



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Universidad de Granada



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

IMPORTANCIA DE LA BIOSÍNTESIS DEL ERGOSTEROL EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y EN EL MECANISMO DE ACCIÓN DE FÁRMACOS EN TRIPANOSOMÁTIDOS

MARCO SEALEY CARDONA

Tesis Doctoral

Junio 2007

IMPORTANCIA DE LA BIOSÍNTESIS DEL ERGOSTEROL EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y EN EL MECANISMO DE ACCIÓN DE FÁRMACOS EN TRIPANOSOMÁTIDOS

Memoria presentada por el Licenciado
Marco Sealey Cardona para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas.

Granada, Junio de 2007.

Marco Sealey Cardona

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

Dolores González Pacanowska

Investigadora Científica

Luis Miguel Ruiz Pérez

Científico Titular

INDICE

I	Resumen	1
II	Introducción	3
II.A.	Los Tripanosomátidos	3
	A.1 <i>Trypanosoma brucei</i>	4
	A.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
II.B	Tratamiento para las enfermedades causadas por los Tripanosomátidos	7
	B.1 Tripanosomiasis Africana.....	8
	B.2 Tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas).....	8
II.C.	Aspectos específicos de la biología molecular de protozoos de la familia de los Tripanosomatidae	12
	C.1 Biosíntesis de Isoprenoides.....	14
	C.2 Metabolismo de esteroides de la familia de los Tripanosomatidae.....	16
	C.2.1 Características generales de la Escualeno Sintasa.....	21
	C.2.2 Escualeno Epoxidasa.....	30
	C.2.3 $\Delta^{24,25}$ esterol metiltransferasa.....	32
III.	Objetivos	37
IV.	Anexo Resultados	
	IV.I. Caracterización cinética de la escualeno sintasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>, estudios de inhibición selectiva por derivados de quinuclidinas	39
	IV.II Nuevos Azasteroles frente a <i>Trypanosoma brucei</i>: el papel de la 24-esterol metiltransferasa en el mecanismo de acción de inhibidores	40
	IV.III Papel de las etapas tardías de la síntesis de ergosterol en la proliferación celular y morfología en el <i>Trypanosoma africano</i>	41
	IV.IV Ubicación subcelular de la escualeno sintasa en <i>Trypanosoma</i>	72
V.	Discusión	84
	V.I Conclusiones	104
	V.II Bibliografía	106

ABREVIATURAS

DMSO. Dimetil sulfóxido.

DNA. Ácido desoxirribonucleico.

FPP. Farnesil pirofosfato

FPPS. Farnesil difosfato sintasa.

GGPP. Geranil-geranil pirofosfato

GPP. Geranil pirofosfato.

HMG-CoA. 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA.

HAT. Tripanosomiasis africana humana.

IC50. Dosis inhibitoria de crecimiento 50.

IPP. Isopentenil pirofosfato.

kb. Kilobase.

kDa. Kilodalton.

K_m . Constante de Michaelis.

LPDS. Suero bovino fetal deslipidado.

mg. Miligramo.

min. Minuto.

ml. Mililitro.

mM. Milimolar.

μ M. Micromolar.

mRNA. Ácido ribonucleico mensajero.

μ l. Microlitro.

μ M. Micromolar.

ng. Nanogramo.

nM. Nanomolar.

PBS. Tampón fosfato salino.

PCR. Reacción en cadena de la DNA polimerasa.

pb. Pares de bases.

pI. Punto Isoeléctrico.

PPi. Pirofosfato.

RNA. Ácido ribonucleico.

SBF. Suero bovino fetal.

SDS. Dodecil sulfato sódico.

SDS-PAGE. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida.

Sec. Segundo

SMT. $\Delta^{24-(25)}$ -esterol metiltransferasa.

SQS. Escualeno sintasa.

SQE. Escualeno epoxidasa.

RESUMEN

I. RESUMEN

La ruta de biosíntesis de esteroides en tripanosomátidos constituye un atractivo conjunto de dianas de acción farmacológica y compuestos inhibidores de la misma han demostrado su eficacia en la interrupción del crecimiento de distintos protozoos patógenos, en este sentido el principal objetivo de este trabajo fue la obtención de un sistema de expresión heterólogo de proteína soluble y activa para la SQS de *Trypanosoma cruzi*. Los resultados demuestran claramente que la eliminación de aminoácidos de las regiones amino y carboxilo terminal generan proteína soluble y activa. Determinamos las constantes cinéticas de la enzima para sus sustratos FPP y NADPH, y obtuvimos una K_m de $5.25 \mu\text{M}$ y $24.47 \mu\text{M}$ respectivamente y una V_{max} de $1428.56 \text{ nmol}\cdot\text{min}\cdot\text{mg}^{-1}$. Analizamos la inhibición de la SQS frente a derivados de quinuclidinas que mostraron ser activos *in vitro* frente al parásito y por último se estableció una selectividad para la SQS de *T. cruzi* mediante ensayos comparativos con la SQS humana. De esta manera se ha identificado varias quinuclidinas selectivas y muy potentes con valores de K_i del orden nM frente a la SQS de *T. cruzi*.

Por otro lado se ha estudiado el papel de la enzima 24-esterol metiltransferasa de *Trypanosoma brucei* y el mecanismo de acción de los azasteroles. Para ello hemos sintetizado un grupo de azasteroles que resultaron poseer una potente actividad del orden de nM *in vitro* frente a cultivos de las formas sanguíneas de *T. b. rhodesiense*. Sin embargo, observamos que estos azasteroles no eran activos frente a la enzima recombinante 24-esterol metiltransferasa de *Trypanosoma brucei*. Estudios de la composición lipídica de las formas sanguíneas y procíclicas de *Trypanosoma brucei* revelaron que las membranas de formas sanguíneas del parásito poseen mayoritariamente esteroides de tipo colestano mientras que la de los procíclicos poseen esteroides de tipo ergosta. Estudios de northern y western blot evidenciaron la presencia de la enzima en ambas formas del parásito, sin embargo, la expresión en los sanguíneos es tres veces menor. Concluimos que la citotoxicidad de los azasteroles sintetizados se debe a que actúan en lugares distintos a la 24-esterol metiltransferasa de *Trypanosoma brucei*. Para profundizar sobre los requerimientos de ergosterol en *Trypanosoma brucei*, estudiamos el papel de las enzimas pertenecientes a las etapas tardías de la síntesis del ergosterol en la proliferación celular y morfología. Para ello realizamos experimentos

de RNA de interferencia para la SQS y la SQE de *Trypanosoma brucei*. Los resultados muestran que la depleción de la SQS no mostró ningún efecto en el crecimiento o en la morfología tanto en las formas sanguíneas como en las procíclicas de *T. brucei*. Sorprendentemente, la depleción de SQE en las formas sanguíneas produjo una clara disminución del crecimiento, unido a una alteración de la morfología de los trypanosomas. La pérdida de viabilidad, y los defectos observados en la morfología de las formas sanguíneas producto de la depleción de la SQE, evidencian un fallo en la citocinesis que se refleja en la elevada aparición de formas de tamaño aberrante y parásitos multinucleados. Este fenotipo también se observó cuando se utilizó la terbinafina un inhibidor específico de la SQE. De esta manera se demuestra que el bloqueo de la síntesis de ergosterol a nivel de la SQE en la forma sanguínea de *Trypanosoma brucei*, genera severos defectos morfológicos y pérdida de viabilidad de los parásitos, indicando la existencia de metabolitos post-escualeno los cuales deben tener una función distinta a los requisitos de “bulk sterols” y que actúan de forma hormonal que es esencial para la viabilidad celular. Esta observación sugiere que inhibidores diseñados para la biosíntesis del ergosterol poseen un uso potencial para combatir la Tripanosomiasis africana.

Por último describimos la localización subcelular de la SQS en *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*. Haciendo uso de un anticuerpo policlonal de conejo para la SQS de *T. cruzi*, hemos estudiado la distribución de estas enzimas utilizando técnicas de inmunofluorescencia. Tanto en *T. cruzi* como en *T. brucei*, la SQS presenta un patrón reticular, confirmado al realizar estudios de colocalización con el marcador de retículo endoplasmático proteína BiP. Nuestras evidencias claramente demuestran que las diferentes enzimas de la ruta de biosíntesis del ergosterol en Trypanosomas se encuentran en distintos compartimientos, situación que plantea en un futuro el estudio del tráfico de intermediarios como una estrategia para la intervención clínica.

Los resultados obtenidos en esta tesis constituyen un significativo avance en la comprensión del metabolismo de esteroides de los Trypanosomas y desde el punto de vista farmacológico establecemos una plataforma para el desarrollo de nuevos fármacos para combatir estas enfermedades.

INTRODUCCION

II. INTRODUCCIÓN

II.A. Los Tripanosomátidos

Los protozoos patógenos *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania sp.* pertenecientes a la familia Trypanosomatidae y orden Kinetoplastida, son los agentes responsables de diversas enfermedades y millones de muertes anualmente en países en desarrollo situados en las zonas tropicales y sub-tropicales, lo que constituye uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. Actualmente no hay vacunas disponibles para estas afecciones y se dispone de solo unos pocos fármacos para combatirlos, los cuales son poco efectivos y altamente tóxicos, habiéndose descrito un elevado número de casos de cepas resistentes (Barrett, Burchmore et al. 2003; Akins 2005).

A pesar de que estos tres patógenos, que se agrupan bajo la denominación de “TriTryps”, presentan estructuras subcelulares particulares comunes como el kinetoplasto y los glicosomas, cada especie es transmitida por un insecto distinto (vectores), presenta sus propias características de ciclo de vida, posee tropismos por distintas células, tejidos y causa diferentes enfermedades en el hospedador mamífero (Fig. II.1). Por otro lado, cada patógeno utiliza distintas estrategias para evadir el sistema inmune del hospedador. En este sentido cabe resaltar que *T. brucei* es el único tripanosomátido extracelular y que habita en el torrente sanguíneo gracias a un cambio periódico de sus proteínas de superficie (VSG), que le permite evadir la respuesta antigénica del hospedador. *T. cruzi* y *Leishmania* se diferencian de *T. brucei* en que son intracelulares e invaden células y tejidos expresando una compleja variedad de antígenos de superficie en el interior de la célula. Además, son capaces de inhibir los mecanismos de defensa del hospedador; por ejemplo, la especie *L. major* altera la función de los macrófagos que infecta para poder sobrevivir a la respuesta intracelular (El-Sayed, Myler et al. 2005).

A.1. *Trypanosoma brucei*

La tripanosomiasis humana africana (*Human african trypanosomiasis*: HAT) o enfermedad del sueño, son dos enfermedades causadas por las sub-especies *Trypanosoma brucei rhodesiense* y *T. b. gambiense*. La sub-especie *T. b. gambiense* es la que presenta una distribución mas amplia en África, y constituye un grave problema de salud publica dada su amplia presencia tanto en África central como occidental. La sub-especie *T. b. rhodesiense* se localiza en el este y sur de África, causando también serios problemas de salud. Las dos enfermedades se diferencian por poseer características y manifestaciones clínicas específicas dependiendo de la subespecie que infecte al humano (Fevre, Picozzi et al. 2006). Según la organización mundial de la salud (World Health Organization: WHO) existen entre 300.000 y 500.000 casos por año de tripanosomiasis Africana (HAT). Durante los últimos 10 años un promedio de 30.000 nuevos casos (incidencia) se contabilizan anualmente (WHO, 2003).

T. brucei posee un ciclo de vida digenético ya que presenta dos estadios proliferativos; uno en el insecto vector y otro en el hospedador vertebrado mamífero. Su ciclo de vida es pleomorfo, presenta distintas formas de desarrollo las cuales implican cambios en la estructura celular, reposicionamiento del DNA mitocondrial que forma el kinetoplasto y modificaciones del metabolismo energético. Una vez que los parásitos son ingeridos por el insecto vector *Glossinia sp.* (mosca Tsetse), la forma tripomastigote se multiplica por fisión binaria en el intestino de la mosca, migra a la porción anterior del tubo digestivo transformándose en la forma epimastigote e invade las glándulas salivales donde sufren otro cambio morfológico transformándose en tripomastigotes metacíclicos. Tras ser inoculada en el hospedador vertebrado por la picadura de la mosca, la forma tripomastigote sanguínea de forma alargada “long slender” altamente proliferativa se reproduce en la sangre y nódulos linfáticos y a medida que incrementa la parasitemia, sufre una transformación a una forma no proliferativa llamada rechoncha o “stumpy”, estadio que pasa al vector tras ingerir la sangre del mamífero infectado completándose el ciclo.

T. brucei es un protozoo flagelado extracelular para el cual no existen tratamientos efectivos, los fármacos disponibles son altamente tóxicos y no se dispone de una

quimioterapia o profilaxis efectiva, ni tampoco vacunas. La infección por *T. b. gambiense* suele ser crónica (las personas pueden padecer los síntomas durante años), mientras que en el caso de *T. b. rhodesiense*, la enfermedad se manifiesta de forma aguda. Después de la primera fase hemolinfática, sin características clínicas evidentes, la forma crónica evoluciona progresivamente invadiendo el sistema nervioso central provocando síndromes de encefalopatía crónica, dolores de cabeza y alteraciones mentales junto con un estado de somnolencia terminal. Por otro lado, la forma aguda de la enfermedad se caracteriza por un síndrome infeccioso temprano y severo. Para ambas formas de la enfermedad no existen tratamientos eficaces y frecuentemente son mortales (García, Courtin et al. 2006).

A.2. *Trypanosoma cruzi*

La morbilidad y mortalidad asociada a la tripanosomiasis americana, también conocida como la enfermedad de Chagas, es causada por el parásito protozoo *Trypanosoma cruzi*. Se estima que entre 16 y 18 millones de personas se encuentran infectadas y se producen aproximadamente 21.000 muertes al año (WHO, 2003).

Este protozoo, miembro de la familia Trypanosomatidae, presenta un ciclo de vida complejo con estadios especializados para sobrevivir tanto en el hospedador vertebrado como invertebrado. En el insecto vector triatomino (casi exclusivamente especies del género *Rhodnius*), *T. cruzi* prolifera en el lumen del tracto gastrointestinal en la forma de epimastigote (no-infectivo), el cual posteriormente se transforma en tripomastigote metacíclico (infectivo) en respuesta al estrés nutricional. Los tripomastigotes metacíclicos son depositados junto con las heces cuando el vector hematófago se alimenta de la sangre de un mamífero y penetran al sistema circulatorio a través de lesiones de la piel. Esta forma no proliferativa posee la capacidad de invadir distintos tipos de células y tejidos, incluyendo células musculares, nerviosas del corazón, del tracto gastrointestinal, así como aquellas del sistema retículo-endotelial. Tras la invasión, en el interior de la célula los parásitos escapan rápidamente de la vacuola fagocítica, se transforman en amastigotes los cuales proliferan por fisión binaria y, eventualmente, se diferencian en tripomastigotes sanguíneos, que normalmente destruyen las células del hospedador y alcanzan el torrente sanguíneo. Los

tripomastigotes sanguíneos pueden invadir otros tejidos, o ser ingeridos junto con la sangre por el insecto vector, en el cual se diferenciarán nuevamente a epimastigotes, completándose el ciclo (Burleigh and Andrews 1995).

La enfermedad de Chagas presenta dos fases secuenciales. Una fase aguda, caracterizada por un grado de parasitemia máximo en el cual las formas de multiplicación del parásito se encuentran con facilidad y donde se puede observar la formación de un infiltrado inflamatorio alrededor de la zona invadida por los parásitos constituido principalmente por linfocitos y monocitos. Posteriormente, el grado de parasitemia comienza a disminuir por la continua y creciente producción de anticuerpos y la enfermedad puede entrar en una fase crónica. La característica más evidente de la fase crónica es la aparición de una miocardiopatía, así como el desarrollo de un fenómeno de hipersensibilidad (Moncayo and Ortiz Yanine 2006). En la primera etapa de la fase crónica, la miocardiopatía puede llevar a una ligera extrasistolia y taquicardia, mientras que en pacientes en fase avanzada se puede dar el bloqueo cardíaco parcial o total provocando insuficiencia cardíaca, algunas veces se observa megaesófago y megacólon (Higuchi Mde, Benvenuti et al. 2003). Al igual que para la HAT, no existen métodos preventivos ni tampoco una quimioterapia eficaz para combatir la enfermedad.

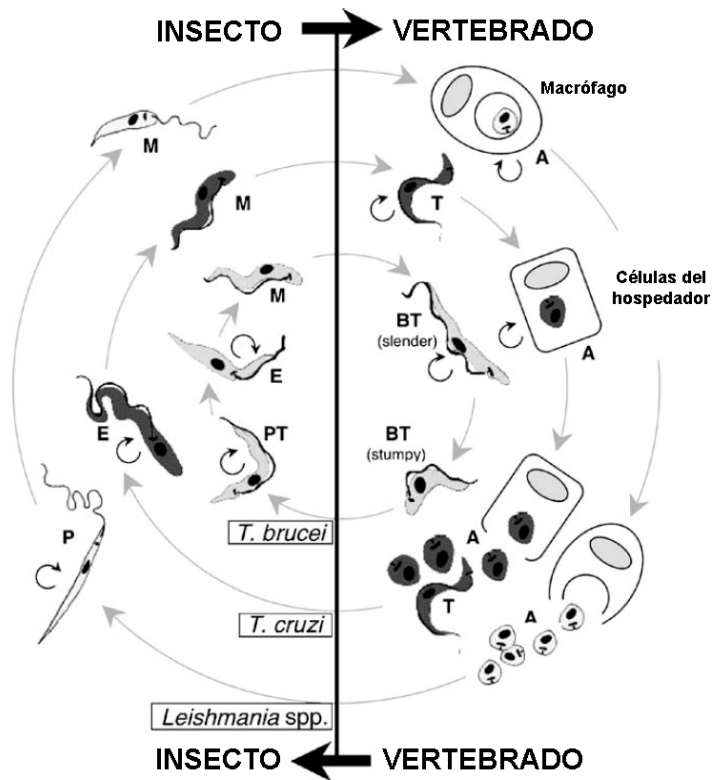


Figura II.1| Ciclo de vida de los tripanosomátidos. Los círculos concéntricos muestran las formas replicativas. Abreviaturas: A, amastigote; BT, tripomastigote sanguíneo; E, epimastigote; M, metacíclico; P, promastigote; PT, tripomastigote procíclico; T, tripomastigote (Bringaud 2005).

II.B Tratamientos para las enfermedades causadas por Tripanosomátidos

La gran mayoría de los fármacos utilizados actualmente para tratar la tripanosomiasis africana, la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis fueron desarrollados hace más de 20 años. Estos fármacos (Tabla II.1) presentan diversos problemas de toxicidad, su efectividad es variable, las dosis de administración de algunos de ellos es prolongada, e incluso hay casos en que es parenteral. Cabe destacar que la leishmaniasis es la única de las enfermedades causadas por los tripanosomátodos en la que se ha producido un ligero avance en el desarrollo y validación de nuevas moléculas (Croft, Barrett et al. 2005).

En los últimos 20 años se ha producido grandes avances en el entendimiento de la bioquímica y biología molecular de los tripanosomátidos, unidos a un amplio desarrollo de nuevas tecnologías de síntesis de compuestos. Sin embargo, esta situación aún no ha repercutido significativamente en el desarrollo de nuevos fármacos.

La validación de nuevas rutas metabólicas, la creación de nuevos modelos de enfermedad, la síntesis de nuevas moléculas y el fomento de ensayos pre-clínicos y clínicos con los fármacos actualmente disponibles (Fig. II.2), ayudaran a poner a disposición de las poblaciones de los países en desarrollo nuevos fármacos para el tratamiento de estas enfermedades y beneficiar a mas de 350 millones de personas que se encuentran en situación de riesgo.

B.1. Tripanosomiasis africana

Hasta la fecha los avances en la biología molecular y celular de los trypanosomas africanos no han repercutido en la generación de nuevos fármacos contra HAT. La eflornitina, un inhibidor de la ornitina descarboxilasa, fue aprobada para tratar fases avanzadas de la tripanosomiasis africana gambiense en el año 1990, a pesar de que los primeros ensayos para probar su eficacia se realizaron en 1984. La baja toxicidad de la eflornitina al compararla con el melarsoprol, otro fármaco utilizado para tratar la HAT, la ha situado como el tratamiento de primera elección (Chappuis, Udayraj et al. 2005). Sin embargo, las dificultades encontradas en la administración, la dosis y los periodos prolongados del tratamiento (21-35 días), unidos a que se administra por vía parenteral, convierte a la eflornitina en un fármaco de elevado coste y de difícil administración. Actualmente el único fármaco que se encuentra en ensayos clínicos contra la tripanosomiasis africana es el DB-289, un pro-fármaco cuya forma activa es efectiva en etapas tempranas de la enfermedad (Ansedde, Anbazhagan et al. 2004). Hay autores que postulan que el lento desarrollo de nuevos fármacos frente a la HAT, se debe a la falta de conexión entre la ciencia básica y la ciencia aplicada (Stich, Barrett et al. 2003).

B.2. Tripanosomiasis Americana (enfermedad de Chagas)

En el año 1985, diversos grupos de investigación consideraban a la auto-inmunidad como el principal factor relacionado con la fase crónica de la enfermedad de Chagas (Kalil and Cunha-Neto 1996). Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que este cuadro de síntomas se debe a la persistencia del parásito, unido a un desequilibrio en la respuesta inmune del paciente (Engman and Leon 2002; Kierszenbaum 2003). Este hallazgo indica que la erradicación del parásito en el paciente

es determinante para evitar la evolución crónica de la enfermedad (Tarleton 2001). Desafortunadamente, a pesar del avance en el entendimiento de la biología del *Trypanosoma cruzi*, actualmente los fármacos existentes para tratar esta enfermedad siguen siendo los mismos que comenzaron a utilizarse hace 20 años: el nifutimox y el benzonidazol, los cuales se desarrollaron empíricamente durante los años 1960 y 1970 (Croft, Barrett et al. 2005). Estos fármacos son eficaces en un 80% de los casos de la fase aguda de la enfermedad, siendo el benzonidazol el único que ha demostrado ser eficaz en etapas tempranas de la fase crónica (Sosa Estani, Segura et al. 1998). Sin embargo, su efectividad en las etapas crónicas avanzadas es bastante limitada y los efectos adversos son considerables. Actualmente se están desarrollando aproximaciones racionales para el estudio de nuevos fármacos y en este sentido inhibidores de enzimas pertenecientes a la ruta de biosíntesis del ergosterol como la C14 α -desmetilasa, escualeno sintasa y óxido escualeno ciclasa, han sido propuestos para su uso en ensayos pe-clínicos (Urbina and Docampo 2003).

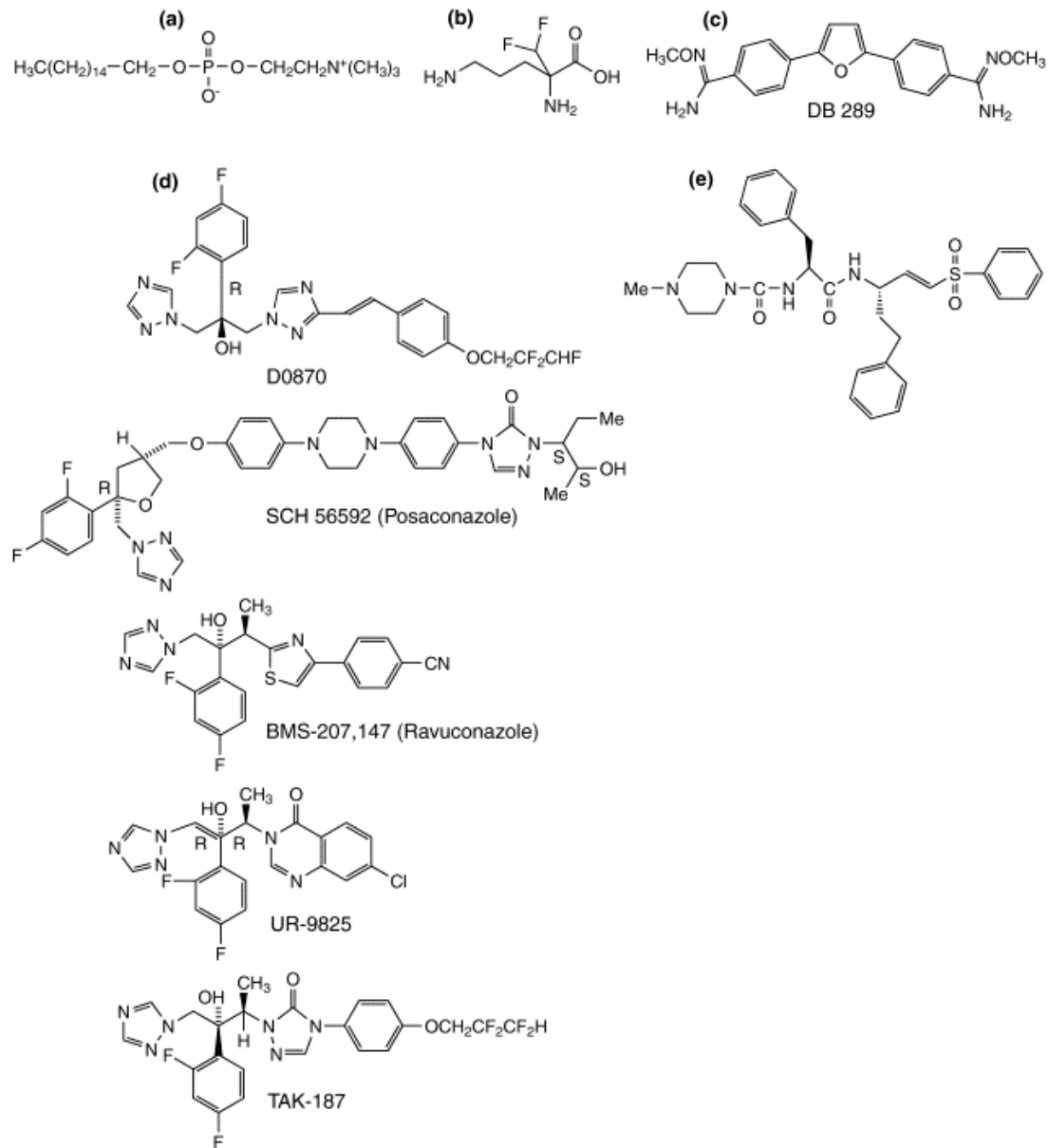


Figura II.2| Fármacos desarrollados para tratar las tripanosomiasis y leishmaniasis que se encuentran en ensayos clínicos y pre-clínicos. (a) Miltefosina, (alqui-lisofosfolípido) originalmente desarrollado como un fármaco antitumoral, la farmacéutica Zentaris Inc. junto con WHO/TDR la ha validado para tratar a la LV como LC. (b) la eflornitina (di-fluro-metil ornitina) es un inhibidor irreversible de la ornitila descarboxilasa y biosíntesis de poliaminas, también fue desarrollado como un antitumoral, actualmente se utiliza para tratar la Etapa 2 de la tripanosomiasis africana gambiense. (c) La diamidina DB-289 es un pro-fármaco 2,5-bis-(4-amidinofenil)-furano (DB-75 o furamidina) actualmente se encuentra en ensayos clínicos de Fase III para el tratamiento de la Etapa I de la tripanosomiasis africana gambiense en Africa central (ha sido desarrollada por la Universidad de Carolina del Norte, en colaboración con el Consorcio Gates). (d) Nuevos derivados de triazoles inhibidores de síntesis de ergosterol en *T. cruzi* que actúan sobre la enzima C14 α desmetilasa, poseen una potentes actividades y propiedades farmacocinéticas. (e) N-metil-piperazina-urea-F-hF-vinyl-sulfona-fenil (K-777) es un inhibidor específico e irreversible de la cruzipaína, una cisteína proteasa esencial que esta presente en todas las fases de *T. cruzi*, el K-777 tiene efecto tanto in-vivo como in-vitro (Croft, Barrett et al. 2005).

INTRODUCCION

Leishmaniasis visceral	1985	2005
Fármacos de primera línea	estibogluconato de sodio (Pentostam®); antimonio de meglumina (Glucantime®) Anfotericina-B (Flungizone)	estibogluconato de sodio (Pentostam®, generico: estibogluconato de sodio); meglumina (Glucantime®) Anfotericina-B (Flungizone) Anfotericina-B liposomal (AmBisome®)
Fármacos en fase clínica	Pentamidina Alopurinol (Fase III)	Pentamidina Miltelfosina (oral, Fase IV, registrada en la India) Paramomicina (Fase III) Otras formulaciones de Anfotericina-B
Fármacos en desarrollo pre-clínico	-	-
Leishmaniasis cutánea	1985	2005
Fármacos de primera línea	estibogluconato de sodio (Pentostam®); antimonio de meglumina (Glucantime®) Anfotericina-B (Flungizone) Pentamidina	estibogluconato de sodio (Pentostam®, generico: estibogluconato de sodio); meglumina (Glucantime®) Anfotericina-B (Flungizone) Pentamidina
Fármacos en fase clínica	Paramomicina (formulacion tópica, Fase II) Alopurinol-ribósido (Fase II)	Paramomicina (formulacion tópica, Fase III) Miltelfosina (oral, Fase III) Paramomicina (otras formulaciones tópicas, Fase II) Imiquimod (inmunomodulador tópico, Fase II)
Fármacos en desarrollo pre-clínico	-	-
Tripanosomiasis Africana	1985	2005
Fase hemolinfática		
Fármacos de primera línea	Pentamidina Suramina	Pentamidina Suramina DB 289 (Fase III)
Ensayos clínicos	-	-
Fase del sistema nervioso central		
Fármacos de primera línea	Melarsoprol	Melarsoprol Eflornitina Nifurtimox con Eflornitina (Fase III)
Ensayos clínicos	-	-
Fármacos en desarrollo Pre-clínico	-	-
Enfermedad de Chagas	1985	2005
Fármacos de primera línea	-	-
Fase aguda	Benzonidazol; Nifurtimox	Benzonidazol; Nifurtimox
Fase intermedia	-	-
Fase crónica	-	-
Ensayos clínicos	Alopirinol (fase aguda, Fase II)	Benzonidazol (cualquier fase)
Fármacos en desarrollo pre-clínico	-	Triazoles antifúngicos (posaconazol, ravuconazol, TAK-187), Inhibidores de la cruzipaina K-777

Tabla II.1| Fármacos utilizados y en ensayos clínicos en los años 1985 y 2005 (Croft, Barrett et al. 2005).

II.C Aspectos específicos de la biología molecular de protozoos de la familia de Trypanosomatidae

El genoma completo de los tres principales kinetoplástidos esta disponible (<http://www.genedb.org>) y su conocimiento permitirá explorar las bases genéticas, metabólicas y evolutivas que comparten las distintas especies y formas de vida de estos protozoos. A pesar de que la mayoría de los genes de los tripanosomátidos se encuentran conservados, existen diferencias sustanciales entre las distintas especies las cuales presumiblemente puedan atribuirse a diversos procesos de especialización a los que se han visto sometidos dado sus distintas y complejas formas de vida (El-Sayed, Myler et al. 2005).

Los tripanosomátidos son peculiares en cuanto a su compartimentalización subcelular y su metabolismo energético. Los genes involucrados en el metabolismo de los carbohidratos y ruta de las hexosas monofosfato se encuentran presentes en todas las especies. Las siete primeras enzimas de la glucolisis se encuentran compartimentalizadas en un microcuerpo especializado llamado glicosoma (Opperdoes and Borst 1977). La gran mayoría de las proteínas codificadas por los genes de esta ruta poseen señales de importación al glicosoma, sugiriendo que el glicosoma de los tripanosomátidos se ha adaptado para la degradación de una amplia variedad de azúcares como fuente de energía (Opperdoes and Szikora 2006). La forma sanguínea *long-slender* que prolifera en el torrente sanguíneo del hospedador, presenta un metabolismo energético bastante simple ya que la principal fuente de energía procede de la degradación de glucosa a piruvato mediante la glucolisis (Hannaert, Bringaud et al. 2003). Además de la glucosa, es capaz de utilizar fructosa, manosa y glicerol, los cuales en condiciones de aerobiosis son convertidos a piruvato que es excretado al medio como producto final de la glucolisis (Hellemond, Bakker et al. 2005).

El metabolismo de la forma procíclica que habita en el intestino medio del insecto se modifica dramáticamente en relación a la forma sanguínea. La degradación de aminoácidos a través del metabolismo mitocondrial se activa para generar ATP y el ciclo de Krebs es utilizado con fines catabólicos y anabólicos (Besteiro, Barrett et al. 2005; Hellemond, Bakker et al. 2005).

Recientemente se ha demostrado que el ciclo de Krebs en las formas procíclicas de *T. brucei* presenta ciertas peculiaridades. Los procíclicos utilizan parte del ciclo no solo para la degradación de sustratos mitocondriales; las enzimas citrato sintasa y piruvato deshidrogenasa son utilizadas para el transporte de moléculas de acetil-CoA desde la mitocondria al citosol para la biosíntesis de ácidos grasos y las enzimas succinato deshidrogenasa y fumarasa son utilizadas principalmente para la producción de malato como sustrato de la gluconeogenesis (van Weelden, van Hellemond et al. 2005). La existencia de genes que codifican para enzimas de la β -oxidación confirma que *T. brucei* es capaz de sintetizar y oxidar ácidos grasos (Michels, Bringaud et al. 2006). La presencia en esta familia de numerosos genes de ancestros de bacteria, indica que la transferencia horizontal ha jugado un papel fundamental en la conformación de las capacidades metabólicas de los tripanosomátidos (Hannaert, Bringaud et al. 2003).

En cuanto al metabolismo energético de *T. cruzi*, se sabe que en condiciones de cultivo *in vitro*, los epimastigotes de *T. cruzi* prefieren utilizar la glucosa en vez de aminoácidos como fuente de energía (Alonso, Pereira et al. 2001), y como producto final generan CO₂, cantidades considerables de succinato, L-alanina y acetato (Cazzulo 1992). Modelos de cultivo axénicos de amastigotes de *T. cruzi* sugieren que el metabolismo energético se sostiene a partir de la glucólisis. Dada la baja disponibilidad de aminoácidos, los amastigotes pueden fermentar la glucosa a succinato y acetato, y al parecer no excretan amonio (Bringaud, Riviere et al. 2006).

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

Los tripanosomátidos presentan una inusual organización del DNA mitocondrial que forma una estructura llamada kinetoplasto. El DNA se encuentra empaquetado en una densa red con forma de disco que está compuesta de cientos de minicírculos y maxicírculos concatenados entre si. En estos últimos se han encontrado 18 genes codificantes para proteínas mitocondriales que están altamente conservadas y RNA ribosomal (rRNA) (Simpson, Thiemann et al. 2000). En *Leishmania sp.*, y en *T. brucei* se han identificado genes mitocondriales que sufren un proceso de edición, que consiste en una modificación post-transcripcional del RNA donde ocurre la adición o delección de residuos de uridina (U), lo que provoca un cambio en el marco de lectura del mRNA, traducándose de esta manera a partir de un mismo RNA distintas proteínas (Simpson, Aphasizhev et al. 2004). El mecanismo molecular de este proceso involucra un complejo de proteínas y moléculas de RNA, ayudados por los llamados RNAs-guía codificados por los minicírculos, mientras que los RNA editados son codificados por los maxicírculos (Stuart and Panigrahi 2002).

C.1. Biosíntesis de Isoprenoides

Los isoprenoides representan un grupo muy diverso de productos naturales lipídicos sintetizados a partir de una molécula compuesta por 5 átomos de carbono llamada isopentenil pirofosfato (IPP; 2-metil-1,3-butadieno). La síntesis de isoprenoides constituye una de las rutas metabólicas más complejas de las células eucariotas. Tiene un alto coste energético e implica más de 20 pasos catalizados por enzimas específicas (Fig. II.3).

En primer lugar se produce la conversión de acetil-CoA a mevalonato. La primera reacción, catalizada por la tiolasa, consiste en la condensación de dos moléculas de acetil-CoA, para formar acetoacetil-CoA. A continuación, éste reacciona con otra molécula de acetil-CoA, produciendo así el 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), mediante la acción de la HMG-CoA sintasa. Finalmente la enzima HMG-CoA reductasa, dependiente de NADPH, reduce al HMG-CoA hasta mevalonato (Cabrera, Bolds et al. 1986; Chappell, Wolf et al. 1995; Bach, Boronat et al. 1999). La HMG-CoA reductasa es una enzima limitante en el proceso de control de la velocidad de la

biosíntesis de colesterol en mamíferos (Basson, Thorsness et al. 1986) siendo la enzima más estrictamente regulada de la ruta (Fig. II.3).

Posteriormente el mevalonato es transformado a escualeno. Para ello, el mevalonato sufre una serie de reacciones hasta convertirse en isopentenil pirofosfato, que se transforma en su isómero dimetilalil pirofosfato. Ambas moléculas, de cinco carbonos cada una, se condensan y producen geranyl pirofosfato, que reacciona con otra molécula de isopentenil pirofosfato generándose el farnesil pirofosfato. Ambas reacciones son catalizadas por la enzima farnesil pirofosfato sintasa (FPPS). Finalmente se produce la condensación de dos moléculas de farnesil pirofosfato, mediante la acción de la escualeno sintasa (SQS) dando lugar a escualeno. El geranyl pirofosfato y el farnesil pirofosfato también participan en la síntesis de otros derivados isoprenoides fundamentales para la viabilidad celular, como son el dolicol, la ubiquinona y el grupo hemo A. Además, existen diferentes proteínas involucradas en los sistemas de transducción de señales que necesitan ser modificadas post-traduccionalmente por isoprenilación para ser funcionales (Gelb, Scholten et al. 1998). Entre ellas destacan la proteína ras, las proteínas G heterotriméricas y la lámina nuclear.

Las etapas tardías implican la conversión del escualeno en colesterol o ergosterol. Es en esta porción de la ruta donde se ponen de manifiesto las diferencias encontradas entre la ruta de biosíntesis de esteroides de mamíferos y de tripanosomátidos. El escualeno sufre un proceso de ciclación para dar lugar a lanosterol, molécula de 30 carbonos que tras varias transformaciones, entre las que se incluye la pérdida de tres grupos metilo, se transforma en colesterol en células de mamífero. El colesterol tiene un papel estructural fundamental en la membrana plasmática. Además, participa en la síntesis de hormonas esteroideas, vitamina D, ácidos biliares y lipoproteínas. Sin embargo, en tripanosomátidos el lanosterol sigue una ruta diferente, ya que además de ser desmetilado en posición 4 y 14, es metilado en posición 24. La desmetilación en posición 14 es catalizada por la C14 α -desmetilasa, enzima dependiente del citocromo P-450. La metilación en posición 24 está catalizada por la enzima $\Delta^{24,25}$ esterol metiltransferasa (SMT), que es dependiente de S-adenosil-L-metionina (AdoMet), y es característica de tripanosomátidos, hongos y plantas. Por este motivo constituye un atractivo blanco para el diseño de fármacos contra enfermedades protozoarias y fúngicas.

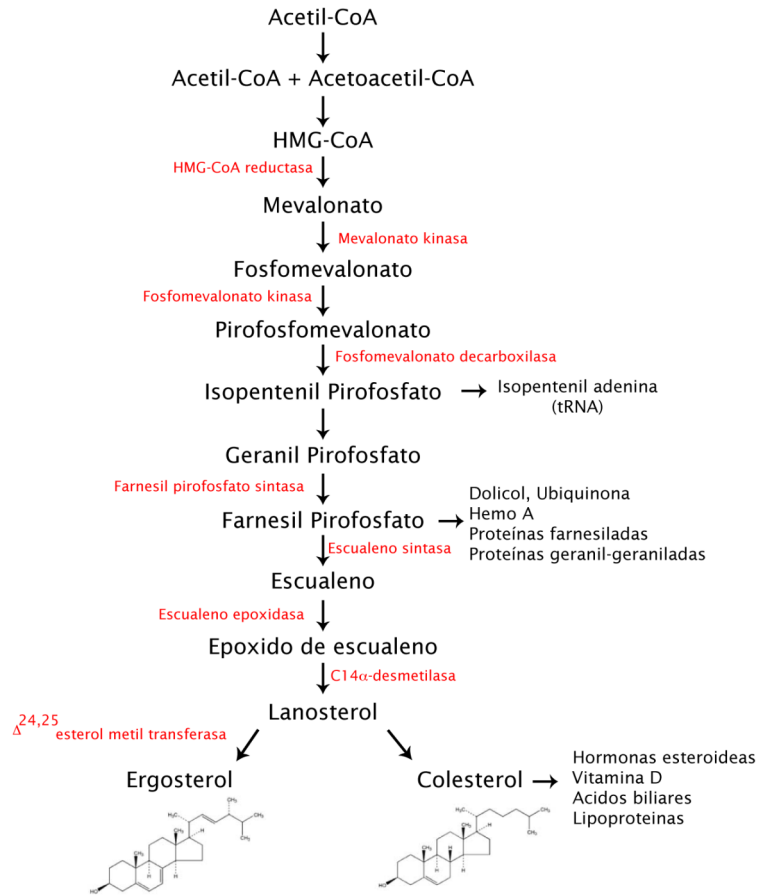


Figura II.3| Ruta de biosíntesis de isoprenoides.

C.2. Metabolismo de esteroides en especies de la familia Trypanosomatidae

Los trypanosomas durante su ciclo de vida experimentan distintos cambios ambientales en respuesta a los cuales se adaptan cambiando su morfología, metabolismo energético y lipídico.

Los lípidos cumplen una gran variedad de funciones en diversos organismos; son una forma de almacenamiento de energía, cumplen funciones metabólicas y son el principal constituyente de las membranas biológicas. De igual manera ciertos lípidos sirven de cofactores, detergentes, transportadores, hormonas, mensajeros intracelulares y extracelulares, pigmentos y anclajes de proteínas de membrana.

En relación con la composición de esteroides los trypanosomas presentan una serie de características particulares. Los esteroides mayoritarios son los de tipo $\Delta^{5,7}$ -esteroides y pertenecen al grupo C28-ergosta o el C29-estigmasta (Fig. II.4).

Leishmania posee principalmente esteroides de tipo ergosta de 28 átomos de carbono, aunque también están presentes pero en menor proporción los esteroides de tipo estigmasta de C29. El esteroide mayoritario en promastigotes de *Leishmania tropica*, *L. donovani*, *L. mexicana* y *L. amazonensis* es el ergosta-5,7,24(24¹)-trien-3 β -ol, mientras que en *L. major* es el ergosta-7,24(24¹)-dien-3 β -ol. El ergosterol (ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol) es el esteroide de C28 más abundante presente en protozoos parásitos y difiere estructuralmente del colesterol que presenta 27 átomos de carbono. Los promastigotes de *Leishmania* también contienen esteroides de C29 como el estigmasta-5,7,22-trien-3 β -ol, que suelen comprender alrededor de un 5 % del contenido total (Roberts, McLeod et al. 2003).

Sin embargo, en amastigotes de *L. major* la cantidad de estigmasteroides es más significativa, representado el 20 % de los esteroides endógenos (Roberts, McLeod et al. 2003). Los más abundantes en la membrana de los parásitos son el estigmasta-5,7,24(24¹)-trien-3 β -ol y el estigmasta-7,24(24¹)-dien-3 β -ol.

Los promastigotes de *Leishmania* pueden tomar grandes cantidades de colesterol del medio de cultivo, pero no son capaces de metabolizarlo ni de sintetizarlo *de novo* a partir de mevalonato (Chance 1997). El colesterol puede conformar hasta el 50 % de los esteroides totales en promastigotes, sin embargo, no es capaz de satisfacer los requerimientos celulares y un alto contenido del mismo en las membranas del parásito se relaciona con pérdida de viabilidad.

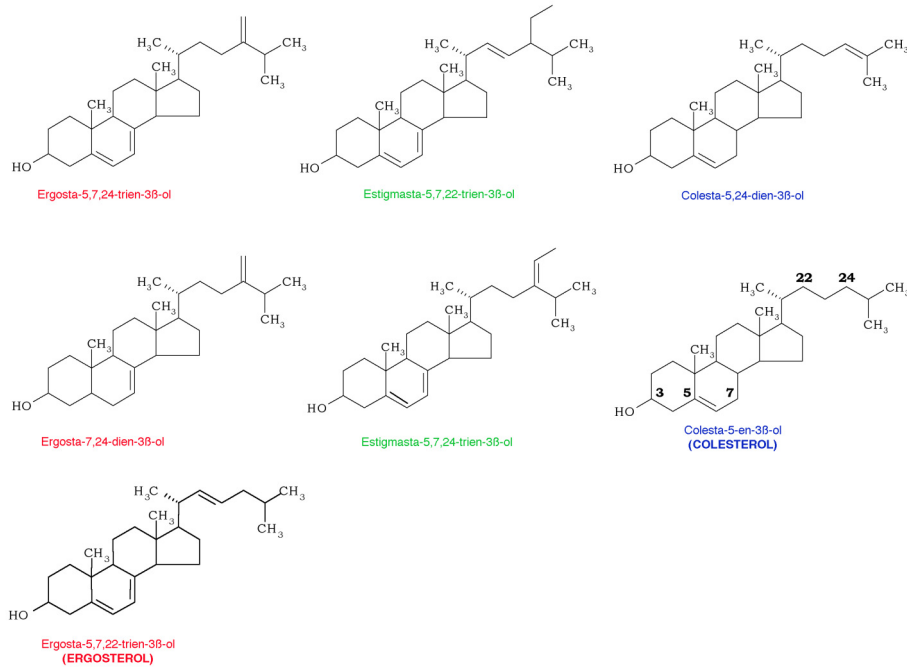


Figura II.4| Estructura de los principales esteroides de mamífero y trypanosomas. En la estructura del colesterol se indican con números los átomos de carbono para identificarlos en los demás esteroides.

Los epimastigotes de *T. cruzi* contienen ergosterol y ergosta-5,7-dien-3β-ol, los cuales representan más del 40% del total de esteroides. También poseen una cantidad apreciable (~30%) de estigmasta-5,7-dien-3β-ol y estigmasta-5,7,22-trien-3β-ol (Korn, Von Brand et al. 1969; Beach, Goad et al. 1986). Las formas amastigotes de *T. cruzi* se diferencian de los promastigotes ya que en vez de producir $\Delta^{5,7}$ -esteroides, sintetizan ergosta-7,24(24¹)-dien-3β-ol y ergosta-7-en-3β-ol, lo que sugiere la ausencia de actividad Δ^5 y Δ^{22} desaturasa (Liendo, Visbal et al. 1999). Además de los esteroides de C28 y C29, *Leishmania* y *T. cruzi* contienen colesterol que oscila aproximadamente entre un 10-50% del total de esteroides. Este colesterol proviene del hospedador animal o del suero presente en el medio de cultivo (Goad, Holz et al. 1984; Beach, Goad et al. 1986; Haughan 1991; Liendo, Visbal et al. 1999). En cualquier caso, los tripanosomátidos necesitan sintetizar sus propios esteroides debido al importante papel que juegan tanto en el metabolismo celular como en el mantenimiento de las propiedades físico-químicas de las membranas celulares.

A diferencia de *Leishmania* y *T. cruzi*, los trypanosomas africanos poseen una capacidad limitada de síntesis de esteroides *de novo*. Las formas sanguíneas de *T. brucei* se diferencian del resto de los trypanosomas ya que el esteroide mayoritario que poseen en sus membranas es el colesterol, el cual es incorporado del medio a través de una endocitosis mediada por el receptor de lipoproteínas de bajo peso molecular (LDL) (Coppens, Levade et al. 1995). En *T. brucei* la endocitosis de lipoproteínas y transferrina se realiza a través de un receptor ubicado en la bolsa flagelar, que es una invaginación especializada de la membrana plasmática el único lugar donde se realiza este proceso (Green, Del Pilar Molina Portela et al. 2003).

A pesar de la aparente ausencia de síntesis de ergosterol *de novo* en las formas sanguíneas de *T. brucei*, se ha detectado actividad HMG-CoA reductasa (Coppens, Bastin et al. 1995). Como productos de la síntesis del mevalonato se generan isoprenoides, dolicol y ubiquinona, los cuales también han sido detectados en las formas sanguíneas del parásito (Low, Dallner et al. 1991). La baja concentración en el plasma de dolicol, ésteres y derivados del fosfato (141 nM en total (Elmberger, Engfeldt et al. 1988)), sugiere que las formas sanguíneas de *T. brucei* deben poseer la capacidad de sintetizar *de novo* el dolicol, ya que estos parásitos requieren aproximadamente 28 $\mu\text{mol/mg}$ de proteína para su crecimiento durante la fase logarítmica cada 5 y 10 horas (Low, Dallner et al. 1991), cantidad que no puede ser proporcionada exógenamente debido a las bajas concentraciones de dolicol presentes en el medio. Por otro lado se ha demostrado la esencialidad del dolicol en las formas sanguíneas a través del uso del inhibidor tunicamicina, evidenciando que el dolicol es un intermediario esencial necesario para la transferencia de las cadenas de oligosacárido a residuos de asparagina para la síntesis de glicoproteínas en *T. brucei* (Strickler and Patton 1980). Este proceso involucra a una manosiltransferasa dolicol-dependiente localizada en el retículo endoplasmático rugoso, como ya se ha visto en las células de mamíferos (Prado-Figueroa, Raper et al. 1994).

A diferencia de los trypanosomas sanguíneos y de forma similar a *Leishmania* y *T. cruzi*, la forma procíclica de los trypanosomas africanos es flexible en cuanto a sus requerimientos de esteroides. Estos parásitos son capaces de captarlos del medio y también son capaces de sintetizarlos *de novo* a partir de mevalonato (Coppens and Courtoy 1995; Coppens, Levade et al. 1995). Estudios demuestran que los procíclicos

son capaces de regular su síntesis endógena de lípidos, ya que la presencia de lípidos exógenos tiene un efecto regulador sobre la maquinaria biosintética de los isoprenoides. Por otro lado la estatina sinvinolina, un inhibidor específico de la HMG-CoA reductasa afecta el crecimiento de los procíclicos en cultivo y disminuye también la incorporación de [¹⁴C]acetato a esteroides, además de generar cambios morfológicos, paro en la citokinesis y alteraciones en la estructura del mitocondria y el kinetoplasto. Estos efectos se potencian al crecer los parásitos en un suero carente de lipoproteínas (Coppens, Bastin et al. 1995) (Fig. II.5).

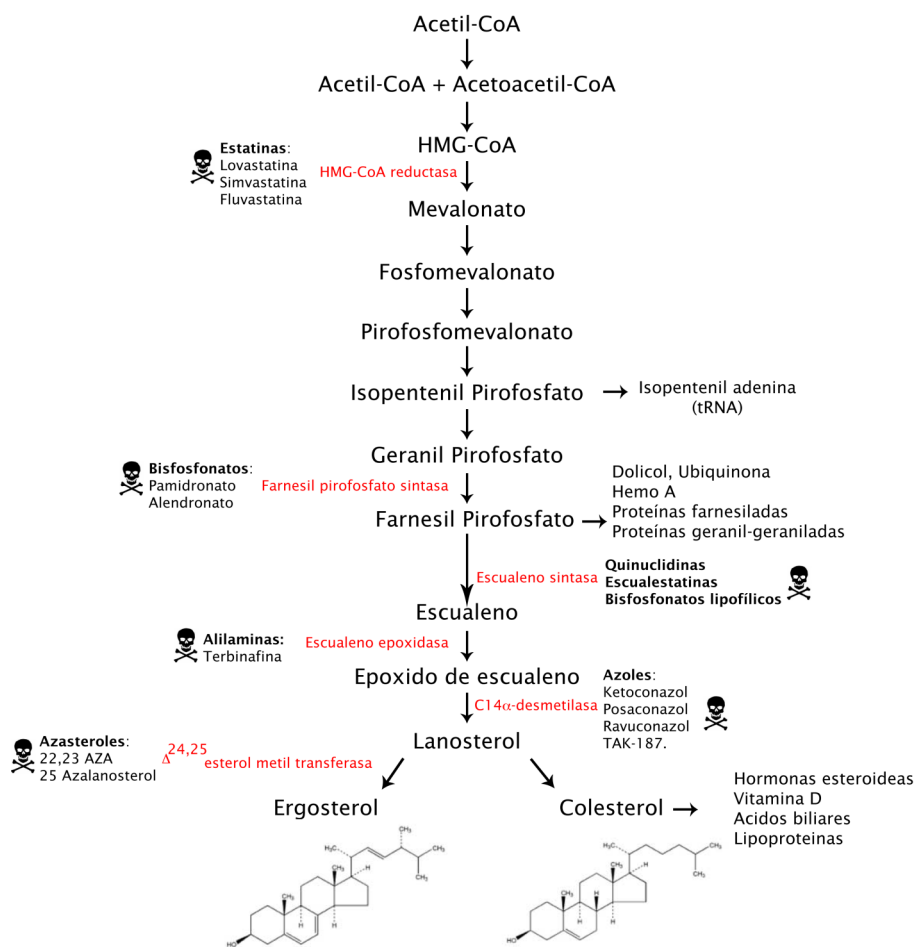


Figura II.5| Inhibidores de la biosíntesis de ergosterol.

C.2.1. Características generales de la escualeno sintasa

La escualeno sintasa (SQS: farnesil-difosfato farnesil-transferasa, EC 2.5.1.21) es una enzima clave en la ruta biosintética de los esteroides de todas las células eucariotas, por lo que representa un blanco potencialmente importante de intervención terapéutica para el desarrollo de fármacos hipocolesterolémicos.

La escualeno sintasa (SQS) cataliza la condensación cabeza-cabeza de dos moléculas de farnesil pirofosfato (FPP) para formar escualeno. La reacción se produce en dos pasos distintos, involucrando ambos la formación de intermediarios carbocatiónicos. En la primera mitad de la reacción, dos moléculas de FPP reaccionan para formar pre-escualeno pirofosfato (PSQPP). En la segunda mitad, el PSQPP sufre heterólisis, isomerización y reducción con NADPH para formar el escualeno (Thompson, Danley et al. 1998) (Fig. II.6).

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

En células de mamíferos, la condensación de FPP a escualeno representa una reacción enzimática que es crucial para la producción de esteroides, síntesis de hormonas esteroideas, vitamina D, ácidos biliares y lipoproteínas (Fig. II.6).

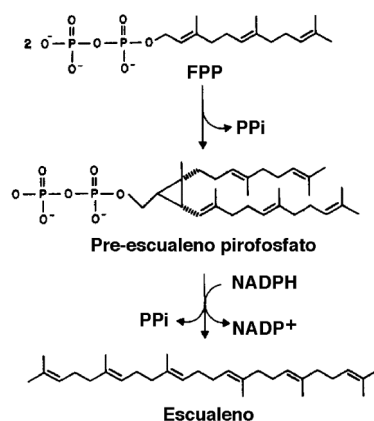


Figura II.6| Reacción que cataliza la enzima escualeno sintasa (SQS)

Adicionalmente, el FPP es el precursor de varios compuestos, incluyendo el dolicol, el hemo A, la cadena lateral de la ubiquinona, y el residuo de isoprenoide de proteínas preniladas (Soltis, McMahon et al. 1995), además de los sesquiterpenoides y las fitoalexinas de plantas que actúan como defensa contra el ataque de patógenos (Kribii, Arro et al. 1997). Ya que el paso enzimático catalizado por la SQS tiene lugar justo después de la bifurcación de la ruta, la inhibición de esta enzima no debería afectar la producción de metabolitos no esteroideos los cuales juegan papeles importantes en la viabilidad y proliferación celular, lo que supone una ventaja frente a los inhibidores de la HMG-CoA reductasa.

Actualmente los inhibidores de uso clínico mas efectivos para la disminución de los niveles de colesterol en la sangre son las estatinas, que actúan a nivel de la HMG-CoA reductasa. A pesar de que estos inhibidores han demostrado ser seguros, ocasionalmente se observa en pacientes elevados niveles de transaminasas e incidencia de miopatías. Se piensa que estos efectos se deben a la depleción de los niveles de mevalonato en las etapas tempranas de la síntesis de colesterol, suprimiendo la síntesis productos que son esenciales para la viabilidad celular (ras, dolicol, Hemo A, etc.).

La singularidad de la reacción catalizada por la SQS que implica una fusión cabeza-cabeza de dos moléculas de FPP para dar lugar al escualeno ha generado innumerables especulaciones con respecto al mecanismo de reacción. Como mencionamos anteriormente, la reacción ocurre en dos pasos diferentes y cada uno incluye la

formación de intermediarios de reacción carbocationicos (Poulter 1990; Jarstfer 1996). En la primera parte de la reacción, dos moléculas de FPP reaccionan cabeza-cabeza para formar el intermediario estable ciclopropilcarbamil difosfato, pre-escualeno difosfato (PSQPP) produciéndose la liberación de un protón y pirofosfato inorgánico (PPi). En la segunda parte de la reacción, que aparentemente tiene lugar en un segundo centro activo de la enzima (EJ Corey 1976; CD Poulter 1989; Petras, Lindsey et al. 1999) el PSQPP sufre una heterólisis, una isomerización y una reducción NADPH dependiente para formar escualeno. Se ha postulado que la maquinaria catalítica de la SQS esta formada por dos sitios de unión distintos para el FPP (Ortiz de Montellano, Wei et al. 1977; Washburn 1977), uno que une al FPP favoreciendo que éste adopte una conformación que facilita su hidrólisis para generar un carbocatión alílico, y otro que une al segundo FPP y lo orienta para facilitar la inserción del carbocatión en el doble enlace C2-C3 (Poulter 1981). También se ha propuesto que las moléculas de FPP se unen secuencialmente y que la translocación del PSQPP del primer centro de reacción hacia el segundo ocurre sin disociarse de la enzima (Popjak G 1979; Mookhtiar, Kalinowski et al. 1994). Los residuos involucrados en la maquinaria catalítica de la SQS han sido identificados mediante mutagénesis dirigida (Gu, Ishii et al. 1998).

La SQS esta presente en muchos organismos como, hongos, plantas y animales. La enzima es monomérica y se encuentra asociada al retículo endoplasmático en hepatocitos de rata y en células humanas (Cohen, Griffioen et al. 1992; Stamellos, Shackelford et al. 1993) y ha sido clonada a partir de levadura, hepatocitos de rata, ratón, humano y plantas (Shechter, Klinger et al. 1992; LoGrasso, Soltis et al. 1993; Kribii, Arro et al. 1997; Thompson, Danley et al. 1998; Okazaki, Tazoe et al. 2006). El tamaño de la proteína es de aproximadamente 46-48 kDa, está unida a la membrana del retículo endoplasmático por su extremo carboxilo y su extremo amino, y la zona donde está el sitio activo se encuentra orientada hacia el citosol (Devarenne, Shin et al. 1998). Al comparar las secuencias de la proteína de la SQS de *T. cruzi*, *L. major*, humana y de *S. cerevisiae* se puede observar 4 motivos conservados entre las distintas enzimas (Fig. II.7).

El motivo **DDXXD** es un motivo típico de enzimas de la ruta de isoprenoides clase I que unen sustratos que poseen difosfatos (Poulter 1981; Sacchettini and Poulter 1997). Al superponer la estructura de la SQS humana con la de la farnesil difosfato sintasa

(FPS), se observa que el motivo DDXXD de la FPS solapa con dos motivos ricos en aspartato de la SQS humana el ⁸³DTLEDD⁸⁸ y el ²²⁹DYLED²³³, situados en las zonas consenso I y II (Pandit, Danley et al. 2000). Estos motivos están altamente conservados en las cuatro secuencias de las SQS y corresponden a los sitios de unión del FPP. A partir de la información obtenida de la estructura cristalográfica se sabe que estos motivos están ubicados en las caras opuestas de la hendidura central de la enzima. En la catálisis interviene el ion Mg^{2+} el cual está involucrado en la estabilización del grupo difosfato (Poulter 1981; Sacchettini and Poulter 1997).

Esta comparación también sugiere que algunas regiones hidrofóbicas altamente conservadas pueden participar en su asociación con la membrana y localización microsomal, o en la unión del NADPH (Kribii, Arro et al. 1997)

INTRODUCCION

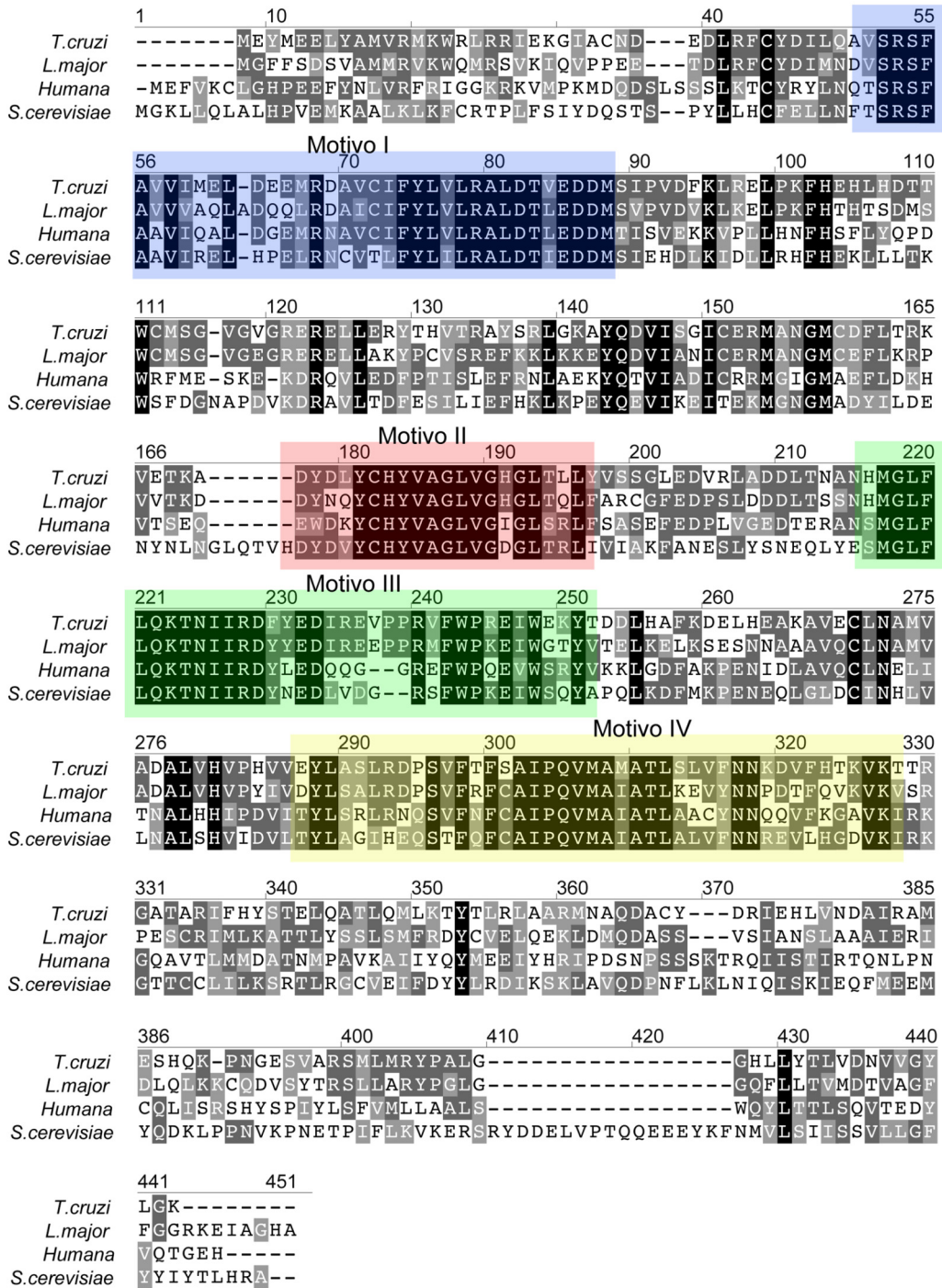


Figura II.7| Alineamiento de las secuencias de SQS de los tripanosomátidos: *Trypanosoma cruzi* (XP806809), *Leishmania major* (CAJ08546), SQS humana (I52090) y la SQS de levadura (CAA42583). Las secuencias fueron alineadas utilizando el modulo AlingX del programa Vector NTI (Invitrogen™). Los 4 motivos conservados se muestran en colores.

La estructura de la SQS fue obtenida por Pandit y colaboradores (Pandit, Danley et al. 2000), quienes también cristalizaron complejos con varios inhibidores. Distintas modificaciones genéticas han generado versiones de proteínas truncadas donde se han eliminado regiones de anclaje a membrana (LoGrasso, Soltis et al. 1993; Zhang, Jennings et al. 1993). La estructura tridimensional de la enzima humana corresponde a la de una proteína doble truncada, donde se han eliminado 47 aminoácidos del extremo amino y 30 del extremo carboxilo, construcción que constituye una versión activa y soluble (Thompson, Danley et al. 1998). Un análisis de esta estructura ha puesto de manifiesto que la enzima se encuentra plegada formando un único dominio y presenta una hendidura en la parte central de una de sus caras (Fig. II.8). Los sitios activos para las dos reacciones se hallan en el centro de la hendidura y contiene los residuos conservados de aspartato y arginina que están involucrados en la unión del sustrato (FPP). Debido a que la SQS es una proteína de membrana, uno de los extremos de la hendidura se encuentra orientado hacia el disolvente, mientras que el otro extremo se localiza un bolsillo de residuos hidrofóbicos de cara a la membrana (Pandit, Danley et al. 2000).

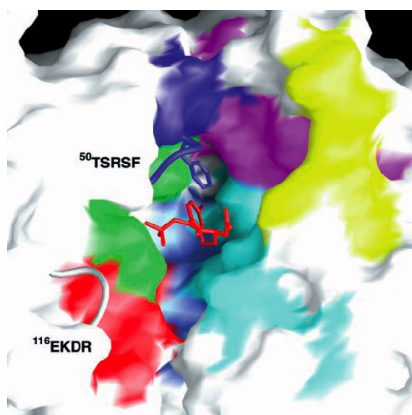


Figura II.8| Detalle del sitio catalítico de la escualeno sintasa humana, las zonas de colores en la superficie de la molécula muestran las regiones conservadas entre las distintas enzimas (Pandit, Danley et al. 2000).

Estudios de la estructura junto con experimentos de mutagénesis dirigida, han permitido identificar los residuos que están involucrados en el reconocimiento, unión y catálisis de los sustratos. Las dos moléculas de FPP se unen a un extremo de la hendidura donde se localiza el sitio activo de la primera semi-reacción. Posteriormente el intermediario estable se introduce en un bolsillo hidrofóbico donde ocurre la segunda parte de la

reacción. Es interesante destacar que las cinco alfa hélices que rodean el centro activo son homólogas desde el punto de vista estructural (a pesar de no existir homología a nivel de secuencia) y están conservadas con otras enzimas de la síntesis de isoprenoides como son la farnesil difosfato sintasa, pentaleno sintasa y la 5-epi-aristoloqueno sintasa (Fig. II.9) (Pandit, Danley et al. 2000).

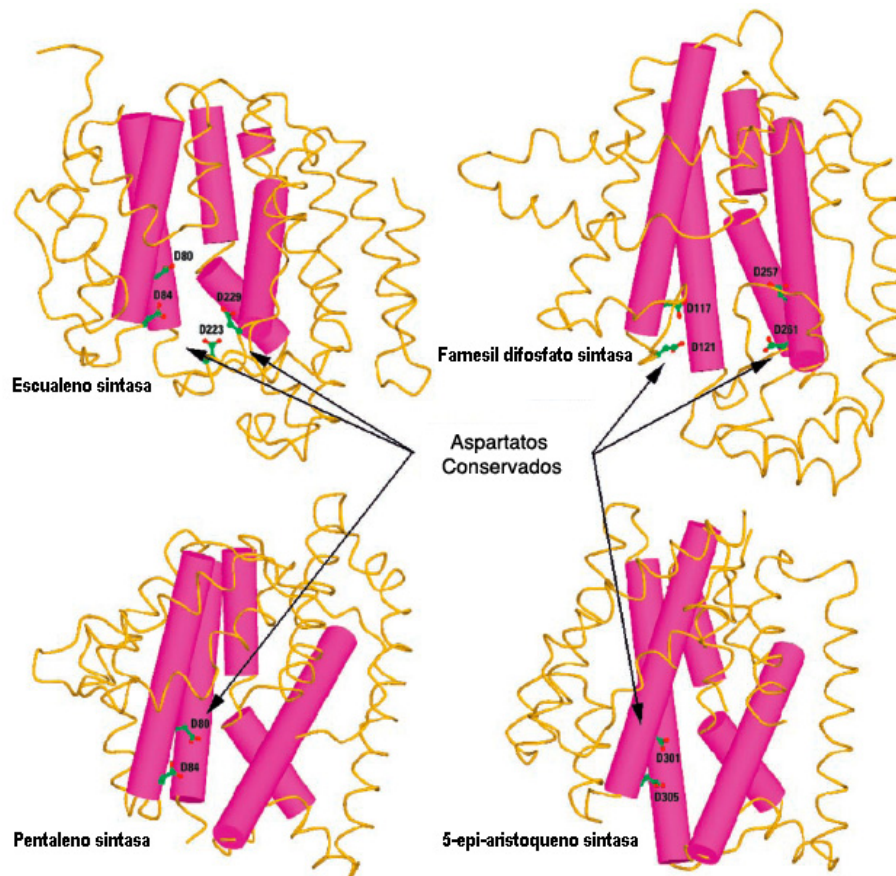


Figura II.9| Homología estructural de la escualeno sintasa humana con otras enzimas de la síntesis de isoprenoides (Pandit, Danley et al. 2000).

Se ha invertido un gran esfuerzo en el desarrollo de inhibidores de la escualeno sintasa dado su potencial como hipocolesterolémicos. El concepto del diseño racional de fármacos se ha utilizado para generar moléculas que mimetizan a los sustratos e intermediarios del estado de transición en la transformación del FPP a escualeno. También se han realizado “screenings” de productos naturales con el fin de identificar nuevas moléculas cabeza de serie. Actualmente se cuenta con inhibidores de la escualeno sintasa de los siguientes tipos: 1) Intermediarios análogos del estado de transición, que mimetizan el carbocatión y otros inhibidores con un ion amonio. Entre estos inhibidores se incluyen análogos de ciclopropil-amonio, análogos de amonio

alifáticos y las quinuclidinas entre otros. 2) Compuestos que contienen fósforo que mimetizan al FPP (bisfosfonatos). 3) Ácidos zaragóxicos (escualestatinas). Los ácidos zaragóxicos, o escualestatinas, actúan como inhibidores competitivos de la SQS con respecto al sustrato FPP e inhiben tanto la conversión de FPP a PSQPP, como la de PSQPP a escualeno (Bergstrom, Dufresne et al. 1995; Watson and Procopiou 1996). El ácido zaragóxico A (ZGA-A) actúa inhibiendo irreversiblemente la SQS, vía un proceso similar a los inhibidores suicidas clásicos con la formación de un aducto covalente ZGA-A.SQS que es catalíticamente incompetente (Lindsey and Harwood 1995). El ácido zaragóxico C es un inhibidor competitivo del FPP de la enzima humana tiene una K_i de 250 pM y no afecta a la unión del NADPH, por lo que se supone que los sitios de unión de ambos son distintos (Soltis, McMahon et al. 1995).

Los bisfosfonatos son compuestos que contienen un enlace P-C-P y son resistentes a la degradación metabólica que tiene lugar en el caso de los pirofosfatos (P-O-P) (Amin, Cornell et al. 1992). Estos fármacos inhiben la resorción ósea y la mineralización de hueso y son usados para el tratamiento de diversos desórdenes óseos. Algunos que contienen nitrógeno son inhibidores de la farnesilación y geranilación al actuar a nivel de la farnesil difosfato sintasa, induciendo apoptosis (Amin, Cornell et al. 1992).

Las SQS de una gran variedad de organismos son inhibidas por los bisfosfonatos CP-295679 y la benzoxazepinona CP-2944838. Estos compuestos se unen al sitio activo, ya que mimetizan al FPP, y presentan un grupo ácido unido a una larga cadena hidrofóbica (Thompson, Danley et al. 1998). El isopentenil 1,1-bisfosfonato y análogos relacionados, son potentes inhibidores de la SQS microsomal de hepatocitos de rata ($IC_{50} = 0.7-32$ nM) (Ciosek, Magnin et al. 1993). Sin embargo, la utilidad terapéutica de los bisfosfonatos es cuestionable, ya que son moléculas altamente cargadas y, se absorben de manera ineficiente cuando se ingieren por vía oral (Amin, Cornell et al. 1992).

Las quinuclidinas 3-sustituídas son una serie de inhibidores catiónicos de la SQS que desde el punto de vista estructural son muy diferentes a los ácidos zaragóxicos, y los bisfosfonatos (Brown, Clarke et al. 1996; McTaggart, Brown et al. 1996). Presentan una mayor biodisponibilidad que los bisfosfonatos y ácidos zaragóxicos presumiblemente como resultado de su estructura química di y tri-aniónica. Es probable que las

quinuclidinas simulen las propiedades lipofílicas y electrostáticas del intermediario carbocatiónico de la reacción (McTaggart, Brown et al. 1996). Las quinuclidinas 3-(bifenil-4-il)quinuclidina BPQ y BPQ-OH causan una inhibición bifásica de la SQS de hepatocitos de rata, con constantes de inhibición aparentes de 12 nM y 15 nM, para la fase sensible e insensible respectivamente (McTaggart, Brown et al. 1996). Ambos son inhibidores de la síntesis hepática de esteroides con valores de ED50 de 10.6 y 7.1 mg/Kg., respectivamente al ser administrados por vía oral a ratas (Brown, Clarke et al. 1996).

Recientemente se han evaluado diversos inhibidores de la SQS que presentan actividad antiprotozoaria *in vitro* e *in vivo*. Este es el caso de las quinuclidinas E5700 y ER119884 (sintetizadas por la compañía farmacéutica Japonesa Eisai Inc.) desarrolladas como hipocolesterolémicos y que han demostrado poseer una potente actividad *in vitro* e *in vivo* frente a la SQS de *T. cruzi* con valores de K_i del rango subnanomolar (Urbina, Concepcion et al. 2004). También se ha estudiado el efecto antiproliferativo de diversas quinuclidinas frente a *L. major*, *L. mexicana*, *L. donovani* y *T. b. rhodesiense*. Estos compuestos producen un alto grado de inhibición de la enzima, inhibición del crecimiento de los parásitos *in vitro*, y alteraciones morfológicas severas ya que causan la depleción del pool de esteroides endógenos. Algunos han demostrado ser efectivos en modelos murinos (Urbina, Concepcion et al. 2002; Braga, Urbina et al. 2004; Lorente, Rodrigues et al. 2004; Urbina, Concepcion et al. 2004; Rodrigues, Urbina et al. 2005).

El desarrollo de inhibidores de la SQS como antiprotozoarios puede tener ventajas terapéuticas. Si estos compuestos actúan a nivel de la SQS de patógenos como *T. cruzi*, *L. mexicana*, *T. b. rhodesiense* o *gambiense* inhibiendo su crecimiento al producir el agotamiento de esteroides específicos endógenos y a la vez inhiben la síntesis de esteroides de las células hospedadoras no tendrían consecuencias tóxicas severas ya que el hospedador puede compensar el bloqueo de la síntesis endógena de colesterol con la absorción de esteroides exógenos que proceden de la dieta a través de receptores de LDL.

C.2.2. Escualeno Epoxidasa

La enzima escualeno epoxidasa (SQE: EC 1.14.99.7) de mamíferos también denominada escualeno mono-oxigenasa, es una proteína de 64 kDa que cataliza la oxidación del escualeno para formar 2,3-óxido de escualeno el cual posteriormente sufre un proceso de ciclación por otra enzima para producir lanosterol (Fig. II.10). En mamíferos la escualeno epoxidasa es una enzima de membrana del retículo endoplasmático y, al igual que la SQS, posee un papel importante en la síntesis de esteroides esenciales (Laden, Tang et al. 2000).



Figura II.10| Reacción que cataliza la enzima escualeno epoxidasa.

A pesar de que la enzima humana fue identificada a inicios de los 70 (Yamamoto and Bloch 1970) (Ono and Bloch 1975), su caracterización no fue posible hasta mediados de los años 90, que fue cuando se llevaron a cabo una serie de estudios bioquímicos utilizando preparaciones obtenidas a partir de fracciones subcelulares de la línea celular hepática humana HepG2 (Hidaka, Satoh et al. 1990; Sakakibara, Watanabe et al. 1995). En el año 1995 se obtuvo la primera secuencia de la SQE de hepatocitos de rata, la cual exhibe un 30% de similitud de secuencia con la de levadura y otras flavoproteínas. Posteriormente se han clonado la SQE de ratón y la humana (Hata, Inoue et al. 1995 ; Laden, Tang et al. 2000). La similitud existente entre la escualeno epoxidasa humana y la de ratón es de un 84%. Es de destacar que se han identificado diferencias entre las SQE de mamíferos en relación con su sensibilidad a inhibidores, lo que sugiere que existen diferencias entre las enzimas de distintas especies que pueden ser explotadas en el diseño de inhibidores específicos (Gotteland, Loubat et al. 1998).

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

Se han desarrollado varios compuestos análogos del escualeno que inhiben la SQE humana. La compañía farmacéutica Banyu fue la primera en sintetizar el primer inhibidor efectivo de la SQE de mamíferos, el NB-598 {E-N-ethyl-N-(6,6-dimethyl-2hepten-4-ynyl)-3-[(3,3'-bisthiophen-5-yl)methoxy]benzene-methanamine hydrochloride}. El NB-598 fue obtenido mediante una modificación química del anillo aromático de la benzidamida, derivado de la terbinafina un potente inhibidor de la SQE de levaduras y hongos. El NB-598 presentaba actividad frente a la SQE de mamíferos pero no frente a la de hongos y levaduras. Los valores de IC₅₀ frente a la SQE de rata, perro y células HepG2 son de 4.4, 2 y 0,75 nM respectivamente (Horie, Tsuchiya et al. 1990; Horie, Sawasaki et al. 1991).

Existen múltiples compuestos que son inhibidores selectivos de la SQE. Las alilaminas y tiocarbamatos utilizados como antifúngicos sintéticos, inhiben la biosíntesis de ergosterol al actuar sobre la SQE generando la acumulación de escualeno el cual es tóxico para la célula. La terbinafina es una alilamina que presenta un amplio espectro de actividad frente a agentes patógenos fúngicos de la piel, pelo y uñas. Interviene de modo específico al actuar sobre la SQE produciendo una deficiencia en ergosterol y la acumulación de escualeno, lo que produce la pérdida de viabilidad de los hongos, sin inhibir a la SQE del hospedador mamífero (Favre and Ryder 1997). Dado al potencial antifúngico que poseen las alilaminas se han estudiado diversos compuestos en distintas cepas de hongos. Por ejemplo, en *Candida albicans* se ha estudiado la relación entre la biosíntesis de esteroides, integridad de la membrana y proliferación celular utilizando diferentes compuestos que actúan sobre la SQE. Todos los compuestos de tipo naftifina y terbinafina mostraron ser muy potentes, sin embargo, al comparar estos inhibidores

con inhibidores de la síntesis de C14 α -desmetilasa, que también presentan actividad frente a *C. albicans*, se observó que las alilaminas son más activas frente a hongos dermatofitos (Georgopapadakou and Bertasso 1992). Estudios clínicos han demostrado que aproximadamente un 70% de la terbinafina es absorbida después de suministrar una dosis oral (250 mg). El mecanismo de inhibición de la SQE por a terbinafina no se conoce, sin embargo se piensa que interfiere en la unión del sustrato (Ryder 1990).

A pesar que la aparición de cepas resistentes a la terbinafina en aislados clínicos es rara, se han observado casos de resistencia. El mecanismo de resistencia presumiblemente está relacionado con la aparición de mutaciones puntuales que generan un cambio en un aminoácido de la SQE, el cual produce la disminución de la afinidad por el inhibidor (Osborne, Leitner et al. 2005; Osborne, Leitner et al. 2006).

Experimentos de sobreexpresión y selección en *L. major* utilizando inhibidores de la síntesis de esteroides (IBEs); terbinafina (escualeno epoxidasa) e itraconazol (C14 α -desmetilasa) han dado a lugar a la identificación de proteínas y genes implicados en el mecanismo de resistencia en *Leishmania*. Tal es el caso de la escualeno sintasa, una enzima que se localiza en la etapa anterior a la que cataliza la SQE pero que se sobreexpresa en mutantes resistentes a la terbinafina. Estas observaciones sugieren que existe una regulación coordinada en la síntesis de esteroides y que el tratamiento con IBEs induce una activación de varias enzimas de la ruta lo que genera un aumento en la síntesis de intermediarios (Cotrim, Garrity et al. 1999).

C.2.3. $\Delta^{24,25}$ esteroil metiltransferasa SMT

Como ya se ha mencionado, la biosíntesis de esteroides constituye una de las principales diferencias entre el metabolismo primario de mamíferos, hongos, plantas y tripanosomátidos (Nes 2000). La $\Delta^{24,25}$ -esteroil metiltransferasa (SMT: EC 2.1.1.43) es la enzima responsable de la adición del grupo metilo o etilo en la posición 24 (Fig. II.11). Esta enzima está presente en hongos, levaduras, plantas y protozoarios mientras que no se encuentra en células de mamíferos. El grupo metilo proveniente de la s-adenosil-L-metionina en posición 24 del núcleo esteroide, constituye una de las principales

diferencias estructurales entre el colesterol y el ergosterol y convierte a la SMT en un blanco atractivo para el desarrollo de inhibidores selectivos.

Los criterios de clasificación de las SMTs se basan en la similitud entre las secuencias de aminoácidos y en el grado de metilación de la posición 24 del núcleo esteroide que llevan a cabo estas enzimas (Bouvier-Nave, Husselstein et al. 1998). La familia *smt1* reúne a las enzimas que introducen el primer grupo metilo y reconocen al cicloartenol como sustrato natural. Por este motivo también se denominan cicloartenol C-24 metiltransferasas o monometiltransferasas. La familia *smt2* agrupa a las SMTs capaces de catalizar la segunda metilación, para dar lugar a etil esteroides, utilizando como sustrato preferente el 24-metilen-lofenol (Bouvier-Nave, Husselstein et al. 1998).

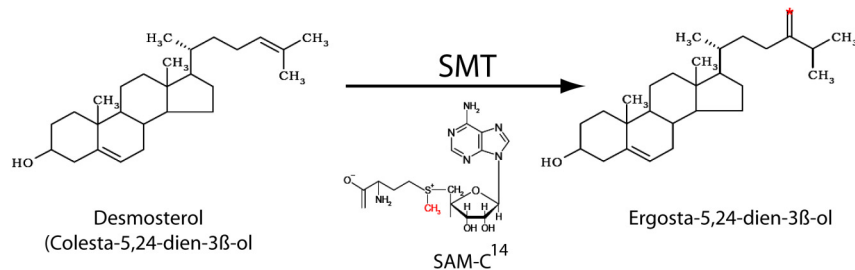


Figura II.11 | Reacción que cataliza la $\Delta^{24,25}$ -esterol metiltransferasa

El gen *ERG6* codifica la $\Delta^{24,25}$ esteroil metiltransferasa (SMT) en hongos *S. cerevisiae*, *C. albicans* y *Schizosaccharomyces pombe*, exhibe al menos un 52% de identidad entre las SMTs de distintas especies (Diener, Li et al. 2000), y en todos los casos la enzima SMT es capaz de catalizar la primera metilación para dar lugar a 24-metilesteroides. Este grupo de proteínas presenta mayor proximidad con la familia *smt1* que con la *smt2*, pero en ningún caso superan el 43% de identidad con los genes de plantas (Jensen-Pergakes, Kennedy et al. 1998). En tripanosomátidos existen esteroides tanto metilados como etilados en posición 24.

En levaduras y plantas se ha descrito que la SMT es una proteína de membrana (Hartmann-Bouillon MA 1978; Nes 2000). Recientemente se ha caracterizado la SMT de *Trypanosoma brucei* (Zhou, Lepesheva et al. 2006) cuyo sustrato preferencial es el zimosterol y los productos de reacción producidos son una mezcla de esteroides C24-

monoalquilados y, de forma inusual, esteroides doble C24-alquilados, un tipo de esteroide característico de plantas.

El compartimiento intracelular en donde tiene lugar la síntesis de esteroides no ha sido identificado claramente en tripanosomátidos. Usando técnicas de fraccionamiento bioquímico tanto la SMT como la enzima escualeno sintasa aparecen en el glicosoma y la mitocondria (Urbina, Concepcion et al. 2002). Sin embargo, en diversos organismos la porción post-escualeno de la ruta de síntesis generalmente se encuentra en el retículo endoplasmático (Brown and Goldstein 1990; Krisans 1996; Gaylor 2002). En células de levaduras, se ha encontrado a la enzima SMT casi exclusivamente en partículas lipídicas (Zinser, Paltauf et al. 1993; Athenstaedt, Zweytick et al. 1999). De hecho se ha observado que una cepa mutante en la producción de cuerpos lipídicos, presenta defectos en la formación de ergosterol (Sorger, Athenstaedt et al. 2004). Recientemente también se ha visto en levaduras que la SMT interviene en la formación y distribución de vesículas durante procesos de exocitosis (Proszynski, Klemm et al. 2005). Las partículas lipídicas son estructuras citoplasmáticas generadas en el retículo endoplasmático constituidas por lípidos neutros y rodeados por una monocapa de membrana compuesta por fosfolípidos y diversas enzimas que están involucradas en la síntesis de lípidos (Zweytick, Athenstaedt et al. 2000).

Compuestos que inhiben a la SMT han mostrado capacidad antiproliferativa *in vitro* frente a levaduras, hongos, plantas, algas (Rahier, Genot et al. 1984; Nes, Janssen et al. 1991; Ator, Schmidt et al. 1992; Acuna-Johnson, Oehlschlager et al. 1997; Mangla and Nes 2000; Nes 2000), tripanosomátidos (Lorente, Rodrigues et al. 2004), *L. donovani* (Haughan, Chance et al. 1995) en *T. cruzi* (Urbina, Visbal et al. 1997), y en *T. brucei* (Gros, Castillo-Acosta et al. 2006).

Los compuestos que inhiben a la enzima SMT pueden agruparse en tres grupos: 1) Análogos de sustrato, que inactivan a la SMT mediante una unión covalente. 2) Análogos de los compuestos intermediarios de alta energía que se forman durante el transcurso de la reacción y 3) Análogos del producto, identificados a partir del estudio de la estructura de los productos finales obtenidos en la ruta de biosíntesis de esteroides.

Compuestos análogos del sustrato. Estos compuestos mimetizan a los sustratos naturales de la enzima SMT. En algunos casos se comportan como inhibidores irreversibles, debido a que forman un enlace covalente con un residuo del sitio activo de la proteína. Se han realizado diversos ensayos de inhibición de la SMT de *S. cerevisiae* (Nes, He et al. 1998) y *Prototheca wickerhamii* (Marshall and Nes 1999) utilizando esteroides diseñados a partir de sus respectivos sustratos naturales preferentes, zimosterol y cicloartenol respectivamente. En ambos casos las cinéticas de inhibición revelaron una inhibición dependiente del tiempo y de tipo competitivo, con valores de K_i del mismo orden que las K_m s obtenidas para los sustratos.

Compuestos análogos de los intermediarios de alta energía. Los esteroides que contienen un nitrógeno o un azufre en su cadena lateral son los principales representantes de este grupo. Se asume que el sitio activo de la enzima SMT debe tener cierta flexibilidad conformacional para promover los cambios necesarios para que se de la reacción de metilación. Existen dos mecanismos que tratan de explicar la reacción de metilación-eliminación que produce la inhibición de la actividad SMT mediada por estos compuestos (Nes 2000). En el primer mecanismo, la inhibición es de tipo reversible y resulta de las interacciones electrostáticas que se producen entre la carga positiva del nitrógeno o azufre y un aminoácido polar del sitio activo. En el segundo mecanismo la inactivación de la enzima se lleva a cabo en dos pasos; en primer lugar se da la metilación del nitrógeno o azufre de la cadena lateral del esteroide, seguida del ataque nucleofílico promovido por el aminoácido polar del centro activo hacia el metilo, produciéndose así una unión covalente e irreversible entre la enzima y el compuesto. Mucho de estos compuestos se unen a la enzima con una afinidad que es varios ordenes de magnitud mayor que la del sustrato natural, lo que puede explicarse en base a que son análogos del estado de transición. Así, presentan un tipo de inhibición no competitivo con respecto al sustrato a metilar, y de tipo competitivo respecto al sustrato AldoMet, lo que sugiere una mayor semejanza con el carbocatión inestable que con el sustrato inicial. La afinidad del proceso de unión, la analogía de carga y la cinética de inhibición de estos análogos con respecto al sustrato preferente y el AldoMet respectivamente sugieren que la cadena lateral que contiene al nitrógeno o azufre se une a la SMT a través del sitio normalmente ocupado por el AldoMet, mientras que el núcleo esteroide ocuparía el lugar al que habitualmente se une el esteroide a metilar.

Compuestos análogos de producto. Se ha determinado la inhibición por producto por compuestos como el ergosterol y el 24 (28)-metilencicloartanol, en el caso de la enzima SMT del alga no fotosintética *Prototheca wickerhamii* (Mangla and Nes 2000), demostrándose que el producto de la reacción ejerce una inhibición de tipo competitivo. Otros derivados que carecen del grupo en la posición 24 (como el colesterol), o que poseen un grupo etilo (como el sitosterol) no producen inhibición ninguna de la actividad SMT, confirmando así que en la zona de unión a la enzima se produce una discriminación en función del tamaño del sustituyente en posición 24.

OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

Las enfermedades parasitarias constituyen en la actualidad un importante problema de salud pública a nivel mundial. A pesar de su elevada incidencia e impacto económico y social, esta situación no ha repercutido en el desarrollo de nuevos fármacos. Los fármacos utilizados actualmente para combatirlos fueron desarrollados hace más de 20 años, presentan una pronunciada toxicidad, son de difícil administración y presentan un elevado coste.

Esta situación pone de manifiesto la urgente necesidad de desarrollar nuevos compuestos más eficaces, menos tóxicos y que sean activos frente a cepas resistentes.

En esta línea, la ruta de biosíntesis de esteroides en tripanosomátidos constituye un atractivo conjunto de dianas de acción farmacológica y compuestos inhibidores de la misma han demostrado su eficacia en la interrupción del crecimiento de distintos protozoos patógenos.

El **objetivo fundamental** de esta tesis ha sido estudiar la importancia de la biosíntesis del ergosterol en la proliferación celular y en el mecanismo de acción de fármacos en tripanosomátidos.

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

I) Establecimiento de un sistema de expresión de proteína soluble para la escualeno sintasa y desarrollo de metodología para la obtención de proteína purificada a homogeneidad.

II) Caracterización cinética de la enzima. Identificación de nuevas quinuclidinas y estudios de selectividad para la SQS de *Trypanosoma cruzi*.

III) Estudiar el papel de la 24-esterol metiltransferasa en *Trypanosoma brucei* y el mecanismo de acción de los azasteroides.

IV) Estudio del papel de las etapas tardías de la síntesis de ergosterol en la proliferación celular y la morfología en el Trypanosoma africano.

V) Determinación de la localización subcelular de la SQS de Trypanosomas.

RESULTADOS

ANEXO I

RESULTADOS Y PUBLICACIONES RECOGIDAS EN EL PROYECTO DE TESIS DOCTORAL

I. Caracterización cinética de la escualeno sintasa de *Trypanosoma cruzi*, estudios de inhibición selectiva por derivados de quinuclidinas.**Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 51(6):2123-2129. 2007**

El principal objetivo de este trabajo fue la obtención de un sistema de expresión heterólogo de proteína soluble y activa para la SQS de *Trypanosoma cruzi*. Los resultados en esta publicación demuestran claramente que la eliminación de aminoácidos de la regiones amino y carboxilo terminal generan proteína soluble y activa. Determinamos las constantes cinéticas de la enzima para sus sustratos FPP y NADPH, y obtuvimos una K_m de $5.25 \mu\text{M}$ y $24.47 \mu\text{M}$ respectivamente y una V_{max} de $1428.56 \text{ nmol}\cdot\text{min}\cdot\text{mg}^{-1}$. Se analizó la inhibición de la SQS frente a derivados de quinuclidinas que mostraron ser activos *in vitro* frente al parásito y por último se estableció una selectividad para la SQS de *T. cruzi* mediante ensayos comparativos con la SQS humana. De esta manera se ha identificado varias quinuclidinas selectivas y muy potentes con valores de K_i del orden nM frente a la SQS de *T. cruzi*.

Estos resultados sugieren que la inhibición selectiva de la SQS de *T. cruzi* puede constituir una estrategia eficiente para el desarrollo de nuevos agentes anti-protozoarios.

Kinetic Characterization of Squalene Synthase from *Trypanosoma cruzi*: Selective Inhibition by Quinuclidine Derivatives[∇]

Marco Sealey-Cardona,¹ Simon Cammerer,² Simon Jones,² Luis M. Ruiz-Pérez,¹ Reto Brun,³ Ian H. Gilbert,² Julio A. Urbina,⁴ and Dolores González-Pacanoska^{1*}

Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avenida del Conocimiento, s/n, 18100-Armilla, Granada, Spain¹; Welsh School of Pharmacy, Cardiff University, Redwood Building, King Edward VII Avenue, Cardiff CF10 3XF, United Kingdom²; Swiss Tropical Institute, Socinstrasse 57, P.O. Box, CH-4002 Basel, Switzerland³; and Laboratorio de Química Biológica, Centro de Bioquímica y Biofísica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Altos de Pipe, Km. 11, Carretera Panamericana, Caracas 1020, Venezuela⁴

Received 20 November 2006/Returned for modification 9 January 2007/Accepted 13 March 2007

The biosynthesis of sterols is a major route for the development of antitrypanosomals. Squalene synthase (SQS) catalyzes the first step committed to the biosynthesis of sterols within the isoprenoid pathway, and several inhibitors of the enzyme have selective antitrypanosomal activity both in vivo and in vitro. The enzyme from *Trypanosoma cruzi* is a 404-amino-acid protein with a clearly identifiable membrane-spanning region. In an effort to generate soluble recombinant enzyme, we have expressed in *Escherichia coli* several truncated versions of *T. cruzi* SQS with a His tag attached to the amino terminus. Deletions of both the amino- and carboxyl-terminal regions generated active and soluble forms of the enzyme. The highest levels of soluble protein were achieved when 24 and 36 amino acids were eliminated from the amino and carboxyl regions, respectively, yielding a protein of 41.67 kDa. The Michaelis-Menten constants of the purified enzyme for farnesyl diphosphate and NAD (NADPH) were 5.25 and 23.34 μM , respectively, whereas the V_{max} was 1,428.56 $\text{nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$. Several quinuclidine derivatives with antiprotozoal activity in vitro were found to be selective inhibitors of recombinant *T. cruzi* SQS in comparative assays with the human enzyme, with 50% inhibitory concentration values in the nanomolar range. These data suggest that selective inhibition of *T. cruzi* SQS may be an efficient strategy for the development of new antitrypanosomal agents.

Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi, is an intracellular protozoan parasite that infects many wild mammals and humans, being the etiological agent of Chagas' disease, one of the major public health problems in many countries of Central and South America (20). Acute infections can be lethal, but the disease usually evolves into a chronic stage, accompanied in 25 to 30% of cases by severe debilitation and ultimately death due to irreversible lesions of the heart and gastrointestinal tract. It is estimated that 16 to 18 million people are infected with *T. cruzi*, primarily in Central and South America, with 21,000 deaths reported each year (27). Currently available chemotherapy has low efficacy (particularly in chronic infections), frequent toxic side effects, and drug resistance (3, 22). Studies have shown that protozoan parasites such as *T. cruzi* and different species of the *Leishmania* genus require the de novo synthesis of specific endogenous sterols (ergosterol and analogs), which act as essential growth factors for survival (5, 22, 23). These parasites are highly susceptible, in vivo and in vitro, to sterol biosynthesis inhibitors such as antifungal azoles, quinuclidine derivatives, allylamines, statins, and azasterols (5, 26). Indeed, sterol biosynthesis is a major route for intervention in the development of antitrypanosomals.

The enzyme squalene synthase (SQS; EC 2.5.1.21) catalyzes

the condensation of two molecules of farnesyl diphosphate (FPP) to produce squalene, the first committed step of the sterol pathway (Fig. 1). FPP is a major branching point in isoprenoid biosynthesis: it can be converted by SQS to squalene and sterols, or it can be used for the production of other essential isoprenoids, such as dolichols, coenzyme Q, heme, and prenylated proteins. Hence, considerable effort has been devoted to the development of specific inhibitors of SQS, since this should prevent the biosynthesis of sterols while not affecting the production of other essential isoprenoids (14). The inhibition of SQS should also prevent the buildup of sterol intermediates that may occur should later steps of sterol biosynthesis be inhibited.

Published evidence has shown that several inhibitors of mammalian SQS have potent antitrypanosomal activity both in vitro and in animal models (16, 24). Inhibition of parasite growth was associated with a depletion of the parasite's endogenous sterols strongly, suggesting that the main mode of action of these compounds is through the inhibition of SQS. Rational drug design has been utilized in the development of mimetics of several substrates, intermediates, and transition states in the transformation of FPP to squalene (1). One class of compounds of particular interest is the arylquinuclidines, which are protonated at physiological pH and are thought to mimic a high-energy intermediate of the SQS reaction.

Several attempts have been made to express the soluble and active SQS from different organisms in *Escherichia coli*. Different truncated versions of the enzyme have been generated by molecular biology methods (12, 18, 21), based on the previous evidence that a soluble and active form of SQS purified

* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra," Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avda. del Conocimiento s/n, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, 18100-Armilla, Granada, Spain. Phone: 34 958 181621. Fax: 34 958 181633. E-mail: dgonzalez@ipb.csic.es.

[∇] Published ahead of print on 19 March 2007.

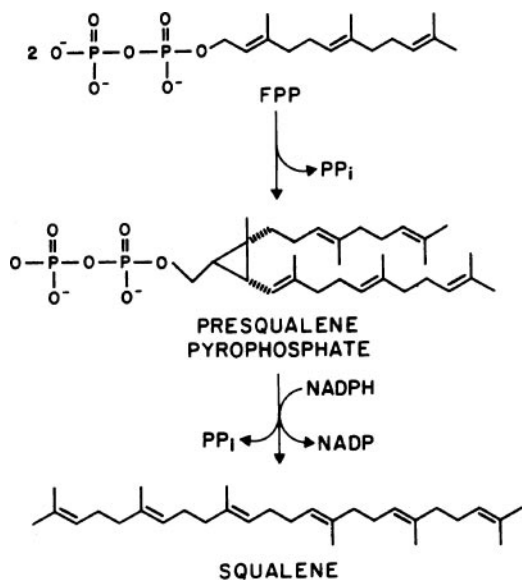


FIG. 1. Chemical reaction catalyzed by SQS.

from rat liver microsomes could be obtained after limited proteolysis with trypsin (11, 18) and genetic truncation to remove membrane binding regions (12, 28).

To avoid problems that arise when expressing and purifying a membrane-bound protein such as SQS, we generated here a recombinant *T. cruzi* enzyme that was truncated at both the amino- and the carboxyl-terminal regions to create a soluble, active protein amenable to kinetic characterization and inhibition studies. We also present a kinetic characterization of the purified soluble enzyme and show that several quinuclidine derivatives exhibit selective inhibition of *T. cruzi* SQS. This information could be exploited in the development of compounds with reduced toxicity for the etiological treatment of Chagas disease.

MATERIALS AND METHODS

Materials. The triammonium salt of [³H]farnesyl diphosphate (15.0 Ci/mmol) was obtained from Amersham Biosciences. Restriction enzymes and protease inhibitors cocktail were from Roche. T4 DNA ligase and *Taq* polymerase from Invitrogen. The pET28(a) expression system and *E. coli* BL21(DE3)RP were purchased from Novagen (Madison, WI).

Cloning of the full-length *T. cruzi* SQS gene and generation of truncated versions. The *SQS* gene was amplified by PCR using the oligonucleotide primers TcSQS N-term (CAT ATG GAG TCA ATG GAG GAG TTG) and TcSQS C-term (GAA TTA CTT CCC AAG ATA TCC AAC AAC), which were designed taking into account the *T. cruzi* sequence present in the GeneDB database, CDS: Tc00.1047053507897.20 (the restriction *Nde*I and *Eco*RI sites are underlined). The PCR was performed using genomic *T. cruzi* strain Y DNA as a template. A 1,215-bp fragment containing the entire *T. cruzi* SQS open reading frame gene (encoding 404 amino acids) was cloned into pGEM-T to generate the plasmid pSQS-ORF. Different constructs were made in order to obtain soluble and active protein. Additional primers were designed to generate truncated proteins by removing 13, 16, 17, and 24 amino acids from the N terminus and 36 and 46 amino acids from the C terminus. *Nde*I and *Eco*RI restriction sites were introduced for directional cloning in the pET28a(+) expression vector (Novagen) to yield pETTCsQS13/46, pETTCsQS16/46, pETTCsQS17/46, pETTCsQS13/36, pETTCsQS17/36, and pETTCsQS24/36. Double-stranded DNA sequencing was performed to confirm that the correct reading frame was used, with the polyhistidine tag placed in the N-terminal position.

Expression of truncated *T. cruzi* SQS. For expression in *E. coli*, the expression plasmids pET28a *T. cruzi* double-truncated SQSs were transfected into the

BL21(DE3)RP strain (Novagen). Bacteria cells were grown in Luria broth (LB) medium containing kanamycin (30 μg/ml) and chloramphenicol (34 μg/ml) and were incubated at 37°C overnight. When induction was performed, cells were incubated at 37°C and 120 rpm until reaching an optical density at 600 nm of 0.3, and then the flask was transferred to an incubator at 24°C to induce the expression of an optical density at 600 nm of 0.4 with 50 μM concentrations of IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside). Cells were induced for 4 h, pelleted by centrifugation at 4,000 rpm for 10 min at 4°C, and stored at -80°C until use.

SQS assay and product analysis. The catalytic activity of SQS was assayed by measuring the conversion of [³H]FPP to [³H]squalene. Final assay concentrations were 50 mM morpholinepropanesulfonic acid-NaOH buffer (pH 7.4), 20 mM MgCl₂, 5 mM CHAPS {3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate}, 1% Tween 80, 10 mM dithiothreitol, 0.025 mg of bovine serum albumin ml⁻¹, 0.25 mM NADPH, mg of purified recombinant protein ml⁻¹, and different concentrations of FPP. For specific activity determinations, a saturating concentration of FPP (20 μM) was used. To determine the *K_m* values for FPP, concentrations between 1 and 20 μM were used, while NADPH was maintained at saturation (2 mM). To determine the *K_m* for NADPH, concentrations ranged from 5 to 400 μM, while the FPP concentration was 20 μM. 50% inhibitory concentration (IC₅₀) determinations were determined at an FPP concentration of 0.5 μM (1 μCi per assay). The final volume of the reaction was 200 μl. After incubation at 37°C for 5 min, 40 μl of 10 M NaOH was added, followed by 10 μl of a mixture (50:1) of 70% ethanol and squalene. The resulting mixtures were mixed vigorously by vortexing, and then 10-μl aliquots were applied to 2.5-by-10-cm channels of a silica gel thin-layer chromatogram, and the newly formed squalene was separated from unreacted substrates by chromatography in toluene-ethyl acetate (9:1). The region of each chromatogram from 2 cm below the squalene band (*R_f* = 0.74) to the top of the chromatogram was removed and immersed in Hydrofluor liquid scintillation fluid and assessed for radioactivity, allowing the measure of the amount of conversion of FPP to squalene using a Pharmacia LKB liquid scintillation counter. The protein concentration was measured by the Bradford method with bovine serum as a standard.

Enzyme kinetic parameters and IC₅₀ values were estimated by utilizing the software SigmaPlot 2002 for Windows version 8.0. The *K_m*/*V_{max}* values were determined from nonlinear hyperbolic fits.

For the analysis of inhibitor interaction with human SQS, extracts from *E. coli* cells transformed with the expression plasmid pHSS16 (21) were used as the enzyme source. IC₅₀ values were obtained by using the same procedures described above for *T. cruzi* SQS.

Purification of double-truncated *T. cruzi* SQS. *E. coli* BL21(DE3)RP/pETTCsQS24/36 cells were resuspended in binding buffer (20 mM NaH₂PO₄ [pH 7.4], 10 mM CHAPS, 2 mM MgCl₂, 10% glycerol, 10 mM β-mercaptoethanol, 500 mM NaCl, 10 mM imidazole, and protease inhibitor cocktail [Roche]), disrupted by sonication, and centrifuged at 14,000 rpm for 20 min. The soluble extract was applied to a HiTrap Nickel-Chelating HP column (Amersham Biosciences). The purification was performed according to the manufacturer's instructions in a Pharmacia FPLC system. The unbound protein was washed with 60 mM imidazole, and the His₆-TcSQS24/36 was eluted with 500 mM imidazole. The enzyme purity was confirmed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Coomassie brilliant blue R-250 (Sigma) was used for staining. Fractions containing the enzyme were pooled and dialyzed against buffer A (25 mM sodium phosphate [pH 7.4] 20 mM NaCl, 2 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 10% methanol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μM leupeptin, 1 μM pepstatin) prior to MonoQ ion-exchange chromatography. A 1-ml MonoQ HR5/5 anion-exchange column (Pharmacia) was equilibrated with 15 ml of buffer A. This chromatographic step was performed by using the Pharmacia HPLC system AKTA P900. The sample from immobilized metal affinity chromatography (IMAC) was applied to a MonoQ HR5/5 column at a flow rate of 0.5 ml/min. The sample was then eluted from the column at a flow rate of 0.5 ml/min by first washing with 15 ml of buffer A, followed by a linear 30-ml salt gradient up to 500 mM NaCl. Fractions containing SQS were identified by enzyme activity assays and SDS-PAGE, concentrated, and stored at -80°C.

Assay of quinuclidine derivatives against intracellular *T. cruzi* amastigotes cultured in vitro. Rat skeletal myoblasts (L-6 cells) were seeded in 96-well microtiter plates at 2,000 cells/well/100 μl in RPMI 1640 medium with 10% fetal bovine serum and 2 mM L-glutamine. After 24 h, 5,000 *T. cruzi* trypomastigotes (Tulahuen strain C2C4 containing the β-galactosidase *lacZ* gene) (2) were added in aliquots of 100 μl per well with a twofold serial drug dilution. The plates were incubated at 37°C in 5% CO₂ for 4 days. The substrate CPRG/Nonidet was then added to the wells. The color reaction, which developed during the following 2

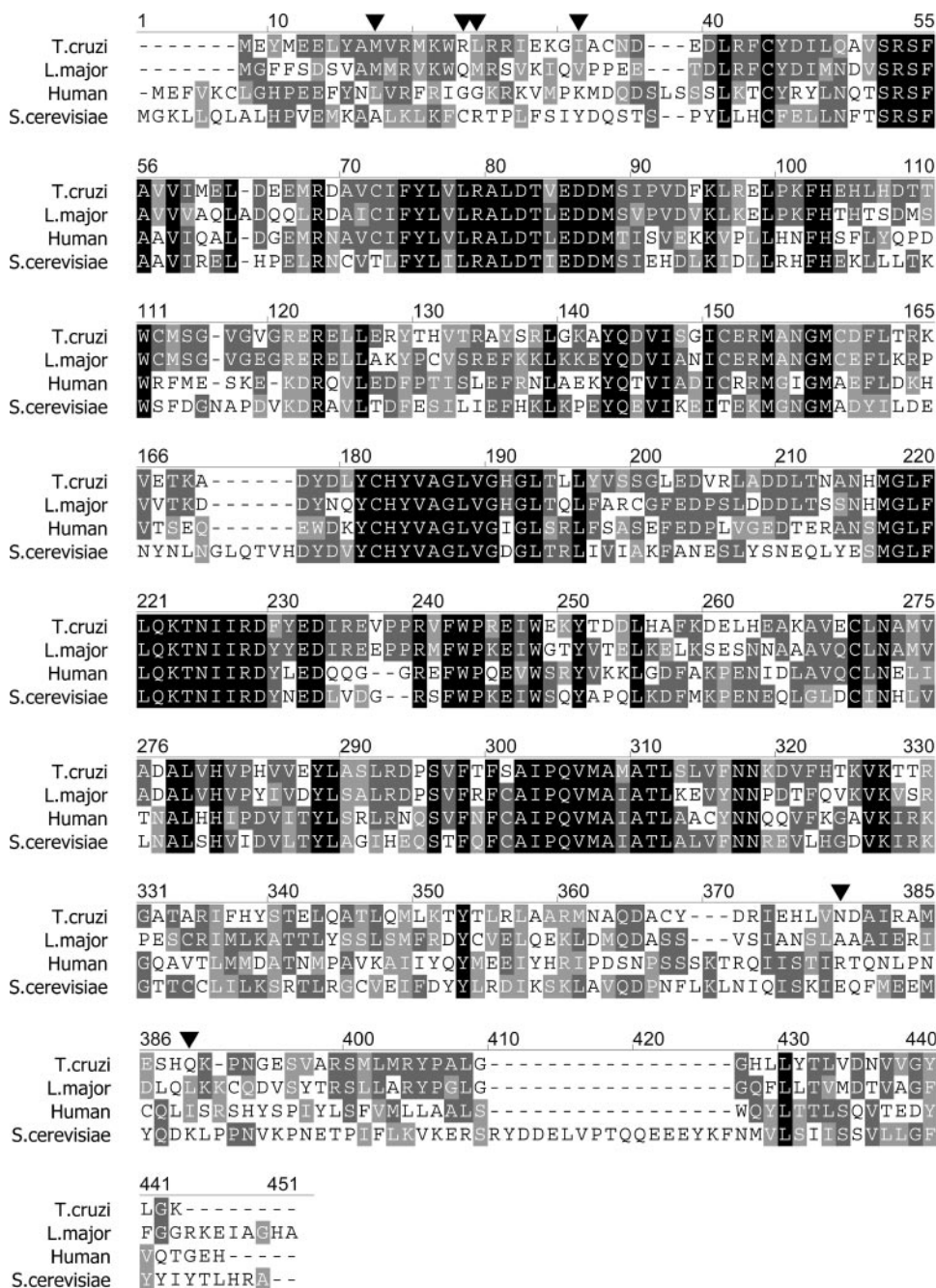


FIG. 2. Alignment of the amino acid sequences of SQS from different organisms: *T. cruzi* (XP806809), *L. major* (CAJ08546), human (I52090), and yeast (CAA42583). Sequences were aligned by using the AlignX module of Vector NTI (Invitrogen). Conserved regions are highlighted. The arrows indicate the site of the different truncations.

to 4 h, was read spectrophotometrically at 540 nm. IC_{50} values were calculated from the sigmoidal inhibition curve by using Microsoft Excel.

Quinuclidine derivatives. The quinuclidine derivatives used in the present study were synthesized and characterized by nuclear magnetic resonance and mass spectrometry. The full details of their chemical synthesis will be published elsewhere (S. B. Cammerer, C. Jimenez, S. Jones, L. Gros, S. Orenes-Lorente, C. Rodrigues, J. C. F. Rodrigues, A. Caldera, L. M. Ruiz-Perez, W. da Souza, M. Kaiser, R. Brun, J. A. Urbina, D. Gonzalez Pacanowska, and I. H. Gilbert, unpublished data), except for ER119884 and E5700, which were supplied by Tsukuba Research Laboratories, Eisai Co., Ltd., Ibaraki, Japan.

RESULTS

The amino acid sequence of *T. cruzi* SQS is conserved relative to other eukaryotic SQSs and has 55 to 58% identity and 65 to 73% similarity with other representatives of the *Trypanosomatidae* family (*T. brucei* and *Leishmania major*). As shown in Fig. 2, all of the conserved residues described to be involved in catalysis (17) are present in the *T. cruzi* enzyme such as the aspartate rich motifs involved in substrate binding (82 DTVED

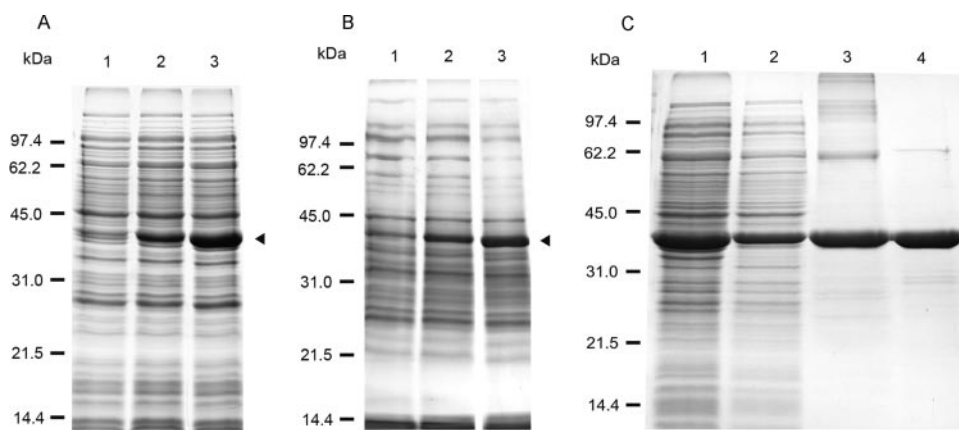


FIG. 3. SDS-PAGE analysis of expression and purification of double-truncated SQS. (A) Soluble fractions of *E. coli* BL21(DE3)RP/pETTcSQS24/36 cells. Lanes 1 to 3 contain the soluble fraction of at 0, 1, and 4 h after induction. (B) Soluble fractions of *E. coli* BL21(DE3)RP/pETTcSQS17/36 cells. Lanes 1 to 3 contain the soluble fraction at 0, 1, and 4 h after induction. The arrows show the position of the *T. cruzi* SQS recombinant protein. (C) Purification of truncated SQS (*TcSQS24/36*). Lane 1, cell extract; lane 2, soluble fraction; lane 3, IMAC; lane 4, after MonoQ HR5/5 chromatography.

and $^{229}\text{CFYED}$). Previous reports have shown the development of SQS expression systems for yeast, rat, and human enzyme (12, 18, 21). For the production of soluble protein, partial deletion of the N-terminal, C-terminal, or both regions was required. Likewise, initial attempts to produce a full-length soluble *T. cruzi* enzyme were unsuccessful. Based on a comparative analysis of other recombinant soluble SQS enzymes several constructs were designed in order to eliminate 13, 16, 17, or 24 amino acids from the amino terminus combined with the elimination of 36 or 46 amino acids from the carboxyl-terminal regions. All of the constructs were cloned into the pET28a(+) expression vector and transformed in *E. coli* BL21(DE3)RP for analysis of the level of expression and solubility on SDS-polyacrylamide gels (data not shown). After analysis for soluble protein and activity measurements, we found that a soluble active double truncated form was only obtained after the elimination of 17 or 24 amino acids from the amino terminus and the elimination of 36 residues from the carboxyl terminus. Panels A and B of Fig. 3 represent the SDS-PAGE analysis after the induction of expression with IPTG for the constructs pETTcSQS24/36 and pETTcSQS17/36, respectively, showing high levels of soluble and active recombinant SQS.

Purification of truncated soluble *T. cruzi* SQS (*TcSQS24/36*). The *TcSQS24/36* truncated protein (lacking 24 and 36 amino acids from the amino- and carboxyl-terminal regions, respectively) was the construct that showed the strongest band at approximately 41 kDa and exhibited high SQS activity. The isolation and purification of truncated *T. cruzi* SQS from *E. coli*

cells was accomplished with two purification steps as described in Materials and Methods: IMAC and MonoQ ion-exchange chromatography. The purification data are summarized in Table 1. IMAC analysis yielded a 1.7-fold purification. This material was loaded directly into a MonoQ ion-exchange chromatography column and eluted with a salt gradient. In this step, SQS eluted with a NaCl gradient ranging from 250 to 350 mM NaCl. The MonoQ ion-exchange chromatography gave a further 4.5-fold purification. Pure truncated SQS was stable in buffer A with 40% of glycerol and could be stored at -80°C for extended periods of time. The purity of the SQS was determined by SDS-PAGE analysis (Fig. 3C). The enzyme migrates as a single band with an estimated molecular mass for the truncated enzyme of 41.67 kDa. All kinetic experiments were performed with purified recombinant enzyme.

Kinetic properties of soluble truncated SQS: determination of K_m and k_{cat} values. Standard procedures were used to determine kinetic parameters. K_m and V_{max} values were obtained by nonlinear regression fit of the data to the Michaelis-Menten equation (SigmaPlot 2002 for Windows, version 8.0). The K_m and the V_{max} for FPP were 5.25 μM and 1,428.56 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ respectively, and for NADPH these values were 23.34 μM and 1,853.24 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (Fig. 4). The calculated k_{cat} values were 1.05 s^{-1} and 1.29 s^{-1} for FPP and NADPH, respectively. These values are of the same order of magnitude as those described for other truncated recombinant enzymes, as shown in Table 2.

Inhibition by quinuclidine derivatives. A series of quinuclidine derivatives were tested against the purified *T. cruzi* re-

TABLE 1. Purification of *TcSQS24/36*^a

Step	Vol (ml)	Protein concn (mg ml ⁻¹)	Total protein (mg)	Sp act (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	Total U (nmol min ⁻¹)	% Yield	Fold purification
Soluble extract	8.50	5.70	49.08	100.29	4,922.6	100	1
IMAC-His	11	0.67	7.20	178.26	1,283.5	26	1.7
MonoQ HR5/5	1.50	1.60	2.40	459.97	1,103.9	22	4.5

^a The truncated protein was purified using a combination of IMAC and MonoQ ion-exchange chromatography.

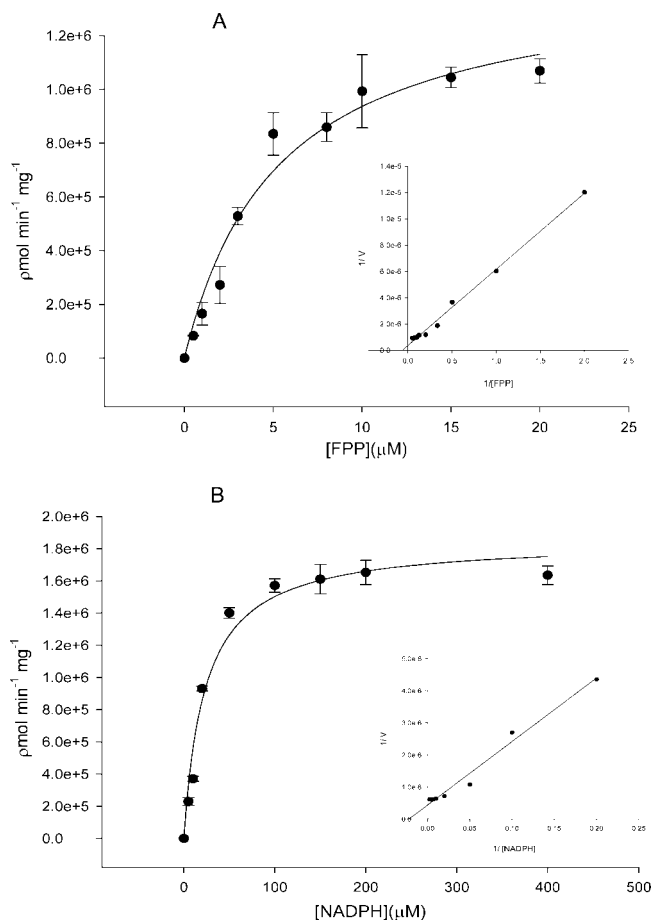


FIG. 4. Michaelis-Menten and Lineweaver-Burk (inset) plots for the calculation of the K_m and V_{max} values of *T. cruzi* SQS. (A) Plots for calculation of the K_m for FPP. The concentration range of FPP was 0.5 to 20 μ M. (B) Plots for calculation of the K_m for NADPH. The concentration range of NADPH was 5 to 400 μ M.

combinant enzyme, the human recombinant SQS, and against the intracellular form of the parasite cultured in vitro. When tested against purified recombinant *T. cruzi* enzyme, the analogs gave IC_{50} values in the low micromolar or nanomolar range (Table 3). Compound 1 exhibited an IC_{50} value of 50 nM, whereas the Eisai compounds E5700 and ER119884 gave

values of 0.84 and 3.52 nM, respectively. We sought to analyze the interaction of some of these compounds with a soluble truncated form of recombinant human SQS. As shown in Table 3, some of the compounds appeared to be less active against the human enzyme and, when IC_{50} values were compared, a selectivity index of 140 was obtained in the case of compound 1. Selectivity indexes higher than 27 and 13 were obtained for compounds 2 and 4, respectively. In the case of E5700 and ER-119884, both compounds appear to be equally active on the human and *T. cruzi* enzymes.

When these compounds were assayed against intracellular *T. cruzi* amastigotes in vitro, they exhibited potent and selective antitrypanosomal activity, with IC_{50} values in the low micromolar range (Table 3). There was not a direct correlation between inhibition of the enzyme and inhibition of the growth of the parasite, but this may not be totally unexpected, since *T. cruzi* is an intracellular parasite, and hence the activity of the compounds against the parasite will depend not only on the inhibition of the parasite's SQS but also on other factors such as drug penetration through the several permeability barriers involved and other properties of the molecules. However, although there is not a direct correlation between enzyme inhibition and growth inhibition of the intracellular parasites, these studies are proof of principle that inhibitors of *T. cruzi* SQSs also show activity against the clinically relevant form of the parasite. Study of a larger range of analogues will provide more information.

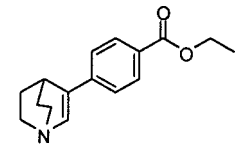
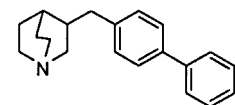
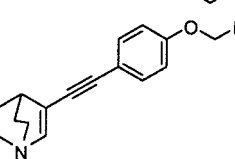
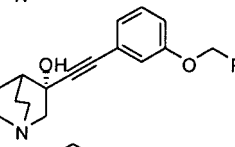
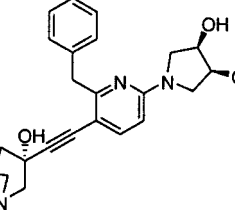
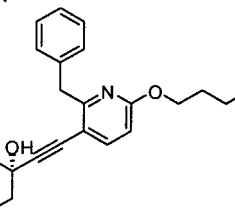
DISCUSSION

Genes encoding SQS have been isolated from many sources, such as fungi, plants and animals (4, 6–10, 12, 13, 15, 28). The enzyme is monomeric and has been reported to be associated with the endoplasmic reticulum at least in most eukaryotes. The *T. cruzi* enzyme is considerably conserved and a comparative analysis of the amino acid sequences reveals an overall high degree of similarity. The generation of high quantities of soluble enzyme for inhibitor screening was attempted using a strategy that proved to be successful with other eukaryotic SQSs. Thus far, truncated soluble and active recombinant enzymes have been generated for yeast, rat, and human SQSs. In the yeast protein, the 24 carboxyl-terminal residues were removed via genetic manipulation, and a soluble, active enzyme was produced that could account for up to 20% of the total

TABLE 2. Kinetic constants of squalene synthase from different species and sources

Species and/or source ^a	SQS type	FPP		NADPH		k_{cat} (s ⁻¹)	Reference
		K_m (μ M)	V_{max} (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	K_m (μ M)	V_{max} (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)		
Human pHSS12/pHSS16	Double-truncated SQS	2.8				1.44	21
<i>T. cruzi</i>	Glycosomal SQS	2.8	0.97	40	0.43		25
<i>T. cruzi</i>	Microsomal/mitochondrial SQS	2.3	1.18	33	0.76		25
<i>L. mexicana</i>	Glycosomal SQS	3.2	0.75	62	0.58		25
<i>L. mexicana</i>	Microsomal/mitochondrial SQS	2.8	0.98	57	0.84		25
Human	Full-length SQS expressed in a baculoviral system	2.3 \pm 0.5	4,800 \pm 460	430 \pm 60	3,800 \pm 150		19
Yeast	C-terminal truncated SQS	2.5 \pm 0.46		530 \pm 77		0.53 \pm 0.03	12
<i>T. cruzi</i>							
TcSQS24/36		5.25 \pm 1.2	1,428.56 \pm 317	23.34 \pm 4.5	1,853.24 \pm 435	1.05 \pm 0.16	

TABLE 3. Interaction of SQS from different sources with quinuclidine analogs^a

Compound	Structure	IC ₅₀ (μM)		SI _{enz}	IC ₅₀ (μM)		SI _{growth}
		<i>T. cruzi</i> SQS	Human SQS		<i>T. cruzi</i> amastigote ^b	L6 cells ^b	
1		0.05	7 ^b	140	16.0	265.2	17
2		0.73	>20	>27	4.7	20.5	4.4
3		0.83	0.25 ^b	0.3	3.1	47.2	15
4		1.5	>20	>13	9.6	45	4.7
E5700		0.00084	0.0015	1.8	0.008 ^c	ND ^d	
ER119884		0.00352	0.006	1.7	0.011 ^c	ND	

^a SI_{enz} is the ratio of IC₅₀ values for human SQS to those for *T. cruzi* SQS, and SI_{growth} is the ratio of IC₅₀ values for growth inhibition against L6 cells to those against intracellular *T. cruzi* amastigotes.

^b Values to be reported elsewhere (Cammerer et al., unpublished).

^c Values for inhibition of amastigote growth as reported by Urbina et al. (24).

^d ND, not determined.

soluble protein when expressed in *E. coli* (12). The production of an active human enzyme was attained after truncation of both the carboxy (47 amino acids) and the amino terminus (30 amino acids) (31 to 371) that yielded a soluble protein with catalytic properties similar to the native enzyme (21). In the present study we generated a soluble enzyme by elimination of 24 amino acids of the amino terminus and 36 amino acids of the carboxyl terminus. The kinetic parameters were compared to those previously reported for preparations of *T. cruzi* glycosomal and microsomal SQS (25) and other recombinant enzymes. The resulting enzyme proved to be catalytically active and exhibited kinetic parameters highly similar to those obtained with the native enzyme in purified glycosomes and mitochondria from *T. cruzi* epimastigotes (25), albeit the K_m for FPP was slightly higher. Likewise, the K_m and k_{cat} values were

highly similar to those obtained for the truncated recombinant enzyme from yeast (12).

The first indication of the antitrypanosomal activity of SQS inhibitors came from studies by Urbina et al. with 3-(biphenyl-4-yl)-3-hydroxyquinuclidine (BPQ-OH), a potent and specific inhibitor of mammalian SQS (25). It was found that BPQ-OH induced a dose-dependent reduction of the proliferation of extracellular stages (epimastigotes) of these parasites with MICs of 30 μM. Growth inhibition and cell lysis induced by BPQ-OH in both parasites was associated with complete depletion of endogenous squalene and sterols. BPQ-OH was able to eradicate intracellular *T. cruzi* amastigotes from Vero cells with an MIC of 30 μM, with no deleterious effects on host cells at up to 100 μM.

Several other analogues have been tested for activity against the *L. major* enzyme and the parasite in vitro (16). An analog

of BPO-OH, where the 3-OH group has been removed by dehydration, leaving a $\Delta^{2(3)}$ bond, was clearly more potent than BPO-OH, since cell lysis was observed in the presence of 1 μ M in *L. mexicana* promastigotes and exhibited an IC_{50} for recombinant SQS from *L. major* of 0.24 μ M (16).

Recent studies (24) with the compounds E5700 and ER-119884 (Eisai Chemical Company, Tokyo, Japan) showed that they were very potent noncompetitive or mixed-type inhibitors of native *T. cruzi* SQS with K_i values in the low nanomolar or subnanomolar range in the absence or presence of 20 μ M inorganic pyrophosphate. Their antiproliferative IC_{50} s against extracellular epimastigotes and intracellular amastigotes were ca. 10 nM and 0.4 to 1.6 nM, respectively, with no effects on host cells. These compounds are among the most potent anti-trypanosomals ever tested in vitro.

We now show that E5700 and ER-119884 are also highly potent inhibitors of purified recombinant *T. cruzi* SQS, but they have no selectivity toward the parasite's enzyme in comparative assays with the recombinant human enzyme. On the other hand, we have identified analogs such as compound 2, which is a good inhibitor of intracellular amastigote growth in vitro but also a selective inhibitor of *T. cruzi* SQS. Intracellular amastigotes are the clinically relevant form of the parasite. Compound 1 is also selective for the trypanosomal enzyme, although it was less active against the parasite in vitro. These observations offer a new approach for the design of SQS inhibitors with a potential application as antitrypanosomal compounds. Specific inhibitors of the *T. cruzi* enzyme would allow for increased efficacy and the minimization of possible adverse effects due to inhibition of human sterol biosynthesis. Studies are currently under way to determine the structural requirements for specific inhibition.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the EU INCO-DEV program (ICA4-2000-10028), the Spanish Plan Nacional (SAF2004-03828), the Junta de Andalucía CVI-199, and the Howard Hughes Medical Institute (grant 55000620 to M.S.-C. and J.A.U.) for financial support.

We thank Sofia Vargas for technical assistance and John F. Thompson (Pfizer) for kindly providing the expression system for human SQS.

REFERENCES

1. Biller, S. A., K. Neuenschwander, M. M. Ponnipom, and C. D. Poulter. 1996. Squalene synthase inhibitors. *Curr. Pharm. Design* 2:1–40.
2. Buckner, F. S., A. J. Wilson, and W. C. Van Voorhis. 1999. Detection of live *Trypanosoma cruzi* in tissues of infected mice by using histochemical stain for beta-galactosidase. *Infect. Immun.* 67:403–409.
3. de Andrade, A. L., F. Zicker, R. M. de Oliveira, S. Almeida Silva, A. Luquetti, L. R. Travassos, I. C. Almeida, S. S. de Andrade, J. G. de Andrade, and C. M. Martelli. 1996. Randomised trial of efficacy of benzimidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet* 348:1407–1413.
4. Devarenne, T. P., D. H. Shin, K. Back, S. Yin, and J. Chappell. 1998. Molecular characterization of tobacco squalene synthase and regulation in response to fungal elicitor. *Arch. Biochem. Biophys.* 349:205–215.
5. Docampo, R., and G. A. Schmunis. 1997. Sterol biosynthesis inhibitors: potential chemotherapeutics against Chagas disease. *Parasitol. Today* 13:129–130.
6. Fegueur, M., L. Richard, A. D. Charles, and F. Karst. 1991. Isolation and primary structure of the ERG9 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding squalene synthetase. *Curr. Genet.* 20:365–372.
7. Hanley, K. M., O. Nicolas, T. B. Donaldson, C. Smith-Monroy, G. W. Robinson, and G. M. Hellmann. 1996. Molecular cloning, in vitro expression and characterization of a plant squalene synthetase cDNA. *Plant Mol. Biol.* 30:1139–1151.
8. Hata, S., K. Sanmiya, H. Kouchi, M. Matsuoka, N. Yamamoto, and K. Izui. 1997. cDNA cloning of squalene synthase genes from mono- and dicotyledonous plants, and expression of the gene in rice. *Plant Cell Physiol.* 38:1409–1413.
9. Jennings, S. M., Y. H. Tsay, T. M. Fisch, and G. W. Robinson. 1991. Molecular cloning and characterization of the yeast gene for squalene synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:6038–6042.
10. Lee, J. H., Y. H. Yoon, H. Y. Kim, D. H. Shin, D. U. Kim, I. J. Lee, and K. U. Kim. 2002. Cloning and expression of squalene synthase cDNA from hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Mol. Cells* 13:436–443.
11. Lindsey, S., and H. J. Harwood, Jr. 1995. Inhibition of mammalian squalene synthetase activity by zaragozic acid A is a result of competitive inhibition followed by mechanism-based irreversible inactivation. *J. Biol. Chem.* 270:9083–9096.
12. LoGrasso, P. V., D. A. Soltis, and B. R. Boettcher. 1993. Overexpression, purification, and kinetic characterization of a carboxyl-terminal-truncated yeast squalene synthetase. *Arch. Biochem. Biophys.* 307:193–199.
13. McKenzie, T. L., G. Jiang, J. R. Straubhaar, D. G. Conrad, and I. Shechter. 1992. Molecular cloning, expression, and characterization of the cDNA for the rat hepatic squalene synthase. *J. Biol. Chem.* 267:21368–21374.
14. McTaggart, F., G. R. Brown, R. G. Davidson, S. Freeman, G. A. Holdgate, K. B. Mallion, D. J. Mirrlees, G. J. Smith, and W. H. Ward. 1996. Inhibition of squalene synthase of rat liver by novel 3' substituted quinuclidines. *Biochem. Pharmacol.* 51:1477–1487.
15. Nakashima, T., T. Inoue, A. Oka, T. Nishino, T. Osumi, and S. Hata. 1995. Cloning, expression, and characterization of cDNAs encoding *Arabidopsis thaliana* squalene synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:2328–2332.
16. Orenes Lorente, S., R. Gomez, C. Jimenez, S. Cammerer, V. Yardley, K. de Luca-Fradley, S. L. Croft, L. M. Ruiz Perez, J. Urbina, D. Gonzalez Pacanowska, and I. H. Gilbert. 2005. Biphenylquinuclidines as inhibitors of squalene synthase and growth of parasitic protozoa. *Bioorg. Med. Chem.* 13:3519–3529.
17. Pandit, J., D. E. Danley, G. K. Schulte, S. Mazzalupo, T. A. Pauly, C. M. Hayward, E. S. Hamanaka, J. F. Thompson, and H. J. Harwood, Jr. 2000. Crystal structure of human squalene synthase. A key enzyme in cholesterol biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 275:30610–30617.
18. Shechter, I., E. Klinger, M. L. Rucker, R. G. Engstrom, J. A. Spirito, M. A. Islam, B. R. Boettcher, and D. B. Weinstein. 1992. Solubilization, purification, and characterization of a truncated form of rat hepatic squalene synthetase. *J. Biol. Chem.* 267:8628–8635.
19. Soltis, D. A., G. McMahon, S. L. Caplan, D. A. Dudas, H. A. Chamberlin, A. Vattay, D. Dottavio, M. L. Rucker, R. G. Engstrom, S. A. Cornell-Kennon, et al. 1995. Expression, purification, and characterization of the human squalene synthase: use of yeast and baculoviral systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 316:713–723.
20. Tanowitz, H. B., L. V. Kirchhoff, D. Simon, S. A. Morris, L. M. Weiss, and M. Wittner. 1992. Chagas' disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 5:400–419.
21. Thompson, J. F., D. E. Danley, S. Mazzalupo, P. M. Milos, M. E. Lira, and H. J. Harwood, Jr. 1998. Truncation of human squalene synthase yields active, crystallizable protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 350:283–290.
22. Urbina, J. A. 2002. Chemotherapy of Chagas disease. *Curr. Pharm. Des.* 8:287–295.
23. Urbina, J. A. 2003. World class parasites, vol. American trypanosomiasis. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA.
24. Urbina, J. A., J. L. Concepcion, A. Caldera, G. Payares, C. Sanoja, T. Otomo, and H. Hiyoshi. 2004. In vitro and in vivo activities of E5700 and ER-119884, two novel orally active squalene synthase inhibitors, against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:2379–2387.
25. Urbina, J. A., J. L. Concepcion, S. Rangel, G. Visbal, and R. Lira. 2002. Squalene synthase as a chemotherapeutic target in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 125:35–45.
26. Urbina, J. A., and R. Docampo. 2003. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.* 19:495–501.
27. WHO. 2002. The world health report. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
28. Zhang, D., S. M. Jennings, G. W. Robinson, and C. D. Poulter. 1993. Yeast squalene synthase: expression, purification, and characterization of soluble recombinant enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 304:133–143.

ANEXO I

RESULTADOS Y PUBLICACIONES RECOGIDAS EN EL PROYECTO DE TESIS DOCTORAL

II. Nuevos azasteroles frente a *Trypanosoma brucei*: el papel de la 24-esterol metiltransferasa en el mecanismo de acción de inhibidores**Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50(8):2595-2601. 200**

En este trabajo en colaboración se ha estudiado el papel de la enzima 24-esterol metiltransferasa de *Trypanosoma brucei* y el mecanismo de acción de los azasteroles. Para ello se sintetizaron un grupo de azasteroles que resultaron poseer una potente actividad del orden de nM *in vitro* frente a cultivos de las formas sanguíneas de *T. b. rhodesiense*. Sin embargo, estos azasteroles no eran activos frente a la enzima recombinante 24-esterol metiltransferasa de *Trypanosoma brucei*. Estudios de la composición lipídica de las formas sanguíneas y procíclicas de *Trypanosoma brucei* revelaron que las membranas de formas sanguíneas del parásito poseen mayoritariamente esteroides de tipo colestano mientras que la de los procíclicos poseen esteroides de tipo ergostano. Estudios de northern y western blot evidenciaron la presencia de la enzima en ambas formas del parásito, sin embargo, la expresión en los sanguíneos es tres veces menor. Con las evidencias presentadas en este artículo concluimos que la citotoxicidad de los azasteroles sintetizados se debe a que actúan en lugares distintos a la 24-esterol metiltransferasa de *Trypanosoma brucei*.

New Azasterols against *Trypanosoma brucei*: Role of 24-Sterol Methyltransferase in Inhibitor Action

Ludovic Gros,¹ Victor Manuel Castillo-Acosta,² Carmen Jiménez Jiménez,² Marco Sealey-Cardona,² Sofia Vargas,² Antonio Manuel Estévez,² Vanessa Yardley,³ Lauren Rattray,³ Simon L. Croft,³ Luis M. Ruiz-Perez,² Julio A. Urbina,⁴ Ian H. Gilbert,¹ and Dolores González-Pacanowska^{2*}

Welsh School of Pharmacy, Cardiff University, Redwood Building, King Edward VII Avenue, Cardiff CF10 3XF, United Kingdom¹; Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain²; Department of Infectious and Tropical Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine, Keppel Street, London WC1E 7HT, United Kingdom³; and Laboratorio de Química Biológica, Centro de Bioquímica y Biofísica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Altos de Pipe, Km. 11, Carretera Panamericana, Caracas 1020, Venezuela⁴

Received 23 November 2005/Returned for modification 3 January 2006/Accepted 5 May 2006

A series of azasterol derivatives, designed as potential inhibitors of the Δ^{24} -sterol methyltransferase enzyme (24-SMT), were synthesized and evaluated for their activities against parasitic protozoa. Values in the nanomolar range were obtained for 50% effective dose against the *Trypanosoma brucei* subsp. *rhodesiense* bloodstream form cultured in vitro. In order to investigate the mode of action, *Trypanosoma brucei* subsp. *brucei* 24-SMT was cloned and overexpressed and compounds were assayed for inhibitory activity. None of the inhibitors tested appeared to be active against the enzyme. Sterol composition analysis showed that only cholestane type sterols are present in membranes of bloodstream forms while ergosterol is a major component of procyclic sterol extracts. Interestingly, Northern blot analysis showed the presence of 24-SMT mRNA in both the procyclic and the bloodstream forms of the parasite, although levels of mRNA were threefold lower in the latter. Likewise, Western blot analysis and activity determinations evidenced the existence of active enzyme in both forms of the parasite. We conclude that the designed compounds act at sites other than 24-SMT in *Trypanosoma brucei*.

Diseases caused by parasitic protozoa affect many people in large areas of the world (24). Among diseases caused by the protozoa of the Trypanosomatidae family, Chagas' disease (American trypanosomiasis), sleeping sickness (human African trypanosomiasis), and leishmaniasis are of importance. The cure of these diseases depends largely on chemotherapy (4). Although several antiparasitic drugs are available, toxic side effects and development of drug resistance are often associated with them. Therefore, new, effective drugs have to be found.

The sterol biosynthetic pathway presents opportunities for the design of anti-infective agents (1, 15, 19). Ergosterol and 24-alkylated sterols are major components in the cell membranes of fungi and plants and also of *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi*. This contrasts to the situation in mammalian cells, where cholesterol is the principle steroid found. In the case of *Trypanosoma brucei*, the procyclic form of the parasite has been reported to biosynthesize ergosterol and other 24-alkylated sterols (2, 3), while in the bloodstream form (BSF), the parasite is reported to scavenge cholesterol from the host with uptake from LDL receptors. These differences in sterol metabolism between the parasites and mammalian cells are clearly important and could be exploited as an antiparasitic drug target.

Biosynthesis of ergosterol and related sterols requires alkyl-

ation of the 24 position of the side chain, a step not found in cholesterol biosynthesis. This step is catalyzed by *S*-adenosyl-L-methionine: Δ^{24} -sterol methyltransferase (24-SMT), which is a key difference between cholesterol and ergosterol biosynthesis. Azasterols have been shown to cause inhibition of 24-SMT; examples are given in references 10, 11, 13, 16, 20, and 22. The supposed mechanism of action of 24-SMT (18) goes through a carbocationic intermediate which could be mimicked by azasterols protonated at physiological pH (10). However, some azasterols have also been reported to inhibit the sterol 24-reductase, an enzyme involved in biosynthesis of cholesterol. This latter effect leads to a buildup of steroid precursors to toxic concentrations (17).

Previously, we (9, 16, 21–23) and others (5) reported the activity of 22,26-azasterol (AZA) (Fig. 1) as an agent against *Leishmania* and *T. cruzi*. AZA was found to be active against both promastigote/epimastigote and intracellular amastigote forms of the parasites and has been shown to give parasitological cure in a rodent model of Chagas' disease (21). Encouraged by those findings, we decided to extend the range of azasterols; some of these compounds were active against bloodstream form *Trypanosoma brucei* subsp. *rhodesiense*, the causative organism of human African trypanosomiasis (7, 8). In the present paper, we report some new analogues, their biological evaluation, and studies on their mode of action.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Chemicals, reagents, and solvents were purchased from Aldrich, Sigma, Lancaster, Merck, Fisher, or Steraloids and employed without further purification, unless otherwise stated. Genomic DNA from the *Trypanosoma*

* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avda. del Conocimiento s/n, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, 18100 Armilla, Granada, Spain. Phone: 34 958 181621. Fax: 34 958 181633. E-mail: dgonzalez@ipb.csic.es.

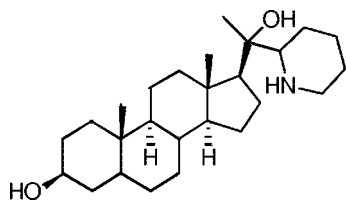


FIG. 1. Structure of 22,26-azasterol (AZA).

brucei subsp. *brucei* 427 strain was used for 24-SMT cloning. Fetal calf serum was obtained from Gibco. *Trypanosoma brucei* subsp. *rhodesiense* STIB900 and *Trypanosoma brucei* subsp. *brucei* 427 were used in growth inhibition assays.

Inhibitor synthesis. Nuclear magnetic resonance spectra were obtained with a Bruker Avance DPX 300-MHz spectrometer at 300 MHz for ^1H and 75 MHz for ^{13}C . Mass spectra and exact mass measurements were performed on a Waters ZQ4000 and a Finnigan MAT 95XP, respectively. Precoated Merck silica gel F254 plates were used for thin-layer chromatography, and spots were examined with phosphomolybdic acid (0.5% in ethanol) solution. Column chromatography was performed on silica gel 60 (0.035 to 0.070 mm). The ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectra allowed the characterization of all purified intermediates in the synthesis and final products. The full synthetic details are described elsewhere (4a).

Growth inhibition of *Trypanosoma brucei* subsp. *rhodesiense* and *Trypanosoma brucei* subsp. *brucei*. *Trypanosoma brucei* subsp. *rhodesiense* STIB900 BSF trypanomastigotes were maintained in HMI-18 medium (6) with 15% heat-inactivated fetal calf serum (Harlan-SeraLab, United Kingdom) at 37°C in a 5% CO_2 -95% air mixture. Trypomastigotes were washed and resuspended in fresh medium at a concentration of $2 \times 10^5/\text{ml}$. The top concentration for the test compounds was 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Five different concentrations of drug were tested in triplicate. The 50% effective dose (ED_{50}) for pentamidine was usually between 1.0 and 0.1 ng/ml. Plates were incubated for 72 h at 37°C in a 5% CO_2 -95% air mixture. At 72 h, the plates were assessed microscopically before alamarBlue was added (14). Plates were read after 5 to 6 h on a Gemini Fluorescent plate reader (Softmax Pro. 3.1.1, Molecular Devices, United Kingdom) at an excitation/emission of 530/585 nm, with a filter cutoff at 550 nm. ED_{50} values were calculated with MxS/fit (IDBS, United Kingdom). For studies with *Trypanosoma brucei* subsp. *brucei* bloodstream forms, trypanomastigotes were maintained in HMI-9 medium with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Gibco) at 37°C in a 5% CO_2 -95% air mixture. The HMI-9 medium was supplemented with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of ergosterol, which was dissolved in dimethyl sulfoxide. Procyclic forms were grown in SDM-79 with 10% heat-inactivated fetal calf serum at 27°C.

Cytotoxicity. Plates were seeded with 100 μl human epidermal nasopharyngeal carcinoma KB cells at $4 \times 10^4/\text{ml}$ and RPMI 1640 plus 10% heat-inactivated fetal calf serum and incubated at 37°C in 5% CO_2 -95% air for 24 h. The overlay was removed and replaced by the drugs to be tested in fresh medium at 300, 30, 3, and 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in triplicate at each concentration. The positive-control drug was podophyllotoxin (Sigma, United Kingdom). Plates were incubated for a further 72 h, at 37°C in 5% CO_2 -95% air. The wells were microscopically assessed for cell growth. The overlay was removed and wells washed three times with phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.0). Then, 100 μl PBS plus 10 μl alamarBlue was added per well and plates incubated for 2 to 4 h (37°C, 5% CO_2 -95% air) before reading at an excitation/emission of 530/585 nm (cutoff, 550 nm) in a Gemini plate reader. ED_{50} values were calculated compared to blanks and untreated controls.

Bacterial strains and growth conditions. *Escherichia coli* BL21(DE3) bacteria were grown in Luria-Bertani (LB) medium supplemented with the following antibiotics, when needed, at the indicated concentrations: ampicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$; chloramphenicol, 34 $\mu\text{g}/\text{ml}$; and kanamycin, 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Plasmid preparation, agarose gel electrophoresis DNA ligation, transformation, and other cloning procedures were done by standard methods.

***T. brucei* subsp. *brucei* 24-SMT cloning and overexpression.** The *Trypanosoma brucei* subsp. *brucei* 24-SMT gene (GenBank accession number DQ126002) was cloned by PCR using genomic DNA as a template. The oligonucleotide primers used for PCR amplification were synthesized by the Technical Services department of the Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra. Restriction sites (NdeI and BamHI) were introduced at the 5' and 3' ends for convenient cloning. The primers used were the N-terminal primer GGAATTCATATGT CGGCCGATCTCGT and the C-terminal primer CGGGATCCTTAGCACG ACAGCTCTTCCCC. The entire coding sequence was cloned in pET28a(+) to give pET28TbSMT, and the resulting construct was used to transform *E. coli*

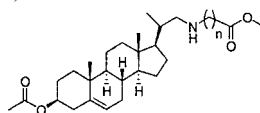
BL21(DE3) cells, which were plated on LB agar plates containing 34 μg of kanamycin per ml.

Enzyme activity assays. In assays of inhibition of 24-SMT, soluble protein extracts from *E. coli* BL21(DE3)/pET28TbSMT cells were used. *Trypanosoma brucei* subsp. *brucei* recombinant 24-SMT is produced as a His-tagged fusion protein and is overexpressed when induced with 1 mM IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) for 4 h. Cells were disrupted by sonication in a buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2 mM MgCl_2 , 4 mM CHAPS {3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate}, 0.5% (vol/vol) Tween 80, and protease inhibitors. The sonicate was centrifuged at 12,000 rpm for 30 min at 4°C to obtain the soluble fraction, which contained the active form of the enzyme. When parasite extracts were analyzed, bloodstream forms were collected at 2×10^6 cells per ml, while procyclic forms were collected at 7.5×10^6 cells per ml. Cultures were centrifuged at 2,600 rpm for 10 min at 4°C; parasites were washed twice with PBS (pH 7.2) and lysed by sonication in the same buffer as that used for bacterial cells. Total extracts obtained after sonication were used in the enzymatic assay. A standard 24-SMT activity assay contained 1.7 mg/ml of bacterial soluble extracts or 3.3 mg/ml of parasitic total extracts in buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2 mM MgCl_2 , 4 mM CHAPS, 0.5% (vol/vol) Tween 80, 100 μM desmosterol, and 200 μM [^{14}C]S-adenosyl-L-methionine (6×10^5 dpm or 1×10^6 dpm per reaction). Desmosterol was dissolved in chloroform, which was evaporated before the rest of the components were added. The inhibitor was resuspended first in a minimal volume of its corresponding solvent and later added to the reaction mixture as an aqueous solution. The reaction was started with the enzyme. Incubations were performed at 30°C for 45 min and terminated with 0.5 ml of 10% KOH dissolved in 80% (vol/vol) methanol. To quantify the efficiency of the extraction, [^3H]cholesterol (3 mg, 30,000 dpm per reaction) was added as an internal standard. The methylated sterol product was extracted three times with 1 ml of hexane and the resulting organic layer washed once with Tris-HCl buffer to remove the [^{14}C]S-adenosyl-L-methionine that was not incorporated. One milliliter of the organic layer was added to 10 ml of hydrofluor (National Diagnostics), and the radioactivity was measured in a scintillation counter. Values for 50% inhibitory concentration (IC_{50}) were obtained from hyperbolic plots of percentage of inhibition versus concentration of inhibitor.

Northern blot analysis. Total RNA from both procyclic and bloodstream forms was obtained using the TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Total RNA (15 $\mu\text{g}/\text{lane}$) was fractionated by electrophoresis on a 1.5% formaldehyde agarose gel under denaturing conditions and transferred overnight to a nylon membrane (Hybond-N; Amersham Life Sciences, Inc.). The membrane was subjected to overnight hybridization of a ^{32}P -radiolabeled, single-stranded DNA 24-SMT probe. The probe was obtained by PCR amplification under the same conditions and using the same primers as those described above. The obtained PCR product was added to the hybridization buffer at a final concentration of 10^6 cpm/ml. After hybridization, the membrane was washed and analyzed using X-OMATAR film (Kodak).

Western blot analysis. For the preparation of *T. brucei* lysates, the parasites were washed twice in PBS (pH 7.2) and lysed by sonication in the same buffer supplemented with protease inhibitors. Twenty-one micrograms of protein from total extract was subjected to 12.5% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and blotted onto an Immobilon-P membrane (Millipore) at 10 V for 30 min, using a semidry transfer sell (Bio-Rad). The membrane was blocked overnight at 4°C with 5% (wt/vol) nonfat powdered milk in PBS and incubated with a 1:2,500 dilution of a polyclonal antibody generated against purified recombinant *Leishmania major* SMT from *E. coli* inclusion bodies and purified by chromatography through a protein A Sepharose CL-4B column (Amersham biosciences) according to the manufacturer's instructions. As a secondary antibody, horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit immunoglobulin G diluted 1:5,000 was used. Bound antibody was visualized using enhanced-chemiluminescence immunodetection reagents (Amersham).

Studies of lipid composition. For the analysis of the lipid composition in *T. brucei* subsp. *brucei*, total lipids of bloodstream forms and procyclic forms were extracted and fractionated into neutral and polar lipid fractions by silicic acid column chromatography and gas-liquid chromatography (8, 9). The neutral lipid fractions were first analyzed by thin-layer chromatography (on Merck 5721 silica gel plates with heptane-isopropyl ether-glacial acetic acid [60:40:4] as the developing solvent) and conventional gas-liquid chromatography (isothermic separation in a 4-m glass column packed with 3% OV-1 on Chromosorb 100/200 mesh, with nitrogen as the carrier gas at 24 ml/min $^{-1}$, and flame ionization detection in a Varian 3700 gas chromatograph). For quantitative analysis and structural assignments, the neutral lipids were separated in a capillary high-resolution Ultra-2 column (25 m by 0.20 mm [inner diameter]; 5% phenyl-methyl-siloxane; film thickness, 0.33 μm) in a Hewlett-Packard 6890 series II gas chromatograph equipped with an HP5973A mass-sensitive detector. The lipids were injected in chloroform, and the column was kept at 50°C for 1 min, and then the temper-

TABLE 1. Activities of azasterol compounds against recombinant *L. major* 24-SMT, *T. brucei* subsp. *brucei* 24-SMT, 24-SMT from *T. brucei* subsp. *brucei* parasite extracts, and bloodstream forms of *T. brucei* subsp. *rhodesiense*^a

Inhibitor	No. of carbon atoms	<i>L. major</i> 24-SMT IC ₅₀ (μM)	<i>T. brucei</i> subsp. <i>brucei</i> 24-SMT IC ₅₀ (μM) ^b	<i>T. brucei</i> subsp. <i>rhodesiense</i> ED ₅₀ (μM) (95% CI)	KB cells ED ₅₀ (μM)	SI
1a	1	>100	>100 (ND)	7.85 (5.5–11.1)	94.47	12
1b	2	>100	>100 (ND)	0.302 (0.0035–25.5)	17.40	58
1c	3	>100	>100 (ND)	0.012 (0.004–0.032)	19.21	1,600
1d	4	>100	>100 (ND)	0.032 (0.0214–0.0468)	11.28	352
1e	5	>100	>100 (ND)	0.033 (0.0237–0.0546)	15.55	471
1f	6	>100	>100 (>100)	0.025 (0.0214–0.0293)	11.25	450
1g	7	>100	>100 (>100)	0.098 (0.065–0.148)	10.00	102
AZA		0.028	1.76 (2.43)	3.3 (3.02–3.59)	11.9	3.6

^a CI, confidence interval; SI, selectivity index.

^b Values in parentheses are for 24-SMT from *T. brucei* subsp. *brucei* extracts. ND, not determined.

ature was increased to 270°C at a rate of 25°C · min⁻¹ and finally to 300°C at a rate of 1°C · min⁻¹. The carrier gas (He) flow was kept constant at 0.5 ml · min⁻¹. The injector temperature was 250°C, and the detector was kept at 280°C.

RESULTS

Inhibitor synthesis and evaluation of action on parasite growth. The inhibitors, 1a to 1g, were synthesized by standard methods using a convergent strategy (Table 1). The full details of this strategy will be published separately.

In vitro growth assays were carried out using the clinically relevant BSF of *T. brucei* subsp. *rhodesiense* and against mammalian KB cells to give an idea of toxicity in mammalian cells (Table 1). All compounds analyzed showed potent growth inhibition of *T. brucei* subsp. *rhodesiense*, with the most active compound having an ED₅₀ of 12 nM. There appeared to be an optimum chain length; growth inhibition increased as chain length increased, with an optimum chain length of three carbon atoms. When chain length was further increased, activity slowly decreased. The compounds showed greater activity against *T. brucei* subsp. *rhodesiense* than the lead compound, AZA, which had an ED₅₀ of 3.3 μM. The growth inhibition of KB cells was significantly lower than that of *T. brucei* subsp. *rhodesiense*, implying that there is a good selectivity for parasite cells over mammalian cells. There appeared to be a slight increase in toxicity as chain length was increased; notwithstanding, compounds appeared to have lower toxicity than the lead compound, AZA. The compound with a chain length of three carbon atoms shows the greatest selectivity index, about 1,600-fold more active against the parasite, and all of these new analogues showed greater selectivity than AZA.

An analysis of growth inhibition was also performed in the presence of ergosterol in the culture medium in order to evaluate whether the availability of alkylated sterols would counteract the effect of potential 24-SMT inhibition. The resulting inhibition data are shown in Table 2. *T. brucei* subsp. *brucei* BSFs were cultured for 72 h in the presence of different concentrations of compounds 1e and 1f, and ED₅₀ values were calculated as described above. The selected compounds were not active against procyclic forms at concentrations as high as 1 μM. In the case of BSFs, ergosterol in the medium had no

effect on the resulting ED₅₀, which was somewhat higher than the value obtained for *T. brucei* subsp. *rhodesiense* BSFs.

Cloning and overexpression of *T. brucei* subsp. *brucei* 24-SMT. The 24-SMT sequence, exhibiting high similarity with the coding sequence from *Leishmania major*, was identified in chromosome 10 of the *Trypanosoma brucei* subsp. *brucei* genome. The sequence gives a deduced amino acid sequence of 359 residues and a pI of 5.2. The *T. brucei* subsp. *brucei* amino acid sequence exhibits a 62% identity with the *L. major* enzyme, and all of the highly conserved motifs characteristic of 24-SMTs are conserved, including the *S*-adenosyl-L-methionine and sterol binding sites (motifs II and I, respectively). Efforts to produce recombinant protein were successful when the entire coding region was placed in pET28a and the enzyme was produced with a His tag at the amino terminus. 24-SMT accounted for 1% of the total soluble protein, while high quantities were generated as inclusion bodies, accounting for 25% of the total protein in *E. coli* extracts (Fig. 2). Soluble active protein proved to be extremely unstable under different experimental conditions when immobilized-metal-affinity chromatography was attempted. We therefore decided to use *E. coli* BL21(DE3)/pET28TbSMT extracts for enzyme determinations.

Inhibition of *T. brucei* subsp. *brucei* 24-SMT by azasterols. Compounds were then assayed against *T. brucei* subsp. *brucei* 24-SMT. The assays were conducted using the freshly prepared whole-cell extracts of *E. coli* overexpressing recombinant 24-

TABLE 2. Effects of ergosterol on the growth inhibition of procyclic forms and BSFs from *T. brucei* subsp. *brucei* by azasterols^a

Inhibitor	ED ₅₀ value (μM) for:			
	Procyclic forms with no addition	Procyclic forms + 1 μg/ml ergosterol	BSFs with no addition	BSFs + 1 μg/ml ergosterol
1e	>1	>1	0.127 ± 0.044	0.101 ± 0.022
1f	>1	>1	0.080 ± 0.032	0.118 ± 0.057

^a Values are the averages ± standard deviations obtained from five different drug concentrations assayed in triplicate.

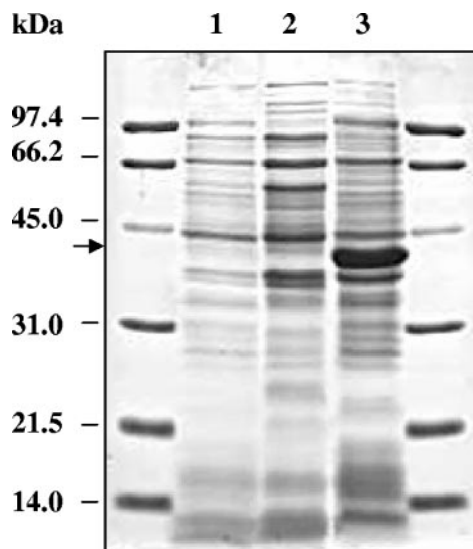


FIG. 2. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis analysis of 24-SMT expression in *Escherichia coli* BL21(DE3)/pET28TbSMT cells. Lane 1, 25 µg of soluble extract of cells prior to induction with IPTG; lane 2, 25 µg of soluble extract after 4 h of induction with 1 mM IPTG at 25°C for 4 h; lane 3, 25 µg of the insoluble fraction of cells after 4 h of induction with 1 mM IPTG at 25°C for 4 h.

SMT, due to the difficulty in producing large quantities of soluble active enzyme, in a method similar to what we have reported for assays of *L. major* 24-SMT (9). A range of six concentrations of inhibitor was tested in duplicate. AZA was assayed against both the *T. brucei* subsp. *brucei* and the *L. major* enzymes, as a reference compound; the IC_{50} found against recombinant *T. brucei* subsp. *brucei* 24-SMT was 1.76 µM. This value was higher than what we have reported for *L. major* 24-SMT (0.028 µM), indicating that despite high similarities in sequence between the *L. major* and *T. brucei* subsp. *brucei* sequences, subtle differences in the active site may exist, leading to different IC_{50} values.

The newly synthesized azasterols were then evaluated using cell extracts of the recombinant *T. brucei* subsp. *brucei* 24-SMT, and IC_{50} values obtained are shown in Table 1. None of the compounds tested showed any significant inhibition, and IC_{50} values were estimated to all be higher than 100 µM.

Considering the possibility that the His-tagged recombinant enzyme might exhibit properties different from those of the native enzyme present in parasite extracts, procyclic cells were used for extract preparation and analyzed for inhibition on behalf of two of the compounds previously tested against the recombinant enzyme. In addition, the reference compound AZA was evaluated for inhibition against 24-SMT from parasite extracts. Compounds 1f and 1g gave inhibition percentages of 35 and 29%, respectively, when tested against the 24-SMT present in extracts at a concentration of 100 µM (IC_{50} values higher than 100 µM), while the IC_{50} value obtained for AZA was 2.43 µM under the same conditions.

Northern and Western blot analyses of 24-SMT expression in procyclic forms and BSFs. While growth inhibition assays *in vitro* clearly showed that the novel azasterols were particularly potent against *T. brucei* subsp. *brucei*, surprisingly, none of

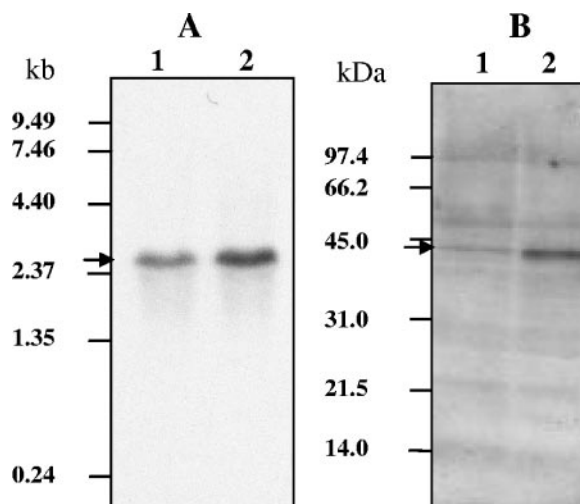


FIG. 3. (A) Northern analysis of *Trypanosoma brucei* subsp. *brucei* 24-SMT gene expression. Total RNA was prepared from both procyclic and BSFs. The Northern blot was hybridized with a probe encompassing the entire coding sequence of *T. brucei* subsp. *brucei* 24-SMT. (B) Western blot analysis of SMT protein levels in *T. brucei* subsp. *brucei*. Polyclonal serum raised against *Leishmania major* 24-SMT was used. Lane 1, bloodstream forms; lane 2, procyclic forms.

them showed significant activity against *T. brucei* subsp. *brucei* 24-SMT. It has been reported that bloodstream forms of *T. brucei* subsp. *brucei* do not synthesize sterols (2, 3) and that their cellular requirements are satisfied by the uptake of cholesterol for the culture media via a mechanism that involves an LDL receptor. We decided to investigate further the existence of 24-SMT activity in BSFs by Northern and Western blot analyses. Logarithmic-phase procyclic forms and BSFs were used for total RNA extraction, and the coding sequence of the

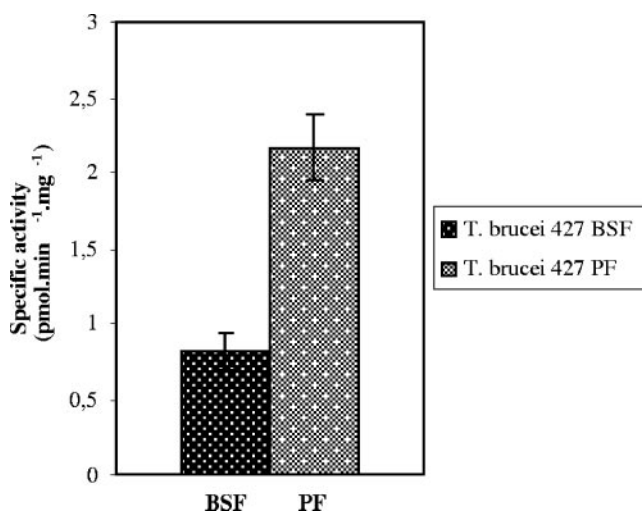
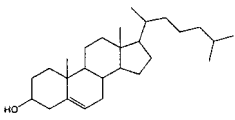
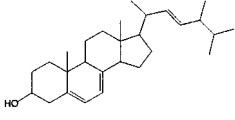
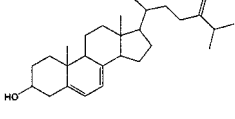
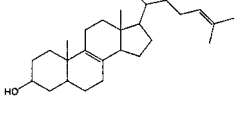
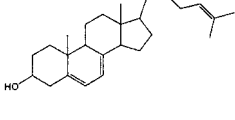
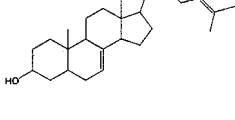


FIG. 4. Determination of 24-SMT activity in parasite extracts. 24-SMT activity measurements were performed at 200 µM [¹⁴C]-adenosyl-L-methionine (8.33 dpm/pmol) and 100 µM desmosterol as indicated in Materials and Methods. Results are the averages of the values for specific activity obtained for three different protein extract concentrations, and assays were performed in triplicate. BSF, bloodstream forms; PF, procyclic forms.

TABLE 3. Free sterol composition of bloodstream and procyclic forms of *T. b. brucei*^a

Compound	Molecular structure	Retention time (min)	% of mass for:	
			Bloodstream forms	Procyclic forms
Exogenous				
Cholesterol		22.3	>99	60.2
Endogenous, 14 desmethyl				
Ergosta-5,7,22-dien-3 β -ol (ergosterol)		25.3	ND	14.3
Ergosta-5,7,24(24 ¹)-trien-3 β -ol (5-dehydroepisterol)		27.1	ND	3.8
Cholesta-8,24-dien-3 β -ol (zymosterol)		23.4	ND	3.2
Cholesta-5,7,24-trien-3 β -ol		23.9	ND	15.1
Cholesta-7,24-dien-3 β -ol		24.3	ND	3.4

^a Sterols were extracted from cells in cultivated in vitro to late exponential growth phase; they were separated from polar lipids by silicic acid column chromatography and analyzed by quantitative capillary gas-liquid chromatography and mass spectrometry. Composition is expressed as mass percentages. ND, not detected.

24-SMT gene was used as a probe. As shown in Fig. 3A, a single transcript of 2.6 kb was observed in both forms. Densitometric analysis illustrated that approximately threefold-higher levels are present in procyclic forms.

Western blot analysis was performed using an antibody raised against *L. major* 24-SMT and is shown in Fig. 3B. Again, a band of the expected molecular mass was evidenced in both procyclic and BSFs, although levels were approximately threefold higher in procyclic forms as determined densitometrically. Furthermore, protein detected by Western blot analysis corresponds to active protein. As shown in Fig. 4, the conversion of desmosterol to methylsterols by extracts of both life forms of *T. brucei* was detectable and measurable. Thus, the specific activities of 24-SMT were 2.17 and 0.82 pmol \cdot min⁻¹ \cdot mg⁻¹ in procyclic forms and BSFs, respectively.

Sterol composition. The sterol compositions of *T. brucei* subsp. *brucei* BSFs and procyclic forms were investigated. Table 3 shows that in procyclic forms, 60.2% of the mass of the sterol composition is represented by cholesterol, the rest being sterols alkylated

in position 24, with ergosterol accounting for 14.3% of the total sterol mass. On the other hand, in BSFs, cholesterol accounts for more than 99% of the total sterol mass and no 24-alkylated sterols were detected.

DISCUSSION

All of the compounds described in the present report were active in vitro against *T. brucei* subsp. *rhodesiense*. In particular, compounds 1b to 1g showed antiproliferative effects in the nanomolar range against BSFs of *T. brucei* subsp. *rhodesiense*. Compound 1c appeared to be the most active, with an ED₅₀ of 12 nM. Consequently, these compounds represent exciting leads for the development of new chemotherapeutic agents for the treatment of human African trypanosomiasis, yet their mode of action now appears to be independent of 24-SMT activity.

The potent activity observed for certain compounds with bloodstream forms of the parasite was somewhat surprising

since it has been well documented that *Trypanosoma brucei* BSFs lack the ability to synthesize sterols and depend on the presence in the culture medium of plasma low-density lipoprotein particles, which are necessary for membrane assembly (2, 3). Conversely, procyclic forms may obtain sterols from both exogenous and endogenous sources, although in this case, the two pathways can compensate for each other as incorporation of exogenous lipid downregulates the isoprenoid biosynthetic machinery. Indeed, no growth inhibition was observed for this form of the parasite for a subset of the compounds tested. We were therefore interested in investigating the mode of action of these compounds and the role of 24-SMT in parasite viability.

Northern and Western blot analyses clearly indicated that the 24-SMT gene was transcribed and translated in both bloodstream and procyclic forms of *T. brucei* subsp. *brucei*, yet levels of enzyme were approximately threefold higher in procyclic forms. Having established that the 24-SMT was present, it was important to show that it was functional; this was achieved by carrying out enzyme assays with radiolabeled desmosterol and showing that it was converted to methylsterols. Again, enzyme activity in procyclic forms was approximately threefold higher than that measured in BSFs. Previous results obtained by Coppens and Courtoy (2, 3) together with our own analysis of the sterol composition of procyclic and bloodstream form *T. brucei* subsp. *brucei* showed that 24-alkylated sterols are present in the former but absent in the latter. An explanation for a functional 24-SMT in bloodstream forms of *T. brucei* subsp. *brucei* may be that a low level of biosynthesis of 24-alkylated sterols is required for a sparking role, as suggested for the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (12), or alternatively that although this enzyme is still expressed at low levels, carbon flow leading to sterol production is undetectable.

Due to previous observations on the efficacy of azasterols as antitrypanosomal agents, compounds were developed as inhibitors of 24-SMT and we accordingly decided to analyze the interaction of inhibitors with the *T. brucei* enzyme. As found with the *L. major* enzyme, the purified protein has poor aqueous solubility and was difficult to purify on a large scale. However, it was possible to clone and overexpress the enzyme in *E. coli* cells and screen compounds against the enzyme using whole-cell extracts. None of the novel azasterol derivatives were active against the enzyme, suggesting that their primary mode of trypanocidal activity was not inhibition of 24-SMT or depletion of 24 alkyl sterols. Additionally, two compounds were selected to analyze inhibition of the native 24-SMT using procyclic parasite extracts as an enzyme source. Again, no significant inhibition was observed, ruling out possible differences in inhibitor susceptibility that may arise as a result of heterologous expression in *E. coli*.

The mode of action of this set of analogues remains to be established and is currently under investigation, although certain hypotheses may be set forth. One possibility is the existence of alternative extracellular or intracellular protein targets to which the sterol analogue specifically binds, and in this sense, certain structural requirements would exist for efficient binding. Other possibilities include the existence of specific membrane microdomains (25) where the analogues may be inserted and alter protein/membrane function. General toxic effects do not appear to exist at the concentrations tested, at least when ED₅₀ values for KB cells are analyzed, yet the

possibility of a wider-range toxic mode of action cannot be fully discarded. Proteomic studies as well as membrane function are currently under investigation for disclosure of possible molecular targets and mechanisms of action for this class of compounds. Likewise, further structure-activity relationship determinations could contribute to the understanding of requirements for inhibition and mode of action.

In conclusion, we have prepared some novel azasterols which inhibit the growth of bloodstream forms of *T. brucei* subsp. *rhodesiense* with ED₅₀ values in the nanomolar range, which represent good drug leads worthy of further study. The mode of action of the compounds does not seem to be associated with 24-SMT inhibition. Further work is required to analyze the mode of action of azasterols and the cellular basis for toxicity as well as the function of 24-SMT in *T. brucei*.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the European Union INCO-DEV program (ICA4-CT-2001-10074), the Plan Nacional de Investigación (SAF2004-03828), and the Welsh School of Pharmacy for funding. Ludovic Gros was a fellow of the Marie Curie Training Site (QLK2-CT-2001-60091). This investigation received financial support from the UNDP/World Bank/WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases (TDR).

The EPSRC National Mass Spectrometry Service Centre is acknowledged for accurate mass spectroscopy.

REFERENCES

- Chance, M. L., and L. J. Goad. 1997. Sterol metabolism of *Leishmania* and trypanosomes: potential for chemotherapeutic exploitation, p. 163–167. In G. Hide, G. H. Coombs, and P. H. Holmes (ed.), *Trypanosomiasis and leishmaniasis: biology and control*. CAB International, Wallingford, United Kingdom.
- Coppens, I., and P. J. Courtoy. 2000. The adaptative mechanisms of *Trypanosoma brucei* for sterol homeostasis in its different life-cycle environments. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:129–156.
- Coppens, I., and P. J. Courtoy. 1995. Exogenous and endogenous sources of sterols in the culture-adapted procyclic trypomastigotes of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **73**:179–188.
- Croft, S. L. 1997. The current status of antiparasite chemotherapy. *Parasitology* **114**(Suppl.):S3–S15.
- Gros, L., S. Orenes Lorente, C. Jimenez Jimenez, V. Yardley, L. Rattray, H. Wharton, S. Little, S. L. Croft, L. M. Ruiz-Perez, D. Gonzalez-Pacanowska, and I. H. Gilbert. Evaluation of azasterols as anti-parasitics. *J. Med. Chem.*, in press.
- Haughan, P. A., M. L. Chance, and L. J. Goad. 1995. Effects of an azasterol inhibitor of sterol 24-transmethylation on sterol biosynthesis and growth of *Leishmania donovani* promastigotes. *Biochem. J.* **308**:31–38.
- Hirumi, H., and K. Hirumi. 1989. Continuous cultivation of *Trypanosoma brucei* blood stream forms in a medium containing a low concentration of serum protein without feeder cell layers. *J. Parasitol.* **75**:985–989.
- Lorente, S. O., C. J. Jimenez, L. Gros, V. Yardley, K. de Luca-Fradley, S. L. Croft, J. A. Urbina, L. M. Ruiz-Perez, D. G. Pacanowska, and I. H. Gilbert. 2005. Preparation of transition-state analogues of sterol 24-methyl transferase as potential anti-parasitics. *Bioorg. Med. Chem.* **13**:5435–5453.
- Lorente, S. O., J. C. Rodrigues, C. Jimenez Jimenez, M. Joyce-Menekse, C. Rodrigues, S. L. Croft, V. Yardley, K. de Luca-Fradley, L. M. Ruiz-Perez, J. Urbina, W. de Souza, D. Gonzalez Pacanowska, and I. H. Gilbert. 2004. Novel azasterols as potential agents for treatment of leishmaniasis and trypanosomiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2937–2950.
- Magaraci, F., C. J. Jimenez, C. Rodrigues, J. C. Rodrigues, M. V. Braga, V. Yardley, K. de Luca-Fradley, S. L. Croft, W. de Souza, L. M. Ruiz-Perez, J. Urbina, D. Gonzalez Pacanowska, and I. H. Gilbert. 2003. Azasterols as inhibitors of sterol 24-methyltransferase in *Leishmania* species and *Trypanosoma cruzi*. *J. Med. Chem.* **46**:4714–4727.
- Nes, W. D. 2000. Sterol methyl transferase: enzymology and inhibition. *Biochim. Biophys. Acta.* **1529**:63–88.
- Oehlschlager, A. C., R. H. Angus, A. M. Pierce, H. D. Pierce, Jr., and R. Srinivasan. 1984. Azasterol inhibition of delta 24-sterol methyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **23**:3582–3589.
- Parks, L. W., S. J. Smith, and J. H. Crowley. 1995. Biochemical and physiological effects of sterol alterations in yeast—a review. *Lipids* **30**:227–230.
- Rahier, A., M. Taton, and P. Benveniste. 1990. Inhibition of sterol biosyn-

- thesis enzymes in vitro by analogues of high-energy carbocationic intermediates. *Biochem. Soc. Trans.* **18**:48–52.
14. **Raz, B., M. Iten, Y. Grether-Buhler, R. Kaminsky, and R. Brun.** 1997. The Alamar Blue assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (*T.b. rhodesiense* and *T.b. gambiense*) in vitro. *Acta Trop.* **68**:139–147.
 15. **Roberts, C. W., R. McLeod, D. W. Rice, M. Ginger, M. L. Chance, and L. J. Goad.** 2003. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Mol. Biochem. Parasitol.* **126**:129–142.
 16. **Rodrigues, J. C., M. Attias, C. Rodriguez, J. A. Urbina, and W. Souza.** 2002. Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22,26-azasterol, a $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:487–499.
 17. **Roux, C.** 1964. Action teratogene du triparanol chez l'animal. *Arch. Fr. Pediatr.* **21**:451–464.
 18. **Tong, Y., B. S. McCourt, D. A. Guo, A. T. Mangla, W. X. Zhou, M. D. Jenkins, W. Zhou, M. Lopez, and W. D. Nes.** 1997. Stereochemical features of C-methylations on the path to $\Delta^{24(28)}$ -methylene and $\Delta^{24(28)}$ -ethylidene sterols: studies on the recombinant phytosterol methyl transferase from *Arabidopsis thaliana*. *Tetrahedron Lett.* **38**:6115–6118.
 19. **Urbina, J. A.** 1997. Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. *Parasitology* **114**(Suppl.):S91–S99.
 20. **Urbina, J. A., G. Visbal, L. M. Contreras, G. McLaughlin, and R. Docampo.** 1997. Inhibitors of $\Delta^{24(25)}$ sterol methyltransferase block sterol synthesis and cell proliferation in *Pneumocystis carinii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:1428–1432.
 21. **Urbina, J. A., J. Vivas, K. Lazard, J. Molina, G. Payares, M. M. Piras, and R. Piras.** 1996. Antiproliferative effects of $\Delta^{24(25)}$ sterol methyl transferase inhibitors on *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*: in vitro and in vivo studies. *Chemotherapy* **42**:294–307.
 22. **Urbina, J. A., J. Vivas, G. Visbal, and L. M. Contreras.** 1995. Modification of the sterol composition of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* epimastigotes by $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyl transferase inhibitors and their combinations with ketoconazole. *Mol. Biochem. Parasitol.* **73**:199–210.
 23. **Vivas, J., J. A. Urbina, and W. de Souza.** 1996. Ultrastructural alterations in *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* induced by $\Delta^{24(25)}$ sterol methyl transferase inhibitors and their combinations with ketoconazole. *Int. J. Antimicrob. Agents* **7**:235–240.
 24. **World Health Organization.** 1 June 2006, last date modified. The UNICEF-UNDP-World Bank-WHO special programme for research and training in tropical diseases. [Online.] <http://www.who.int/tdr>.
 25. **Zhang, W., A. L. McIntosh, H. Xu, D. Wu, T. Gruninger, B. Atshaves, J. C. Liu, and F. Schroeder.** 2005. Structural analysis of sterol distributions in the plasma membrane of living cells. *Biochemistry* **44**:2864–2884.

ANEXO I

RESULTADOS Y PUBLICACIONES RECOGIDAS EN EL PROYECTO DE TESIS DOCTORAL

III. Papel de las etapas tardías de la síntesis de ergosterol en la proliferación celular y morfología en el *Trypanosoma africano*.

En este trabajo se explora el papel de las enzimas pertenecientes a las etapas tardías de la síntesis del ergosterol en la proliferación celular y morfología de *Trypanosoma brucei*. Para ello se realizaron experimentos de RNA de interferencia para la SQS y la SQE de *Trypanosoma brucei*. Los resultados muestran que la depleción de la SQS no mostró ningún efecto en el crecimiento o en la morfología tanto en las formas sanguíneas como en las procíclicas de *T. brucei*. Sorprendentemente, la depleción de SQE en las formas sanguíneas produjo una clara disminución del crecimiento, unido a una alteración de la morfología de los trypanosomas. La pérdida de viabilidad, y los defectos observados en la morfología de las formas sanguíneas producto de la depleción de la SQE, evidencian un fallo en la citocinesis que se refleja en la elevada aparición de formas de tamaño aberrante y parásitos multinucleados. Este fenotipo también se observó cuando se utilizó la terbinafina un inhibidor específico de la SQE. De esta manera se demuestra que el bloqueo de la síntesis de ergosterol a nivel de la SQE en la forma sanguínea de *Trypanosoma brucei*, genera severos defectos morfológicos y pérdida de la viabilidad de los parásitos, indicando la existencia de metabolitos post-escualeno los cuales debe tener una función distinta a los requisitos de “bulk sterols” y que actúan de forma hormonal que es esencial para la viabilidad celular. Esta observación sugiere que inhibidores diseñados para la biosíntesis del ergosterol poseen un uso potencial para combatir la Tripanosomiasis africana.

Anexo IV.III

The role of the late steps of the ergosterol biosynthetic pathway in cell proliferation and morphology in the african Trypanosome.

1. Introduction

Protozoan parasites are responsible for a significant portion of the global morbidity, mortality, and economic hardship, and in most countries current control and treatment regimes are either failing or under serious threat (Barrett, Burchmore et al. 2003). African trypanosomiasis, caused by *Trypanosoma brucei sp.*, is responsible for tens to hundreds of thousands of human infections annually in areas of sub-Saharan Africa where the infection is endemic and is compounded by the impact of the disease on animal welfare and productivity. Without treatment trypanosomiasis is invariably fatal, and the need of treatment is urgent. Mechanism for combating pathogenic protozoa rely on development and exploitation of new drug targets and/or vaccine candidates as well as efforts at vector control, all of which require detailed understanding of the biology of the pathogen and its relationship with the host and vector (Barry and McCulloch 2001). Recently, the genomes of several major protozoan pathogens have been decoded, including the tree principal trypanosomatid pathogenic species, *T. brucei*, *Trypanosoma cruzi*, and *Leishmania major* (Berriman, Ghedin et al. 2005; El-Sayed, Myler et al. 2005; Ivens, Peacock et al. 2005). The availability of complete genome data for this organism provides an opportunity to develop new methods and approaches to analyze gene function and identify and validate therapeutic targets, as well as to identify new aspects of exploitable biology.

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

The biosynthesis of sterols is a major route for the intervention in the development of anti-trypanosomals. Interest has emerged due to the observation that these parasites have close similarities to fungi in relation to sterol composition and sterol biosynthesis. This has offered a unique opportunity for the development of chemotherapy by targeting the sterol biosynthetic pathway using the type of drugs already successfully employed against fungal pathogens (Roberts, McLeod et al. 2003).

Africans trypanosomes do not synthesize cholesterol de novo, but instead synthesize ergosterol and other 24-alkylated sterol similar to plants and fungi (Roberts, McLeod et al. 2003). However, when cholesterol is present in their environment it is incorporated

by the parasite without further metabolism (Dixon, Ginger et al. 1972). Trypanosomes acquire cholesterol from the host via receptor-mediated endocytosis of low-density lipoproteins (LDL) followed by lysosomal degradation (Coppens and Courtoy 1995; Coppens, Levade et al. 1995). Procyclic trypanosomes are flexible with respect to the source of sterols, as these cells adjust their *de novo* ergosterol biosynthesis to the external supply of cholesterol (Coppens and Courtoy 1995). However, bloodstream form trypanosomes, which contain predominantly cholesterol, are dependent on sterol uptake from the host, as lipoproteins were demonstrated to be an essential source of cholesterol for the cells (Coppens, Levade et al. 1995).

Previous studies have shown that trypanosomes and *Leishmania* have ergosterol and other 24-alkylated sterols as the major sterols present in their cells, as found in fungi and plants (Goad, Holz et al. 1984; Urbina, Payares et al. 1998; Nes 2000; Gros, Castillo-Acosta et al. 2006). This contrasts with the situation in mammalian cells, where cholesterol is the major sterol present.

The enzyme squalene synthase (SQS, EC 2.5.1.21) catalyzes the condensation of two molecules of farnesyl diphosphate to produce squalene, the first committed step of the sterol pathway. Is the first enzyme branched out from other farnesyl pyrophosphate (FPP) derivatives, ubiquinones, dolichols, heme, and C₁₅- or C₂₀-isoprenoid chains. Loss of its function in *S. cerevisiae* leads to cell death (Jennings, Tsay et al. 1991) due to the defect of ergosterol biosynthesis. Therefore inhibitors of this enzyme as candidates of antifungal compound and anti-trypanosomals have been intensively pursued. Recently, the SQS from *Trypanosoma cruzi* has been cloned and characterized, studies with quinuclidine derivative inhibitors shows a very potent (sub-nanomolar) activity and selectivity for the parasite enzyme (Sealey-Cardona, Cammerer et al. 2007). The essential nature of the ERG9 gene in *T. brucei* has not been reported. To address this question, we have isolated the gene from this organism and investigated its essentiality by RNA interference.

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

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

In order to explore the role of the late steps of ergosterol biosynthetic pathway in cell viability and morphogenesis, we examined the effect of depletion of squalene synthase (ERG9), and squalene epoxidase (ERG1) levels by RNAi in the model organism *T. brucei*. We aimed at addressing the potential essential character of sterol biosynthesis and the need of synthesis *de novo* for correct cell division.

2. Materials and methods

2.1 Compounds

Terbinafine was purified by organic extraction from Lamisil™ tables (Novartis Pharmaceuticals, East Hanover, NJ). KBr (Sigma). The terbinafine was dissolved in 100% dimethyl sulfoxide (DMSO). Ergosterol was dissolved in Tween 80, Ethanol (1:1) and squalene in Ethanol.

2.2 Trypanosome culture and transfection

For RNAi analyses, *T. brucei* Lister 427 and single-marker were used (Wirtz, Leal et al. 1999), whereas established procyclic form were *T. brucei* 1313-1333 and 1313-514 (Biebinger, Wirtz et al. 1997; Alibu, Storm et al. 2005) were cultured and transfected as previously described (Biebinger, Wirtz et al. 1997; Alibu, Storm et al. 2005; C.E. Clayton 2005). To induce tetracycline-regulable promoters, doxycycline was added to 1 µg/ml. RNA were prepared from exponentially growing cells.

2.3 Plasmid construction

Oligonucleotides used for PCR are listed in Table 1, and plasmids constructs are listed in Table 2. ERG9 (GeneBank™ accession number XP-847542) and ERG1 (GeneBank™ accession number XP-828409) open reading frames were amplified using *T. brucei* Lister 427 genomic DNA as template, and cloned into the pGEM-T vector system I (Promega). Taq polymerase was used to amplify fragments for RNA interference, were cloned into the tetracycline-inducible vectors p2T7^{TI}:TABLue (Alibu, Storm et al. 2005). A fragment of the TbSQS, 550 bp was selected and verified by RNAi software (Redmond, Vadivelu et al. 2003) and was amplified by PCR with the primers (SQS HindIII-5' 5'- AAGCTTGGCCGCGCGAAATAT-3') and (SQS BamHI-3' 5'- GGATCCGGAATACTGCGCCAGCAC-3'). The SQE 451 bp fragment was generated with the primer (SQE-5' 5'-GGA TCC TAG CGG AGA AAC TCC TCG AA-3') and (SQE-3'3'- CTC GAG CCG CGA TCA GAA GAT AAA G-3'). The RNAi stem-loop construct was generated as follows. A first fragment of 550 bp was amplified with the primers 5'HP BamHI/HindIII (5'-GAGGATCCAAGCTTGGCCGCGCGAAATAT-3') and 3'HP HpaI/ApaI (5'-AACGGGCCCCTGCGCCAGCACTCGCCG -3') and ligated between the HindIII and ApaI sites of (pGR19). The second 550 bp fragment was ligated in pGR19_SQS

between the HpaI and BamHI restriction sites to produce the plasmid pGR19SQS_HP. PCR products and cloned fragments were checked by sequencing. For the double knockdowns of SQS and SQE in the bloodstream form of *T. brucei*, RNAi fragments of SQS (550 bp) and SQE (451 bp) genes previously used for RNAi for individual gene knockdowns, were inserted into: SQS in the p2T7 vector with the blasticidin resistance cassette and SQE into the p2T7^{II} with the hygomycin cassette. Both vectors were linearized with NotI before transfection to allow for homologous recombination to the ribosomal DNA spacer locus in the bloodstream form *T. brucei*.

2.4 Preparation of LPDS

Lipoprotein-deficient serum (LPDS) was made according to a method described by Hatch et al. (Hatch 1968). Solid KBr was added to foetal calf serum at a concentration of 1.25 g/ml. The resultant solution was centrifuged using a Beckman Rotor 70Ti, 37.600 rpm (104.030 \times g) at 10°C for 48 hours. 3/4 of the newly isolated lipoprotein-deficient serum (LPDS) (bottom fraction) was removed with a peristaltic pump. The remaining LPS rich fraction (upper 1/4) was collected. Both fractions were then extensively dialyzed against 50 volumes of PBS (pH 7.4) with L-ser 0.05% and then sterilised by membrane filtration. The cholesterol and protein concentration were estimated after the depletion using by Cholesterol Liquid Stable Reagent (InfinityTM).

2.5 Northern blots

For Northern blotting 10 μ g of total RNA were separated on formaldehyde gels and blotted onto membrane (Nitre® Schleicher and Schuell). Probes for the Northern blots were synthesised by random priming with ³²P label (Random Primed DNA Labelling Kit, Roche). Blot signals were quantitated by phosphorimager. As a loading control we use the SRP ³²P label probe (Estevez, Kempf et al. 2001).

2.6 Immunofluorescence microscopy

For immunostaining of *T. brucei* cells with the 221 polyclonal antibody directed against *T. brucei* VSG glycoprotein (used at a 1:1000 dilution), cells were washed twice and fixed on suspension 4 % p-formaldehyde for 20 min at room temperature. Fixed cells were adhered to poly-L-lysine coated slides for 20 min. Subsequently, they were blocked with 1.5 % BSA in PBS (pH 7.4) for 1 h and incubated with the polyclonal antibody anti-Tb221 diluted 1:1000. After three washes with PBS for 20 min, cells were

incubated in the dark with goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 594 (Molecular Probes) diluted 1:40. After three washes with PBS at room temperature in the dark, parasites were finally fixed with cold methanol (Merck). Samples were treated with Vectashield®-DAPI (Vector Laboratories) and analyzed on an Olympus microscope system (Cell R IX81; Olympus), 63x/100x objectives, illumination system (MT20; Olympus), and camera (Orca CCD; Hamamatsu).

2.7 Electron microscopy

T. brucei SQE-RNAi bloodstream cell lines non-induced and induced for 72h (dox +/-) and *T. brucei* (wild type) 427 treated with 40 μ M terbinafine (48 h), were collected and fixed in 0.5 % glutaraldehyde 4 % p-formaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) during 4 h at 4°C. Free aldehyde was quenched with 0.1 M glycine for 1 h and the samples were dehydrated in 50 to 100 % ethanol and embedded in LRWhite resin at -20 °C. Finally, the samples were subjected to polymerization for 2 days at -20 °C in UV and 1 day at room temperature. Ultrathin sections of 500 Å thickness were obtained and collected on nickel grids. The sections were observed under a Zeiss 902 10 CR electron microscope at 100 kV.

2.8 Flow cytometry

The flow cytometry analysis of propidium iodide-stained trypanosome cells was carried out as previously described (Li and Wang 2003). The DNA content of propidium iodide-stained cells was analyzed with a fluorescence-activated cell sorting scan (FACS) analytical flow cytometer (BD Biosciences). The percentages of cells in each phase of the cell cycle (G1, S, and G2/M) were determined by the BD CellQuest™ Pro version 4.0.2 software (BD Biosciences).

3. Results

3.1 Squalene synthase of *Trypanosoma brucei*

The *T. brucei* SQS sequence, exhibits a high similarity with the coding sequence from human 41% identity, and all the highly conserved motifs characteristic of SQSs are conserved. The *T. brucei* SQS was identified in chromosome 8 of the genome. The sequence gives a deduced amino acid sequence of 51.4 kDa protein with a pI of 6.1. To isolate the *T. brucei* SQS gene, we designed primers corresponding to the 5' and 3' ends of the coding sequence which was obtained by PCR and cloned in pGEMT (Promega).

This plasmid was used as a template for amplification and cloning of fragments for RNAi using the p2T7^{TI}: and pGR19 vectors.

3.2 Reduced expression of TbSQS mRNAs does not impair growth

RNAi mediated knockdown was performed for the SQS gene in both the bloodstream and procyclic forms of the parasite using cells transfected with the plasmid p2T7SQS_2. The effectiveness of RNAi was evaluated by Northern blot and total RNA was prepared after 72 h of induction (Fig 1E). The efficiency of transcript down-regulation ranged from 57-80 % in both forms. Increasing the doxycycline concentration and continuous RNAi induction did not lead to higher RNAi efficiency. Several clones were always tested yet it was not possible to attain increased depletion. Further experiments were aimed at using a stem-loop system (pGR19SQS_HP), which has been reported to be more robust under certain conditions. Again the RNAi-producing cell lines were grown in the presence and absence of doxycycline for 6 days and growth was monitored every 24 h. None of the cell lines examined showed defects in growth after RNAi induction (Fig 1 A and B). Either SQS is not essential in *T. brucei*, or the protein down-regulation was insufficiently effective to impair growth. Furthermore, induction of SQS-RNAi in bloodstream forms did not result either in apparent growth defects (Coppens, Levade et al. 1995).

3.3 Effect of down-regulation of SQS on the growth of *Trypanosoma brucei* RNAi cell lines. Dependence on lipoprotein deficient serum (LPDS)

In order to evaluate the role of SQS in parasite viability it was of interest to analyse modifications in growth after the induction of RNAi in the absence of an exogenous sterol supply. To this end we have prepared serum with a low content in lipoproteins following standard protocols (Fig 2). Previous studies have shown that bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* are auxotrophic for LDL-cholesterol (Coppens, Levade et al. 1995) in contrast the presence of lipoproteins is not critical for procyclics that can be adapted to growth in a medium depleted of LDL-cholesterol (Coppens and Courtoy 1995). The growth of the procyclic cells lines 1313-1333 and 1313-514 was monitored in a medium supplemented with 10 % lipoprotein-deficient serum (LPDS) instead of normal serum. As shown in figure (Fig 2B) although growth rate was slightly decreased, LPDS supplemented medium supported growth of thus suggesting that procyclics are probably capable of an efficient sterol biosynthesis that allows them to

grow under conditions of a reduced exogenous sterol supply. This was not the case of the bloodstream form S16 which could not proliferate in a lipoprotein deficient medium (Fig 2A). The effect of RNAi mediated depletion of SQS was analysed both in medium with whole serum and LPDS. As shown in (Fig 1B) when parasites were grown in the presence of 10% of FBS (Gibco), no growth defects were observed after RNAi induction. Likewise, when RNAi-SQS was induced in medium containing LPDS, growth rates were similar in both induced and non-induced procyclic cells (Fig 2D).

3.4 Depletion of squalene epoxidase of impairs growth in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*

Further experiments were performed in order to analyse the role of the next step in the pathway catalysed by squalene monooxygenase (SQE). The gene is present on chromosome 11 of *T. brucei*, and encodes a protein of predicted mass 63.8 kDa and pI of 8.4. SQE has 30.5% amino acid sequence identity with *Saccharomyces cerevisiae* ERG1. Tetracycline-inducible BF and PF cells were transfected with the RNAi plasmid p2T7^{TI} containing a fragment of the TbSQE gene. To check the effectiveness of RNAi, total RNA was prepared from induced and non-induced cells after 72 h of induction with 1 µg/ml doxycycline (Fig 1E).

When the production of double-stranded RNA was induced by doxycycline in bloodstream forms grown in medium supplemented with 10% FBS, cell growth decreased compared to non-induced parasites after day two (Fig 1C). In the case of the bloodstream form cells, growth ceased very rapidly following induction (within 24h) and growth cessation continued for about 8 days. After this period, loss of expression of RNAi led to recovery of growth. This phenomenon has been observed by several workers and is a general feature of RNAi in trypanosomes (Wang, Morris et al. 2000). The induction of TbSQE double strand RNA in procyclics form had no effect on cell proliferation and morphology and they still exhibited exponential growth (Fig 1D). Likewise when RNAi induction was performed on bloodstream form in medium supplemented with 5% dialyzed serum and 10 % of serum plus (Gibco), growth rates were similar in both induced and non-induced when we compared with 10% of FBS. In the case of procyclics cells grown in medium containing LPDS, growth rates were similar in both induced and non-induced procyclic cells (Fig 3). The growth defects observed in bloodstream forms could not be restored by addition of ergosterol to the medium.

3.5 Decreased squalene epoxidase expression results in alterations of cell proliferation and cytokinesis arrest

To determine the detailed effects of TbSQE down regulation on cell division, nuclear and kinetoplast contents for individual cells were determined by DAPI staining (Table 3). Perturbation of TbSQE protein levels had profound effects on the progress through the cell cycle. Upon induction there was a decrease of cells in G1 (60% to 40%) and an increase in cells in both G2/M (32% to 54%) as determined by FACS analysis (Fig 4). Samples obtained following TbSQE RNAi induction for 72 h were classified according to the numbers of nuclei and kinetoplasts in each cell (Table 3). These results showed that cells with one nucleus and one kinetoplast (1K1N) decreased from ~ 60% to ~ 40% in the population after 72 h while 2K1N cells decreased from ~ 28% to ~ 11%. Cells with multiple kinetoplasts (more than two) and polynucleated cells (designed XNMK) emerged during RNAi and increased from ~ 20% to ~ 60% of the population after 72 h (Table 3). The cell designed XNMK were a gigantic size, at least several fold larger than the wild type. They had lost the original morphology and become round-shaped containing multiple kinetoplasts and were polynucleated, DNA which in certain cells was disorganized and fragmented (Fig 5B). These cells were apparently polyploid, suggesting the occurrence of additional rounds of nuclear DNA synthesis in the absence of chromosome segregation. The presence of multiple kinetoplasts also indicated a continuous progression of the kinetoplast cycle while cytokinesis was blocked. Very similar observations were obtained when wild type bloodstream forms of the parasites were treated with 40 μ M of terbinafine, a compound that blocks ergosterol biosynthesis in several fungi acting at the point of squalene epoxidation. The phenotype obtained after treatment with terbinafine for 48 hours was highly similar to defects observed in the TbSQE-deficient bloodstream form cells (Fig 6).

3.7 Ultrastructural alterations induced by the ergosterol biosynthesis inhibitor terbinafine and squalene epoxidase RNAi in *Trypanosoma brucei* bloodstream forms

In order to characterise in more detail morphological changes due to terbinafine treatment and squalene epoxidase RNAi, trypanosomes grown for 48h in the presence or absence of 40 μ M terbinafine and the SQE RNAi blood stream cell line induced for 72 h were all monitored by transmission electron microscopy. The ultrastructural alterations are illustrated in Fig. 7. Control bloodstream forms (Fig. 7A, 8A) showed the

characteristic elongated shape of the cells. The amount of cells containing more than one nucleus and showing more than one flagellar pocket was drastically elevated when the cells were exposed to terbinafine (Fig. 7 B, C). Similar observations were evidenced in the RNAi induced population which exhibited a high number of poly-nucleated cells and severe morphological alterations such as the appearance of multiple flagella, enlarged flagellar pockets and nuclei, indicating abnormal cell division (Fig. 8 B-E). Multiple electron-dense inclusion bodies possibly corresponding to lipid vacuoles/droplets were also observed both in RNAi-SQE and terbinafine treated cells.

3.8 Double interference

We perform a double interference SQE and SQS to study if the down regulation of SQS affect the phenotype obtained by the depletion of the SQE. After the induction of the double knockdown in the bloodstream form we don't see any difference in the phenotype when we compared the double knockdown with the single SQE knockdown (Fig. 9).

4. Discussion

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

The potent activity observed for certain compounds that inhibit the sterol biosynthetic pathway against the bloodstream forms of the parasite (Lorente, Rodrigues et al. 2004; Orenes Lorente, Gomez et al. 2005; Gros, Castillo-Acosta et al. 2006), led us to revisit the very well documented issue that *T. brucei* bloodstream forms lack the ability to synthesize sterols and depend on the presence in the culture medium of plasma low density lipoprotein particles which are necessary for membrane assembly (Coppens and Courtoy 1995; Coppens and Courtoy 2000). Conversely procyclic forms may obtain sterols from both exogenous and endogenous sources and both pathways appear to compensate for each other as incorporation of exogenous lipid down regulates the isoprenoid biosynthetic machinery (Coppens and Courtoy 1995).

We and others have previously established the sterol composition of bloodstream and procyclic forms of *T. brucei*, 24-alkylated sterols are present in procyclic forms but are absent in the bloodstream form, where cholesterol is the main present sterol (Gros, Castillo-Acosta et al. 2006; Zhou, Cross et al. 2007). However several other sterol molecules have been identified in procyclics indicating a non conventional ergosterol pathway (Zhou, 2007 #356). Sterols may be important from two points of view. First, they have a bulk structural role in cellular membranes and are important for function, stability and permeability. However, sterol derivatives or intermediates may also constitute functionally active metabolites with distinct roles in metabolism that cannot be replaced by cholesterol. Thus, previous studies in fungi and protozoa suggest that 24-methyl sterols serve a dual role in cells (Bloch 1983; Rodriguez, Low et al. 1985; Roberts, McLeod et al. 2003): one so called “sparking”, that involves hormonal levels of sterol and that is involved in cell proliferation, and a second bulk role which satisfies general structural requirements.

The essential nature of late steps in ergosterol biosynthesis in *T. brucei* has not been previously investigated. To address this, we first analysed the requirement of SQS by down regulating its expression by RNAi with a tetracycline inducible system (Alibu, Storm et al. 2005). Northern blot analysis clearly indicated that the SQS gene was transcribed in both bloodstream forms and procyclic forms of *T. brucei*. During the course of the induction neither bloodstream S16 cells nor procyclic cells showed a decrease in the growth rate when compared to the non-induced cultures. RNAi mediated depletion of SQS expression appeared to be highly efficient with less than 10% mRNA remaining after 72 hours of induction. Nonetheless, the possibility existed that expression is not reduced to a sufficient extent to completely abolish sterol biosynthesis. Alternatively, squalene synthesis is not an essential process. Several authors have analysed the requirement of SQS; loss of its function in *S. cerevisiae* leads to cell death (Jennings, Tsay et al. 1991). Homozygous deletion of the SQS gene in mice was lethal between embryonic day 9.5 and 12.5 and animals exhibited severe retardation of development and defective neural tube closure, indicating that SQS is essential for development, particularly of the central nervous system (Tozawa, Ishibashi et al. 1999). Controversially, others groups report the possibility of restoring the viability of the cells depleted of squalene by the incorporation of exogenous cholesterol into the cells, which is the case of the disruption of the squalene synthase gene (*fdft1*) which is critical for cholesterol synthesis, using conditional gene inactivation in the mouse. In this latter

case mutant mice showed no histological signs of neuronal degeneration, displayed ultrastructurally normal synapses, and exhibited normal motor coordination, concluding that at least some adult neurons no longer require endogenous cholesterol synthesis and can fully meet their cholesterol needs by uptake from their surrounding (Funfschilling, Saher et al. 2007). Depletion of the ERG9 gene in *Candida glabrata* decreased the cell viability in laboratory media, whereas it did not affect cell growth in mice. Analyses of the sterol composition of the restored cells in serum-containing media suggest that the defect of ergosterol biosynthesis can be complemented by the incorporation of exogenous cholesterol into the cells. Thus, inactivation of squalene synthase did not affect fungal growth in mice, presumably because the cells were able to incorporate cholesterol from the serum (Nakayama, Izuta et al. 2000). In a study on cholesterol import by *Aspergillus fumigatus* and its influence on the antifungal potency of ergosterol biosynthesis inhibitors, specifically 14 α -demethylase inhibitors, it was concluded that adding serum or cholesterol to the medium partially rescues fungal cells from the drug-induced growth inhibition (Xiong, Hassan et al. 2005). Bearing in mind these considerations, we analysed the effect of SQS depletion in a lipoprotein poor medium with reduced cholesterol availability. Again neither significant reduction in growth nor alterations in cell morphology were identified.

Surprisingly, the down-regulation of squalene epoxidase had a very clear effect on cell proliferation and morphology in the bloodstream cells while no evident changes in proliferation were observed in procyclics. This is the first report showing profound perturbations of cell morphology and ultrastructure after the down-regulation of a sterol biosynthesis enzyme. Major defects included enlarged or multiple flagellar pockets and the presence of giant polyploid cells indicating multiple rounds of mitosis without completion of cytokinesis. This is indicative of profound differences in certain cell cycle check-points which allow for replication and nuclear division to proceed in the absence of cytokinesis in bloodstream forms of *T. brucei*. Highly similar defects and morphology aberrations were observed when cells were grown in the presence of terbinafine a specific SQE inhibitor further supporting that the growth defects are specific to SQE depletion and that bloodstream forms require efficient squalene epoxidation for survival.

The reduction in growth was observed both in the presence of whole serum and when dialyzed and serum plus was used suggesting that the mode of toxicity was not related to bulk sterol requirements. Minor ergosterol requirements not detectable in a whole

sterol analysis may exist in blood stream forms. We therefore evaluated if the inclusion in the medium of ergosterol dissolved in a manner that appears to satisfy requirements of yeast cells (Leber, Landl et al. 1998) could maintain growth and thus trace quantities of ergosterol itself or some derivative would be responsible for the observed toxicity. However, in the present case, the inclusion of 1 µg/ml of ergosterol in the medium (in addition to whole serum) while performing the down-regulation of SQE was unable to sustain normal growth.

Ultrastructural alterations induced by ergosterol biosynthesis inhibitors in parasites have been previously reported (Lazardi, Urbina et al. 1990; Lazardi, Urbina et al. 1991; Rodrigues, Attias et al. 2002; Braga, Urbina et al. 2004; Rodrigues, Urbina et al. 2005; Santa-Rita, Lira et al. 2005). In addition studies in *Candida albicans* have shown that blocking of 14α-demethylase, leading to cholesterol starvation, produces the inhibition of cytokinesis and the formation of polyploid cells, which were multinucleated and had mitotic aberrations. Cholesterol is essential for mitosis completion and, in the absence of cholesterol, the cells fail to undergo cytokinesis, enter G1 phase at higher DNA ploidy (tetraploidy), and then progress through S (replication) into G2, generating polyploid cells (Fernandez, Lobo Md Mdel et al. 2004). Ultrastructural damage has been reported also in *T. cruzi* epimastigotes after treatment with terbinafine, which blocks ergosterol synthesis in these cells at the level of squalene epoxidase and leads to almost immediate arrest of growth at concentrations greater than 1 µM, produced proliferation of glycosome-like bodies, polynucleated cells (arrest at cytokinesis), and eventually massive vacuolization (Lazardi, Urbina et al. 1990).

In the present case the effect of SQE depletion on cell proliferation and morphology, can be an indication of the need of post squalene metabolic intermediates that may have a cellular function different from bulk sterol requirement which could be satisfied by cholesterol. On the other hand it is possible that squalene is a toxic metabolite in trypanosoma and accumulation is a major source of toxicity. In this sense in fungi inhibition of squalene epoxidase by terbinafine, or other allylamine compounds caused a depletion of normal sterols and an accumulation of abnormal amounts of sterol precursors with cytostatic or cytotoxic consequences (Roberts, McLeod et al. 2003). The inhibition of squalene epoxidase in yeast results in decreased ergosterol and intracellular accumulation of squalene, and its subsequent deposition in numerous lipid droplets through cytoplasm. The vacuolar and cell membranes, as well as the cell wall, are ultimately disrupted and damaged, resulting in fungicidal action (Jain and Sehgal 2000).

Itraconazole (azole), and antifungal, also inhibit ergosterol biosynthesis, but at a later step than terbinafine, after the formation of lanosterol, and are primarily fungistatic, thereby favouring the conclusion that squalene inhibition and squalene accumulation are decisive factors in fungicidal activity (Jain and Sehgal 2000).

Indeed ultrastructural analysis of SQE depleted *T. brucei* cells evidenced the presence of multiple electron dense vacuoles with the typical morphology of lipid inclusions possibly containing an accumulation of squalene. It is possible that squalene accumulation is a major cause of cell death also in trypanosoma. To further analyse this possibility, double interference of SQS and SQE was accomplished in order to prevent squalene accumulation. An important observation in the double interference lines was the inability to reduce levels of mRNA for SQE beyond 50-60% control values while the mRNA for SQS was efficiently reduced. Under these experimental conditions defects in growth were similar to those observed in the single SQE RNAi cell line as well as the morphological and cell cycle defects. Experiments were also performed where squalene was directly added to the growth medium at concentrations that allowed for efficient solubilization (up to 100 μ M) yet it did not appear to cause any toxicity although efficient uptake could not be monitored (results not shown).

In summary we conclude that the blockage of sterol biosynthesis at the level of squalene epoxidase leads to cell death and severe morphological defects in bloodstream forms of *T. brucei* an observation that suggests that sterol biosynthesis inhibitors may have useful anti-trypanosomal activity in the treatment of sleeping sickness. This requirement of SQE activity is independent of the availability of serum cholesterol or ergosterol. We postulate that carbon flow through the sterol pathway in bloodstreams occurs yet leads to metabolites present in extremely low quantities. Interruption of this low yet sustained carbon flow would lead to the accumulation of toxic intermediates and/or to the depletion of essential metabolites usually present in trace quantities. In any case, previous observations establishing the idea that efficient endogenous sterol biosynthesis is not required for growth in bloodstream forms should be reconsidered in the light of these findings.

5. References

- Akins, R. A. (2005). "An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*." Med Mycol **43**(4): 285-318.
- Alibu, V. P., L. Storm, et al. (2005). "A doubly inducible system for RNA interference and rapid RNAi plasmid construction in *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **139**(1): 75-82.
- Barrett, M. P., R. J. Burchmore, et al. (2003). "The trypanosomiases." Lancet **362**(9394): 1469-80.
- Barry, J. D. and R. McCulloch (2001). "Antigenic variation in trypanosomes: enhanced phenotypic variation in a eukaryotic parasite." Adv Parasitol **49**: 1-70.
- Berriman, M., E. Ghedin, et al. (2005). "The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*." Science **309**(5733): 416-22.
- Biebinger, S., L. E. Wirtz, et al. (1997). "Vectors for inducible expression of toxic gene products in bloodstream and procyclic *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **85**(1): 99-112.
- Bloch, K. E. (1983). "Sterol structure and membrane function." CRC Crit Rev Biochem **14**(1): 47-92.
- Braga, M. V., J. A. Urbina, et al. (2004). "Effects of squalene synthase inhibitors on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*." Int J Antimicrob Agents **24**(1): 72-8.
- C.E. Clayton, A. M. E., C. Hartmann, V.P. Alibu, M. Field and D. Horn (2005). Down-regulating gene expression by RNA interference in *Trypanosoma brucei* in RNA interference, Humana Press.
- Coppens, I. and P. J. Courtoy (1995). "Exogenous and endogenous sources of sterols in the culture-adapted procyclic trypomastigotes of *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **73**(1-2): 179-88.
- Coppens, I. and P. J. Courtoy (2000). "The adaptative mechanisms of *Trypanosoma brucei* for sterol homeostasis in its different life-cycle environments." Annu Rev Microbiol **54**: 129-56.
- Coppens, I., T. Levade, et al. (1995). "Host plasma low density lipoprotein particles as an essential source of lipids for the bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*." J Biol Chem **270**(11): 5736-41.
- Dixon, H., C. D. Ginger, et al. (1972). "Trypanosome sterols and their metabolic origins." Comp Biochem Physiol B **41**(1): 1-18.
- El-Sayed, N. M., P. J. Myler, et al. (2005). "The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease." Science **309**(5733): 409-15.
- Estevez, A. M., T. Kempf, et al. (2001). "The exosome of *Trypanosoma brucei*." Embo J **20**(14): 3831-9.

Favre, B. and N. S. Ryder (1997). "Cloning and expression of squalene epoxidase from the pathogenic yeast *Candida albicans*." Gene **189**(1): 119-26.

Fernandez, C., V. Lobo Md Mdel, et al. (2004). "Cholesterol is essential for mitosis progression and its deficiency induces polyploid cell formation." Exp Cell Res **300**(1): 109-20.

Funfschilling, U., G. Saher, et al. (2007). "Survival of adult neurons lacking cholesterol synthesis in vivo." BMC Neurosci **8**: 1.

Goad, L. J., G. G. Holz, Jr., et al. (1984). "Sterols of *Leishmania* species. Implications for biosynthesis." Mol Biochem Parasitol **10**(2): 161-70.

Gros, L., V. M. Castillo-Acosta, et al. (2006). "New azasterols against *Trypanosoma brucei*: role of 24-sterol methyltransferase in inhibitor action." Antimicrob Agents Chemother **50**(8): 2595-601.

Hatch, F. T. (1968). "Practical methods for plasma lipoprotein analysis." Adv Lipid Res **6**: 1-68.

Ivens, A. C., C. S. Peacock, et al. (2005). "The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*." Science **309**(5733): 436-42.

Jain, S. and V. N. Sehgal (2000). "Terbinafine, a unique oral antifungal: current perceptions." Int J Dermatol **39**(6): 412-23.

Jennings, S. M., Y. H. Tsay, et al. (1991). "Molecular cloning and characterization of the yeast gene for squalene synthetase." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(14): 6038-42.

Klobucnikova, V., P. Kohut, et al. (2003). "Terbinafine resistance in a pleiotropic yeast mutant is caused by a single point mutation in the *ERG1* gene." Biochem Biophys Res Commun **309**(3): 666-71.

Lazardi, K., J. A. Urbina, et al. (1990). "Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*." Antimicrob Agents Chemother **34**(11): 2097-105.

Lazardi, K., J. A. Urbina, et al. (1991). "Ultrastructural alterations induced by ICI 195,739, a bis-triazole derivative with strong antiproliferative action against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*." Antimicrob Agents Chemother **35**(4): 736-40.

Leber, R., S. Fuchsbichler, et al. (2003). "Molecular mechanism of terbinafine resistance in *Saccharomyces cerevisiae*." Antimicrob Agents Chemother **47**(12): 3890-900.

Leber, R., K. Landl, et al. (1998). "Dual localization of squalene epoxidase, Erg1p, in yeast reflects a relationship between the endoplasmic reticulum and lipid particles." Mol Biol Cell **9**(2): 375-86.

- Li, Z. and C. C. Wang (2003). "A PHO80-like cyclin and a B-type cyclin control the cell cycle of the procyclic form of *Trypanosoma brucei*." J Biol Chem **278**(23): 20652-8.
- Lorente, S. O., J. C. Rodrigues, et al. (2004). "Novel azasterols as potential agents for treatment of leishmaniasis and trypanosomiasis." Antimicrob Agents Chemother **48**(8): 2937-50.
- Nakayama, H., M. Izuta, et al. (2000). "Depletion of the squalene synthase (ERG9) gene does not impair growth of *Candida glabrata* in mice." Antimicrob Agents Chemother **44**(9): 2411-8.
- Nes, W. D. (2000). "Sterol methyl transferase: enzymology and inhibition." Biochim Biophys Acta **1529**(1-3): 63-88.
- Orenes Lorente, S., R. Gomez, et al. (2005). "Biphenylquinuclidines as inhibitors of squalene synthase and growth of parasitic protozoa." Bioorg Med Chem **13**(10): 3519-29.
- Redmond, S., J. Vadivelu, et al. (2003). "RNAi: an automated web-based tool for the selection of RNAi targets in *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **128**(1): 115-8.
- Roberts, C. W., R. McLeod, et al. (2003). "Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa." Mol Biochem Parasitol **126**(2): 129-42.
- Robinson, G. W., Y. H. Tsay, et al. (1993). "Conservation between human and fungal squalene synthetases: similarities in structure, function, and regulation." Mol Cell Biol **13**(5): 2706-17.
- Rodrigues, J. C., M. Attias, et al. (2002). "Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22,26-azasterol, a delta(24(25))-sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*." Antimicrob Agents Chemother **46**(2): 487-99.
- Rodrigues, J. C., J. A. Urbina, et al. (2005). "Antiproliferative and ultrastructural effects of BPQ-OH, a specific inhibitor of squalene synthase, on *Leishmania amazonensis*." Exp Parasitol **111**(4): 230-8.
- Rodriguez, R. J., C. Low, et al. (1985). "Multiple functions for sterols in *Saccharomyces cerevisiae*." Biochim Biophys Acta **837**(3): 336-43.
- Santa-Rita, R. M., R. Lira, et al. (2005). "Anti-proliferative synergy of lysophospholipid analogues and ketoconazole against *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): cellular and ultrastructural analysis." J Antimicrob Chemother **55**(5): 780-4.

Sealey-Cardona, M., S. Cammerer, et al. (2007). "Kinetic characterization of squalene synthase from *Trypanosoma cruzi*: selective inhibition by quinuclidine derivatives." Antimicrob Agents Chemother.

Thompson, J. F., D. E. Danley, et al. (1998). "Truncation of human squalene synthase yields active, crystallizable protein." Arch Biochem Biophys **350**(2): 283-90.

Tozawa, R., S. Ishibashi, et al. (1999). "Embryonic lethality and defective neural tube closure in mice lacking squalene synthase." J Biol Chem **274**(43): 30843-8.

Tsai, H. F., M. Bard, et al. (2004). "Candida glabrata erg1 mutant with increased sensitivity to azoles and to low oxygen tension." Antimicrob Agents Chemother **48**(7): 2483-9.

Urbina, J. A., K. Lazard, et al. (1988). "Antiproliferative synergism of the allylamine SF 86-327 and ketoconazole on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*." Antimicrob Agents Chemother **32**(8): 1237-42.

Urbina, J. A., G. Payares, et al. (1998). "Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*: in vitro and in vivo studies." Antimicrob Agents Chemother **42**(7): 1771-7.

van Hellemond, J. J. and A. G. Tielens (2006). "Adaptations in the lipid metabolism of the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*." FEBS Lett **580**(23): 5552-8.

Wang, Z., J. C. Morris, et al. (2000). "Inhibition of *Trypanosoma brucei* gene expression by RNA interference using an integratable vector with opposing T7 promoters." J Biol Chem **275**(51): 40174-9.

Wirtz, E., S. Leal, et al. (1999). "A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **99**(1): 89-101.

Xiong, Q., S. A. Hassan, et al. (2005). "Cholesterol import by *Aspergillus fumigatus* and its influence on antifungal potency of sterol biosynthesis inhibitors." Antimicrob Agents Chemother **49**(2): 518-24.

Zhou, W., G. A. Cross, et al. (2007). "Cholesterol import fails to prevent catalyst-based inhibition of ergosterol synthesis and cell proliferation of *Trypanosoma brucei*." J Lipid Res **48**(3): 665-73.

Table 1.

ORF, size	Primers	Sequence	Comments
TbSQS Tb927.8.7120 1371 bp	ORF 5'	AAGCTTATGGATTACGTTAGCGAATTGT	HindIII
	ORF 3'	GGATCCTCACCTGCCCAAATAACCGAAG	BamHI, -stop
RNAi, 550 bp p2T7 ^{TI}	SQS HindIII 5' SQS BamHI 3'	AAGCTTGGCCGCGCGAAATAT GGATCCGGAATACTGCGCCAGCAC	HindIII BamHI
pGR19	5' HP 3' HP	GAGGATCCAAGCTTGGCCGCGCGAAATAT AACGGGCCCTGCGCCAGCACTCGCCG	BamHI/HindIII HpaI/ApaI
TbSQE Tb11.02.0780 1740 bp	ORF 5'	CATATGGAGGCGGCCATTATTGGA	Nde I
RNAi, 451 bp	ORF 3' SQE 5' SQE 3'	GGATCACAACCAATTGGCTTCCTTTT GGA TCC TAG CGG AGA AAC TCC TCG AA CTC GAG CCG CGA TCA GAA GAT AAA G	Bam HI, -stop Bam HI Xho I

Table 1. Oligonucleotides used to amplify complete open reading frames and RNAi fragments of the squalene synthase and squalene epoxidase genes.

Table 2.

pGEMTbSQS	pGEMT+SQS-cds at HindIII /BamHI
pGEMTbSQE	pGEMT+SQE-cds at NdeI /BamHI
p2T7SQS_1	p2T7+SQS-RNAi, pheo resistance
p2T7SQS ^{TI} _2	p2T7 ^{TI} +SQS-RNAi, hygro resistance
pGR19SQS_HP	pGR19 + SQS-RNAi
p2T7 ^{TI} SQE	p2T7 ^{TI} +SQE-RNAi

Table 2. Plasmids constructs containing complete open reading frames and RNAi fragments of the sterol pathway.

Figure 1.

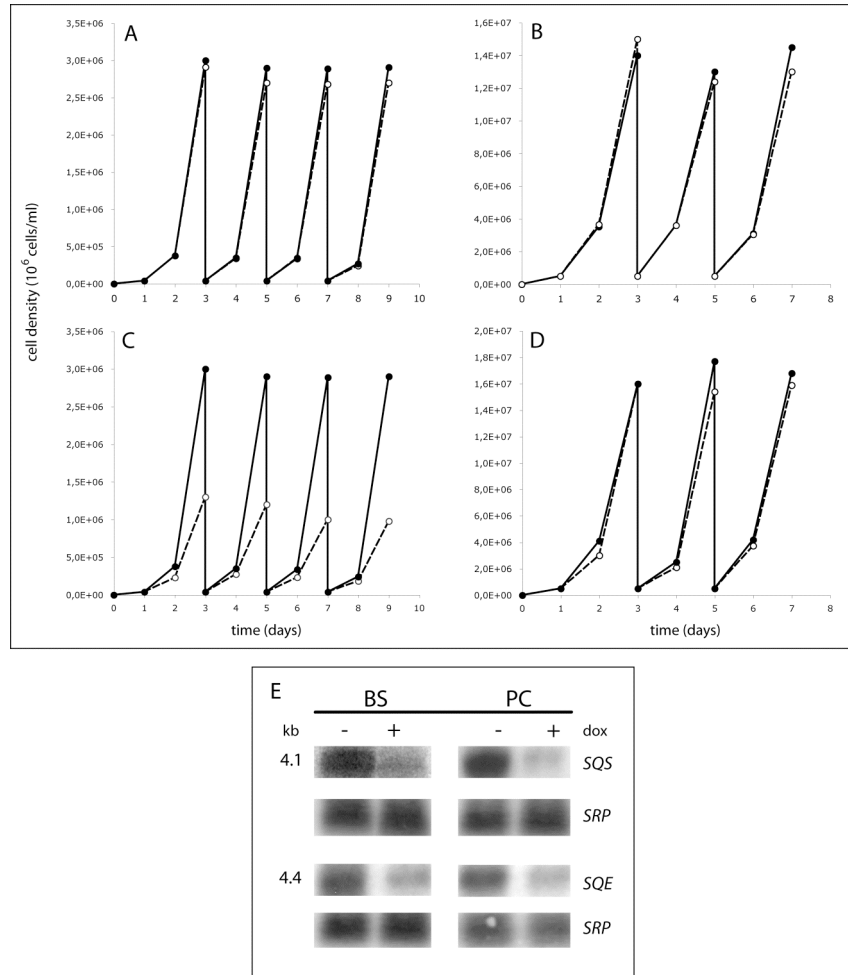


Fig 1. **A.** Growth curves of RNA interference cells. Filled circles and unbroken lines, control cells grown without Dox; open circles and broken lines, cells in the presence of 1 $\mu\text{g/ml}$ of Dox. Bloodstream cultures were initiated at 5×10^4 cells/ml and Procyclic trypanosomes cultures were initiated at 4×10^5 cells/ml. The rate of the cell growth was monitored daily using an electronic particle counter (model ZBI: Coulter Electronics Inc., Hialeah, FL). **A,** RNAi p2T7^{II} SQS BF; **B,** RNAi p2T7^{II} SQS PF; **C,** RNAi p2T7^{II} SQE BF; **D,** RNAi p2T7^{II} SQE PF. **E.** Northern blots showing down regulation of TbSQS and TbSQE transcript. Equal amounts of RNA (10 μg) from uninduced (-) and induced (+) bloodstream (BS) and procyclic (PC) cells were loaded on each lane. After probing for TbSQS or TbSQE transcripts, the same filter was hybridised with SRP (signal recognition particle RNA) as a loading control

Figure 2.

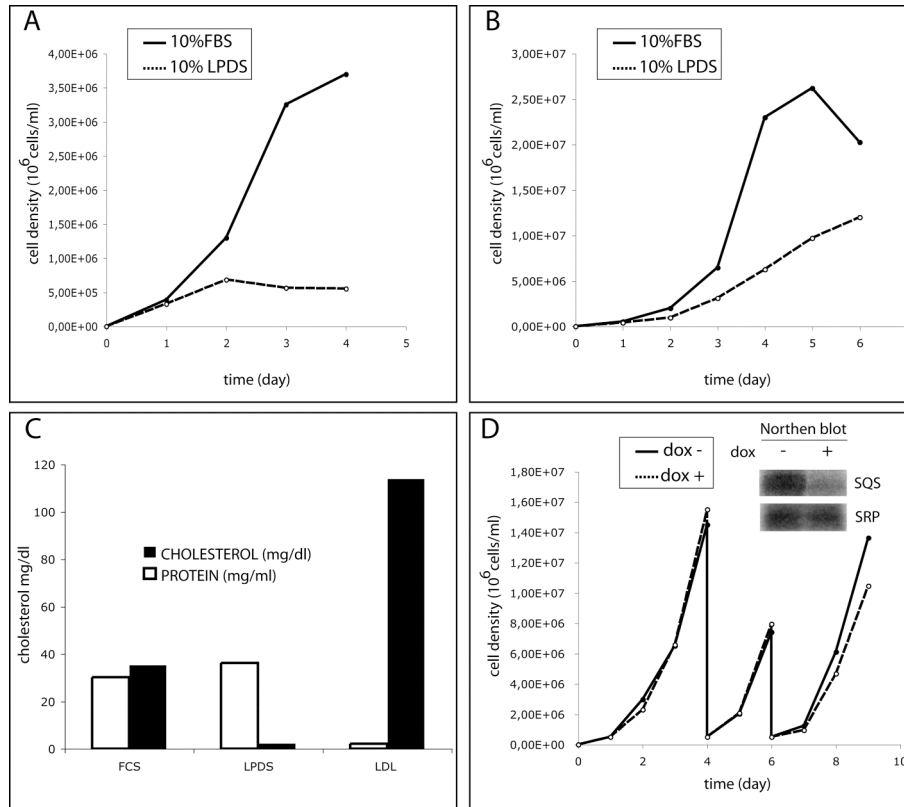


Fig 2. Trypanosomes cells cultured in lipoprotein-deficient medium (LPDS). **A.** *T. brucei* bloodstream form, filled circles and strait line cultured in the presence of 10% FCS, broken lines and open circles in the presence of 10% LPDS. **B.** *T. brucei* procyclic form, filled circles and strait line cultured in the presence of 10% FCS, broken lines and open circles in the presence of 10% LPDS. **C** Cholesterol and protein content of FCS, LPDS and LDL fractions after isolation. **D** Effect of the SQS RNAi on procyclic trypanosomes grown in medium supplemented with 10% of LPDS.

Figure 3.

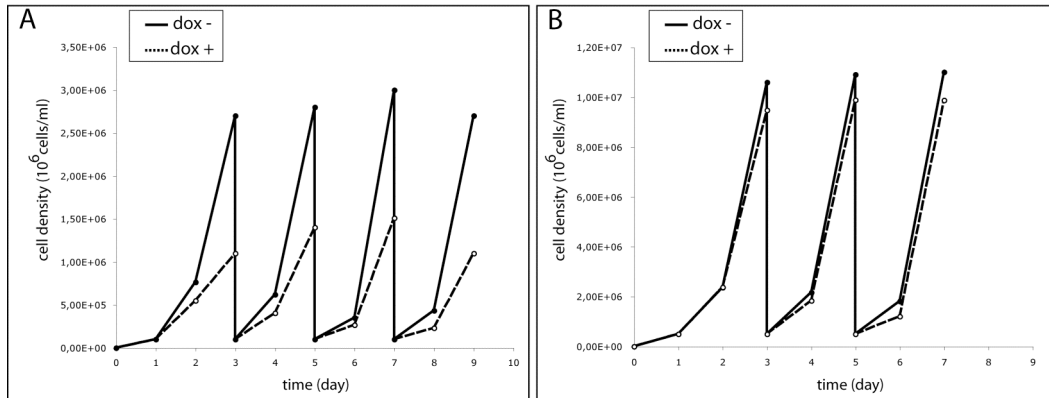


Fig 3. Effect of the SQE RNAi. **A.** Bloodstream form cells grown in the presence of 5% dialyzed serum and 10% serum plus. **B.** Procyclic trypanosomes grown in 10% of LPDS.

Table 3.

Strain ^b	1K1N	2K1N	2K2N	XNMK
WT	60	28	8	1
WT + Terb	25	10	11	53
SQE ^c dox-	79	9	9	3
SQE dox+	40	11	14	30

Table 3. Nuclear/kinetoplast analysis of TbSQE RNAi and cells treated with 40µM of terbinafine. % of total cell population in each strain with the following karyotype^a

^a Nuclear/kinetoplast classification was performed by immunofluorescence assays following DAPI staining to determine both nuclear and kinetoplast copy numbers.

^b WT, wild type; WT+Terb, 40µM of terbinafine 48h;

^c p2T7/TbSQE BSF (bloodstream) trypanosomes were induced for 3 days.

Figure 4.

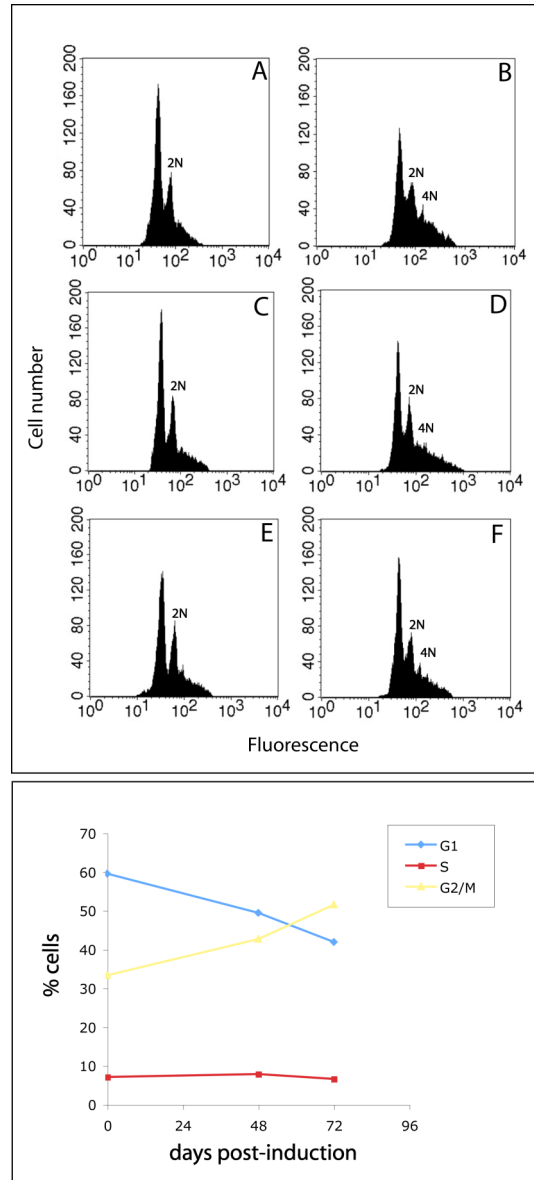


Fig 4. Flow cytometry analysis of the control, terbinafine treated and TbSQE RNAi bloodstream form cells. A, WT wild type cells; B, WT + 40 μ M terb.; C, D RNAi TbSE dox-, dox+ (48h); E, F RNAi TbSQE dox-, dox+ (72h). The plots from FACScan are shown in the upper panel, and the percentages of cells in G1, S and G2/M phases determined by BD CellQuest™Pro version 4.0.2 software (BD Biosciences) are represented in the bottom panel.

Figure 5.

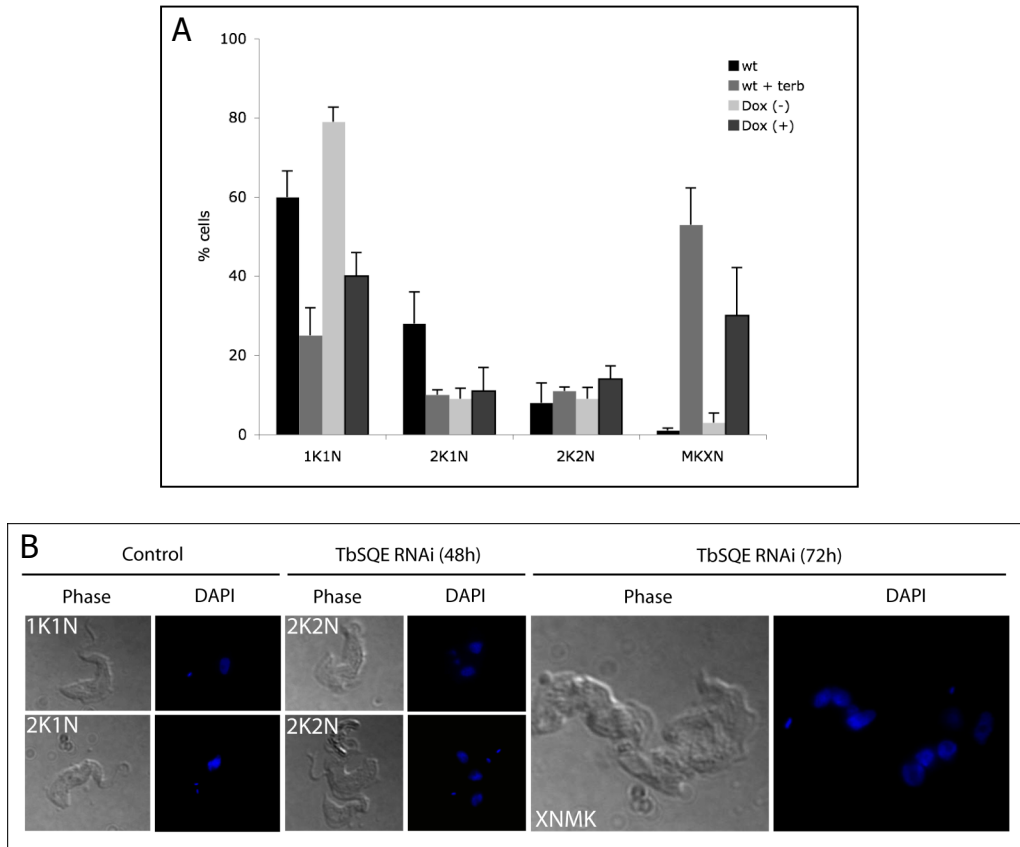


Fig 5 **(A)** Morphological phenotype of TbSQE-deficient bloodstream form cells. TbSQE bloodstream form cells were fixed with 4% paraformaldehyde, stained with DAPI (Vectashield), and examined with a fluorescence microscope. Tabulation of cells with different numbers of nuclei (N) and kinetoplasts (K) and morphology was performed. Data are presented as the mean percentages \pm standard errors (errors bars) for about 100 cells. **(B)** Morphology of the uninduced control and TbSQE-deficient cells after RNAi induction for 48 h and 72 h.

Figure 6.

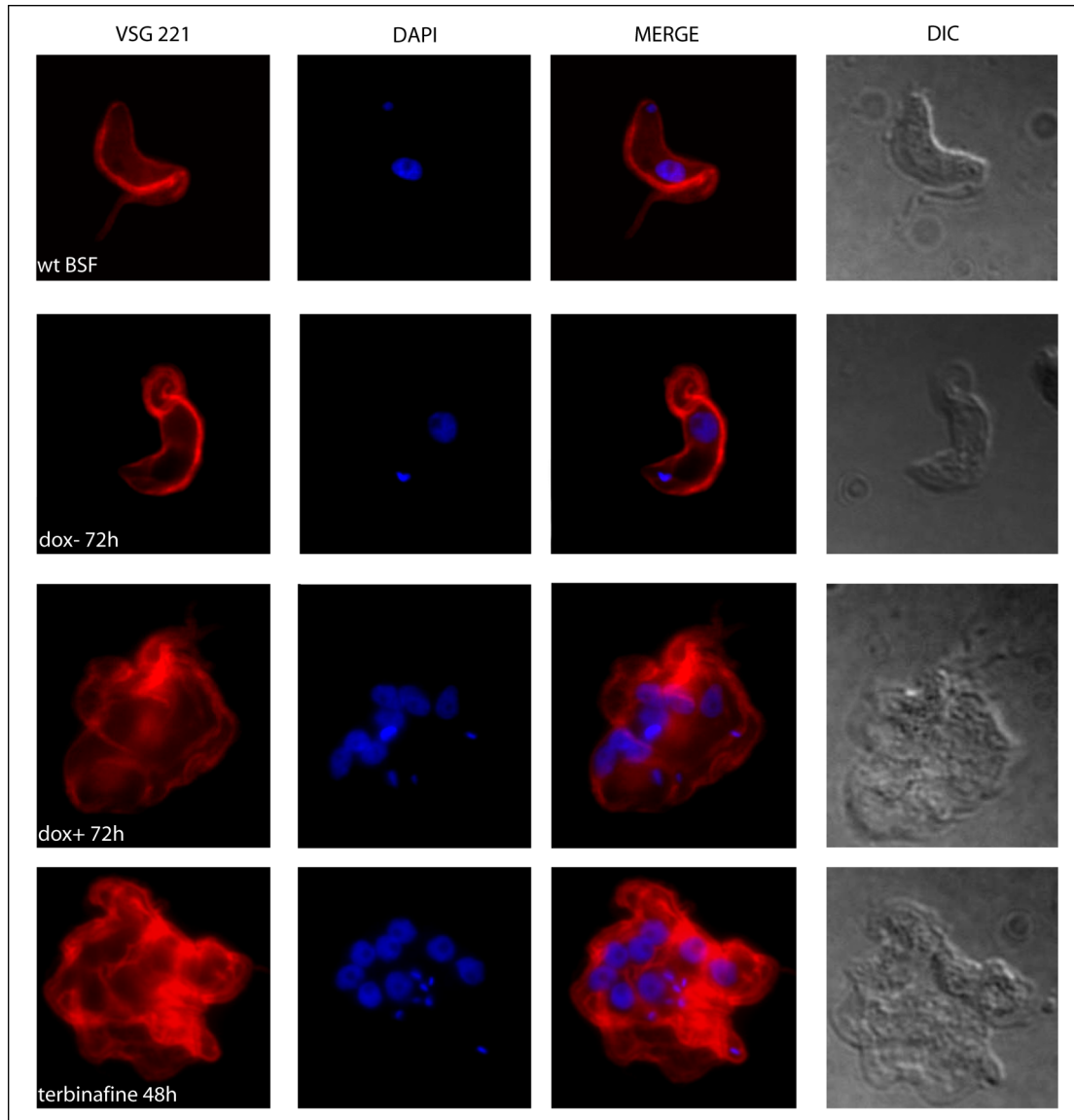


Fig 6. Effect of TbSQE RNAi down regulation and terbinafine on morphology and cell cycle progress in bloodstream form. The RNAi was induced with doxycycline for 72 h. The terbinafine was added a final concentration of $40\mu\text{M}$ on DMSO. Cells were visualized by using differential interference contrast (DIC). DNA was stained with DAPI. The VSG coat was recognized by an anti-VSG221 primary antibody and Alexa-594 secondary antibody.

Figure 7.

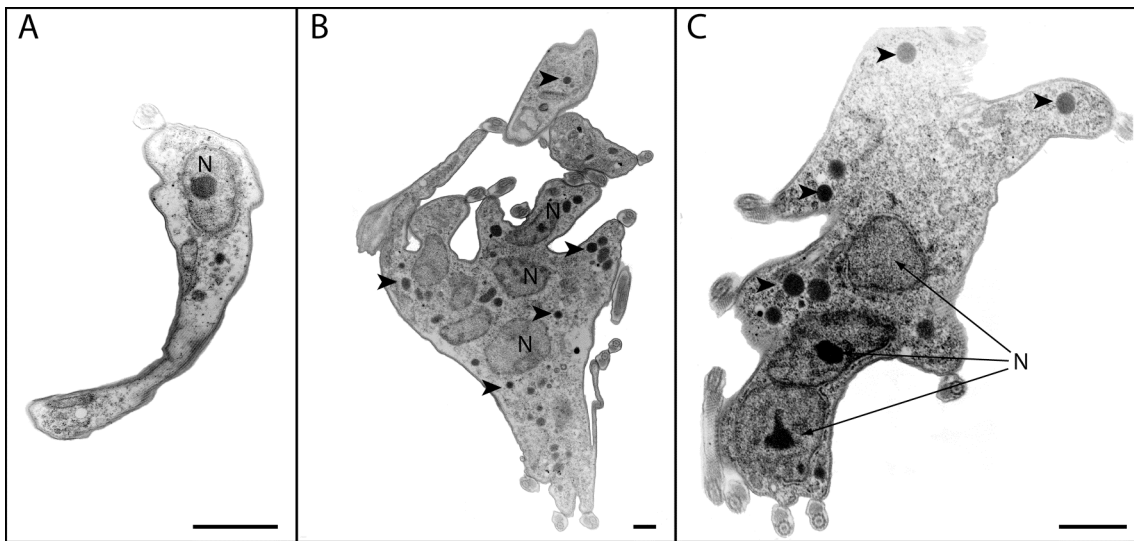


Fig 7. TEM of Epon-Embedded *T. brucei* bloodstream form cells, ultrathin sections of *T. brucei* bloodstream control (A) and treated with 40 μM of terbinafine for 48 h (B,C). N, nucleus; FP, flagellar pocket; BB, basal bodies; arrows lipid vacuoles/droplets. Bars in TEM represent 0,5 μM each.

Figure 8.

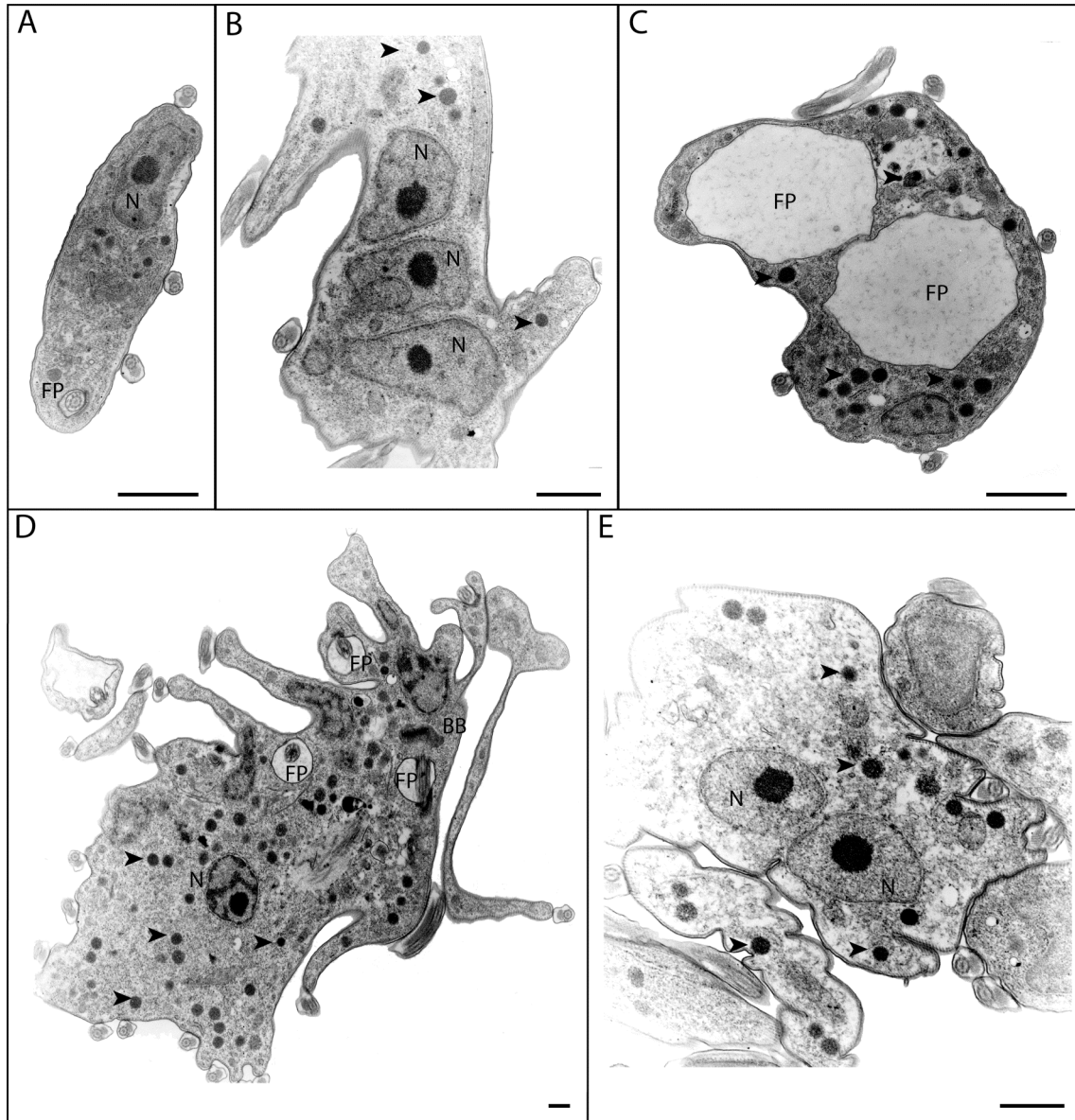


Fig 8. TEM of Epon-Embedded *T. brucei* bloodstream form cells, ultrathin sections of *T. brucei* bloodstream SQE RNAi cells; uninduced (A), induced for 72h (B-E). N, nucleus; FP, flagellar pocket; BB, basal bodies; arrows, lipid vacuoles/droplets. Bars in TEM represent 0,5 μM each.

Figure 9.

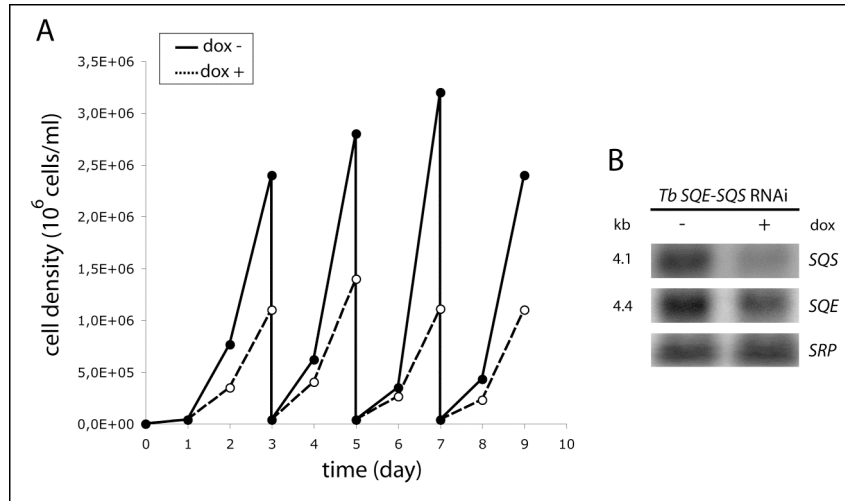


Fig 9. **A.** Growth curves of bloodstream form double knockdown cells for SQS and SQE. Filled circles and unbroken lines, control cells grown without Dox; open circles and broken lines, cells in the presence of 1 $\mu\text{g/ml}$ of Dox. Bloodstream cultures were initiated at 5×10^4 cells/ml. **B.** Northern blots showing down regulation of TbSQS and TbSQE transcript.

ANEXO I

RESULTADOS Y PUBLICACIONES RECOGIDAS EN EL PROYECTO DE TESIS DOCTORAL

IV. Ubicación subcelular de la escualeno sintasa en *Trypanosoma*

En este último trabajo describimos la localización subcelular de la SQS en *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*. La localización intracelular de las enzimas implicadas en la síntesis de esteroides en trypanosomas no ha sido totalmente dilucidada y existen ciertas controversias en cuanto al establecimiento de la compartimentalización de la ruta. Haciendo uso de un anticuerpo policlonal de conejo para la SQS de *T. cruzi*, hemos estudiado la distribución de estas enzimas utilizando técnicas de inmunofluorescencia. Tanto en *T. cruzi* como en *T. brucei*, la SQS presenta un patrón reticular, confirmado al realizar estudios de colocalización con el marcador de retículo endoplasmático proteína BiP. Nuestras evidencias claramente demuestran que las diferentes enzimas de la ruta de biosíntesis del ergosterol en Trypanosomas se encuentra en distintos compartimientos, situación que plantea en un futuro el estudio del tráfico de intermediarios como una estrategia para la intervención clínica.

Anexo IV.IV

Cellular localization of squalene synthase in trypanosoma

1. Introduction

In eukaryotic cells, sterols are important determinants of membrane properties such as fluidity and permeability, which are critical parameters for transmembrane transport and activity of membrane-bound enzymes. Enzymes of the sterol biosynthesis pathway are attractive targets for the specific treatment of fungus and parasites, because the aetiological agents for these diseases require endogenous ergosterol and other 24-alkylated sterols for growth and survival and are unable to use the abundant supply of cholesterol present in the mammalian hosts. There are differences in the enzymes in the biosynthetic pathways of ergosterol and cholesterol, and a number of enzymes in the ergosterol biosynthetic pathway have been investigated as potential drug targets for these organisms and have shown to have great promise.

In multicellular eukaryotes, most enzymes involved in cholesterol biosynthesis are localized in the endoplasmic reticulum (Reinhart, Billheimer et al. 1987). The predominant sterol of the trypanosomatids is ergosterol, as well in yeast *Saccharomyces cerevisiae*, which is structural related to cholesterol in mammalian cells.

Mevalonate pathway provides precursors for the diverse spectrum of isoprenoid compounds (Sacchetti and Poulter 1997; Edwards and Ericsson 1999), isoprenoids are molecules essential to all known independent life forms. Built up from the common building block of the phosphorylated five-carbon compound isopentenyl diphosphate (IPP).

The localization of mevalonate pathway in trypanosomatids is little known and remains controversial since HMGCoA reductase (HMGR) was described in the mitochondrion in *Leishmania* (Pena-Diaz, Montalvetti et al. 2004), farnesyl pyrophosphate synthase (FPP) is located in the cytoplasm (Ortiz-Gomez, Jimenez et al. 2006) and squalene synthase and $\Delta^{24,(25)}$ -sterol methyltransferase were suggested to have a dual subcellular localization in glycosomes and mitochondrial/microsomal vesicles (Urbina, Concepcion et al. 2002).

In yeast the enzymes catalyzing the transformation of squalene, the polyisoprene precursor, to ergosterol are also believed to be microsomal proteins (Mercer 1984; Paltauf 1992), but the precise subcellular localization has not yet been described.

The 27-carbon cholesterol molecule is synthesized from acetate in a series of approximately 30 enzymatic reactions. The first sterol intermediate in the pathway, lanosterol is formed by the condensation of squalene a 30-carbon isoprenoid. This and

subsequent reactions in “post-squalene” cholesterol biosynthesis are known, or believed, to occur in the membranes of the endoplasmic reticulum (ER), while earlier steps in the biosynthetic pathway occur in the cytosol, peroxisome and/or ER membrane (Goldstein and Brown 1990) (Kovacs, Olivier et al. 2002). The compartmentalization of enzymes involved in the early steps of the cholesterol biosynthetic pathway may provide a mechanism to help regulate its synthesis.

Squalene synthase (SQS: EC 2.5.1.21) catalyzes the condensation of two molecules of farnesyl pyrophosphate to produce squalene the first committed step of the sterol pathway. This enzyme has been of great interest as a potential drug target for inhibition of cholesterol biosynthesis in humans.

The subcellular location of SQS in rat hepatic cells determined by different methods shows that SQS is present in the membrane of the ER cisternae but not in the peroxisomes (Stamellos, Shackelford et al. 1993). Previous report shows in Hep G2 cell line, that SQS resides in ER membranes which are in a part different from those containing HMG-CoA reductase (Cohen, Griffioen et al. 1992).

The intracellular site where the later steps in the sterol biosynthesis take place has not been clearly defined in trypanosomatids, although biochemical fractionations studies have suggested that the SQS is a membrane-bound enzyme in both *T. cruzi* epimastigotes and *Leishmania mexicana* promastigotes with a dual subcellular localization, being almost evenly distributed between glycosomes and mitochondrial/microsomal vesicles (Urbina, Concepcion et al. 2002).

In the present study we describe the subcellular location of squalene synthase in the trypanosomatids *T. cruzi* and *T. brucei* we show that the enzyme exhibits a major colocalization with BiP, a typical ER marker. However immunofluorescence analysis in procyclics shows the presence of significant amounts of enzyme in vesicle type structures which remain to be identified.

2. Materials and Methods

2.1 Parasites

Trypanosoma cruzi Y strain promastigotes were cultured at 28 °C in liver infusion tryptose (LIT) liquid medium supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum (Gibco). *Trypanosoma brucei* bloodstream-form 427 were cultured at 37°C 5% CO₂ in HMI-9 medium supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum (Gibco) and the procyclic-form 427 were cultivated at 28°C in SDM-79 supplemented with 10% of heat-inactivated foetal calf serum (Gibco).

2.2 Production of polyclonal TcSQS antibodies

An anti-TcSQS polyclonal antibody was raised against highly purified *T. cruzi* SQS recombinant protein (Sealey-Cardona, Cammerer et al. 2007). The immune serum was prepared in rabbits immunized with the recombinant protein. The specific antibodies were further purified using prot-A sepharoseTM CL-4B (Amersham biosciences) according to the manufacturers instructions.

2.3 Preparation of *T. cruzi* protein extracts

Total protein extract of *T. cruzi* was obtained from log-phase epimastigotes washed and resuspended in 50 mM MOPS NaOH pH 7.4, 20 mM MgCl₂, 5 mM CHAPS, 1 % Tween 80, containing proteinase inhibitors (2mM PMSF, 100µg/ml leupeptin, 5mM EDTA, 2 µg/ml aprotinin, 7 µg/ml pepstatin, 5µM o-phenanthroline, and 10µM antipain). Cells were lysed by sonication and proteins were solubilized by boiling for 10 min in lysis buffer (10% glycerol, 0.1% bromophenol blue, 2% SDS, and 100mM DTT) the protein quantification was performed using the Bradford reagent.

2.4 Immunoblotting

Twenty micrograms of total extract was subjected to 12.5% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and blotted onto a nitrocellulose membrane. Blocking and antibody incubation were performed in PBS containing 5% non-fat milk and 0.05% Tween 20. The membrane was blocked with 5% (wt/vol) nonfat powdered milk in PBS and incubated with a 1:5000 dilution of a polyclonal antibody generated against purified recombinant TcSQS. The immunoreactivity was visualized using a

secondary anti-body, anti-rabbit IgG HRP-conjugated diluted 1:5000. Bound antibody was visualized using ECLTM immunodetection reagents (Amersham).

2.5 TcSQS polyclonal antibody saturation assays

TcSQS rabbit polyclonal antibody (20 μ l; 1:150 in PBS) was incubated with 20 μ l recombinant TcSQS-6HIS protein (130 ng/ μ l final concentration) at 4°C overnight. The recombinant protein (bound or not bound to the antibody) was centrifuged for 15 minutes at 16,000 g, 4°C, or eliminated by adding 5 μ l of Ni-NTA agarose slurry and incubating for 1 hour at 4°C before centrifugation as before (Pradel, Bonhivers et al. 2006). The supernatant was used for the immunofluorescence and diluted for the western blot as described previously.

2.6 Indirect Immunofluorescence microscopy.

For the localization of TbSQS and TcSQS using deconvolution epifluorescence microscopy, parasites were collected, washed 3 times with PBS and fixed with 4% formaldehyde in PBS for 20 min at RT. The fixed cells were adhered to poly-L-lysine-coated coverslips, permeabilized using 0.1% NP-40 for 20 min and blocked using 1.5 % BSA in PBS for 1 h. After three washes the cells were incubated for 1 h with the polyclonal antibody *anti*-TcSQS (1:200) respectively. After three washes with PBS, cells were incubated in the dark with goat anti-rabbit IgG FITC-conjugated (Sigma) diluted 1:40.

For colocalization studies the polyclonal antibody BiP was used at 1:700 dilution. This antibody detects the endoplasmic reticulum resident hsp70 gene family member. After three washes with PBS, cells were incubated in the dark with goat anti-rabbit IgG FITC-conjugated (Sigma) diluted 1:40. The polyclonal antibody TcSQS was conjugated with ZenonTM Alexa Fluor 594 Rabbit IgG Labelling Kit (Molecular Probes) diluted 1:100. After three washes with PBS at room temperature in the dark, parasites were finally fixed with 4% p-formaldehyde for 20 min to avoid cross-reaction. After fixation the slides were fixed with cold methanol (Merck). Samples were treated with Vectashield[®] DAPI (Vector Laboratories) and analyzed on an Olympus microscope. Stacks (0.2- μ m z step) acquisition was performed with a microscope system (Cell R IX81; Olympus), 63x/100x objectives, illumination system (MT20; Olympus), and camera (Orca CCD; Hamamatsu). Deconvolution of images was performed using Huygens Essential software (version 3.3; Scientific Volume Imaging). All images displayed in the figures

are maximum intensity projections from digitally deconvolved multichannel 3D image datasets. Pseudocoloring and maximum intensity projections were performed using ImageJ software (version 1.37; National Institutes of Health).

3. Results

3.1 Characterization of an immune serum against TcSQS of *T. cruzi*.

The immune serum was prepared against the recombinant protein TcSQS24Q. Immunoblotting experiments were performed using the recombinant TcSQS24Q protein as antigen. Total immune serum recognized a protein with the molecular weight corresponding to His-fused TcSQS protein (around 41 kDa, Fig. 1).

3.2 Identification of TcSQS protein in *T. cruzi*

In order to verify whether total immune serum, and purified antibody recognized protein in the SQS molecular weight range (46.5 kDa), immunoblotting experiments were performed with *T. cruzi* epimastigote crude protein extracts. The serum recognized, in the wild type cells a polypeptide with the predicted molecular weight of the SQS protein. Cross reactivity with *T. brucei* extracts was also observed. Thus, the affinity purified antibody was able to recognize a 46.5 kDa protein. Western blotting studies indicated that SQS recognises a protein band of apparent relative mass of ~46 kDa from whole-cell preparations of wild-type epimastigotes cells. To ensure that SQS is specific for recombinant SQS-6HIS protein and endogenous TcSQS protein, the polyclonal antibody was first saturated with the recombinant SQS-6HIS protein then tested in western blots (Fig. 1). After saturation, no recombinant or endogenous protein *TbSQS* protein was observed, indicating that indeed the SQS antibody is specific for TcSQS protein and can therefore be used in immunolocalization experiments.

3.3 Localization of TcSQS protein in *T. cruzi* and *T. brucei*

We sought to determine the localization of SQS in *T. cruzi* epimastigotes, *T. brucei* BF and PF. Analysis of the intracellular location of SQS was performed by indirect immunofluorescence. Images show a network-like or reticular pattern. Colocalization studies using an antibody directed towards the protein BiP, evidences that the pattern for SQS resembles that of an endoplasmic reticulum enzyme (Fig 2-4).

4. Discussion

Protein subcellular localization is a key functional characteristic of proteins. The spatial and temporal regulation of biochemical reactions in eukaryotic cells is achieved by high degree of compartmentation. This structural differentiation facilitates interactions and yet allows the segregation of different biochemical networks. The cholesterol/isoprenoid biosynthetic pathway has been the subject of extensive studies in the previous decades due the panoply of functions of the cholesterol, its metabolites, and its intermediate biosynthetic precursors in the proper functioning of cells and organism.

In the present study we describe the properties and the subcellular localization of SQS in the trypanosomatids *T. cruzi* and *T. brucei*. The intracellular localization of the different enzymes involved in sterol biosynthesis in trypanosome has not been fully characterized and certain controversy exist regarding the establishment of the compartmentalization of the different enzymes that take part in this pathway. Studies on the 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase, involved in mevalonate synthesis, using several approaches in *T. cruzi* and *L. major* clearly indicate the association of this enzyme to the mitochondrial matrix (Pena-Diaz, Montalvetti et al. 2004). Additionally, farnesyl diphosphate synthase is a cytosolic enzyme in *L. major* (Ortiz-Gomez, Jimenez et al. 2006). Previous studies performed in *T. cruzi* have suggested that SQS and SMT are located in the glycosome and the mitochondrion as determined by biochemical fractionation (Urbina, Concepcion et al. 2002).

In this study, we have use indirect immunofluorescence in different trypanosomes for determining the intracellular distribution of SQS. In mammalian cells, the enzymes involved in cholesterol biosynthesis were initially believed to be confined to either the ER or cytosol (Olivier, Kovacs et al. 2000). Studies performed by biochemical fractionations in *T. cruzi* epimastigotes and *Leishmania mexicana* promastigotes have revealed a dual subcellular localization, being almost evenly distributed between glycosomes and mitochondrial/microsomal vesicles (Urbina, Concepcion et al. 2002). Prediction using PSORT II of ER retention signal sequences such as, SKL and SKL2, showed that the *T. cruzi* and *T. brucei* enzymes lack any of these export signals. The indirect immunofluorecence analysis revealed a reticular pattern which in colocalization studies clearly overlaps with that of BiP, a trypanosomal homologue of the hsp70 ER protein. In agreement with this observation using *T. brucei* BFS and PF the pattern clearly colocalized with the reticular marker BiP. Our present findings clearly show that

sterol proteins are distributed in multiple compartments. Further elucidation of the sterol biosynthetic pathway will allow for the exploitation of product trafficking as a strategy for clinical intervention.

References

Cohen, L. H., M. Griffioen, et al. (1992). "Subcellular localization of squalene synthase in human hepatoma cell line Hep G2." Biochim Biophys Acta **1126**(1): 114-8.

Edwards, P. A. and J. Ericsson (1999). "Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway." Annu Rev Biochem **68**: 157-85.

Goldstein, J. L. and M. S. Brown (1990). "Regulation of the mevalonate pathway." Nature **343**(6257): 425-30.

Kovacs, W. J., L. M. Olivier, et al. (2002). "Central role of peroxisomes in isoprenoid biosynthesis." Prog Lipid Res **41**(5): 369-91.

Mercer, E. I. (1984). "The biosynthesis of ergosterol." Pestic. Sci. **15**: 133-155.

Olivier, L. M., W. Kovacs, et al. (2000). "Identification of peroxisomal targeting signals in cholesterol biosynthetic enzymes. AA-CoA thiolase, hmg-coa synthase, MPPD, and FPP synthase." J Lipid Res **41**(12): 1921-35.

Ortiz-Gomez, A., C. Jimenez, et al. (2006). "Farnesyl diphosphate synthase is a cytosolic enzyme in *Leishmania major* promastigotes and its overexpression confers resistance to risedronate." Eukaryot Cell **5**(7): 1057-64.

Paltauf, F., Kohlwein, S.D., and Henry, S.A. (1992). Regulation and compartmentalization of lipid synthesis in yeast. The molecular and Cellular Biology of the saccharomyces: Gene Expression, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Pena-Diaz, J., A. Montalvetti, et al. (2004). "Mitochondrial localization of the mevalonate pathway enzyme 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase in the Trypanosomatidae." Mol Biol Cell **15**(3): 1356-63.

Pradel, L. C., M. Bonhivers, et al. (2006). "NIMA-related kinase TbNRKC is involved in basal body separation in *Trypanosoma brucei*." J Cell Sci **119**(Pt 9): 1852-63.

Reinhart, M. P., J. T. Billheimer, et al. (1987). "Subcellular localization of the enzymes of cholesterol biosynthesis and metabolism in rat liver." J Biol Chem **262**(20): 9649-55.

Sacchettini, J. C. and C. D. Poulter (1997). "Creating isoprenoid diversity." Science **277**(5333): 1788-9.

Sealey-Cardona, M., S. Cammerer, et al. (2007). "Kinetic characterization of squalene synthase from *Trypanosoma cruzi*: selective inhibition by quinuclidine derivatives." Antimicrob Agents Chemother.

Stamellos, K. D., J. E. Shackelford, et al. (1993). "Subcellular localization of squalene synthase in rat hepatic cells. Biochemical and immunochemical evidence." J Biol Chem **268**(17): 12825-36.

Urbina, J. A., J. L. Concepcion, et al. (2002). "Squalene synthase as a chemotherapeutic target in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*." Mol Biochem Parasitol **125**(1-2): 35-45.

Figure Legends

Figure 1. Analysis of TcSQS polyclonal antibody specificity. Western blotting of purified recombinant TcSQS protein (lanes 2 and 4) and *T. cruzi* epimastigote crude protein extract (lanes 1 and 3) with or without pre-incubation with TcSQS recombinant protein (saturation assay).

Figure 2. Indirect immunofluorescence microscopy of *T. cruzi* epimastigote SQS and BiP. SQS (Alexa-594) using the TcSQS antibody directly conjugated to the fluorochrome (Zenon-Molecular Probes) diluted 1:100. ER protein marker BiP antibody (FITC) diluted 1:700, indicating the localization of TcSQS in the endoplasmatic reticulum.

Figure 3. Indirect immunofluorescence microscopy of *T. brucei* bloodstream-form SQS and BiP. SQS (Alexa-594) using the TcSQS antibody directly conjugated to the fluorochrome (Zenon-Molecular Probes) diluted 1:100. ER protein marker BiP antibody (FITC) diluted 1:700, indicating the localization of *Tb*SQS in the endoplasmatic reticulum.

Figure 4. Indirect immunofluorescence microscopy of *T. brucei* procyclic-form SQS and BiP. SQS (Alexa-594) using the TcSQS antibody directly conjugated to the fluorochrome (Zenon-Molecular Probes) diluted 1:100. ER protein marker BiP antibody (FITC) diluted 1:700, indicating the localization of *Tb*SQS in the endoplasmatic reticulum.

Figure 1.

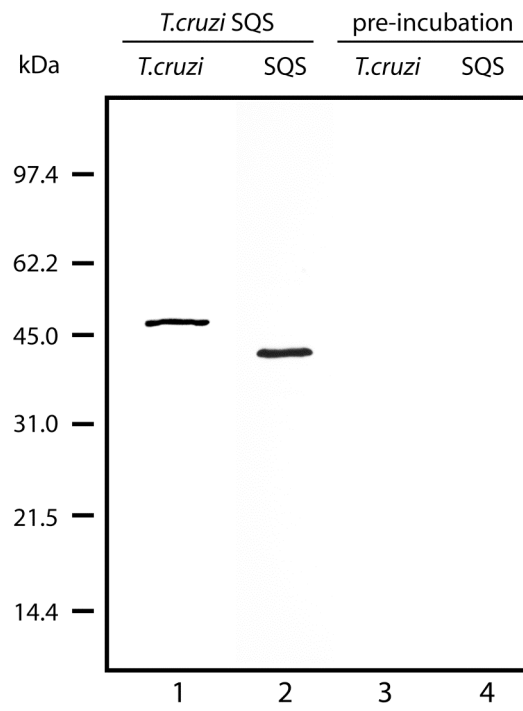


Figure 2.

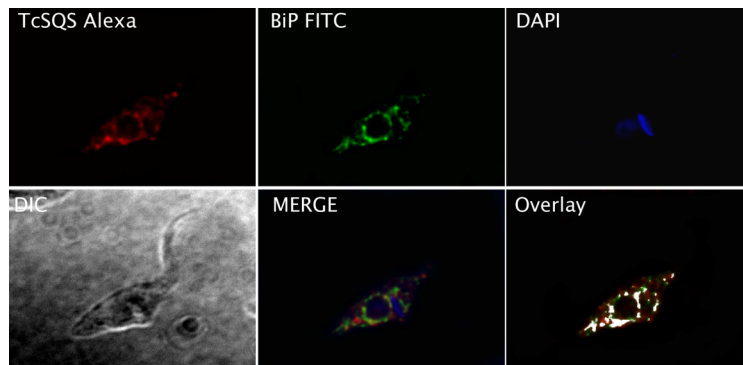


Figure 3.

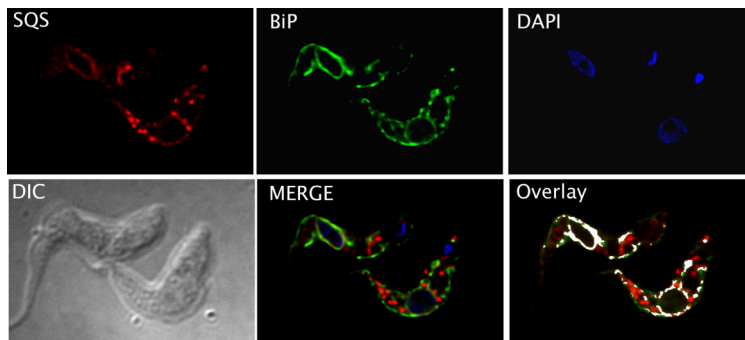
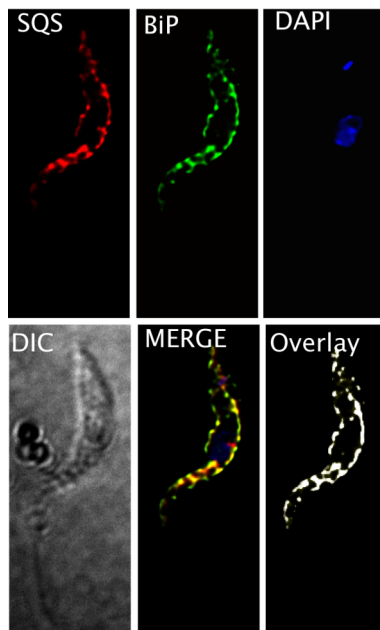


Figure 4.



DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

En los últimos 25 años se ha producido un enorme avance en el conocimiento de la bioquímica y biología celular de *T. cruzi* y organismos relacionados como *Trypanosoma brucei* y varios miembros del género *Leishmania*, incluyendo el establecimiento del genoma completo de esos organismos, recientemente publicado (Berriman, Ghedin et al. 2005; El-Sayed, Myler et al. 2005; Ivens, Peacock et al. 2005).

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

Estudios llevados a cabo en las últimas dos décadas han demostrado consistentemente que especies de la familia Trypanosomatidae requieren esteroides específicos para mantener su viabilidad y capacidad de proliferación a lo largo de todo su ciclo de vida y que inhibidores específicos de la biosíntesis de ergosterol (IBE) son potentes agentes antiproliferativos frente a protozoos parásitos, tanto *in vitro* como *in vivo* (Urbina, Payares et al. 1996; Urbina 2002; Urbina and Docampo 2003; Croft, Barrett et al. 2005; Orenes Lorente, Gomez et al. 2005). Su efectividad radica en el hecho de que estos organismos presentan como esteroide mayoritario el ergosterol mientras que en células de mamífero, el colesterol constituye el máximo componente de membranas. Las necesidades de ergosterol no pueden ser sustituidos por el colesterol del medio lo que convierte a la biosíntesis de isoprenoides y esteroides en un proceso esencial.

Este trabajo de tesis se ha centrado en el estudio de varias enzimas que actúan en etapas de la biosíntesis de esteroides posteriores a la síntesis de farnesil difosfato: la escualeno sintetasa, la escualeno epoxidasa y la esteroide metil transferasa. El objetivo principal ha

sido profundizar en su potencial como blancos de acción de fármacos y evaluar el papel biológico de las etapas tardías de la biosíntesis de esteroides en el ciclo celular y la proliferación en tripanosoma.

Un grupo prometedor de IBEs son los inhibidores la escualeno sintetasa (SQS). La SQS cataliza el primer paso específico de la síntesis de esteroides y ha sido el objeto de un elevado número de estudios, tanto en el sector académico como en el industrial, dado su potencial como blanco de nuevos agentes hipocolesterolémicos. Estos compuestos tendrían significativas ventajas sobre las estatinas actualmente disponibles al no inhibir la síntesis de compuestos esenciales para la proliferación celular que se forman a partir del ácido mevalónico ya que actuarían sobre la porción de la ruta que es específica de síntesis de esteroides.

Estudios previos han establecido su utilidad como blanco quimioterapéutico en *T. cruzi* y *Leishmania mexicana*, usando el inhibidor prototipo 3-(biphenyl-4-yl)-3-hydroxyquinuclidine (BPQ-OH) (Fig. V.1). (Urbina, Concepcion et al. 2002).

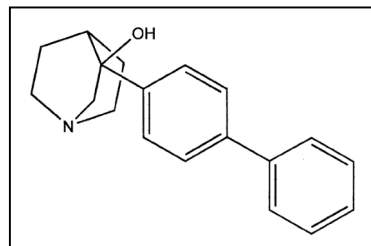


Figura V.1 | 3-(biphenyl-4-yl)-3-hydroxyquinuclidine (BPQ-OH).

Expresión, purificación y caracterización de la proteína recombinante SQS de *Trypanosoma cruzi*

La escualeno sintasa ha sido caracterizada previamente en diversos eucariotas y en todos los casos constituye una proteína de membrana presente de forma mayoritaria en el retículo endoplasmático. La enzima es monomérica y se encuentra considerablemente conservada entre especies. La disponibilidad de la estructura tridimensional de la SQS humana nativa y en forma de complejo con varios inhibidores (Pandit, Danley et al. 2000) ha permitido identificar los residuos del sitio activo implicados en la catálisis

además de proponer un mecanismo de la reacción. Aunque la similitud de secuencia con otras prenil transferasas es baja, la SQS humana exhibe una elevada homología estructural con esta clase de enzimas (Pandit, Danley et al. 2000). La SQS de *Trypanosoma cruzi* tiene una masa molecular deducida a partir de la secuencia de aminoácidos de 46.5 kDa y un pI de 5.9. Presenta una identidad de 37% con la proteína humana y un 34% con la proteína de *S. cerevisiae* y posee los motivos conservados característicos de prenil transferasas como dos regiones ricas en residuos de aspártico implicadas en la unión del sustrato prenilo (Fig. V.2).

Para estudiar la proteína de *T. cruzi* y generar altas cantidades de enzima soluble para su caracterización cinética y estudios con inhibidores, se han construido diferentes versiones truncadas de la enzima que carecen de los dominios de membrana y que conservan el dominio catalítico. Una estrategia parecida ha sido utilizada para la expresión de las enzimas de levadura y humana (LoGrasso, Soltis et al. 1993; Thompson, Danley et al. 1998).

Así, en el caso de la SQS de levadura la eliminación de 24 aminoácidos del amino terminal vía manipulación genética dio lugar a una enzima soluble y activa, representando un 20% de la proteína total de *E. coli* (LoGrasso, Soltis et al. 1993). En el caso de la SQS humana fue necesario la eliminación de 47 aminoácidos del extremo amino y 30 aminoácidos del extremo carboxilo para producir proteína soluble que conservaba las mismas propiedades catalíticas de la enzima nativa (Thompson, Danley et al. 1998). La posibilidad de eliminar aminoácidos tanto del extremo amino como del carboxilo de la SQS revela la flexibilidad que posee esta enzima y la existencia de un dominio catalítico robusto el cual no se ve alterado por la eliminación de los dominios de membrana.

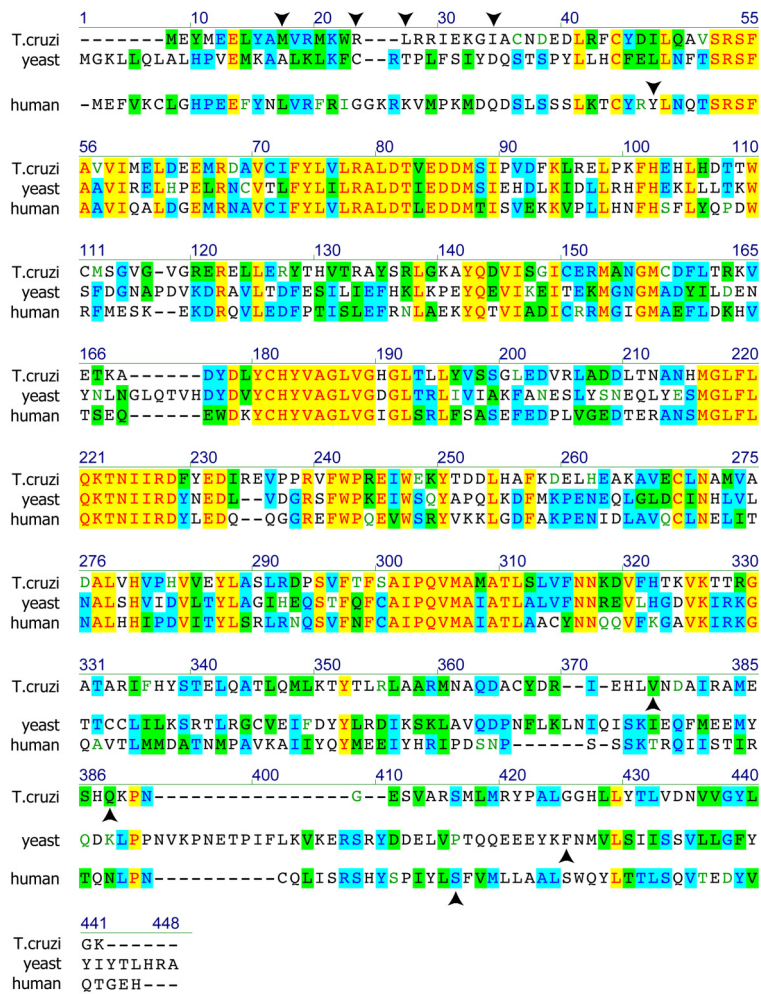


Figura V.2| Alineamiento de las secuencias de SQS de *Trypanosoma cruzi* (XP806809), *S. cerevisiae* (CAA42583) y humana (I52090). Las secuencias fueron alineadas utilizando el modulo AlingX del programa Vector NTI (Invitrogen™). Las flechas señalan los sitios de los truncamientos.

Estudios de perfiles de hidrofobicidad, evidencian que las SQS de *T. cruzi* posee regiones hidrofóbicas en ambos extremos que presumiblemente están encargadas de interactuar con la membrana no estando implicadas en la unión de los sustratos o el sitio catalítico.

Con la finalidad de producir proteína soluble y activa, fue necesario realizar varias construcciones (Fig. V.3). De las distintas proteínas truncadas analizadas existen dos versiones que generaron proteína soluble y activa y corresponden a proteínas donde se eliminaron 17 y 36 ó 24 y 36 aminoácidos del extremo amino y carboxilo

respectivamente. En estudios de optimización de la expresión fue la construcción 24-36 la que dio lugar a mayor cantidad de proteína soluble y por tanto fue la utilizada en los estudios de caracterización cinética y de análisis de interacción con inhibidores.

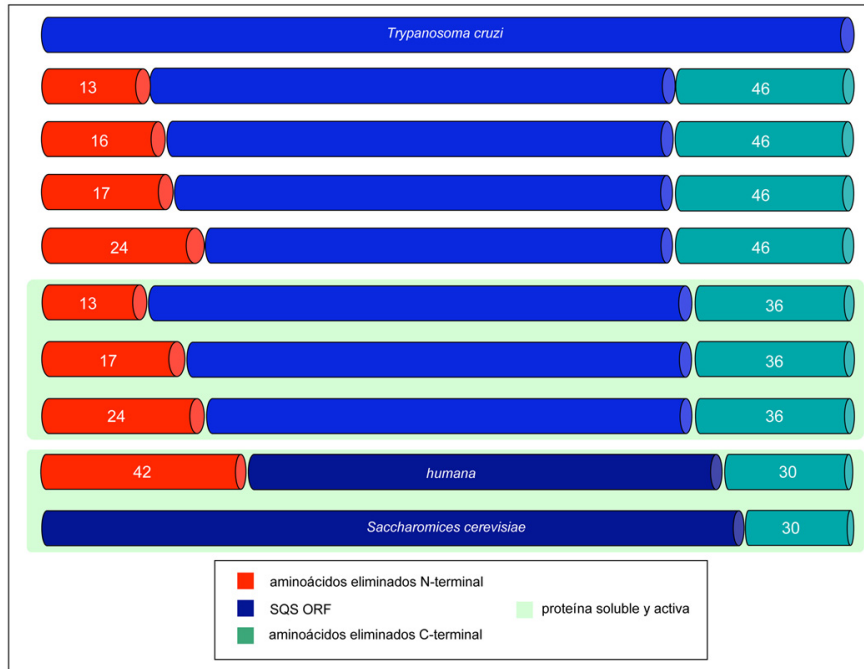


Figura V.3| Truncamientos de la SQS de *Trypanosoma cruzi*, humana y *S. cerevisiae*.

Para la construcción del sistema de expresión se utilizó el vector pET28a (Novagen) que añade una cola de 6 histidinas al extremo N-terminal de la proteína y permite la producción de elevadas cantidades de proteína soluble. Tras la construcción del plasmido pETTcSQS24/36, se llevo a cabo la transformación de bacterias *E. coli* BL21 (DE3) RP diseñadas para la expresión de proteínas eucariotas con un alto contenido de G y C. Se indujo la expresión de la proteína TcSQS durante 4 horas a 24 °C ya que en estas condiciones se obtiene el máximo de proteína soluble y activa. En estas condiciones de inducción la cantidad de SQS representa aproximadamente un 30% del total de proteína soluble.

Gracias a la presencia de la cola de histidinas en la SQS recombinante, tras un primer paso de purificación mediante la utilización de una columna de afinidad de níquel, se obtuvo proteína con un grado de pureza cercano a un 70%. Un paso de purificación con una columna de intercambio aniónico Mono-Q (Pharmacia) permitió obtener proteína

con grado de pureza cercano al 99%. La enzima purificada almacenada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en presencia de 40% de glicerol mantiene la actividad específica constante durante largos periodos de tiempo. La masa molecular de la proteína recombinante obtenida de esta manera con la cola de histidinas fue de 41.6 kDa.

La V_{max} obtenida para la TcSQS recombinante purificada fue de $1.428.56\text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ lo que da una k_{cat} de $1.05 \pm 0.16\text{ s}^{-1}$. Este valor de k_{cat} es del mismo orden que el descrito para SQS de otros organismos como la humana 1.44 s^{-1} (Thompson, Danley et al. 1998) y de levadura 0.53 s^{-1} (LoGrasso, Soltis et al. 1993). El valor de K_{m} para el FPP fue de $5.25 \pm 1.2\text{ }\mu\text{M}$, mientras que el valor de K_{m} para el NADPH fue de $23.34\text{ }\mu\text{M}$.

Estudios de inhibición *in vitro* de la TcSQS

Se han desarrollado múltiples compuestos inhibidores de la SQS dado su enorme potencial hipocolesterolémico. Compuestos de la familia de los ácidos zaragóxicos, los bisfosfonatos y, más recientemente, las quinuclidinas han sido ampliamente caracterizados como inhibidores de la SQS de diferentes especies.

Como ejemplos cabe citar que la K_{i} para el ácido zaragóxico A frente a la SQS de hepatocitos de rata es de 0.072 nM , de hecho, se le considera el más potente inhibidor de esta enzima, inhibiéndola irreversiblemente a través de la formación de un aducto covalente (Lindsey y colaboradores (1995)),.

Los bisfosfonatos también son extremadamente potentes y ejemplos son el compuesto YM175 que funciona como un inhibidor no-competitivo con una K_{i} de 57 nM y una IC_{50} de 64 nM para la enzima de hepatocitos de rata (Amin, Cornell et al. 1992) y el BM 210955 que tiene una K_{i} de 2 nmol/L (Amin, Rutledge et al. 1997).

Por otra parte, las quinuclidinas son un grupo de inhibidores cuyo mecanismo y cinética de inhibición para la SQS de mamíferos ha sido extensamente estudiada (Brown, Clarke et al. 1996) (Ishihara, Kakuta et al. 2003) (Ishihara, Kakuta et al. 2004) (McTaggart, Brown et al. 1996).

Ward y colaboradores (1996) han mostrado que el BPQ funciona como un análogo del intermediario carbocatiónico de la reacción de la SQS con la cadena lateral hidrofóbica ocupando el sitio de unión del farnesilo, y el nitrógeno cargado simulando el carbocación .

Estudios iniciales realizados por Urbina y colaboradores han demostrado que la BPQ-OH, quinuclidina cabeza de serie (inhibidor específico de la SQS humana) es un inhibidor potente de la SQS de *T. cruzi* y posee una alta selectividad frente a *T. cruzi* y *L. major in vitro* (Urbina, Concepcion et al. 2002). También se han probado otros análogos del BPQ-OH, en los que el grupo 3-OH ha sido eliminado dejando un enlace $\Delta^{2(3)}$ libre, obteniéndose una quinuclidina mas potente, que produce la lisis celular de promastigotes de *L. mexicana* a una concentración de 1 μ M y una IC50 frente a la enzima recombinante de *L. major* de 0.24 μ M (Orenes Lorente, Gomez et al. 2005).

Estudios más recientes utilizando derivados de BBQ-OH como el E5700 y el ER-119884 (Eisai Chemical Company. Tsukuba, Japan) pusieron de manifiesto que la cinética de inhibición frente a la enzima nativa de *T. cruzi* medida en extractos de parásitos es de tipo no-competitiva o de tipo mixto, con valores de Ki del orden nanomolar y sub-nanomolar. El efecto antiproliferativo frente a amastigotes intracelulares fue del orden nanomolar careciendo estos compuestos de efectos tóxicos frente a células vero (Urbina, Concepcion et al. 2004).

En este trabajo se ha utilizado proteína recombinante purificada a homogeneidad para analizar la inhibición *in vitro* de la SQS de *T. cruzi* por distintos derivados de quinuclidinas. Asimismo se realiza un estudio comparativo con la proteína humana estableciendo por primera vez que existen compuestos que presentan especificidad por la enzima de parásitos (Fig. V.4). Mientras que el número de compuestos ensayado es demasiado pequeño para establecer relaciones estructura actividad, estas observaciones establecen la existencia de diferencias significativas entre ambas enzimas y sientan la bases para el desarrollo de compuestos de actividad selectiva frente a *T. cruzi*.

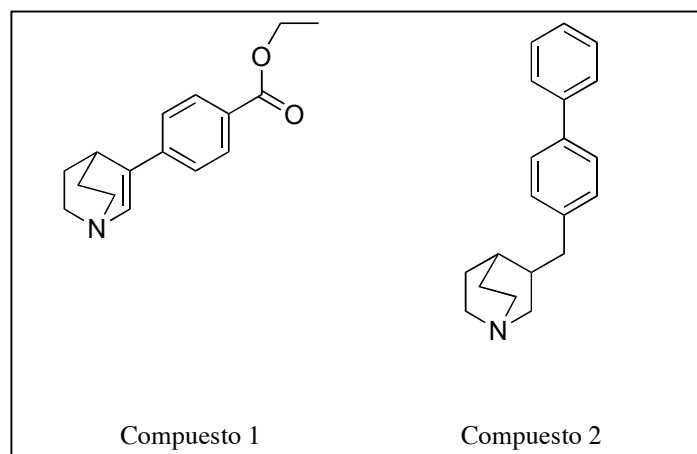


Figura V.4| Derivados de quinclidina selectivos frente a la SQS de *T. cruzi*.

El diseño de compuestos específicos eliminaría posibles problemas de toxicidad asociados a la acumulación del sustrato farnesil difosfato en células de mamífero. El aumento de estos compuestos genera la excreción en animales de ácidos dioicos que deriva del farnesol por un mecanismo de ω -oxidación (Gonzalez-Pacanowska, Arison et al. 1988). El farnesol se genera a partir del FPP por la actuación de una farnesil pirofosfatasa y el mecanismo de formación del ácido farnesoico es P450 dependiente (Bansal and Vaidya 1994). El farnesol induce un elevado número de actividades biológicas que incluyen la inhibición del crecimiento e inducción de la apoptosis (Voziyan, Haug et al. 1995). Asimismo actúa de agonista del receptor nuclear “farnesoid X-activated receptor” (Tozawa, Ishibashi et al. 1999) y del receptor de proliferación peroxisomal (Hanley, Jiang et al. 1997), que tienen importantes funciones metabólicas. También se ha descrito que el farnesol constituye una molécula señalizadora en *Candida albicans* (Hornby, Jensen et al. 2001) donde regula la morfología celular y el crecimiento. Otros efectos asociados a la utilización de inhibidores de la síntesis de esteroides son casos de hepatotoxicidad (Ishihara, Kakuta et al. 2003) y posibles alteraciones derivadas de una deficiente síntesis de hormonas esteroideas.

En definitiva la utilización de compuestos selectivos frente a la SQS de *Trypanosoma cruzi* constituye una nueva aproximación al desarrollo de compuestos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Una tremenda ventaja de este planteamiento es

la disponibilidad de una gran colección de inhibidores que han sido ya desarrollados como hipocolesterolémicos. En una aproximación conocida como “piggy back” se pueden aprovechar los conocimientos ya desarrollados para explorar el potencial antiprotozoario de estos compuestos. Estudios en fase de desarrollo en el laboratorio están evaluando el potencial de un conjunto amplio de quinuclidinas frente a *Leishmania*, *T. cruzi* y *T. brucei* lo que permitirá delimitar de manera más concreta el tipo de compuestos que podrían ser utilizados como antiparasitarios. La existencia de proteína recombinante permitirá el planteamiento de “screenings” de medio y alto rendimiento que ayudarán en la identificación de compuestos selectivos.

Estudio del mecanismo de acción de los azasteroles en *Trypanosoma brucei*

Las principales diferencias existentes entre el ergosterol y el colesterol son la presencia en el ergosterol de un grupo metilo en el carbono 24 y de dobles enlaces en posición 5 y 7 y en la cadena lateral (posición 22). El colesterol sin embargo sólo tiene un doble enlace en la posición 5 (Fig. V.5). A pesar de que estas diferencias estructurales pueden parecer pequeñas, el colesterol no puede sustituir totalmente al ergosterol en la membrana de estos organismos. El ergosterol, así como los demás esteroides, interactúa con los fosfolípidos para mantener la fluidez óptima de la membrana, así como su integridad en condiciones ambientales cambiantes. Una composición subóptima de esteroides de la membrana puede ocasionar un incremento en la permeabilidad de electrolitos (Bloch 1983).

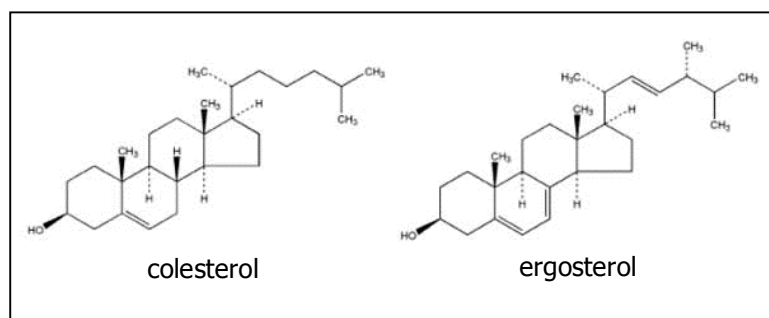


Figura V.5| Estructuras del colesterol y el ergosterol.

El ergosterol posee dos funciones principales en la membrana: a) una función estructural, asociada con los grupos acílicos de los fosfolípidos, para promover un estado de movilidad apropiado que mantiene las propiedades de selectividad y

permeabilidad de la membrana; y b) un papel metabólico o regulador, en el que pequeñas cantidades de esterol asociado con estructuras específicas son necesarias para el desempeño de actividades enzimáticas asociadas a la regulación del crecimiento y el desarrollo (Beach, Goad et al. 1988).

Rodriguez y colaboradores (Rodriguez, Low et al. 1985) han propuesto 4 papeles funcionales para el ergosterol en levaduras: una función “sparking” o capacidad de mantener y/o disparar el crecimiento; función de “dominio crítico” que hace referencia a que es requerido sólo en áreas restringidas de la membrana y función “bulk” que consiste en el mantenimiento de la estructura global y fluidez óptima de las membranas celulares. Estas funciones son altamente dependientes del grupo metilo en el carbono 24, puesto que sustituciones del grupo α -metilo por 24b- β -metilo no pueden ejercer la misma función.

En el caso particular de *T. brucei* se ha descrito que las formas sanguíneas de este parásito no son capaces de sintetizar *de novo* ergosterol y para su proliferación dependen de la captación del plasma o del medio de lipoproteínas de baja densidad (LDL) a partir de las cuales incorporan colesterol a su membrana donde constituye más de un 95% del total de esteroides analizados (Coppens and Courtoy 1995; Coppens and Courtoy 2000). Sin embargo las formas procíclicas de *T. brucei* poseen la capacidad de sintetizar *de novo* el ergosterol y también captarlo del medio. Constituye una parte importante del total de esteroides de membrana y parece ser necesario para la integridad de la misma.

Como ya se ha mencionado, una de las principales diferencias entre la ruta de biosíntesis del ergosterol y del colesterol es la presencia del grupo 24 alquilo en la cadena del ergosterol y estigmasterol. Esta modificación es introducida por la enzima Δ^{24} metil-transferasa (24-SMT), la cual está solo presente en hongos, plantas, levaduras y protozoos. En este sentido esta enzima ha sido extensamente estudiada como blanco de acción de fármacos en hongos (Oehlschlager, Angus et al. 1984; Ator, Schmidt et al. 1989; Ator, Schmidt et al. 1992; Urbina, Vivas et al. 1996).

En el presente trabajo se han probado distintos inhibidores diseñados a partir del cabeza de serie 22,26-azasterol (AZA) (Fig. V.6) frente a la forma clínicamente relevante de *T. brucei. sbsp. rhodesiense*. Todos los compuestos ensayados y (Gros, Castillo-Acosta et al. 2006) presentaron actividad *in vitro* frente a la forma sanguínea del parásito, incluso los compuestos del 1b al 1g mostraron valores de IC50 efectivos en el rango de nM. En este sentido el compuesto 1c fue el mas potente con una IC50 de 12 nM.

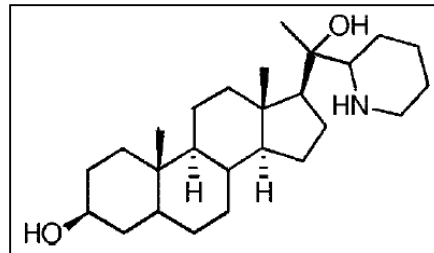


Figura V.6| 22,26 Azasterol.

Esta observación era sorprendente pues el “dogma” existente es que las formas sanguíneas no necesitan sintetizar ergosterol para crecer. Un detallado análisis de la composición de esteroides en este trabajo confirmó la ausencia de ergosterol en formas sanguíneas. Así en formas procíclicas el ergosterol constituyó un 14.3% del total de esteroides mientras que en formas sanguíneas fue indetectable y el único esteroide significativo que aparece en el análisis realizado mediante GC-MS fue el colesterol.

Tras este conjunto de observaciones se procedió a clonar la 24-SMT de *T. brucei* para desarrollar un sistema de expresión recombinante, analizar en más detalle su expresión en formas sanguíneas y establecer las características de la inhibición por esteroides. En este sentido a través de northern y western blots confirmamos que el gen de la 24-SMT se transcribe y se expresa tanto en la forma sanguínea del parásito como en la procíclica, si bien estudios densitométricos pusieron de manifiesto que se expresa 3 veces mas en la forma del insecto. Por tanto, aunque es un hecho que las formas sanguíneas de *T. brucei* carecen aparentemente de niveles detectables de ergosterol, la 24-SMT es una enzima funcional en esta forma de vida. Esta afirmación viene reforzada por el hecho de que extractos de formas sanguíneas catalizan la conversión de desmosterol radiactivo a metil-esteroides.

La disponibilidad de enzima recombinante permitió analizar el perfil de inhibición. Sin embargo, de manera sorprendente, alguno de los compuestos que mostraron ser muy activos *in vitro* frente a *T. brucei. sbsp. rhodesiense* no fueron capaces de inhibir *in vitro* la enzima. Adicionalmente, seleccionamos un par de inhibidores para probar su efecto inhibitorio sobre la enzima nativa de extractos, para evitar la posibilidad de que la enzima del parásito presentara diferencias funcionales con la enzima recombinante que justificaran las variaciones observadas. Tampoco en este caso se observa un efecto inhibitorio sobre la actividad 24-SMT. Todas estas observaciones claramente sugieren la existencia de un mecanismo de acción distinto a la inhibición de la 24-SMT.

En definitiva de este conjunto de estudios se deducen dos conclusiones. En primer lugar a pesar de la ausencia de niveles detectables de esteroides de síntesis endógena, las formas sanguíneas expresan una forma activa de 24-SMT. A esta observación se une la de otros autores que demuestran la existencia en formas sanguíneas de actividad lanosterol sintasa (Buckner, Nguyen et al. 2000) y C14 α -desmetilasa, otras dos enzimas implicadas en la síntesis de esteroides (Joubert, Nguyen et al. 2001). La existencia en la forma sanguínea de una 24-SMT funcional, puede justificarse desde el punto de vista que estas formas requieren niveles muy bajos (difícilmente detectables) de esteroides que podrían cumplir una función de tipo hormonal, de señalización y regulación conocidos como función “sparking” previamente definida (Parks, Smith et al. 1995). Por otra parte también es posible una función “dominio” donde esteroides de síntesis endógena estarán participando en la composición de microdominios de membrana implicados en funciones celulares específicas.

En segundo lugar existen mecanismos de toxicidad asociados a la actividad de los azasteroides que son independientes de la actividad 24-SMT. En este sentido se podría existir perturbaciones estructurales que implican la incorporación de los análogos de esteroides a estructuras de membrana, posiblemente en microdominios específicos, modificando sus propiedades. Alternativamente, es posible que exista dianas alternativas que incluyen enzimas implicadas en el metabolismo de esteroides como es la 24 metil esterol reductasa.

En cualquier caso a pesar de que no se conoce por ahora el mecanismo de acción exacto del grupo de azasteroles probados en este estudio, la actividad antiprotozoaria *in vitro* es muy potente y merecedor de estudios detallados que permitan el desarrollo de este tipo de compuestos para el tratamiento de la tripanosomiasis africana. La determinación del mecanismo de acción permitirá evitar posibles efectos tóxicos para que estos fármacos sean considerados en futuros ensayos clínicos.

Papel de las etapas tardías de la biosíntesis del ergosterol en la proliferación celular y morfología de *Trypanosoma brucei*

Los hallazgos descritos en *Trypanosoma brucei* en relación con el efecto de los IBEs en las distintas formas de vida plantea numerosos interrogantes en relación con el papel de la síntesis de esteroides en este parásito. Con el fin contribuir a esclarecer los requerimientos de este tipo de compuestos así como las bases moleculares de la toxicidad, se han analizado las consecuencias de la depleción de determinadas enzimas implicada en la síntesis de esteroides mediante RNAi.

Como ya se ha indicado, la SQS tiene un papel central en el metabolismo de esteroides y ha sido ampliamente estudiada con el fin de establecer las características del mecanismo de acción y su naturaleza esencial. Otra enzima que ha recibido una gran atención como diana farmacológica frente a infecciones producidas por hongos es la escualeno epoxidasa. Destacar que la terbinafina es un inhibidor de esta enzima que ha sido ampliamente utilizado como antifúngico. En definitiva el elevado potencial terapéutico de la ruta junto con las interrogantes planteadas en relación con el papel de la síntesis de esteroides en *Trypanosoma brucei* motivaron un conjunto de estudios destinados a establecer las consecuencias de la depleción de estas dos enzimas claves desde el punto de vista terapéutico.

El carácter esencial de las etapas tardías de la biosíntesis de esteroides no había sido analizado con anterioridad en tripanosomátidos. La posibilidad de poder utilizar la técnica de RNAi en *Trypanosoma brucei* está permitiendo realizar estudios de función génica que están contribuyendo a desvelar el papel de múltiples procesos y proteínas, muchas de función desconocida, tras el advenimiento del genoma de estos organismos.

El RNA de interferencia (RNAi) es un mecanismo de silenciamiento génico descubierto en *Caenorhabditis elegans* como respuesta a la presencia de RNA de doble cadena (Fire, Xu et al. 1998). Este fenómeno se ha descrito en muchos organismos como en células de mamíferos y plantas.

La introducción de RNA de doble hebra (dsRNA) en una célula inicia una compleja cascada de eventos, los cuales culminan con la degradación del RNA mensajero (mRNA) de secuencia homologa al dsRNA originalmente introducido.

En la primera fase del proceso el complejo de señalización está a cargo de una ribonucleasa tipo 3 denominada Dicer. Esta ribonucleasa fragmenta el dsRNA en porciones de 21-25 nucleótidos de longitud, denominados siRNA o RNA interferentes pequeños. Posteriormente estos siRNAs inducen la formación de un complejo de proteínas denominado RISC (del inglés RNA-Induced Silencing Complex). El complejo RISC contiene una helicasa, la cual se encarga de separar las dos hebras del siRNA. Durante este paso, el RISC puede quedarse con la hebra sentido o la antisentido del siRNA. Una vez que el RISC se queda con la hebra sencilla, este complejo produce el reconocimiento específico del mRNA una proteína con actividad de nucleasa se encarga de degradar el mRNA complementario a la secuencia del siRNA. Al degradarse el mRNA existente en la célula no se producirá nueva proteína, resultando en la depleción de esa proteína en particular (Fig. V.6)

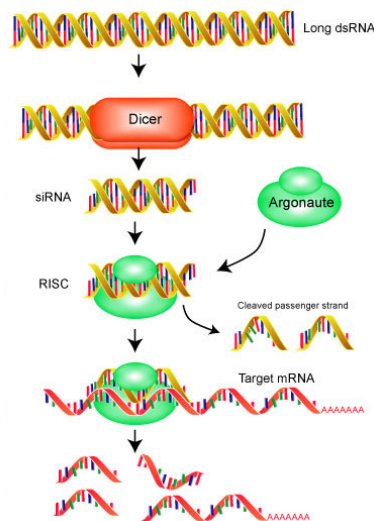


Figura V.6| Modelo del mecanismo de degradación de mRNAs mediante RNAi.

Desde su descubrimiento el RNAi ha pasado a ser una herramienta poderosa para el estudio de la función de genes. En el caso de los protozoos patógenos, actualmente *T. brucei* es el único de los tripanosomátidos que posee una maquinaria funcional de interferencia (Ngo, Tschudi et al. 1998). Actualmente existen distintas líneas celulares y vectores diseñados para estudiar la función de los genes en estos parásitos.

A pesar que el RNAi se ha convertido en una herramienta valiosa para estudiar la función génica en *Trypanosoma brucei*, hay que tener en cuenta que es un proceso de “down-regulation”, lo que significa que no se elimina en la totalidad el producto del gen. Con lo cual la eliminación de la función de un gen específico, dependerá de la abundancia de la proteína, el tiempo de vida media y la cantidad de dsRNA. Un aspecto curioso que se origina en los experimentos de interferencia en *T. brucei* es el posibilidad de seleccionar poblaciones que se escapen al fenómeno de interferencia. Una posibilidad es que las células seleccionadas puedan haber perdido la interferencia al producirse un evento de recombinación del marcador de selección en otro lugar del genoma. Otra alternativa es que las células seleccionadas sean RNAi negativas y no son capaces de responder a la interferencia (Ullu, Tschudi et al. 2004).

En el presente estudio se ha utilizado un vector que presenta dos promotores T7 enfrentados y que permite la producción del RNA de doble cadena a partir de la transcripción en ambos sentidos de la secuencia diana. La expresión del RNAi de doble cadena es inducible por doxiciclina (Alibu, Storm et al. 2005). Esta tecnología unido al desarrollo de técnicas de manipulación genética en estos organismos permite estudios de genómica funcional incluso extrapolables a otros organismos de la familia Trypanosomatidae. En lo que a biosíntesis de esteroides se refiere, las formas procíclicas de *Trypanosoma* son semejantes a los promastigotes de *Leishmania* y a los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* ya que estas tres formas de vida contiene cantidades significativas de ergosterol en sus membranas y requieren la síntesis *de novo* para sobrevivir.

Hasta la fecha el único estudio existente que analiza la esencialidad de la ruta de biosíntesis de esteroides en *Trypanosoma brucei* es el trabajo que demuestra la esencialidad de la FPPS en *Trypanosoma brucei*, realizado por el grupo de Docampo y colaboradores (Montalvetti, Fernandez et al. 2003). En este artículo validan la FPPS

como diana para el desarrollo de fármacos utilizando técnicas de RNAi, al observar que la disminución de los niveles de FPPS generan una pérdida de viabilidad. La depleción de la FPPS tiene múltiples efectos ya que esta enzima es la encargada de sintetizar el FPP que sirve de sustrato para la formación del dolicol, la ubiquinona, al grupo hemo y el farnesilo de proteínas y ergosterol.

El carácter esencial de la isoprenilación de proteínas ha sido puesto de manifiesto en tripanosomátidos por diversos autores. Se ha demostrado que la prenilación de proteínas ocurre en tripanosomátidos y es un proceso esencial ya que inhibidores de la farnesil transferasa humana son capaces de inhibir la modificación de proteínas en *T. brucei* produciendo una inhibición en el crecimiento celular (Yokoyama, Trobridge et al. 1998). Recientemente estudios realizados en nuestro laboratorio han puesto de manifiesto la inhibición de la FPPS de *L. major* por una serie de aminobisfosfonatos (Ortiz-Gomez, Jimenez et al. 2006).

Al analizar los requerimiento de la SQS en *T. brucei* por RNA de interferencia, no se observan efectos a nivel de la proliferación celular en ninguna de las formas de vida a pesar de obtener una disminución de los niveles de mRNA cercanos al 70% en ambos casos. Es posible que niveles bajos de SQS son suficientes para mantener la proliferación celular. Estudios realizados en *Aspergillus fumigatus* utilizando inhibidores de la C14 α -desmetilasa demuestran que al añadir colesterol al medio de cultivo se rescata la viabilidad celular (Xiong, Hassan et al. 2005). En este sentido y dado que las formas procíclicas poseen una maquinaria endógena de síntesis de esteroides, lo que implica que son capaces de crecer en suero deslipidado, y considerando que su metabolismo energético y de esteroides es mas parecido al de *T. cruzi* y *Leishmania*, intentamos estudiar el efecto del RNAi de la SQS en líneas celulares adaptadas y crecidas en medio suplementado con 10% de LPSD. Tras la inducción de la interferencia en condiciones de bajos niveles de esteroides presentes en el medio de cultivo, tampoco se observó un fenotipo de pérdida de viabilidad en procíclicos.

Sorprendentemente al inducir la interferencia de la SQE en las formas sanguíneas, observamos un dramático efecto sobre el crecimiento celular. A partir del segundo día de inducción, el crecimiento de los parásitos se ve afectado y aparecen en el cultivo

trypanosomas con alteraciones morfológicas severas. Este fenotipo se reprodujo al crecer los parásitos en presencia de terbinafina, un inhibidor específico de la SQE de levaduras, observándose un fenotipo similar al obtenido mediante el RNAi de la SQE.

Diversos investigadores han propuesto que el efecto inhibitorio de la terbinafina en *C. albicans* se debe a una suma de la deficiencia en ergosterol y la acumulación de escualeno un metabolito tóxico en estas células (Akins 2005) (Leber, Fuchsbichler et al. 2003). En este sentido, intentamos ver si creciendo los parásitos en presencia de escualeno podíamos observar el mismo fenotipo. Dado la naturaleza oleica del escualeno al añadirlo al cultivo, era imposible disolverlo en el medio a altas concentraciones, lo que dificultó su captación por los trypanosomas. Por otro lado, la disminución de la expresión de la SQS realizando una doble interferencia no generó la reversión del fenotipo asumiendo que fuera generado por una acumulación de escualeno. Tampoco pudimos ver ningún cambio al colocar en el medio de cultivo 1 $\mu\text{g/ml}$ de ergosterol. De esta manera podemos sugerir que las alteraciones morfológicas observadas por la interferencia de la SQE puede deberse a la disminución de intermediarios de la ruta situados entre el epóxido de escualeno y el ergosterol.

Por otro lado los defectos en el ciclo celular, la aparición de células polinucleadas evidencian un claro defecto en la citocinesis. Existen diversas evidencias de los efectos en el ciclo celular de distintas interferencias, el efecto de la depleción de distintos genes, no necesariamente relacionados entre si producen la aparición en el cultivo de trypanosomas con formas aberradas. La caracterización de estos efectos es complicada, sin embargo, lo que está claro es el efecto que la interferencia genera sobre alguno de los sitios de control (check-point) del ciclo celular. En nuestro caso, el fenotipo es similar al obtenido en el caso de la interferencia de la TbAUK1 (aurora quinasa) en donde también se observa un defecto en la citocinesis y la aparición de células pilinucleadas (Li and Wang 2006).

El efecto que genera la depleción de la SQE en las formas sanguíneas de *T. brucei*, es la primera evidencia sobre la esencialidad de las etapas tardías de la ruta de biosíntesis del ergosterol en los trypanosomas africanos realizado por RNA de interferencia. Este hallazgo permite comprender varias incógnitas encontradas sobre el papel que cumplen en las formas sanguíneas enzimas de la biosíntesis del ergosterol ubicadas en las etapas

tardías de la ruta metabólica. Como comentamos anteriormente en el caso de la 24-SMT es una enzima que se expresa y es funcional en las formas sanguíneas de *T. brucei*, sin embargo, no es posible detectar 24-alquil esteroides en esta forma del parásito. Por otro lado, la interferencia de la SQE en sanguíneos genera un claro fenotipo de pérdida de viabilidad y alteraciones morfológicas evidentes. Estas dos evidencias nos permiten concluir que posiblemente la función que cumple esta parte de ruta en el caso de los tripanosomas africanos sanguíneos es la síntesis de *sparkling-sterols*, es decir, son intermediarios del ergosterol necesarios a muy bajas concentraciones (no detectables) que cumplen funciones de tipo hormonal y de señalización celular, importantes para la proliferación celular de estos tripanosomas.

Localización intracelular de enzimas de la biosíntesis de esteroides en *Trypanosoma cruzi*

La localización intracelular de la biosíntesis de esteroides en tripanosomátidos es un tema sujeto a controversia. En el caso de la enzima HMG-CoA reductasa, se ha estudiado la localización subcelular en protozoos como *T. brucei*, para el que se ha descrito su asociación a microsomas (Coppens, Bastin et al. 1995), a matriz mitocondrial (Heise and Opperdoes 2000) minoritariamente a la membrana de glicosomas y posiblemente en el retículo endoplasmático. Trabajos realizados en *T. cruzi* por Concepción y col. (1998) sugieren una localización mayoritariamente glicosomal y minoritariamente asociada a la fracción citosólica. Sin embargo, estudios detallados llevados a cabo en nuestro laboratorio tanto en *T. cruzi* como en *L. major*, utilizando técnicas de permeabilización de células intactas con digitonina e inmunomicroscopía electrónica, indican claramente una asociación predominante de la HMG-CoA reductasa con la matriz mitocondrial (Pena-Díaz, Montalvetti et al. 2004).

En relación a la localización subcelular de la FPPS en muchos organismos esta enzima se ha considerado como una enzima principalmente citosólica tanto en animales como en plantas (Hugueney, Bouvier et al. 1996), debido a la presencia de la misma en las fracciones solubles de células y tejidos; aunque también se han descrito FPPSs localizadas en cloroplastos (Sanmiya, Ueno et al. 1999) y mitocondrias de plantas (Cunillera, Arro et al. 1996).

En los últimos 10 años, trabajos realizados por Krisans y col., han puesto de manifiesto una localización mayoritariamente peroxisomal para muchas de las enzimas de la biosíntesis de isoprenoides en mamíferos, localizadas a nivel de pre-escualeno que incluye a la HMG-Co reductasa (Keller, Barton et al. 1985), la mevalonato kinasa (Biardi, Sreedhar et al. 1994), la fosfomevalonato kinasa (Olivier, Chambliss et al. 1999), la mevalonato difosfato descarboxilasa (Biardi and Krisans 1996), la isopentenil difosfato isomerasa (Paton, Shackelford et al. 1997), y la farnesil difosfato sintetasa (Krisans, Ericsson et al. 1994).

Trabajos recientes realizados en nuestro laboratorio realizados en *L. major* utilizando permeabilización de células intactas con digitonina, inmunofluorescencia indirecta y inmunomicroscopia electrónica en parásitos que sobreexpresan la FPPS, señalan que la FPPS es mayoritariamente una enzima citosólica (Ortiz-Gomez, Jimenez et al. 2006).

En el caso de las enzimas ubicadas en las etapas tardías de la biosíntesis de esterol en trypanosomas, estudios de fraccionamiento subcelular en gradiente de densidad realizados por Urbina y col. (2002) sugieren que la SQS posee una localización dual se encuentra en glicosomas y microsomas en *T. cruzi* y *L. major* (Urbina, Concepcion et al. 2002). Con respecto a la 24-SMT, estudios realizados en *S. cerevisiae* evidencian que la 24-SMT posee una localización dual, se encuentra en asociada al retículo endoplasmático y a partículas lipídicas (Leber, Landl et al. 1998). Dada esta localización dual, diversos autores proponen un modelo en el cual plantean que la distinta ubicación de las enzimas pertenecientes a las etapas tardías de la ruta, se debe al rol regulatorio cuya función es mantener homeostasis de esteroides entre las distintas membranas de los compartimientos celulares.

Los estudios de la localización intracelular de la SQS mediante inmunofluorescencia indirecta en promastigotes de *T. cruzi* y *Trypanosoma brucei* realizados en este trabajo, han puesto de manifiesto una localización claramente de retículo endoplasmático.

Diversos autores coinciden que la localización de la SQS es mayoritariamente reticular. En células hepáticas de rata se localiza en el retículo endoplasmático (Stamellos, Shackelford et al. 1993) y en la línea celular Hep G2 la SQS reside en el retículo

endoplasmático (Cohen, Griffioen et al. 1992). Nuestras observaciones son consistentes con los resultados obtenidos por Cohen y col. (1992) y Stamellos y col. (1993), sin embargo, difieren de los obtenidos por Urbina y col. (2002). El patrón reticular obtenido utilizando es idéntica al obtenido utilizando un marcador reticular proteína BiP, incluso los experimentos de colocalización realizados en *T. brucei* también evidencian un mismo patrón. De esta manera podemos concluir que la SQS en *T. cruzi* presenta un patrón mayoritariamente reticular.

Existe un gran interés en conocer la localización de la ruta de la biosíntesis de esteroides en tripanosomátidos debido al potencial de esta ruta en el desarrollo de nuevos antiprotozoarios. La distribución encontrada de las enzimas pertenecientes a las etapas tempranas y tardías de la ruta es claramente divergente en cuanto a la de las células de mamíferos o plantas (Fig. V.6). El tráfico de intermediarios a través de los distintos compartimientos gran parte de los cuales no son capaces de difundir libremente a través de las membranas sugieren la existencia de transportadores, estas particularidades pueden ser explotadas como futuras herramientas de intervención clínica.

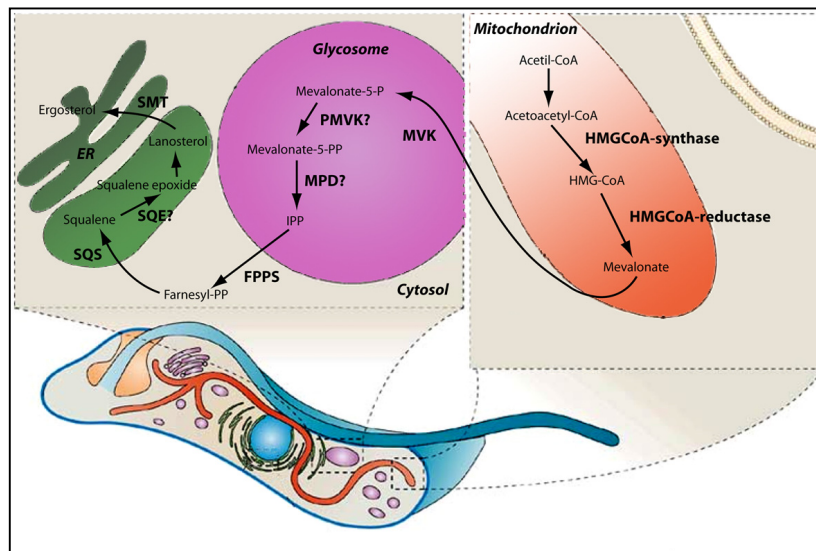


Figura V.7| Compartimentalización de la ruta de la síntesis de esteroides en tripanosomas. **HMGCoA sintasa**; 3-Hidroxi-3-metilglutaril-coenzima-A sintasa, **HMGCoA reductasa**; 3-Hidroxi-3-metilglutaril-coenzima-A reductasa, **MVK**; mevalonato kinasa, **PMVK**; fosfomevalonato kinasa, **MPD**; mevalonato difosfo decarboxilasa, **FPPS**; farnesil difosfato sintasa, **SQS**; escualeno sintasa, **SQE**; escualeno epoxidasa, **SMT**; Δ^{24} esterol metiltransferasa.

CONCLUSIONES

V.I. CONCLUSIONES

1. La eliminación de 17 y 24 aminoácidos del extremo n-terminal, junto con la eliminación de 36 aminoácidos del extremo c-terminal en la SQS de *T. cruzi*, permite obtener proteína soluble y activa.
2. El valor de Km obtenido para el FPP es de 5.25 μM y para el NADPH es de 24.47 μM con una Vmax de 1428.56 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. Estos parámetros cinéticos son del mismo orden de magnitud que los obtenidos para otras SQSs incluyendo a la truncada de levadura y la doble truncada humana.
3. Se ha identificado una serie de quinuclidinas que presentan un alto grado de inhibición (del orden nM) y son selectivas frente a la SQS de *Trypanosoma cruzi*.
4. El mecanismo de citotoxicidad de los azasteroles en *T. brucei* es independiente de la inhibición exclusiva de la de la 24-esterol metiltransferasa y sugiere nuevos modos de acción de este tipo de compuestos.
5. Las formas sanguíneas de los trypanosomas africanos carecen de niveles detectables de 24 alquil-esteroles a diferencia de las formas procíclica, a pesar de que ambas formas poseen una 24-SMT funcional.
6. Experimentos de RNA de interferencia para la SQS de *Trypanosoma brucei* no conllevan la pérdida de viabilidad celular, lo que sugiere que niveles muy bajos de la enzima son suficientes para mantener la supervivencia de estos tripanosomátidos.
7. Experimentos de RNA de interferencia de la SQE en formas sanguíneas de *Trypanosoma brucei* producen una fuerte disminución de la proliferación celular y efectos morfológicos severos, que incluyen alteraciones en el ciclo celular y la citocinesis. Dichas observaciones apuntan hacia un papel esencial de las etapas tardías de la síntesis de ergosterol en los trypanosomas africanos.

8. Los experimentos de inmunofluorescencia a realizados con epimastigotes de *T. cruzi* y formas sanguíneas y procíclicas de *T. brucei* ponen de manifiesto que la SQS se localiza en el retículo endoplasmático.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

Acuna-Johnson, A. P., A. C. Oehlschlager, et al. (1997). "Stereochemistry of yeast delta 24-sterol methyl transferase." Bioorg Med Chem **5**(5): 821-32.

Akins, R. A. (2005). "An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*." Med Mycol **43**(4): 285-318.

Alibu, V. P., L. Storm, et al. (2005). "A doubly inducible system for RNA interference and rapid RNAi plasmid construction in *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **139**(1): 75-82.

Alonso, G. D., C. A. Pereira, et al. (2001). "Arginine kinase of the flagellate protozoa *Trypanosoma cruzi*. Regulation of its expression and catalytic activity." FEBS Lett **498**(1): 22-5.

Amin, D., S. A. Cornell, et al. (1992). "Bisphosphonates used for the treatment of bone disorders inhibit squalene synthase and cholesterol biosynthesis." J Lipid Res **33**(11): 1657-63.

Amin, D., R. Z. Rutledge, et al. (1997). "RPR 107393, a potent squalene synthase inhibitor and orally effective cholesterol-lowering agent: comparison with inhibitors of HMG-CoA reductase." J Pharmacol Exp Ther **281**(2): 746-52.

Ansele, J. H., M. Anbazhagan, et al. (2004). "O-alkoxyamidine prodrugs of furamidine: in vitro transport and microsomal metabolism as indicators of in vivo efficacy in a mouse model of *Trypanosoma brucei rhodesiense* infection." J Med Chem **47**(17): 4335-8.

Athenstaedt, K., D. Zweytick, et al. (1999). "Identification and characterization of major lipid particle proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." J Bacteriol **181**(20): 6441-8.

Ator, M. A., S. J. Schmidt, et al. (1989). "Mechanism and inhibition of delta 24-sterol methyltransferase from *Candida albicans* and *Candida tropicalis*." Biochemistry **28**(25): 9633-40.

Ator, M. A., S. J. Schmidt, et al. (1992). "Synthesis, specificity, and antifungal activity of inhibitors of the *Candida albicans* delta 24-sterol methyltransferase." J Med Chem **35**(1): 100-6.

Bach, T. J., A. Boronat, et al. (1999). "Mevalonate biosynthesis in plants." Crit Rev Biochem Mol Biol **34**(2): 107-22.

Bansal, V. S. and S. Vaidya (1994). "Characterization of two distinct allyl pyrophosphatase activities from rat liver microsomes." Arch Biochem Biophys **315**(2): 393-9.

- Barrett, M. P., R. J. Burchmore, et al. (2003). "The trypanosomiases." Lancet **362**(9394): 1469-80.
- Basson, M. E., M. Thorsness, et al. (1986). "*Saccharomyces cerevisiae* contains two functional genes encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(15): 5563-7.
- Bates, E. J., E. Knuepfer, et al. (2000). "Poly(A)-binding protein I of *Leishmania*: functional analysis and localisation in trypanosomatid parasites." Nucleic Acids Res **28**(5): 1211-20.
- Beach, D. H., L. J. Goad, et al. (1986). "Effects of ketoconazole on sterol biosynthesis by *Trypanosoma cruzi* epimastigotes." Biochem Biophys Res Commun **136**(3): 851-6.
- Beach, D. H., L. J. Goad, et al. (1988). "Effects of antimycotic azoles on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania* promastigotes." Mol Biochem Parasitol **31**(2): 149-62.
- Bergstrom, J. D., C. Dufresne, et al. (1995). "Discovery, biosynthesis, and mechanism of action of the zaragozic acids: potent inhibitors of squalene synthase." Annu Rev Microbiol **49**: 607-39.
- Berriman, M., E. Ghedin, et al. (2005). "The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*." Science **309**(5733): 416-22.
- Biardi, L. and S. K. Krisans (1996). "Compartmentalization of cholesterol biosynthesis. Conversion of mevalonate to farnesyl diphosphate occurs in the peroxisomes." J Biol Chem **271**(3): 1784-8.
- Biardi, L., A. Sreedhar, et al. (1994). "Mevalonate kinase is predominantly localized in peroxisomes and is defective in patients with peroxisome deficiency disorders." J Biol Chem **269**(2): 1197-205.
- Besteiro, S., M. P. Barrett, et al. (2005). "Energy generation in insect stages of *Trypanosoma brucei*: metabolism in flux." Trends Parasitol **21**(4): 185-91.
- Bloch, K. E. (1983). "Sterol structure and membrane function." CRC Crit Rev Biochem **14**(1): 47-92.
- Bouvier-Nave, P., T. Husselstein, et al. (1998). "Two families of sterol methyltransferases are involved in the first and the second methylation steps of plant sterol biosynthesis." Eur J Biochem **256**(1): 88-96.
- Braga, M. V., J. A. Urbina, et al. (2004). "Effects of squalene synthase inhibitors on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*." Int J Antimicrob Agents **24**(1): 72-8.
- Bringaud, F. (2005). "[Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa]." Med Sci (Paris) **21**(12): 1027-8.

- Bringaud, F., L. Riviere, et al. (2006). "Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources." Mol Biochem Parasitol **149**(1): 1-9.
- Brown, G. R., D. S. Clarke, et al. (1996). "Synthesis and activity of a novel series of 3-biarylquinuclidine squalene synthase inhibitors." J Med Chem **39**(15): 2971-9.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1990). "Atherosclerosis. Scavenging for receptors." Nature **343**(6258): 508-9.
- Burleigh, B. A. and N. W. Andrews (1995). "The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells." Annu Rev Microbiol **49**: 175-200.
- Buckner, F. S., L. N. Nguyen, et al. (2000). "Cloning and heterologous expression of the *Trypanosoma brucei* lanosterol synthase gene." Mol Biochem Parasitol **110**(2): 399-403.
- Cabrera, J. A., J. Bolds, et al. (1986). "Isoprenoid synthesis in *Halobacterium halobium*. Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a concentration in response to mevalonate availability." J Biol Chem **261**(8): 3578-83.
- Cazzulo, J. J. (1992). "Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids." Faseb J **6**(13): 3153-61.
- CD Poulter, T. C., MD Thompson, RS Bard (1989). "Squalene Synthetase. Inhibition by Ammonium Analogues of Carbocationic Intermediates in the Conversion of Presqualene Diphosphate to Squalene." Journal of the American Chemical Society **111**: 3734-3739.
- Chance, M. L., Goad, L.J (1997). Sterol metabolism of *Leishmania* and trypanosomes: Potential for chemoterapeutic exploitation.. London, Cab International.
- Chappell, J., F. Wolf, et al. (1995). "Is the Reaction Catalyzed by 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase a Rate-Limiting Step for Isoprenoid Biosynthesis in Plants?" Plant Physiol **109**(4): 1337-1343.
- Chappuis, F., N. Udayraj, et al. (2005). "Eflornithine is safer than melarsoprol for the treatment of second-stage *Trypanosoma brucei gambiense* human African trypanosomiasis." Clin Infect Dis **41**(5): 748-51.
- Ciosek, C. P., Jr., D. R. Magnin, et al. (1993). "Lipophilic 1,1-bisphosphonates are potent squalene synthase inhibitors and orally active cholesterol lowering agents in vivo." J Biol Chem **268**(33): 24832-7.
- Clayton, C. E. (2002). "Life without transcriptional control? From fly to man and back again." Embo J **21**(8): 1881-8.
- Cohen, L. H., M. Griffioen, et al. (1992). "Subcellular localization of squalene synthase in human hepatoma cell line Hep G2." Biochim Biophys Acta **1126**(1): 114-8.

- Coppens, I., P. Bastin, et al. (1995). "Activity, pharmacological inhibition and biological regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **69**(1): 29-40.
- Coppens, I. and P. J. Courtoy (1995). "Exogenous and endogenous sources of sterols in the culture-adapted procyclic trypomastigotes of *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **73**(1-2): 179-88.
- Coppens, I., T. Levade, et al. (1995). "Host plasma low density lipoprotein particles as an essential source of lipids for the bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*." J Biol Chem **270**(11): 5736-41.
- Coppens, I. and P. J. Courtoy (2000). "The adaptative mechanisms of *Trypanosoma brucei* for sterol homeostasis in its different life-cycle environments." Annu Rev Microbiol **54**: 129-56.
- Cotrim, P. C., L. K. Garrity, et al. (1999). "Isolation of genes mediating resistance to inhibitors of nucleoside and ergosterol metabolism in *Leishmania* by overexpression/selection." J Biol Chem **274**(53): 37723-30.
- Croft, S. L., M. P. Barrett, et al. (2005). "Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis." Trends Parasitol **21**(11): 508-12.
- Cunillera, N., M. Arro, et al. (1996). "Arabidopsis thaliana contains two differentially expressed farnesyl-diphosphate synthase genes." J Biol Chem **271**(13): 7774-80.
- Devarenne, T. P., D. H. Shin, et al. (1998). "Molecular characterization of tobacco squalene synthase and regulation in response to fungal elicitor." Arch Biochem Biophys **349**(2): 205-15.
- Diener, A. C., H. Li, et al. (2000). "Sterol methyltransferase 1 controls the level of cholesterol in plants." Plant Cell **12**(6): 853-70.
- EJ Corey, R. V. (1976). "Application of unreactive analogs of terpenoid pyrophosphates to studies of multistep biosynthesis. Demonstration that "presqualene pyrophosphate" is an essential intermediate on the path to squalene." J. Am. Chem. Soc. **98**(5): 1291 - 1293.
- El-Sayed, N. M., P. J. Myler, et al. (2005). "Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa." Science **309**(5733): 404-9.
- Elmberger, P. G., P. Engfeldt, et al. (1988). "Presence of dolichol and its derivatives in human blood." J Lipid Res **29**(12): 1651-62.
- Engman, D. M. and J. S. Leon (2002). "Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity." Acta Trop **81**(2): 123-32.
- Favre, B. and N. S. Ryder (1997). "Cloning and expression of squalene epoxidase from the pathogenic yeast *Candida albicans*." Gene **189**(1): 119-26.

- Fevre, E. M., K. Picozzi, et al. (2006). "Human African trypanosomiasis: Epidemiology and control." Adv Parasitol **61**: 167-221.
- Fire, A., S. Xu, et al. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Nature **391**(6669): 806-11.
- Garcia, A., D. Courtin, et al. (2006). "Human African trypanosomiasis: connecting parasite and host genetics." Trends Parasitol **22**(9): 405-9.
- Gaylor, J. L. (2002). "Membrane-bound enzymes of cholesterol synthesis from lanosterol." Biochem Biophys Res Commun **292**(5): 1139-46.
- Gelb, M. H., J. D. Scholten, et al. (1998). "Protein prenylation: from discovery to prospects for cancer treatment." Curr Opin Chem Biol **2**(1): 40-8.
- Georgopapadakou, N. H. and A. Bertasso (1992). "Effects of squalene epoxidase inhibitors on *Candida albicans*." Antimicrob Agents Chemother **36**(8): 1779-81.
- Gilinger, G. and V. Bellofatto (2001). "Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms." Nucleic Acids Res **29**(7): 1556-64.
- Goad, L. J., G. G. Holz, Jr., et al. (1984). "Sterols of *Leishmania* species. Implications for biosynthesis." Mol Biochem Parasitol **10**(2): 161-70.
- Gonzalez-Pacanowska, D., B. Arison, et al. (1988). "Isopentenoid synthesis in isolated embryonic *Drosophila* cells. Farnesol catabolism and omega-oxidation." J Biol Chem **263**(3): 1301-6.
- Gotteland, J. P., C. Loubat, et al. (1998). "Sulfonamide derivatives of benzylamine block cholesterol biosynthesis in HepG2 cells: a new type of potent squalene epoxidase inhibitors." Bioorg Med Chem Lett **8**(11): 1337-42.
- Green, H. P., M. Del Pilar Molina Portela, et al. (2003). "Evidence for a *Trypanosoma brucei* lipoprotein scavenger receptor." J Biol Chem **278**(1): 422-7.
- Gros, L., V. M. Castillo-Acosta, et al. (2006). "New azasterols against *Trypanosoma brucei*: role of 24-sterol methyltransferase in inhibitor action." Antimicrob Agents Chemother **50**(8): 2595-601.
- Gu, P., Y. Ishii, et al. (1998). "Function-structure studies and identification of three enzyme domains involved in the catalytic activity in rat hepatic squalene synthase." J Biol Chem **273**(20): 12515-25.
- Hanley, K., Y. Jiang, et al. (1997). "Activators of the nuclear hormone receptors PPARalpha and FXR accelerate the development of the fetal epidermal permeability barrier." J Clin Invest **100**(3): 705-12.
- Hannaert, V., F. Bringaud, et al. (2003). "Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida." Kinetoplastid Biol Dis **2**(1): 11.

- Hartmann-Bouillon MA, B. P. (1978). "Sterol biosynthetic capability of purified membrane fractions from maize coleoptiles." Phytochemistry **17**: 1037-1042.
- Hata, S., T. Inoue, et al. (1995). "Identification of two splice isoforms of mRNA for mouse hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4)." Biochim Biophys Acta **1260**(1): 55-61.
- Haughan, P. A., M. L. Chance, et al. (1995). "Effects of an azasterol inhibitor of sterol 24-transmethylation on sterol biosynthesis and growth of *Leishmania donovani* promastigotes." Biochem J **308** (Pt 1): 31-8.
- Haughan, P. A. G., L. J. (1991). Lipid biochemistry of trypanosomatids. London, Taylor & Francis.
- Heise, N. and F. R. Opperdoes (2000). "Localisation of a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in the mitochondrial matrix of *Trypanosoma brucei* procyclics." Z Naturforsch [C] **55**(5-6): 473-7.
- Hellemond, J. J., B. M. Bakker, et al. (2005). "Energy metabolism and its compartmentation in *Trypanosoma brucei*." Adv Microb Physiol **50**: 199-226.
- Hidaka, Y., T. Satoh, et al. (1990). "Regulation of squalene epoxidase in HepG2 cells." J Lipid Res **31**(11): 2087-94.
- Higuchi Mde, L., L. A. Benvenuti, et al. (2003). "Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments." Cardiovasc Res **60**(1): 96-107.
- Horie, M., Y. Sawasaki, et al. (1991). "Hypolipidemic effects of NB-598 in dogs." Atherosclerosis **88**(2-3): 183-92.
- Horie, M., Y. Tsuchiya, et al. (1990). "NB-598: a potent competitive inhibitor of squalene epoxidase." J Biol Chem **265**(30): 18075-8.
- Hornby, J. M., E. C. Jensen, et al. (2001). "Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol." Appl Environ Microbiol **67**(7): 2982-92.
- Huguency, P., F. Bouvier, et al. (1996). "Developmental and stress regulation of gene expression for plastid and cytosolic isoprenoid pathways in pepper fruits." Plant Physiol **111**(2): 619-26.
- Ishihara, T., H. Kakuta, et al. (2003). "Syntheses of 3-ethylidenequinuclidine derivatives as squalene synthase inhibitors. Part 2: enzyme inhibition and effects on plasma lipid levels." Bioorg Med Chem **11**(17): 3735-45.
- Ishihara, T., H. Kakuta, et al. (2004). "Synthesis and biological evaluation of novel propylamine derivatives as orally active squalene synthase inhibitors." Bioorg Med Chem **12**(22): 5899-908.
- Ivens, A. C., C. S. Peacock, et al. (2005). "The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*." Science **309**(5733): 436-42.

- Iyer, V. R., M. B. Eisen, et al. (1999). "The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum." Science **283**(5398): 83-7.
- Jarstfer, M. B. B., B. S. J.; Rogers, D. H.; Poulter, C. D. (1996). "Biosynthesis of Squalene. Evidence for a Tertiary Cyclopropylcarbinyl Cationic Intermediate in the Rearrangement of Presqualene Diphosphate to Squalene." J. Am. Chem. Soc. **118**: 13089-13090.
- Jensen-Pergakes, K. L., M. A. Kennedy, et al. (1998). "Sequencing, disruption, and characterization of the *Candida albicans* sterol methyltransferase (ERG6) gene: drug susceptibility studies in erg6 mutants." Antimicrob Agents Chemother **42**(5): 1160-7.
- Joubert, B. M., L. N. Nguyen, et al. (2001). "Cloning and functional characterization of a *Trypanosoma brucei* lanosterol 14 α -demethylase gene." Mol Biochem Parasitol **117**(1): 115-7.
- Kalil, J. and E. Cunha-Neto (1996). "Autoimmunity in chagas disease cardiomyopathy: Fulfilling the criteria at last?" Parasitol Today **12**(10): 396-9.
- Keller, G. A., M. C. Barton, et al. (1985). "3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase is present in peroxisomes in normal rat liver cells." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(3): 770-4.
- Kierszenbaum, F. (2003). "Views on the autoimmunity hypothesis for Chagas disease pathogenesis." FEMS Immunol Med Microbiol **37**(1): 1-11.
- Korn, E. D., T. Von Brand, et al. (1969). "The sterols of *Trypanosoma cruzi* and *Crithidia fasciculata*." Comp Biochem Physiol **30**(4): 601-10.
- Kribii, R., M. Arro, et al. (1997). "Cloning and characterization of the *Arabidopsis thaliana* SQS1 gene encoding squalene synthase--involvement of the C-terminal region of the enzyme in the channeling of squalene through the sterol pathway." Eur J Biochem **249**(1): 61-9.
- Krisans, S. K., J. Ericsson, et al. (1994). "Farnesyl-diphosphate synthase is localized in peroxisomes." J Biol Chem **269**(19): 14165-9.
- Krisans, S. K. (1996). "Cell compartmentalization of cholesterol biosynthesis." Ann N Y Acad Sci **804**: 142-64.
- Laden, B. P., Y. Tang, et al. (2000). "Cloning, heterologous expression, and enzymological characterization of human squalene monooxygenase." Arch Biochem Biophys **374**(2): 381-8.
- Landfear, S. M. (2003). "Trypanosomatid transcription factors: waiting for Godot." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(1): 7-9.
- Leber, R., S. Fuchsbichler, et al. (2003). "Molecular mechanism of terbinafine resistance in *Saccharomyces cerevisiae*." Antimicrob Agents Chemother **47**(12): 3890-900.

- Liendo, A., G. Visbal, et al. (1999). "Sterol composition and biosynthesis in *Trypanosoma cruzi* amastigotes." Mol Biochem Parasitol **104**(1): 81-91.
- Lindsey, S. and H. J. Harwood, Jr. (1995). "Inhibition of mammalian squalene synthetase activity by zaragozic acid A is a result of competitive inhibition followed by mechanism-based irreversible inactivation." J Biol Chem **270**(16): 9083-96.
- Li, Z. and C. C. Wang (2006). "Changing roles of aurora-B kinase in two life cycle stages of *Trypanosoma brucei*." Eukaryot Cell **5**(7): 1026-35.
- LoGrasso, P. V., D. A. Soltis, et al. (1993). "Overexpression, purification, and kinetic characterization of a carboxyl-terminal-truncated yeast squalene synthetase." Arch Biochem Biophys **307**(1): 193-9.
- Lorente, S. O., J. C. Rodrigues, et al. (2004). "Novel azasterols as potential agents for treatment of *leishmaniasis* and trypanosomiasis." Antimicrob Agents Chemother **48**(8): 2937-50.
- Low, P., G. Dallner, et al. (1991). "The mevalonate pathway in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. Identification of dolichols containing 11 and 12 isoprene residues." J Biol Chem **266**(29): 19250-7.
- Mangla, A. T. and W. D. Nes (2000). "Sterol C-methyl transferase from *Prototheca wickerhamii* mechanism, sterol specificity and inhibition." Bioorg Med Chem **8**(5): 925-36.
- Marshall, J. A. and W. D. Nes (1999). "Isolation and characterization of an active-site peptide from a sterol methyl transferase with a mechanism-based inhibitor." Bioorg Med Chem Lett **9**(11): 1533-6.
- Matthews, K. R., C. Tschudi, et al. (1994). "A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes." Genes Dev **8**(4): 491-501.
- McTaggart, F., G. R. Brown, et al. (1996). "Inhibition of squalene synthase of rat liver by novel 3' substituted quinuclidines." Biochem Pharmacol **51**(11): 1477-87.
- Michels, P. A., F. Bringaud, et al. (2006). "Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids." Biochim Biophys Acta **1763**(12): 1463-77.
- Moncayo, A. and M. I. Ortiz Yanine (2006). "An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis)." Ann Trop Med Parasitol **100**(8): 663-77.
- Montalvetti, A., A. Fernandez, et al. (2003). "Farnesyl pyrophosphate synthase is an essential enzyme in *Trypanosoma brucei*. In vitro RNA interference and in vivo inhibition studies." J Biol Chem **278**(19): 17075-83.
- Mookhtiar, K. A., S. S. Kalinowski, et al. (1994). "Yeast squalene synthase. A mechanism for addition of substrates and activation by NADPH." J Biol Chem **269**(15): 11201-7.

- Nakamura, Y., J. Sakakibara, et al. (1996). "Transcriptional regulation of squalene epoxidase by sterols and inhibitors in HeLa cells." J Biol Chem **271**(14): 8053-6.
- Ngo, H., C. Tschudi, et al. (1998). "Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(25): 14687-92.
- Nes, W. D. (2000). "Sterol methyl transferase: enzymology and inhibition." Biochim Biophys Acta **1529**(1-3): 63-88.
- Nes, W. D., L. He, et al. (1998). "4,4,14 alpha-trimethyl 9 beta,19-cyclo-5 alpha-26-homocholesta-24,26-dien-3 beta-ol: a potent mechanism-based inactivator of delta 24(25)- to delta 25(27)-sterol methyl transferase." Bioorg Med Chem Lett **8**(24): 3449-52.
- Nes, W. D., G. G. Janssen, et al. (1991). "Structural requirements for transformation of substrates by the (S)-adenosyl-L-methionine:delta 24(25)-sterol methyl transferase." J Biol Chem **266**(23): 15202-12.
- Oehlschlager, A. C., R. H. Angus, et al. (1984). "Azasterol inhibition of delta 24-sterol methyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*." Biochemistry **23**(16): 3582-9.
- Okazaki, H., F. Tazoe, et al. (2006). "Increased cholesterol biosynthesis and hypercholesterolemia in mice overexpressing squalene synthase in the liver." J Lipid Res **47**(9): 1950-8.
- Ono, T. and K. Bloch (1975). "Solubilization and partial characterization of rat liver squalene epoxidase." J Biol Chem **250**(4): 1571-9.
- Opperdoes, F. R. and P. Borst (1977). "Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome." FEBS Lett **80**(2): 360-4.
- Olivier, L. M., K. L. Chambliss, et al. (1999). "Characterization of phosphomevalonate kinase: chromosomal localization, regulation, and subcellular targeting." J Lipid Res **40**(4): 672-9.
- Opperdoes, F. R. and J. P. Szikora (2006). "In silico prediction of the glycosomal enzymes of *Leishmania major* and trypanosomes." Mol Biochem Parasitol **147**(2): 193-206.
- Orenes Lorente, S., R. Gomez, et al. (2005). "Biphenylquinuclidines as inhibitors of squalene synthase and growth of parasitic protozoa." Bioorg Med Chem **13**(10): 3519-29.
- Ortiz de Montellano, P. R., J. S. Wei, et al. (1977). "Substrate selectivity of squalene synthetase." Biochemistry **16**(12): 2680-5.
- Ortiz-Gomez, A., C. Jimenez, et al. (2006). "Farnesyl diphosphate synthase is a cytosolic enzyme in *Leishmania major* promastigotes and its overexpression confers resistance to risedronate." Eukaryot Cell **5**(7): 1057-64.

- Osborne, C. S., I. Leitner, et al. (2005). "Amino acid substitution in *Trichophyton rubrum* squalene epoxidase associated with resistance to terbinafine." Antimicrob Agents Chemother **49**(7): 2840-4.
- Osborne, C. S., I. Leitner, et al. (2006). "Biological, biochemical, and molecular characterization of a new clinical *Trichophyton rubrum* isolate resistant to terbinafine." Antimicrob Agents Chemother **50**(6): 2234-6.
- Pandit, J., D. E. Danley, et al. (2000). "Crystal structure of human squalene synthase. A key enzyme in cholesterol biosynthesis." J Biol Chem **275**(39): 30610-7.
- Paton, V. G., J. E. Shackelford, et al. (1997). "Cloning and subcellular localization of hamster and rat isopentenyl diphosphate dimethylallyl diphosphate isomerase. A PTS1 motif targets the enzyme to peroxisomes." J Biol Chem **272**(30): 18945-50.
- Petras, S. F., S. Lindsey, et al. (1999). "HMG-CoA reductase regulation: use of structurally diverse first half-reaction squalene synthetase inhibitors to characterize the site of mevalonate-derived nonsterol regulator production in cultured IM-9 cells." J Lipid Res **40**(1): 24-38.
- Parks, L. W., S. J. Smith, et al. (1995). "Biochemical and physiological effects of sterol alterations in yeast--a review." Lipids **30**(3): 227-30.
- Pena-Diaz, J., A. Montalvetti, et al. (2004). "Mitochondrial localization of the mevalonate pathway enzyme 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase in the Trypanosomatidae." Mol Biol Cell **15**(3): 1356-63.
- Popjak G, A. W. (1979). "Squalene synthetase." Mol Cell Biochem **15**(2): 97-116.
- Poulter, C. D. (1990). "Biosynthesis of Non-Head-to-Tail Terpenes. Formation of 1'-1 and 1'-3 Linkages." Acc. Chem. Res. **23**: 70-77.
- Poulter, C. D. R., H. C. (1981). Biosynthesis of Isoprenoid Compounds.
- Prado-Figueroa, M., J. Raper, et al. (1994). "Possible localisation of dolichol-dependent mannosyltransferase of *Trypanosoma brucei* to the rough endoplasmic reticulum." Mol Biochem Parasitol **63**(2): 255-64.
- Proszynski, T. J., R. W. Klemm, et al. (2005). "A genome-wide visual screen reveals a role for sphingolipids and ergosterol in cell surface delivery in yeast." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(50): 17981-6.
- Rahier, A., J. C. Genot, et al. (1984). "Inhibition of S-adenosyl-L-methionine sterol-C-24-methyltransferase by analogues of a carbocationic ion high-energy intermediate. Structure activity relationships for C-25 heteroatoms (N, As, S) substituted triterpenoid derivatives." J Biol Chem **259**(24): 15215-23.
- Roberts, C. W., R. McLeod, et al. (2003). "Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa." Mol Biochem Parasitol **126**(2): 129-42.

- Rodriguez, R. J., C. Low, et al. (1985). "Multiple functions for sterols in *Saccharomyces cerevisiae*." Biochim Biophys Acta **837**(3): 336-43.
- Rodrigues, J. C., J. A. Urbina, et al. (2005). "Antiproliferative and ultrastructural effects of BPQ-OH, a specific inhibitor of squalene synthase, on *Leishmania amazonensis*." Exp Parasitol **111**(4): 230-8.
- Ryder, N. S. (1990). "Inhibition of squalene epoxidase and sterol side-chain methylation by allylamines." Biochem Soc Trans **18**(1): 45-6.
- Sacchettini, J. C. and C. D. Poulter (1997). "Creating isoprenoid diversity." Science **277**(5333): 1788-9.
- Sakakibara, J., R. Watanabe, et al. (1995). "Molecular cloning and expression of rat squalene epoxidase." J Biol Chem **270**(1): 17-20.
- Sanmiya, K., O. Ueno, et al. (1999). "Localization of farnesyl diphosphate synthase in chloroplasts." Plant Cell Physiol **40**(3): 348-54.
- Shechter, I., E. Klinger, et al. (1992). "Solubilization, purification, and characterization of a truncated form of rat hepatic squalene synthetase." J Biol Chem **267**(12): 8628-35.
- Simpson, L., R. Aphasizhev, et al. (2004). "Mitochondrial proteins and complexes in *Leishmania* and *Trypanosoma* involved in U-insertion/deletion RNA editing." Rna **10**(2): 159-70.
- Simpson, L., O. H. Thiemann, et al. (2000). "Evolution of RNA editing in trypanosome mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(13): 6986-93.
- Soltis, D. A., G. McMahon, et al. (1995). "Expression, purification, and characterization of the human squalene synthase: use of yeast and baculoviral systems." Arch Biochem Biophys **316**(2): 713-23.
- Sorger, D., K. Athenstaedt, et al. (2004). "A yeast strain lacking lipid particles bears a defect in ergosterol formation." J Biol Chem **279**(30): 31190-6.
- Sosa Estani, S., E. L. Segura, et al. (1998). "Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease." Am J Trop Med Hyg **59**(4): 526-9.
- Stamellos, K. D., J. E. Shackelford, et al. (1993). "Subcellular localization of squalene synthase in rat hepatic cells. Biochemical and immunochemical evidence." J Biol Chem **268**(17): 12825-36.
- Stich, A., M. P. Barrett, et al. (2003). "Waking up to sleeping sickness." Trends Parasitol **19**(5): 195-7.
- Strickler, J. E. and C. L. Patton (1980). "*Trypanosoma brucei brucei*: inhibition of glycosylation of the major variable surface coat glycoprotein by tunicamycin." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(3): 1529-33.

- Stuart, K. and A. K. Panigrahi (2002). "RNA editing: complexity and complications." Mol Microbiol **45**(3): 591-6.
- Tarleton, R. L. (2001). "Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease." Int J Parasitol **31**(5-6): 550-4.
- Thompson, J. F., D. E. Danley, et al. (1998). "Truncation of human squalene synthase yields active, crystallizable protein." Arch Biochem Biophys **350**(2): 283-90.
- Tozawa, R., S. Ishibashi, et al. (1999). "Embryonic lethality and defective neural tube closure in mice lacking squalene synthase." J Biol Chem **274**(43): 30843-8.
- Ullu, E., C. Tschudi, et al. (2004). "RNA interference in protozoan parasites." Cell Microbiol **6**(6): 509-19.
- Urbina, J. A., J. L. Concepcion, et al. (2004). "In vitro and in vivo activities of E5700 and ER-119884, two novel orally active squalene synthase inhibitors, against *Trypanosoma cruzi*." Antimicrob Agents Chemother **48**(7): 2379-87.
- Urbina, J. A. (2002). "Chemotherapy of Chagas disease." Curr Pharm Des **8**(4): 287-95.
- Urbina, J. A., J. L. Concepcion, et al. (2002). "Squalene synthase as a chemotherapeutic target in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*." Mol Biochem Parasitol **125**(1-2): 35-45.
- Urbina, J. A. and R. Docampo (2003). "Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances." Trends Parasitol **19**(11): 495-501.
- Urbina, J. A., G. Visbal, et al. (1997). "Inhibitors of delta24(25) sterol methyltransferase block sterol synthesis and cell proliferation in *Pneumocystis carinii*." Antimicrob Agents Chemother **41**(7): 1428-32.
- Urbina, J. A., G. Payares, et al. (1996). "Cure of short- and long-term experimental Chagas' disease using D0870." Science **273**(5277): 969-71.
- Urbina, J. A., J. Vivas, et al. (1996). "Antiproliferative effects of delta 24(25) sterol methyl transferase inhibitors on *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: in vitro and in vivo studies." Chemotherapy **42**(4): 294-307.
- Washburn, W. N. K., R. (1977). "Investigations of substrate specificity of squalene synthase." Tetrahedron Lett **18**: 1555-1558.
- Watson, N. S. and P. A. Procopiou (1996). "Squalene synthase inhibitors: their potential as hypocholesterolaemic agents." Prog Med Chem **33**: 331-78.
- Yokoyama, K., P. Trobridge, et al. (1998). "The effects of protein farnesyltransferase inhibitors on trypanosomatids: inhibition of protein farnesylation and cell growth." Mol Biochem Parasitol **94**(1): 87-97.

- Yamamoto, S. and K. Bloch (1970). "Studies on squalene epoxidase of rat liver." J Biol Chem **245**(7): 1670-4.
- Xiong, Q., S. A. Hassan, et al. (2005). "Cholesterol import by *Aspergillus fumigatus* and its influence on antifungal potency of sterol biosynthesis inhibitors." Antimicrob Agents Chemother **49**(2): 518-24.
- Voziyan, P. A., J. S. Haug, et al. (1995). "Mechanism of farnesol cytotoxicity: further evidence for the role of PKC-dependent signal transduction in farnesol-induced apoptotic cell death." Biochem Biophys Res Commun **212**(2): 479-86.
- van Weelden, S. W., J. J. van Hellemond, et al. (2005). "New functions for parts of the Krebs cycle in procyclic *Trypanosoma brucei*, a cycle not operating as a cycle." J Biol Chem **280**(13): 12451-60.
- Zhang, D., S. M. Jennings, et al. (1993). "Yeast squalene synthase: expression, purification, and characterization of soluble recombinant enzyme." Arch Biochem Biophys **304**(1): 133-43.
- Zhou, W., G. I. Lepesheva, et al. (2006). "Mechanistic analysis of a multiple product sterol methyltransferase implicated in ergosterol biosynthesis in *Trypanosoma brucei*." J Biol Chem **281**(10): 6290-6.
- Zinser, E., F. Paltauf, et al. (1993). "Sterol composition of yeast organelle membranes and subcellular distribution of enzymes involved in sterol metabolism." J Bacteriol **175**(10): 2853-8.
- Zweytick, D., K. Athenstaedt, et al. (2000). "Intracellular lipid particles of eukaryotic cells." Biochim Biophys Acta **1469**(2): 101-20.

