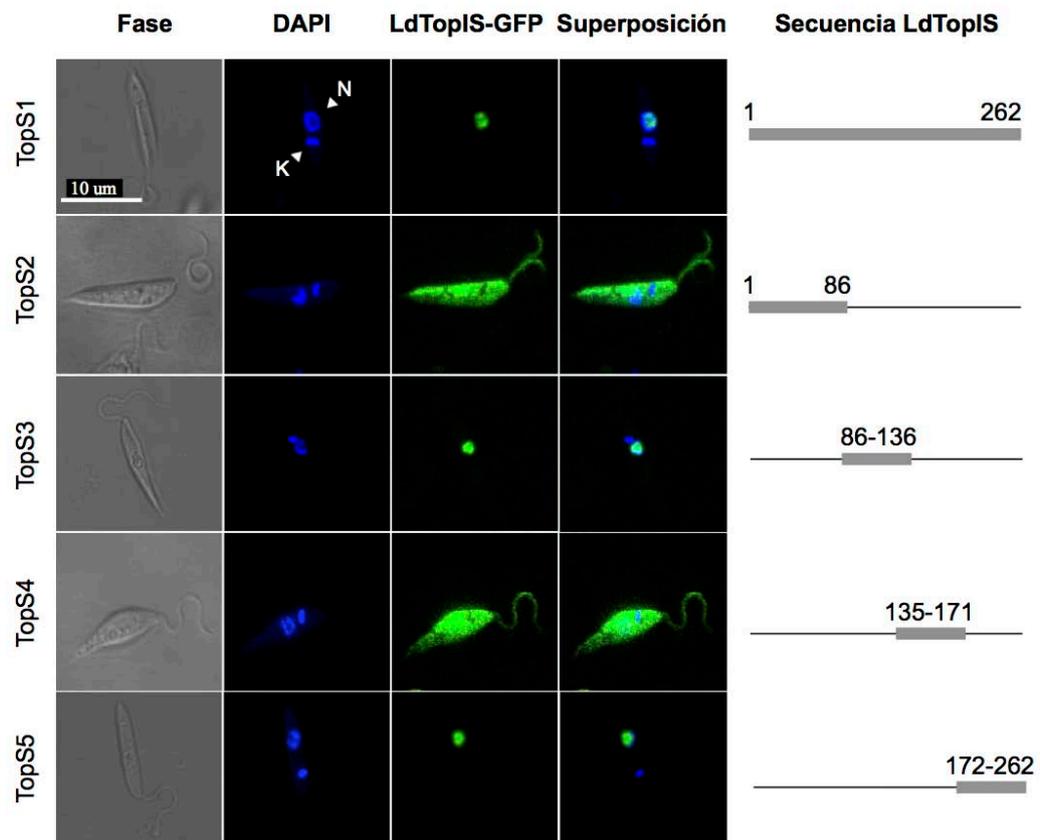


Figura 4.28. Resultado de los análisis realizados por microscopía confocal de las diferentes quimeras LdTopIS-GFP. La colocalización del núcleo (N) y kinetoplasto (K) con respecto a la LdTopIS se realizó mediante la tinción del ADN con DAPI.

La quimera TopS2 amplificó un polipéptido desde la metionina inicial al aminoácido 86 de la LdTopIS, un fragmento que termina justo al comienzo de la secuencia APPPKVRRVE (residuos 86-96). Tal y como se observa en las imágenes de microscopía, el fragmento fusionado a la GFP mostró una clara acumulación citoplasmática, demostrando por lo tanto que esta región carece de motivos NLS funcionales. De forma contraria, los promastigotes transfectados con TopS3, cuya secuencia incluye los motivos APPPKVRRVE (residuos 86-96) y DDDSSDD

(residuos 110-117), exhibieron acumulación de fluorescencia en el interior del núcleo, lo que indica la presencia de un motivo NLS en esta región pero no excluye la existencia de otros motivos en otras secciones de la proteína.

Para completar el análisis secuencial se clonaron y estudiaron las construcciones TopS4 y TopS5. La quimera TopS4 comprende los aminoácidos localizados entre las posiciones 136 y 171, terminando justo antes del comienzo del motivo PPRPPVRSFE (residuos 171-183), que parece estar directamente involucrado en la sensibilidad a CPT y está altamente conservado entre los *Tripanosomatidos*. Esta construcción presentó una clara acumulación citoplasmática cuando se realizó el análisis microscópico. La quimera de fusión TopS5 contiene el final del fragmento C-terminal (residuos 171-262) e incluye el residuo catalítico Tyr-222. Inesperadamente, tal y como se muestra en la Fig. 4.28, la señal GFP emitida por la TopS5 se encontraba localizada en el núcleo de los promastigotes.

Por lo tanto, hasta este punto, se consiguieron identificar dos grandes regiones con la capacidad de transportar la LdTopIS en al núcleo, correspondiendo con las secuencias incluidas en las quimeras TopS3 y TopS5, respectivamente.

El motivo PPPKVRRVE, que podría compartir cierta similitud con el motivo NLS PKKKRKV del SV40, comienza en el residuo 86. Para comprobar si dicho parecido era también funcional se diseñó la construcción TopS6, cuya secuencia se extiende desde la Met inicial al residuo 109, siendo por lo tanto la suma de la quimera TopS2 y el motivo PPPKVRRVE seguido de la región rica en serinas. La Fig. 4.29 muestra como la fluorescencia emitida por la construcción TopS6 se acumuló en el núcleo, lo que pone de manifiesto la importancia de este motivo para la internalización de la proteína en el núcleo.

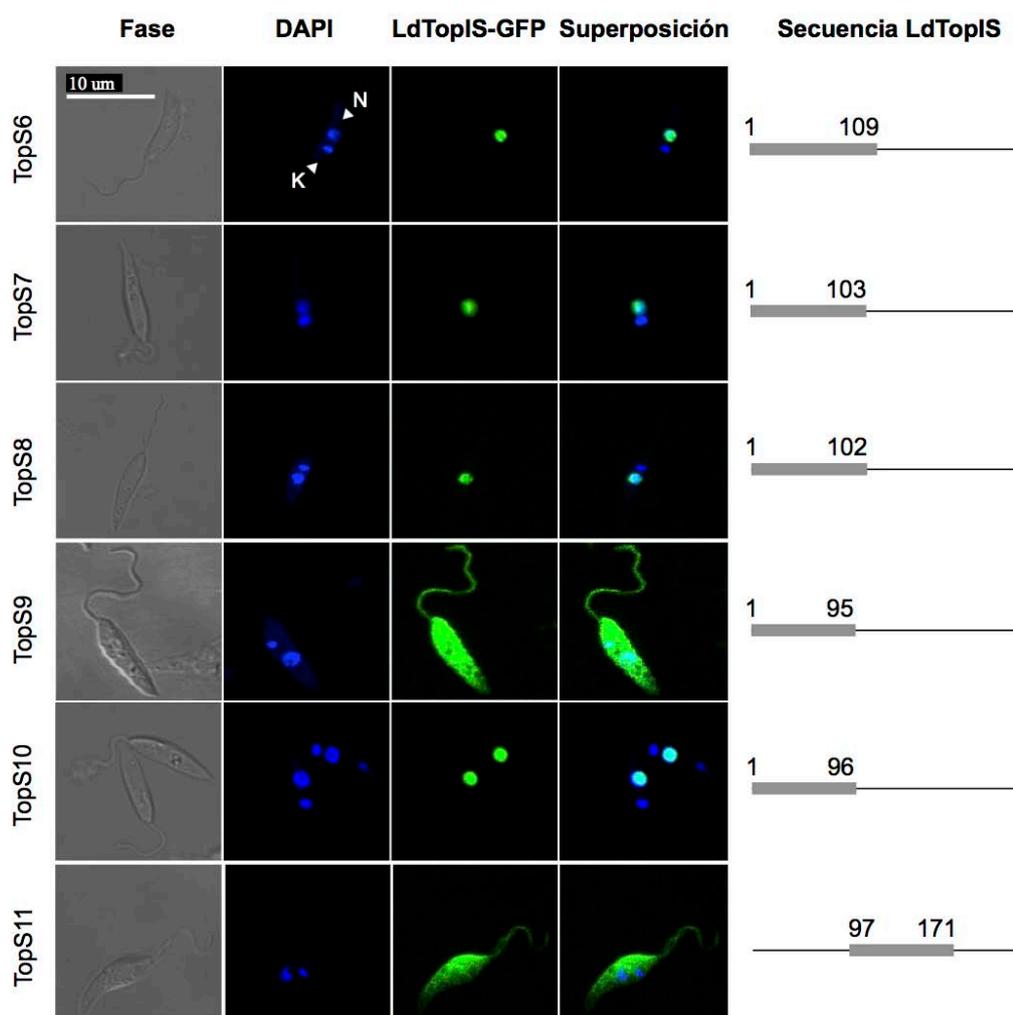


Figura 4.29. Resultado de los análisis realizados por microscopía confocal de las diferentes quimeras LdTopIS-GFP. La colocalización del núcleo (N) y kinetoplasto (K) con respecto a la LdTopIS se realizó mediante la tinción del ADN con DAPI.

Entre los aminoácidos 96 y 109, además del bloque de serinas, el único residuo cargado a pH fisiológico es el Asp-103. Para determinar su posible papel en el transporte nuclear de la LdTopIS se realizaron dos nuevas construcciones. La construcción TopS7 incluyó la secuencia desde el comienzo de la proteína hasta el aminoácido Asp-103, mientras que TopS8 terminó en el residuo Ser-102. Ambas quimeras fueron internalizadas dentro del núcleo, por lo que se deduce que el Asp-103 no desempeña ningún papel en la señalización nuclear de la proteína. Esto supuso una delimitación más precisa de la NLS2 que debería estar localizada entre los aminoácidos 86 y 103.

Con el fin de precisar la secuencia mínima constitutiva de NLS2, se realizó una nueva construcción terminando justo antes del bloque de serinas (TopS9). La fila 5 de la Fig. 4.29 muestra como la proteína de fusión resultante se acumuló en el citoplasma. Por lo tanto, las serinas debían estar involucradas en el proceso de transporte citoplasma-núcleo, ya que el motivo PPPKVRRE por sí mismo, fue incapaz de conducir dicha translocación. Para averiguar el número mínimo de serinas necesarias para obtener un NLS funcional, se realizaron varias quimeras con un número creciente de serinas. La construcción TopS9 muestra que la presencia de un único residuo Ser fue suficiente para conducir a la LdTopIS al núcleo. Esto significa que el motivo PPPKVRRES, constituido por 10 aminoácidos (87-97), es la NLS2 de LdTopIB.

A pesar de haber identificado un motivo NLS dentro de esta región de la subunidad pequeña, todavía había que definir el posible papel de la secuencia DDDSSDD (residuos 110-117), que comparte un alto parecido con la señal ácida descrita en la enzima homóloga humana (residuos 117-146 de la hTopIB). Con ese fin, se diseñó una nueva quimera que incluyó los aminoácidos 97 al 171 (TopS11). Dado que la fluorescencia de los promastigotes transfectados se difundió en el citoplasma, se puede concluir que este motivo ácido no es necesario para el transporte de la LdTopIB al interior del núcleo celular.

Una vez identificada la NLS2 dentro de la secuencia de la quimera TopS3, se procedió al estudio de la otra región candidata de contener motivos NLS (TopS5) en el extremo C-terminal de la subunidad pequeña. Para ello se generó la construcción TopS12 (Fig. 4.30), que abarca desde el residuo 172 al 217, que incluía el motivo de resistencia a CPT RPPVV y termina justo antes del motivo catalítico "SKINY". El análisis microscópico mostró una distribución uniforme por el citoplasma de los promastigotes, por lo que la NLS3 debía localizarse entre los aminoácidos 218 y 262.

Para verificar que la subunidad podía ser transportada al interior del núcleo en ausencia de la NLS1 se creó por Quickchange la construcción TopS13 utilizando como molde la enzima salvaje integrada en el vector pSK. La segunda fila de la Fig. 4.30 muestra como la TopS13 es transportada al núcleo sin mediación de la NLS2.

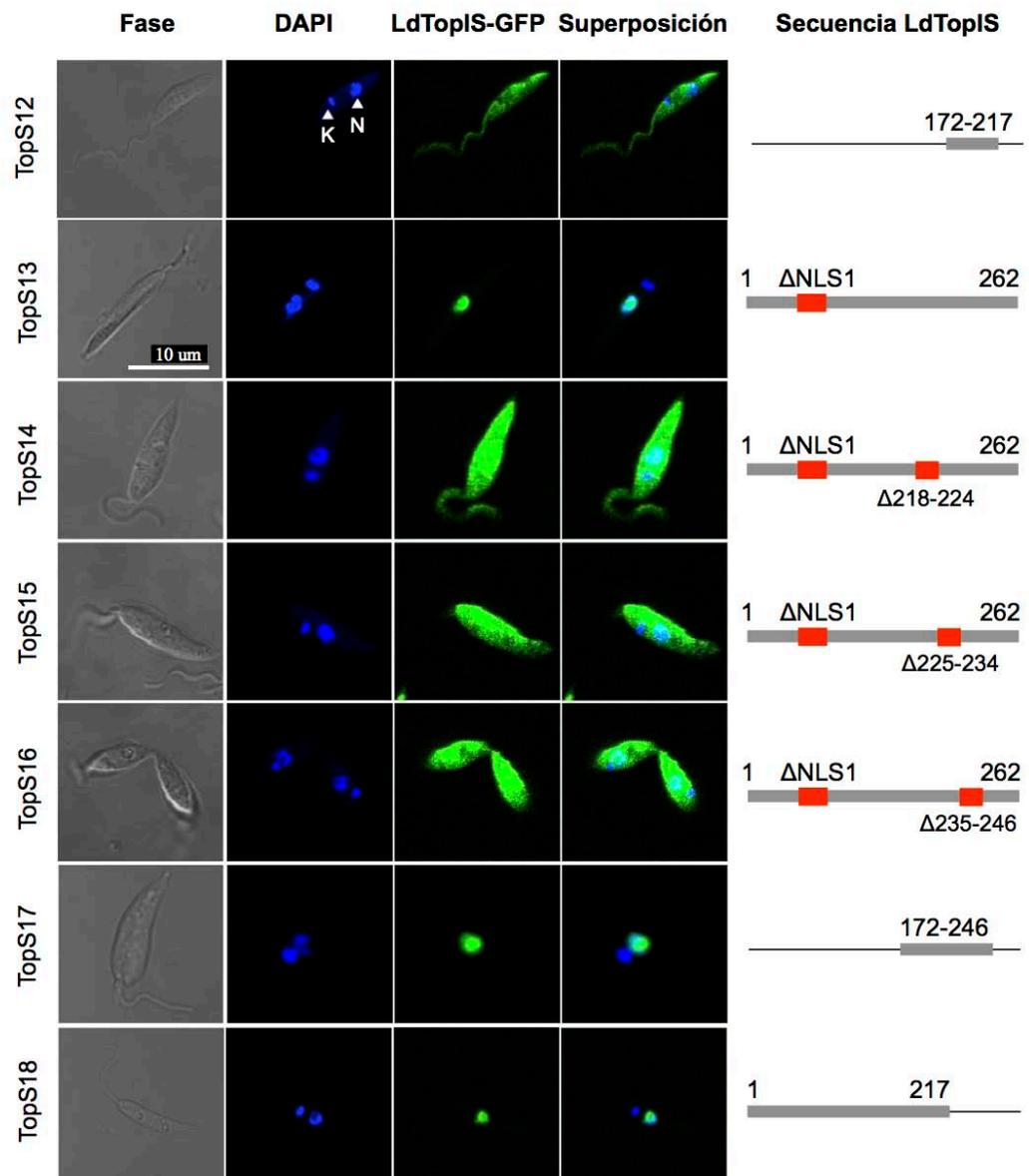


Figura 4.30. Resultado de los análisis realizados por microscopía confocal de las diferentes quimeras LdTopIS-GFP. La colocalización del núcleo (N) y kinetoplasto (K) con respecto a la LdTopIS se realizó mediante la tinción del ADN con DAPI.

Posteriormente, se crearon tres delecciones internas utilizando como molde la quimera TopS13 con el objetivo de analizar la región que contenía el motivo de longitud desconocida NLS3. Estas quimeras doblemente delecionadas fueron diseñadas de la siguiente forma: TopS14 para la proteína Δ NLS1/ Δ 218-224, TopS15 para la proteína Δ NLS1/ Δ 225-234, y TopS16 para la subunidad recombinante Δ NLS1/ Δ 235-246.

Tal y como muestran las imágenes de microscopía, todas estas construcciones dieron lugar al mismo resultado, acumulación citoplasmática de la fluorescencia GFP. Para comprender si esta región (residuos 218 al 246) ejercían en papel de NLS3 dentro de la LdTopIS, se creó la quimera de fusión TopS17. Hay que tener en cuenta que esta construcción cubre la secuencia comprendida entre los residuos 172 al 246. Se tomó esta decisión con el fin de garantizar un correcto clonaje del fragmento, ya que los residuos 172 al 218 habían demostrado no tener ninguna capacidad de señalización nuclear. El resultado del análisis por microscopía reveló que la proteína había sido transportada en su totalidad al núcleo. Por lo tanto, esta región de 28 aminoácidos de la LdTopIS, constituye una única NLS de carácter indivisible (NLS3 218-246).

Por último, se verificó que la subunidad completa podía ser transportada al interior del núcleo en ausencia del motivo NLS3. La quimera TopS18 junto con la TopS13 confirma que tanto el motivo NLS2 como el NLS3 son capaces de conducir la LdTopIS al núcleo de forma independiente.

4.4.3. Transporte nuclear simultáneo LdTopIL-LdTopIS

Una vez delimitadas las secuencias NLS presentes en ambas subunidades de la LdTopIB (Fig. 4.31.A) se investigó si el transporte nuclear de ambos polipéptidos se produce de forma independiente o una vez ensamblada la enzima. Para ello se aplicó el principio de inhibición de la CPT, ya que la LdTopIB es sensible a esta droga cuando ambas subunidades se encuentran unidas en el interior del núcleo celular. La cepa de *S. cerevisiae* MBY3 fue transformada con el gen codificante de la LdTopIB salvaje, el vector de expresión pESC-URA sin inserto alguno ("mock") y quimeras delecionadas en los motivos NLS (Δ NLS).

La Fig. 4.31.B muestra el resultado de los ensayos de viabilidad celular en levaduras (*spot test*).

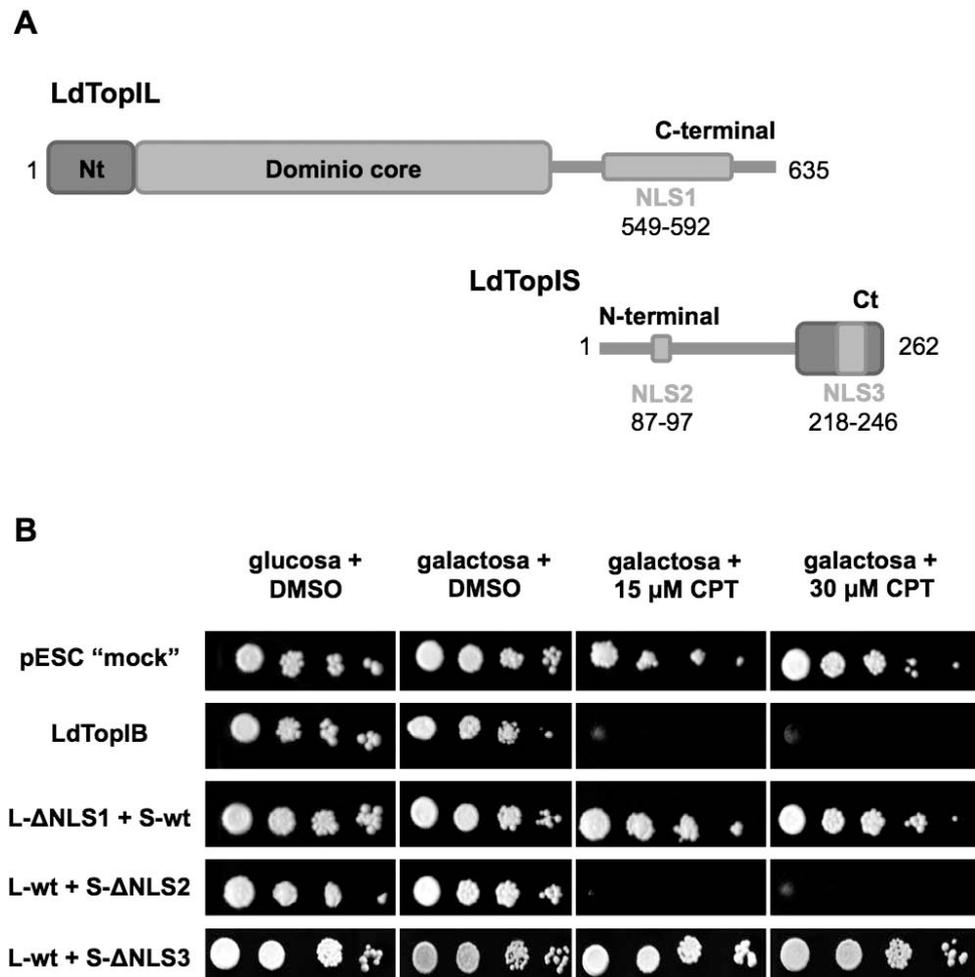


Figura 4.31. Estudio de transporte nuclear simultáneo LdTopIL-LdTopIS en el sistema de levaduras MBY3. (A) representación esquemática de los motivos NLS identificados en las dos subunidades de LdTopIB. (B) Ensayos de viabilidad celular en levaduras MBY3 de las diferentes construcciones en presencia de CPT.

Al utilizar una cepa deficiente en TopIB, la coexpresión heteróloga de la dos subunidades de la LdTopIB convierte a las MBY3 en células sensibles a los inhibidores TopIB, induciendo por lo tanto la muerte de las levaduras. Como era esperable, las levaduras transformadas con las construcciones crecieron sin problemas en presencia de glucosa al 2% (p/v), ya que con este azúcar la

expresión de la LdTopIB se encuentra reprimida (como se indicó anteriormente, ambas subunidades fueron clonadas bajo el control de los promotores GAL1 y GAL10, respectivamente).

Para comprobar si la expresión de la enzima podría ser causante, por sí misma, de la muerte de las células, se crecieron los diferentes cultivos en placas de S.C-ura con galactosa al 2% (p/v) y DMSO. Como se muestra en la segunda columna de la Fig. 4.31.B, el crecimiento de los cultivos transformados es independiente de la expresión de LdTopIB en ausencia de CPT. Sin embargo, cuando los cultivos se realizaron en presencia de CPT se apreciaron diferencias importantes. Las levaduras transfectadas con la construcción salvaje fueron incapaces de crecer tanto a concentraciones de 30 μ M como de 15 μ M CPT, mientras que la quimera “mock” creció con normalidad no mostrando sensibilidad a la droga a ninguna de las dos concentraciones testadas.

Cuando se eliminó el complejo NLS1 de la subunidad grande (L- Δ NLS1 + S-wt), el cultivo no mostró sensibilidad al daño mediado por CPT. Esto indicó que ambas subunidades no se están uniendo de forma correcta, probablemente por la incapacidad de la subunidad pequeña para alcanzar el núcleo. En cambio, cuando se deletó el motivo NLS2 de la LdTopS (L-wt + S- Δ NLS2), los cultivos presentaron el mismo perfil de sensibilidad que los transformados con la enzima salvaje. Esto indica la presencia de una enzima TopIB completamente funcional en el interior del núcleo de la levadura.

Finalmente, el cultivo que expresa la construcción en la que se deletó el motivo NLS3 (L-wt + S- Δ NLS3) no mostró sensibilidad a CPT. Se debe tener en cuenta que en esta construcción se eliminó el residuo catalítico Tyr-222, incluido dentro de la NLS3, por lo que la ausencia de sensibilidad a la droga debe atribuirse a que la enzima no es capaz de cortar la hebra de ADN y por lo tanto no se pudo producir el envenenamiento mediado por la CPT. Estos resultados indican que ambas subunidades pueden penetrar en el núcleo de forma independiente. Además, demuestran que a pesar de ser una señal plenamente funcional, el motivo NLS2 es completamente dispensable para la translocación citoplasma-núcleo de la LdTopIB *in vivo*.

4.4.4. Estudio confocal de co-localización TopIB-ADN

Con el fin de determinar la localización subcelular de todas las proteínas fusionadas a la GFP creadas para el presente trabajo, transfectadas en promastigotes de *L. donovani*, se realizó una tinción del ADN celular mediante la incubación de los cultivos con una solución de DAPI (ver material y métodos). Este colorante derivado del indol se intercaló en el surco menor del ADN, uniéndose a las regiones de alta repetición A=T. La señal fluorescente característica de azul fue obtenida mediante la excitación con un laser de rango ultravioleta.

Tal y como se ha mostrado en todas las imágenes de microscopía de esta memoria, ninguna de las quimeras de la subunidad grande ni las de la LdTopIS se acumuló en el interior de la mitocondria. Tampoco se observó asociación de ninguna de las construcciones con el ADNk. Estos resultados demuestran que la LdTopIB carece de motivos específicos responsables de señalización hacia el kinetoplasto o de acumulación en la mitocondria.

4.5. LA TopIB DE *LEISHMANIA* COMO DIANA MOLECULAR

Una vez exploradas las diferentes regiones no conservadas que componen la TopIB de *Leishmania*, así como los motivos responsables de su translocación al interior del núcleo, se procedió al estudio del efecto de tres familias diferentes compuestos sobre la actividad de la LdTopIB: i) derivados de la CPT, ii) compuestos de estructura indenoisoquinolínica y iii) ácidos grasos acetilénicos y alquinoicos.

La idea principal es que al igual que ocurre en el caso de diferentes tipos de tumores, estos principios activos van a interferir con la funcionalidad de la TopIB en gran medida, ya que tanto las células tumorales como los parásitos se encuentran en continua división, lo que supone una mayor expresión de la LdTopIB con respecto a las células del hospedador.

4.5.1. Efecto de derivados CPT sobre la actividad LdTopIB

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la CPT, de un derivado N-óxido en el anillo B (CPT-N-óxido), así como tres derivados testados clínicamente y en uso en la terapia actual contra el cáncer: topotecan (Hycantim[®]), gimatecan (ST1481) e irinotecan (Camptosar[®] – profármaco soluble en agua), así como el SN-38, metabolito activo del irinotecan (Fig. 4.32), sobre la LdTopIB. Además, se compararon los resultados con la potencia inhibitoria de estas drogas sobre la hTopIB.

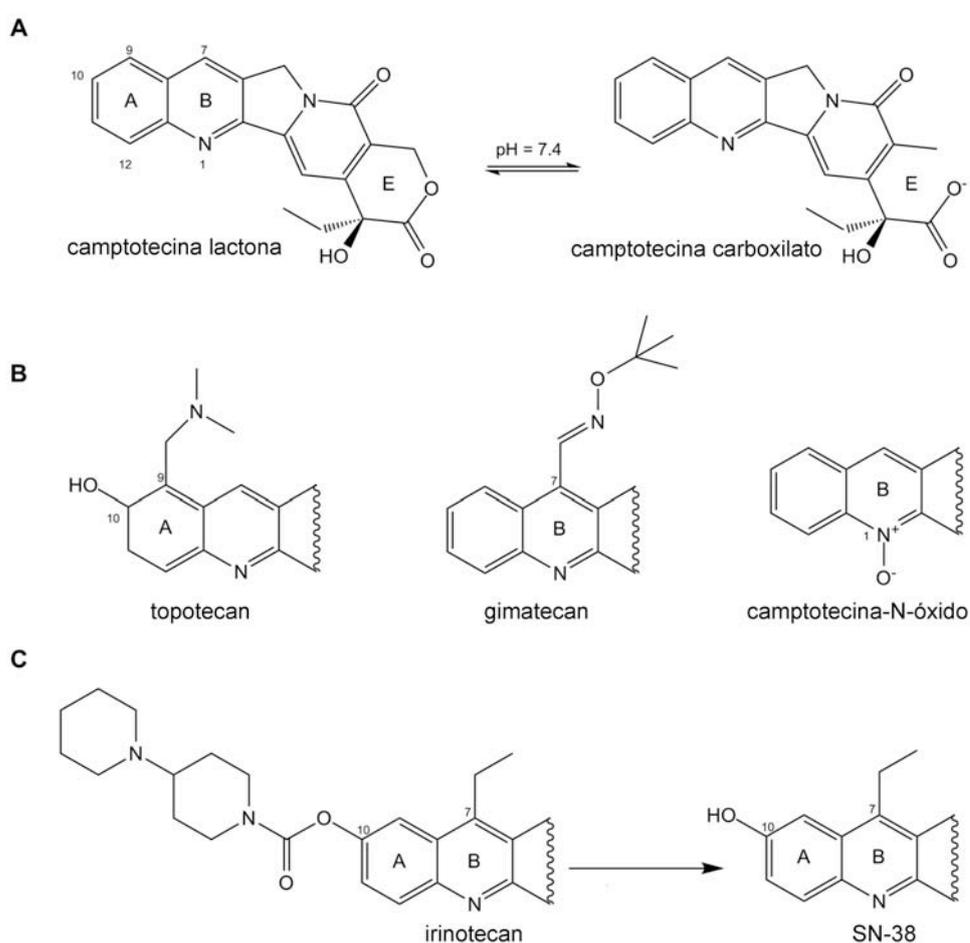


Figura 4.32. Estructura química de los derivados CPT utilizados en el presente estudio. (A) Equilibrio entre las formas lactona y carboxilato del anillo E de la CPT; (B) sustitución de diferentes motivos en los anillos A y B de la CPT que dan lugar al topotecan, gimatecan y CPT-N-óxido; (C) hidrólisis del profármaco irinotecan en el compuesto activo SN-38.

4.5.1.1. CPT

Tal y como se mostró en la sección 4.2. de la presente memoria, la LdTopIB es sensible a la acción de la CPT. Con el fin de calcular la concentración capaz de causar un 50% de inhibición del proceso de relajación del ADN superenrollado mediado por LdTopIB en presencia de CPT (IC_{50} LdTopIB), así como en el caso de la hTopIB (IC_{50} hTopIB), se llevaron a cabo ensayos de inhibición de la relajación en presencia de concentraciones crecientes de CPT.

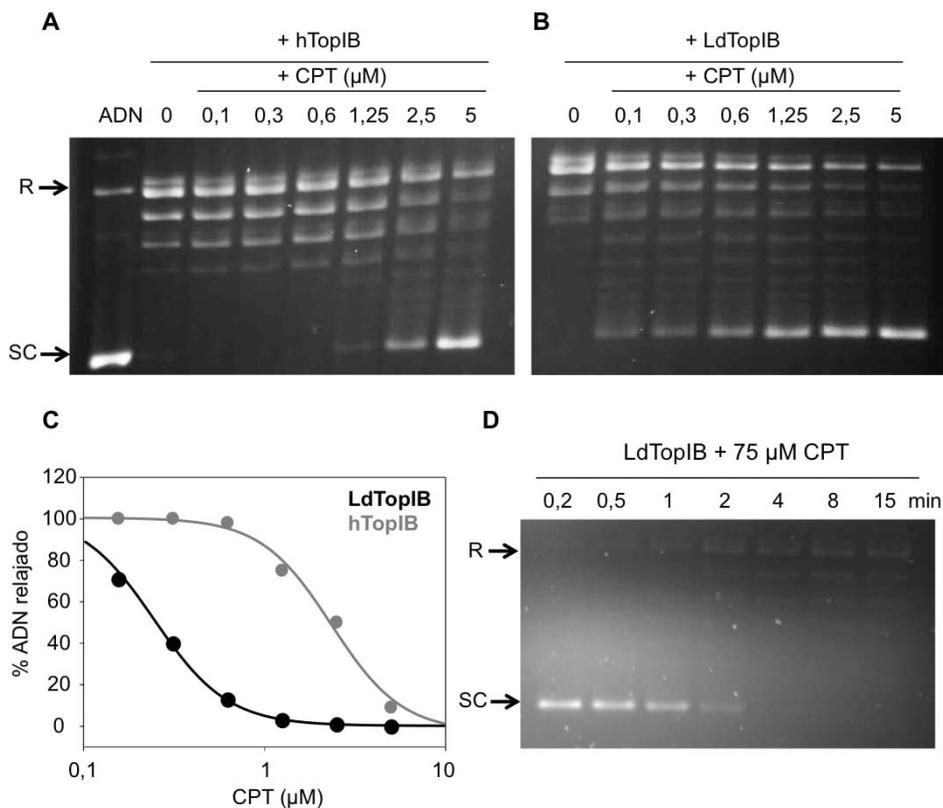


Figura 4.33. Inhibición de la actividad de relajación TopIB en presencia de CPT. (A) Inhibición de la actividad de hTopIB por CPT; (B) Inhibición de la actividad de LdTopIB por CPT; (C) Relación dosis/respuesta de la inhibición de las actividades LdTopIB y hTopIB. (D) Estudio de la duración de la inhibición de la actividad de relajación de LdTopIB a una concentración fija de CPT 75 μ M.

La Fig. 4.33.A muestra como en el caso de la hTopIB la inhibición comienza a ser apreciable a concentraciones en torno a 1,25 μ M. En cambio, la inhibición de la LdTopIB se hizo patente a concentraciones diez veces más bajas (Fig. 4.33.B). Cuando se realizaron las curvas dosis-respuesta a partir de la cuantificación de la

cantidad de ADN relajado y superenrollado, se obtuvieron unos valores de IC_{50} de $2,34 \mu\text{M}$ y $0,25 \mu\text{M}$ para hTopIB y LdTopIB, respectivamente (Fig. 4.33.C). En el estudio de duración de la inhibición de la actividad de relajación de LdTopIB se observó que la CPT permaneció unida durante 2 min a los complejos de CL (Fig. 4.33.D).

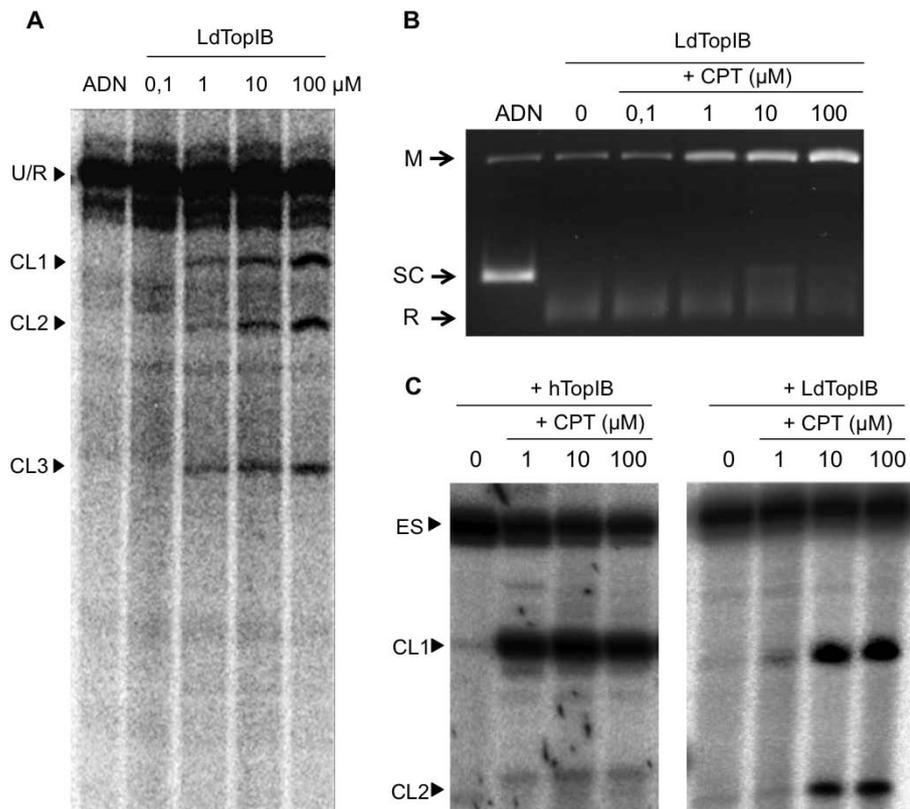


Figura 4.34. Estudio de estabilización de complejos CL por CPT. (A) Autorradiografía del equilibrio escisión/religación de la LdTopIB en presencia de distintas concentraciones de CPT con un fragmento de 202 pb marcado radiactivamente en su extremo 3'. CL: complejo de escisión TopIB-ADN; U/R: ADN inalterado y/o religado (B) Formación de complejos covalentes en un gel de agarosa en presencia de CPT. M: ADN mellado; SC: ADN superenrollado; R: ADN relajado. (C) Autorradiografía del gel desnaturalizante de los productos de reacción del equilibrio escisión/religación de un sustrato de 25 pb en presencia de CPT y 100 U de hTopIB (panel izquierdo) o de LdTopIB (panel derecho).

La CPT fue capaz de estabilizar efectivamente los CL LdTopIB-ADN a partir de concentraciones de $1 \mu\text{M}$, tanto en el ensayo de equilibrio escisión/religación con el fragmento lineal de 202 pb del pSK (Fig. 4.34.A), como en presencia de $0,5 \mu\text{g}$

del plásmido circular cerrado en un ensayo de agarosa (Fig. 4.34.B). Para comparar la capacidad de estabilización entre la enzima de *Leishmania* y su homóloga humana se utilizó un dúplex de ADN de 25 pb marcado radiactivamente en el extremo 5' de una de sus cadenas. La autorradiografía de la Fig. 4.34.C muestra como la hTopIB presentó un único corte preferente, que fue fuertemente estabilizado por CPT a la concentración de 1 μ M. En cambio, la LdTopIB produjo dos puntos de escisión dentro de la secuencia de 25 pb, ambos estabilizados en igual medida por CPT. Es importante señalar que en el caso de la enzima de *Leishmania*, la CPT a una concentración de 1 μ M produjo una estabilización muy leve, siendo ambas bandas obtenidas casi imperceptibles.

4.5.1.2. CPT-N-óxido

Al igual que con la CPT, se procedió al estudio de la capacidad de este compuesto para inhibir la actividad de relajación de las enzimas hTopIB y LdTopIB. Los geles de agarosa de las Fig. 4.35. A y B muestran como la CPT-N-óxido provocó la aparición de la banda de ADN superenrollado a concentraciones superiores a 5 μ M para la hTopIB y de 2,5 μ M para la LdTopIB. Cuando se realizaron las curvas dosis respuesta a partir de los porcentajes de ADN relajado y superenrollado de cada carril, se obtuvo un valor de IC_{50} para la hTopIB de 4,90 μ M y de 1,37 μ M para la LdTopIB (Fig. 4.35.C), valores en torno a 2 y 5 veces superiores a los obtenidos para la CPT, respectivamente. Por ello la oxidación del N-1 del anillo B no parece potenciar el efecto de la CPT tanto sobre la enzima humana como sobre la de *Leishmania*.

Sin embargo, cuando se analizó el tiempo que la CPT-N-óxido era capaz de mantener inhibida la actividad LdTopIB, los resultados mostraron un aumento de aproximadamente 2 min en el tiempo de residencia de la banda de ADN superenrollado con respecto a la CPT (Fig. 4.35.D). Por ello, todo parece indicar que la oxidación del N-1 del anillo B, a pesar de no aumentar la potencia de la droga, produce un incremento en la duración de la inhibición una vez se alcanza una concentración mínima efectiva.

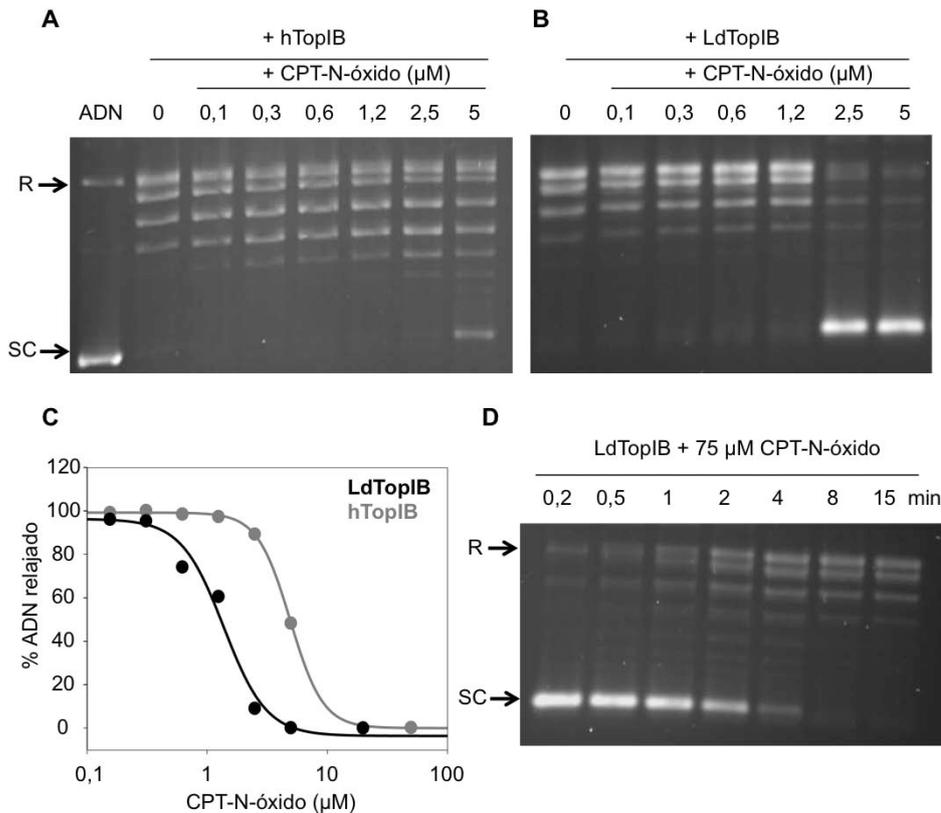


Figura 4.35. Inhibición de la actividad de relajación TopIB en presencia de CPT-N-óxido. (A) Inhibición de la actividad hTopIB por CPT-N-óxido; (B) Inhibición de la actividad LdTopIB por CPT-N-óxido; (C) Relación dosis/respuesta de la inhibición de las actividades LdTopIB y hTopIB. (D) Estudio de la duración de la inhibición de la actividad LdTopIB en presencia de una concentración fija de CPT-N-óxido 75 μM.

La CPT-N-óxido no fue capaz de estabilizar los complejos de CL con ninguna de las enzimas y el ADN (Fig. 4.36 A y B). Aunque no se observó ninguna banda en la autorradiografía del ensayo de escisión/religación con el sustrato de 202 pb, la imagen del ensayo con el plásmido circular muestra un leve aumento (entorno al 6%) de la banda correspondiente al ADN mellado. Por lo tanto, la CPT-N-óxido no presentó potencia suficiente para desplazar el equilibrio hacia la forma escindida. Finalmente, y dada la incapacidad de este compuesto para atrapar los complejos de CL, no se pudo comparar el efecto estabilizador con la enzima humana (Fig. 4.36.C).

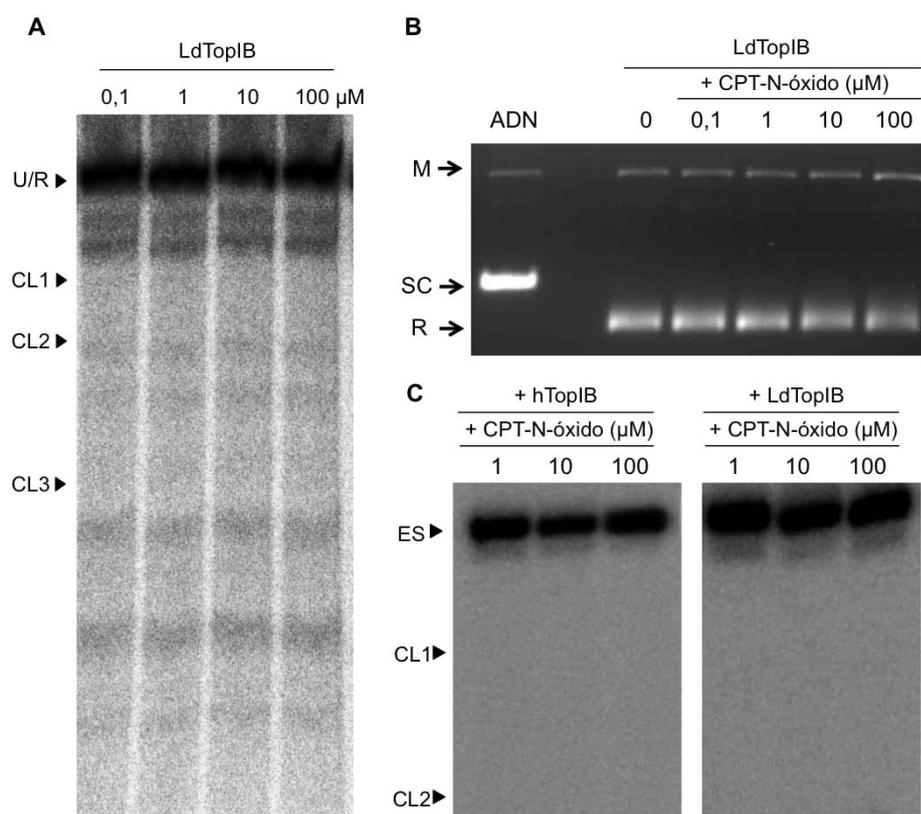


Figura 4.36. Estudio de estabilización de complejos CL por CPT-N-óxido. (A) Autorradiografía del equilibrio escisión/religación de la LdTopIB en presencia de CPT-N-óxido con un fragmento de 202 pb marcado radiactivamente en su extremo 3'. CL: complejo de escisión TopIB-ADN; U/R: ADN inalterado y/o religado (B) Formación de complejos CL en un gel de agarosa en presencia de CPT-N-óxido. M: ADN mellado; SC: ADN superenrollado; R: ADN relajado. (C) Autorradiografía del gel desnaturalizante de los productos de reacción del equilibrio escisión/religación de un sustrato de 25 pb en presencia de CPT-N-óxido y 100 U de hTopIB (panel izquierdo) o de LdTopIB (panel derecho).

4.5.1.3. Topotecan (TPT)

El TPT es un derivado soluble en agua de la CPT, cuya forma hidrocloreto se utiliza para el tratamiento de tumores de ovario y pulmón en las terapias antineoplásicas actuales (Pommier, 2006). De hecho, el TPT es el primer inhibidor TopIB que permitió una administración oral en forma de cápsulas (Ulukan y Swaan, 2002; Pommier, 2006). Este fármaco, bajo el nombre comercial de Hycamtin, fue patentado por GlaxoSmithKline (UK) y aprobado por la FDA en 2007.

Los ensayos de inhibición de la actividad de relajación TopIB mostraron una mayor sensibilidad de la LdTopIB con respecto a la enzima humana (Fig. 4.37 A y B). Los valores de IC_{50} calculados a partir de las curvas dosis-respuesta muestran grandes diferencias de inhibición entre las dos TopIB, siendo necesaria una concentración de $0,14 \mu\text{M}$ para inhibir la LdTopIB, frente a $9,11 \mu\text{M}$ en el caso de la hTopIB (Fig. 4.37.C). Otro aspecto importante observado en los ensayos efectuados con el TPT fue el tiempo que el fármaco fue capaz de prolongar el estado de inhibición. Como se observa en el panel D de la Fig. 4.36, la enzima fue capaz de retrasar la relajación del ADN superenrollado en presencia de $75 \mu\text{M}$ más allá de 15 min, lo que supone un incremento significativo con respecto a la CPT (4 min).

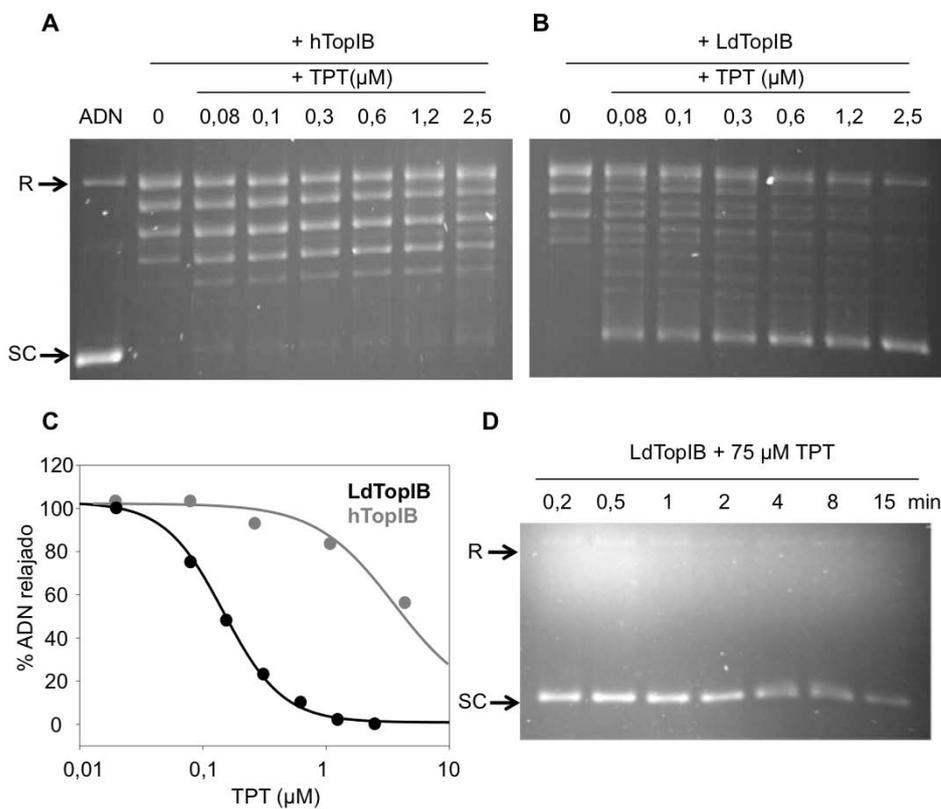


Figura 4.37. Inhibición de la actividad de relajación TopIB en presencia de TPT. (A) Inhibición de la actividad hTopIB por TPT; (B) Inhibición de la actividad LdTopIB por TPT; (C) Relación dosis/respuesta de la inhibición de las actividades LdTopIB y hTopIB. (D) Estudio de duración de la inhibición de la actividad LdTopIB en presencia de una concentración fija de TPT $75 \mu\text{M}$.

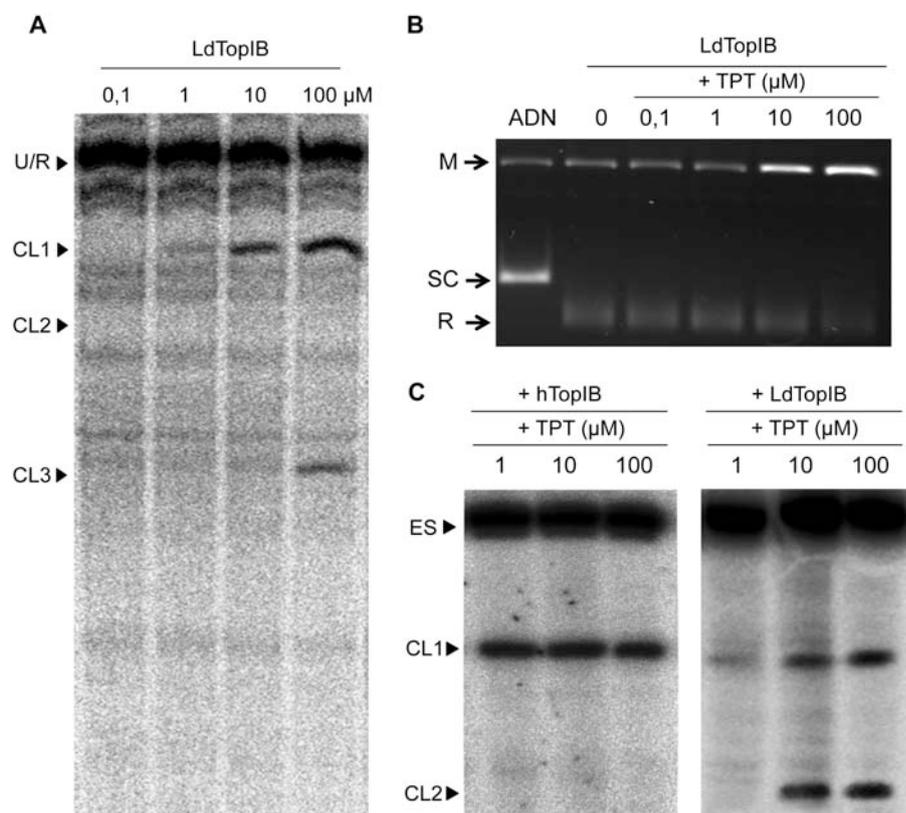


Figura 4.38. Estudio de estabilización de complejos CL por TPT. (A) Autorradiografía del equilibrio escisión/religación de la LdTopIB en presencia de TPT con un fragmento de 202 pb marcado radiactivamente en su extremo 3'. CL: complejo de escisión TopIB-ADN; U/R: ADN inalterado y/o religado (B) Formación de complejos covalentes en un gel de agarosa en presencia de TPT. M: ADN mellado; SC: ADN superenrollado; R: ADN relajado. (C) Autorradiografía del gel desnaturalizante de los productos de reacción del equilibrio escisión/religación de un sustrato de 25 pb en presencia de TPT y 100 U de hTopIB (panel izquierdo) o de LdTopIB (panel derecho).

Los estudios de estabilización de complejos CL en presencia de TPT se muestran en la Fig. 4.38. El ensayo de equilibrio escisión/religación (panel A) mostró la estabilización de únicamente dos bandas, correspondiéndose con los complejos CL1 y CL3. Además, dicha estabilización sólo fue evidente a concentraciones superiores a 10 μ M. El ensayo realizado en presencia del plásmido circular cerrado (panel B) confirmó este hecho, obteniéndose un aumento significativo de la banda correspondiente al ADN mellado a concentraciones iguales o superiores a 10 μ M.

Cuando se llevó a cabo el ensayo de equilibrio escisión/religación con el sustrato de 25 pb se observó que los complejos hTopIB-ADN fueron claramente estabilizados a partir de 1 μM , mientras que, una vez más, la LdTopIB necesitó de concentraciones 10 veces superiores para obtener un efecto visible (Fig. 4.38.C). De cualquier modo, en ambas enzimas el efecto del TPT fue mucho menor que el observado para la CPT.

4.5.1.4. Irinotecan y su metabolito activo SN-38

El profármaco irinotecan se utiliza en el tratamiento del cáncer colorrectal metastatizante, en el cáncer de células pequeñas de pulmón y en otros muchos tumores sólidos (Azim y Awada, 2012; Ogata y col., 2013). El irinotecan es metabolizado en el hígado a la forma activa capaz de inhibir la TopIB, SN-38, por acción de la enzima carboxilesterasa (Pommier, 2006).

A modo de control, se comprobó la capacidad inhibitoria del irinotecan sobre la actividad de relajación del ADN mediada por hTopIB y LdTopIB. La Fig. 4.39 muestra que, tal y como se esperaba, este compuesto es incapaz de ejercer efecto alguno sobre la TopIB *in vitro*, lo que corrobora su necesidad de ser hidrolizado para actuar sobre la diana farmacológica.

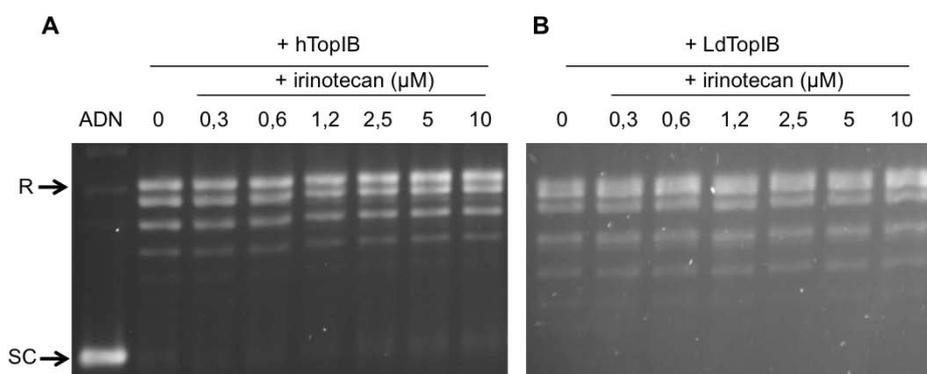


Figura 4.39. Actividad de relajación TopIB en presencia de irinotecan. (A) Inhibición de la actividad de hTopIB por irinotecan; (B) Inhibición de la actividad de LdTopIB por irinotecan.

Bien distinto fue lo observado en los ensayos realizados con su metabolito activo SN-38. Este compuesto fue capaz de prevenir la relajación del ADN superenrollado tanto por la hTopIB como por la LdTopIB, siendo apreciable la banda SC a concentraciones en torno a 1,2 μM y 0,1 μM , respectivamente (Fig. 4.40 A y B). Los valores IC_{50} calculados a partir de las curvas obtenidas al enfrentar las diferentes concentraciones de SN-38 y el porcentaje de ADN relajado en cada una de ellas, fueron de 0,99 μM y 0,065 μM para hTopIB y LdTopIB, respectivamente (Fig. 4.40.C). Cuando se realizó el ensayo de inhibición de la relajación mediada por la LdTopIB en función del tiempo, en presencia de una concentración fija de SN-38 (75 μM), se comprobó como el proceso se retrasó durante aproximadamente 2 min, de forma muy similar a lo observado para la CPT (Fig. 4.40.D).

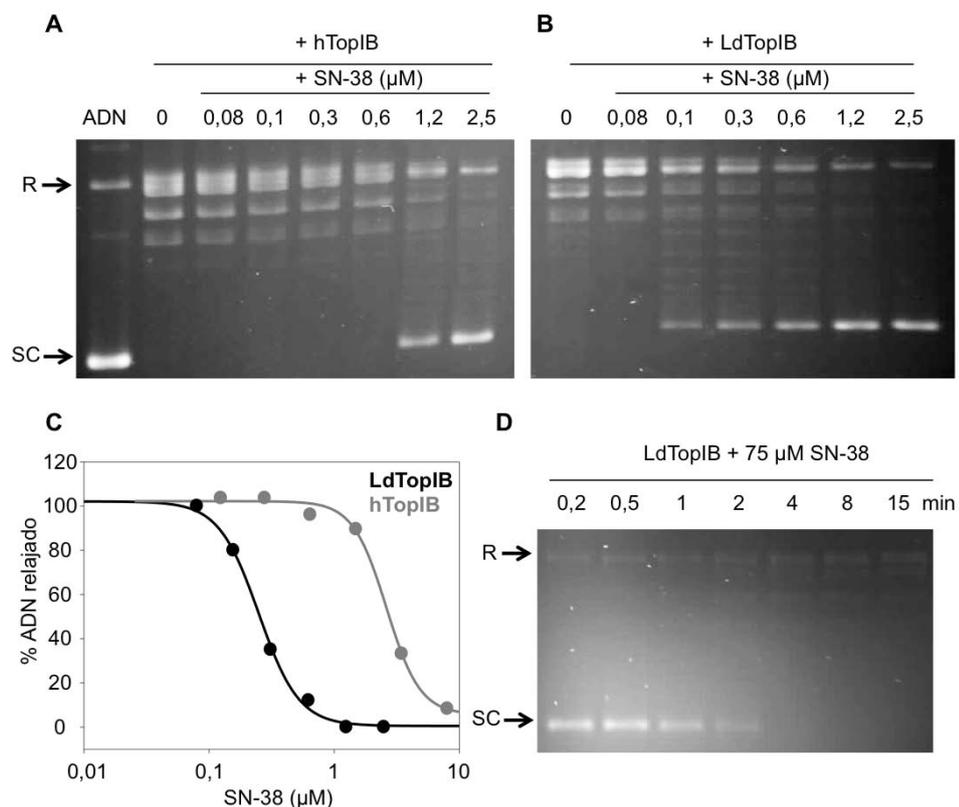


Figura 4.40. Inhibición de la actividad de relajación TopIB en presencia de SN-38. (A) Inhibición de la actividad hTopIB por SN-38; (B) Inhibición de la actividad LdTopIB por SN-38; (C) Relación dosis/respuesta de la inhibición de las actividades LdTopIB y hTopIB. (D) Estudio de la duración de la inhibición de la actividad LdTopIB en presencia de una concentración fija de SN-38 75 μM .

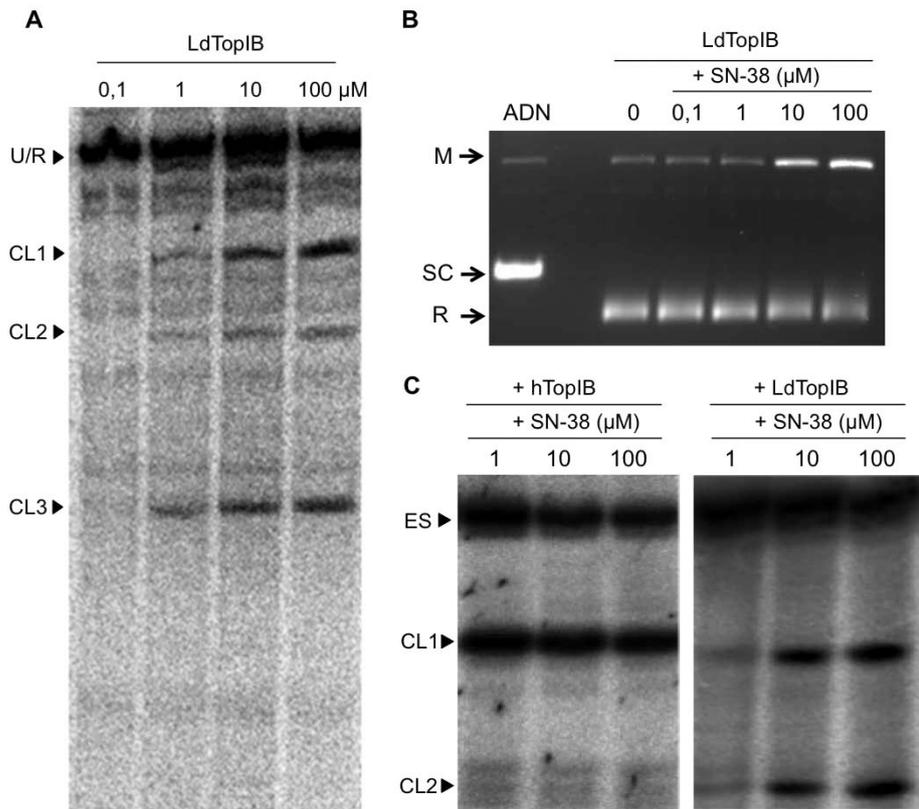


Figura 4.41. Estudio de estabilización de complejos CL por SN-38. (A) Autorradiografía del equilibrio escisión/religación de la LdTopIB en presencia de SN-38 con un fragmento de 202 pb marcado radiactivamente en su extremo 3'. CL: complejo de escisión TopIB-ADN; U/R: ADN inalterado y/o religado (B) Formación de complejos covalentes en un gel de agarosa en presencia de SN-38. M: ADN mellado; SC: ADN superenrollado; R: ADN relajado. (C) Autorradiografía del gel desnaturante de los productos de reacción del equilibrio escisión/religación de un sustrato de 25 pb en presencia de SN-38 y 100 U de hTopIB (panel izquierdo) o de LdTopIB (panel derecho).

Los ensayos de estabilización de complejos revelaron que el SN-38 es capaz de atrapar de forma mucho más eficaz los complejos de escisión LdTopIB-ADN que el TPT, alcanzando valores similares a los observados para la CPT. En el equilibrio de escisión/religación con el fragmento de 202 pb, el SN-38 produjo bandas de CL visibles, a partir de 1 μ M; mostrando un claro incremento de intensidad directamente proporcional a la concentración de SN-38 dentro del rango 1-100 μ M (Fig. 4.41.A). En el ensayo con plásmido circular el incremento de la banda de mellado se hizo patente a partir de 10 μ M, de forma casi idéntica a lo observado para el TPT (Fig. 4.41.B).

El equilibrio escisión/religación con el sustrato de 25 pb mostró que al igual que en los casos anteriores, los complejos hTopIB-ADN fueron estabilizados a concentraciones inferiores a las necesarias para la enzima de *Leishmania*. Una vez más, se observó la presencia de dos bandas de CL para la LdTopIB frente a la banda única obtenida con la enzima humana (Fig. 4.41.C).

4.5.1.5. Gimatecan

El gimatecan es un derivado lipofílico semisintético de la CPT que es biodisponible una vez administrado por vía oral que se encuentra en fase clínica II. El gimatecan presenta una sustitución 7-t-butoxi-aminometil en el anillo B de la CPT. Este compuesto es una droga huérfana que está siendo estudiada frente al astrocitoma, el glioblastoma y otros tumores de la oligodendroglía (Teicher, 2008).

En primer lugar se estudió la capacidad del gimatecan para inhibir la actividad catalítica de las enzimas hTopIB y LdTopIB, mediante ensayos de relajación de ADN superenrollado. Los resultados fueron sorprendentes ya que tal como se muestra en los paneles A y B de la Fig. 4.42 el gimatecan fue muy efectivo inhibiendo ambas TopIB. Del análisis de la curva dosis-respuesta con la hTopIB obtuvo un valor de IC_{50} de 0,30 μ M, mientras que con la LdTopIB el valor fue de 0,05 μ M, aproximadamente 7 inferior que con la CPT (Fig. 4.42.C).

El siguiente paso fue evaluar la duración de la inhibición de la relajación causada por un exceso de gimatecan en presencia de 1 U de LdTopIB. El panel D de la Fig. 4.42, muestra que, al igual que para el TPT, el gimatecan fue capaz de prevenir la relajación del ADN superenrollado por un periodo de tiempo superior a los 15 min. Este hecho junto al bajo valor de IC_{50} obtenido, hacen del gimatecan el derivado CPT más potente dentro de los estudiados en el presente trabajo.

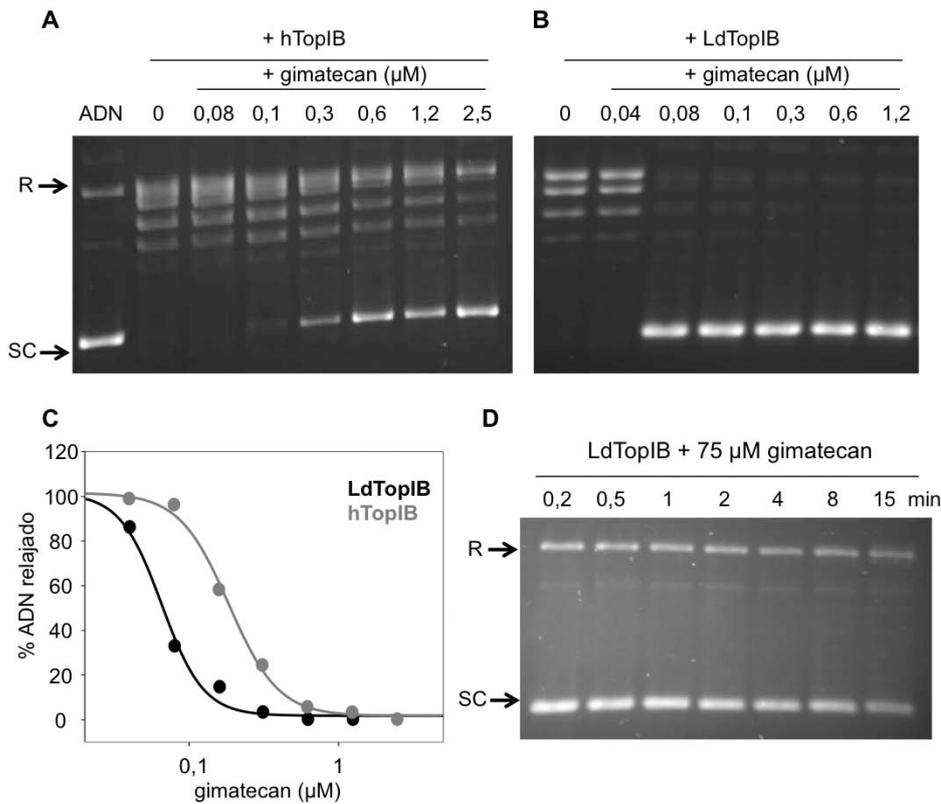


Figura 4.42. Inhibición de la actividad de relajación TopIB en presencia de gimatecan. (A) Inhibición de la actividad hTopIB por gimatecan; (B) Inhibición de la actividad LdTopIB por gimatecan; (C) Relación dosis/respuesta de la inhibición de las actividades LdTopIB y hTopIB. (D) Estudio de la duración de la inhibición de la actividad LdTopIB en presencia de una concentración fija de gimatecan a 75 μM .

Para comprobar si dicha potencia inhibitoria era debida a una mayor estabilización de los complejos de CL LdTopIB-ADN, se llevó a cabo un ensayo de equilibrio escisión/religación con el sustrato de 202 pb en presencia de 100 U LdTopIB y concentraciones crecientes de gimatecan. De nuevo, el gimatecan manifestó su elevada potencia como veneno TopIB, ya que como muestra el panel A de la Fig. 4.43, provocó una estabilización visible de los complejos de CL a una concentración de 0,1 μM , 10 veces inferior a la requerida por la CPT. Los resultados obtenidos en el ensayo de estabilización de complejos con el plásmido circular fueron muy similares, observándose un claro aumento de la intensidad de la banda de mellado a concentraciones inferiores a 0,01 μM (Fig. 4.43.B).

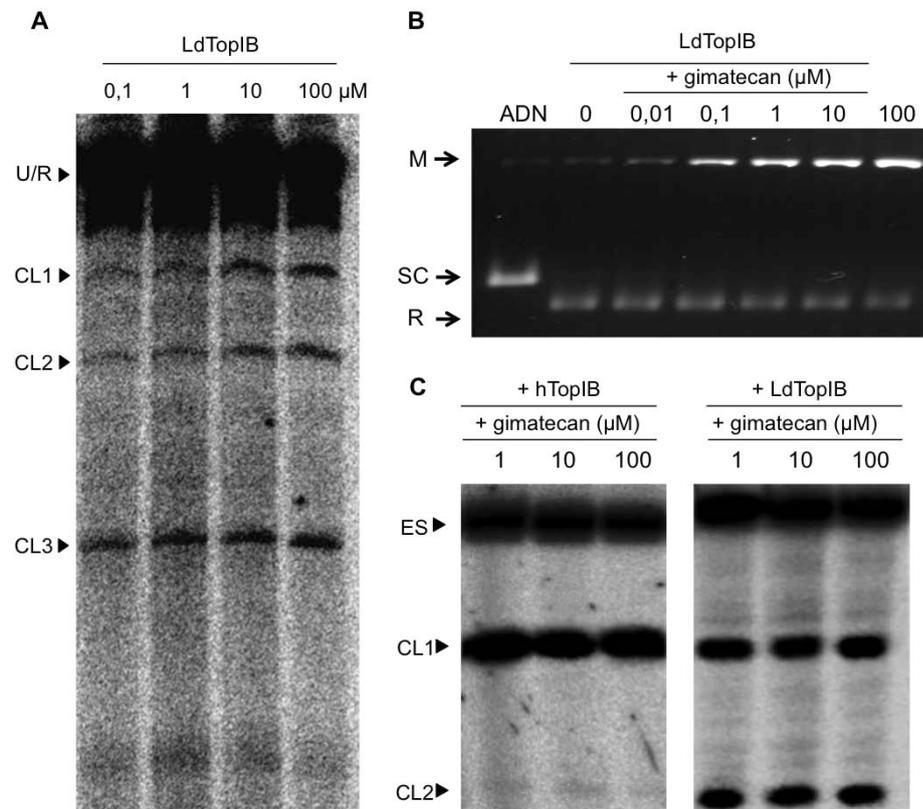


Figura 4.43. Estudio de estabilización de complejos CL por gimatecan. (A) Autorradiografía del equilibrio escisión/religación de la LdTopIB en presencia de gimatecan con un fragmento de 202 pb marcado radiactivamente en su extremo 3'. CL: complejo de escisión TopIB-ADN; U/R: ADN inalterado y/o religado (B) Formación de complejos covalentes en un gel de agarosa en presencia de gimatecan. M: ADN mellado; SC: ADN superenrollado; R: ADN relajado. (C) Autorradiografía del gel desnaturalizante de los productos de reacción del equilibrio escisión/religación de un sustrato de 25 pb en presencia de gimatecan y 100 U de hTopIB (panel izquierdo) o de LdTopIB (panel derecho).

Además, cuando se realizó el estudio comparativo de estabilización de complejos CL frente a la hTopIB, el gimatecan fue el único derivado CPT capaz de estabilizar las bandas CL1 y CL2 del sustrato de 25 pb a la concentración de 1 μM (Fig. 4.43.C).

Para comprender si la mayor potencia del gimatecan, con respecto a la CPT, podría ser el resultado de una mayor residencia del complejo terciario, se realizó un estudio de reversión de complejos de escisión, comparando la estabilidad de los complejos LdTopIB-CPT-ADN y LdTopIB-gimatecan-ADN. La Fig. 4.44

muestra la autorradiografía del gel resultante, mostrando que la reversión de los complejos estabilizados de escisión fue mucho más lenta para el gimatecan que para la CPT. Mientras que los complejos CL estabilizados con CPT se deshicieron a partir de los 30 s de la adición del exceso de NaCl, aquellos estabilizados con gimatecan persistieron más de 15 min. Por lo tanto, los complejos LdTopIB-ADN atrapados por el gimatecan pueden ser definidos como de reversión lenta, en contraposición a los formados en presencia de CPT. Todos estos resultados demuestran que el gimatecan es el mejor derivado CPT entre los analizados en el presente estudio.

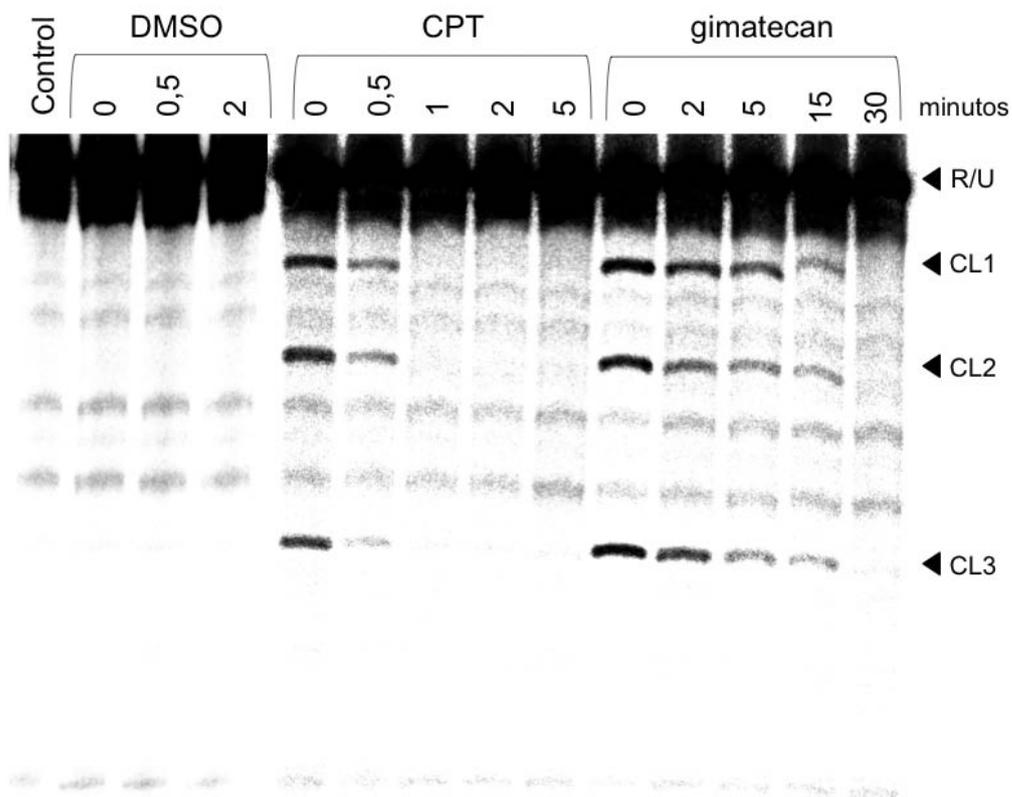


Figura 4.44. Estudio de estabilidad de los complejos de escisión LdTopIB inducidos por el la CPT y el gimatecan. Las reacciones se llevaron a cabo a 25 °C durante 4 min, tras los cuales se tomó un control (tiempo 0) y acto seguido se añadió 0,35 M NaCl. Las muestras fueron tomadas a los tiempos que se indican sobre cada carril tras la adición del NaCl, y paradas añadiendo SDS al 0,5 %. CL: complejo de escisión; R/U: ADN inalterado y/o religado.

Por último, y con el objetivo de comprender la mayor capacidad de inhibición del gimatecan sobre la LdTopIB en comparación con la CPT, se realizaron estudios de acoplamiento molecular tomando como diana el complejo LdTopIB-ADN y como ligandos la CPT y el gimatecan. Para ello se ejecutó el software Autodock Vina para ambos ligandos con el sistema de búsqueda de máxima exhaustividad para obtener los diez mejores resultados de ensamblaje.

La Fig. 4.45 muestra los mejores resultados de los cálculos de ensamblaje realizados para la CPT (panel A) y para el gimatecan (panel B). Estos resultados mostraron un valor de afinidad de unión de $-7,5$ y $-7,8$ kcal/mol respectivamente con unos límites superiores e inferiores para las derivaciones cuadráticas medias igual a 0. Estos valores de afinidad a pesar de no ser suficientemente buenos para asegurar una conformación 3D específica, permitieron explorar las diferentes regiones en las que los derivados CPT se podían anclar.

Mediante un exhaustivo análisis de los datos, se observó que todos los resultados obtenidos para el gimatecan se localizaron en el área existente entre la doble cadena escindida de ADN y el complejo LdTopIB-ADN. Esta observación es consistente con los análisis previos realizados que sugieren que el gimatecan está actuando como un veneno TopIB muy afín por los complejos LdTopIB-ADN.

En cuanto a la CPT, el resultado que presentó una menor energía se localizó en el punto opuesto a la apertura de la doble cadena de ADN, no existiendo similitud con los datos del gimatecan hasta el sexto resultado. Esta observación sugiere una ambigüedad en el anclaje de la CPT con el complejo LdTopIB-ADN, lo que podría dificultar la acción de la droga durante el anclaje.

Por lo tanto, la existencia de una única configuración de anclaje para el gimatecan, la cual presenta una menor energía que la calculada para la CPT, junto con los resultados experimentales podría explicar la mayor capacidad del gimatecan para inhibir la LdTopIB.

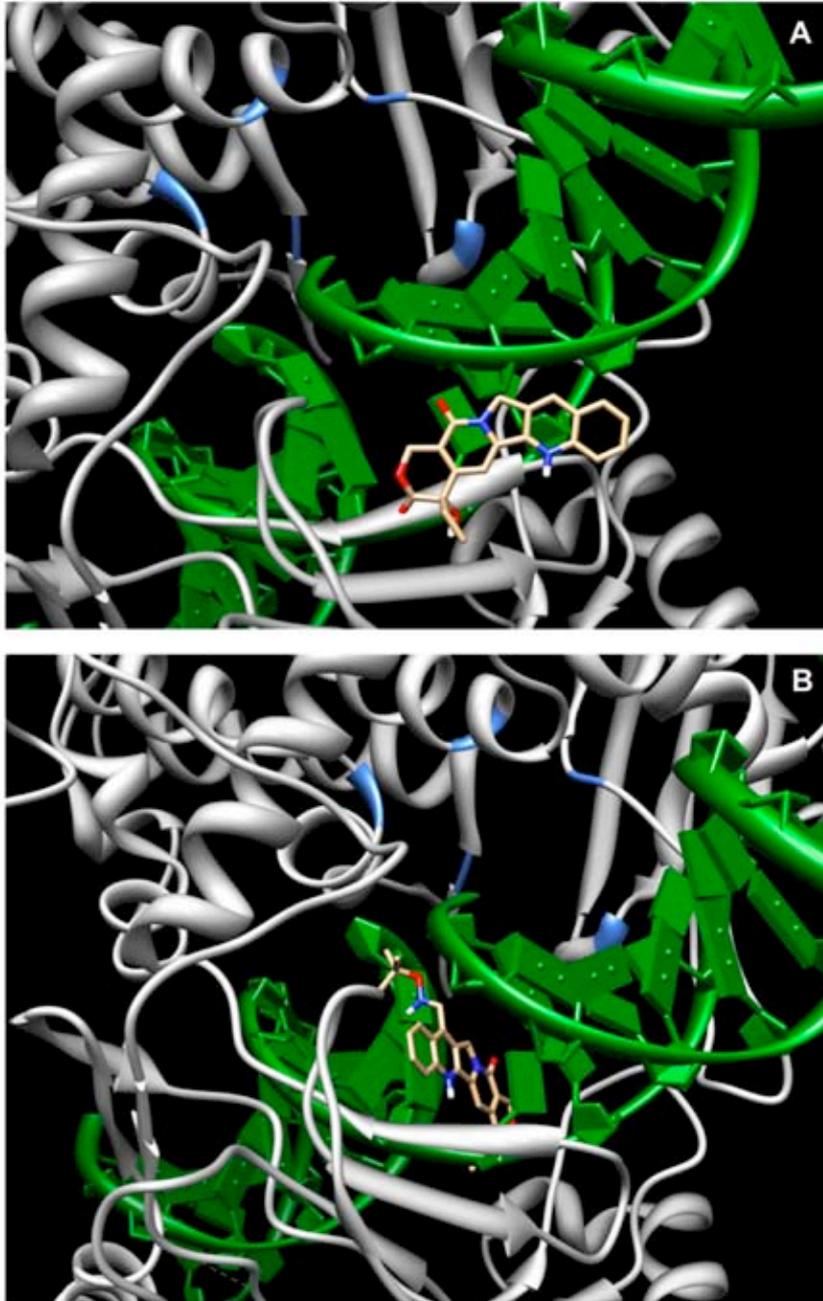


Figura 4.45. Representación de la estructura 3D de los mejores resultados de ensamblaje obtenidos para la interacción de (A) CPT y (B) gimatecan con el complejo de escisión LdTopIB-ADN. Los aminoácidos pertenecientes al centro catalítico de la enzima están coloreados en azul.

4.5.1.6. Efecto de los derivados CPT sobre cultivos de *Leishmania*

Una vez establecida la capacidad tanto de inhibición del proceso global de relajación (inhibidor TopIB) como de estabilización de complejos de escisión (veneno TopIB), se procedió a comprobar el efecto tóxico de estos compuestos sobre cultivos de *Leishmania*. Para ello se utilizaron promastigotes de *L. infantum*, especie endémica del suroeste europeo y más concretamente de España, siendo la responsable en nuestro país tanto de la leishmaniosis canina, como de los casos subclínicos de leishmaniosis críptica y de los casos de leishmaniosis ligadas a inmunosupresión asociados al VIH. La TopIB de *L. infantum* presenta una homología del 99,7% con respecto a la LdTopIB, habiéndose comprobado previamente que la presencia de tres aminoácidos no conservados en toda su estructura no afecta a la capacidad catalítica de la enzima ni a su sensibilidad a inhibidores TopIB.

Se realizaron dos ensayos diferentes: i) efecto inhibidor de los derivados CPT sobre el crecimiento de cultivos de promastigotes y ii) precipitación de complejos CL con SDS/KCl.

Para el cálculo de la IC₅₀ en promastigotes, las células de *L. infantum* fueron crecidas en presencia de diferentes concentraciones de cada uno de los inhibidores durante un periodo de 48 h. El número de células fue determinado mediante un contador Coulter. Para determinar los complejos enzima-ADN formados *in vivo* en promastigotes de *Leishmania* expuestos a diferentes concentraciones de los compuestos seleccionados, se utilizó el método de precipitación con SDS en presencia de KCl frío en células previamente marcadas con [2-¹⁴C] timidina. Las muestras resultantes se analizaron en un contador Beckman LS 6000TA y se aplicó la siguiente fórmula a los datos obtenidos para calcular el porcentaje de formación de CL: [(dpm muestra – dpm control) / dpm ADN total] x 100.

Los porcentajes obtenidos en ambos ensayos fueron representados en forma de curvas dosis-respuesta con el software estadístico SigmaPlot™ 11.3 (Systat Software Inc, UK) lo que permitió el cálculo de los valores IC₅₀ (concentración capaz de matar al 50 % de la población) y MC₅₀ (concentración en

la que el 50 % del ADN está mellado). En la Tabla 4.1 se recogen estos valores junto con los valores IC₅₀ obtenidos en los ensayos de inhibición de la actividad de relajación de LdTopIB y hTopIB, con el fin de facilitar la comparación directa.

TABLA 4.1. Valores de IC₅₀ y de MC₅₀ obtenidos en cultivos de promastigotes de *L. infantum* tras 48 h de cultivo en presencia de los diferentes derivados CPT, así como los valores IC₅₀ de dichos compuestos frente a las enzimas hTopIB y LdTopIB. Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar de tres determinaciones independientes.

| Compuesto | Promastigotes (48 h) | | ADN TopIB | |
|-------------|-----------------------|-----------------------|-------------|--------------|
| | IC ₅₀ (μM) | MC ₅₀ (μM) | hTopIB (μM) | LdTopIB (μM) |
| CPT | 1,12 ± 0,13 | 0,31 ± 0,06 | 2,34 ± 0,2 | 0,25 ± 0,02 |
| CPT-N-óxido | 90,02 ± 1,2 | 4,29 ± 0,73 | 4,90 ± 0,06 | 1,37 ± 0,18 |
| TPT | 10,86 ± 1,64 | 6,16 ± 0,13 | 9,11 ± 0,63 | 0,14 ± 0,01 |
| irinotecan | > 200 | > 90 | n.d. | n.d. |
| SN-38 | 12,20 ± 2,11 | > 90 | 0,99 ± 0,05 | 0,25 ± 0,01 |
| gimatecan | 1,73 ± 0,1 | 0,02 ± 0,01 | 0,30 ± 0,01 | 0,05 ± 0,00 |

n.d. = no disponible

De estos estudios *in vivo* se desprendieron varios resultados interesantes. En primer lugar, los compuestos que presentaron mayor capacidad leishmanicida fueron la CPT y el gimatecan, con resultados de IC₅₀ casi idénticos, con valores en torno a 1 μM. Además, ambos fueron capaces de mellar el 50 % del ADN del promastigote a concentraciones por debajo del rango micromolar. En concreto, el gimatecan fue capaz de alcanzar la MC₅₀ a 20 nM, valor que se acerca bastante a la IC₅₀ en los ensayos de inhibición de la actividad de relajación LdTopIB.

Tanto el TPT como el SN-38 mataron al 50 % de la población de promastigotes a una concentración próxima a 12 μM, sin embargo, los valores de MC₅₀ difirieron enormemente, siendo el del SN-38 20 veces superior al obtenido para el TPT. La CPT-N-óxido, con excepción del irinotecan, fue el derivado CPT menos tóxico para los promastigotes, no existiendo correlación con los valores

observados para la precipitación de complejos covalentes ni con los valores de IC_{50} sobre la enzima purificada.

Finalmente, tal y como era esperado, los resultados obtenidos para el irinotecan fueron negativos para todos los ensayos realizados, confirmando que este profármaco debe ser metabolizado a SN-38 para presentar algún tipo de actividad, ya sea como leishmanicida o como inhibidor TopIB.

4.5.2. Efecto de indenoisoquinolinas sobre la LdTopIB

En la actualidad existen varios estudios prometedores con derivados indenoisoquinolínicos frente a procesos tumorales y más recientemente frente a la tripanosomiasis africana. La inestabilidad química de los derivados CPT, así como la necesidad de drogas más efectivas frente al amplio espectro de formas tumorales, llevó al Dr. Yves Pommier (Center for Cancer Research, NCI, Bethesda, Maryland, USA) al descubrimiento de una nueva estructura capaz de inhibir la hTopIB, la indenoisoquinolina NSC 314622 (Kohlhagen y col., 1998). A partir de ese momento el Dr. Mark Cushman (Department of Medicinal Chemistry and Molecular Pharmacology, Purdue University, West Lafayette, USA) sintetizó más de 300 estructuras indenoisoquinolínicas, varias de ellas con buena actividad anti-TopIB.

4.5.2.1. Efecto sobre la actividad de relajación TopIB

Con el fin de averiguar si estos compuestos podrían ser utilizados para un futuro tratamiento frente a las diferentes formas de leishmaniosis se procedió a evaluar la capacidad de las indenoisoquinolinas recogidas en la Fig. 4.46 como inhibidores LdTopIB.

En primer lugar se realizó un estudio comparativo de la capacidad de inhibir la actividad de relajación del ADN de estas drogas entre la hTopIB y la LdTopIB. Tal y como se muestra en la Fig. 4.47 se observaron resultados muy variables dependiendo de la indenoisoquinolina estudiada. De forma general podemos decir que casi todas presentaron una gran capacidad inhibitoria, siendo en muchos casos superior a la mostrada por la CPT.

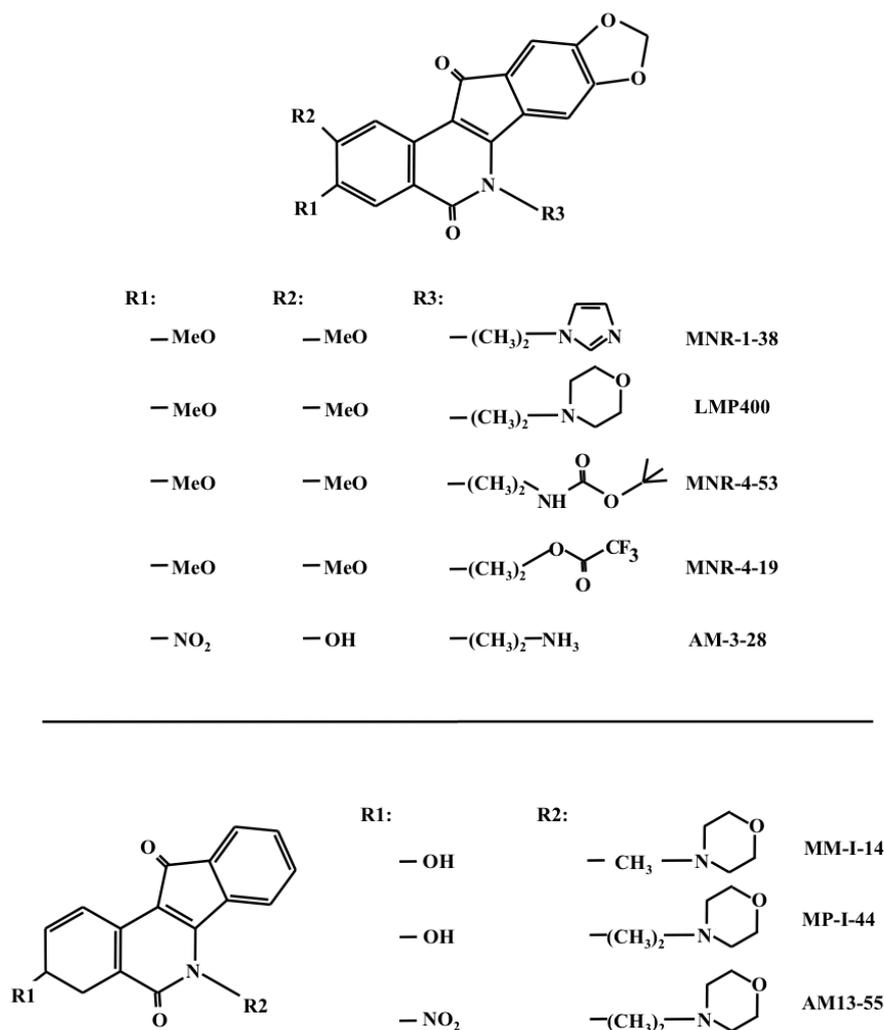
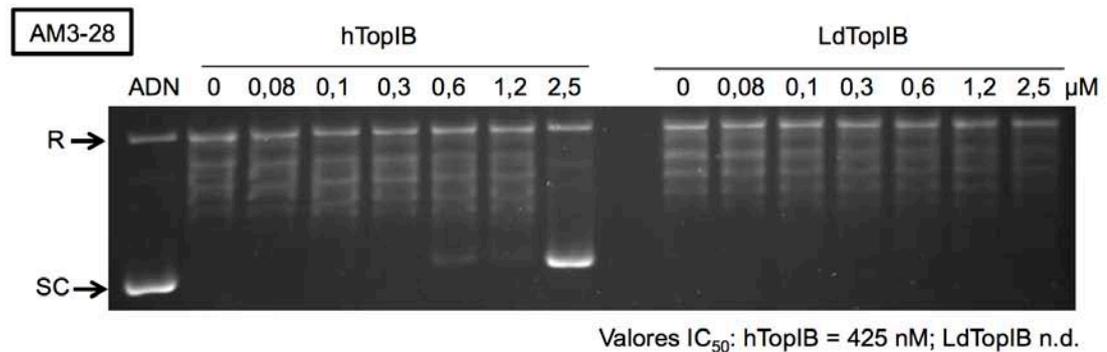
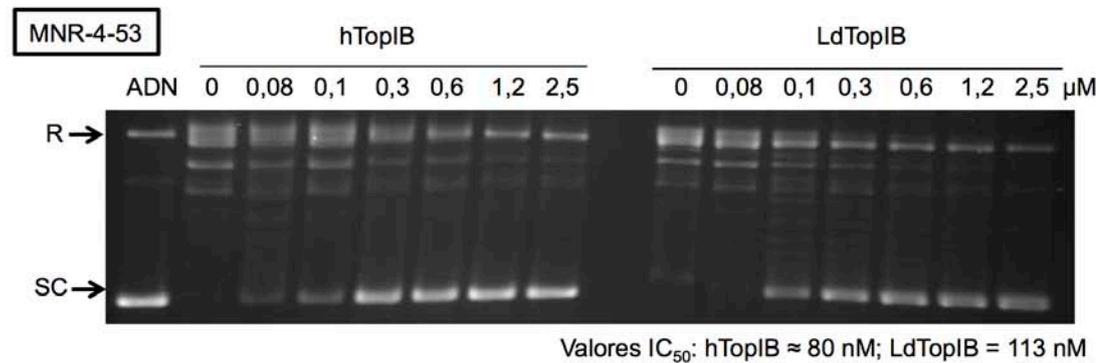
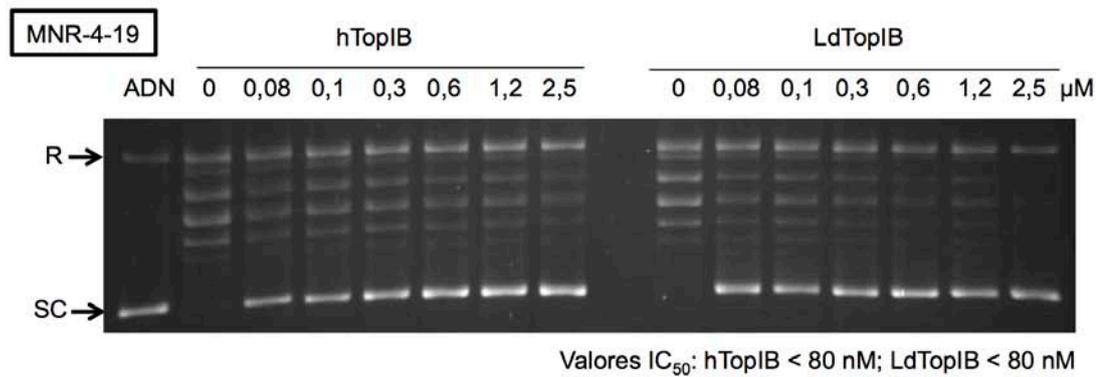
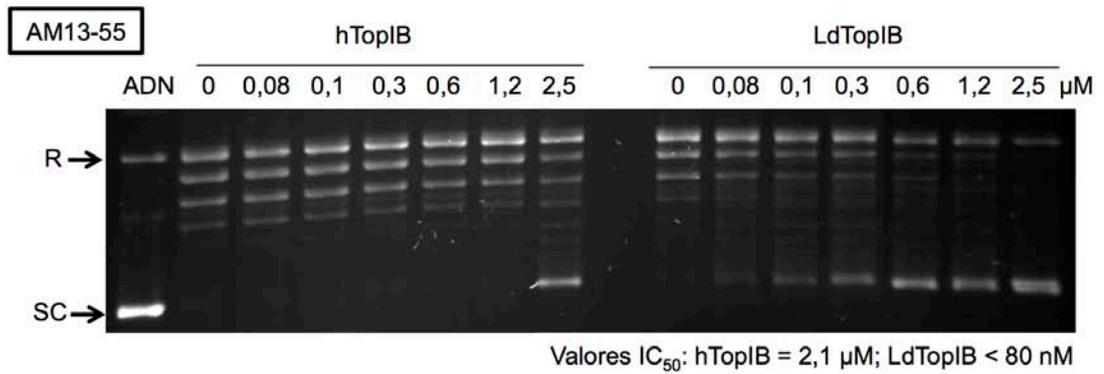


Figura 4.46. Estructura química de los derivados indenoisoquinolínicos sintetizados por el Dr. Mark Cushman que fueron utilizados en el presente estudio.

De entre todas las indenoisoquinolinas ensayadas únicamente dos mostraron una mayor inhibición de la TopIB de *Leishmania* en comparación con la humana. Tanto la AM13-55 como la LMP400 inhibieron la LdTopIB a concentraciones inferiores a 80 nM, respectivamente, mientras que para conseguir un efecto similar en la enzima hTopIB ambas necesitaron unas concentraciones de torno a 2 μ M, tal y como se muestra en los geles de agarosa recogidos en la Fig. 4.47. Dado que éstos fueron los únicos compuestos con un perfil terapéutico favorable en base a la inhibición TopIB, se decidió investigar con más detalle su mecanismo de acción.



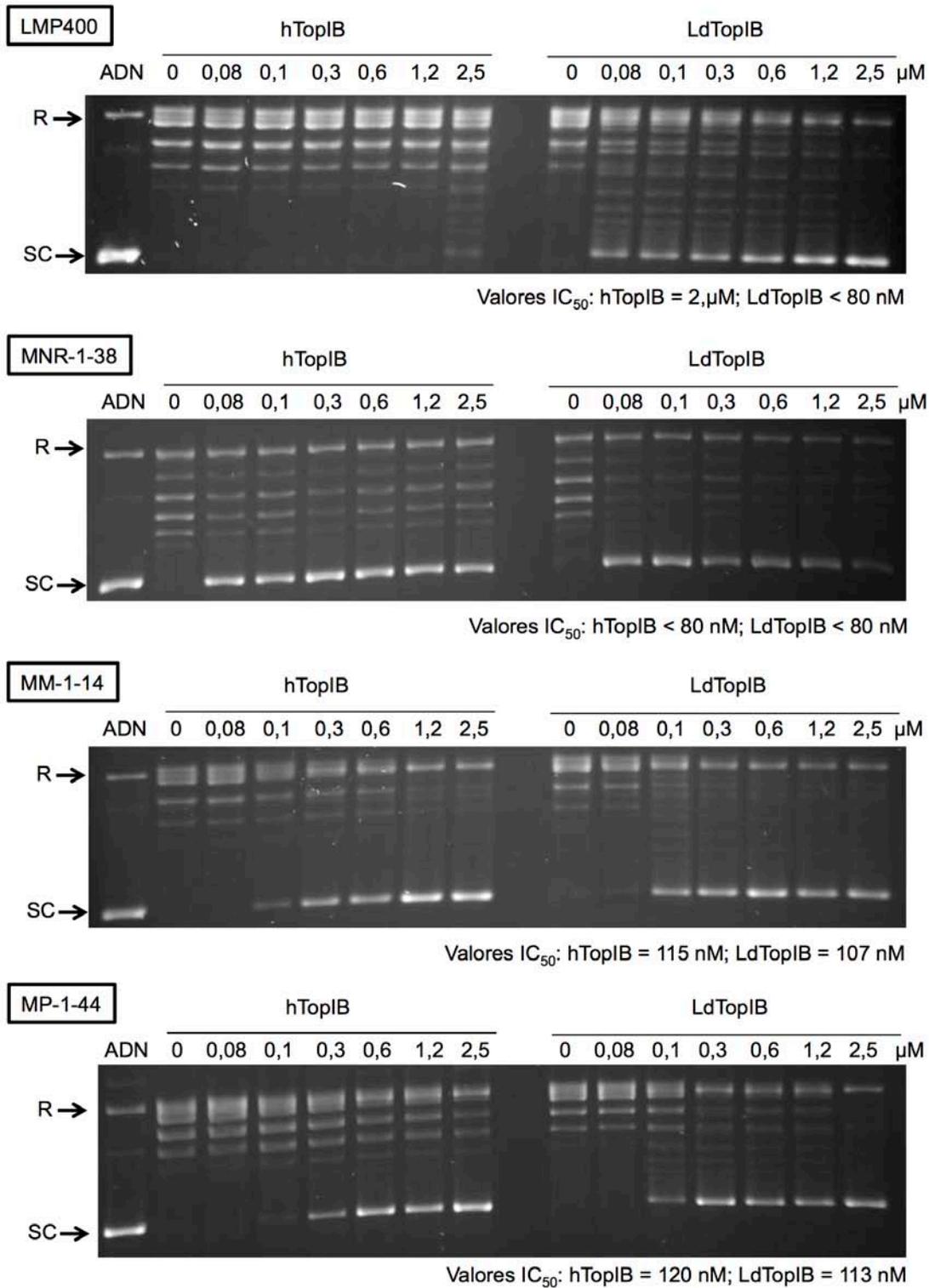


Figura 4.47. Estudio comparativo de inhibición de la actividad de relajación de las enzimas hTopIB y LdTopIB en presencia de las diferentes indenoisoquinolinas. A partir de la cuantificación de las bandas se calcularon los valores de IC_{50} . R: ADN relajado; SC: ADN superenrollado.

4.5.2.2. Estabilización de complejos de LdTopIB-ADN

La Fig. 4.48.A muestra la inducción de complejos CL producidos por el LMP400 y el AM13-55 en presencia de LdTopIB en un ensayo de estabilización de complejos ADN circular con 0,5 μg de plásmido pSK. Tanto el LMP400 como el AM13-55 indujeron la estabilización de complejos CL con un patrón similar al de la CPT, pero mostrando diferencias en sus intensidades relativas. El complejo CL atrapado por el LMP400 mostró la misma intensidad que el producido por la CPT a 100 μM , aunque las intensidades fueron similares también en los rangos inferiores de 0,1 a 10 μM (Fig. 4.48.B). Por otro lado, el complejo de escisión LdTopIB-ADN con el AM13-55 mostró intensidades inferiores pero con un patrón similar a la CPT, siendo en todo caso proporcional a la concentración de droga testada.

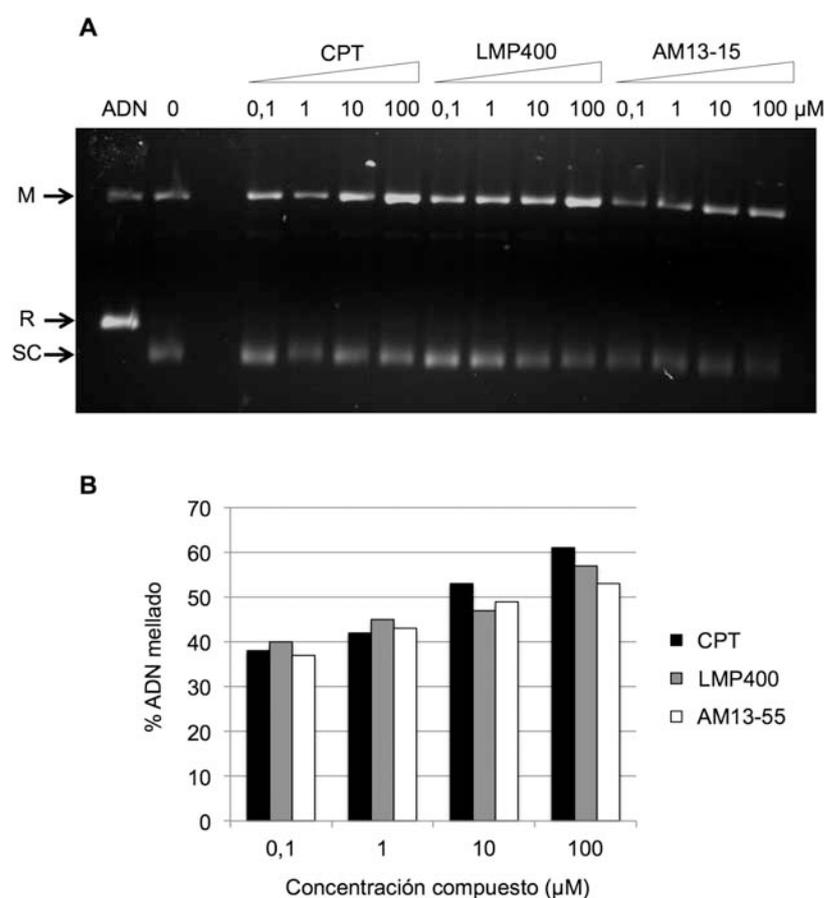


Figura 4.48. (A) Ensayo de estabilización de complejos CL en gel de agarosa mostrando el desplazamiento del equilibrio hacia el estado escindido en presencia de CPT y ambas indenoisoquinolinas. (B) Gráfica enfrentando los porcentajes de ADN mellado con la concentraciones de las diferentes moléculas. R: ADN relajado; SC: ADN superenrollado; M: ADN mellado.

Por todo ello, el aumento de la banda de ADN mellado dependiente de la dosis confirma la naturaleza de inhibidor tipo veneno TopI de ambas indenoisoquinolinas a dosis farmacológicamente relevantes. Además, ambas moléculas son mucho más efectivas en *Leishmania* que en la enzima humana.

4.5.2.3. Efecto sobre una LdTopIB resistente a CPT

Con el fin de evaluar si las regiones implicadas en la sensibilidad a CPT podrían ser las mismas para las indenoisoquinolinas, se realizó un ensayo de estabilización de complejos CL con la enzima truncada LdTopIL¹⁻⁵⁶¹/S^{175end}, capaz de relajar el ADN superenrollado e insensible a la acción de la CPT.

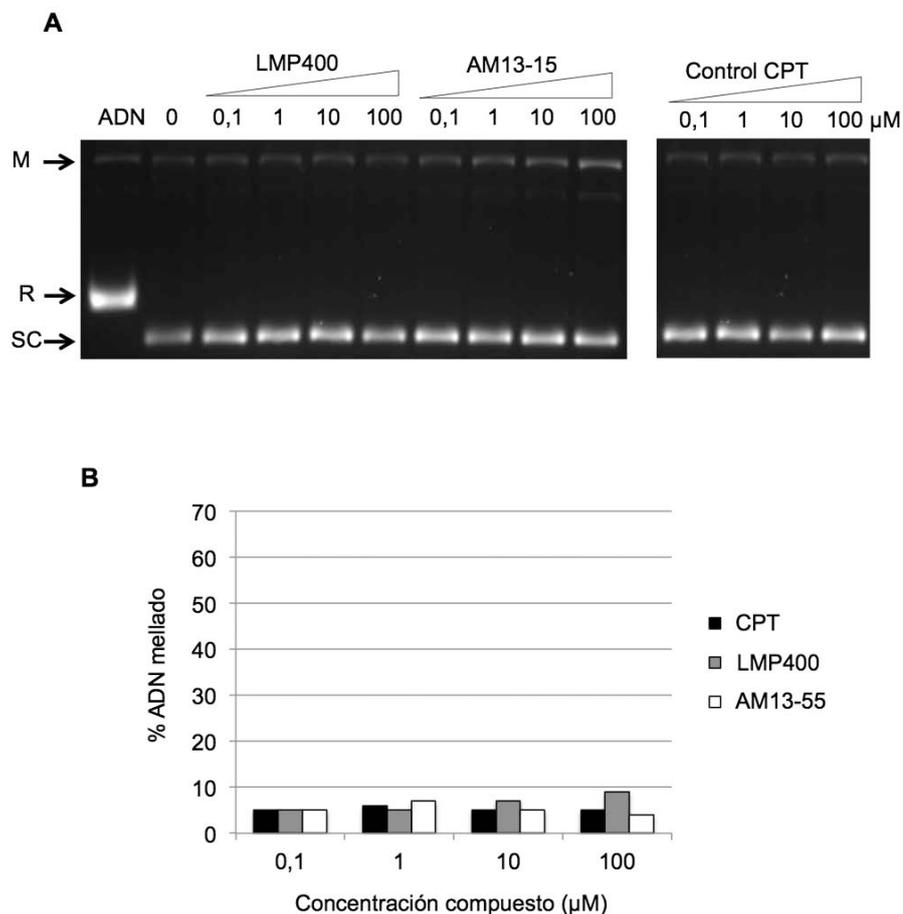


Figura 4.49. (A) Ensayo de estabilización de complejos CL en gel de agarosa mostrando el efecto de la CPT, LMP400 y AM13-55 sobre la forma LdTopIB insensible a CPT. (B) Gráfica enfrentando los porcentajes de ADN mellado con la concentraciones de las diferentes moléculas. R: ADN relajado; SC: ADN superenrollado; M: ADN mellado.

Tal y como muestra la Fig. 4.49 ninguna de las dos indenoisoquinolinas fue capaz de estabilizar los complejos CL generados por la LdTopIL¹⁻⁵⁶¹/S^{175end}, y por lo tanto ambas familias de compuestos, CPT y derivados indenoisoquinolínicos, necesitan la presencia de las mismas regiones de la LdTopIB para llevar a cabo el envenenamiento derivado de la estabilización de los complejos terciarios.

4.5.2.4. Inhibición de cultivos e inducción de CL *in vivo*

Para el cálculo de la IC₅₀ en promastigotes, las células de *L. infantum* fueron crecidas en presencia de diferentes concentraciones de cada uno de los inhibidores durante un periodo de 48 h. El número de células fue determinado mediante un contador Coulter. A partir de las curvas dosis-respuesta se calcularon unos valores de IC₅₀ de 0,10 ± 0,08 µM para el LMP400 y 1,02 ± 0,09 µM para AM13-55. Ambos valores fueron menores a los observados para la CPT, y muy inferiores a los de la paromomicina (42,41 ± 1,65 µM) y la miltefosina (25,15 ± 2,35 µM) que fueron utilizadas como fármacos leishmanicidas de uso clínico.

Seguidamente, se determinó si el LMP400 o el AM13-55 podían inducir complejos CL en cultivos celulares *in vivo*. Para ello se utilizó el método de precipitación de complejos del SDS/KCl. Los promastigotes de *L. infantum*, cuyo ADN había sido marcado con [¹⁴C]-timidina durante 24 h, fueron expuestos durante 30 min a CPT (utilizado como control positivo), LMP400 y AM13-55 en un rango de concentraciones de 0,1 a 90 µM. Tras esta incubación se cuantificaron los complejos proteína-ADN estabilizados mediante el método de precipitación con SDS/KCl. La Fig. 4.50.A muestra como la CPT produjo un incremento de los complejos precipitados de forma proporcional a la concentración de droga añadida, alcanzando un valor máximo en torno al 80 % del ADN total marcado. Sin embargo, ninguna de las indenoisoquinolinas estudiadas exhibió un efecto tan potente a las concentraciones estudiadas. Tanto el LMP400 como el AM13-55 mostraron un claro incremento en la cantidad de complejos proteína-ADN precipitados, pero a diferencia de la CPT, el LMP400 únicamente consiguió inducir la estabilización del 20% del ADN marcado a 10 µM; a esta concentración el AM13-55 alcanzó cerca del 40 %.

Dado que tanto el LMP400 como el AM13-55 son capaces de inhibir la relajación del ADN e inducir la estabilización de complejos TopIB-ADN, se realizó un estudio de competición entre la CPT y ambas indenoisoquinolinas para evaluar el mecanismo primario de acción sobre los cultivos de *Leishmania*. La Fig. 4.50.B muestra como una concentración de 5 μM de ambos compuestos fue incapaz de impedir la estabilización de los complejos TopIB-ADN inducidos por la CPT, y por lo tanto ambas indenoisoquinolinas están actuando como venenos TopIB en vez de establecer interacciones directas con el ADN.

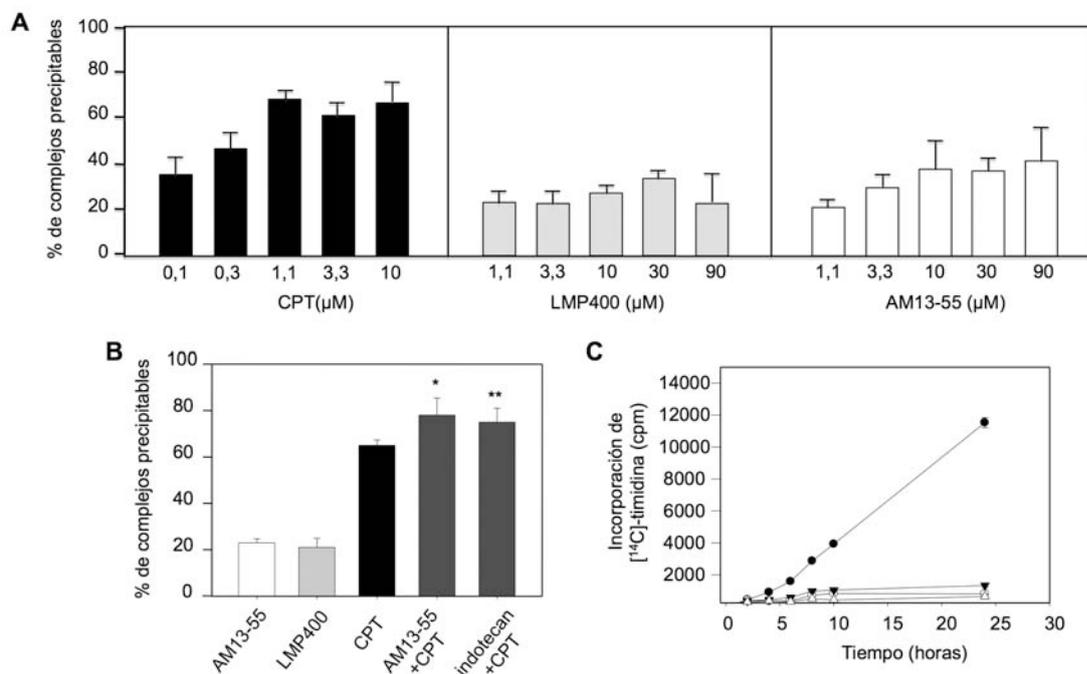


Figura 4.50. Inducción de complejos covalentes e inhibición de la síntesis de ADN por LMP400 y AM13-55 indotecan en cultivos de *L. infantum*. Complejos enzima-ADN precipitados mediante SDS/KCl a concentraciones crecientes de las diferentes drogas a estudiar: (A) CPT, LMP400 y AM13-55, en promastigotes de *L. infantum* después de 30 min de crecimiento en presencia de diferentes concentraciones de droga. (B) LMP400 y AM13-55 incrementan la formación de complejos de escisión inducidos por la CPT. Los promastigotes de *Leishmania* fueron tratados con LMP400 5 μM , AM13-55 5 μM ó CPT 10 μM durante 30 min, ó con LMP400/AM13-55 5 μM 5 min antes de añadir CPT 10 μM , seguido de una incubación adicional de 25 min; (*) $P < 0.01$; (**) $P < 0.05$ utilizando un test de Student pareado; (C) Incorporación de [^{14}C] timidina en el ADN de promastigotes en división en presencia de CPT 1 μM (puntos blancos), AM13-55 1 μM (triángulos blancos), LMP400 1 μM (triángulos negros) y solvente (puntos negros). La cantidad de ADN marcado se expresa como las cpm totales por ensayo a diferentes tiempos (2, 4, 6, 8, 10 y 24 h).

Finalmente, para comprobar si el LMP400 o el AM13-55 producían un arresto en la síntesis de ADN, se incubaron 5×10^6 promastigotes de *L. infantum* en fase exponencial con 0,5 μCi de $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ timidina en presencia CPT 1 μM , AM13-55 1 μM , LMP400 1 μM o DMSO (control). Después de periodos de incubación de 2, 4, 6, 8, 10 y 24 h, se determinó la cantidad de ADN marcado mediante recuento de la radiactividad incorporada en un contador de centelleo líquido. Todos los venenos TopI detuvieron la síntesis de ADN en más de un 90% a todos los tiempos estudiados, no mostrándose grandes diferencias entre ellos (Fig. 4.50.C).

4.5.3. Efecto de ácidos grasos sobre la actividad LdTopIB

En la búsqueda de nuevos agentes con actividad leishmanicida se estableció una colaboración con el grupo de síntesis orgánica del Dpto. de Química de la Univeridad de Puerto Rico (Río Piedras, Puerto Rico, USA), en el que el Dr. Néstor Carballeira y su equipo trabajan en la síntesis total de ácidos grasos insaturados aislados de extractos de organismos marinos con potencial actividad sobre la ADN TopI (Kumaratilake y col., 1992).

Para la presente memoria se realizaron estudios con dos series diferenciadas de derivados: i) se estudio la capacidad leishmanicida de varios ácidos grasos acetilénicos en función de su grado de insaturación, manteniendo fija la longitud de su esqueleto carbonado. Además, se analizó si la metoxilación de estos compuestos producía un incremento en su efecto leishmanicida y/o como inhibidor TopIB, ii) se estudió la influencia de la longitud del esqueleto carbonado en la capacidad de varios ácidos grasos 2-alquinoicos, en sus propiedades tanto leishmanicida como inhibitoria de la LdTopIB.

4.5.3.1. Estudio de ácidos grasos acetilénicos

En primer lugar, se realizaron ensayos de inhibición de la relajación en presencia de los compuestos recogidos en el panel A de la Fig. 4.51, con el objetivo de evaluar la capacidad de inhibición de los ácidos grasos sobre la LdTopIB en

función del grado de insaturación, ya que todos ellos poseen una longitud constante de 17 átomos de carbono.

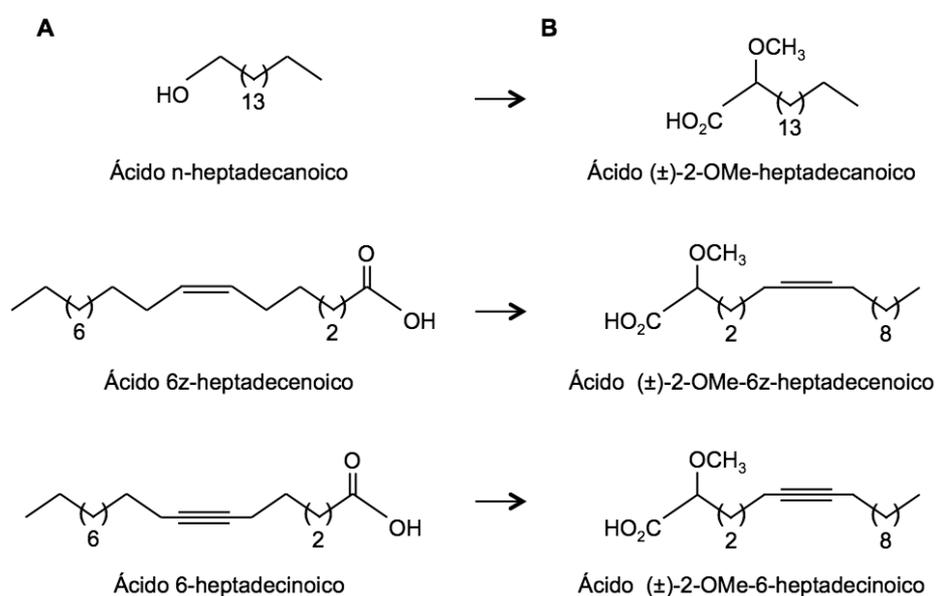


Figura 4.51. Estructura química de los ácidos grasos acetilénicos utilizados en el presente estudio en su forma natural (A) y en la forma metoxilada (B), ordenados de forma ascendente en función de su grado de insaturación.

Para ello se incubaron diferentes concentraciones de los ácidos grasos n-heptadecanoico, 6z-heptadecenoico y 6-heptadecinoico en presencia de 0,5 µg de ADN pSK y 1 U LdTopIB durante 30 min a 37 °C. Tal y como muestran los geles de agarosa recogidos en la Fig. 4.52 todos los ácidos inhibieron la LdTopIB. Sorprendentemente, se observó que la concentración a la que se producía la inhibición de la relajación era proporcional al grado de insaturación, siendo el ácido n-heptadecanoico el menos activo con una LdTopIB IC₅₀ >1000 µM y el ácido 6-heptadecinoico el más activo con un valor de IC₅₀ de 71,7 µM. Finalmente el ácido 6z-heptadecenoico presentó un valor de IC₅₀ de 80,4 µM.

Al igual que en el caso del resto de compuestos se realizó un análisis de la capacidad leishmanicida de los ácidos grasos frente a promastigotes de *L. donovani*. Los valores de IC₅₀ fueron superiores a los obtenidos frente a la TopIB, con excepción del ácido 6-heptadecinoico que presentó valores de inhibición

inferiores *in vivo*. No obstante, al igual que en los ensayos enzimáticos, mostraron una clara actividad dependiente del grado de insaturación. El ácido n-heptadecanoico fue el menos efectivo con un valor de IC_{50} superior a 1 mM. Los ácidos grasos insaturados 6z-heptadecenoico y 6-heptadecinoico presentaron valores de IC_{50} mucho menores, 280 y 25,1 μ M respectivamente (Tabla 3.2).

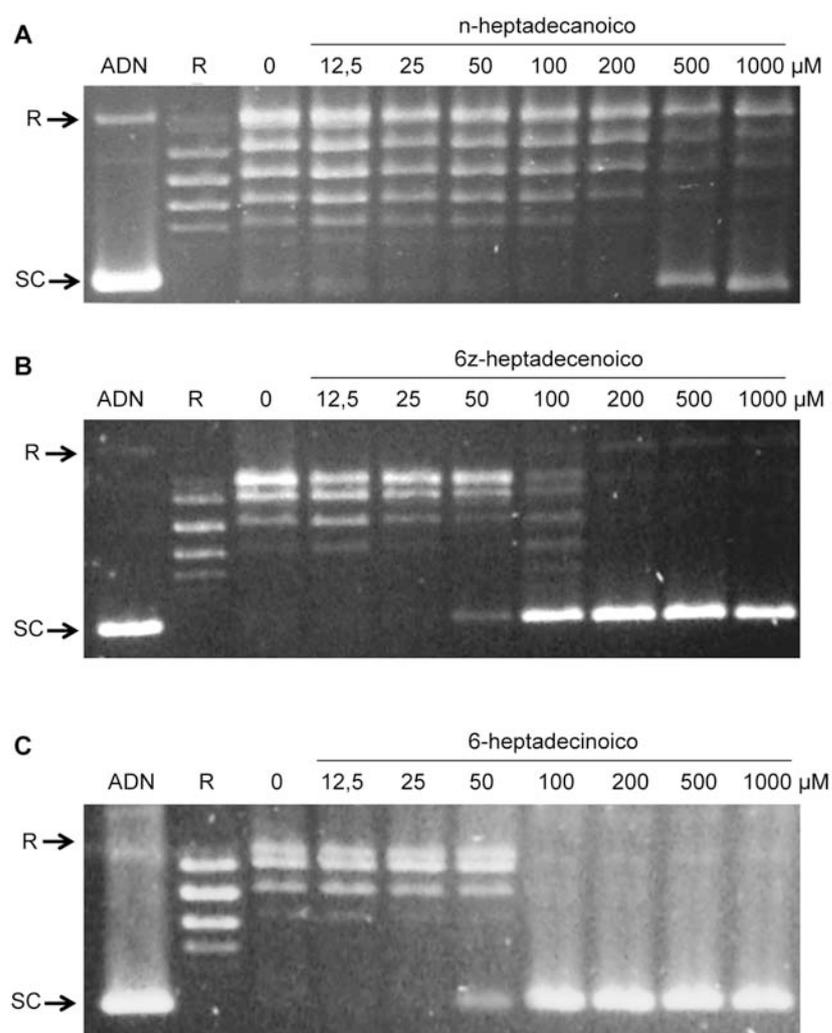


Figura 4.52. Estudios de inhibición de la actividad de relajación de la enzima LdTopIB en presencia de diferentes concentraciones los ácidos grasos n-heptadecanoico, 6z-heptadecenoico y 6-heptadecinoico. R: ADN relajado; SC: ADN superenrollado.

Con el objetivo de evaluar el efecto de una metoxilación en posición α de los ácidos grasos acetilénicos en el potencial inhibitorio y leishmanicida, el Dr. Carballeira generó una nueva serie de ácidos grasos metoxilados que se recogen en el panel B de la Fig. 4.51. Además, esto permite comprobar el efecto sobre la actividad LdTopIB de un triple enlace frente a uno doble, ya que el número de átomos de carbono del esqueleto carbonado se mantuvo invariable en estos nuevos ácidos grasos.

Tal y como se muestra en la Tabla 4.2, el ácido (\pm)-2-OMe-6-heptadecinoico fue el inhibidor más efectivo con un valor de IC_{50} de $16,6 \mu\text{M}$ (Fig. 4.53).

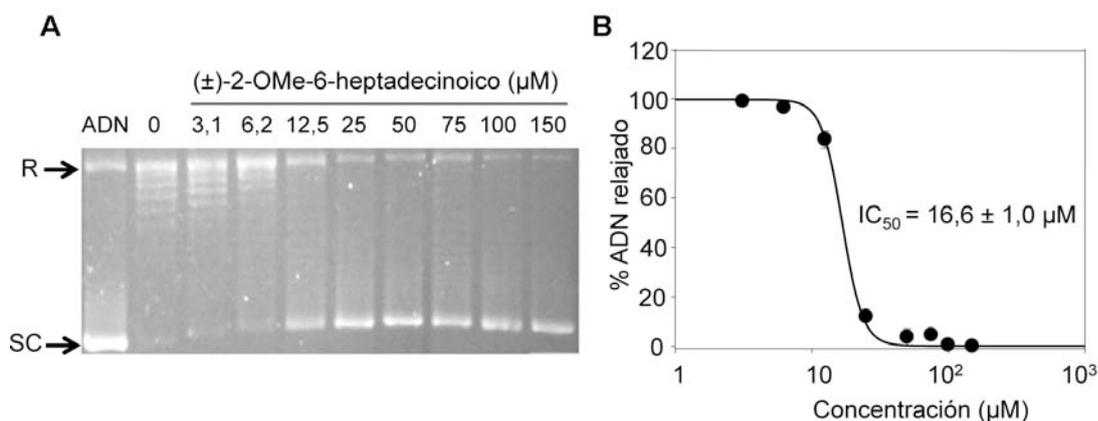


Figura 4.53. Inhibición de la actividad de relajación de LdTopIB en presencia del ácido (\pm)-2-OMe-6-heptadecinoico (A) y su gráfica correspondiente de la actividad de relajación (%) frente a diferentes concentraciones del ácido graso acetilénico.

La Tabla 4.2 muestra que la efectividad de inhibición sobre la LdTopIB siguió el orden: (\pm)-2-OMe-6-heptadecinoico > (\pm)-2-OMe-6z-heptadecenoico > (\pm)-2-OMe-heptadecanoico. Ya que la longitud de la cadena (C17) y la posición de la insaturación en la posición C-6 se mantuvieron constantes, se puede concluir que la metoxilación en posición α parece mejorar el potencial inhibitorio de los ácidos grasos de C17 frente a la LdTopIB. Además, igual que se vio en las formas no metoxiladas, la presencia de insaturaciones aumenta la capacidad de inhibición de estos derivados acetilénicos, observándose una clara disminución de la actividad siguiendo el orden triple enlace \geq doble enlace \gg enlace sencillo.

TABLA 4.2. Inhibición de la actividad de relajación de la enzima LdTopIB y actividad leishmanicida de los ácidos grasos estudiados. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de tres determinaciones independientes.

| Ácido graso | LdTopIB IC ₅₀ (μM) | Promastigotes IC ₅₀ (μM) |
|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| n-heptadecanoico | > 1000 | > 1000 |
| (±)-2-OMe-heptadecanoico | > 1000 | > 1000 |
| 6z-heptadecenoico | 80,4 \pm 9,3 | 280 \pm 7,8 |
| (±)-2-OMe-6z-heptadecenoico | 41,3 \pm 5,6 | 404,1 \pm 11,9 |
| 6-heptadecinoico | 71,7 \pm 3,8 | 25,1 \pm 1,4 |
| (±)-2-OMe-6-heptadecinoico | 16,6 \pm 1,0 | 74,0 \pm 17,1 |

En base a los estudios enzimáticos, se procedió a explorar la actividad leishmanicida de los ácidos grasos 2-metoxilados frente a los promastigotes de *L. donovani*, tal y como se hizo con las formas no metoxiladas (comparación en Tabla 3.2.). De entre todos los ácidos grasos 2-metoxilados, el (±)-2-OMe-6-heptadecinoico fue el más efectivo frente a los promastigotes con una IC₅₀ de 74,0 μM. Cuando se comparó con el ácido 6-heptadecinoico (IC₅₀ 25,1 μM), se observó que la metoxilación en posición α, supone una disminución de la toxicidad del ácido 6-heptadecinoico en *L. donovani*.

El resultado obtenido para los ácidos 6z-heptadecenoico y (±)-2-OMe-6z-heptadecenoico fue llamativo ya que tuvieron muy poca eficacia frente a los promastigotes en comparación con su capacidad, relativamente buena, para inhibir la LdTopIB *in vitro*. Esto indicaría que el potencial leishmanicida de estos ácidos grasos depende de la presencia de un triple enlace. Esta observación se vio confirmada por los resultados obtenidos tanto para el ácido (±)-2-metoxiheptadecanoico como para el *n*-heptadecanoico, ya que ambos carecieron de actividad frente al parásito.

4.5.3.2. Estudio de ácidos grasos 2-alquinoicos

Son varios los ácidos grasos 2-alquinoicos que han mostrado actividad antiprotozoaria y/o inhibición de enzimas de diversos protozoos. Por ejemplo, Tasdemir y col. (2010) demostraron la capacidad antiprotozoaria del ácido 2-hexadecinoico y vieron que inhibía de forma efectiva las enzimas de la síntesis de ácidos grasos FAS-II de *Plasmodium*, además de detener el desarrollo de sus fases eritrocitarias y hepáticas en infecciones experimentales.

Estos resultados previos nos animaron a estudiar el posible potencial leishmanicida de tres ácidos grasos 2-alquinoicos con distinta longitud de su esqueleto carbonado: 2-octadecinoico (2-ODA), 2-hexadecinoico (2-HDA) y 2-tetradecinoico (2-TDA), en función de la longitud de su cadena carbono (Fig. 4.54). Además se estudió su posible efecto inhibitorio sobre la actividad LdTopIB en comparación con su homóloga humana.

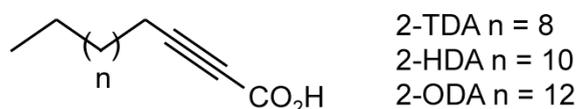


Figura 4.54. Estructura de los ácidos grasos insaturados 2-alquinoicos utilizados en el presente estudio.

TABLA 4.3. Valores de IC_{50} de la Inhibición de la actividad de relajación de las enzimas LdTopIB y hTopIB, y actividad leishmanicida de los ácidos grasos estudiados en cultivos de promastigotes de *L. donovani*. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de tres determinaciones independientes.

| Ácido graso | LdTopIB | hTopIB | <i>L. donovani</i> |
|-------------|------------------------|----------------|------------------------|
| 2-TDA | 67,8 \pm 1,1 μ M | > 100 | 27,2 \pm 0,9 μ M |
| 2-HDA | 28,7 \pm 1,3 μ M | > 100 | 20,9 \pm 3,1 μ M |
| 2-ODA | 5,3 \pm 0,7 μ M | 51,9 \pm 1,0 | 11,0 \pm 0,0 μ M |

Tal y como muestra la Tabla 4.3, de entre los tres ácidos grasos 2-alquinoicos, el 2-ODA mostró mayor eficacia que el resto de compuestos frente a los cultivos de *L. donovani*, con un valor de IC_{50} de 11,0 μM , seguido por el 2-HDA (IC_{50} de 20,9 μM) y finalmente el 2-TDA (IC_{50} de 27,2 μM). Por lo tanto, la eficacia leishmanicida de la serie de ácidos grasos 2-alquinoicos fue la siguiente: 2-ODA > 2-HDA > 2-TDA.

El siguiente paso fue evaluar la capacidad de estos compuestos para inhibir la capacidad de relajación de la LdTopIB, además y a modo comparativo se realizó el mismo estudio con la enzima homóloga recombinante hTopIB. Tal y como se esperaba, el 2-ODA fue el mejor inhibidor de la LdTopIB con un valor de IC_{50} de 5,3 μM (Fig. 4.55), seguido por el 2-HDA con una de IC_{50} de 28,7 μM . Por lo tanto la efectividad de inhibición siguió el orden 2-ODA > 2-HDA > 2-TDA. Esta tendencia se correlaciona muy bien con la toxicidad mostrada por estos ácidos grasos sobre los cultivos de *Leishmania infantum*.

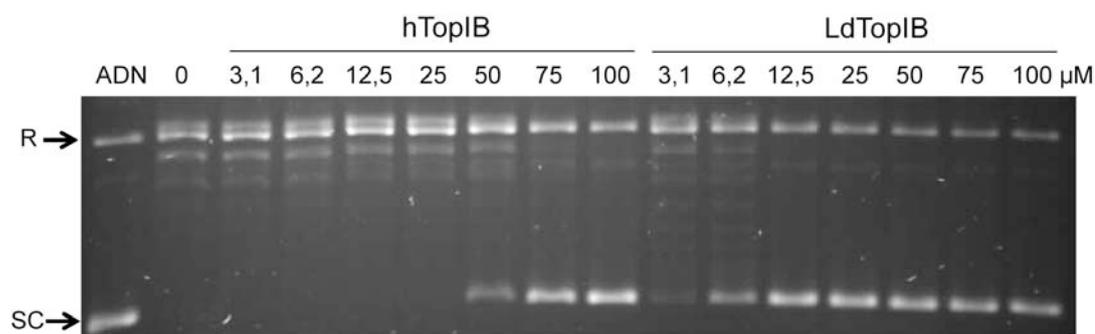


Figura 4.55. Comparación de la inhibición de la relajación de la TopIB humana (izquierda) y la TopIB de *Leishmania* (derecha) por el 2-ODA. Se incubó una unidad de hTopIB/LdTopIB en presencia de concentraciones crecientes de 2-ODA y 0,5 μg de ADN pSK durante 30 min a 37 °C. R: ADN relajado; SC: ADN superenrollado.

De la misma forma se realizaron estudios de inhibición sobre la actividad de relajación de la hTopIB. Los valores se encuentran recogidos en la segunda columna de la Tabla 3.3 a fin de facilitar la comparación directa. Mientras que el 2-ODA fue capaz de inhibir la LdTopIB a 5,3 μM , fue mucho menos efectivo frente a la hTopIB (51,9 μM). De hecho, ni el 2-TDA ni el 2-HDA fueron capaces de inhibir la

hTopIB a 100 μM . Estos resultados muestran claramente que se podría inhibir de forma preferente la LdTopIB sin causar efecto sobre la enzima humana.

Con el fin de comprender de una forma más precisa la forma en que estos ácidos grasos inhiben la LdTopIB, se decidió comparar su mecanismo de acción con el de la CPT. Para ello se eligió el compuesto 2-HDA, que a pesar de que no fue el mejor inhibidor de la enzima de *Leishmania*, no inhibió la enzima humana a ninguna de las concentraciones estudiadas.

Tal como se aprecia en la Fig. 4.56 el 2-HDA inhibe la actividad catalítica de la LdTopIB a una concentración de 100 μM , pero no de la hTopIB. Sin embargo, en el panel A se ve como la presencia de 2-HDA incrementa la estabilización de los complejos de CL entre la CPT y la hTopIB (4º carril bajo hTopIB). Sin embargo, en el caso de la enzima de *Leishmania* se observa como la presencia de 2-HDA es capaz de desestabilizar los complejos CL establecidos entre la LdTopIB-ADN y la CPT (Fig. 4.56.A, 4º carril bajo LdTopIB). Para profundizar más en este descubrimiento con el 2-HDA, se realizaron dos experimentos en paralelo. En el primero, a modo de control, se hizo reaccionar la LdTopIB con el ADN superenrollado durante 15 min a 4 °C en presencia de 100 μM CPT en DMSO, mientras que en un segundo experimento se pre-incubó durante 15 min la enzima en presencia de un exceso de 2-HDA (100 μM), tras lo cual se añadió 100 μM CPT. En ambos casos se realizó un ensayo de relajación a diferentes tiempos desde 0,5 hasta 15 min. El panel izquierdo de la Fig. 4.56.B muestra como la CPT inhibió la actividad LdTopIB de forma reversible cuando se realizó la pre-incubación en presencia de DMSO (control), y transcurridos 4 min la banda correspondiente al ADN superenrollado perdió intensidad en detrimento de la banda de ADN relajado que se volvió mucho más intensa. Además, la banda de ADN mellado de la Fig. 4.53 B (izquierda) aumentó en intensidad debido a la estabilización de los complejos de CL (efecto de la CPT como veneno TopIB). El panel derecho de la Fig. 4.56.B muestra el ensayo en el que se realizó la pre-incubación de la LdTopIB con 100 μM 2-HDA antes de añadir 100 μM CPT. Se observaron dos aspectos importantes: i) no se produjo relajación del ADN superenrollado, ii) la presencia de 100 μM CPT no ocasionó un incremento apreciable de la banda de ADN mellado, por lo que la CPT no fue capaz de estabilizar complejo terciario alguno.

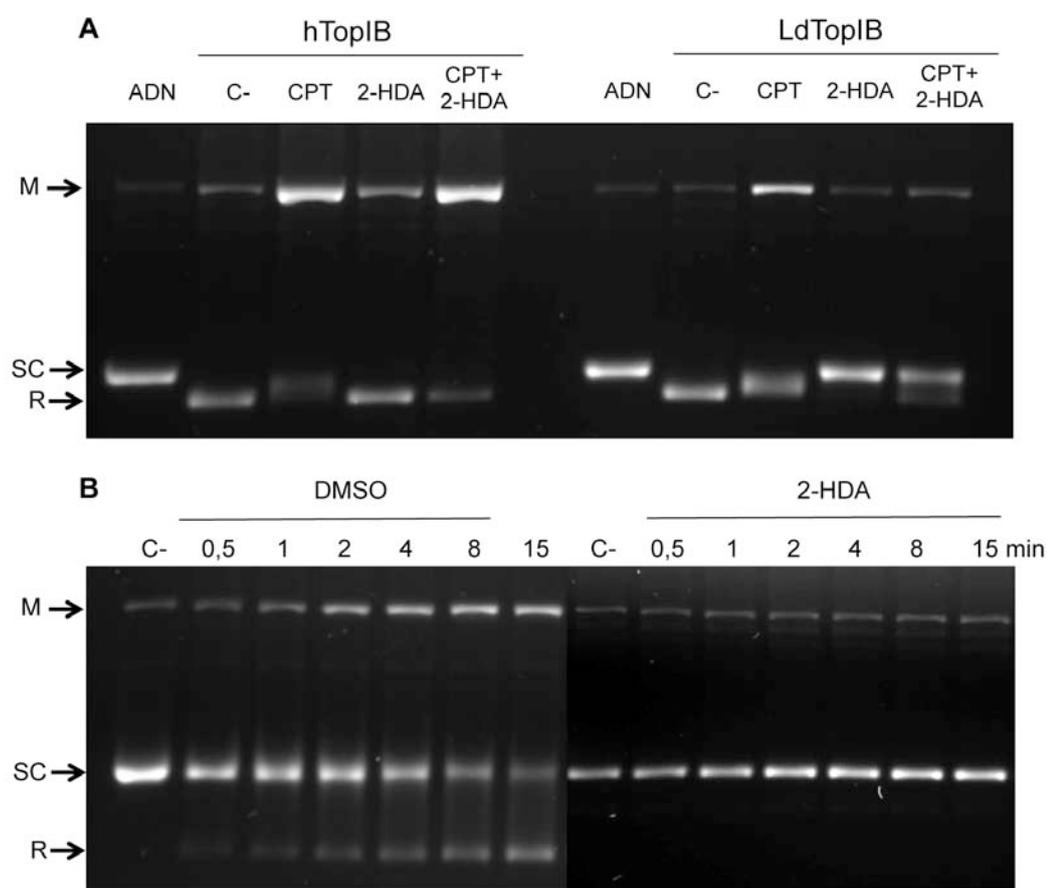


Figura 4.56. (A) Ensayo de detección de complejos de CL en presencia de un plásmido superenrollado comparando el efecto de la CPT y el 2-HDA sobre las actividades catalíticas de la hTopIB (izquierda) y la LdTopIB (derecha). (B) Ensayo de inhibición competitiva entre el 2-HDA y la CPT. En el gel de la izquierda se pre-incubó la enzima en presencia de ADN y DMSO antes de la adición del exceso de CPT. En el gel de la derecha se realizó la pre-incubación en presencia de un exceso de 2-HDA antes de añadir la CPT y proceder a la determinación de la actividad a los diferentes tiempos mostrados para cada carril. M: ADN mellado, SC: ADN superenrollado, R: ADN relajado.

En este punto todo pareció indicar que el ácido graso estaba interfiriendo con la actividad de corte de la enzima. Para comprobar esta hipótesis se llevó a cabo un ensayo de “oligonucleótido suicida”, en el que se hizo reaccionar el sustrato (20 nM del oligonucleótido CL14/CP25) con un exceso de 2-HDA (100 μ M) que había sido pre-incubado previamente durante 15 min a 4 °C con 100 U de LdTopIB. Tal y como se muestra en la Fig. 4.57 la enzima es capaz de cortar casi la totalidad del sustrato dentro del primer minuto de reacción. Sin embargo, cuando se realiza el mismo ensayo en presencia de 2-HDA la LdTopIB es incapaz de cortar el

ADN, observándose únicamente niveles residuales de actividad. Por lo tanto se confirmó que el mecanismo de acción del 2-HDA sobre la actividad de LdTopIB es debido a la incapacidad de la enzima para realizar con normalidad el ataque nucleofílico que produce el corte de una de las hebras del ADN.

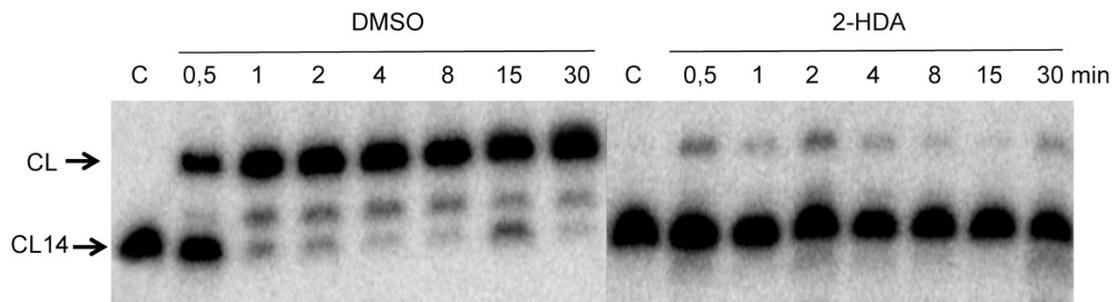


Figura 4.57. Cinética de escisión con el sustrato “suicida” CL14/CP25 para la LdTopIB después de una pre-incubación (15 min a 4 °C ausencia del sustrato) con DMSO (panel izquierdo) y tras la pre-incubación con 2-HDA 100 μ M (panel derecho). No se añadió proteína al primer carril de los geles desnaturalizantes. CL1 representa el fragmento de ADN escindido debido al corte mediado por la LdTopIB en el sitio preferencial. CL14 representa el sustrato oligonucleotídico que permanece intacto.

Por último, se comprobó si las regiones que confieren sensibilidad tanto a los derivados CPT como a los compuestos con estructura indenoisoquinolínica eran esenciales para que la enzima mostrase una sensibilidad completa a los ácidos grasos estudiados. Para ello se realizaron ensayos comparativos entre la enzima salvaje LdTopIB y la enzima truncada LdTopIL^{1-561/S}^{175end}.

Tal y como se muestra en la Fig. 4.58.A el ácido 2-HDA fue capaz de inhibir de forma idéntica tanto a la enzima salvaje (panel izquierdo) como a la construcción insensible a CPT (panel derecho). Además, en el ensayo de detección de complejos CL de la Fig. 4.58.B, se ve la incapacidad de la CPT tanto para inhibir la actividad de la LdTopIL^{1-561/S}^{175end} como para inducir un aumento de la banda de ADN mellado. Sin embargo, en ambos geles se observa como la presencia de 2-HDA 100 μ M impide la acción de ambas enzimas, ya que únicamente se aprecia la banda correspondiente al ADN superenrollado. Por todo ello, el 2-HDA produce la inhibición de la enzima en el primer paso catalítico (escisión de la cadena), a diferencia de los derivados CPT e indenoisoquinolinas que actúan estabilizando los

complejos de escisión generados por el corte de la enzima en una de las hebras de ADN, impidiendo o retrasando el paso de religación.

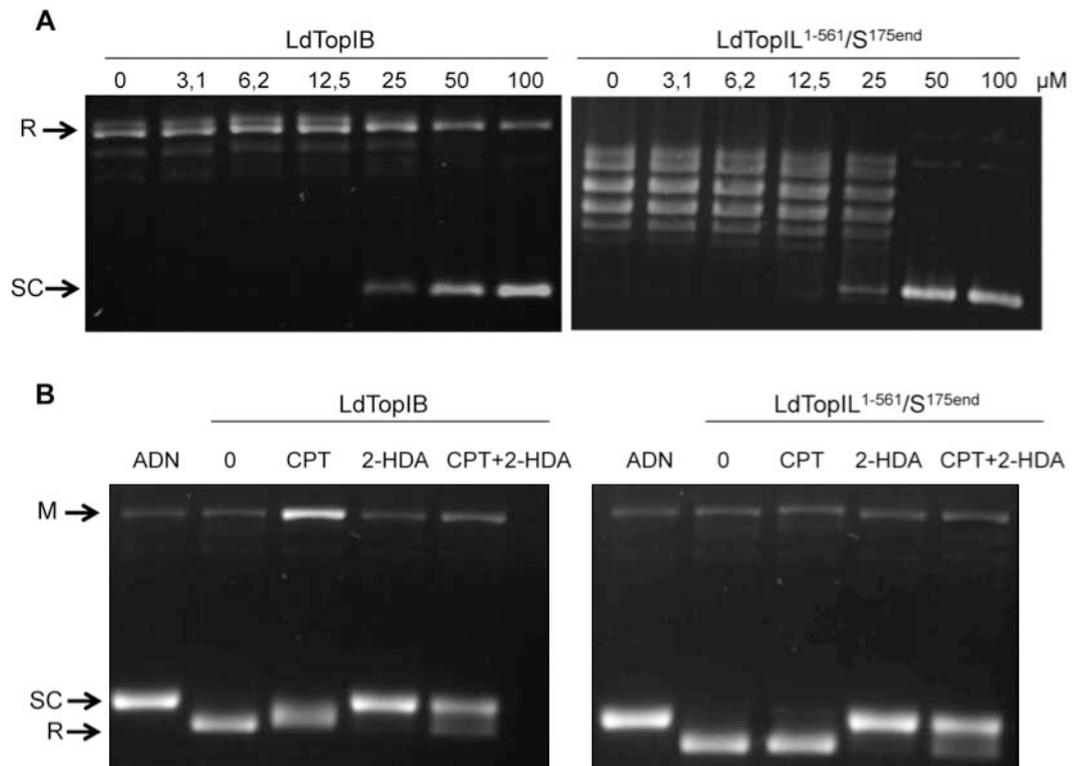
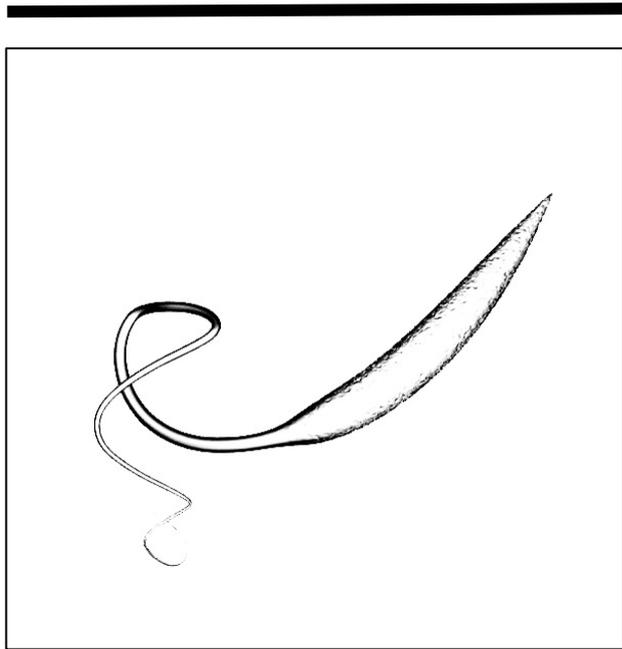


Figura 4.58. (A) Ensayo de inhibición de relajación mediada por la enzima salvaje LdTopIB (izquierda) y LdTopIL¹⁻⁵⁶¹/S^{175end} resistente a CPT (derecha) en presencia de concentraciones creciente de 2-HDA. (B) Ensayo de detección de complejos de CL en presencia de un plásmido superenrollado comparando el efecto de la CPT y el 2-HDA sobre las actividades catalíticas de la LdTopIB (izquierda) y LdTopIL¹⁻⁵⁶¹/S^{175end} (derecha). M: ADN mellado; SC: ADN superenrollado; R: ADN relajado.



5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Las leishmaniosis se encuadran dentro de las enfermedades tropicales olvidadas o NTDs (Neglected Tropical Diseases), cuya prevalencia es mucho mayor en países subdesarrollados o en vías de desarrollo. Sin embargo, los países desarrollados, en los que se pensaba que estas enfermedades habían sido erradicadas desde hace años, están comenzando a sufrir cada vez más casos de leishmaniosis. Esto se puede deber principalmente al aumento del turismo, tropas destinadas en áreas endémicas, flujos migratorios, y probablemente a los cambios climáticos actuales (Ready, 2010; Schwartz y col., 2006). Durante décadas, se ha utilizado como primera línea de tratamiento los ya desfasados derivados del Sb^V (Aït-Oudhia y col., 2011). Aunque recientemente se han introducido nuevos fármacos más seguros y de mayor efectividad para remplazar a los Sb^V, éstos siguen siendo tóxicos, producen una rápida aparición de resistencias, y en algunos casos no pueden ser administrados durante la gestación (Bhattacharya y col., 2007; Berman y col., 2005). Debido a esto, la búsqueda de nuevos compuestos frente a estas enfermedades se ha vuelto una prioridad ya que la posibilidad de generar vacunas efectivas a corto plazo es remota. A principios de este siglo, se identificaron las TopIB como dianas potenciales de intervención terapéutica frente a *Leishmania* y otros tripanosomátidos (Bakshi y Shapiro, 2003; Balaña-Fouce y col., 2006; Balaña-Fouce y col., 2008). La elección de esta nueva diana se basa principalmente en dos razones: i) la expresión de la enzima es muy elevada durante la rápida replicación del parásito, de forma similar a lo observado en el caso de las células tumorales, y especialmente ii) la enzima del patógeno difiere estructuralmente de la del hospedador (Villa y col., 2003).

En el presente trabajo se ha realizado un estudio exhaustivo de las regiones no conservadas de la LdTopIB, así como de las secuencias específicas implicadas en la translocación de la proteína al interior del núcleo. Finalmente se ha evaluado el efecto de tres familias de compuestos: derivados CPT, indenoisoquinolinas y

ácidos grasos sobre la actividad catalítica de la enzima, así como su efecto leishmanicida en cultivos de promastigotes.

5.1. DOMINIO LINKER DE LdTopIB: ACTIVIDAD Y SENSIBILIDAD A CPT

A pesar del bajo grado de homología con la enzima humana (únicamente del 39%), la mayoría de los dominios relacionados con la actividad LdTopIB presentan un elevado grado de conservación. El monómero correspondiente a la LdTopIL contiene el extremo N-terminal no conservado y la región *core* altamente conservada. A partir de este motivo, la proteína pierde drásticamente toda homología con otras TopIB, particularmente en su extremo C-terminal. La LdTopIS posee un extremo N-terminal no conservado, mientras que en el C-terminal se localiza el motivo “SKxxY” presente en todas las TopIB, y en la mayoría de las tirosina recombinasas. Dentro de este motivo se encuentra la Tyr-222 que realiza la función de corte de la hebra de ADN sustrato (Balaña-Fouce y col., 2006).

Hasta la realización de la presente Memoria, y a pesar de todas las similitudes estructurales, la región responsable de formar el dominio *linker* – una extensión que conecta el *core* con el dominio C-terminal de todas las TopIB – no había sido definido en *Leishmania* (Díaz-González y col., 2008). Esta región no es imprescindible para la actividad TopIB, pero contribuye tanto a la unión con el ADN como a la sensibilidad a los venenos TopIB, probablemente aumentando de la rigidez de la estructura y frenando el proceso de rotación previo a la religación de la hebra escindida (Stewart y col., 1997). Además, las regiones responsables de la interacción entre ambas subunidades no habían podido ser identificadas hasta la fecha, ya que la estructura derivada de la cristalización de la LdTopIB en complejo con el ADN disponible, no incluye las regiones no conservados filogenéticamente. La falta de información dificulta enormemente la creación de modelos 3D que permitan un estudio estructura-función preciso de la enzima de *Leishmania* (Davies y col., 2006). Son varios los autores que han demostrado que si una estructura es desconocida, el modelado por homología puede proporcionar modelos útiles para estudios predictivos posteriores (Baker y Sali, 2001). En concreto, en el presente

estudio (Prada y col., 2012), la estructura modelada, a pesar de no ser lo suficientemente precisa para realizar una caracterización completa de la enzima a partir de su análisis, sirvió para delimitar pequeñas zonas específicas de interacción entre subunidades y diseñar mutaciones concretas, de forma similar al trabajo realizado por Vernal y col. (2002) con la enzima alfa-hidroxiácido deshidrogenasa de *T. cruzi*.

Por otra parte los estudios sobre la estructura secundaria realizados por alineamiento de secuencia con servidor pBLAST confirmaron la presencia de una pequeña región de siete aminoácidos conservada en la subunidad pequeña de la LdTopIB, que a su vez se encontraba entre las regiones de interacción observadas en el modelo 3D. Además el alineamiento múltiple de secuencias reveló que las enzimas homólogas del resto de tripanosomatidos, tanto africanos como americanos secuenciados hasta el momento, poseían este motivo de siete residuos flanqueado por prolinas con el patrón RPxxxRSF, por lo que todo parecía apuntar a que dichos aminoácidos podrían jugar un papel importante en la función-estructura de la LdTopIB a pesar de la ausencia de homología con la hTopIB.

En el caso de la enzima humana se ha visto que varios aminoácidos individuales están involucrados directamente en la sensibilidad a CPT. Tamura y col. (1991) demostraron que la resistencia inusual a la CPT de una línea celular de leucemia linfoblástica aguda era debida al cambio del residuo Asp-533 por Gly. Por otro lado, se ha comprobado que sustituciones puntuales del residuo Asn en las cercanías de la Tyr catalítica producen cambios en la resistencia a CPT sin afectar la capacidad de relajación de la enzima (Knab y col., 1993). Igualmente, Marquis y col. (2005) mostraron que la cepa de *L. donovani* resistente a CPT LdRCPT.160 es debida a la sustitución de dos residuos dentro del dominio *core* de la LdTopIL (Gly185Arg y Asp325Glu). Sin embargo, en los experimentos realizados en esta Memoria se encontró que ninguna de las sustituciones realizadas en el motivo de siete aminoácidos afectó a la capacidad de relajación de la enzima o a su sensibilidad a CPT.

Debido al poco éxito de esta aproximación se decidió realizar dos truncaciones internas dentro de la región, eliminando los motivos RPPVV y RS,

respectivamente. La primera generó una enzima incapaz de cortar el ADN y por lo tanto incapaz de llevar a cabo la relajación de sustratos superenrollados. La segunda dio lugar a una enzima con una sensibilidad 10 veces menor a CPT. Además, y lo que fue más sorprendente, la eliminación del dipéptido RS supuso una desestabilización en la capacidad de rotación controlada de la enzima, de la cual el dominio *linker* es el último responsable (Stewart y col., 1998). Esta alteración funcional provoca que la estructura pierda rigidez, existiendo un estado de mayor flexibilidad en el que el *linker* no actúa como “embrague” cinético y por lo tanto el paso de rotación ocurre de forma muy rápida (Seol y col., 2012; Prada y col., 2012). Esto produce un comportamiento anómalo de hipercinesia en el que la enzima es capaz o bien de procesar múltiples superenrollamientos en cada ciclo de escisión/religación o de cortar la hebra de ADN y religarla inmediatamente sin relajar el sustrato (Stivers y col., 1997).

A través del estudio de truncaciones lineales de la secuencia de la subunidad pequeña se descubrió que la proteína carente de los primeros 175 residuos es capaz de relajar con normalidad el ADN superenrollado y presenta sensibilidad a CPT. Sin embargo, la LdTopIB recombinante a la que se le eliminaron cinco aminoácidos más es igualmente capaz de relajar con normalidad el ADN pero ha perdido toda sensibilidad a CPT. Este hecho puede ser debido a dos factores: i) la CPT posee una afinidad muy reducida por los complejos CL generados por esta forma truncada, o ii) ha habido un cambio en los sitios preferenciales de corte, siendo necesaria otra secuencia de nucleótidos para que se establezca el equilibrio. Esta última posibilidad es la más improbable, ya que si nos fijamos en la evolución de la sensibilidad a CPT en los ensayos de equilibrio escisión/religación realizados tanto con el sustrato de 202 pb, la CPT va perdiendo capacidad de estabilización siguiendo el orden enzima salvaje > 169 > 175 > 180, existiendo en todos los casos la estabilización de tres CL bien definidos. De forma similar se observó que los aminoácidos del extremo C-terminal de la subunidad grande estarían involucrados en la interacción con los residuos 175-180 de la LdTopIS.

En la Fig. 5.1 se muestra una sección del modelo 3D de ensamblaje proteína-proteína entre los residuos de la subunidad grande (cadena blanca) y de la

subunidad pequeña (cadena azul). La mayoría de los aminoácidos incluidos en esta sección se encuentran a una distancia inferior a 10 Å (aminoácidos 525 al 581 de la subunidad grande y 160 al 183 de la pequeña) pero en la imagen se remarcan aquellos cuya distancia entre subunidades es inferior a 5 Å (rojo).

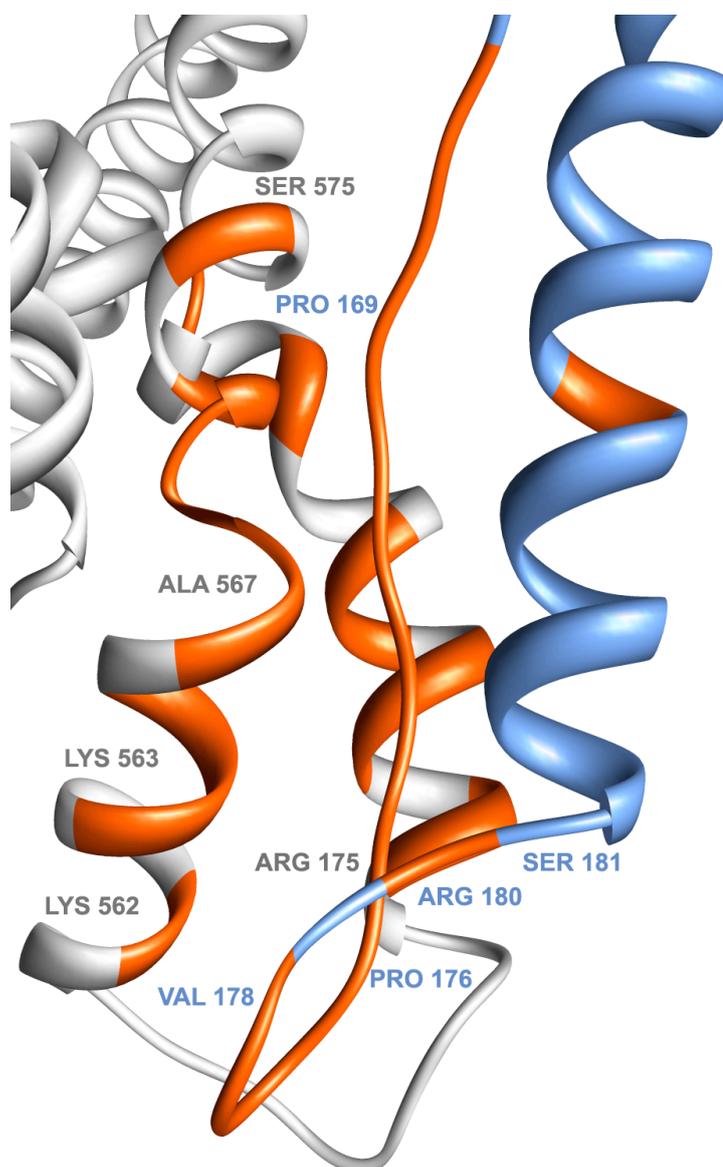


Figura 5.1. Estereograma de la sección correspondiente a las regiones de interacción entre la LdTopIL y la LdTopIS, obtenido a partir del modelado por homología de la proteína completa (Prada y col., 2012). La cadena correspondiente a la subunidad grande se ha representado en color blanco, la subunidad pequeña en azul. Los residuos de ambas cadenas situados a una distancia inferior a 5 Å han sido coloreados en rojo, y etiquetados con su respectivo nombre.

Es importante señalar que el motivo pentapéptido RPPVV introduce un *loop* en la subunidad pequeña que orienta la estructura de tal forma que se puede establecer la interacción entre ambas subunidades, por lo que, la delección interna de este motivo supone un cambio radical en la arquitectura proteica dando lugar a una enzima no funcional, tal y como se demostró experimentalmente. Además, cuando se elimina el motivo RS (residuos 180-181) tenemos una enzima con menor capacidad de relajación y una menor sensibilidad a CPT, apuntando de nuevo a la importancia de esta región en la actividad de la LdTopIB. Por otro lado, es importante señalar que los resultados experimentales demostraron que aunque existe una actividad de relajación mínima con los primeros 561 aminoácidos de la subunidad grande, son necesarios los residuos hasta la posición 592 para tener una enzima totalmente funcional y sensible a CPT. A pesar de que estos aminoácidos se encuentran fuera de la región de interacción propuesta en el modelo de homología, son importantes para que la enzima relaje con normalidad el ADN, ya sea estabilizando la estructura o facilitando la unión al sustrato (Prada y col., 2012).

La posibilidad de una pérdida de afinidad de la CPT hacia los complejos ADN-TopIB, incluso absoluta, sin cambios en el sitio preferencial de corte ha sido ampliamente estudiada por varios autores en la enzima homóloga humana. Fiorani y col. (2003) observaron que una única mutación puntual en el dominio *linker* de la hTopIB haría que la CPT desplazara el equilibrio escisión/religación hacia el estado religado, mostrando por lo tanto que el *linker* en su estado inalterado es responsable de frenar la religación.

Nuestros resultados también se correlacionan bien con los observados por Stewart y col. (1999), quienes reconstituyeron dos especies enzimáticas a partir de fragmentos de la hTopIB; uno que incluía el dominio *core* más una secuencia del extremo C-terminal conteniendo la región completa correspondiente al *linker*, y otra que carecía de este último dominio. Al comparar ambas enzimas con el tipo salvaje observaron un incremento en la tasa de religación y una reducción significativa de la sensibilidad a CPT. Esto indica que el *linker* únicamente es funcional en condiciones nativas y que cualquier alteración del mismo desencadena alteraciones en la religación que disminuyen la sensibilidad a CPT. Este punto es muy

importante a la hora de realizar la expresión y purificación de la proteína, y mucho más en el caso del heterodímero de *Leishmania*. La región *linker* se encuentra protegida de los procesos proteolíticos cuando la enzima está plegada en su estado nativo, en tanto en cuando forma complejos covalentes con el ADN como cuando se encuentra disociada del mismo (Stewart y col., 1997; Stewart y col., 1999). Das y col. (2004) propusieron como método de purificación de la LdTopIB la expresión de cada subunidad en un sistema bacteriano independiente y la posterior reconstitución del heterodímero a partir de los monómeros obtenidos. Este método, dejaría expuestas las regiones responsables de constituir el dominio *linker* entre ambas subunidades a la acción de las proteasas, obteniéndose una enzima reconstituida que diferiría en su sensibilidad a CPT con respecto al tipo salvaje. En la presente Memoria se demuestra que la expresión biscistrónica de ambas subunidades en el sistema de levaduras EKY3 da lugar a una enzima en condiciones nativas con un dominio *linker* totalmente funcional, pudiendo estudiar, por primera vez y de forma precisa, cada uno de los pasos catalíticos de la enzima de *Leishmania* (Prada y col., 2012).

Además, Ireton y col. (2000) mostraron que si se eliminan 30 aminoácidos del dominio *linker* de la hTopIB produce una enzima con buena actividad de relajación pero sin sensibilidad alguna a CPT. Dado que la LdTopIB es un heterodímero que necesita de fuerzas de estabilización entre ambas subunidades para mantener su estructura cuaternaria, cualquier modificación que involucre a los aminoácidos de interacción producirá importantes cambios de estabilidad estructural y por lo tanto alterará la función normal de la proteína.

Por lo tanto todo parece indicar que el *linker* de la LdTopIB, y posible lugar de interacción entre ambas subunidades, debe estar integrado por los aminoácidos 175-180 de la subunidad pequeña y los aminoácidos 575-592 de la extensión C-terminal de la subunidad grande, por lo que cualquier alteración en estas regiones desencadena un aumento en la tasa de religación y por lo tanto una disminución en la sensibilidad a los venenos TopIB. Además, dado el alto grado de conservación entre tripanosomátidos esta observación debería ser extensible a todos ellos (Prada y col., 2012; Díaz-González y col., 2008).

5.2. NLSs: TRANSPORTE CITOPLASMA-NÚCLEO

Una vez definidas las regiones responsables tanto de la actividad de la LdTopIB como de la sensibilidad a venenos TopIB, se procedió a investigar las posibles regiones NLS presentes en ambas subunidades, así como al estudio de la localización subcelular de la LdTopIB. Para catalizar cambios en la superhelicidad del ADN las TopIB deben localizarse en el interior del núcleo, donde producen escisiones temporales de cadena sencilla que permiten que el ADN se relaje antes de ser ligado de nuevo (Wang, 2002).

Las proteínas que son importadas al interior nuclear generalmente poseen motivos NLS en su secuencia. Existen varias proteínas involucradas en el transporte nuclear que interactúan con las NLSs permitiendo su entrada en el núcleo celular (Görlich y col., 1996; Nigg, 1997; Powers y Forbes, 1994). Las secuencias NLS están muy conservadas entre los eucariotas superiores, sin embargo, existen muy pocos trabajos describiendo NLS funcionales en *Leishmania* (Sengupta y col., 2003; Dubessay y col., 2006; Banerjee y col., 2010; Kumar y col., 2012), por lo que no es posible encontrar una secuencia común responsable del transporte nuclear en estos parásitos.

Tanto la naturaleza como la longitud de estas secuencias son factores muy heterogéneos. Mientras que Kumar y col. (2012) encontraron una secuencia de cuatro aminoácidos altamente básicos en el extremo N-terminal de la proteína ORC1, otro estudio delimitó una región NLS de 60 residuos en la extensión C-terminal de la proteína ADN tirosil fosfodiesterasa 1 (Tdp1); la eliminación de estos residuos resultó en la dispersión de la proteína por todo el citoplasma del promastigote (Banerjee y col., 2010). La quinesina KIN13-1 de *L. major* posee también una NLS no canónica de aproximadamente 60 residuos en su extremo C-terminal, con los aminoácidos responsables de la señalización nuclear dispersos a lo largo de toda esta extensión (Dubessay y col., 2006). Es un estudio similar al realizado en esta Memoria, mediante un análisis delecional de la TopII de *L. donovani* se delimitó otra región de entorno a 60 aminoácidos en el C-terminal que contiene posibles motivos NLS responsables de la translocación de esta enzima (Sengupta y col., 2003). Entre las NLSs descritas en especies de *Trypanosoma*

encontramos tanto monopartitas, por ejemplo en la proteína ligante de ADN monocatenario (La) de *T. brucei* (Marchetti y col., 2000), como secuencias bipartitas tales como la identificada tanto en la histona H2B de *T. cruzi* (Westergaard y col., 2010).

Un análisis previo realizado por nuestro grupo de investigación, mostró la localización nuclear la LdTopIB mediante técnicas de inmunolocalización. Esto, junto con un análisis de la secuencia de la enzima, reveló que las posibles NLSs deberían estar concentradas en la extensión C-terminal de la subunidad grande (Reguera y col., 2006). Como consecuencia, algunos grupos de investigación se aventuraron a hipotetizar que la enzima debe ensamblarse obligatoriamente en el citoplasma y que una vez unidas la subunidad LdTopIL actúa como transportador de la enzima completa hacia el interior nuclear (BoseDasgupta y col., 2008).

En el presente estudio hemos conseguido identificar tres motivos NLSs en la LdTopIB por medio de delecciones parciales de los genes codificantes de de ambas subunidades fusionadas al vector de expresión que proporcionaba la secuencia de la GFP en *Leishmania* pXG-GFP+2. La primera de estas regiones, NLS1, se localiza en la extensión C-terminal de la subunidad grande y está constituida por 43 aminoácidos. Debido a su tamaño, es mucho más correcto hablar de un complejo NLS, similar al observado por Dubessay y col. (2006), en el que varias subregiones adyacentes de pequeño tamaño pueden transportar de forma independiente la subunidad al interior nuclear. Este resultado confirma de cierta manera la complejidad de las NLSs en *Leishmania*, siendo imposible delimitar en la mayoría de los casos pequeñas secuencias aisladas (Sengupta y col., 2003; Banerjee y col., 2010). Es importante señalar que parte de esta NLS1 forma parte de la región de interacción con la subunidad pequeña, por lo que si ambas subunidades se ensamblan en el citoplasma esta NLS quedaría totalmente invalidada, y consecuentemente la subunidad pequeña debería albergar motivos NLS para transportar el heterodímero, invalidando por lo tanto la teoría del transporte asociado a la subunidad grande.

Una vez identificada la NLS de la LdTopIL decidimos realizar un análisis similar con la subunidad pequeña. A pesar de que según la bibliografía disponible y

las bases de datos de predicción, esta subunidad no debería albergar NLS alguna (BoseDasgupta y col., 2008). Por ello, fue sorprendente ver cómo la fluorescencia correspondiente a la LdTopIB-GFP se acumulaba en el interior del núcleo celular de los promastigotes transfectados con dicha construcción. Pero más sorprendente aún fue descubrir dos NLS independientes y alejadas entre sí dentro de la secuencia de esta subunidad.

La NLS2 de LdTopIB es una secuencia de 10 residuos en el extremo N-terminal de la subunidad pequeña, situada justo al comienzo de una gran agrupación de serinas. Este hecho es importante, ya que tal como se demostró el péptido PPPKVRRVE requiere de la presencia de al menos un aminoácido Ser para que la NLS sea completa. Una posible explicación es que se necesite la fosforilación de un residuo Ser para que se produzca el transporte tal y como se ha descrito para otros motivos NLS en diferentes proteínas (Teng y col., 2011).

Por último, se identificó una tercera NLS (NLS3) de 29 aminoácidos en la región que integra la Tyr-222 catalítica dentro del extremo C-terminal de la subunidad pequeña. Esta señal es imprescindible para la función normal de la LdTopIB tanto *in vitro* como *in vivo*, ya que si se elimina se produce la pérdida de toda actividad enzimática, siendo incapaz la LdTopIB por tanto de cortar la cadena de ADN y comenzar el proceso de relajación (Díaz-González y col., 2008). Esta señal no guarda parecido alguno con las señales NLS canónicas descritas hasta el momento, sin embargo, podría asemejarse tanto en estructura como en secuencia a las señales PY-NLSs propuestas por Lee y col. (2006). En ellas la importina β se une a la proteína por medio de un residuo de Tyr y otro de Pro muy próximos entre sí, aunque necesariamente contiguos (Shin y col., 2012), produciéndose entonces la translocación nuclear del péptido. La NLS3 de LdTopIB incluye la secuencia 218-SKINYIDPR-226, en la que encontramos dichos residuos próximos entre sí, Tyr-222 y Pro-225, aunque para confirmar definitivamente que la NLS3 es una PY-NLS habría que llevar a cabo estudios adicionales relacionados con la inhibición de la importina β (Shin y col., 2012).

Todo esto parece indicar que, contradiciendo la hipótesis original de BoseDasgupta y col. (2008), ambas subunidades podrían alcanzar el interior

nuclear de forma independiente ya que las dos presentan motivos NLS funcionales en su secuencia. Además, la NLS1 presente en la subunidad grande se corresponde con la región de interacción con la LdTopIS por lo que si ambas proteínas se uniesen en el citoplasma toda la responsabilidad del transporte nuclear recaería sobre la NLS3 de la subunidad pequeña, ya que como se vio en los ensayos de *spot test*, la NLS2 es totalmente prescindible para la translocación de la proteína completa a pesar de ser una NLS funcional.

Existen varios estudios que muestran como las TopIB de organismos eucariotas presentan una compartimentalización subcelular dual, acumulándose tanto en el núcleo como en las mitocondrias (Zhang y col., 2001). Los Tripanosomátidos son eucariotas primitivos con una divergencia genética temprana que presentan una única mitocondria modificada que alberga un orgánulo único, adyacente al cuerpo flagelar basal, denominado kinetoplasto. Este orgánulo, propuesto como posible diana de intervención terapéutica (Shapiro y Englund, 1995), contiene una red intrincada de ADNk organizado en mini y maxicírculos cuya replicación ocurre de forma simultánea a la del ADN nuclear durante la división celular. La Dra. Shapiro (1994) identificó mediante experimentos de localización inmunocitoquímica que la TopII de tripanosomatidos presenta localización dual, asociándose tanto con el ADN nuclear como con el ADNk de los minicírculos del kinetoplasto, por lo que todo parecía indicar que esta enzima se encargaría de los problemas topológicos relacionados con el ADNk. Sin embargo, el grupo liderado por el Dr. Majumder ha señalado que la LdTopIB se co-localiza en el interior del kinetoplasto además de en el núcleo, asociándose con el ADN de los minicírculos de este orgánulo. Mediante el desarrollo de una proteína quimérica activa, resultante de la fusión de la UMSBP (Universal Minicircle Binding Protein Sequence) con cada una de las dos subunidades de la LdTopIB se observaron que la subunidad grande era la responsable de conducir el heterodímero completo al interior del kinetoplasto (Das y col., 2006).

Para comprobar estos resultados realizamos una tinción del ADN celular de los promastigotes transfectados con DAPI de todas y cada una de las construcciones LdTopIB-GFP creadas. A pesar de que ciertos autores apuntaban hacia una localización dual de la proteína, no se ha identificado ningún motivo de

señalización específica en el kinetoplasto, ni señales específicas de localización mitocondrial en ninguna de las subunidades de la LdTopIB, por lo que podemos concluir que esta enzima se sitúa únicamente en el núcleo.

5.3. LdTopIB COMO DIANA MOLECULAR

Tras la delimitación de los diferentes dominios de sensibilidad a venenos TopIB e identificación de los motivos NLS de la LdTopIB se procedió a evaluar el potencial inhibidor de diferentes moléculas tanto *in vitro* como en cultivos de *Leishmania*.

La primera familia estudiada frente a la LdTopIB se corresponde con los derivados CPT. La CPT ha demostrado un importante potencial antiproliferativo *in vitro* (Luzzio y col., 1995), dentro del rango submicromolar, frente a amplio abanico de tumores, además se haber sido el primer compuesto descrito como inhibidor específico de la TopIB de células eucariotas sin efecto alguno sobre la TopIA bacteriana (Pommier, 2006). El desarrollo de derivados CPT frente a varios tipos de cáncer ha dado lugar a dos compuestos solubles en agua que actualmente se utilizan clínicamente en medicina humana: el topotecan (Hycantim[®]) y el profármaco irinotecan (Camptosar[®]). Además, se han evaluado otros dos derivados, la CPT-N-óxido y el gimatecan (ST1481). Este último es un fármaco huérfano que se encuentra en fase clínica de estudio II frente a astrocitoma, glioblastoma y tumores de la oligodendroglía (Teicher, 2008).

Los resultado *in vitro* mostraron que la actividad de relajación de la LdTopIB fue inhibida por todos los derivados CPT dentro del rango nanomolar, con la excepción de la CPT-N-óxido y del irinotecan, sugiriendo por lo tanto que la LdTopIB es la diana responsable de la muerte de los cultivos de *Leishmania* tratados con estos compuestos. Además, es importante señalar que todas estas CPT inhibieron la enzima de *Leishmania* a concentraciones inferiores a las de la enzima humana, lo que indica que las diferencias estructurales entre ambas proteínas favorecen el efecto de los inhibidores sobre la de *Leishmania*.

El gimatecan estabilizó los complejos CL a una concentración 10 veces menor a la necesaria para obtener efectos similares con cualquiera de los otros derivados CPT. Y lo que es más, los complejos estabilizados por este fármaco fueron revertidos con mucha menor velocidad en presencia de un exceso de NaCl que los estabilizados por CPT. Este hecho podría explicar los mejores valores de energía de unión obtenidos para el gimatecan en el estudio comparativo de acoplamiento molecular. La lenta reversión de los complejos CL estabilizados por el gimatecan puede ser debido a la sustitución t-butoxyiminometil en posición 7, ya que varios autores han demostrado su importancia en otras CPT modificadas en este lugar (Valenti y col., 1997). La larga persistencia de los complejos inducidos por el gimatecan se correlacionaron también con la mayor duración de la inhibición de la relajación, así como con la gran eficacia del gimatecan induciendo complejos precipitables con SDS/KCl.

El topotecan a pesar de ser muy activo inhibiendo la actividad de relajación de la LdTopIB fue mucho más ineficaz estabilizando complejos CL, siendo incapaz de generar la banda CL2 en el ensayo de equilibrio escisión/religación, indicando por lo tanto una menor afinidad por los complejos CL de la LdTopIB con respecto a la hTopIB. Además, esta ausencia podría ser debida a una menor permanencia de la droga en este complejo CL o a que el topotecan presenta un patrón de estabilización en el que CL2 no es un sitio preferencial (Taniwaza y col., 1994).

En trabajos paralelos de nuestro grupo de investigación, se ha validado el potencial leishmanicida de estos derivados CPT en un modelo de esplenocitos murinos infectados con una cepa de *L. infantum* que expresa la proteína de fluorescencia infrarroja 1 (IFP1.4). Este modelo permite el estudio de las drogas bajo unas condiciones que mimetizan a las que se encuentra en el animal, incluyendo la presencia de todas las células inmunes (Prada y col., 2013; Balaña-Fouce y col., 2012b). Para todos los compuestos, la sensibilidad de la forma amastigote fue mucho mayor que la de los promastigotes. Este hecho no es inesperado ya que muchas drogas con diferentes dianas intracelulares se han manifestado de la misma manera (Coombs y col., 1983).

Un aspecto muy interesante, es que el gimatecan presentó un índice selectivo (definido como la relación de la IC₅₀ en el macrófago respecto a la de los esplenocitos infectados) superior a 170, tres veces mayor al obtenido para la miltefosina, uno de los tratamientos clínicos actuales de la enfermedad. Si se analiza detenidamente la bibliografía disponible con respecto al gimatecan, se observan aspectos o valores añadidos que hacen de esta droga una opción muy interesante para el tratamiento de las leishmaniosis, y mas concretamente de la leishmaniosis visceral: i) tras la administración oral los mayores niveles en tejidos se encuentran en hígado y bazo (Dallavalle y col., 2000); ii) el porcentaje de la forma lactona activa en plasma es del 80 al 100 %, superior al observado para el topotecan, irinotecan y SN-38, con valores estimados cercanos al 20 % para cada uno de ellos (Burke y col., 1995; Zhu y col., 2009); iii) posee una vida media de alrededor de 76,5 h, manteniendo concentraciones significativas en plasma 7 días después de la administración oral (Zhu y col., 2009); iv) Zhu y col. (2009) mostraron que el gimatecan es tolerado en pacientes con cáncer con una pauta de administración semanal de 1,2 mg/kg por vía oral, presentando propiedades farmacocinéticas favorables. La miltefosina, a pesar de su seguridad, posee un régimen de administración mucho más complejo, siendo necesaria la administración de un tratamiento oral de 1,76 mg/kg/d durante 28 días para curar la LC, lo que dificulta enormemente la adherencia de los pacientes al tratamiento en los países en vías de desarrollo (Dorlo y col., 2008); v) a diferencia de otras CPT, la farmacocinética de este compuesto es más favorable en humanos que en ratones (Burke y col., 1995); vi) recientemente se ha descubierto que el gimatecan no es expulsado de las células tumorales por la proteína de resistencia múltiple a drogas 1 (MDR-1), la cual es responsable de la aparición de resistencias a CPT y que un ortólogo en *Leishmania* (Teicher, 2008; Légaré y col., 2001).

Por lo tanto, todas las CPT estudiadas, con la excepción de la CPT-N-óxido, actúan como venenos TopIB sobre la enzima de *Leishmania* operando dentro del rango micromolar. De entre todos ellos el gimatecan es el más eficiente en todos los ensayos realizados. Su buen índice terapéutico, junto con un mecanismo de acción claramente definido, sugiere que este compuesto podría ser un buen candidato para el tratamiento de la leishmaniosis (Prada y col., 2013).

La segunda familia de compuestos estudiada sobre la LdTopIB fueron las indenoisoquinolinas. Estos compuestos, denominados también inhibidores sintéticos no camptotécnicos, fueron identificados en la búsqueda de nuevos agentes anticancerígenos y se demostró que su perfil citotóxico era similar al de los venenos TopIB, descubriéndose posteriormente que eran capaces de estabilizar los complejos de escisión TopIB-ADN (Strumberg y col., 1999; Ioanoviciu y col., 2005). Algunas indenoisoquinolinas tienen la capacidad de unirse o intercalarse en el ADN en ausencia de enzima (Staker y col., 2005), mientras que otras pueden incluso interaccionar de forma directa con la proteína hTopIB a altas concentraciones (Nagarajan y col., 2006), esto hace, que tal y como se ha mostrado en esta Memoria, sean compuestos mucho más efectivos frente a *Leishmania* que las CPT, con excepción del gimatecan. Sin embargo, presentan la desventaja de poseer varios mecanismos de acción, lo que dificulta su evaluación.

La primera diferencia importante que se observó al estudiar estos compuestos fue que únicamente dos de ellos fueron más efectivos inhibiendo la actividad LdTopIB (ca. 156 nM) que la hTopIB (ca. 2,5 μ M), a diferencia de los derivados CPT que, en mayor o menor medida presentaron mayor especificidad por la enzima de *Leishmania*. El estudio de la formación y estabilización de complejos de escisión en presencia de las dos indenoisoquinolinas activas frente a la LdTopIB, LMP400 y AM13-55, confirmó su naturaleza de venenos TopIB ya que se observó un incremento en la intensidad de la banda de ADN mellado de forma dependiente de la concentración estudiada, alcanzando valores similares a los de la CPT. Estos resultados se correlacionan bien con los obtenidos por Bakshi y col. (2009) en un estudio similar realizado con tripanosomas africanos.

Los resultados de los ensayos de inhibición de la relajación sobre una LdTopIB resistente a CPT mostraron que tanto el LMP400 como el AM13-55 requieren de la presencia de las mismas regiones que la CPT para poder inhibir la actividad LdTopIB, indicando por lo tanto que su mecanismo de acción *in situ* es debido al envenenamiento de la LdTopIB, derivado de la estabilización de los complejos CL.

Los ensayos de precipitación de complejos en presencia de SDS/KCl revelaron que las indenoisoquinolinas no son capaces de alcanzar los niveles de estabilización de complejos ADN-TopIB (ca. 12 %) de la CPT (ca. 70 %) y mucho menos los del gimatecan (ca. 80 %) dentro del mismo rango de concentraciones. Dado que el LMP400 y el AM13-55 inhiben la relajación del ADN e inducen la estabilización de complejos CL, se realizó un estudio de competición entre la CPT y ambas indenoisoquinolinas con el fin de evaluar el principal mecanismo de acción sobre los promastigotes de *Leishmania*. Dado que ninguna de las dos moléculas fue incapaz de prevenir el efecto de estabilización de complejos CL mediado por CPT, el comportamiento de ambas indenoisoquinolinas se acerca más al de un veneno TopIB que al de los compuestos que establecen interacción directa con el ADN (Staker y col., 2005). Los estudios de cuantificación de síntesis de ADN mostraron como ambos compuestos detuvieron de forma efectiva la síntesis de ADN a todos los tiempos estudiados en más de un 90 %. Estos resultados se correlacionan bien con los obtenidos por Peterson y col. (2011), quienes mostraron que las indenoisoquinolinas con una amina primaria de cadena larga, tal y como es el caso del LMP400 y AM13-55, no se intercalan en el ADN libre y por lo tanto no suprimen la formación de complejos de CL a altas concentraciones, a diferencia de aquellas con una amina primaria de cadena corta (Bakshi y col., 2009).

El AM13-55 presentó valores de IC_{50} en cultivos de promastigotes similares a los de la CPT y el gimatecan, mientras que el LMP400 necesitó una concentración 10 veces menor para conseguir este mismo efecto. Recientemente, nuestro grupo de investigación ha realizado estudios con estos compuestos sobre esplenocitos infectados de forma natural con amastigotes de *L. infantum*, obteniendo valores de índice de selectividad entre nueve y doce veces mayores a los observados para la miltefosina (Balaña-Fouce y col., 2012b). Además, en ese mismo trabajo, se demostró que el compuesto LMP400 es capaz de reducir la carga parasitaria tanto de bazo como de hígado en un modelo experimental de leishmaniosis visceral en ratón, resultados similares a los observados por otros autores con paromomicina (Gangneux y col., 1997) o CPT (Proulx y col., 2001).

Por lo tanto, al igual que en el caso del gimatecan, se ha demostrado que un inhibidor TopIB puede ser considerado como un candidato excepcional para el

desarrollo de nuevos compuestos leishmanicidas con mejores perfiles terapéuticos que los que se utilizan en la actualidad (Balaña-Fouce y col., 2012b).

El siguiente paso fue evaluar el efecto de dos series de ácidos grasos sobre la actividad LdTopIB y sobre cultivos de promastigotes de *Leishmania*. De este estudio se desprenden varios resultados interesantes. El primero de ellos es que la LdTopIB es en general mucho más sensible al efecto inhibitorio de los ácidos grasos que la hTopIB, por lo que se trata de compuestos con un buen índice selectivo al menos a nivel enzimático.

En segundo lugar, se ha demostrado que la capacidad de inhibición es dependiente del grado de insaturación siguiendo un orden decreciente de triple enlace \geq doble enlace \gg enlace sencillo. En la literatura relacionada con el efecto leishmanicida de diferentes ácidos grasos encontramos resultados contradictorios entre sí con respecto a este punto. Por un lado, en un trabajo de Cunningham y col. (1972), se demuestra como los ácidos n-decanoico, n-dodecanoico y n-hexanoico fueron capaces de inhibir la movilidad de promastigotes de *L. donovani* a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$, mientras que el ácido oleico no mostró efecto alguno. Sin embargo, Chaudhuri y col. (1986) demostraron que dentro de una serie de ácidos grasos de 18 átomos de carbono, los ácidos insaturados son mucho más efectivos frente a promastigotes de *L. donovani* que sus análogos saturados. En particular, el ácido oleico mostró el valor de IC_{50} más bajo con 90 μM mientras que el valor obtenido con el ácido n-octadecanoico fue de 1,39 mM. Lo que se correlaciona perfectamente con los resultados obtenidos en la presente Memoria.

Dado que no se espera una gran diferencia entre los ácidos acetilénicos estudiados y que se ha demostrado el hecho de que los ácidos grasos con un grupo *cis*-ciclopropano no inhiben la actividad LdTopIB (Carballeira y col., 2010), otros factores, tales como las interacciones intermoleculares cation- π , podrían ser significativas en las regiones cercanas a los sitios de unión de estos ácidos grasos con la LdTopIB. Una posible explicación es que los grupos amonio (R-NH_3^+ ó $\text{R}_2\text{C}=\text{NH}_2^+$) de aminoácidos tales como la Lys y/o la Arg, presentes en los sitios activos de todas las TopIB (Castelli y col., 2009), podrían interaccionar con los dobles y triples enlaces de estos ácidos grasos. Dichas fuerzas son altamente

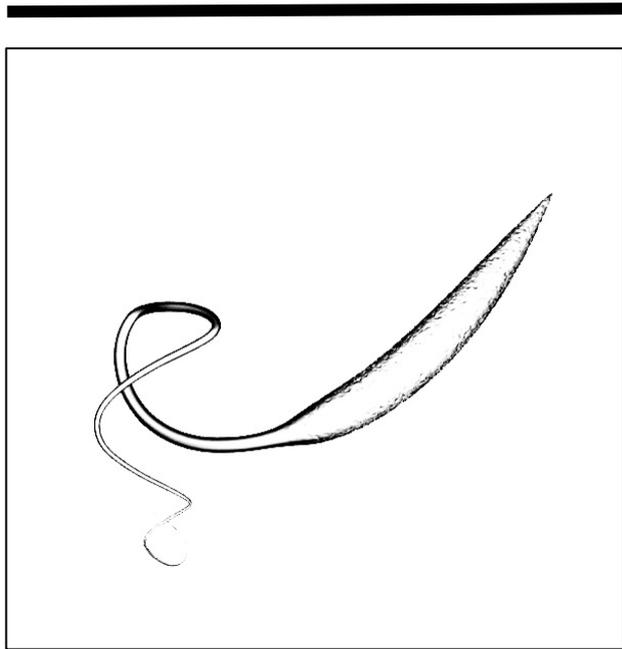
significativas, aproximadamente 10 kcal/mol, tal y como han mostrado estudios computacionales previos (Ma y Dougherty, 1997). Por lo tanto, la combinación de un triple enlace en la posición C6 en combinación con una metoxilación en posición α incrementa notablemente la capacidad de los ácidos grasos de 17 átomos de carbono para inhibir la LdTopIB. Sin embargo la introducción de la metoxilación redujo la capacidad de estos ácidos grasos para inhibir el crecimiento de cultivos de promastigotes, pero al reducir también la toxicidad sobre las células de mamífero, produce un incremento notable del índice de selectividad del ácido (\pm)-2-OMe-6-heptadecinoico (Carballeira y col., 2012).

En tercer lugar se estudió la relación entre la longitud del esqueleto carbonado y la capacidad de inhibición de la actividad TopIB de los ácidos grasos 2-alquinoicos. Es importante señalar que los ácidos 2-alquinoicos fueron todos ellos mucho más eficaces inhibiendo la LdTopIB que los ácidos acetilénicos, incluso tras ser metoxilados, de forma similar a lo observado en el caso de las enzimas FAS-II de *Plasmodium* con valores de IC₅₀ entre 1,5 y 13,9 μ M (Tasdemir y col., 2010). Independientemente a este aspecto, la potencia de los ácidos 2-alquinoicos tanto *in vitro* como *in vivo* se correlacionó positivamente con la longitud de su esqueleto de carbonos, siendo el 2-ODA el compuesto más activo. Una posible explicación a esta mayor afinidad del 2-ODA podría ser su capacidad de establecer un mayor número de interacciones por fuerzas de van der Waals con la LdTopIB por los grupos metileno extra presentes en esta molécula, aunque sería necesario realizar estudios bioinformáticos más exhaustivos para determinarlo.

Finalmente, se evaluó el mecanismo de acción de estos ácidos grasos comparando su actividad con la CPT. Mediante el ensayo de “oligo suicida” se demostró que estos compuestos impiden que la LdTopIB corte la hebra de ADN. Este modo de inhibición es muy similar al descrito para el ácido eicosapentanoico conjugado (cEPA) con la enzima humana (Castelli y col., 2009). En ese estudio se concluyó que el cEPA se unía esencialmente a la región cercana al centro activo de la enzima por lo que bloquea el área e impide el corte de la hebra de ADN, aunque no impide la unión al ADN. De hecho en el modelo computacional que propusieron los autores se muestra como el cEPA de una en las proximidades de Lys-443, Lys-587, y Asn-722, y previene el ataque nucleofílico mediado por la Tyr-723 sobre el

fosfato del esqueleto de ADN. Además, en la presente Memoria se ha demostrado que las regiones responsables de la sensibilidad de la LdTopIB a los ácidos grasos no se corresponden con las de la CPT e indenoisoquinolinas, por lo que la hipótesis del bloqueo físico del centro activo cobra todavía más fuerza.

Todos los resultados, tanto estructurales como funcionales, descritos a lo largo de esta Memoria reflejan la enorme complejidad de la LdTopIB, revelando la importancia de las regiones no conservadas en papeles tan diversos como la sensibilidad a CPT, la velocidad de relajación o la señalización de la proteína hacia el interior del núcleo celular. Gracias a ello se profundiza en el conocimiento de las ADN topoisomerasas y se abre el camino hacia un desarrollo racional de nuevos fármacos con una diana claramente definida frente a las diversas formas de leishmaniosis.



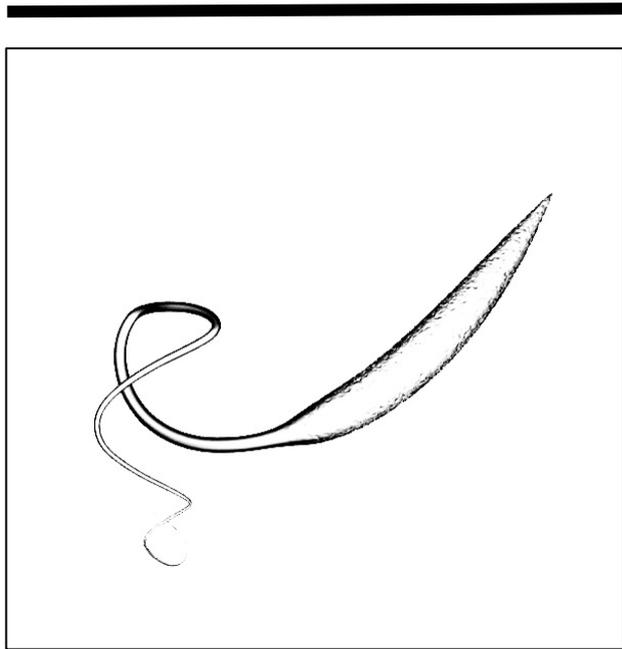
6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. La estructura mínima funcional y sensible a la CPT de LdTopIB está formada por los primeros 592 aminoácidos de la subunidad grande junto con los residuos 175 al 262 de la subunidad pequeña. Si bien es cierto que existe una actividad de relajación mínima con los primeros 561 aminoácidos de la subunidad grande, son necesarios los residuos hasta la posición 592 para tener que la actividad de la enzima no se distinga de la salvaje.
2. El dominio *linker* de *Leishmania* está constituido por los residuos 561 al 592 de la subunidad grande junto con los aminoácidos 175 al 180 de la subunidad pequeña, demostrándose la importancia del pentapéptido RPPVV dentro de la LdTopIS tanto en la sensibilidad a CPT como en la estabilización de las dos subunidades del heterodímero LdTopIB.
3. Se han identificado 3 NLSs en la LdTopIB. La subunidad LdTopIL contiene el motivo NLS1 formado por 43 aminoácidos localizados su extremo C-terminal capaz de transportar la LdTopIL al interior del núcleo pero no al kinetoplasto. Se trata de una region de gran tamaño dentro de la que pequeñas agrupaciones de aminoácidos adyacentes pueden asumir el papel de transportar la proteína al núcleo.
4. La subunidad LdTopIS contiene dos NLS y ningún motivo de localización a kinetoplasto. La NLS2 está constituida por la secuencia PPPKVRRVES localizada entre las posiciones 88 y 97, mientras que la NLS3 está integrada por 29 aminoácidos (residuos 219-246) en su extremo C-terminal que incluye la Tyr-222 catalítica.
5. Todos los derivados CPT son potentes inhibidores de la LdTopIB y, con excepción de la CPT-N-óxido, son potentes venenos enzimáticos. El gimitecan ha demostrado ser el más efectivo de todos ellos en cada uno de

los ensayos realizados, por lo que podría ser explotado como droga candidata frente a la leishmaniosis.

6. Los compuestos de naturaleza indenoisolínicica se ha revelado como potentes inhibidores de la LdTopIB por un mecanismo de acción similar al de la CPT, pero a diferencia de los derivados CPT, sólo el AM13-55 y el LMP400 fueron más efectivos sobre la enzima de *Leishmania* que sobre su homóloga humana.
7. El mecanismo de inhibición de los ácidos grasos difiere tanto de los derivados CPT como de las indenoisoquinolinas. Su efecto se debe a la unión a la región cercana al centro activo de la enzima, lo que impide el corte de la hebra de ADN aunque no la unión con la misma. Los estudios estructura-actividad demuestran que la capacidad inhibitoria sobre la LdTopIB es mayor cuanto más larga es la cadena carbonada, cuanto mayor es el grado de insaturación o si existe una metoxilación en posición α .



7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aït-Oudhia, K., Gazanion, E., Vergnes, B., Oury, B., Sereno, D. (2011) Leishmania antimony resistance: what we know what we can learn from the field. *Parasitol Res.* 109: 1225-1232.
- Akilov, OE., Khachemoune, A., Hasan, T. (2007) Clinical manifestations and classification of Old World cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol.* 46: 132-142.
- Akiyama, HJ., McQuillen, NK. (1972) Interaction and transformation of Leishmania donovani within in vitro cultured cells. An electron microscopical study. *Am J Trop Med Hyg.* 21: 873–879.
- Alexander, J., Bryson, K. (2005) T helper (h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. *Immunol Lett.* 99: 17–23
- Alsner, J., Svejstrup, JQ., Kjeldsen, E., Sørensen, BS., Westergaard, O. (1992) Identification of an N-terminal domain of eukaryotic DNA topoisomerase I dispensable for catalytic activity but essential for in vivo function. *J Biol Chem.* 267: 12408-12411.
- Alvar, J. (2001) Leishmaniasis: de la biología al control. Laboratorios Intervet. 2ª Edición: 200pp
- Amato, VS., Tuon, FF., Bacha, HA., Neto, VA., Nicodemo, AC. (2008) Mucosal leishmaniasis. Current scenario and prospects for treatment. *Acta Trop.* 105 :1–9.
- Amato, VS., Tuon, FF., Siqueira, AM., Nicodemo, AC., Neto, VA. (2007) Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. *Am J Trop Med Hyg.* 77: 266-274.
- Anónimo. (2002) *Weekly Epidemiological Record.* 77: 365-372.
- Antinori, S., Longhi, E., Bestetti, G., Piolini, R., Acquaviva, V., Foschi, A., Trovati, S., Parravicini, C., Corbellino, M., Meroni, L. (2007) Post-kala-azar dermal leishmaniasis as an immune reconstitution inflammatory syndrome in

- a patient with acquired immune deficiency syndrome. *Br J Dermatol.* 157: 1032-1036.
- Antinori, S., Schifanella, L., Corbellino, M. (2012) Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 31: 109-118.
 - Antony, S., Agama, KK., Miao, ZH., Takagi, K., Wright, MH., Robles, AI., Varticovski, L., Nagarajan, M., Morrell, A., Cushman, M., Pommier, Y. (2007) Novel indenoisoquinolines NSC 725776 and NSC 724998 produce persistent topoisomerase I cleavage complexes and overcome multidrug resistance. *Cancer Res.* 67: 10397-10405.
 - Ashford, RW. (2000) The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30: 1269-1281
 - Azim, HA. Jr., Awada, A. (2012) Clinical development of new formulations of cytotoxics in solid tumors. *Curr Opin Oncol.* 24: 325-331.
 - Baker, D. (2000) A surprising simplicity to protein folding. *Nature* 405: 39-42
 - Baker, D., Sali, A. (2001) Protein structure prediction and structural genomics. *Science.* 294: 93-96
 - Bakshi, RP., Sang, D., Morrell, A., Cushman, M., Shapiro, TA. (2009). Activity of indenoisoquinolines against African trypanosomes. *Antimicrob Agents Chemother.* 53: 123-128.
 - Bakshi, RP., Shapiro, TA. (2003) DNA topoisomerases as targets for antiprotozoal therapy. *Mini Rev Med Chem.* 3: 597-608.
 - Bakshi, RP., Shapiro, TA. (2004) RNA interference of *Trypanosoma brucei* topoisomerase IB: both subunits are essential. *Mol Biochem Parasitol.* 136: 249-255.
 - Balaña-Fouce, R., Calvo-Álvarez, E., Álvarez-Velilla, R., Prada, CF., Pérez-Pertejo, Y., Reguera, RM. (2012a) Role of trypanosomatid's arginase in polyamine biosynthesis and pathogenesis. *Mol Biochem Parasitol.* 181: 85-93.
 - Balaña-Fouce, R., Cubría, JC., Reguera, RM., Ordóñez, D. (1998) The pharmacology of leishmaniasis. *Gen Pharmacol.* 30: 435-443.
 - Balaña-Fouce, R., García-Estrada, C., Pérez-Pertejo, Y., Reguera, RM. (2008) Gene disruption of the DNA topoisomerase IB small subunit induces

- a non-viable phenotype in the hemoflagellate *Leishmania major*. *BMC Microbiol.* 8: 113.
- Balaña-Fouce, R., Prada, CF., Requena, JM., Cushman, M., Pommier, Y., Álvarez-Velilla, R., Escudero-Martínez, JM., Calvo-Álvarez, E., Pérez-Pertejo, Y., Reguera, RM. (2012b) Indotecan (LMP400) and AM13-55: two novel indenoisoquinolines show potential for treating visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 56: 5264-5270
 - Balaña-Fouce, R., Redondo, CM., Pérez-Pertejo, Y., Diaz-González, R., Reguera RM. (2006) Targeting atypical trypanosomatid DNA topoisomerase. *Drug Discov. Today.* 11: 733-740.
 - Banerjee, B., Roy, A., Sen, N., Majumder, HK. (2010) A tyrosyl DNA phosphodiesterase 1 from kinetoplastid parasite *Leishmania donovani* (LdTdp1) capable of removing topo I-DNA covalent complexes. *Mol Microbiol.* 78: 119-137.
 - Basselin, M., Badet-Denisot, MA., Robert-Gero, M. (1998) Modification of kinetoplast DNA minicircle composition in pentamidine-resistant *Leishmania*. *Acta Trop.* 70: 43-61.
 - Bates, AD., Berger, JM., Maxwell, A. (2011) The ancestral role of ATP hydrolysis in type II topoisomerases: prevention of DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.* 39: 6327-6339.
 - Berman, J. (2005) Miltefosine to treat leishmaniasis. *Expert Opin Pharmacother.* 6: 1381-1388.
 - Berman, J. (2006) Visceral leishmaniasis in the New World & Africa. *Indian J Med Res.* 123: 289-294.
 - Berman, JD. (1988) Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Rev Infect Dis.* 10: 560-586
 - Bhattacharya, SK., Sinha, PK., Sundar, S., Thakur, CP., Jha, TK., Pandey, K., Das, VR., Kumar, N., Lal, C., Verma, N., Singh, VP., Ranjan, A., Verma, RB., Anders, G., Sindermann, H., Ganguly, NK. (2007) Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 196: 591-598.

- Bjornsti, M., Fertala, J. (1999) Overexpression and purification of DNA topoisomerase I from yeast. *Methods Mol Biol.* 94: 179-186.
- Bodley, A., Chakraborty, AK., Xie, S., Burri, C., Shapiro, TA. (2003) An unusual type IB topoisomerase from African trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100: 7539-7544.
- BoseDasgupta, S., Ganguly, A., Das, BB., Roy, A., Khalkho, NV., Majumder, HK. (2008) The large subunit of *Leishmania* topoisomerase I functions as the 'molecular steer' in type IB topoisomerase. *Mol Microbiol.* 67: 31-46.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Bray, RS. (1987) Note on the history of cutaneous leishmaniasis in the Mediterranean and Middle East area. *Parassitologia.* 29: 175-179.
- Broccoli, S., Marquis, J.F., Papadopoulou, B., Olivier, M., Drolet, M. (1999) Characterization of a *Leishmania donovani* gene encoding a protein that closely resembles a type IB topoisomerase. *Nucleic Acids Res.* 27: 2745-2752.
- Burke, TG., Munshi, CB., Mi, Z., Jiang, Y. (1995) The important role of albumin in determining the relative human blood stabilities of the camptothecin anticancer drugs. *J Pharm Sci.* 84: 518-519.
- Calvo-Álvarez, E., Guerrero, NA., Alvarez-Velilla, R., Prada, CF., Requena, JM., Punzón, C., Llamas, MÁ., Arévalo, FJ., Rivas, L., Fresno, M., Pérez-Pertejo, Y., Balaña-Fouce, R., Reguera, RM. (2012) Appraisal of a *Leishmania major* strain stably expressing mCherry fluorescent protein for both in vitro and in vivo studies of potential drugs and vaccine against cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 6: e1927
- Carballeira, NM., Cartagena, M., Li, F., Chen, Z., Prada, CF., Calvo-Alvarez, E., Reguera, RM., Balaña-Fouce, R. (2012) First total synthesis of the (±)-2-methoxy-6-heptadecynoic acid and related 2-methoxylated analogs as effective inhibitors of the *leishmania* topoisomerase IB enzyme. *Pure Appl Chem.* 84: 1867-1875.
- Carballeira, NM., Montano, N., Reguera, RM., Balaña-Fouce, R. (2010) The first total synthesis of the (±)-17-methyl-trans-4,5-methyleneoctadecanoic

- acid and related analogs with antileishmanial activity. *Tetrahedron Lett.* 51: 6153.
- Carrión, J., Folgueira, C., Soto, M., Fresno, M., Requena, JM. (2011) *Leishmania infantum* HSP70-II null mutant as candidate vaccine against leishmaniasis: a preliminary evaluation. *Parasit Vectors.* 4: 150.
 - Castelli, S., Campagna, A., Vassallo, O., Tesauro, C., Fiorani P., Tagliatesta, P., Oteri, F., Falconi, M., Majumder, HK., Desideri, A. (2009) Conjugated eicosapentaenoic acid inhibits human topoisomerase IB with a mechanism different from camptothecin. *Arch Biochem Biophys.* 486: 103-110.
 - Chakir, H., Campos-Neto, A., Mojibian, M., Webb, JR. (2000) IL-12Rbeta2-deficient mice of a genetically resistant background are susceptible to *Leishmania major* infection and develop a parasite-specific Th2 immune response. *Microbes Infect.* 5: 241–249.
 - Champoux, JJ. (2001) DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem.* 70: 369-413.
 - Champoux, JJ., Dulbecco, R. (1972) An activity from mammalian cells that untwists superhelical DNA--a possible swivel for DNA replication (polyomavirus ethidium bromide-mouse-embryo cells-dye binding assay). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 69: 143-146.
 - Chaudhuri, G., Ghoshal, K., Banerjee AB. (1986) Toxic effects of fatty acids on *Leishmania donovani* promastigotes. *Indian J Med Res.* 84: 361-365.
 - Chen, AY., Yu, C., Gatto, B., Liu, LF. (1993) DNA minor groove-binding ligands: a different class of mammalian DNA topoisomerase I inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90: 8131-8135.
 - Chowdhury, AR., Mandal, S., Goswami, A., Ghosh, M., Mandal, L., Chakraborty, D., Ganguly, A., Tripathi, G., Mukhopadhyay, S., Bandyopadhyay, S., Majumder, HK. (2003) Dihydrobetulinic acid induces apoptosis in *Leishmania donovani* by targeting DNA topoisomerase I and II: implications in antileishmanial therapy. *Mol Med.* 9: 26-36.
 - Coombs, GH., Hart, DT., Capaldo, J. (1983) *Leishmania mexicana*: drug sensitivities of promastigotes and transforming amastigotes. *J Antimicrob Chemother.* 11:151–62.

- Cox, F. (2002) History of Human Parasitology. *Clin Microbiol Rev.* 15: 595-612.
- Cunningham, DD. (1885) On the presence of peculiar parasitic organisms in the tissue of a specimen of Delhi boil. *Sci Mem Med Offic Army India.* 1: 21-31
- Cunningham, LV., Kazan, BH., Kuwahara, SS. (1972) Effect of long-chain fatty acids on some trypanosomatid flagellates. *J Gen Microbiol.* 70, 491.
- Dallavalle, S., Delsoldato, T., Ferrari, A., Merlini, L., Penco, S., Carenini, N., Perego, P., De Cesare, M., Pratesi, G., Zunino, F. (2000) Novel 7-substituted camptothecins with potent antitumor activity. *J Med Chem.* 43: 3963-3969.
- Das, A., Dasgupta, A., Sengupta, T., Majumder, HK. (2004) Topoisomerases of kinetoplastid parasites as potential chemotherapeutic targets. *Trends Parasitol.* 20: 381-387.
- Das, B., Sengupta, T., Ganguly, A., Majumder, HK. (2006) Topoisomerases of kinetoplastid parasites: why so fascinating?. *Mol. Microbiol.* 62: 917-927
- Davies, DR., Mushtaq, A., Interthal, H., Champoux, JJ., Hol, WG. (2006) The structure of the transition state of the heterodimeric topoisomerase I of *Leishmania donovani* as a vanadate complex with nicked DNA. *J Mol Biol.* 357: 1202-1210.
- De Gorgolas, M., Miles, MA. (1994) Visceral leishmaniasis and AIDS. *Nature.* 372: 734.
- de Sá Oliveira, T., Capp Neto, M., Martins, BJ., Rodrigues, HA., Antonino, RM., Magalhães, AV. (2000) Action of pentoxifylline on experimental cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 95: 477-482
- den Boer, M., Argaw, D., Jannin, J., Alvar, J. (2011) Leishmaniasis impact and treatment access. *Clin Microbiol Infect.* 17: 1471-1477.
- Dermine, JF., Scianimanico, S., Prive, C., Descoteaux, A., Desjardins, M. (2000) *Leishmania* promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. *Cell Microbiol.* 2: 115-126.

- Desjeux, P. (2001) The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 95: 239-243.
- Desjeux, P., Alvar, J. (2003) Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol.* 97: S3-15.
- Deterding, A., Dungey, FA., Thompson, KA., Steverding, D. (2005) Anti-trypanosomal activities of DNA topoisomerase inhibitors. *Acta Trop.* 93: 311-316.
- Dexheimer, TS., Pommier, Y. (2008) DNA cleavage assay for the identification of topoisomerase I inhibitors. *Nat Protoc.* 3: 1736-1750
- Díaz-González, R., Pérez-Pertejo, Y., Pommier, Y., Balaña-Fouce, R., Reguera, RM. (2008) Mutational study of the "catalytic tetrad" of DNA topoisomerase IB from the hemoflagellate *Leishmania donovani*: Role of Asp-353 and Asn-221 in camptothecin resistance. *Biochem Pharmacol.* 76: 608-619.
- Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P., Moreno, SN. (2005) Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nat Rev Microbiol.* 3: 251-61.
- Donovan, C. (1903) The etiology of the heterogeneous fevers in India. *Br Med.* ii: 1401
- Dorlo, TP., van Thiel, PP., Huitema, AD., Keizer, RJ., de Vries, HJ., Beijnen, JH., de Vries, PJ. (2008) Pharmacokinetics of miltefosine in Old World cutaneous leishmaniasis patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 52: 2855-2860.
- Dubessay, P., Blaineau, C., Bastien, P., Tasse, L., Van Dijk, J., Crobu, L., Pagès, M. (2006) Cell cycle-dependent expression regulation by the proteasome pathway and characterization of the nuclear targeting signal of a *Leishmania major* Kin-13 kinesin. *Mol Microbiol.* 59: 1162-1174.
- Fairlamb, AH., Cerami, A. (1992) Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol.* 46: 695-729
- Fairlamb, AH., Henderson, GB., Cerami, A. (1989) Trypanothione is the primary target for arsenical drugs against African trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2607-2611

- Feng, W., Satyanarayana, M., Tsai, YC., Liu, AA., Liu, LF., LaVoie, EJ. (2009) Novel topoisomerase I-targeting antitumor agents synthesized from the N,N,N-trimethylammonium derivative of ARC-111, 5H-2,3-dimethoxy-8,9-methylenedioxy-5-[(2-N,N,N-trimethylammonium)-ethyl]-dibenzo-[c,h]-[1,6]-naphthyridin-6-one iodide. *Eur J Med Chem.* 44: 3433-3438.
- Fiorani, P., Bruselles, A., Falconi M., Chillemi, G., Desideri, A., Benedetti, P. (2003) Single mutation in the linker domain confers protein flexibility and camptothecin resistance to human topoisomerase I. *J Biol Chem.* 278: 43268-43275.
- Forestier, CL., Machu, C., Loussert, C., Pescher, P., Spath, GF. (2011) Imaging host cell-leishmania interaction dynamics implicates parasite motility, lysosome recruitment, and host cell wounding in the infection process. *Cell Host Microbe* 9: 319–330
- Forterre, P., Gribaldo, S., Gadelle, D., Serre, MC. (2007) Origin and evolution of DNA topoisomerases. *Biochimie.* 89: 427-446.
- Fraga, J., Montalvo, AM., De Doncker, S., Dujardin, JC., Van der Auwera, G. (2010) Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infect Genet Evol.* 10: 238-245.
- Fujimoto, DF., Pinilla, C., Segall, AM. (2006) New peptide inhibitors of type IB topoisomerases: similarities and differences vis-a-vis inhibitors of tyrosine recombinases. *J Mol Biol.* 363: 891-907.
- Gangneux, JP., Sulahian, A., Garin, YJ., Derouin, F. (1997) Efficacy of aminosidine administered alone or in combination with meglumine antimoniate for the treatment of experimental visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. *J Antimicrob Chemother.* 40: 287-289.
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, MH., Nash, HA. (1976) DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 73: 3872–3876.
- Gillespie, M., Titus, RG. (2000) The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunol.* 22: 319-331.
- Glew, RH., Saha, AK., Das, S., Remaley, AT. (1988) Biochemistry of the *Leishmania* species. *Microbiol Rev.* 52: 412-432.

- Goad, L.J., Berens, R.L., Marr JJ., Beach, D.H., Holz, G.G. Jr. (1989) The activity of ketoconazole and other azoles against *Trypanosoma cruzi*: biochemistry and chemotherapeutic action in vitro. *Mol Biochem Parasitol.* 32: 179-189.
- Goad, L.J., Holz, G.G. Jr., Beach, D.H. (1984) Sterols of *Leishmania* species. Implications for biosynthesis. *Mol Biochem Parasitol.* 10: 161-170.
- González, U., Pinart, M., Reveiz, L., Rengifo-Pardo, M., Tweed, J., Macaya, A., Alvar, J. (2010) Designing and reporting clinical trials on treatments for cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 51: 409– 419.
- Görlich, D. (1997) Nuclear protein import. *Curr Opin Cell Biol.* 9: 412–419.
- Grumont, R., Washtien, W.L., Caput, D., Santi, D.V. (1986) Bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase from *Leishmania tropica*: sequence homology with the corresponding monofunctional proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83: 5387-5391
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol Biol.* 166: 557-580
- Hertzberg, R.P., Caranfa, M.J., Holden, K.G., Jakas, D.R., Gallagher, G., Mattern, M.R., Mong, S.M., Bartus, J.O., Johnson, R.K., Kingsbury, W.D. (1989) Modification of the hydroxy lactone ring of camptothecin: inhibition of mammalian topoisomerase I and biological activity. *J Med Chem.* 32: 715-720.
- Herwaldt, B.L. (1999) Leishmaniasis. *Lancet.* 354: 1191-1199.
- Hoare, C.A. (1938) Early discoveries regarding parasite of oriental sore. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 32: 67-92.
- Hoeppli, R. (1969) Parasitic diseases in Africa and the Western hemisphere: early documentation and transmission by slave trade. Basel, Verlag für Recht und Gesellschat.
- Holm, A., Tejle, K., Magnusson, K.E., Descoteaux, A., Rasmusson, B. (2001) *Leishmania donovani* lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKC α and defective phagosome maturation. *Cell Microbiol* 3: 439–447.
- Holmes, D.S., Quigley M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacteria plasmids. *Anal Biochem.* 114: 193-197.

- Hsiang, YH., Hertzberg, R., Hecht, S., Liu, LF. (1985) Camptothecin induces protein-linked DNA break via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem.* 260: 14873–14878.
- Hsiang, YH., Lihou, MG., Liu, LF. (1989) Arrest of replication forks by drugs tabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Res.* 49: 5077–5082.
- Iniesta, V., Gómez-Nieto, LC., Molano, I., Mohedano, A., Carcelén, J., Mirón, C., Alonso, C., Corraliza, I. (2002) Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite Immunol.* 24: 113–118.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28
- Ioanoviciu, A., Antony, S., Pommier, Y., Staker, BL., Stewart, L., Cushman, M. (2005) Synthesis and mechanism of action studies of a series of norindenoisoquinoline topoisomerase I poisons reveal an inhibitor with a flipped orientation in the ternary DNA-enzyme-inhibitor complex as determined by X-ray crystallographic analysis. *J Med Chem.* 48: 4803-4814.
- Ireton, GC., Stewart, L., Parker, LH., Champoux, JJ. (2000) Expression of human topoisomerase I with a partial deletion of the linker region yields monomeric and dimeric enzymes that respond differently to camptothecin. *J Biol Chem.* 275: 25820-25830.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol.* 153: 163-168.
- Jean-Moreno, V., Rojas, R., Goyeneche, D., Coombs, GH., Walker, J. (2006) *Leishmania donovani*: differential activities of classical topoisomerase inhibitors and antileishmanials against parasite and host cells at the level of DNA topoisomerase I and in cytotoxicity assays. *Exp Parasitol.* 112: 21-30.
- Kamhawi, S. (2006) Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol.* 22: 439-445.
- Kaufmann, SH., Charron, M., Burke, PJ., Karp, JE. (1995) Changes in topoisomerase I levels and localization during myeloid maturation in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 55: 1255-1260.

- Kazemi, B. (2011) Genomic organization of leishmania species. *Iran J Parasitol.* 6:1-18.
- Kemp, K. (2000) Cytokine-producing T cell subsets in human leishmaniasis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 48: 173-176.
- Kohlhagen, G., Paull, KD., Cushman, M., Nagafuji, P., Pommier, Y. (1998) Protein-linked DNA strand breaks induced by NSC 314622, a novel noncamptothecin topoisomerase I poison. *Mol Pharmacol.* 54: 50-58.
- Kiefer, F., Arnold, K., Künzli, L., Bordoli, M., Schwede, T. (2009) The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Res.* 37: D387-392.
- Kimblin, N., Peters, N., Debrabant, A., Secundino, N., Egen, J., Lawyer, P., Fay, MP., Kamhawi, S., Sacks, D. (2008) Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105: 10125-10130.
- Knab, A., Fertala, J., Bjornsti, MA. (1993) Mechanisms of camptothecin resistance in yeast DNA topoisomerase I mutants. *J Biol Chem.* 268: 22322-22330.
- Koster, DA., Croquette, V., Dekker, C., Shuman, S., Dekker, NH. (2005) Friction and torque govern the relaxation of DNA supercoils by eukaryotic topoisomerase IB. *Nature.* 434: 671-674.
- Kozyavkin, SA., Krahl, R., Gellert, M., Stetter, KO., Lake, JA., Slesarev, AI. (1994) A reverse gyrase with an unusual structure. A type I DNA topoisomerase from the hyperthermophile *Methanopyrus kandleri* is a two-subunit protein. *J Biol Chem.* 269: 11081-11089.
- Kubar, J., Marty, P., Lelièvre, A., Quaranta, JF., Staccini, P., Caroli-Bosc, C., Le Fichoux, Y. (1998) Visceral leishmaniasis in HIV-positive patients: primary infection, reactivation and latent infection. Impact of the CD4+ T-lymphocyte counts. *AIDS.* 12: 2147-2153.
- Kumar, D., Kumar, D., Saha, S. (2012) A highly basic sequence at the N-terminal region is essential for targeting the DNA replication protein ORC1 to the nucleus in *Leishmania donovani*. *Microbiology.* 158: 1775-1782.
- Kumaratilake, LM., Robinson, BS., Ferrante, A., Poulos, A. (1992) Antimalarial properties of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids: in vitro

- effects on *Plasmodium falciparum* and in vivo effects on *P. berghei*. *J Clin Invest.* 89: 961-967.
- Laemmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
 - Lainson, R., Shaw, JJ. (1987) Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R (eds) *The leishmaniasis in biology and medicine.* Academy Press, London pp 1-120.
 - Lang, T., Hellio, R., Kaye, PM., Antoine, JC. (1994) *Leishmania donovani*-infected macrophages: characterization of the parasitophorous vacuole and potential role of this organelle in antigen presentation. *J Cell Sci.* 107: 2137–2150.
 - Laufs, H., Müller, K., Fleischer, J., Reiling, N., Jahnke, N., Jensenius, JC., Solbach, W., Laskay T. (2002) Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect Immun* 70: 826–835.
 - LeBowitz, JH. (1994) Transfection experiments in *Leishmania*. *Meth Cell Biol.* 45: 65-78.
 - Lee, BJ., Cansizoglu, AE., Süel, KE., Louis, TH., Zhang, Z., Chook, YM. (2006) Rules for nuclear localisation sequence recognition by karyopherin beta 2. *Cell.* 126: 543–58.
 - Légaré D, Cayer S, Singh AK, Richard D, Papadopoulou B, Ouellette M. (2001) ABC proteins of *Leishmania*. *J Bioenerg Biomembr.* 33: 469-474.
 - Leishman, WB. (1903) On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. *Br Med J. i:* 1252-1254.
 - Leppard, JB., Champoux, JJ. (2005) Human DNA topoisomerase I: relaxation, roles, and damage control. *Chromosoma.* 114: 75-85.
 - Li, TK., Houghton, PJ., Desai, SD., Daroui, P., Liu, AA., Hars, ES., Ruchelman, AL., LaVoie, EJ., Liu, LF. (2003) Characterization of ARC-111 as a novel topoisomerase I-targeting anticancer drug. *Cancer Res.* 63: 8400-8407.
 - Lindoso, JA., Barbosa, RN., Posada-Vergara, MP., Duarte, MI., Oyafuso, LK., Amato, VS., Goto, H. (2009) Unusual manifestations of tegumentary

- leishmaniasis in AIDS patients from the New World. *Br J Dermatol.* 160: 311-318
- Lisby, M., Olesen, JR., Skouboe, C., Krogh, BO., Straub, T., Boege, F., Velmurugan, S., Martensen, PM., Andersen, AH., Jayaram, M., Westergaard, O., Knudsen, BR. (2001) Residues within the N-terminal domain of human topoisomerase I play a direct role in relaxation. *J Biol Chem.* 276: 20220-20227.
 - Liu, LF., Wang, JC. (1987) Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Nat Acad Sci USA.* 84: 7024-7027.
 - Lodge, R., Descoteaux, A. (2005) Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. *Clin Immunol.* 114: 256-265.
 - López-Vélez, R., Molina-Moreno, R. (2005) Climate change in Spain and risk of infectious and parasitic diseases transmitted by arthropods and rodents. *Rev Esp Salud Pública.* 79: 177-190.
 - Lux, H., Hart, DT., Parker, PJ., Klenner, T. (1996) Ether lipid metabolism, GPI anchor biosynthesis, and signal transduction are putative targets for anti-leishmanial alkyl phospholipid analogues. *Adv Exp Med Biol.* 416: 201-211.
 - Luzzio, MJ., Besterman, JM., Emerson, DL., Evans, MG., Lackey, K., Leitner, PL., McIntyre, G., Morton, B., Myers, PL., Peel, M. (1995) Synthesis and antitumor activity of novel water soluble derivatives of camptothecin as specific inhibitors of topoisomerase I. *J Med Chem.* 38: 395-401.
 - Ma, JC., Dougherty, DA. (1997) The Cation- π interaction. *Chem Rev.* 97: 1303-1324.
 - Maniscalco, M., Noto, G., Zichichi, L., Veraldi, S. (2007) Multifocal cutaneous leishmaniasis: a new clinical presentation of the disease. *Acta Derm Venereol.* 87: 275-276.
 - Marchetti, MA., Tschudi, C., Kwon, H., Wolin, SL., Ullu, E. (2000) Import of proteins into the trypanosome nucleus and their distribution at karyokinesis. *J Cell Sci.* 113: 899-906.
 - Marquis, JF., Hardy, I., Olivier, M. (2005) Topoisomerase I amino acid substitutions, Gly185Arg and Asp325Glu, confer camptothecin resistance in *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 1441-1446.

- Marquis, JF., Makhey, D., LaVoie, EJ., Olivier, M. (2003) Effects of topoisomerases inhibitors protoberberine on *Leishmania donovani* growth, macrophage function, and infection. *J Parasitol.* 89: 1048-1052.
- Marti-Renom, MA., Stuart, A., Fiser, A., Sanchez, R., Melo, F., Sali, A. (2000). Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 29: 291-325.
- Martin, S., Agarwal, R., Murugaiyan, G., Saha, B. (2010) CD40 expression levels modulate regulatory T cells in *Leishmania donovani* infection. *J Immunol.* 185: 551–559.
- Martin, S., McCoubrey, WK. Jr., McConaughy, BL., Young, LS., Been, MD., Brewer, BJ., Champoux, JJ. (1983) Multiple forms of rat liver type I topoisomerase. *Methods Enzymol.* 100: 137-144.
- Mo, YY., Wang, C., Beck, WT. (2000) A novel nuclear localization signal in human DNA topoisomerase I. *J Biol Chem.* 275: 41107-41113.
- Molina, R., Jiménez, MI., Cruz, I., Iriso, A., Martín-Martín, I., Sevillano, O., Melero, S., Bernal, J. (2012) The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet Parasitol.* 190: 268-271.
- Moll, H., Rollinghoff, M. (1990) Resistance to murine cutaneous leishmaniasis is mediated by Th-1 cells, but disease-promoting CD4+ cells are different from Th-2 cells. *Eur J Immunol.* 20: 2067-2074.
- Moody, SF., Handman, E., McConville, MJ., Bacic, A. (1993) The structure of *Leishmania major* amastigote lipophosphoglycan. *J Biol Chem.* 268: 18457–18466.
- Moore, KJ., Matlashewski, T. (1994) Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *J Immunol.* 152: 2930–2937.
- Moro, O., Lerner, EA. (1997) Maxadilan, the vasodilator from sand flies, is a specific pituitary adenylate cyclase activating peptide type I receptor agonist. *J Biol Chem.* 272: 966-970.
- Moyersoén, J., Choe, J., Fan, E., Hol, WG., Michels, PA. (2004) Biogenesis of peroxisomes and glycosomes: trypanosomatid glycosome assembly is a promising new drug target. *FEMS Microbiol Rev.* 28: 603-643.

- Muleme, HM., Reguera, RM., Berard, A., Azinwi, R., Jia, P., Okwor, IB., Beverley, S., Uzonna, JE. (2009) Infection with arginase-deficient *Leishmania major* reveals a parasite number-dependent and cytokine-independent regulation of host cellular arginase activity and disease pathogenesis. *J Immunol.* 183: 8068–8076.
- Muller, MT. (1985) Quantitation of eukaryotic topoisomerase I reactivity with DNA. Preferential cleavage of supercoiled DNA. *Biochim Biophys Acta.* 824: 263-267.
- Muñoz-Fernández, MA., Fernández, MA., Fresno, M. (1992) Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol Lett.* 33: 35–40.
- Murray, HW. (2000) Treatment of visceral leishmaniasis (Kala-azar): a decade of progress and future approaches. *Int J Infect Dis.* 4: 158-177.
- Murray, HW., Tsai, CW., Liu, J., Ma, X. (2006) Visceral *Leishmania donovani* infection in interleukin-13-/-mice. *Infect Immun.* 74: 2487–2490.
- Myler, P., Fasel, N. (editors). (2008) *Leishmania: After The Genome.* Caister Academic Press.
- Nagarajan, M., Morrell, A., Ioanoviciu, A., Antony, S., Kohlhagen, G., Agama, K., Hollingshead, M., Pommier, Y., Cushman, M. (2006) Synthesis and evaluation of indenoisoquinoline topoisomerase I inhibitors substituted with nitrogen heterocycles. *J Med Chem.* 49: 6283-6289.
- Ng, LG., Hsu, A., Mandell, MA., Roediger, B., Hoeller, C., Mrass, P., Iparraguirre, A., Cavanagh, LL., Triccas, JA., Beverley, SM., Scott, P., Weninger, W. (2008) Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites. *PLoS Pathog.* 4: e1000222.
- Nigg, EA. (1997). Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature* 386, 779–787.
- Ofek, I., Goldhar, J., Keisari, Y., Sharon N. (1995) Nonopsonic phagocytosis of microorganisms. *Annu Rev Microbiol.* 49: 239-276.
- Ogata, Y., Tanaka, T., Akagi, Y., Ishibashi, N., Tsuji, Y., Matono, K., Isobe, M., Sueyoshi, S., Kaibara, A., Shirouzu, K. (2013) Multicenter Phase II Study of a New Effective S-1 and Irinotecan Combination Schedule in Patients with

Unresectable Metastatic or Recurrent Colorectal Cancer. *Clin Med Insights Oncol.* 7: 21-30.

- OMS. (2007) Control de la leishmaniosis: informe de la Secretaría. 60^a Asamblea Mundial de la Salud. A60/10: 5pp.
- OMS. (2010) Control of the leishmaniasis. Report of a WHO expert committee. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 949: 1-186.
- Opperdoes, FR., Baudhuin, P., Coppens, I., De Roe, C., Edwards, SW., Weijers, PJ., Misset, O. (1984) Purification, morphometric analysis, and characterization of the glycosomes (microbodies) of the protozoan hemoflagellate *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol.* 98: 1178-1184.
- Park, AY., Hondowicz, BD., Scott, P. (2000) IL-12 is required to maintain a Th1 response during *Leishmania major* infection. *J Immunol.* 165: 896–902.
- Pessoa, S., Barreto, MP. (1948) *Leishmaniose tegumentar americana*. Rio de Janeiro, Ministério da Educação e Saúde.
- Peters, NC., Egen, JG., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., Lawyer, P., Fay, MP., Germain, RN., Sacks D. (2008) In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 321: 970–974.
- Peterson, KE., Cinelli, MA., Morrell, AE., Mehta, A., Dexheimer, TS., Agama, K., Antony, S., Pommier, Y., Cushman, M. (2011) Alcohol-, diol-, and carbohydrate-substituted indenoisoquinolines as topoisomerase I inhibitors: investigating the relationships involving stereochemistry, hydrogen bonding, and biological activity. *J Med Chem.* 54: 4937-4953.
- Pettersen, EF., Goddard, TD., Huang, CC., Couch, GS., Greenblatt, DM., Meng, EC., Ferrin, TE. (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 25: 1605-1612.
- Pieper, U., Eswar, N., Ilyin, VA., Stuart, A., Sali, A. (2002). ModBase, a database of annotated comparative protein structure models. *Nucleic Acids Res.* 30: 255-259.
- Pintado, V., Martín-Rabadán, P., Rivera, ML., Moreno, S., Bouza, E. (2001) Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected patients. A comparative study. *Medicine (Baltimore).* 80: 54-73.

- Pommier, Y. (2006) Topoisomerase inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer*. 6: 789-802
- Pommier, Y. (2009) DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology, and interfacial inhibition. *Chem Rev*. 109: 2894-902
- Pommier, Y., Barcelo, JM., Rao, VA., Sordet, O., Jobson, AG., Thibaut, L., Miao, ZH., Seiler, JA., Zhang, H., Marchand, C., Agama, K., Nitiss, JL., Redon, C. (2006) Repair of topoisomerase I-mediated DNA damage. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 81: 179–229.
- Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H., Marchand, C. (2010) DNA Topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem Biol*. 17: 421-433.
- Powers, MA., Forbes, DJ. (1994) Cytosolic factors in nuclear transport: what's importin? *Cell*. 79: 931–934.
- Prada, CF., Álvarez-Velilla, R., Balaña-Fouce, R., Prieto, C., Calvo-Álvarez, E., Escudero-Martínez, JM., Requena, JM., Ordóñez, C., Desideri, A., Pérez-Pertejo, Y., Reguera, RM. (2013) Gimatecan and other camptothecin derivatives poison leishmania DNA-topoisomerase IB leading to a strong leishmanicidal effect. *Biochem Pharmacol*. (Article in press)
- Prada, CF., Alvarez-Velilla, R., Diaz-González, R., Prieto, C., Pérez-Pertejo, Y., Balaña-Fouce, R., Reguera, RM. (2012) A pentapeptide signature motif plays a pivotal role in Leishmania DNA topoisomerase IB activity and camptothecin sensitivity. *Biochim Biophys Acta*. 1820: 2062-2071.
- Pratt, DM., David, JR. (1981) Monoclonal antibodies that distinguish between New World species of Leishmania. *Nature*. 291: 581-583.
- Proulx, ME., Désormeaux, A., Marquis, JF., Olivier, M., Bergeron, MG. (2001) Treatment of visceral leishmaniasis with sterically stabilized liposomes containing camptothecin. *Antimicrob Agents Chemother*. 45: 2623-2627.
- Prudhomme, M. (2003) Rebeccamycin analogues as anti-cancer agents. *Eur J Med Chem*. 38: 123-140.
- Ray, S., Hazra, B., Mitra, B., Das, A., Majumder, HK. (1998) Diospyrin, a bisnaphthoquinone: a novel inhibitor of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. *Mol Pharmacol*. 54: 994-999.

- Ready, PD. (2010) Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill.* 15:19505.
- Redinbo, MR., Champoux, JJ., Hol, WG. (1999) Structural insights into the function of type IB topoisomerases. *Curr Opin Struct Biol.* 9: 29-36.
- Redinbo, MR., Champoux, JJ., Hol, WG. (2000) Novel insights into catalytic mechanism from a crystal structure of human topoisomerase I in complex with DNA. *Biochemistry.* 39: 6832-6840.
- Redinbo, MR., Stewart, L., Kuhn, P., Champoux, JJ. (1998) Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. *Science.* 279: 1504-1513.
- Reguera, RM., Díaz-González, R., Pérez-Pertejo, Y., Balaña-Fouce R. (2008) Characterizing the bi-subunit type IB DNA topoisomerase of *Leishmania* parasites; a novel scenario for drug intervention in trypanosomatids. *Curr Drug Targets.* 9: 966-978.
- Reguera, RM., Redondo, CM., Gutiérrez de Prado, R., Perez-Pertejo, Y., Balaña-Fouce, R. (2006) DNA topoisomerase I from parasitic protozoa: a potential target for chemotherapy. *Biochim Biophys Acta.* 1759: 117-131.
- Riera, C., Fisa, R., López-Chejade, P., Serra, T., Girona, E., Jiménez, M., Muncunill, J., Sedeño, M., Mascaró, M., Udina, M., Gállego, M., Carrió, J., Forteza, A., Portús, M. (2008) Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain). *Transfusion.* 48: 1383-1389.
- Ritter, U., Frischknecht, F., van Zandbergen, G. (2009) Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? *Trends Parasitol.* 25: 505–510.
- Rivier, D., Bovay, P., Shah, R., Didisheim, S., Mael, J. (1999) Vaccination against *Leishmania major* in a CBA mouse model of infection: role of adjuvants and mechanism of protection. *Parasite Immunol.* 21: 461-473.
- Rogers, ME., Ilg, T., Nikolaev, AV., Ferguson, MA., Bates, PA. (2004) Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature.* 430: 463-467.
- Roy, A., Chowdhury, S., Sengupta, S., Mandal, M., Jaisankar P, D'Annessa I, Desideri, A., Majumder, HK. (2011) Development of derivatives of 3, 3'-

- diindolylmethane as potent *Leishmania donovani* bi-subunit topoisomerase IB poisons. *PLoS One*. 6: e28493.
- Rub, A., Dey, R., Jadhav, M., Kamat, R., Chakkaramakkil, S., Majumdar, S., Mukhopadhyaya, R., Saha, B. (2009) Cholesterol depletion associated with *Leishmania major* infection alters macrophage CD40 signalosome composition and effector function. *Nat Immunol*. 10: 273–280.
 - Sacks, DL., Pimenta, PF., McConville, MJ., Schneider, P., Turco, SJ. (1995) Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *J Exp Med*. 181: 685-697.
 - Sambrook, K., Fritsch, EF., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York USA. Vol. 1, 2 y 3 (Ford N, Nollan C y Ferguson M eds.).
 - Schönian, G., Mauricio, I., Gramiccia, M., Cañavate, C., Boelaert, M., Dujardin, JC. (2008) Leishmaniasis in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. *Trends Parasitol*. 24: 135-142.
 - Schwartz, E., Hatz, C., Blum, J. (2006) New world cutaneous leishmaniasis in travelers. *Lancet Infect Dis*. 6: 342-349.
 - Scianimanico, S., Desrosiers, M., Dermine, J.F., Meresse, S., Descoteaux, A., Desjardins, M. (1999) Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by *Leishmania donovani* promastigotes. *Cell Microbiol*. 1: 19–32.
 - Sen, N., Das, BB., Ganguly, A., Mukherjee, T., Bandyopadhyay, S., Majumder, HK. (2004) Camptothecin-induced imbalance in intracellular cation homeostasis regulates programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. *J Biol Chem*. 279: 52366-52375.
 - Sengupta, T., Mukherjee, M., Mandal, C., Das, A., Majumder, HK. (2003) Functional dissection of the C-terminal domain of type II DNA topoisomerase from the kinetoplastid hemoflagellate *Leishmania donovani*. *Nucleic Acids Res*. 31: 5305-5316.
 - Seol, Y., Zhang, H., Pommier, Y., Neuman, KC. (2012) A kinetic clutch governs religation by type IB topoisomerases and determines camptothecin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109: 16125-16130.

- Shapiro, TA. (1994) Mitochondrial topoisomerase II activity is essential for kinetoplast DNA minicircle segregation. *Mol Cell Biol.* 14: 3660-3667.
- Shapiro, TA., Englund, PT. (1995) The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu Rev Microbiol.* 49: 117-143.
- Shin, SH., Lee, EJ., Chun, J., Hyun, S., Kim, YI., Kang, SS. (2012) The nuclear localization of glycogen synthase kinase 3 β is required its putative PY-nuclear localization sequences. *Mol Cells.* 34: 375-382.
- Simon, I., Wissing, KM., Del Marmol, V., Antinori, S., Remmelink, M., Nilufer Broeders, E., Nortier, JL., Corbellino, M., Abramowicz, D., Cascio, A. (2011) Recurrent leishmaniasis in kidney transplant recipients: report of 2 cases and systematic review of the literature. *Transpl Infect Dis.* 13: 397-406.
- Singh, S., Sharma, U., Mishra, J. (2011) Post-kala-azar dermal leishmaniasis: recent developments. *Int J Dermatol.* 50: 1099-1108.
- Sinha, S., Fernández, G., Kapila, R., Lambert, WC., Schwartz, RA. (2008) Diffuse cutaneous leishmaniasis associated with the immune reconstitution inflammatory syndrome. *Int J Dermatol.* 47: 1263-1270.
- Slesarev, AI., Stetter, KO., Lake, JA., Gellert, M., Krah, R., Kozyavkin, SA. (1993) DNA topoisomerase V is a relative of eukaryotic topoisomerase I from a hyperthermophilic prokaryote. *Nature.* 364:735-737.
- Soares, MB., Titus, RG., Shoemaker, CB., David, JR., Bozza, M. (1998) The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF-alpha and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor. *J Immunol.* 160:1811-1816.
- Späth, GF., Garraway, LA., Turco, SJ., Beverley, SM. (2003) The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100: 9536-9541.
- Spellberg, B., Edwards, JE. Jr. (2001) Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis.* 32: 76-102.
- Staker, BL., Feese, MD., Cushman, M., Pommier, Y., Zembower, D., Stewart, L., Burgin, AB. (2005) Structures of three classes of anticancer agents bound to the human topoisomerase I-DNA covalent complex. *J Med Chem.* 48: 2336-2345.

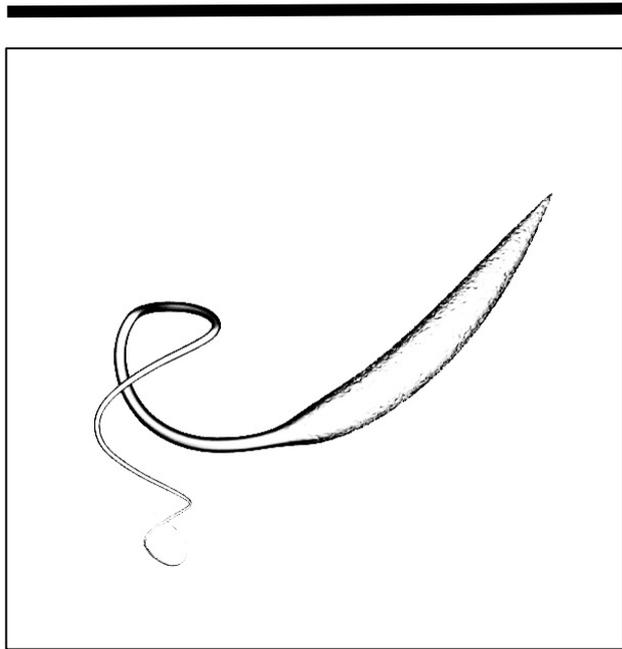
- Staker, BL., Hjerrild, K., Feese, MD., Behnke, CA., Burgin, AB. Jr., Stewart, L. (2002) The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99: 15387-15292.
- Stewart, L., Ireton, GC., Champoux, JJ. (1996) The domain organization of human topoisomerase I. *J Biol Chem*. 271:7602-7608.
- Stewart, L., Ireton, GC., Champoux, JJ. (1997) Reconstitution of human topoisomerase I by fragment complementation. *J Biol Mol*. 269: 355-372.
- Stewart, L., Ireton, GC., Champoux, JJ. (1999) A functional linker in human topoisomerase I is required for maximum sensitivity to camptothecin in a DNA relaxation assay. *J Biol Chem*. 274: 32950-32960.
- Stewart, L., Redinbo, MR., Qiu, X., Hol, WG., Champoux, JJ. (1998) A model for the mechanism of human topoisomerase I. *Science*. 279: 1534-1541.
- Stivers, JT., Harris, TK., Mildvan, AS. (1997) Vaccinia DNA topoisomerase I: evidence supporting a free rotation mechanism for DNA supercoil relaxation. *Biochemistry*. 36: 5212-5222.
- Strumberg, D., Pommier, Y., Paull, K., Jayaraman, M., Nagafuji, P., Cushman, M. (1999) Synthesis of cytotoxic indenoisoquinoline topoisomerase I poisons. *J. Med. Chem*. 42: 446-457.
- Suffia, IJ., Reckling, SK., Piccirillo, CA., Goldszmid, RA., Belkaid, Y. (2006) Infected site-restricted Foxp3⁺ natural regulatory T cells are specific for microbial antigens. *J Exp Med*. 203: 777–788.
- Sundar, S., Chakravarty, J., Agarwal, D., Rai, M., Murray, HW. (2010) Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. *N Engl J Med*. 362: 504–512.
- Sundar, S., Jha, TK., Thakur, CP., Mishra, M., Singh, VP., Buffels, R. (2003) Single-dose liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis in India: a multicenter study. *Clin Infect Dis*. 37: 800–804.
- Tamura, H., Kohchi, C., Yamada, R., Ikeda, T., Koiwai, O., Patterson, E., Keene, JD., Okada, K., Kjeldsen, E., Nishikawa, K. (1991) Molecular cloning of a cDNA of a camptothecin-resistant human DNA topoisomerase I and identification of mutation sites. *Nucleic Acids Res*. 19: 69-75.

- Tanizawa, A., Fujimori, A., Fujimori, Y., Pommier, Y. (1994) Comparison of topoisomerase I inhibition, DNA damage, and cytotoxicity of camptothecin derivatives presently in clinical trials. *J Natl Cancer Inst.* 86:836-842.
- Tanizawa, A., Kohn, KW., Pommier, Y. (1993) Induction of cleavage in topoisomerase I c-DNA by topoisomerase I enzymes from calf thymus and wheat germ in the presence and absence of camptothecin. *Nucleic Acids Res.* 21: 5157-5166.
- Tasdemir, D., Sanabria, D., Lauinger, IL., Tarun, A., Herman, R., Perozzo, R., Zloh, M., Kappe, SH., Brun, R., Carballeira, NM. (2010) 2-Hexadecynoic acid inhibits plasmodial FAS-II enzymes and arrests erythrocytic and liver stage Plasmodium infections. *Bioorg Med Chem.* 18: 7475-7485.
- Teicher, AB. (2008) Next generation topoisomerase I inhibitors: Rationale and biomarker strategies. *Biochem Pharmac.* 75: 1262-1271.
- Teng, AC., Al-Montashiri, NA., Cheng, BL., Lou, P., Ozmizrak, P., Chen, HH., Stewart, AF. (2011) Identification of a phosphorylation-dependent nuclear localization motif in interferon regulatory factor 2 binding protein 2. *PLoS One.* 6: e24100.
- Theodos, CM., Povinelli, L., Molina, R., Sherry, B., Titus, RG. (1991) Role of tumor necrosis factor in macrophage leishmanicidal activity in vitro and resistance to cutaneous leishmaniasis in vivo. *Infect Immun.* 59: 2839–2842.
- Tolson, DL., Turco, SJ., Pearson, TW. (1990) Expression of a repeating phosphorylated disaccharide lipophosphoglycan epitope on the surface of macrophages infected with *Leishmania donovani*. *Infect Immun.* 58: 3500–3507.
- Tovchigrechko, A., Vakser, IA., (2006) GRAMM-X public web server for protein-protein docking. *Nucleic Acids Res.* 34: 310-314.
- Trott, O., Olson, AJ. (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J Comput Chem.* 31: 455-461.
- Ulukan, H., Swaan, PW. (2002) Camptothecins: a review of their chemotherapeutic potential. *Drugs.* 62: 2039-2057.

- Uthaisangsook, S., Day, NK., Bahna, SL., Good, RA., Haraguchi, S. (2002) Innate immunity and its role against infections *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 88: 253-264.
- Valenti, M., Nieves-Neira, W., Kohlhagen, G., Kohn, KW., Wall, ME., Wani, MC., Pommier, Y. (1997) Novel 7-alkyl methylenedioxy-camptothecin derivatives exhibit increased cytotoxicity and induce persistent cleavable complexes both with purified mammalian topoisomerase I and in human colon carcinoma SW620 cells. *Mol Pharmacol.* 52: 82-87.
- Valenzuela, JG., Garfield, M., Rowton, ED. (2004) Pham VM Identification of the most abundant secreted proteins from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, vector of *Leishmania chagasi*. *J Exp Biol.* 207: 3717-3729.
- van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W., Laskay, T. (2004) Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol.* 173: 6521–6525.
- Vangone, A., Spinelli, R., Scarano, V., Cavallo, L., Oliva, R. (2011) COCOMAPS: a web application to analyze and visualize contacts at the interface of biomolecular complexes. *Bioinformatics.* 27: 2915-2916.
- Varela-M, RE., Villa-Pulgarin, JA., Yepes, E., Müller, I., Modolell, M., Muñoz, DL., Robledo, SM., Muskus, CE., López-Abán, J., Muro, A., Vélez, ID., Mollinedo, F. (2012) In vitro and in vivo efficacy of ether lipid edelfosine against *Leishmania* spp. and SbV-resistant parasites. *PLoS Negl Trop Dis.* 6: e1612.
- Vennerstrom, JL., Lovelace, JK., Waits, VB., Hanson, WL., Klayman, DL. (1990) Berberine derivatives as antileishmanial drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 34: 918-921.
- Vernal, J., Fiser, A., Sali, A., Müller, M., Cazzulo, JJ., Nowicki, C. (2002) Probing the specificity of a trypanosomal aromatic alpha-hydroxy acid dehydrogenase by site-directed mutagenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 293: 633-639.
- Villa, H., Otero-Marcos, AR., Reguera RM., Balaña-Fouce R., García-Estrada C., Pérez-Pertejo Y., Tekwani, BL., Myler, PJ., Stuart, KD., Bjornsti,

- MA., Ordóñez, D. (2003) A novel active DNA topoisomerase I in *Leishmania donovani*. *J Biol Chem.* 278: 3521-3526.
- Vinograd, L.J., Radloff, R., Watson, R., Laipis, P. (1965) The twisted circular form of polyoma viral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 53: 1104-1111.
 - Vologodskii, AV., Cozzarelli, NR. (1994) Conformational and thermodynamic properties of supercoiled DNA. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 23: 609-643.
 - Walker, J., Saravia, NG. (2004) Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote DNA topoisomerase I and human monocyte DNA topoisomerases I and II by antimonial drugs and classical antitopoisomerase agents. *J Parasitol.* 90: 1155-1162.
 - Wanasen, N., Soong, L. (2008) L-Arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. *Immunol Res.* 41: 15–25.
 - Wang, JC. (1998) Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine. *Q Rev Biophys.* 31: 107–144.
 - Wang, JC. (2002) Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3: 430-440.
 - Weina, P.J., Neafie, RC., Wortmann, G., Pholhemus, M., Aronson, NE. (2004) Old world leishmaniasis: an emerging infection among deployed US military and civilian workers. *Clin Infect Dis.* 39: 1674-1680.
 - Westergaard, GG., Bercovich, N., Reinert, MD., Vazquez, MP. (2010) Analysis of a nuclear localization signal in the p14 splicing factor in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol.* 40: 1029–1035.
 - Wheat, WH., Pauken, KE., Morris, RV., Titus, RG. (2008) *Lutzomyia longipalpis* salivary peptide maxadilan alters murine dendritic cell expression of CD80/86, CCR7, and cytokine secretion and reprograms dendritic cell-mediated cytokine release from cultures containing allogeneic T cells. *J Immunol.* 180: 8286-8298.
 - Wolday, D., Berche, N., Akuffo, H., Britton, S., (1999) *Leishmania*-HIV interaction: immunopathogenic mechanisms. *Parasitology Today.* 15: 182-187.

- Wolf, LK. (2009) New software and websites for the chemical enterprise. *Chemical & Engineering News Archive*. 87: 48.
- Woodrow, JP., Hartzell, JD., Czarnik, J., Brett-Major, DM., Wortmann, G. (2006) Cutaneous and presumed visceral leishmaniasis in a soldier deployed to Afghanistan. *Med Gen Med*. 30: 43.
- Wright, JH. (1903) Protozoa in a case of tropical ulcer. *J Med Res*. 10: 472-482.
- Wu, J., Cunha, FQ., Liew, FY., Weiser, WY. (1993) IL-10 inhibits the synthesis of migration inhibitory factor and migration inhibitory factor-mediated macrophage activation. *J Immunol*. 151: 4325–4332.
- Yamashita, Y., Fujii, N., Murakata, C., Ashizawa, T., Okabe, M., Nakano, H. (1992) Induction of mammalian DNA topoisomerase I mediated DNA cleavage by antitumor indolocarbazole derivatives. *Biochemistry*. 31: 12069-12075.
- Yang, Z., Champoux, JJ. (2002) Reconstitution of enzymatic activity by the association of the cap and catalytic domains of human topoisomerase I. *J Biol Chem*. 277: 30815-30823.
- Zhang, L., Hua, Z., Ren, J., Meng, A. (2001) The nuclear localization signal of zebrafish terra is located within the DM domain. *FEBS Lett*. 503: 25-29.
- Zhu, AX., Ready, N., Clark, JW., Safran, H., Amato, A., Salem, N., Pace, S., He, X., Zvereva, N., Lynch, TJ., Ryan, DP., Supko, JG. (2009) Phase I and pharmacokinetic study of gimatecan given orally once a week for 3 of 4 weeks in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res*. 15: 374-381.



8. ANEXOS

TABLA 1. Oligonucleótidos utilizados como cebadores para el clonado de las diferentes deleciones de la LdTopIL.

| | | |
|-------|---|------------------------------------|
| 1-635 | S | CGGGATCCATGAAGGTGGAGAATAGC |
| | A | CCGCTCGAGCTACACCCTCAAAGCTGC |
| 1-592 | S | CGGGATCCATGAAGGTGGAGAATAGC |
| | A | CCGCTCGAGCTACTCCTTCAACTTCTTTGGCGC |
| 1-575 | S | CGGGATCCATGAAGGTGGAGAATAGC |
| | A | CCGCTCGAGCTAGCTCAACACCTTTCCACCCTTC |
| 1-561 | S | CGGGATCCATGAAGGTGGAGAATAGC |
| | A | CCGCTCGAGCTAGGCGGCCCTCTTCTTGCCAG |

S: sentido; A: antisentido

TABLA 2. Oligonucleótidos utilizados como cebadores para el clonado de las diferentes deleciones de la LdTopIS.

| | | |
|---------|---|--|
| 1-262 | S | ATAAGAATGCGGCCGCATGCAGCCTTTCAAAGTCCT |
| | A | GACTAGTGGAGATCAAGTCGCGC |
| 169-262 | S | ATAAGAATGCGGCCGCATGCCACGCTGGTGCCTCCGCGTCCT |
| | A | GACTAGTGGAGATCAAGTCGCGC |
| 175-262 | S | ATAAGAATGCGGCCGCATGGTCCTCCGGTGGTGC GA |
| | A | GACTAGTGGAGATCAAGTCGCGC |
| 180-262 | S | ATAAGAATGCGGCCGCATGCGATCTTTCCCAATGACATC |
| | A | GACTAGTGGAGATCAAGTCGCGC |
| R175A | S | ACGCTGGTGCCTCCGGCTCCTCCGGTGGTGC GA |
| | A | TCGCACCACCGGAGGAGCCGGAGGCACCAGCGT |
| R180A | S | CGTCCTCCGGTGGCATCTTTCTTCCCAATGAC |
| | A | GTCATTGGGGAAAGATGCCACCACCGGAGGACG |
| S181A | S | CCTCCGGTGGTGCAGCTTTCCCAATGACATC |
| | A | GATGTCATTGGGGAAAGCTCGCACCACCGGAGG |
| ΔRS | S | CGTCCTCCGGTGGTTTCCCAATGACATC |
| | A | GATGTCATTGGGGAAACACCACCGGAGGACG |
| ΔRPPVV | S | GTCCCCACGCTGGTGCCTCCGGGATCTTTCCCAATGACATC |
| | A | GATGTCATTGGGGAAAGATCGCGGAGGCACCAGCGTGGGGAC |

S: sentido; A: antisentido

TABLA 3. Oligonucleótidos utilizados como cebadores para el clonado de las diferentes quimeras de fusión LdTopIL-GFP.

| | | |
|--------|---|--------------------------------------|
| TopL1 | S | CGGGATCCACCATGAAGGTGGAGAATAGCAAGAT |
| | A | CAATTGTCACTACACCCTCAAAGCTGCAAG |
| TopL2 | S | CGGGATCCACCATGAAGGTGGAGAATAGCAAGAT |
| | A | CAATTGTCAGTCCACACGCAGTATCGGT |
| TopL3 | S | CGGGATCCACCGGGCGTCGCGAGCAGGTG |
| | A | CAATTGTCAGATGTGCTCCACACGCAGCG |
| TopL4 | S | CGGGATCCACCCAGCTCATGCCGGACAACATC |
| | A | CAATTGTCAGGCGCCCGACGTGGATTTT |
| TopL5 | S | CGGGATCCACCAAGAAGGCCGAGTCCGCATC |
| | A | CAATTGTCACTACACCCTCAAAGCTGCAAG |
| TopL6 | S | CGGGATCCACCCAGCTCATGCCGGACAACATC |
| | A | CAATTGTCACTTCTTCTTTTTGGCGGCCCTC |
| TopL7 | S | CGGGATCCACCTCTGCCAAGAAGGGTGGAAAG |
| | A | CAATTGTCACTACACCCTCAAAGCTGCAAG |
| TopL8 | S | CGGGATCCACCGCAGCAAGCAAGTCGTCCAAG |
| | A | CAATTGTCACTACACCCTCAAAGCTGCAAG |
| TopL9 | S | CGGGATCCACCGAGGAGGACGAGGACGAC |
| | A | CAATTGTCACTACACCCTCAAAGCTGCAAG |
| TopL10 | S | AAATCCACGTCGGGCGCCAAAAAGAAGAAGTCTGCC |
| | A | GGCAGACTTCTTCTTTTTGGCGCCCGACGTGGATTT |
| TopL11 | S | GGTGGAAAGGTGTTGAGCGAGGAGGACGAGGACGAC |
| | A | GTCGTCCTCGTCCTCCTCGCTCAACACCTTTCCACC |

S: sentido; A: antisentido

TABLA 4. Oligonucleótidos utilizados como cebadores para el clonado de las diferentes quimeras de fusión LdTopIS-GFP.

| | | |
|--------|---|--------------------------------------|
| TopS1 | S | CGGGATCCACCATGCAGCCTGTTCAAAGTCCAG |
| | A | CAATTGTCAAAAATCGAAGTTCTCGGCAT |
| TopS2 | S | CGGGATCCACCATGCAGCCTGTTCAAAGTCCAG |
| | A | CAATTGTCAAGCCGTCGTTGCAACCGGC |
| TopS3 | S | CGGGATCCACCGCTCCGCCACCGAAGGTGC |
| | A | CAATTGTCAGACGAGGAGGAGCGATCG |
| TopS4 | S | CGGGATCCACCGCTGAGTCAGTGGTGTGTCAGG |
| | A | CAATTGTCACAGCGTGGGGACTTCCTCC |
| TopS5 | S | CGGGATCCACCGTGCCTCCGCGTCCTCCG |
| | A | CAATTGTCAAAAATCGAAGTTCTCGGCAT |
| TopS6 | S | CGGGATCCACCATGCAGCCTGTTCAAAGTCCAG |
| | A | CAATTGTCAGGAGGACGAGGACGAGCTATC |
| TopS7 | S | CGGGATCCACCATGCAGCCTGTTCAAAGTCCAG |
| | A | CAATTGTCAATCGGACGATGAGCTGGAAGTCTG |
| TopS8 | S | CGGGATCCACCATGCAGCCTGTTCAAAGTCCAG |
| | A | CAATTGTCAGAGCAGTTCCAGCTCATCGTCC |
| TopS9 | S | CGGGATCCACCATGCAGCCTGTTCAAAGTCCAG |
| | A | CAATTGTCACTCGACGCGGCGCACCTTC |
| TopS10 | S | CGGGATCCACCATGCAGCCTGTTCAAAGTCCAG |
| | A | CAATTGTCAGCTCTCGACGCGGCGCACC |
| TopS11 | S | CGGGATCCACCTCCAGCTCATCGTCCGATAGC |
| | A | CAATTGTCACAGCGTGGGGACTTCCTCCTC |
| TopS12 | S | CGGGATCCACCGTGCCTCCGCGTCCTCCG |
| | A | CAATTGTCAGGTGCCGAGCGACACAGCCTT |
| TopS13 | S | CCGTTGCAACGACGGCTAGTTCCAGCTCATCGTCC |
| | A | GGACGATGAGCTGGAAGTACCGTTCGTTGCAACCGG |
| TopS14 | S | GCTGTGTCGCTCGGCACCCCGTATCATCTGCTCG |
| | A | CGAGCAGATGATACGGGGGGTCCGAGCGACACAGC |
| TopS15 | S | AAAATCAACTACATCGACCAAGACGTGCCGATCAAC |
| | A | GTTGATCGGCACGTCTTGGTCGATGTAGTTGATTTT |
| TopS16 | S | TGCTCGTGGGCAAAGGCGACCATCCAGAAGAAGTTC |
| | A | GAACTTCTTCTGGATGGTGCCTTTGCCACGAGCA |
| TopS17 | S | CGGGATCCACCGTGCCTCCGCGTCCTCCG |
| | A | CAATTGTCAGGTTGCAGAGAAGATCTTGTTG |
| TopS18 | S | CGGGATCCACCATGCAGCCTGTTCAAAGTCCAG |
| | A | CAATTGTCAGGTGCCGAGCGACACAGCCTT |

S: sentido; A: antisentido

Novel Findings on Trypanosomatid Chemotherapy Using DNA Topoisomerase Inhibitors

Rosario Díaz-González, Yolanda Pérez-Pertejo, Christopher Fernández Prada, Celia Fernández-Rubio, Rafael Balaña-Fouce* and Rosa M. Reguera

Dpto. Farmacología y Toxicología (INTOXCAL), Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León (SPAIN).
Phone 34987291257; telefax 34 987291252

Abstract: Trypanosomatid (order *Kinetoplastida*)-borne neglected tropical diseases – African and American trypanosomiasis and leishmaniasis - are amongst the most devastating health threats of underdeveloped, developing and poor countries. Climatic changes due to global warming, tourism exchange and increasing migratory fluxes are re-distributing the endemic subtropical location of these diseases to a new scenario with a rising presence in developed countries during the last decades. In addition, the proved opportunistic transmission of these diseases through contaminated syringes shared by drug users, in combination with immunosuppression processes linked to HIV infections and the poor response to the typical treatments, point to AIDS patients as a sensitive sub-population prone to suffer from these diseases.

DNA topoisomerases are the “molecular engineers” that unravel the DNA during replication and transcription. The mechanism of DNA unwinding includes the scission of a single DNA strand - type I topoisomerases - or both DNA strands - type II topoisomerases - establishing transient covalent bonds with the scissile end. Camptothecin and etoposide – two natural drugs whose semi-synthetic derivatives are currently used in cancer chemotherapy – target types I and II DNA-topoisomerases respectively, stabilizing ternary topoisomerase-DNA-drug covalent complexes, which irreversibly poison the enzymes. Several differences between parasite and host DNA topoisomerases have pointed to these enzymes as potential drug targets in Trypanosomatids. The unusual localization inside the mitochondria-like organelle – the kinetoplast - linked to mini and maxicircles, as well as the uncommon heterodimeric structure of the DNA topoisomerase IB subfamily, make these proteins unquestionable targets for drug intervention against trypanosomatids.

Key Words: DNA-topoisomerases, chemotherapy, camptothecin, parasitic protozoa, trypanosomatids, tropical diseases.

INTRODUCTION

Neglected tropical diseases are one of the most painful consequences of poverty. Poor prophylactic measures, null or inadequate sanitary conditions and a difficult access to effective medicines or therapies, along with no effective vaccines against trypanosomatids - despite the important role of the host's immune system in resistance and healing - are giving rise to an enormous incidence of these diseases in Asian, African and South-American countries [1-3].

The pharmacological management of these parasitoses is at crossroads nowadays. On the one hand, the old fashion first-line drugs – arsenic and antimony derivatives, diamidines, macrolide antibiotics, benznidazole, amongst others – are losing efficiency due to their massive use during decades and the emergence of resistant strains [4-6]. On the other hand, new hit drugs are being marketed after successful trials in humans. This was the case of α -difluoromethylornithine (DFMO) - an irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase [7]– developed in the early 90s against late stages of African trypanosomiasis [8], or more recently the alkylphospholipid – miltefosine – with unquestionable effects against visceral leishmaniasis [9, 10]. However, miltefosine exhib-

ited variable efficacies in trials against *Leishmania Viannia* mucocutaneous leishmaniasis [11]. Reproductive toxicity remains a problem and is an important part of post-marketing miltefosine surveillance [12]. Therefore, the lack of efficient antiparasitic drugs strongly justifies the characterization and validation of new molecular targets for drug intervention [13].

A common feature of all trypanosomatids is the existence of a single mitochondrion, which extends towards the cell. The part that is attached to the basal body contains an intricate mesh of disc-shaped extranuclear DNA called kinetoplast DNA (kDNA), which represents the 10-20% of the total cellular DNA [14]. kDNA is arranged in thousands of interlocked DNA rings called mini- and maxicircles. Minicircles are the most abundant form in kDNA (5.000-10.000 molecules per cell). They consist of circular DNA molecules, from 100 to 2.500 bp in length, encoding guide RNAs involved in the edition of mitochondrial nascent RNAs [15]. Maxicircles are much larger rings - 30.000-50.000 bp in length - but less abundant than minicircles - 50 copies per cell. Maxicircles are equivalent to the mitochondrial DNA from other eukaryotes, since they codify mitochondrial proteins, ribosomal RNA and tRNAs [16]. Replication of kDNA occurs synchronously with genomic DNA during cell division. kDNA components must be decatenated from the network and catenated later to the nascent mesh when DNA is replicated [17]. DNA replication from both mini and maxicircles

*Address correspondence to this author at the Dpto. Farmacología y Toxicología, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León (SPAIN); Tel: 34987291257; Fax: 34 987291252; E-mail: rbalf@unileon.es



Published in final edited form as:

Chem Phys Lipids. 2009 September ; 161(1): 38–43. doi:10.1016/j.chemphyslip.2009.06.140.

First total synthesis and antiprotozoal activity of (Z)-17-methyl-13-octadecenoic acid, a new marine fatty acid from the sponge

Polymastia penicillus

Néstor M. Carballeira^{a,*}, Nashbly Montano^a, Rafael Balaña-Fouce^b, and Christopher Fernández Prada^b

^a Department of Chemistry, University of Puerto Rico, P.O. Box 23346, San Juan, Puerto Rico 00931-3346, USA

^b Department of Biomedical Sciences (INTOXCAL), University of León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León, Spain

Abstract

The first total synthesis for the (Z)-17-methyl-13-octadecenoic acid was accomplished in seven steps and in a 45% overall yield. The use of (trimethylsilyl)acetylene was key in the synthesis. Based on a previous developed strategy in our laboratory the best synthetic route towards the title compound was first acetylide coupling of (trimethylsilyl)acetylene to the long-chain protected 12-bromo-1-dodecanol followed by a second acetylide coupling to the short-chain 3-methyl-1-bromobutane, which resulted in higher yields. Complete spectral data is also presented for the first time for this recently discovered fatty acid. The title compound displayed antiprotozoal activity against *Leishmania donovani* (EC₅₀ = 19.8 µg/ml) and inhibited the leishmania DNA topoisomerase IB at concentrations of 50 µM.

Keywords

Fatty acids; leishmaniasis; (Z)-17-methyl-13-octadecenoic acid; *Polymastia penicillus*; sponges; synthesis; topoisomerase IB

1. Introduction

Marine sponges have provided some rather interesting phospholipid fatty acids with no counterpart in terrestrial organisms. One rather poorly studied class of fatty acids has been the *iso* methyl-branched nonadecenoic acids, from which only a handful number of compounds are known. Among these fatty acids it is worthwhile to mention here the (Z)-17-methyl-6-octadecenoic acid and the (Z)-17-methyl-7-octadecenoic acid, which were isolated from the mollusk *Siphonaria denticulata* and synthesized for the first time by our group (Carballeira et al., 2001). The isomeric (Z)-17-methyl-11-octadecenoic acid was also identified in the Caribbean sponge *Calyx podatypa* (Carballeira et al., 1998), but it is probably arising from a marine bacterium since it was first identified in the sulfate-reducing bacteria *Desulfobacter*

*Corresponding author. Tel.: 787-764-0000 x 4791; fax: 787-756-8242, nmcarballeira@uprrp.edu (N.M. Carballeira).

Publisher's Disclaimer: This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final citable form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.



Published in final edited form as:

Lipids. 2009 October ; 44(10): 953–961. doi:10.1007/s11745-009-3345-z.

Total Synthesis and Antileishmanial Activity of the Natural Occurring Acetylenic Fatty Acids 6-Heptadecynoic acid and 6-Icosynoic acid

Néstor M. Carballeira^{a,*}, Michelle M. Cartagena^a, Christopher Fernández Prada^b, Celia Fernández Rubio^b, and Rafael Balaña-Fouce^b

^a Department of Chemistry, University of Puerto Rico, P.O. Box 23346, San Juan, Puerto Rico 00931-3346, USA

^b Department of Biomedical Sciences (INTOXCAL), University of León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León, Spain

Abstract

The first total syntheses of the naturally occurring acetylenic fatty acids 6-heptadecynoic acid (59% overall yield) and 6-icosynoic acid (34% overall yield) was accomplished in four steps. Using the same synthetic sequence the naturally occurring fatty acids (6*Z*)-heptadecenoic acid (46% overall yield) and (6*Z*)-icosenoic acid (27% overall yield) were also synthesized. The Δ^6 acetylenic fatty acids displayed good antiprotozoal activity towards *Leishmania donovani* promastigotes ($EC_{50} = 1-6 \mu\text{g/mL}$), but the 6-icosynoic acid was the most effective in the series. In addition, the (6*Z*)-icosenoic acid was a much better antiprotozoal compound ($EC_{50} = 5-6 \mu\text{g/mL}$) than the (6*Z*)-heptadecenoic acid ($EC_{50} > 25 \mu\text{g/mL}$). The saturated fatty acids *n*-heptadecanoic acid and *n*-eicosanoic acid were not effective towards *L. donovani*, indicating that the Δ^6 unsaturation in these fatty acids is necessary for leishmanicidal activity. In addition, both the 6-icosynoic acid and the (6*Z*)-icosenoic acid were inhibitors of the leishmania DNA topoisomerase IB enzyme ($EC_{50's} = 36-49 \mu\text{M}$), a possible intracellular target for these compounds. This is the first study assessing fatty acids as inhibitors of the leishmania DNA topoisomerase IB enzyme.

Keywords

Acetylenic fatty acids; Antiprotozoal activity; *Leishmania donovani*; Synthesis; Topoisomerase IB

Introduction

Many acetylenic fatty acids are natural plant constituents, but those with a C-6 triple bond, such as the 6-nonadecynoic acid, have displayed strong antifungal activity [1]. Recently, the novel 6-heptadecynoic acid (**1a**) and 6-icosynoic acid (**1b**) were isolated from the plant *Sommeria sabiceoides* [1]. While **1a** is a new natural product, **1b** has been known for sometime as a trace constituent of *Alvaradoa amorphoides* seed oil [2]. Neither of these two acetylenic fatty acids **1a** and **1b** have been explored for antiprotozoal activity nor their olefinic analogs (6*Z*)-heptadecenoic acid (**6a**) and (6*Z*)-icosenoic acid (**6b**), which are also natural products. The (6*Z*)-heptadecenoic acid (**6a**) was identified in the opisthobranch *Haminaea templadoi* as well as in a marine *Micrococcus* bacterium [3,4], while **6b** is also a minor constituent of some seed oils [2].

*To whom correspondence should be addressed. Tel.: 787-764-0000 ext. 4791; Fax: 787-756-8242, nmcarballeira@uprrp.edu.

Review

DNA topoisomerases in apicomplexan parasites: promising targets for drug discovery

Carlos García-Estrada¹, Christopher Fernández Prada¹,
Celia Fernández-Rubio¹, Francisco Rojo-Vázquez²
and Rafael Balaña-Fouce^{1,*}

¹Departamento de Ciencias Biomédicas (INTOXCAL), and ²Departamento de Sanidad Animal, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León, Spain

The phylum Apicomplexa includes a large group of protozoan parasites responsible for a wide range of animal and human diseases. Destructive pathogens, such as *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*, causative agents of human malaria, *Cryptosporidium parvum*, responsible of childhood diarrhoea, and *Toxoplasma gondii*, responsible for miscarriages and abortions in humans, are frequently associated with HIV immunosuppression in AIDS patients. The lack of effective vaccines, along with years of increasing pressure to eradicate outbreaks with the use of drugs, has favoured the formation of multi-drug resistant strains in endemic areas. Almost all apicomplexan of medical interest contain two endosymbiotic organelles that contain their own mitochondrial and apicoplast DNA. Apicoplast is an attractive target for drug testing because in addition to harbouring singular metabolic pathways absent in the host, it also has its own transcription and translation machinery of bacterial origin. Accordingly, apicomplexan protozoa contain an interesting mixture of enzymes to unwind DNA from eukaryotic and prokaryotic origins. On the one hand, the main mechanism of DNA unwinding includes the scission of one—type I—or both DNA strands—type II eukaryotic topoisomerases, establishing transient covalent bonds with the scissile end. These enzymes are targeted by camptothecin and etoposide, respectively, two natural drugs whose semisynthetic derivatives are currently used in cancer chemotherapy. On the other hand, DNA gyrase is a bacterial-borne type II DNA topoisomerase that operates within the apicoplast and is effectively targeted by bacterial antibiotics like fluoroquinolones and aminocoumarins. The present review is an update on the new findings concerning topoisomerases in apicomplexan parasites and the role of these enzymes as targets for therapeutic agents.

Keywords: DNA topoisomerases; chemotherapy; apicomplexan protozoa; tropical diseases

1. INTRODUCTION

The phylum Apicomplexa includes parasites of major medical relevance such as *Plasmodium* sp., *Babesia* sp., *Theileria* sp., *Cryptosporidium* sp., *Toxoplasma* sp. and others. All of them are unicellular organisms characterized by the lack of mobile structures and the presence of a representative organelle—the apicoplast, a relic chloroplast-like organelle of uncertain function that contains more than 500 functional predicted proteins and gives this phylum its name (Ralph *et al.* 2004; Morrison 2009). Species of genus *Plasmodium*, *Babesia* and *Theileria* are zoonotic diseases transmitted by arthropod vectors. The *Anopheles* mosquito is the vector of malaria, while *Theileria* sp. and *Babesia* sp. are currently transmitted by ticks of the *Ixodidae* family. On the contrary, diseases caused by *Toxoplasma* and *Cryptosporidium* are not transmitted by arthropods. The contamination of foodstuffs,

frequently raw or lightly cooked meat (containing *Toxoplasma* bradyzoites) (Dorny *et al.* 2009) or water supplies with oocysts (resistant stages of *Cryptosporidium*), is the major source of infective outbreaks (Fayer 2004).

Once the micro-organisms enter their respective mammalian hosts, apicomplexan parasites undergo several development stages. Prior to erythrocyte invasion (exerythrocytic cycle), *Plasmodium* and *Theileria* reside within hepatocytes and lymphocytes, respectively, unlike *Babesia* sporozoites, which directly infect host erythrocytes. By contrast, the life cycle of *Cryptosporidium* occurs entirely in the host's gastrointestinal tract, preferably in the brush border cells of the small intestine lining. This particular feature of *Cryptosporidium* differs from the cyst-forming parasites like *Toxoplasma*, whose sexual and asexual reproduction occur in different host species.

Malaria constitutes an important worldwide health issue given that more than 40 per cent of world population is affected by this disease. Malaria is endemic in over 100 countries, inhabited by 2400 million people. The World Health Organization estimated that there

* Author for correspondence (rbalf@unileon.es).

Electronic supplementary material is available at <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2009.2176> or via <http://rsob.royalsocietypublishing.org>.



First total synthesis and antileishmanial activity of (Z)-16-methyl-11-heptadecenoic acid, a new marine fatty acid from the sponge *Dragmaxia undata*

Néstor M. Carballeira^{a,*}, Nashbly Montano^a, Gabriel A. Cintrón^a, Carmary Márquez^a, Celia Fernández Rubio^b, Christopher Fernández Prada^b, Rafael Balaña-Fouce^b

^a Department of Chemistry, University of Puerto Rico, P.O. Box 23346, San Juan Puerto Rico 00931-3346, USA

^b Department of Biomedical Sciences, University of León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 October 2010

Received in revised form

18 November 2010

Accepted 24 November 2010

Available online 1 December 2010

Keywords:

Dragmaxia undata

Fatty acids

Leishmaniasis

(Z)-16-methyl-11-heptadecenoic acid

Sponges

Synthesis

Topoisomerase IB

ABSTRACT

The first total synthesis for the (Z)-16-methyl-11-heptadecenoic acid, a novel fatty acid from the sponge *Dragmaxia undata*, was accomplished in seven steps and in a 44% overall yield. The use of (trimethylsilyl)acetylene was key in the synthesis. Based on a previous developed strategy in our laboratory the best synthetic route towards the title compound was first acetylide coupling of (trimethylsilyl)acetylene to the long-chain protected 10-bromo-1-decanol followed by a second acetylide coupling to the short-chain 1-bromo-4-methylpentane, which resulted in higher yields. Complete spectral data is also presented for the first time for this recently discovered fatty acid and the *cis* double bond stereochemistry of the natural acid was established. The title compound displayed antiprotozoal activity against *Leishmania donovani* (IC₅₀ = 165.5 ± 23.4 μM) and inhibited the leishmania DNA topoisomerase IB enzyme (LdTopIB) with an IC₅₀ = 62.3 ± 0.7 μM.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Marine organisms continue to yield interesting and unprecedented phospholipid fatty acids with no counterpart in terrestrial organisms. One such class of fatty acids is the *iso* methyl-branched octadecenoic acids, from which only a handful number of compounds have been reported. To the best of our knowledge, the only known examples of this type of fatty acids are the (Z)-16-methyl-8-heptadecenoic acid, also synthesized for the first time by our group (Carballeira and Pagán, 2001), and the (Z)-16-methyl-6-heptadecenoic acid, which were identified in a *Micrococcus* bacterium isolated from Lake Pomorie in Bulgaria (Carballeira et al., 2000). Just recently, Osorno and coworkers identified the new fatty acid (Z)-16-methyl-11-heptadecenoic acid (**1**) in the phospholipids (1.1% relative abundance) of the Colombian Caribbean sponge *Dragmaxia undata*, collected at 21 m depth in Punta de Betin, Santa Marta, Colombia (Rodríguez et al., 2010). This rather unusual fatty acid is the *iso* methyl-branched octadecenoic acid with the closest double bond to the ω end of the chain, i.e., a (*n*–6) fatty

acid. However, acid **1** was identified in *D. undata* by means of mass spectrometry on the corresponding methyl ester and pyrrolidide derivative and the identification by GC–MS relied on minute amounts from a complex mixture of 30 fatty acids. Therefore, it was not possible to elucidate if the double bond stereochemistry of the naturally occurring fatty acid was *cis* or *trans*.

It is very likely that acid **1** was biosynthesized by a symbiotic bacterium within *D. undata*, thus implying that having the complete mass spectral data of **1** at hand will be useful to microbiologists seeking to characterize **1** in bacterial samples. The latter statement is backed up by the fact that acid **1** is a two-carbon chain extension of the (Z)-14-methyl-9-pentadecenoic acid, an acid that has been identified in several bacterial sources and most recently in a *Streptomyces* sp. B6007 originating from mangrove sediment in Papua New Guinea (Stritzke et al., 2004). Of particular interest in this context is also the report by Jung and collaborators that *iso* and *anteiso* fatty acids from a *Streptomyces* sp. strain KM86-9B displayed topoisomerase I inhibitory activity (Lee et al., 1998). In fact, we have also shown that the acid (Z)-14-methyl-9-pentadecenoic acid inhibits the human placenta DNA topoisomerase I enzyme at concentrations of 500 μM (Carballeira et al., 2007), while the marine fatty acid (Z)-17-methyl-13-octadecenoic acid inhibits the leishmania DNA topoisomerase IB enzyme at concentrations of 50 μM

* Corresponding author. Tel.: +1 787 764 0000×4791; fax: +1 787 756 8242.
E-mail address: nmcarballeira@uprrp.edu (N.M. Carballeira).



Review

Role of trypanosomatid's arginase in polyamine biosynthesis and pathogenesis

Rafael Balaña-Fouce*, Estefanía Calvo-Álvarez, Raquel Álvarez-Velilla, Christopher F. Prada, Yolanda Pérez-Pertejo, Rosa M. Reguera

Dpto. Ciencias Biomédicas, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 August 2011
Received in revised form 12 October 2011
Accepted 12 October 2011
Available online 20 October 2011

Keywords:

Leishmania spp.
Trypanosoma cruzi
Arginase
Nitric oxide
Polyamines
Host response

ABSTRACT

L-Arginine is one of the precursor amino acids of polyamine biosynthesis in most living organisms including *Leishmania* parasites. L-Arginine is enzymatically hydrolyzed by arginase producing L-ornithine and urea. In *Leishmania* spp. and other trypanosomatids a single gene encoding arginase has been described. The product of this gene is compartmentalized in glycosomes and is the main source of L-ornithine for polyamine synthesis in these parasites. L-Ornithine is substrate of ornithine decarboxylase (ODC) – one of the key enzymes of polyamine biosynthesis and a validated target for therapeutic intervention – producing putrescine, which in turn is converted to spermidine by condensing with an aminopropyl group from decarboxylated S-adenosylmethionine. Unlike trypanosomatids, mammalian hosts have two arginases (arginase I and II), which have close structural and kinetic resemblances, but localize in different subcellular organelles, respond to different stimuli and have different immunological reactivity. Arginase I is a cytosolic enzyme, mostly expressed in the liver as a pivotal component of the urea cycle, providing in addition L-ornithine for polyamine synthesis. In contrast, arginase II localizes inside mitochondria and is metabolically involved in L-proline and L-glutamine biosynthesis. More striking is the role played by L-arginine as substrate for nitric oxide synthase (NOS2) in macrophages, the main route of clearance of many infectious agents including *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*. In infected macrophages L-arginine is catalysed by NOS2 or arginase, contributing to host defense or parasite killing, respectively. A balance between NOS2 and arginase activities is a crucial factor in the progression of the *Leishmania* infection inside macrophages. In response to T-helper type 2 (Th2) cytokines, resident macrophages induce arginase I inhibiting NO production from L-arginine, thereby promoting parasite proliferation. Conversely, the response to T-helper type 1 (Th1) cytokines is linked to NOS2 induction and parasite death. Moreover, induction of any of these enzymes is accompanied by suppression of the other. Specifically, arginase reduces NO synthesis by substrate depletion, and N^ω-hydroxy-L-arginine, one of the intermediates of NOS2 catalysis, competitively inhibits arginase activity.

In spite of abundant data concerning arginases in mammals as well their involvement in parasite killing, there are very few papers regarding the actual role of arginase in the parasite itself. This review is an update on the recent progress in research on leishmanial arginase including the role played by this enzyme in the establishment of infection in macrophages and the immune response of the host. A comparative study of arginases from other kinetoplastids is also discussed.

© 2011 Published by Elsevier B.V.

Contents

| | |
|--|----|
| 1. The dimension of the problem..... | 86 |
| 2. Arginine metabolism in mammals..... | 86 |
| 3. Arginine metabolism in trypanosomatids..... | 87 |

Abbreviations: ODC, ornithine decarboxylase; SAMDC, S-adenosylmethionine decarboxylase; ADC, arginine decarboxylase; NO, nitric oxide; NOS2, inducible nitric oxide synthase; Th1, T-helper type 1 lymphocytes; Th 2, T-helper type 2 lymphocytes; NOHA, N^ω-hydroxy-L-arginine; R&D, research and development; NTD, neglected tropical diseases; HIV, human immunodeficiency virus; AIDS, acquire immunodeficiency syndrome; ROS, reactive oxygen species; RNOS, reactive nitrogen oxidized species; ONOO⁻, peroxyxynitrite; CAT, cationic amino acid transporter; y⁺, basic amino acid transporter; LPG, lipophosphoglycan; gp63, glycoprotein 63; PS, phosphatidyl serine; Trp, trypanothione; fPPG, filamentous proteophosphoglycan.

* Corresponding author. Tel.: +34 987291257; fax: +34 987291252.

E-mail address: rbalf@unileon.es (R. Balaña-Fouce).

Indotecan (LMP400) and AM13-55: Two Novel Indenoisoquinolines Show Potential for Treating Visceral Leishmaniasis

Rafael Balaña-Fouce,^a Christopher F. Prada,^a José María Requena,^b Mark Cushman,^c Yves Pommier,^d Raquel Álvarez-Velilla,^a José Miguel Escudero-Martínez,^a Estefanía Calvo-Álvarez,^a Yolanda Pérez-Pertejo,^a and Rosa M. Reguera^a

Departamento de Ciencias Biomédicas, Universidad de León, Campus de Vegazana, León, Spain^a; Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid, Spain^b; Department of Medicinal Chemistry and Molecular Pharmacology, College of Pharmacy, and the Purdue Center for Cancer Research, Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA^c; and Laboratory of Molecular Pharmacology, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, USA^d

Visceral leishmaniasis is an emerging neglected tropical disease (NTD) caused by the protozoan *Leishmania infantum* in the countries bordering the Mediterranean Basin. Currently there is no effective vaccine against this disease, and the therapeutic approach is based on toxic derivatives of Sb^V. Therefore, the discovery of new therapeutic targets and the development of drugs designed to inhibit them comprise an extremely important approach to fighting this disease. DNA topoisomerases (Top) have been identified as promising targets for therapy against leishmaniasis. These enzymes are involved in solving topological problems generated during replication, transcription, and recombination of DNA. Being unlike that of the mammalian host, type IB DNA topoisomerase (TopIB) from *Leishmania* spp. is a unique bisubunit protein, which makes it very interesting as a selective drug target. In the present investigation, we studied the effect of two TopIB poisons with indenoisoquinoline structure, indotecan and AM13-55, on a murine BALB/c model of infected splenocytes with *L. infantum*, comparing their effectiveness with that of the clinically tested leishmanicidal drug paromomycin. Both compounds have high selectivity indexes compared with uninfected splenocytes. SDS-KCl-precipitable DNA-protein complexes in *Leishmania* promastigotes and *in vitro* cleaving assays confirmed that these drugs are Top poisons. The inhibitory potency of both indenoisoquinolines on *L. infantum* recombinant TopIB was assessed *in vitro*, with results showing that indotecan was the most active compound, preventing the relaxation of supercoiled DNA. Experimental infections in susceptible BALB/c mice treated with 2.5 mg/kg body weight/day once every other day for a total of 15 days showed that indotecan cleared more than 80% of the parasite burden of the spleen and liver, indicating promising activity against visceral leishmaniasis.

Neglected tropical diseases (NTD) produced by vector-borne protozoa are mostly prevalent in underdeveloped and poor countries, causing an estimated 4.1 million disability-adjusted life years (DALYs) lost (16). However, in developed countries, where these diseases were unknown or had been eradicated for a long time, an unexpected new scenario has appeared. Increased tourist exchange, soldiers deployed in countries where these diseases are endemic, migratory fluxes, and eventually climate changes, along with other pandemics, are challenging the apparent safety of rich populations (26, 30). Since NTDs are prevalent in low-income countries, large pharmaceutical companies have neglected research and development of new drugs. Therefore, old compounds that are losing efficacy are still in use. These compounds have undesirable toxic effects, and their dosage schedules are complex and repetitive, which compromises patient compliance (7).

Visceral leishmaniasis is an NTD increasingly affecting European countries because of the massive flows of immigrants from North Africa (18). Its etiologic agent, *Leishmania infantum*, infects domestic dogs (canine leishmaniasis), which act as reservoir, and it is transmitted to humans through sandfly bites (20). For decades, the first-line treatment of this disease consisted of the old-fashioned and toxic drugs derived from pentavalent antimony (Sb^V) (1). Recently, safer and more effective drugs, such as amphotericin B, miltefosine, and paromomycin, are replacing Sb^V, despite the fact that they are not devoid of undesirable side effects and cannot be administered during pregnancy (8, 9). For these reasons, the search for new compounds against this disease is very much needed. Since the beginning of this century, DNA topoisomerase IB (TopIB) has been identified as a potential target in

therapy against *Leishmania* and other trypanosomatids (3, 5, 6). The choice of this target is based on two main reasons: (i) the enzyme has an increased expression during the rapidly dividing cycle of the pathogen, similar to the case with tumor cells, and especially (ii) the pathogen's enzyme is structurally different from that of the host (35).

Our research group found that *Leishmania donovani* TopIB (LdTopIB) was atypically composed of two different subunits, encoded by different genes, that have to be assembled in the pathogen to reconstitute the active enzyme. One of the subunits contains the four amino acids of the active site, which is fully conserved from a phylogenetic point of view (35). The other subunit contains the catalytic amino acid (Tyr222), which acts by breaking one DNA strand by a specific nucleotide sequence (13). All of these features have also been found in the other protozoan-borne NTDs pathogens: *Trypanosoma brucei*, the agent responsible for sleeping sickness in Africa (11), and *T. cruzi*, responsible for Chagas' disease in South America (36). However, despite the fact that these enzymes conserve their catalytic domains unchanged,

Received 6 March 2012 Returned for modification 12 May 2012

Accepted 25 July 2012

Published ahead of print 30 July 2012

Address correspondence to Rafael Balaña-Fouce, rbalf@unileon.es.

Supplemental material for this article may be found at <http://aac.asm.org/>.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.00499-12



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcl

2-Alkynoic fatty acids inhibit topoisomerase IB from *Leishmania donovani*

Néstor M. Carballeira^{a,*}, Michelle Cartagena^a, David Sanabria^b, Deniz Tasdemir^c, Christopher F. Prada^d, Rosa M. Reguera^d, Rafael Balaña-Fouce^d

^a Department of Chemistry, University of Puerto Rico, PO Box 23346, San Juan 00931-3346, Puerto Rico

^b Department of Natural Sciences, Interamerican University, Metropolitan Campus, San Juan 00919, Puerto Rico

^c School of Chemistry, National University of Ireland Galway, Galway, Ireland

^d Department of Biomedical Sciences, University of León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 June 2012

Revised 20 July 2012

Accepted 1 August 2012

Available online xxxx

Keywords:

Acetylenic fatty acids

Leishmania donovani

2-Octadecynoic acid

Topoisomerase IB

ABSTRACT

2-Alkynoic fatty acids display antimycobacterial, antifungal, and pesticidal activities but their antiprotozoal activity has received little attention. In this work we synthesized the 2-octadecynoic acid (2-ODA), 2-hexadecynoic acid (2-HDA), and 2-tetradecynoic acid (2-TDA) and show that 2-ODA is the best inhibitor of the *Leishmania donovani* DNA topoisomerase IB enzyme (*LdTopIB*) with an $EC_{50} = 5.3 \pm 0.7 \mu\text{M}$. The potency of *LdTopIB* inhibition follows the trend 2-ODA > 2-HDA > 2-TDA, indicating that the effectiveness of inhibition depends on the fatty acid carbon chain length. All of the studied 2-alkynoic fatty acids were less potent inhibitors of the human topoisomerase IB enzyme (*hTopIB*) as compared to *LdTopIB*. 2-ODA also displayed *in vitro* activity against *Leishmania donovani* ($IC_{50} = 11.0 \mu\text{M}$), but it was less effective against other protozoa, *Trypanosoma cruzi* ($IC_{50} = 48.1 \mu\text{M}$) and *Trypanosoma brucei rhodesiense* ($IC_{50} = 64.5 \mu\text{M}$). The antiprotozoal activity of the 2-alkynoic fatty acids, in general, followed the trend 2-ODA > 2-HDA > 2-TDA. The experimental information gathered so far indicates that 2-ODA is a promising antileishmanial compound.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Acetylenic fatty acids have entertained both medicinal chemists and natural products chemists for the diversity of biological activities that they have displayed.^{1,2} Among these fatty acids the octadecynoic acids are worth mentioning. Earlier studies identified the 5-octadecynoic acid (5-ODA) as a natural product from the root of the plant *Ximena americana* with pesticidal activity as demonstrated by the inhibition of the hatching of the pod-sucking bug *Clavigralla tomentosicollis* eggs.³ On the other hand, the roots of *Pentagonia gigantifolia* yielded the acid 6-octadecynoic acid (6-ODA), which displayed potent antifungal activity against a series of fluconazole resistant *Candida albicans* strains with IC_{50} values between 0.45–0.65 $\mu\text{g/mL}$.⁴ Among a series of 2-alkynoic fatty acids the 2-octadecynoic acid (2-ODA) and its metabolites displayed the best antimycobacterial activity against *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium bovis* BCG by inhibiting fatty acid biosynthetic pathways of considerable importance for mycobacteria.⁵ Interesting to mention is that by placing the unsaturation at the other extreme of the acyl chain, the acid 17-octadecynoic acid (17-ODA) is obtained, which is a well-known suicide inhibitor of the leukotriene B₄ ω -oxidase ($IC_{50} < 5 \mu\text{M}$) as well as a selective inhibitor of the renal CYP450 ω -hydroxylase.⁶ All of these findings attest to the biological potential of the octadecynoic acids as anti-infective agents and enzyme inhibitors, but no data on the inhibi-

tion of key enzymes in *Leishmania* parasites by these acids has been reported.

Several other 2-alkynoic fatty acids show antiprotozoal activity and inhibit protozoal enzymes. For example, our team studied the antiprotozoal activity of 2-hexadecynoic acid (2-HDA) and found that it effectively inhibited plasmodial FAS-II enzymes (IC_{50} 's between 1.5 and 13.9 μM) and arrests erythrocytic and liver stage *Plasmodium* infections.⁷ In addition, we showed that 2-HDA displays antiprotozoal activity against *Leishmania donovani* amastigotes ($IC_{50} = 17.8 \mu\text{M}$) but no studies on key *L. donovani* enzymes amenable for therapeutic intervention were performed. These initial results motivated us to study 2-TDA, 2-HDA and 2-ODA as antiprotozoal compounds so as to determine the antiprotozoal activity of the acids as a function of carbon chain length. Therefore, in this work we synthesized 2-TDA, 2-HDA, and 2-ODA and determined their growth inhibitory activities against *L. donovani*, *T. cruzi*, and *Trypanosoma brucei rhodesiense* *in vitro*. The best antiprotozoal results were obtained against *L. donovani* and therefore, we studied the inhibition of the *LdTopIB* enzyme by 2-TDA, 2-HDA, and 2-ODA and compared it to *hTopIB*.

DNA topoisomerases have been the target of many studies since early successes with the camptothecins and similar structural analogs.⁸ In particular, type I DNA topoisomerases are a well-recognized target for cancer therapy. The trypanosomal and leishmania type IB DNA topoisomerases differ significantly from the homologous mammalian structures since they are phylogenetically

* Corresponding author.

E-mail address: nestor.carballeira1@upr.edu (N.M. Carballeira).



A pentapeptide signature motif plays a pivotal role in *Leishmania* DNA topoisomerase IB activity and camptothecin sensitivity

Christopher F. Prada^a, Raquel Álvarez-Velilla^a, Rosario Diaz-González^b, Carlos Prieto^c, Yolanda Pérez-Pertejo^a, Rafael Balaña-Fouce^{a,*}, Rosa M. Reguera^a

^a Departamento de Ciencias Biomédicas, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León, Spain

^b Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra", Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avenida del Conocimiento, s/n 18100 Granada, Spain

^c Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC), Parque Científico de León, Avenida Real 1, 24006 León, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 July 2012

Received in revised form 3 September 2012

Accepted 7 September 2012

Available online 18 September 2012

Keywords:

Leishmania donovani
DNA topoisomerase IB
Camptothecin sensitivity
Relaxation activity
Linker domain
Protein interactions

ABSTRACT

Background: *Leishmania donovani* – the causative agent of visceral leishmaniasis – has several evolutionary characteristics that make the disease difficult to combat. Among these differences, a rare heterodimeric DNA topoisomerase IB has been reported thus opening a new promising field in the therapy of leishmaniasis. Several studies of the human enzyme have pointed to the importance of the linker domain in respect to camptothecin sensitivity. At present, it has been impossible to pinpoint the regions that make up the linker domain in *Leishmania*.

Methods: Several site-directed mutations as well as internal and linear truncations involving both subunits were assayed on both, relaxation activity and sensitivity to camptothecin.

Results: Truncations performed on the trypanosomatids conserved motif (RPPVVRS) of the small subunit of leishmanial DNA topoisomerase IB demonstrated that elimination of pentapeptide RPPVV produced a nonfunctional enzyme. However, the removal of the dipeptide RS led to an enzyme with reduced relaxation activity and less sensitivity to camptothecin. The basic structure, both sensitive to camptothecin and able to fully relax DNA, composed of amino acids 1–592 and 175–262 in the large and small subunits, respectively.

Conclusion: It has been established that the region between amino acids 175 and 180 (RPPVV) of the small subunit plays a pivotal role in both interaction with the large subunit and sensitivity to camptothecin in *Leishmania*.

General significance: The present report describes a functional analysis of the leishmanial DNA topoisomerase IB regions directly involved both in sensitivity to poisons and in the conformation of the linker domain.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Current pharmacology treatments against visceral leishmaniasis – a fatal zoonotic disease caused by the haemoflagellate protozoa *Leishmania donovani* and transmitted by the bite of female sandflies – have significant disadvantages that include the rapid emergence of resistant strains and severe toxicity. Most of the first-line drugs – pentavalent antimonials (Sb^V), macrolide antibiotics, aromatic diamidines and alkylphospholipids [1,2] – are expensive, have undesirable side effects, or require parenteral administration and long-term treatments that prevents the patient adherence to treatment, especially those from poor or developing countries [3].

One promising line of drug discovery is by targeting of DNA topoisomerases (Top), a family of enzymes that regulates DNA superhelicity in all living organisms [4]. Eukaryotic type I Top

family (TopIB) includes ATP-independent monomeric enzymes that introduce transient single-stranded breaks in DNA followed by rotation, religation and release. After cleavage, the DNA downstream of the nick rotates (propelled by the superhelical tension) around the unbroken strand removing DNA supercoils. This process is known as “controlled rotation” since enzyme flexibility coupled with TopI-DNA interactions allows the rotation step by local conformational changes [4,5]. Type II Top family involves ATP-hydrolyzing proteins that generate temporary double-stranded breaks in the double helix, followed by passage and rejoining [4,6]. TopIB alleviates topological tensions of DNA during replication and transcription processes where DNA and RNA polymerases can intervene [7]. Unlike other eukaryotic TopIB, the enzyme of the Trypanosomatidae family is a heterodimer, with coding genes found on different chromosomes [8,9]. Amino acid sequence alignment of leishmanial (LdTopIB) and mammalian TopIBs was used to identify both the N-terminal end and the putative core domain within the large subunit (LdTopIL) of the dimer. Whereas, the putative C-terminal domain containing the phylogenetically conserved “SKxyY” motif in which Tyr-222 is responsible for the nucleophilic attack in DNA cleavage formation, within the small subunit (LdTopIS) [10]. However, two long peptide extensions placed at C- and N-termini of the large and small subunits,

Abbreviations: Top, DNA topoisomerases; LdTopIB, *Leishmania* TopIB; hTopIB, human TopIB; LdTopIL, gene encoding the large subunit of LdTopIB; LdTopIS, gene encoding the small subunit of LdTopIB; CPT, camptothecin; CL, cleavage band

* Corresponding author. Tel.: +34 987 291590; fax: +34 987 291252.

E-mail address: rbalf@unileon.es (R. Balaña-Fouce).

First total synthesis of the (±)-2-methoxy-6-heptadecynoic acid and related 2-methoxylated analogs as effective inhibitors of the *Leishmania* topoisomerase IB enzyme*

Néstor M. Carballeira^{1,‡}, Michelle Cartagena¹, Fengyu Li¹,
Zhongfang Chen¹, Christopher F. Prada², Estefania Calvo-Alvarez²,
Rosa M. Reguera², and Rafael Balaña-Fouce²

¹Department of Chemistry, University of Puerto Rico, Rio Piedras campus,
P.O. Box 23346, San Juan, Puerto Rico; ²Department of Biomedical Sciences,
University of León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León, Spain

Abstract: The fatty acids (±)-2-methoxy-6Z-heptadecenoic acid, (±)-2-methoxy-6-heptadecynoic acid, and (±)-2-methoxyheptadecanoic acid were synthesized and their inhibitory activity against the *Leishmania* DNA topoisomerase IB enzyme (*LdTopIB*) determined. Both 2-OMe-17:1 fatty acids were synthesized from 4-bromo-1-pentanol, the olefinic fatty acid in 10 steps and in 7 % overall yield, while the acetylenic fatty acid in 7 steps and in 14 % overall yield. The 2-OMe-17:0 acid was prepared in 6 steps and in 42 % yield from 1-hexadecanol. The 2-OMe-17:1 acids inhibited *LdTopIB*, with the acetylenic acid displaying an $EC_{50} = 16.6 \pm 1.1 \mu\text{M}$, but the 2-OMe-17:0 acid did not inhibit *LdTopIB*. The (±)-2-methoxy-6Z-heptadecenoic acid preferentially inhibited *LdTopIB* over the human TopIB enzyme. Unsaturation seems to be a prerequisite for effective inhibition, rationalized in terms of weak intermolecular interactions between the active site of *LdTopIB* and either the double or triple bonds of the fatty acids. Toxicity toward *Leishmania donovani* promastigotes was also investigated, resulting in the order acetylenic > olefinic > saturated with the (±)-2-methoxy-6-heptadecynoic acid displaying an $EC_{50} = 74.0 \pm 17.1 \mu\text{M}$. Our results indicate that α -methoxylation decreases the toxicity of C_{17:1} fatty acids toward *L. donovani* promastigotes, but improves their selectivity index.

Keywords: alkynes; *Leishmania donovani*; lipids; methoxylated fatty acids; synthesis; topoisomerase IB.

INTRODUCTION

Visceral leishmaniasis continues to be a serious tropical disease with around 500 000 cases reported each year, mainly in third-world countries such as India, Bangladesh, Indonesia, and Sudan [1]. The causative agent is *Leishmania donovani*, injected by a sand fly into a human in the form of promastigotes, which eventually invade the spleen and liver as amastigotes, resulting in anaemia and fever and ultimately in death if left untreated [2]. Several therapeutic venues are presently available, including

*Pure Appl. Chem. **84**, 1837–1937 (2012). A collection of invited papers based on presentations on the Chemistry of Life theme at the 43rd IUPAC Congress, San Juan, Puerto Rico, 30 July–7 August 2011.

‡Corresponding author

Appraisal of a *Leishmania major* Strain Stably Expressing mCherry Fluorescent Protein for Both *In Vitro* and *In Vivo* Studies of Potential Drugs and Vaccine against Cutaneous Leishmaniasis

Estefania Calvo-Álvarez^{1,9}, Nestor Adrian Guerrero^{2,9}, Raquel Álvarez-Velilla¹, Christopher Fernández Prada¹, Jose María Requena², Carmen Punzón³, Miguel Ángel Llamas³, Francisco J. Arévalo³, Luis Rivas⁴, Manuel Fresno^{2,3}, Yolanda Pérez-Pertejo¹, Rafael Balaña-Fouce^{1*}, Rosa M. Reguera¹

1 Departamento de Ciencias Biomédicas, Universidad de León, León, Spain, **2** Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain, **3** Diomune, Parque Científico de Madrid, Madrid, Spain, **4** Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, Spain

Abstract

Background: *Leishmania major* cutaneous leishmaniasis is an infectious zoonotic disease. It is produced by a digenetic parasite, which resides in the phagolysosomal compartment of different mammalian macrophage populations. There is an urgent need to develop new therapies (drugs) against this neglected disease that hits developing countries. The main goal of this work is to establish an easier and cheaper tool of choice for real-time monitoring of the establishment and progression of this pathology either in BALB/c mice or *in vitro* assays. To validate this new technique we vaccinated mice with an attenuated Δ hsp70-II strain of *Leishmania* to assess protection against this disease.

Methodology: We engineered a transgenic *L. major* strain expressing the mCherry red-fluorescent protein for real-time monitoring of the parasitic load. This is achieved via measurement of fluorescence emission, allowing a weekly record of the footpads over eight weeks after the inoculation of BALB/c mice.

Results: *In vitro* results show a linear correlation between the number of parasites and fluorescence emission over a range of four logs. The minimum number of parasites (amastigote isolated from lesion) detected by their fluorescent phenotype was 10,000. The effect of antileishmanial drugs against mCherry+*L. major* infecting peritoneal macrophages were evaluated by direct assay of fluorescence emission, with IC₅₀ values of 0.12, 0.56 and 9.20 μ M for amphotericin B, miltefosine and paromomycin, respectively. An experimental vaccination trial based on the protection conferred by an attenuated Δ hsp70-II mutant of *Leishmania* was used to validate the suitability of this technique *in vivo*.

Conclusions: A *Leishmania major* strain expressing mCherry red-fluorescent protein enables the monitoring of parasitic load via measurement of fluorescence emission. This approach allows a simpler, faster, non-invasive and cost-effective technique to assess the clinical progression of the infection after drug or vaccine therapy.

Citation: Calvo-Álvarez E, Guerrero NA, Álvarez-Velilla R, Prada CF, Requena JM, et al. (2012) Appraisal of a *Leishmania major* Strain Stably Expressing mCherry Fluorescent Protein for Both *In Vitro* and *In Vivo* Studies of Potential Drugs and Vaccine against Cutaneous Leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis 6(11): e1927. doi:10.1371/journal.pntd.0001927

Editor: Genevieve Milon, Institut Pasteur, France

Received: April 30, 2012; **Accepted:** October 16, 2012; **Published:** November 29, 2012

Copyright: © 2012 Calvo-Álvarez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This research was supported by Ministerio de Ciencia y Tecnología (grants AGL2010 16078/GAN), Instituto de Salud Carlos III (grant PI09/0448 and the Network of Tropical Diseases RICET RD06/0021/1004), RAV, CFP and ECA are pre-doctoral fellows granted by RICET (ISCIII), Junta de Castilla y León (ESF; European Social Founding) and University of León, respectively to RMR. Instituto de Salud Carlos III (Network of Tropical Diseases RICET RD06/0021/0016), Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2010-17833), ChagasEpiNet 223034 European Union Seventh Framework Programme and Fundación Ramón Areces to MF. Funding by ISCIII-RETIC RD06/0021/0008-FEDER to JMR and ISCIII-RETIC RD06/0021/0006-FEDER to LR is also acknowledged. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: rbalf@unileon.es

⁹ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Leishmania major is the main cause of cutaneous leishmaniasis (CL) in the Old World. Parasites are transmitted by *Phlebotominae* sandflies whilst blood feeding on infected mammalian hosts. CL is widely spread in the developing world, affecting people in 88 countries with 1.5 million new cases reported each year. CL

usually produces ulcers on the exposed parts of the body that often leave disfiguring scars, which in turn, can cause serious social prejudice [1].

Conventional *in vivo* animal models for the study of parasite-host relationships involve large number of animals. These animals are required to be slaughtered at different time points in order to identify both anatomical distribution and parasite numbers in

Accepted Manuscript

Title: Gimatecan and other camptothecin derivatives poison leishmania dna-topoisomerase α leading to a strong leishmanicidal effect

Authors: Christopher F. Prada, Raquel Álvarez-Velilla, Rafael Balaña-Fouce, Carlos Prieto, Estefania Calvo-Álvarez, Jose Miguel Escudero-Martínez, José María Requena, César Ordóñez, Alessandro Desideri, Yolanda Pérez-Pertejo, Rosa M. Reguera

PII: S0006-2952(13)00147-0
DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.bcp.2013.02.024>
Reference: BCP 11565

To appear in: *BCP*

Received date: 14-12-2012
Revised date: 22-2-2013
Accepted date: 22-2-2013

Please cite this article as: Prada CF, Álvarez-Velilla R, Balaña-Fouce R, Prieto C, Calvo-Álvarez E, Escudero-Martínez JM, Requena JM, Ordóñez C, Desideri A, Pérez-Pertejo Y, Reguera RM, GIMATECAN AND OTHER CAMPTOTHECIN DERIVATIVES POISON LEISHMANIA DNA-TOPOISOMERASE α LEADING TO A STRONG LEISHMANICIDAL EFFECT, *Biochemical Pharmacology* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2013.02.024>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.



1 **GIMATECAN AND OTHER CAMPTOTHECIN DERIVATIVES**
2 **POISON LEISHMANIA DNA-TOPOISOMERASE IB LEADING TO**
3 **A STRONG LEISHMANICIDAL EFFECT**

4
5 Christopher F. Prada¹, Raquel Álvarez-Velilla¹, Rafael Balaña-Fouce¹, Carlos Prieto²,
6 Estefania Calvo-Álvarez¹, Jose Miguel Escudero-Martínez¹, José María Requena³, César
7 Ordóñez¹, Alessandro Desideri⁴, Yolanda Pérez-Pertejo¹, Rosa M. Reguera¹

8
9 ¹Departamento de Ciencias Biomédicas, Universidad de León, Campus de Vegazana
10 s/n; 24071 León (SPAIN), Phone 34 987 291257; Telefax 34 987 291252

11 ²Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC), Parque Científico de León, Avenida
12 Real 1, 24006 León, Spain

13 ³Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Centro de Biología Molecular
14 “Severo Ochoa” c/ Nicolás Cabrera, 1, 28049 Madrid (SPAIN)

15 ⁴Dept. of Biology, University of Rome "Tor Vergata" Via della Ricerca Scientifica 1,
16 00133, Roma Italia.

17
18
19
20 **Correspondence to:** Dr. Rafael Balaña-Fouce. Departamento de Ciencias Biomédicas,
21 Universidad de León, Campus de Vegazana s/n; 24071 León (SPAIN), Phone 34 987
22 291257; telefax 34 987 291252; e-mail: rbalf@unileon.es

23
24
25 **Abbreviations:** DNA topoisomerases: Top; DNA topoisomerase IB: TopIB; *L.*
26 *donovani* TopIB: LdTopIB; *L. infantum* TopIB: LiTopIB; Infrared Fluorescent Protein
27 1.4: IFP1.4; SI_{48h}: Selectivity Index at 48h; MultiDrug Resistant protein 1: MDR-1

28
29 **ABSTRACT**