

eva rico vidal, 2010

Estudio de la nucleasa EndoG en el protozoo *Leishmania infantum*: caracterización e implicaciones en la supervivencia y muerte del parásito.

eva rico vidal, 2010

Estudio de la nucleasa EndoG en el protozoo *Leishmania infantum*:
caracterización e implicaciones en la supervivencia y muerte del parásito.

departamento de bioquímica
y biología molecular
universidad de Alcalá



Universidad
de Alcalá

TESIS DOCTORAL

**Estudio de la nucleasa EndoG en el protozoo *Leishmania infantum*:
caracterización e implicaciones en la supervivencia y muerte del
parásito.**

Eva Rico Vidal

2010



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Universidad de Alcalá

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA
Y BIOLOGIA MOLECULAR

María José Carmena Sierra, Directora del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Alcalá

INFORMA:

Que Eva Rico Vidal ha realizado la Tesis Doctoral titulada “*Estudio de la nucleasa EndoG en el protozoo Leishmania infantum: caracterización e implicaciones en la supervivencia y muerte del parásito*” bajo la dirección de Antonio Jiménez Ruiz y Federico Gago Badenas en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Alcalá, dentro del programa de Doctorado “*Señalización Celular y Patologías Asociadas*” y, a su juicio, cumple todos los requisitos necesarios para proceder a su defensa pública.

Alcalá de Henares, a 14 de Septiembre de 2009

María José Carmena Sierra

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA
Y BIOLOGIA MOLECULAR

Antonio Jiménez Ruiz, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Alcalá y

Federico Gago Badenas, Catedrático del Departamento de Farmacología de la Universidad de Alcalá

INFORMAN:

Que Eva Rico Vidal ha realizado la Tesis Doctoral titulada “*Estudio de la nucleasa EndoG en el protozoo Leishmania infantum: caracterización e implicaciones en la supervivencia y muerte del parásito*” bajo su dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Alcalá, dentro del programa de Doctorado “*Señalización Celular y Patologías Asociadas*”, y, a su juicio, cumple todos los requisitos necesarios para proceder a su defensa pública.

Alcalá de Henares, a 14 de Septiembre de 2009

Antonio Jiménez Ruiz

Federico Gago Badenas

“The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not 'Eureka!' (I found it!) but 'That's funny ...’

Isaac Asimov

AGRADECIMIENTOS

Me preocupa un poco que los agradecimientos puedan ser más largos que la discusión de los resultados de esta tesis...

Pero es que 5 años dan para mucho, sobre todo cuando vienes de otro lugar y todo es nuevo, y las personas que te rodean adquieren una dimensión especial. Sin olvidarse, claro, de las personas que pasan a estar lejos, pero que nunca han dejado de estar ahí, a mi lado. Sois muchos, y a todos os debo en mayor o menor medida una parte de esta tesis.

Gracias Antonio por atreverte en el Dpto. de Bioquímica con un proyecto de parasitología, una de mis ilusiones, y por dejarme formar parte de él. Por confiar en mí tantos experimentos y decirme que tengo buenas manos. Por sacar el artículo adelante. Por darme la oportunidad de salir fuera, mi otra ilusión, y dejarme ir a tantos congresos increíbles. Y a Federico, porque también estoy aquí gracias a ti. Gracias por tener siempre palabras de ánimo en los momentos de bajón, por atenderme siempre con una sonrisa, por todas las ideas bonitas que has aportado y el empujón que le has dado a esta tesis.

Gracias a Juan F., pero GRACIAS. Por ser la llave con la que Antonio me abrió las puertas de su laboratorio. Porque me dejaste ser “tu grano en el culo”, incluso en la distancia, vía e-mail. Por EndoG, por lo bonita que es esta tesis. Por tu paciencia y capacidad contagiosa para ilusionarte con cada experimento. Por el artículo. Porque cuando te fuiste pensé que sería imposible continuar esta tesis sin ti; después me di cuenta de lo bien que me habías enseñado, aunque no haya heredado tus gafas mágicas...

Gracias a mis compañeros de laboratorio. A Andrés, por todo lo que me has ayudado y enseñado. Por tu sensibilidad, por la “hoooraaa del HEPES” y los pisotones de la muerte; a pesar de Catalina la Oh ;). A David, por todo lo vivido, bueno y malo, porque de todo se aprende. Por el servicio de kebab a domicilio para purificaciones de madrugada, por ser nuestro “informático” particular... A Kilian, por encargarte de que no falte de nada y ser tan organizado, aunque consigas que mi cuaderno parezca el hermano yonkie del tuyo. Por compartir tus tapers, por tus piruetas felices... A Carlos, que tan bien me has entendido. Por tus consejos, tu buen humor, y también por tus frustraciones... Porque yo sé que vales mucho; y ya que no he podido ayudarte ni la mitad de lo que hubiese querido, al menos espero que me creas los halagos. Gracias a todos los compañeros fugaces que hemos tenido en el labo: Vero, Gisela, Marta y las pollitos, Bea, Irene, Ireneeee, y a Cris y Julia, que habéis decidido quedaros un “ratico” más. Gracias por los momentos compartidos, y a los que me habéis sufrido estos últimos meses, gracias por aguantar mi cara de perro (de perro rabioso, sí, lo sé; y lo siento...).

Gracias a los Chilo, empezando por Antonio. Por darme la primera oportunidad, junto con Pepa, y por lo genial que has sido conmigo desde entonces. Por tus consejos y tu buen rollo con los becarios. A Irene. Gracias por ser así, por defender causas perdidas y

compartir mis odios colectivos. Por mi zulillo y mil cosas más para las que siempre has estado dispuesta a ayudarme. Porque vales mucho más de lo que crees. A Pablito, por ser un cielo. Porque no recuerdo un solo momento en el que me haya aburrido a tu lado. Yo por ti me voy a Australia y a donde haga falta; y a Nestlé, ni agua. Y a Laura-Alicia, que aunque tuvo que irse, dejó huella.

Gracias a los Gago. A Anita, por tu energía, tu alegría y tus cabreos con el mundo. Por compartir tantas cosas conmigo y soportarme muchas otras. A Claire, por preocuparte por mí y ser tan dulce, aunque seas una chaquetera y el yeti despertándose a tu lado parezca un tamagotchi. A Juan, gracias por toda tu ayuda con el modelado y por pelearte con mi ordenador; pero sobre todo, gracias por encontrar siempre las palabras que necesito oír, por aguantar mis tultitates (debes ser el hombre con más paciencia del mundo...), por decirme que podía y creer en mí, por estar a mi lado. Gracias por ser tan buen amigo y hacerme tan feliz. A Antonio, porque mientras estuviste aquí se me fue un poco la morriña. Gracias por ser más “empanao” que yo y por todo lo que me he reído contigo. Alberto, encantada de conocerte, ¡de mayor quiero ser como tú!

Gracias a los Ropero. Eso son fichajes en condiciones y no lo que hace el tontainas de Florentino. Nadia, eres genial, del Madrid, pero genial. Tú y yo sabemos que hubiésemos ganado la cutre-final de padel, pero se rajaron. Ana, eres un encanto, transmites alegría todo el día, a pesar de soportar a ese espécimen intensivamente. Al espécimen, Raúl, eres un dolor de cabeza y un ejercicio de paciencia constante para cualquier ser humano, será por eso que tienes algo de entrañable.

Gracias a todas las personas con las que he tenido el placer de convivir todos estos años: Mali, mi argentina favorita, Javi, Ariel, las chicas de fisio y la gente del módulo I, que no digo nombres porque seguro que me dejó a alguien (¡sois un montón!). Gracias porque en muchos momentos de esta tesis me habéis sacado una sonrisa.

Gracias a Isabel, por tu paciencia infinita con el confocal, y a tus chicas, especialmente a Miriam: eres un cielete. A Guillermo y a Juan, que conseguís que revelar un western en blanco merezca la pena, por lo majos que sois. Gracias a Angélica, la secretaria más eficaz del planeta, por solucionarme la vida en más de una ocasión y además ser un encanto, todo a la vez. Y a Pilar Rubio, por tu paciencia y buen humor con todas nuestras aplicaciones raras, raras...

Gracias a Imma y a los Dres. Domínguez y Toraño, por toda su ayuda con el monoclonal.

Thanks to Prof. Michels and Prof. Opperdoes. Thanks Paul for being so nice with me. I have learned a lot with you, and further than that, I had a great time in your lab. Thanks to all the students in TROP, especially to Ana, so sweet and patient with me, and also Melisa. And Lisa (well, you were not in TROP, but you were at “thanks God, it’s Friday!” ;)). Thanks to you all for making me feel so good during those three months.

Thanks to Prof. Klingbeil and her students: Jeny (¡gracias!), Dave, Juemin and Maya. I have learned a lot with you all (even how to apologize to DNA!). I am just sorry because

there was no time to finish the work. And because life is not just work, thanks for Six Flags, the barbecue, July the 4th, the “sexy *Leishmania*” and the best pumpkin party ever. Thanks for all those good moments.

Gracias Diego por darle un toque artístico a esta tesis y hacerme una portada tan bonita.

Gracias Rubia por tus “huracanes” de felicidad y por estar siempre pendiente de mí, incluso cuando casi ni me conocías. Y a Elena, por hacerme sentir como en casa mientras te invadía, y por matarme de la risa a cada rato. Por lo bien que nos lo hemos pasado las 3 juntas; sois mi pedazo favorito de Madrid. Y a mis niñas de A Coruña: Noe, Vane, Isa, Eva, Emma, Ana T., Ana M. y Vicky, porque siempre estáis ahí. Por preocuparos por mí y mandarme el paquete sorpresa más bonito del mundo. Eva, por todas esas conversaciones en las que igual arreglamos el mundo, que rozamos el absurdo más genial. Gracias por decirme que podía y por entenderme tan bien. A Isa, que aún al otro lado del charco, me conoce como pocos. Gracias a Miragaya, porque nuestra amistad nunca envejece.

Gracias a los amigos de 4 y 2 patas que he conocido en una de las experiencias más bonitas de mi vida. Gracias Bubu, Poli, y demás peludos por hacerme olvidar todos mis problemas a base de lametazos. Y a Mónica, Rober, Susi, Maika, Sonia y Ceci porque me alegro muchísimo de haberos conocido. Gracias a la gente de Punto y Aparte por las obras, acampadas, cenas y Tenorios inolvidables... pero sobre todo, gracias Jose. Este percebe no os olvidará.

Y por último, a los que más les debo. Gracias a mi familia, porque sin vosotros yo no estaría aquí. Gracias papá y mamá por ayudarme a cumplir todos mis sueños, por respetar mis decisiones y estar siempre ahí, dándome el empujón cuando lo necesito, dejándome a mi aire cuando veis que puedo sola. Por recargar mis baterías cada domingo. Porque os quiero. Gracias a David y a Pablo, que siempre me defendéis, que habéis sido y siempre seréis la salsa de mi vida. Gracias por hacerme sentir capaz de todo. Gracias también a mis abuelos, a mis tíos, a mis primos, a Pauliña, a Pepe y a María (que son como de la familia) y a Lucero. Gracias, porque saber que siempre vuelvo a veros, es mi mayor motivación.

Graciñas a todos.

A Papá, Mamá, David y Pablo.

A mis niñas de Coruña y de Madrid; a mi bicharraco.

ÍNDICE

Abstract.....	12
Abreviaturas y acrónimos.....	14
Introducción.....	18
Origen e historia de la leishmaniasis.....	18
El género <i>Leishmania</i>	21
Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	23
Biología del parásito <i>Leishmania</i>	27
Epidemiología, manifestaciones clínicas y tratamiento de la leishmaniasis.....	32
Mecanismos de muerte celular.....	38
Muerte celular programada (MCP) y apoptosis en organismos pluricelulares.....	43
MCP y apoptosis en organismos unicelulares.....	50
Principales nucleasas implicadas en la degradación del ADN durante el proceso apoptótico.....	53
CAD.....	53
EndoG.....	55
Hipótesis.....	62
Materiales y métodos.....	63
Materiales y reactivos utilizados en los procedimientos generales de biología molecular.....	64
Cultivos celulares.....	64
Clonación y diseño de construcciones.....	65

Transfección y mantenimiento de promastigotes recombinantes.....	68
Curva de crecimiento de parásitos.....	69
Expresión y purificación de rLiEndoG.....	70
Obtención de anticuerpos policlonal y monoclonal antiEndoG.....	70
Inmuno-blot.....	71
Fraccionamiento celular.....	71
Microscopía confocal.....	72
Ensayos in vitro de la actividad nucleasa de rLiEndoG.....	73
Detección mediante gel de agarosa.....	73
Detección mediante geles de poliacrilamida-SDS-ADN.....	74
Detección por fluorimetría.....	74
Ensayos de actividad exonucleasa.....	75
Citometría de flujo.....	75
Viabilidad celular.....	76
Contaje relativo de parásitos.....	76
Contenido de ADN (ciclo celular).....	76
TUNEL.....	77
Análisis de secuencia y estructura.....	77
Mutagénesis dirigida.....	78
Análisis estadístico.....	79
Resultados.....	80
Identificación de la secuencia codificante para la putativa EndoG de <i>Leishmania infantum</i> (LiEndoG).....	81
Modelado y análisis estructural de LiEndoG.....	84

Clonación y expresión de LiEndoG en <i>E. coli</i>	87
rLiEndoG presenta actividad endonucleasa.....	90
El ácido auríntricoarboxílico inhibe la actividad de rLiEndoG.....	91
La actividad de rLiEndoG es dependiente de iones divalentes, se inhibe por la presencia de Na ⁺ , K ⁺ y Ca ²⁺ y tiene un pH óptimo de 6,5.....	92
El β-mercaptoetanol afecta a la actividad de rLiEndoG.....	94
rLiEndoG genera preferentemente cortes de cadena sencilla en la doble hélice de ADN.....	95
rLiEndoG presenta actividad endo-exonucleasa.....	98
Producción de anticuerpos α-rLiEndoG.....	102
LiEndoG contiene un péptido señal que le dirige a la mitocondria.....	104
La sobre-expresión de <i>LiendoG</i> produce un incremento en el número de parásitos con el ADN degradado tras la inducción de muerte con un estímulo apoptótico.....	107
La reducción en los niveles de expresión de LiEndoG produce una disminución en el crecimiento de los promastigotes de <i>L. infantum</i> , pero los hace más resistentes a estímulos apoptóticos.....	110
LiEndoG se transloca desde la mitocondria hasta el núcleo tras la inducción de muerte con un estímulo apoptótico.....	113
Análisis de la función de los residuos más conservados en el centro activo de LiEndoG.....	117
Estudio del papel del residuo 211 en el motivo S/DRGH.....	124
LiEndoG presenta un posible dominio de autoinhibición.....	126
El compuesto LEI-49 inhibe la actividad de rLiEndoG.....	133
Discusión.....	138
EndoG: la primera proteína efectora del proceso apoptótico descrita en tripanosomátidos.....	139

LiEndoG se localiza en la mitocondria de los parásitos sanos, pero se transloca al núcleo bajo un estímulo apoptótico.....	141
La variación en los niveles de expresión de LiEndoG afecta al crecimiento celular y a la supervivencia de los promastigotes de <i>L. infantum</i>	142
Caracterización molecular de LiEndoG.....	144
Construcción y análisis de un modelo estructural para LiEndoG.....	144
Posible mecanismo catalítico de LiEndoG.....	147
Posible regulación de LiEndoG por oxidación/reducción de sus tioles/puentes disulfuro.....	148
Caracterización de la actividad nucleasa de rLiEndoG.....	149
LiEndoG presenta un posible dominio de autoinhibición.....	153
El compuesto LEI-49 inhibe la actividad de LiEndoG.....	154
Conclusions.....	155
Referencias.....	157
Anexo.....	175

ABSTRACT

It is increasingly accepted that single-celled organisms, such as *Leishmania* parasites, are able to undergo a cell death process that resembles apoptosis in metazoans and is induced by a variety of stimuli. However, the molecular mechanisms that participate and regulate this death process are still very poorly described, and very few of the participating molecules have been identified. Because DNA degradation is probably the most frequently characterized event during programmed cell death in *Leishmania* parasites, we have focused on identifying a candidate nuclease responsible for this effect during the cell death process. The results presented in this thesis demonstrate that *Leishmania infantum* promastigotes express a nuclease similar to the Endonuclease G of higher eukaryotes which, according to its predicted structure, belongs to the $\beta\beta\alpha$ -metal superfamily of nucleases. Its optimal pH and its cation dependence resembles that of EndoGs present in other organisms and, similarly to them, it is inhibited by moderate concentrations of K^+ , Na^+ and Ca^{+2} . Moreover, *L. infantum* nuclease processes each DNA strand independently, as described for other Endonucleases G, and shows, like yeast Nuc1p, endo-exonuclease activity. The activity of the recombinant protein can be inhibited by addition of the general nuclease inhibitor aurintricarboxylic acid (ATA) or the reducing agent β -mercaptoethanol. This latter result is probably due to the presence of a disulfide bound between Cys100 and Cys116 that appears to be crucial for the nuclease activity. This activity can also be inhibited by the synthetic thymidine analogue LEI-49, which also shows higher anti-*Leishmania* activity against wild-type parasites than against parasites overexpressing EndoG.

L. infantum EndoG contains a signal peptide that causes its translocation to the mitochondrion where it is maintained under normal growth conditions. However, under the pressure of a death stimulus such as edelfosine or miltefosine treatment, *L. infantum* EndoG is released from the single mitochondrion and translocates to the nucleus, where it is thought to participate in the process of DNA degradation

that is associated with an apoptotic process. Our results also demonstrate that overexpression of the nuclease in edelfosine- and miltefosine-treated promastigotes causes a significant increase in the percentage of TUNEL-positive parasites, whilst this overexpression has no effect on the normal growth of the parasites. On the other hand, parasites expressing low levels of the protein grow at a lower rate than do wild-type parasites under healthy growth conditions, and show a higher resistance to death than wild-type parasites under a cell-death stimulus, as revealed by the decrease in the percentage of TUNEL-positive parasites treated with edelfosine.

Mutation analysis reveals that the amino acids present in the catalytic center of the nuclease are not equally relevant for the nuclease activity. Thus, His²¹⁴ and Arg²¹² are crucial because they are involved in the catalytic mechanism and in substrate recognition, respectively, whereas Ser²¹¹ is not.

Finally, we have identified a putative inhibitory domain in *L. infantum* EndoG that could be playing a regulatory role in the catalytic activity of this important enzyme.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNdc	ADN de doble cadena
ADNk	ADN de kinetoplasto
ADNmt	ADN mitocondrial
AIF	Factor inductor de apoptosis
Apaf-1	Proteasa apoptótica activadora del factor 1
ARN	Ácido ribonucleico
ARNi	ARN de interferencia
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosomal
ATA	Acido auríntricarboxílico
ATG	Genes relacionados con autofagia
ATP	Adenosín trifosfato
Bad	Inductor de muerte asociado a Bcl-2
Bax	Proteína X asociada a Bcl-2
Bcl-2	Proteína antiapoptótica identificada en células B de linfoma de tipo 2
BH3	Dominios de homología a Bcl-2
Bid	Agonista letal que interacciona mediante dominios BH3
BLAST	Herramienta básica de búsqueda de alineamientos locales
BSA	Albúmina de suero bovino
C	Cisteína
CAD	ADNasa activada por caspasas
Ced	Proteínas implicadas en muerte en <i>C. elegans</i>
CIB	Centro de investigaciones biológicas
CO₂	Dióxido de carbono
CSIC	Centro superior de investigaciones científicas
D	Aspártico
DFF	Factor de fragmentación del ADN
DIC	Contraste de interferencia diferencial
DISC	Complejo inducido por señales de muerte
DmEndoG	EndoG de <i>Drosophila melanogaster</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
eGFP	Proteína fluorescente verde mejorada
Egl-1	Proteína de puesta anormal de huevos en <i>C. elegans</i>

ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EndoG	Endonucleasa G
EndoGI	Inhibidor de EndoG de <i>Drosophila melanogaster</i>
EXOG	Exonucleasa G
FADD	Proteína asociada con dominio de muerte
FAM	Tetraclorofluoresceína
FasL	Ligando del fragmento estimulador de la apoptosis
FasR	Receptor del fragmento estimulador de la apoptosis
FEN-1	Flap endonucleasa 1
G	Glicina
gp63	Glicoproteína 63
GST	Glutation S transferasa
GuHCl	Guanidina-ácido clorhídrico
H	Histidina
HeLa	Primera línea de células humanas inmortales (Henrietta Lacks)
HEPES	4 (2-hidroxietil) - 1 ácido piperazineetanosulfónico
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HMGB1	Proteína del grupo de alta movilidad B1
Hsp	Proteínas de choque térmico
HSV-1	Virus del herpes simple tipo 1
IAP	Proteínas inhibidoras de la apoptosis
iCAD	Inhibidor de la ADNasa activada por caspasas
IL-1β	Interleucina 1 β
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
IP	Ioduro de propidio
LB	Medio Luria-Bertoni
LC	Leishmaniasis cutánea
LC3	Proteína de cadena ligera 3
LiEndoG	EndoG de <i>L. infantum</i>
LMC	Leishmaniasis mucocutánea
LPG	Lipofosfoglicano
LV	Leishmaniasis visceral
MCF-7	Línea celular Fundación del Cáncer de Michigan
MCP	Muerte celular programada
MPT	Poro de transición mitocondrial
N	Asparagina
NADH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido Reducida

NCBI	Centro Nacional de información Biotecnológica
NCCD	Comité de nomenclatura de muerte celular
Ni-NTA	Níquel-ácido nitrilotriacético
NUC1	Nucleasa 1 de <i>S. cerevisiae</i>
NucA	Nucleasa A de <i>Anabaena</i> sp.
Omi/HtrA2	Proteína A2 con requerimiento de alta temperatura
OMS	Organización Mundial de la Salud
PARP	PoliADP-ribosa polimerasa
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Peso molecular
PMN	Polimorfonucleares
PS	Fosfatidil-serina
R	Arginina
rLiEndoG	EndoG recombinante de <i>L. infantum</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
S	Serina
SBF	Suero bovino fetal
SbV	Antimoniales pentavalentes
SDS	Dodecilsulfato sódico
Smac/Diablo	Segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria/Proteína de unión directa a IAP con bajo pI
TAMRA	Tetrametilrodamina
TBS-T	Tampón Tris salino-Tween
TEM	Tris- EDTA-Magnesio
TGF-β	Factor transformante del crecimiento β
TMV	Tubo multivesicular lisosomal
TNF	Factor de necrosis tumoral
TUNEL	Marcaje de extremos rotos de ADN por la transferasa terminal con dUTP
ua	Unidades arbitrarias
UO₂	Dióxido de uranio
UTR	Regiones no traducidas
UV	Luz ultravioleta
z-VAD-fmk	Z-Val-Ala-Asp(OMe)-CH ₂ F
β-ME	β-mercaptoetanol

Introducción

“What a good thing Adam had. When he said a good thing, he knew nobody had said it before”.

Mark Twain

INTRODUCCIÓN

Orígen e historia de la leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad causada por un protozoo intracelular del género *Leishmania* que se transmite al hospedador mamífero por medio de un vector invertebrado. Si el vector pertenece al género *Phlebotomus*, se hace referencia a la denominada leishmaniasis del Viejo Mundo (que afecta a Europa, África y Asia), mientras que si pertenece al género *Lutzomyia*, hace referencia a la leishmaniasis del Nuevo Mundo (América) (2). Por lo tanto, y desde un punto de vista histórico, parece lógico comenzar considerando la forma del Viejo Mundo, también conocida tradicionalmente como “dolor oriental”.

Las primeras referencias que hacen alusión a la leishmaniasis del Viejo Mundo datan del siglo VII AC. Se trata de unos grabados en tabla procedentes de la biblioteca del rey Ashurbanipal, en los cuales se describen las lesiones típicas que caracterizan a esta enfermedad. Se piensa que algunos de estos grabados podrían derivar incluso de textos más antiguos (1500-2000 AC). En el siglo X DC, físicos árabes realizaron descripciones ampliamente detalladas sobre lo que todavía hoy se sigue denominando “dolor de Balkh” en el norte de Afganistán, y que hace alusión a lo que nosotros conocemos como leishmaniasis. A mediados del siglo XVIII DC, en la India, los médicos acuñaron el término “kala-azar” procedente del sánscrito (“fiebre negra”) para referirse a una enfermedad que cursaba con pigmentación de la piel, fiebre y esplenomegalia. Estos síntomas llevaron repetidamente a la confusión de esta enfermedad con una forma muy virulenta de malaria, y a ser tratada ineficazmente con quinina. Existe bastante controversia en cuanto a quien fue el descubridor del parásito causante de la forma cutánea de la enfermedad en el Viejo Mundo. Parece que el sargento de la armada india David Cunningham fue el primero en detectar el parásito en 1885 pero no lo relacionó directamente con la enfermedad. En 1898, Peter Borovsky, un sargento militar

ruso que investigaba la etiología del “dolor oriental” realizó la primera descripción del agente causante de la enfermedad y se refirió acertadamente a él como un protozoo. Debido a que sus resultados fueron publicados en una revista rusa, no tuvieron repercusión internacional y su descubrimiento no fue reconocido hasta después de su muerte. Sí parece más claro quiénes fueron los descubridores del parásito causante de la forma visceral de la enfermedad. En 1901, el doctor de la armada escocesa William Leishman aisló a los parásitos del bazo de un paciente con fiebre de “dum dum”, aunque pensó erróneamente que se trataban de Trypanosomas. Unos meses más tarde, el capitán Charles Donovan confirmó el hallazgo de unos parásitos a los que denominó cuerpos de Leishman Donovan en un paciente del hospital de Madras. Finalmente, fue Ronald Ross el que propuso que los cuerpos Leishman-Donovan eran la forma intracelular de un nuevo tipo de protozoo parásito, al cual denominó *Leishmania donovani* (3), (<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>).



William Leishman

En el Nuevo Mundo, las primeras referencias acerca de las formas cutánea y mucocutánea de la enfermedad datan de los años 400-900 AC. Se trata de unas vasijas de origen Inca procedentes de Perú, Colombia y Ecuador, en las cuales se observan representaciones gráficas de lesiones de piel y deformaciones faciales.



Vasijas Incas presentando lesiones típicas de leishmaniasis.

Muchos años después, durante los siglos XV y XVI DC, los conquistadores españoles dejaron constancia escrita de las lesiones ulcerosas que observaron en agricultores indígenas que volvían de los Andes y extendieron el término de “enfermedad del valle” o “enfermedad andina”. Posteriormente, la desfiguración de la nariz y la boca pasó a conocerse como “lepra blanca”, aludiendo a lo que hoy conocemos como forma mucocutánea de la enfermedad (4), (<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>).

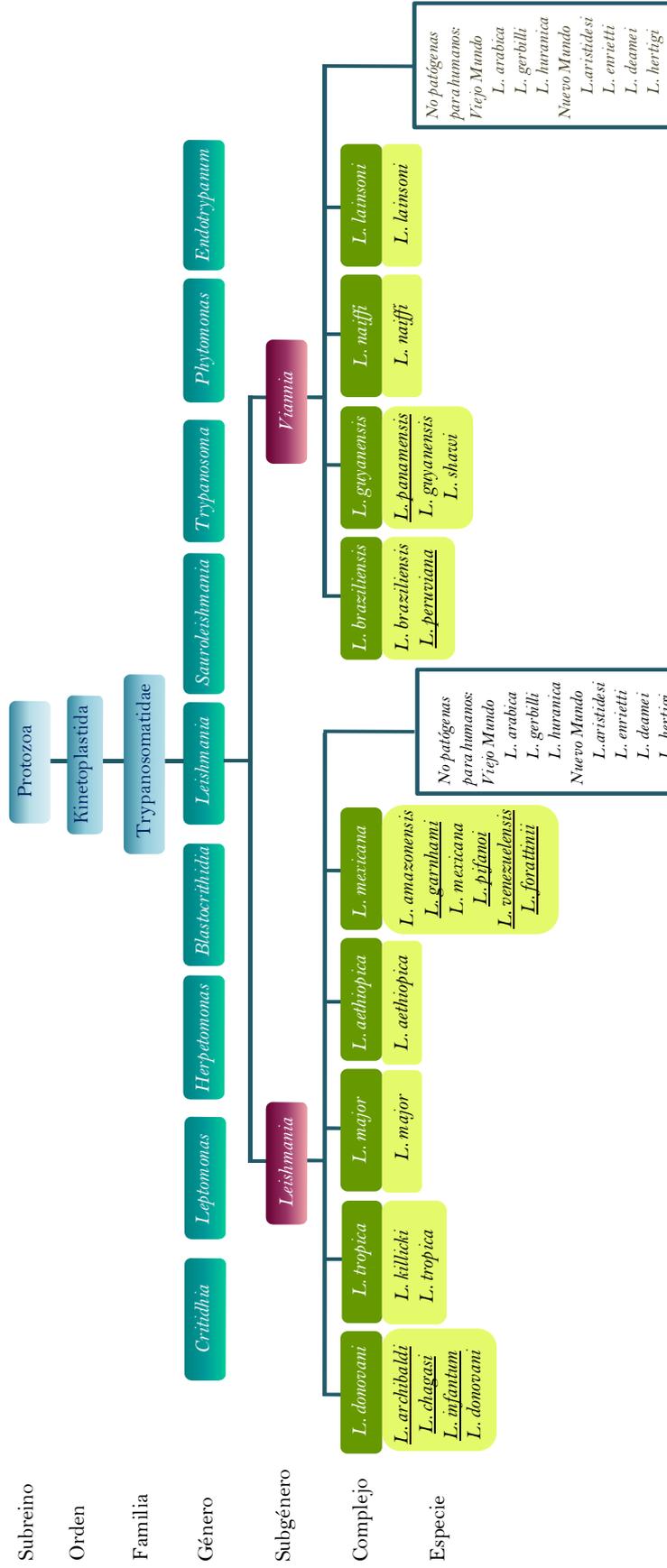
En un principio se pensó que la leishmaniasis del Viejo Mundo y la del Nuevo Mundo eran exactamente la misma enfermedad, pero en 1911 Gaspar Vianna describió que existían diferencias entre los parásitos encontrados en América con respecto a los de África, Asia y Europa. En 1922, se descubrió que el vector responsable de la transmisión de la enfermedad en América, *Lutzomya*, difería del género *Phlebotomus*. Este último, había sido demostrado ser el responsable de la transmisión a humanos en el Viejo Mundo por los hermanos Sergent mediante un experimento realizado con personas que se ofrecieron voluntarias para ser mordidas por el mosquito (3).

El género *Leishmania*

Leishmania pertenece a la familia de los parásitos protozoos Trypanosomatidae, ubicada dentro del orden Kinetoplastida. Dicho orden recibe su nombre por la presencia de una sola mitocondria que se extiende a lo largo del parásito, cuyo ADN crea una estructura única situada próxima al cuerpo basal del flagelo denominada kinetoplasto (5). La familia Trypanosomatidae engloba varios géneros de parásitos de entre los cuales cabe destacar a *Trypanosoma* y *Leishmania*, responsables de diversas manifestaciones clínicas que incluyen la conocida “enfermedad del sueño”, causada por *Trypanosoma brucei* (6), la “enfermedad de Chagas”, causada por *Trypanosoma cruzi* (7) y la leishmaniasis, producida por parásitos del género *Leishmania* (8).

En 1903, Ross realizó una clasificación basada en la morfología de los distintos parásitos del género *Leishmania*, pero el incremento desde entonces en el número de nuevas especies descubiertas ha llevado a la consideración de otros criterios taxonómicos más apropiados. En un principio se consideraron criterios extrínsecos como la clínica, la biogeografía (por ejemplo: *L. guyanensis*, aislada en Guyana) o las características biológicas; pero a partir de 1970 comenzaron a considerarse criterios intrínsecos como la inmunología, la bioquímica y la genética (1). En 1990, Rioux y Lanotte utilizaron el análisis de isoenzimas para definir las distintas especies de cada subgénero (9). Los avances derivados del uso de diversas técnicas moleculares llevaron a la Organización Mundial de la Salud (OMS) a la publicación de un nuevo esquema taxonómico (10). Nuevos métodos de detección, aislamiento y estudios genéticos han incrementado masivamente el número de especies de *Leishmania* conocidas (hasta 30), de las cuales 20 son patógenas para los humanos. Por lo tanto, la validación del esquema taxonómico ha sido cuestionada en sucesivas ocasiones, y existen continuas revisiones con el objetivo de encontrar una clasificación taxonómica que se ajuste mejor a la realidad del parásito, como son los casos de, por ejemplo, Lukes *et al.* (2007) (11) o Smith, Peacock *et al.* (2007) (12).

Esquema 1. Taxonomía de *Leishmania*. Las especies subrayadas son o han sido cuestionadas. Basado en el esquema publicado por la OMS con adiciones de la literatura (1).



Ciclo de vida de *Leishmania*

Leishmania es un parásito dimórfico que presenta un ciclo de vida complejo en el cual intervienen dos hospedadores, uno invertebrado y otro mamífero. Como ya hemos comentado anteriormente, el hospedador invertebrado es un mosquito perteneciente al género *Phlebotomus* o *Lutzomyia* (10). En cuanto al hospedador mamífero, el perro constituye uno de los principales reservorios de esta enfermedad, jugando un papel clave en la transmisión al humano (13,14); pero existen diversos ordenes afectados por este parásito además de los cánidos y los humanos: roedores, marsupiales, ungulados primitivos, primates, edentados y prociónidos (1).

El ciclo comienza cuando un mosquito se alimenta de la sangre de un hospedador mamífero infectado, ingiriendo a los parásitos en su forma de amastigote, los cuales se encuentran alojados en el interior de las células fagocíticas de la piel. En la parte posterior del tracto intestinal del mosquito los amastigotes se enfrentan a unas condiciones de pH y temperatura completamente distintas a las del hospedador mamífero, diferenciándose a parásitos flagelados (aunque todavía con poca motilidad) y con alta capacidad de replicación, a los cuales se les denomina promastigotes procíclicos. Tras un período de una a dos semanas los parásitos comienzan el proceso de metaciclogénesis, durante el cual pasan por dos estadios intermedios. El primero conlleva la diferenciación a promastigotes nectomonados, más alargados y con alta capacidad de movimiento, lo que les permite migrar a la parte anterior del tracto digestivo del mosquito, en donde se transformarán en promastigotes leptomonados. Estos últimos son los responsables de la secreción de un gel que desempeña un importante papel en la transmisión del parásito, pues provoca que el mosquito regurgite el alimento durante la ingesta de sangre, inoculando los parásitos en el hospedador mamífero. Finalmente, algunos de los promastigotes leptomonados se transforman en promastigotes metacíclicos, los cuales presentan una alta capacidad infecciosa y serán inoculados en el hospedador mamífero durante la siguiente ingesta de sangre por parte del mosquito (15).

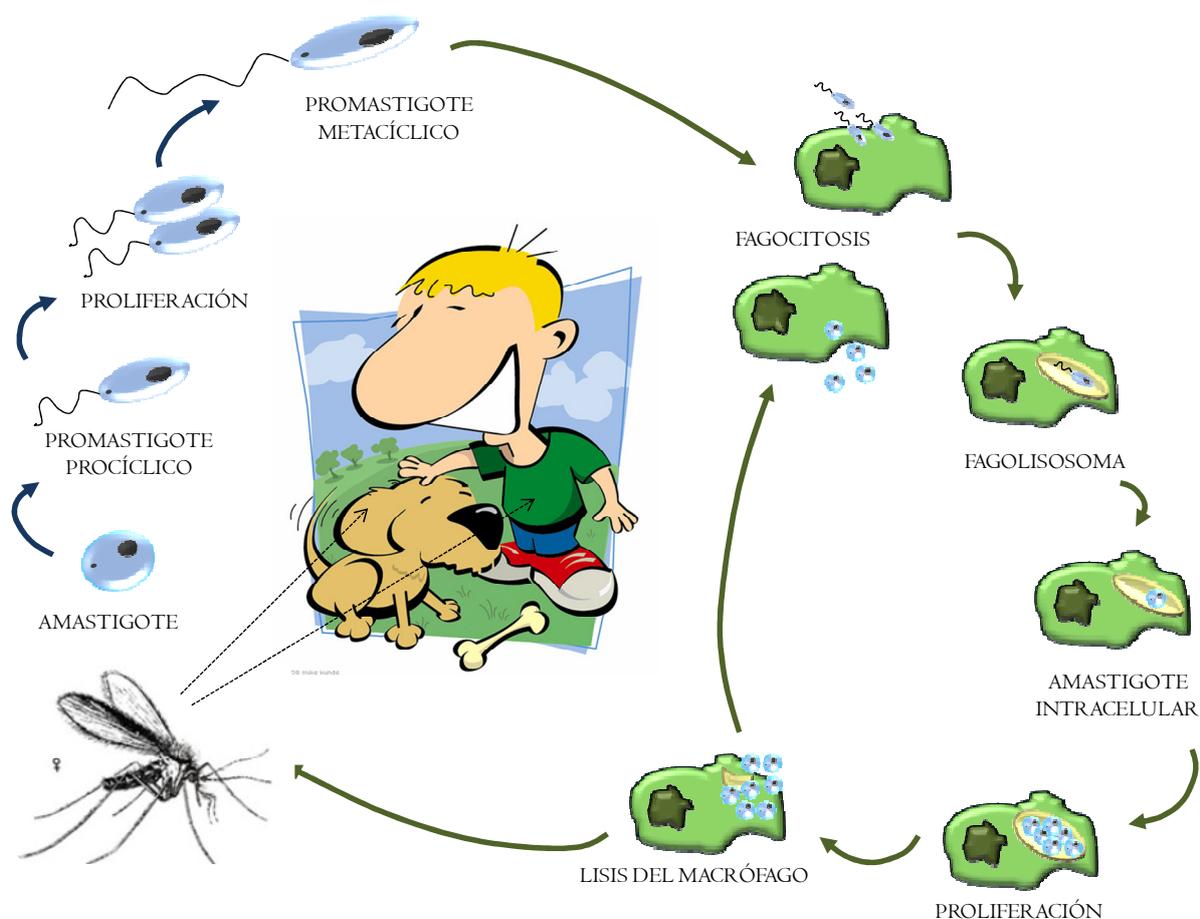
Dentro del hospedador mamífero, *Leishmania* es un patógeno intracelular obligado que tiene la necesidad de vivir en el interior de las células fagocíticas, para lo cual ha desarrollado diferentes estrategias con el fin de evadir la respuesta inflamatoria del sistema inmune del hospedador. Se sabe que *Leishmania* presenta dos moléculas de superficie que juegan un importante papel a este respecto: el lipofosfoglicano (LPG) y la glicoproteína 63 (gp63). Ambas actúan bloqueando la lisis mediada por el complemento (16,17). Concretamente, gp63 actúa procesando a la proteína del complemento C3b, dando lugar a una forma inactiva, iC3b, incapaz de llevar a cabo la lisis pero que conserva la capacidad de opsonizar a los parásitos, marcándolos como diana para las células fagocíticas y favoreciendo su internalización en sus células hospedadoras (18). Por otra parte, se ha demostrado que la presencia de promastigotes apoptóticos es necesaria para que la infección concluya con éxito (19). Se sabe desde hace tiempo que la exposición de fosfatidilserina (PS) en la cara externa por parte de una célula apoptótica conlleva su internalización en los fagocitos para su limpieza (20). Además, la PS estimula la producción del factor TGFβ por parte de los macrófagos, citoquina que actúa inhibiendo la respuesta inflamatoria (21). Los parásitos apoptóticos imitan este mecanismo evitando así una respuesta inflamatoria que favorece la supervivencia de otros promastigotes no apoptóticos fagocitados por la misma célula.

Los granulocitos polimorfonucleares (PMN) son los primeros en fagocitar a los promastigotes y sirven como células hospedadoras intermediarias en las cuales los promastigotes permanecen sin replicarse (22). Posteriormente, *Leishmania* utiliza a los PMN como caballo de Troya para entrar silenciosamente en sus células hospedadoras definitivas, los macrófagos, los cuales reconocen la exposición de PS por parte de los PMN que han entrado en apoptosis tras fagocitar al parásito (23). Una vez dentro del macrófago, los promastigotes se ubican en el interior del fagolisosoma, donde existen unas condiciones muy distintas a las presentes en el tracto intestinal del mosquito, con un pH ácido de 4,5-5,5 y una temperatura que oscila entre 33 y 37°C (dependiendo de si trata de una infección cutánea o visceral, respectivamente) y, por tanto, superior a los 26°C existentes en el mosquito (24).

Estos cambios provocan la diferenciación de promastigotes a amastigotes, de tal forma que el cuerpo del parásito se redondea y pierde la motilidad. En el interior del fagolisosoma los amastigotes se dividen y tras varios días desde el inicio de la infección, el fagolisosoma se sitúa en la periferia de la célula y se produce la liberación de los amastigotes al exterior, en un proceso mediado por la maquinaria exocítica celular (25,26). Los amastigotes necesitan ser incorporados por nuevas células fagocíticas para extender la infección, y para ello también disponen de ciertos mecanismos de evasión del sistema inmune. Se ha demostrado que los amastigotes opsonizados son fagocitados gracias a su adaptación a reacciones de inmuno-adherencia (27). También se sabe que, al igual que sucede con los promastigotes, existen amastigotes apoptóticos que favorecen la internalización en los macrófagos (28).

Finalmente, cuando un mosquito se alimenta de la sangre de un hospedador mamífero infectado, se lleva consigo los amastigotes alojados en los fagocitos de la piel, cerrándose así el ciclo de vida de este parásito.

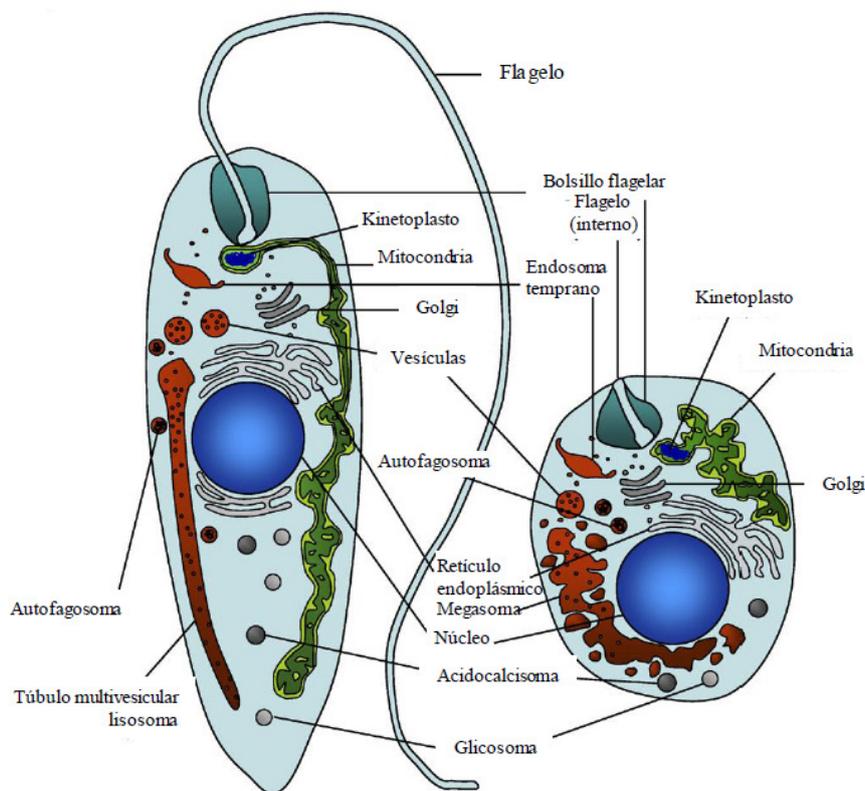
Debido a que se conocen algunos de los factores implicados en el proceso de metaciclologénesis y en la diferenciación de promastigotes metacíclicos a amastigotes, es posible reproducir estos procesos de diferenciación *in vitro*. Por ejemplo, la disminución del pH, la ausencia de oxígeno y la depleción de tetrahidrobiopterina en el medio de cultivo, pueden iniciar la metaciclologénesis. Por otra parte, también es posible reproducir *in vitro* las condiciones que existen en el interior del fagolisosoma utilizando un medio de cultivo con un pH ácido, elevando la temperatura (en función de la especie de *Leishmania*) y aumentando la concentración de CO₂ para obtener diferenciación de promastigotes a amastigotes (29).



Esquema 2. Representación esquemática de los principales pasos en el ciclo de vida de *Leishmania*: Cuando un mosquito pica a un hospedador mamífero infectado con *Leishmania*, ingiere los parásitos en su forma de amastigote. Los amastigotes se diferencian a promastigotes procíclicos, los cuales se replican y por un proceso denominado metaciclologénesis se diferenciarán finalmente a promastigotes metacíclicos. Estos últimos son transmitidos al hospedador mamífero durante una nueva ingesta de sangre por parte del mosquito y allí serán fagocitados en última instancia por los macrófagos, donde serán incorporados al interior de un fagolisosoma para diferenciarse a amastigotes. Los amastigotes se dividen y finalmente son liberados al exterior del macrófago para ser nuevamente fagocitados por otros fagocitos y continuar así el proceso infeccioso. Cuando un mosquito se alimenta de la sangre de un hospedador infectado, se lleva consigo los amastigotes presentes en fagocitos de la piel, cerrando así el ciclo.

Biología del parásito *Leishmania*

Morfológicamente, los promastigotes son células alargadas de un tamaño comprendido entre 5-20 x 1-4µm y un flagelo anterior de 20µm de longitud. Los amastigotes son células redondas de unos 2 x 4µm. Ambos representan una adaptación a las condiciones ambientales con las que el parásito se encuentra al alojarse en cada uno de sus distintos hospedadores (invertebrado y mamífero). Durante la transición entre cada uno de estos ambientes, el parásito hace frente a cambios tales como la disponibilidad de nutrientes, el oxígeno, el pH y la temperatura. La diferenciación de *Leishmania* está marcada por cambios en la morfología así como cambios en la función de los orgánulos que participan en las vías secretora y endocítica. La vía endocítica de los promastigotes consiste en una red de endosomas tubulares, cuerpos multi-vesiculares y un inusual túbulo multivesicular lisosomal (TMV-lisosoma), que actúa como compartimento terminal (30,31).



Esquema 3. Representación gráfica de las organelas presentes en los promastigotes y amastigotes de *Leishmania*. Adaptado de Besteiro y Williams *et al.* (2007) (32).

El flagelo emerge desde una estructura denominada bolsillo flagelar. En amastigotes el flagelo se encuentra prácticamente embebido en el interior del bolsillo, de modo que solo se puede observar mediante microscopía electrónica (33). Tanto el proceso de endocitosis como el de exocitosis tienen lugar en el reservorio del bolsillo flagelar de promastigotes y amastigotes (34). Para adquirir moléculas del exterior celular, *Leishmania* también utiliza transportadores presentes en su membrana, así como la fusión de vesículas autofágicas (35).

En cuanto al metabolismo de *Leishmania*, se puede resumir en los siguientes apartados (36):

a) Metabolismo de los carbohidratos:

Todos los estadios de *Leishmania* expresan las enzimas necesarias para llevar a cabo la glucólisis y la ruta de las pentosas fosfato. Muchas de estas enzimas se encuentran parcial o completamente secuestradas en el interior del glicosoma. Se pueden encontrar de 10 a 100 glicosomas por parásito, los cuales se caracterizan por tener un diámetro de 0.2-0.3 μm y estar rodeados por una membrana única bastante impermeable, por lo que las reservas de ATP y NADH^+ glicosomales deben ser regeneradas en el interior del propio orgánulo.

b) Ciclo de los ácidos tricarboxílicos y respiración mitocondrial:

La dependencia del ciclo de los ácidos tricarboxílicos es mayor en amastigotes, pues están expuestos a niveles bajos de glucosa, pero relativamente altos de aminoácidos y lípidos.

Por otra parte, la mitocondria de *Leishmania* contiene todos los componentes necesarios para una cadena respiratoria funcional, los cuales están codificados tanto por genes nucleares como mitocondriales.

c) Formas de almacenamiento de energía:

Leishmania acumula un tipo de carbohidrato de reserva único, el manán, compuesto de cadenas lineares de β 1,2-manosa. El manán constituye la alternativa al glucógeno presente en eucariotas superiores y es sintetizado en el citoplasma y catabolizado cuando las fuentes de carbono son limitantes. Al igual que en otros protistas y en metazoos, el almacenamiento a largo plazo de carbono reducido implica la participación de lípidos.

d) Biosíntesis de lípidos:

El genoma de tripanosomátidos codifica para la maquinaria de la ácido graso sintasa de tipo II, pero la ruta predominante para la síntesis *de novo* de los ácidos grasos se debe a un sistema denominado elongasa, llevado a cabo por una familia de β -ketoacil-CoA sintasas.

e) Metabolismo de los aminoácidos:

Tanto los promastigotes como los amastigotes pueden utilizar los aminoácidos como fuente principal o única de carbono en ausencia de carbohidratos. Recientes estudios han sugerido que la captación de aminoácidos así como su catabolismo podría ser importante para la proliferación de los amastigotes en el interior del fagolisosoma.

f) Recuperación y síntesis de nucleótidos:

Leishmania carece de las enzimas necesarias para realizar la síntesis *de novo* de purinas. Los promastigotes expresan nucleotidasas, nucleasas y transportadores de membrana que median la degradación de nucleótidos extracelulares y ácidos nucleicos, así como la incorporación de nucleósidos de purina y pirimidina. Se cree que los amastigotes expresan transportadores alternativos a los de promastigotes. Además de poder

importarlas gracias a los transportadores de membrana, *Leishmania* sí puede sintetizar pirimidinas *de novo*.

g) Sistema redox:

Los tripanosomátidos sintetizan cuatro tioles de bajo peso molecular: glutatión, glutatiónil-espermidina, tripanotión y ovotiol, que conjuntamente forman un sistema redox único de tripanosomátidos.

h) Metabolismo de los fosfatos:

Al igual que otros protistas y algunos procariotas, los tripanosomátidos acumulan pirofosfatos y polifosfatos en vacuolas ácidas especializadas denominadas acidocalcisomas, quizás como una forma alternativa de almacenamiento de energía y como protección contra el estrés osmótico.

Como comentamos anteriormente, una de las características más significativas del Orden Kinetoplastida es la presencia de una mitocondria única que se extiende a lo largo del cuerpo del parásito y cuyo ADN se concentra en una zona próxima al cuerpo basal del flagelo, que recibe el nombre de kinetoplasto. El ADN del kinetoplasto (ADNk) representa el 30% del total del ADN celular. El ADNk está formado por moléculas circulares relajadas y concatenadas entre sí formando una red. Existen dos tipos de anillos: los maxicírculos y los minicírculos. Hay miles de minicírculos en una sola mitocondria, y su tamaño oscila entre los 0,5 y los 2,5kb (dependiendo de la especie); sin embargo, solo hay unas pocas docenas de maxicírculos, con un tamaño de entre 20 y 40kb. Los maxicírculos son estructural y funcionalmente análogos al ADN mitocondrial (ADNmt) de eucariotas superiores y codifican para ARNs ribosomales (ARNr) y subunidades del complejo respiratorio mitocondrial. Los minicírculos codifican para ARNs guías responsables de la modificación de los transcritos de los maxicírculos por

inserción o delección de múltiples uridinas, en un proceso conocido como edición del ARN (37).

El genoma de *Leishmania* se encuentra distribuido en 34 y 36 pares de cromosomas en especies del Nuevo Mundo y del Viejo Mundo, respectivamente (38,39). Solo se han encontrado dos genes codificantes que posean intrones: el gen de la poliA polimerasa y el de la ARN helicasa (40,41). Los genes codificantes están dispuestos en largos grupos policistrónicos (de decenas a centenas de genes) en la misma cadena de ADN, y, en los cromosomas en los que ha podido ser estudiada, se ha comprobado que la transcripción se origina bidireccionalmente entre dos grupos policistrónicos divergentes (42-44). La ARN-polimerasa II es la responsable de la transcripción de los ARN mensajeros (ARNm), y experimentos con plásmidos episomales han demostrado que es capaz de iniciarla en ausencia de un promotor específico (45). Como resultado de este tipo de transcripción se obtienen ARNm policistrónicos. Por lo tanto, el control de la expresión génica en *Leishmania* es mayoritariamente post-transcripcional. Dentro de este control cabe destacar los procesos de 5'trans-splicing (en el cual se añade al extremo 5' del ARN una secuencia de 39 nucleótidos denominada mini-exón) y poliadenilación en 3' (adición de una cola de poli-A en el extremo 3') que dan lugar a los ARNm individuales y maduros. En los últimos años se ha empezado hablar también de un importante papel de la epigenética en la regulación de la expresión en tripanosomátidos (46). A pesar de que se han encontrado algunos ejemplos de transcripción antisentido, en *Leishmania* no se ha encontrado una maquinaria de ARN de interferencia (ARNi) y las técnicas de ARNi para silenciar sus genes funcionan pobremente, al contrario de lo que ocurre en *T. brucei*, parásito de la misma familia que sí dispone de dicha maquinaria (47-49).

Epidemiología, manifestaciones clínicas y tratamiento de la leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad endémica en 88 países distribuidos entre el sur de Europa, norte de África, Oriente Medio, Centro América, Sudamérica e India, con 350 millones de personas en riesgo y una prevalencia de 12 millones de personas. De estos países, 72 están en vías de desarrollo y 13 de ellos subdesarrollados (50). La leishmaniasis puede manifestarse principalmente de tres formas: visceral, cutánea y mucocutánea. El tipo de enfermedad que pueda llegar a desarrollarse depende tanto de la especie de *Leishmania*, como de su zimodema (patrón electroforético de isoenzimas expresado por el parásito). Así, parásitos de una misma especie pueden causar leishmaniasis visceral o cutánea, en función del zimodema que presenten (51). Las principales especies causantes de las distintas manifestaciones de la enfermedad se resumen en el siguiente cuadro:

Enfermedad	Especies del Viejo Mundo	Especies del Nuevo Mundo
Leishmaniasis visceral	<i>L. donovani</i> (India, Kenia), <i>L. infantum</i> (Sur de Europa y Norte de África)	<i>L. chagasi</i> , <i>L. amazonensis</i>
Leishmaniasis dérmica post-kala azar	<i>L. donovani</i>	
Leishmaniasis cutánea	<i>L. tropica</i> , <i>L. major</i> , <i>L. aethiopica</i> , <i>L. infantum</i> , <i>L. donovani</i>	Complejo <i>L. mexicana</i> : <i>L. mexicana</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. venezuelensis</i> ; Subgénero Viannia: <i>L. (V) braziliensis</i> , <i>L. (V) panamensis</i> , <i>L. (V) guyanensis</i> , <i>L. (V) peruviana</i> , <i>L. major</i> , <i>L. chagasi</i>
Leishmaniasis mucocutánea	Subgénero Viannia: <i>L. (V) braziliensis</i> , <i>L. (V) panamensis</i> , <i>L. (V) guyanensis</i> , <i>L. amazonensis</i>	
Leishmaniasis cutánea difusa	<i>L. aethiopica</i>	Complejo <i>L. mexicana</i>

Esquema 4. Patrón de enfermedades y las especies de *Leishmania* causantes de las mismas en distintas localizaciones geográficas. Adaptado de Piscopo y Azzopardi (8).

Características de las manifestaciones clínicas:

Leishmaniasis visceral (LV)

Presenta una incidencia de 500.000 casos al año, de los cuales el 90% se dan en zonas rurales pobres y áreas suburbanas de 5 países: Bangladesh, India, Nepal, Sudán y Brasil. (50). El periodo de incubación de esta enfermedad puede variar generalmente entre los 3 y los 8 meses. Los síntomas incluyen fiebre intermitente, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia, linfadenopatía, pancitopenia e hipergammaglobulinemia. A veces puede producir pigmentación de la piel. Puede ser asintomática y resolverse sin mayores problemas, pero generalmente cursa de modo crónico y puede ser fatal sin tratamiento y, en ocasiones, incluso con tratamiento. Existen casos atípicos que pueden afectar a los pulmones, la mucosa oral, esófago, estómago, intestino delgado, piel y médula ósea (8,52). Es importante destacar que un gran porcentaje de pacientes con leishmaniasis visceral en los países mediterráneos están además infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). Este tipo de co-infección se puede encontrar también en el norte de África, Brasil, Sudán, Kenia, Etiopía, Burkina Faso y la India. Los síntomas característicos son fiebre, hepatoesplenomegalia, pérdida de peso y pancitopenia, así como dolencias gástricas (53).

La LV presenta una variación conocida como leishmaniasis dérmica post-kala azar, que se desarrolla una vez que la leishmaniasis visceral ha remitido y que ocurre en un pequeño porcentaje de pacientes de India y África. Generalmente se debe al complejo *L. donovani*. Se trata de una dermatosis crónica que a veces afecta a las mucosas y que cursa con lesiones en la piel que pueden ser de tipo macular, máculopapular o nodular, que se extienden frecuentemente desde la zona perioral a otras zonas del cuerpo (8,54).



Leishmaniasis visceral (a) y post-kala azar (b) (55).

Leishmaniasis cutánea (LC)

Presenta una incidencia anual de 1-1,5 millones de casos de los cuales el 90% se dan en 7 países: Afganistán, Argelia, Brasil, Irán, Perú, Arabia Saudí y Siria (50). El período de incubación va desde 2 semanas hasta varios meses e incluso a veces años. Comienza con una pápula en el lugar de la picadura del mosquito que generalmente crece de tamaño y termina ulcerándose. En el 90% de los casos acaba por curarse, aunque puede costar entre 3 y 18 meses.

También existen variaciones de la enfermedad como la leishmaniasis cutánea difusa, con lesiones diseminadas en cara, pies y manos (8,56).



Leishmaniasis cutánea (a) y leishmaniasis cutánea difusa (b) (55).

Leishmaniasis mucocutánea (LMC)

El período de incubación es de entre 1 y 3 meses aunque la enfermedad puede producirse varios años después de que la primera úlcera haya sanado. Afecta a la mucosa de la nariz, cavidad oral y faringe, produciendo dificultades para comer y elevando el riesgo de una infección secundaria, lo que implica en muchos casos la muerte del paciente (8,56).



Leishmaniasis mucocutánea (55).

En cuanto a los tratamientos disponibles para la leishmaniasis, los antimoniales pentavalentes (SbV) fueron usados durante mucho tiempo como tratamiento estándar para la leishmaniasis, y aún hoy en día constituyen la primera línea de tratamiento en muchos lugares. El SbV es el pro-fármaco y debe reducirse a SbIII para presentar actividad leishmanicida. Aunque no se conoce el mecanismo exacto de acción, se ha descrito que podría interferir con el mecanismo energético del parásito. También se sabe que el SbIII inhibe a la tripanotión reductasa *in vitro*, lo que conlleva una pérdida de tioles intracelulares y a la acumulación de especies reactivas de oxígeno. El principal problema de este fármaco es que han aparecido numerosos casos de resistencia en la India, una región gravemente afectada por LV, así como en otros lugares (57,58).

Desde 1960, la anfotericina B se ha utilizado como segunda línea de tratamiento para la leishmaniasis ofreciendo muy buenos porcentajes de curación en pacientes de la India. En otros lugares, sin embargo, no ofrece ventajas sobre los

antimoniales pentavalentes. El tiempo de administración es muy prolongado y presenta diversos efectos adversos como por ejemplo fiebre, nefrotoxicidad o hipokalemia, lo cual implica su administración continuada en un hospital. Sin embargo, las formulaciones lipídicas de esta droga han mejorado ampliamente su perfil, pues son selectivamente incorporadas por el sistema retículo endotelial del hospedador, ofreciendo así una acción leishmanicida localizada y potente. La formulación liposomal de la anfotericina B suele ser la primera elección como tratamiento en los países endémicos del sur de Europa así como en otros países desarrollados gracias a su rápida tasa de curación. Sin embargo, su coste es prohibitivo para países pobres, en donde la elección del tratamiento se convierte más en una cuestión de coste que de efectividad o toxicidad para el paciente (58,59).

La miltefosina es la primera droga leishmanicida de administración oral. Posee un alto índice de eficacia incluso en aquellos casos en donde los SbV fallan. Presenta ciertos efectos adversos como toxicidad gastrointestinal y elevación de la creatinina y transaminasas hepáticas, pero sus mayores desventajas son su potencial teratogenicidad así como su elevada vida media (alrededor de 150 horas), lo cual puede favorecer la aparición de resistencias. De hecho, se han detectado resistencias en cepas de laboratorio. Su mecanismo de acción concreto se desconoce, aunque parece depender en gran medida de su acumulación intracelular y de su interacción con el metabolismo lipídico (58,60).

La paramomicina es un aminoglucósido con actividad leishmanicida que ha ofrecido buenos porcentajes de curación aunque sin superar a la anfotericina B. Aunque no muy costosa, presenta diversos efectos adversos como elevación de transaminasas y dolor en el lugar de administración (requiere inyecciones intramusculares durante 21 días). Al tratarse de un aminoglucósido es muy probable la aparición de resistencias, por lo que en general se prueba combinada con otras drogas (58,61).

El alopurinol es otro compuesto con actividad leishmanicida de administración oral. Su mecanismo de acción consiste en inhibir la xantina oxidasa, lo que conduce a la síntesis de un análogo de la inosina que bloquea la síntesis proteica al incorporarse en el ARN. Se ha usado experimentalmente para el tratamiento en humanos y es el tratamiento estándar para la leishmaniasis canina (62).

En el siguiente cuadro se resumen los distintos tratamientos aplicados por lo general para cada una de las distintas manifestaciones clínicas de la leishmaniasis:

Enfermedad	Fármaco	Dosis
Leishmaniasis visceral	Miltefosina	(2,5mg/kg/día, oral, 1 o 2 veces al día) x 28 días
	Anfotericina B liposomal	(2mg/kg/día intravenosa) x 5 días
	Antimoniales pentavalentes	(20mg/kg/día intramuscular o intravenosa) x 28 días
Leishmaniasis mucocutánea	Simultánea a visceral:	
	Anfotericina B	(1mg/kg intravenoso) x 20 o 30 dosis
	Como única manifestación:	
	Antimoniales pentavalentes	(20mg/kg/día intramuscular o intravenosa) x 20 días (x10 días en <i>L. major</i> , <i>L. tropica</i> y <i>L. mexicana</i>)
	Fluconazol	200mg, oral, 1 vez al día
	Ketoconazol	(600mg, oral, 1 vez al día)x 28 días
Leishmaniasis cutánea	Miltefosina	(2,5mg/kg/día, oral, 1 vez al día) x 28 días
	Antimoniales pentavalentes	(1ml/lesión, en el interior de la lesión) x 8-15 dosis
	Pentamidina	(2-4mg/kg 1 vez al día o cada 2 días, intravenosa) x 15 dosis
	Paramomicina	Tópico, 2 veces al día

Esquema 5. Sumario de los tratamientos disponibles para las distintas manifestaciones de la leishmaniasis. Adaptado de Piscopo y Azzopardi (8).

En cuanto a la inmunoterapia existente para esta enfermedad, hasta hace poco solo se habían llegado a utilizar 2 vacunas en humanos (una con parásitos vivos y la otra con muertos), y una para profilaxis en perros. Sin embargo, en las dos últimas décadas la inmunoterapia se está abriendo paso como tratamiento adicional de la leishmaniasis bien sola, o bien combinada con quimioterapia con el fin de acelerar la respuesta inmunológica en pacientes con inmunidad intacta o para producir una reacción efectiva en pacientes inmunodeprimidos. En concreto, se busca inducir selectivamente una respuesta de tipo Th1, considerada esencial para la resistencia a la leishmaniasis. La inmunización mediante promastigotes muertos por calor ha dado resultados contradictorios, por lo que los estudios más recientes se centran en la purificación de antígenos recombinantes así como la obtención de vacunas de ADN, y de su aplicación combinada con diversos agentes quimioterapéuticos (63).

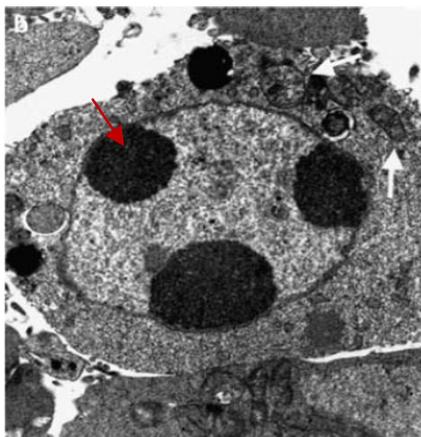
Mecanismos de muerte celular

Los diferentes tipos de muerte celular están definidos generalmente por criterios morfológicos, sin una clara referencia a los mecanismos bioquímicos específicos que los caracterizan. Debido a este motivo los editores de la revista *Cell Death and Differentiation* (una revista del grupo Nature especializada en el proceso de muerte celular) decidieron crear el Comité de Nomenclatura de Muerte Celular (NCCD). El objetivo era unificar los criterios utilizados para la definición de muerte celular y los diferentes tipos de mecanismos mediante los cuales puede operar, así como mantener dichas definiciones en continua revisión y actualizadas. En primer lugar, es importante destacar la discriminación que debe hacerse entre una célula que se está muriendo (como proceso) y una célula que ya está muerta (la muerte como punto final). Por lo tanto, se sugirió considerar a una célula como muerta cuando presenta algunos de los siguientes criterios moleculares: la célula ha perdido la integridad de la membrana plasmática (lo cual se puede determinar *in vitro* mediante el uso de colorantes vitales), la célula y su núcleo se han fragmentado completamente en cuerpos discretos (los denominados “cuerpos

apoptóticos”) y/o ha sido englobada por una célula adyacente *in vivo*. El proceso de muerte puede ser llevado a cabo por múltiples mecanismos, cada uno de ellos caracterizado por unos criterios específicos, aunque no todos deben estar necesariamente presentes para satisfacer la definición. Dichos criterios se resumen a continuación (adaptado de Kroemer *et al.* (2009) (64)).

a) Apoptosis:

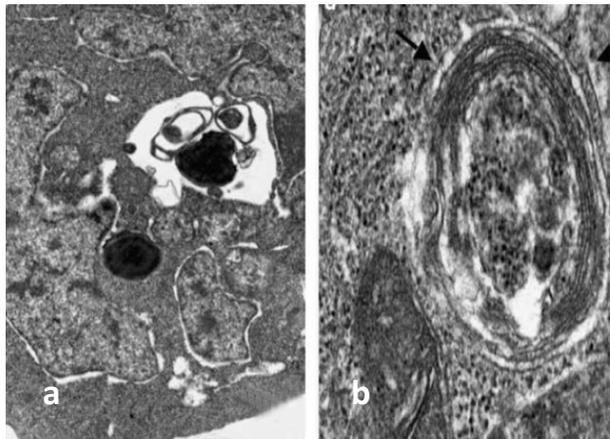
La apoptosis es un tipo de muerte celular que viene acompañada por el redondeamiento de la célula, la retracción de pseudópodos, reducción del volumen celular (piknosis), condensación de la cromatina, fragmentación del núcleo (kariorexis), pequeña o inexistente modificación ultraestructural de las organelas citoplasmáticas, formación de cuerpos apoptóticos y mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática hasta los últimos estadios del proceso. La fragmentación oligonucleosomal del ADN así como la activación de caspasas no deben utilizarse para definir a la apoptosis, pues se ha demostrado que estos cambios no son estrictamente necesarios para que se lleve a cabo el programa de muerte celular, aunque sí son muy útiles para identificar a un determinado proceso como “apoptosis”.



Fotografía de microscopía electrónica de una célula epitelial humana sufriendo apoptosis inducida por radiación: destaca la condensación de la cromatina (flecha roja) y la integridad de la membrana mitocondrial (flecha blanca).

b) Muerte por autofagia:

La muerte por autofagia se podría definir como un tipo de muerte celular que cursa sin condensación de la cromatina, acompañada por un proceso masivo de vacuolización autofágica del citoplasma. Dichas vacuolas presentan por definición una doble membrana y contienen en su interior los restos del citosol y de las organelas, por lo que pueden diferenciarse de endosomas, lisosomas y cuerpos apoptóticos. Otro marcador destacado es la localización de la proteína LC3 en el interior de las vesículas. Es importante diferenciar el proceso de muerte por autofagia del proceso de apoptosis; es decir, la autofagia es un proceso que puede ocurrir de forma habitual en la célula sin conllevar su muerte, pero la muerte por autofagia es un tipo de muerte que implica rasgos fenotípicos típicos del proceso de autofagia.

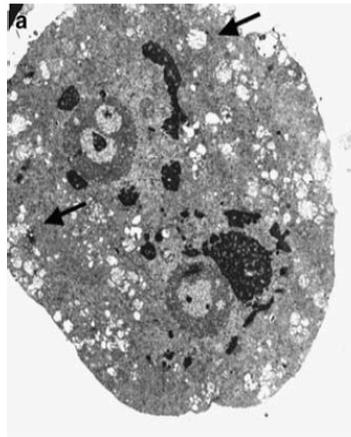


(a) Célula epitelial humana sufriendo formación de vacuolas autofágicas tras tratamiento con tamoxifeno: destaca la dilatación del retículo endoplásmico perinuclear y la formación de vesículas de doble membrana (b, flecha negra).

c) Necrosis:

La necrosis se suele considerar mediante una definición negativa, como un proceso de muerte celular que cursa sin apoptosis y sin autofagia. Su morfología se caracteriza por un citoplasma disgregado, rotura de la membrana plasmática, dilatación de las organelas citoplasmáticas y condensación moderada de la cromatina. Ha sido considerada durante mucho tiempo como una muerte accidental, pero empiezan a descubrirse

evidencias de que podría existir una regulación en la cual estarían implicadas diversas vías de señalización y reacciones catabólicas. De todas formas, los mecanismos que desencadenan el proceso de necrosis *in vivo* necesitan conocerse mejor, con el fin de poder establecer una definición más precisa.



Célula epitelial humana sufriendo necrosis tras estrés oxidativo: destaca la ruptura de la membrana plasmática, la formación de vesículas intracelulares y la pérdida de la ultraestructura mitocondrial (flechas negras).

d) Catástrofe mitótica:

Este tipo de muerte celular ocurre durante o justo después de un fallo en el proceso mitótico. Puede ir acompañada de alteraciones morfológicas como la aparición de micronúcleos y multinucleación, aunque no existe un consenso estricto en el uso de este término.

e) Anoikis:

El uso de este término se encuentra muy extendido y por eso se conserva, pero no deja de ser un tipo de apoptosis inducida por pérdida de adherencia al sustrato o a otras células.

f) Excitotoxicidad:

Es un tipo de muerte que ocurre en las neuronas cuando aminoácidos excitadores como el glutamato provocan la apertura de un canal de calcio

que implica el incremento del calcio intracelular y por lo tanto la muerte de la célula.

g) Degeneración Walleriana:

Se utiliza para definir la muerte de las células nerviosas por degeneración de parte del axón, sin afectar al cuerpo celular principal.

h) Cornificación:

Es un tipo específico de muerte que ocurre en la epidermis y que conlleva la formación de una envuelta cornificada, en donde el queratinocito muerto contiene un conjunto de proteínas y de lípidos específicos necesarios para el mantenimiento de la envuelta.

i) Paraptosis:

Este término se acuñó para definir un tipo de muerte celular programada morfológica y bioquímicamente distinta de la apoptosis, e inducida mayoritariamente por expresión del receptor del factor I de crecimiento similar a insulina. Se caracteriza por la vacuolización del citoplasma y la hinchazón de la mitocondria, pero sin que se halle presente otra marca de apoptosis. Sus manifestaciones no pueden ser prevenidas por inhibidores de caspasas ni por sobre-expresión de proteínas de la familia Bcl-2, de cuyo papel en la apoptosis hablaremos más adelante.

j) Pyroptosis:

Se describió por primera vez en macrófagos infectados por *Salmonella typhimurium*, si bien se ha observado en otro tipo de infecciones que presentan distintas rutas de activación. Está caracterizada por la activación de la caspasa-1 sin activación de la caspasa-3. Los macrófagos que sufren pyroptosis no solo muestran características típicas de apoptosis, sino también de necrosis.

k) Pyronecrosis:

Muerte similar a necrosis observada en macrófagos infectados por *Salmonella flexneri*, que está asociada con la liberación de HMGB-1, caspasa-1 e IL-1 β .

l) Entosis:

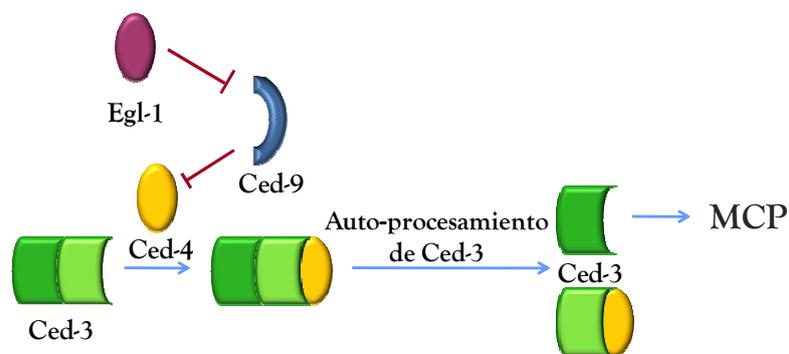
Se describió originalmente como un “canibalismo celular” observado en linfocitos de pacientes con la enfermedad de Huntington, de forma que una célula engulle a las células vecinas. Las células que la llevan a cabo de modo más eficaz son las células de cáncer de mama MCF-7, que son relativamente incapaces de llevar a cabo un proceso de apoptosis o autofagia por carecer de caspasa-3 y beclina-1.

Muerte celular programada (MCP) y apoptosis en organismos multicelulares

Durante la segunda mitad del siglo XX diversos avances experimentales sugirieron la idea de que las células de los organismos multicelulares tienen la capacidad de activar un programa de auto-destrucción regulado por señales procedentes de otras células (65), así como de la propia célula (por daño en el material genético (66), plegamiento anormal de las proteínas (67) o alteraciones en la actividad mitocondrial (68)). De este modo, la MCP juega un importante papel tanto en el desarrollo de los organismos multicelulares regulando procesos de morfogénesis y de diferenciación sexual, como en la vida adulta de los mismos, permitiendo la homeostasis de los tejidos, la eliminación de células dañadas o anormales y como defensa contra las infecciones. Es importante destacar que, aunque la apoptosis es el fenotipo más frecuente y típico de entre los procesos de MCP, los términos MCP y apoptosis no son sinónimos y no deben usarse como equivalentes, pues la MCP puede operar mediante otros mecanismos como por

ejemplo, la autofagia (69,70). Debido a su relevancia para esta tesis, durante esta introducción nos centraremos en la explicación del mecanismo apoptótico.

Aunque el fenotipo apoptótico fue descrito por primera vez por Kerr, Wyllie y Currie en 1972 (71), la primera evidencia de la existencia de información genética específica para el control de la muerte celular la proporcionaron Horvitz *et al.* (1999) mediante estudios en el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Para el desarrollo del gusano adulto se generan 1090 células somáticas de las cuales 131 sufren apoptosis en distintos puntos del desarrollo, el cual es esencialmente invariable para estos animales demostrando que se trata de un fenómeno controlado. La investigación mediante la obtención de diversos mutantes genéticos ha desvelado que la supervivencia o muerte de la mayoría de las células durante el desarrollo de este gusano depende de la presencia y expresión de solo 4 genes: *ced-3*, *ced-4*, *ced-9* y *egl-1* (72,73). Ced-3 es una cisteín-proteasa con especificidad por residuos de aspartato y sintetizada como una pro-enzima inactiva que requiere ser procesada para activarse y actuar como un ejecutor de la muerte celular; es decir, una caspasa. Ced-4 es una proteína adaptadora que se une a Ced-3 y promueve su auto-procesamiento y activación. Ced-9 es un represor de muerte celular que al unirse a Ced-4 evita la activación de Ced-3. Finalmente, Egl-1 es un antagonista de Ced-9, a la cual se une para evitar su efecto protector y permitir la activación de Ced-3. Además, existen otros genes que están implicados en la digestión rápida de las células apoptóticas de este gusano por células adyacentes (72).



Esquema 6. MCP en *C. elegans*: Ced-4 se une a Ced-3 permitiendo su auto-procesamiento y activación para que pueda cumplir con su función ejecutora en el proceso de MCP del nematodo. Ced-4 puede ser inhibida por Ced-9, que a su vez puede ser inhibida por Egl-1.

Durante los últimos años se han encontrado homólogos para estos genes de *C. elegans* en esponjas (*Hydra vulgaris*), insectos (*Drosophila melanogaster*), pez cebra, ratones y humanos, entre otros. En humanos existen alrededor de 20 homólogos al represor Ced-9 y su antagonista Egl-1, que se agrupan dentro de la familia Bcl2. Esta familia engloba tanto a represores de muerte como Bcl-2 o Bcl-XL, como a pro-apoptóticos como Bax, Bak o Bid. También existen homólogos para el ejecutor Ced-3 conocidos como la familia de las caspasas, dentro de la cual podemos diferenciar entre caspasas iniciadoras, 2, 8, 9 y 10, y ejecutoras, 3, 6 y 7. Además, existe al menos un homólogo de Ced-4, conocido como Apaf-1 (proteasa apoptótica activadora del factor 1). La creencia general es que la familia Bcl2/Bax ejerce su papel antagonista en la supervivencia/muerte celular a través del control que ejercen sobre la permeabilidad mitocondrial, bien reprimiendo (Bcl2) o bien induciendo (Bax) la salida al citosol de diversos factores presentes en el espacio intermembrana de la mitocondria. Algunos de estos factores, como el citocromo c, Smac/Diablo y Omi/HtrA2 están relacionados con vías ejecutoras dependientes de caspasas, mientras que otros factores como AIF (factor inductor de la apoptosis) o EndoG, están relacionados generalmente con vías ejecutoras independientes de caspasas (69,74).

Para entender mejor estos procesos hablaremos de las distintas vías de señalización en apoptosis. Hasta la fecha parece evidente que existen dos vías principales: la extrínseca o mediada por receptores de muerte, y la intrínseca o mitocondrial. Sin embargo, existen evidencias de que ambas están ligadas y que las moléculas de una u otra pueden influenciarse mutuamente (75). Además, existe una vía adicional que implica citotoxicidad mediada por células T y que conlleva muerte celular dependiente del dúo granzima-perforina, que puede ser vía granzima A, o vía granzima B. Las vías intrínseca, extrínseca y la mediada por la granzima B, pueden converger en una misma vía terminal o ejecutora que, con intervención de caspasas, da lugar a la fragmentación del ADN, degradación del citoesqueleto y proteínas nucleares, entrecruzamiento de proteínas, formación de cuerpos apoptóticos, expresión de ligandos que puedan ser reconocidos por células

fagocíticas y, finalmente, fagocitación de las células apoptóticas. Sin embargo, en ocasiones estas vías pueden desembocar en vías ejecutoras alternativas que operan de forma independiente de caspasas como describiremos más adelante, y que pueden dar lugar a un fenotipo “similar a apoptosis” (70). Por otra parte, la vía mediada por la granzima A activa un mecanismo paralelo y también independiente de caspasas mediante daño en el ADN de cadena sencilla (76). Nos centraremos en las vías extrínseca e intrínseca por ser las de mayor relevancia:

➤ Vía intrínseca:

Este mecanismo implica que la apoptosis se inicie por una serie de estímulos no mediados por receptor que producen una serie de señales intracelulares que repercuten en la mitocondria. Estos estímulos pueden ser negativos, como la ausencia de ciertos factores de crecimiento, hormonas y citoquinas, o bien positivos, como la radiación, la presencia de toxinas, hipoxia, hipertermia, infecciones virales y radicales libres. Todos estos estímulos producen cambios en la membrana mitocondrial que provocan la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (MPT), la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la liberación de dos grupos principales de proteínas pro-apoptóticas desde el espacio intermembrana al citosol. El primer grupo lo constituyen el citocromo c, Smac/DIABLO (segundo activador de caspasa derivado de la mitocondria/proteína de unión directa a IAP de bajo PI) y la serin proteasa HtrA2/Omi (proteína A2 con requerimiento de alta temperatura), que promoverán la vía mitocondrial dependiente de caspasas (76). El citocromo c al liberarse forma un complejo con Apaf-1 y la procaspasa-9, conocido como apoptosoma, que conduce a la activación de la caspasa-9 (77). Smac/DIABLO y HtrA2/Omi han sido descritos como factores pro-apoptóticos, pues inhiben la actividad de IAP (inhibidores de la apoptosis) (78,79), que a su vez actúan en la célula

inhibiendo la actividad de las caspasas. El segundo grupo lo constituyen otras proteínas apoptóticas como AIF y la Endonucleasa G (Endo G), liberadas ya en la fase terminal de la apoptosis. Ambas, junto con la nucleasa citosólica CAD, se translocan al núcleo donde intervienen en la degradación del ADN y en la condensación de la cromatina, con la diferencia fundamental de que CAD interviene exclusivamente en procesos dependientes de caspasas (80), mientras que EndoG y AIF participan también en procesos independientes de caspasas (81,82). De estas nucleasas hablaremos en detalle más adelante.

Como ya comentamos, el control y la regulación de los eventos apoptóticos relacionados con la mitocondria están regulados por la familia de proteínas Bcl-2, formada por miembros pro-apoptóticos (Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik y Blk) y anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w y BAG) (83).

➤ Vía extrínseca:

Implica la participación de receptores transmembrana pertenecientes a la familia del receptor TNF (factor de necrosis tumoral), los cuales presentan un dominio intracelular de unos 80 aminoácidos conocido como “dominio de muerte”. Los mejor caracterizados junto con sus respectivos ligandos son FasL/FasR y TNF- α /TNFR1. La unión de estos ligandos a sus receptores conlleva finalmente el reclutamiento de la proteína citosólica adaptadora FADD. La asociación de FADD con la procaspasa-8 conlleva la formación de DISC (complejo inducido por señales de muerte), que resulta en la activación auto-catalítica de la procaspasa-8. Ésta será la responsable de la activación de la procaspasa-3 y otras caspasas ejecutoras (76).

Como hemos mencionado, los mecanismos extrínseco e intrínseco pueden compartir el mecanismo final de ejecución. En procesos dependientes de caspasas, las caspasas 3, 6 y 7 funcionan como caspasas “ejecutoras” procesando diversos sustratos entre los cuales destacan PARP (poliADP-ribosa polimerasa) y la gelsolina (87). La caspasa-3 se considera la caspasa ejecutora más importante y puede ser activada por las caspasas 8, 9 y 10. Concretamente, es la encargada de activar a la endonucleasa CAD al separarla de su inhibidor ICAD (88), y de inducir la reorganización y desintegración de la célula en cuerpos apoptóticos (89). Sin embargo, y como hemos mencionado, el proceso apoptótico puede desarrollarse de forma independiente de caspasas. Esto incluye tanto mecanismos en los que las caspasas no intervienen, como mecanismos en los que existe activación de caspasas, pero la muerte no opera a través de ellas. En estos casos, la muerte puede operar mediante fenotipos que pueden ser desde “similares a apoptosis” (parecida a la apoptosis pero que puede carecer de un alto grado de condensación de la cromatina, kariorrhexis, fragmentación oligonucleosomal y/o formación de cuerpos apoptóticos), a un fenotipo autofágico e incluso necrótico, como se resume en el siguiente esquema:



Esquema 7. Representación esquemática de los diversos procesos de muerte que pueden tener lugar en función de la intervención de las caspasas. Adaptado de Kroemer *et al.* (2005) (70).

Cabe decir que existen todavía muchos interrogantes acerca de cómo las células mueren en ausencia de caspasas, y que este mecanismo está todavía definido con términos muy indirectos (70).

MCP y apoptosis en organismos unicelulares

Se han descrito varios tipos de MCP en distintas especies de eucariotas unicelulares, algunas de las cuales divergieron hará uno o dos billones de años. Entre ellas están organismos tan diversos como *Dictyostelium discoideum*, *Tetrahymena thermophila*, *Peridinium gatunense*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Toxoplasma gondii*, *Blastocystis hominis*, *Giardia intestinalis*, *Trichomonas foetus*, *Trichomonas vaginalis*, *Plasmodium berghei*, *Plasmodium falciparum* y varias especies de tripanosomátidos como *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania major*, *Leishmania donovani* y *Leishmania infantum*. Los tripanosomátidos se consideran los eucariotas más primitivos, y por lo tanto los primeros en divergir (90). En los organismos unicelulares, al igual que en los pluricelulares, la MCP puede ser regulada por señales extracelulares. Por ejemplo, tanto en *T. thermophila* como en *T. cruzi* se ha documentado la existencia de un control social de la supervivencia celular que opera a nivel de células individuales (91,92). En el caso de los parásitos tripanosomátidos, se ha visto como señales producidas por el hospedador tales como la temperatura, las lectinas, o factores del sistema inmune como las citoquinas o el complemento pueden regular dichos procesos de MCP (91,93). Este programa de destrucción podría aportar diversos beneficios a los organismos unicelulares como por ejemplo la selección de los individuos más aptos para la supervivencia, la adaptación del número de organismos al ambiente y los recursos derivados del mismo, la regulación del ciclo celular y diferenciación en respuesta a cambios ambientales, y la evasión del sistema inmune en el caso de organismos parásitos (69). A partir de ahora nos centraremos en los estudios realizados en tripanosomátidos, y en especial, en *Leishmania*, por ser de especial relevancia para esta tesis.

Existen diversos estudios que demuestran la capacidad de los tripanosomátidos para morir manifestando un fenotipo autofágico (94,95). La autofagia juega un importante papel en la remodelación y diferenciación de los parásitos a lo largo de su ciclo de vida, y varios de los genes implicados en este proceso han sido identificados (96-98)

Por otro lado, también se han descrito procesos de muerte similar a apoptosis en esta familia de parásitos. Existen etapas en el ciclo de transmisión de la infección por *Leishmania* en las cuales el proceso apoptótico podría desempeñar un importante papel. Por ejemplo, cuando los promastigotes procíclicos se dividen en el sistema digestivo del mosquito, debe existir un mecanismo de control que regule el número de parásitos de tal manera que no se comprometa la supervivencia del hospedador. Así mismo, para que los amastigotes presentes en el hospedador mamífero puedan ser incorporados por un nuevo mosquito en búsqueda de alimento, es necesario que la carga parasitaria en el hospedador vertebrado no sea demasiado elevada y pueda desembocar en la muerte del hospedador. Ambos procesos podrían estar regulados por un proceso apoptótico. Por otro lado, la apoptosis podría ayudar a la eliminación de células con menor capacidad de supervivencia (99). Además, y como hemos comentado cuando describimos el ciclo de vida de *Leishmania*, la presencia de parásitos PS positivos es importante para que el proceso de infección concluya con éxito (19). La presentación de PS en la cara externa de la membrana de parásitos apoptóticos estimula la producción del factor TGF β por parte de los macrófagos, citoquina que actúa inhibiendo la respuesta inflamatoria, favoreciendo la supervivencia de otros promastigotes no apoptóticos fagocitados por la misma célula (21).

Se ha descrito que diversas drogas con actividad leishmanicida pueden provocar fenotipos similares a apoptosis en estos parásitos: estaurosporina (100), *Pentostam*®, anfotericina B (101), antimicina A (102), miltefosina (103), edelfosina (104), novobiocina (105) o camptotecina (106), entre otras. Lo mismo ocurre con ciertos estímulos fisiológicos como el peróxido de hidrógeno (107), el óxido nítrico (108), o el choque térmico (93,109). En el fenotipo expresado por el

parásito tras el tratamiento con estos estímulos se han observado muchas de las características que definen al proceso apoptótico en eucariotas superiores y entre las cuales se encuentra la degradación del ADN genómico. De hecho, la degradación oligonucleosomal del ADN ha sido observada en todos los organismos unicelulares mencionados anteriormente susceptibles de sufrir muerte similar a apoptosis, con la excepción de *Dictyostelium discoideum* (69). Se conoce muy poco sobre las vías y las proteínas implicadas en los procesos similares a apoptosis que tienen lugar en organismos unicelulares, y solo recientemente se han descubierto algunos de los factores implicados en el proceso. Por ejemplo, se ha observado que la muerte inducida por ROS (especies reactivas de oxígeno) en *T. brucei* es dependiente de Ca^{+2} (110). Por otro lado, mediante electroforesis de acrilamida-SDS-ADN, Zangger *et al.* (2002) detectaron actividad nucleasa en lisados de promastigotes estacionarios y amastigotes de distintas especies de *Leishmania*, sugiriendo que alguna de ellas podría ser la responsable de la degradación observada durante el proceso similar a apoptosis. Además, estos promastigotes estacionarios resultaron ser positivos en el ensayo de TUNEL, técnica que permite detectar la presencia de múltiples extremos 3'OH derivados de la rotura de enlaces fosfodiéster (111). En mamíferos, las caspasas juegan un papel clave en la activación de CAD y por lo tanto en la degradación del ADN. Aunque se ha detectado actividad similar a caspasas en tripanosomátidos (101,107), la idea predominante es que en estos parásitos el proceso apoptótico transcurre de forma independiente de caspasas, pues no se han encontrado genes homólogos a los que codifican para estas cisteín-proteasas en el genoma de ningún tripanosomátido. Sin embargo, sí se ha observado que la respuesta celular de este parásito a diversos estímulos de muerte puede ser modulada por la presencia de inhibidores de caspasas. Así, se ha demostrado que un pre-tratamiento con el inhibidor de caspasas zVAD-fmk, reduce el número de parásitos que muestran signos de apoptosis tras el tratamiento con H_2O_2 (107), novobiocina (105) o camptotecina (106). En este sentido, se ha demostrado su capacidad para prevenir la degradación del ADN y, en algunos casos, el procesamiento de la proteína apoptótica similar a PARP presente en tripanosomátidos. A pesar de la aparente

ausencia de caspasas, en muchos de estos protozoos se ha confirmado la presencia de metacaspasas, aunque éstas no parecen estar directamente relacionadas con la actividad similar a caspasas previamente mencionada (112-114). Sin embargo, sí se ha descrito que la metacaspasa de *L. major* es capaz de reemplazar a la metacaspasa YCA1 en mutantes nulos de esta proteína en levaduras, restaurando el fenotipo apoptótico al que da lugar YCA1 en condiciones de estrés oxidativo (113). También se ha demostrado que parásitos de *L. donovani* que sobre-expresan las dos metacaspasas descritas en esta especie, son más sensible al proceso apoptótico inducido por H₂O₂ (114). Otros marcadores apoptóticos como el descenso en el potencial de membrana mitocondrial o la exposición de PS en la cara externa de la membrana también han sido observados (100-102). Es importante mencionar el hecho de que no se hayan encontrado proteínas de la familia Bcl-2 en tripanosomátidos. Sin embargo, la expresión de Bcl-2 humano tiene un efecto protector en *L. infantum* tras el tratamiento con el fármaco edelfosina (104).

Principales nucleasas implicadas en la degradación del ADN durante el proceso apoptótico

Como hemos mencionado, la degradación del ADN genómico es uno de los procesos celulares que habitualmente caracterizan la muerte por apoptosis. Actualmente, se conocen dos nucleasas principales que están implicadas en dicha degradación: CAD y EndoG.

CAD

En 1980, *Wyllie* observó que el tratamiento de timocitos de rata con glucocorticoides induce una degradación del ADN genómico en fragmentos nucleosomales de doble cadena (115). Desde entonces muchos grupos trataron de

buscar a la nucleasa responsable de esta actividad. Fue después del descubrimiento de las caspasas cuando Liu *et al.* (1997) observaron que al tratar extractos citosólicos de células en proliferación con caspasas, éstos podían inducir fragmentación del ADN en núcleos aislados (116). El factor responsable de esta actividad fue designado como DFF (factor de fragmentación del ADN), y posteriormente pasaría a recibir el nombre de CAD (ADNasa activada por caspasas). CAD forma un complejo con ICAD, su inhibidor, el cual debe ser procesado por la caspasa-3 para que CAD se active. Con el fin de digerir el ADN durante el proceso apoptótico, CAD debe dirigirse al núcleo y para ello cuenta con la presencia de una señal de localización nuclear en su extremo C-terminal; sin embargo, en condiciones normales de proliferación existen resultados contradictorios acerca de su localización, habiéndose detectado la presencia de CAD/ICAD tanto en el citosol como en el núcleo dependiendo del tipo de célula observada (117,118).

En principio, parece claro que CAD es la máxima responsable de la degradación de ADN observada durante los procesos apoptóticos dependientes de caspasas. Sin embargo, algunos resultados ponen en duda que sea un elemento indispensable para la degradación del ADN durante la apoptosis. Como comentamos anteriormente, bajo determinados estímulos apoptóticos, se pueden liberar diversos factores desde el interior de la mitocondria, entre ellos, AIF y EndoG. AIF no tiene actividad nucleasa por sí mismo, y aunque se ha publicado su participación en la degradación de ADN a gran escala (119), su papel en la degradación del ADN durante la apoptosis no está muy claro y en caso de que active a alguna nucleasa, ésta no ha sido identificada todavía (118). Sí parece más clara su implicación en la condensación de la cromatina (120). Sin embargo, EndoG sí interviene en la degradación del ADN genómico que tiene lugar en determinados procesos apoptóticos.

EndoG

En 1994, Gerschenson *et al.* (1995) demostraron que la nucleasa conocida como EndoG observada en el núcleo de células de mamífero era la misma nucleasa que había sido descrita como la “ADNasa principal de la mitocondria”. Estas demostraciones están basadas tanto en la identidad de secuencia entre ambas, como en sus propiedades bioquímicas y especificidad a la hora de atacar una secuencia de nucleótidos (121). Los primeros experimentos que hacen alusión a esta nucleasa se remontan a los años 60, donde se detectó una actividad endonucleasa en preparaciones de mitocondria aisladas de hígado de rata (122-124). En 2001, Li *et al.* (2001) demostraron que EndoG es capaz de inducir fragmentación nucleosomal del ADN bajo un estímulo apoptótico mediante su translocación desde la mitocondria hasta el núcleo en fibroblastos de ratones transgénicos que carecen de CAD (o bien del sitio de procesamiento de ICAD mediante el cual CAD es activada por la caspasa-3). Resultados similares se observaron de forma independiente en *C. elegans* (125). La persistencia de la fragmentación del ADN inducida por radiación ultravioleta en presencia de inhibidores de caspasas observada por Li *et al.* (2001) sugiere que dicha fragmentación se puede producir de forma independiente de caspasas. Esto fue demostrado de forma más evidente mediante un experimento en el que se empleó Bim recombinante fusionado a glutatión S-transferasa (GST). Bim es una proteína pro-apoptótica de la familia Bcl-2 capaz de producir una salida de citocromo c de la mitocondria no mediada por caspasas. Lo que observaron fue que en células deficientes en CAD, Bim era capaz de inducir la degradación del ADN; sin embargo, cuando estas mismas células eran tratadas con la proteína anti-apoptótica Bcl-XL (demostrando que se trataba de un proceso apoptótico) o el anticuerpo α -EndoG, se bloqueaba dicha degradación (82), lo que sugiere que EndoG es responsable de la degradación observada. Por otra parte, y contrariamente a los resultados que acabamos de exponer, Arnoult *et al.* (2003) analizaron por inmuno-blot extractos mitocondriales tratados con el pro-apoptótico Bax y observaron que la adición del inhibidor de caspasas zVAD-fmk

impide la liberación de EndoG y de AIF de la mitocondria, sugiriendo que dicha liberación también se puede producir de forma dependiente de caspasas (126). Sus resultados también muestran que tanto la liberación de EndoG como de AIF al citosol es posterior a la liberación de citocromo c, Smac/Diablo y HtrA2/Omi. Según la interpretación de estos autores, la salida del citocromo c al citosol promovería la activación de las caspasas, y éstas serían las responsables de la liberación de otros factores mitocondriales, entre ellos, EndoG.

Se cree que EndoG no está sola durante el proceso de degradación del ADN que lleva a cabo durante la apoptosis. Experimentos de caracterización de la actividad de esta nucleasa muestran que tanto la exonucleasa como la ADNsaI podrían estar cooperando con ella, pues el patrón de degradación observado en el proceso apoptótico se corresponde con el que pueden generar el conjunto de estas nucleasas. (127). Por otra parte, en *C. elegans* se ha sugerido que la proteína nuclear CRN-1 (homóloga a la proteína de reparación FEN-1 humana) podría colaborar con EndoG en las tareas de degradación durante el proceso apoptótico (128).

Como EndoG es de especial relevancia para esta tesis, vamos a profundizar en otros aspectos conocidos hasta la fecha relacionados con la caracterización de esta nucleasa.

- Estructura, caracterización enzimática y mecanismo de acción de EndoG:

EndoG ha sido identificada en todos los genomas completos que existen de eucariotas, incluyendo *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster*, *C. elegans* y *Saccharomyces cerevisiae*, entre otros. Pero también nucleasas pertenecientes a bacterias como *Serratia marcescens* y *Anabaena* sp. contienen un gen codificante para una nucleasa que muestra un 42 y un 28% de identidad respectivamente con la secuencia de la EndoG bovina, lo cual apoya la teoría endosimbionte del

origen de la mitocondria. Ambas nucleasas bacterianas son secretadas al exterior y presentan preferencia por atacar regiones $(dG)_n \cdot (dC)_n$. Es interesante destacar que la nucleasa de *Anabaena* forma un complejo con otra enzima que previene la toxicidad de la nucleasa en el interior de la bacteria (129).

EndoG recibe su nombre porque también presenta preferencia por digerir sitios $(dG)_n \cdot (dC)_n$, con mayor especificidad por la hebra G. Su actividad es dependiente de la presencia de ciertos cationes divalentes como el Mg^{+2} , el Mn^{+2} o el Co^{+2} y se inhibe en presencia de cationes monovalentes como el K^+ o el Na^+ (130,131). Los primeros estudios con proteína recombinante nativa purificada de núcleos de timo bovino demostraron que EndoG se comportaba como un dímero (132), aunque estudios posteriores matizaron que existe un equilibrio entre la forma dimérica y la monomérica de la proteína recombinante (131). EndoG pertenece a la super-familia de las nucleasas no específicas con motivo $\beta\beta\alpha$ de unión al metal, las cuales se encuentran en un amplio número de organismos tanto procariotas como eucariotas, y de las que cabe destacar a la nucleasa extracelular de *Serratia marcescens*, por ser la que más se ha estudiado y por lo tanto la que mejor se conoce. Esta familia de nucleasas se caracteriza por presentar un motivo DRGH que contiene diversos residuos importantes para la catálisis y entre los cuales destaca la histidina, que se comporta como una base general activando una de las aguas que hidratan al catión metálico situado en el centro activo, llevándose así a cabo el ataque nucleofilo sobre el átomo de fósforo del ADN (131). Aunque los residuos del motivo DRGH han sido el principal objetivo de diversos estudios mutacionales, otra serie de mutaciones han permitido conocer otros residuos relevantes tanto durante el proceso catalítico (como es el caso de la Asn catalítica situada en el centro activo), como en la especificidad por una determinada secuencia de nucleótidos o en la unión a sustrato, en la cual están especialmente involucrados varios residuos de Arg (131,133).

Al igual que otros componentes de la familia de nucleasas no específicas con motivo $\beta\beta\alpha$ de unión al metal, EndoG es activa tanto frente a ARN, como frente a híbridos de ADN/ARN, y frente a ADN de cadena doble y sencilla, con preferencia por este último. Con ADN de doble cadena como sustrato, EndoG genera primero cortes de cadena sencilla (121,134,135).

En los últimos años, se han obtenido los cristales tanto de la EndoG de ratón (136), como de la EndoG de *Drosophila* (137). Esta última ha sido cristalizada en presencia de su inhibidor, EndoGI, el cual consiste en una proteína con dos dominios que se unen a los sitios activos de cada uno de los monómeros que forman EndoG, quedando ésta englobada en su interior, a modo de sándwich. EndoGI se localiza en el núcleo y se ha sugerido que podría actuar como un “seguro de vida” en caso de que parte de EndoG pudiese quedar en el núcleo por un fallo en el sistema de transporte a la mitocondria (137).

- Localización:

Otro aspecto muy importante a destacar, pues es algo muy característico de EndoG, es su localización mitocondrial. Al igual que otras proteínas mitocondriales, esta nucleasa está codificada por un gen nuclear y presenta en su secuencia una región que codifica para un péptido señal en su extremo amino terminal, que es responsable de su localización. Concretamente, se ha determinado que EndoG está principalmente localizada en el espacio intermembrana mitocondrial (138,139). El hecho de que esta nucleasa esté contenida en la mitocondria es muy importante, pues la expresión ectópica extra-mitocondrial de EndoG activa puede inducir la muerte celular (131). Como ya hemos mencionado, la localización de la proteína cambia durante el proceso apoptótico, y EndoG se transloca de la mitocondria al núcleo para ejercer su acción degradativa sobre el ADN genómico (82).

- Función:

Durante el transcurso de esta introducción hemos destacado el importante papel que EndoG desempeña durante el proceso apoptótico, interviniendo en la degradación del ADN genómico. Sin embargo, también se ha descrito la presencia de un papel pro-vida para esta nucleasa en células en proliferación. Esto último parece claro al menos en levaduras y en el nematodo *C. elegans* (125). La delección de NUC1, nucleasa equivalente a EndoG en levaduras, conduce a un incremento de la muerte necrótica en condiciones de fermentación, cuando la fosforilación oxidativa está reprimida (140). La reducción en los niveles de *cps-6* en *C. elegans* mediante ARN de interferencia (ARNi), implica un retraso en el crecimiento celular durante el desarrollo del nematodo. Sin embargo, en mamíferos este papel pro-vida no parece ser tan evidente, pues existen resultados contradictorios acerca de la supervivencia de ratones deficientes en EndoG. Cabe mencionar que en ratones, el gen de EndoG se encuentra solapado con otro gen de función desconocida. Los grupos de investigación que no han conseguido ver ninguna clase de fenotipo en los ratones, se limitan a eliminar solamente el gen que codifica para EndoG; por el contrario, en el trabajo en el cual se describe la muerte de los ratones por efecto de la supresión de EndoG, ambos genes han sido eliminados (141-143). Por otra parte, la gran mayoría de los experimentos que adjudican a esta nucleasa un papel pro-vida han sido realizados *in vitro*, y consisten en demostrar cómo EndoG podría estar involucrada en procesos de recombinación, reparación y replicación del ADNm. En cuanto a los trabajos acerca de su posible participación en la recombinación del ADNmt, destacan los realizados en levaduras (144) y *Neurospora* (145), en los que se demuestra que ambas nucleasas presentan además de la actividad endonucleasa, una actividad 5' exonucleasa capaz de crear regiones de cadena sencilla requeridas para que se pueda producir la recombinación homóloga. La EndoG de mamíferos, por su parte, carece

de esta actividad exonucleasa, y su papel en recombinación permanece todavía poco claro, si bien es cierto que existen ciertos trabajos que sugieren su involucración en este proceso. Por un lado, Huang *et al.* (2002) han demostrado que EndoG es la única enzima celular aislada de células HeLa capaz de producir cortes de doble cadena en la secuencia de recombinación *a* del virus HSV-1, secuencia responsable de la inversión que se produce durante la replicación del ADN de este virus (146). Además, han observado que la reducción de los niveles celulares de EndoG por ARNi causa un defecto en la proliferación celular que recuerda a una detención del ciclo celular en la fase G₂ (135). Por otro lado, Cymerman *et al.* (2008) han descubierto recientemente la presencia en mamíferos de EXOG, una endo-exonucleasa mitocondrial que no parece desempeñar ningún papel durante el proceso apoptótico, pero que sí podría estar implicada en recombinación del ADNm, ofreciendo una alternativa a EndoG. EXOG surge de la duplicación de un gen ancestral que generó las subfamilias parálogas EndoG y EXOG en eucariotas superiores; de esta manera EndoG y EXOG podrían tener funciones complementarias y análogas a las que en eucariotas inferiores están desempeñadas por una sola endo/exonucleasa (147).

Como hemos mencionado, también existen trabajos que sugieren que EndoG podría estar interviniendo en la reparación del ADNmt. En *Drosophila*, se ha descrito que la presencia de la mutación *mus308* (que se corresponde con un defecto en EndoG) implica una deficiencia tanto en la reparación de determinados ADNs como en la actividad de la nucleasa *in vitro* (148,149). En el caso de mamíferos, se ha observado que los niveles de EndoG cuantificados en extractos mitocondriales *in vitro* varían hasta en más de 200 órdenes de magnitud entre distintos tejidos de rata, y su actividad específica parece correlacionar con la tasa de oxígeno consumido y, por lo tanto, la tasa de daño oxidativo del ADNmt (150). Otro estudio muestra cómo la EndoG bovina parcialmente purificada

presenta gran afinidad por ADN dañado debido al tratamiento con ácido ascórbico-L, peplomina y *cis*-diaminodicloroplatino (III), sugiriendo que EndoG podría reorganizar y participar en la reparación de las distintas distorsiones locales del ADN que dichos agentes pueden causar (151). También se ha descrito, tanto en *C. elegans* (128) como en humanos (152) la asociación de EndoG con FEN-1, una endonucleasa específica de estructura que retira extremos 5' generados durante la reparación, replicación y recombinación del ADN (153). Sin embargo, y aun considerando todos estos experimentos *in vitro*, los factores que prevendrían la acción de EndoG sobre el ADN intacto no han sido identificados, ni los factores que podrían activarla en caso de daño oxidativo del ADN, por lo que su papel en reparación sigue estando en entredicho (129).

También hemos mencionado la posible participación de EndoG en la replicación del ADNmt. A este respecto, Côte y Carrillo (1993) describieron cómo EndoG es capaz de generar oligonucleótidos de ARN *in vitro* gracias a su actividad ARNasa H (actividad que permite degradar el ARN en los dímeros ADN:ARN), los cuales podrían ser utilizados por la ADN polimerasa durante la replicación del ADNmt (138). Sin embargo, la capacidad de EndoG para comportarse como una ARNasa H es incierta pues a pesar de que puede degradar el ARN en dímeros ADN:ARN, no presenta especificidad por éste, cualidad típica de las ARNssas H (129).

Hipótesis

El parásito protozoo *Leishmania infantum* presenta en su genoma un gen que codifica para una proteína con secuencia, estructura, función y localización subcelular similares a las EndoGs de otros organismos.

Materiales y Métodos

“If you are not part of the solution, you are part of the precipitate.”

Henry J. Tillman

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y reactivos utilizados en los procedimientos generales de biología molecular

A excepción de algunos reactivos que se especifican en el texto, todos los reactivos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich.

Las enzimas de restricción, ADN polimerasas, T4 ADN ligasa, ADNasaI, exonucleasa T7 y fosfatasa alcalina fueron compradas a Takara, Fermentas, Ecogen, Roche y New England Biolabs. Los kits utilizados para la purificación de reacciones enzimáticas, purificación de geles de agarosa y purificaciones preparativas fueron comprados a Qiagen. Para los procesos de clonaje se utilizaron bacterias *E. coli* DH5 α . Para obtener bacterias competentes se utilizó el método Hanahan (Molecular Cloning).

Cultivos celulares

Para el desarrollo de esta tesis doctoral se utilizó la cepa de *Leishmania infantum* M/CAN/ES/96/BCN150 MON-1, aislada de un perro en Barcelona, que fue generosamente cedida a nuestro laboratorio por el Dr. Carlos Alonso Bedate, del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa de la Universidad Autónoma de Madrid. Los parásitos, en su forma de promastigote, se mantuvieron en pase en medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado con Suero Bovino Fetal (SBF) (Gibco BRL® Life Technologies) al 10%, penicilina 100U/mL (Gibco BRL® Life Technologies), estreptomycin 100 μ g/mL (Gibco BRL® Life Technologies) y HEPES 25mM, a una T^a de 26°C. Todos los ensayos fueron realizados con promastigotes en fase logarítmica no excediendo una concentración de 4x10⁶ parásitos/mL y en medio fresco. Los ensayos de inducción de muerte similar a apoptosis fueron realizados añadiendo edelfosina 30-40 μ M o miltefosina 50-70 μ M

al medio de cultivo e incubando los promastigotes en presencia de estas drogas durante 24h. La edelfosina fue generosamente cedida por el Dr. Faustino Mollinedo, del Centro de Investigación del Cáncer del Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (CSIC - Universidad de Salamanca), y la miltefosina, por el Dr. Luis Rivas del Departamento de Biología Física-Química del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC).

Clonación y diseño de construcciones

La región codificante para la putativa EndoG de *Leishmania infantum* (LiEndoG) fue amplificada a partir de ADN genómico, clonada en los sitios de restricción BamHI y XhoI del plásmido pBluescript KS y secuenciada. Posteriormente, dicha región fue subclonada en el vector de expresión en bacterias pRSET mediante ligación, después de haber digerido con las enzimas de restricción BamHI y XhoI. Estas mismas enzimas fueron utilizadas para su posterior subclonación en los sitios BglII (que genera extremos compatibles con BamHI) y XhoI del vector integrativo para transfecciones en *Leishmania*, pIRmcs3(-), que confiere resistencia a nourseotricina. La secuencia codificante para eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) fue amplificada por PCR a partir de la construcción p6.5-eGFP, generosamente cedida por el Dr. K.P. Chang del Chicago Medical School (Rosalind Franklin University, North Chicago). Dicho producto de PCR fue purificado y digerido con las enzimas de restricción NdeI y BglII, al igual que el vector pIRmcs3(-), en el cual se procedió a su ligación. Las construcciones quiméricas formadas por la fusión de eGFP a los péptidos señal de LiEndoG y de la ARNasa HIIC se obtuvieron clonando la región codificante para los primeros 40 aminoácidos de dichos genes en el extremo 5' de la región codificante de eGFP, utilizando el sitio de restricción de BglIII. La construcción quimérica de LiEndoG completa fusionada a eGFP se obtuvo por amplificación de la región codificante de LiEndoG y posterior clonación de la misma en el sitio de restricción para BglIII de la construcción pIRmcs3(-)eGFP. Para la obtención de parásitos con uno de los

alelos de LiEndoG delecionados, se clonaron en el plásmido pUC19 los extremos 5'UTR (digerido con EcoRI y KpnI) y 3'UTR (digerido con BamHI y PstI) del gen de LiEndoG, y en medio de ambos se subclonó el gen de resistencia a puromicina (que había sido clonado previamente en otro vector en el laboratorio) para lo cual se digirió con KpnI y BamHI. Para el intento de obtención de parásitos con los dos alelos de LiEndoG delecionados se utilizó, además de la construcción en pUC19 previamente descrita, una nueva construcción realizada del mismo modo y en el mismo vector, pero conteniendo el gen de resistencia a neomicina.

Para eliminar la secuencia correspondiente al putativo dominio de autoinhibición del gen de LiEndoG, se llevó a cabo una primera reacción de PCR en la que se amplificó la región de la secuencia codificante para LiEndoG desde su inicio hasta los nucleótidos anteriores al posible dominio de autoinhibición. Por otro lado, se realizó otra reacción de PCR en la que se amplificó la región de la secuencia de LiEndoG desde los nucleótidos posteriores al posible dominio de autoinhibición hasta el final de la secuencia. Uno de los oligonucleótidos utilizados para cada una de las reacciones contenía la secuencia codificante para los 5 aminoácidos de la EndoG de *Drosophila* que queríamos incluir en el clonaje, así como una serie de nucleótidos solapantes de los dos fragmentos a amplificar, correspondientes a las regiones flanqueantes al posible dominio de autoinhibición. Ambos productos de PCR se utilizaron para realizar una PCR de fusión, de tal manera que el fragmento final resultante de esta última PCR contuviese la secuencia de LiEndoG con la región del posible dominio de autoinhibición sustituida por la secuencia codificante para 5 aminoácidos de la EndoG de *Drosophila*. Los oligonucleótidos utilizados para esta última reacción contenían las dianas de restricción de BamHI y de XhoI para poder realizar el clonaje tanto en los sitios BamHI y XhoI del vector pRSET, como en los sitios el vector BglII y XhoI del vector pIRmcs3(-).

Con la mezcla de ligación correspondiente a cada una de las distintas construcciones mencionadas, se transformaron bacterias DH5 α , se realizó un

cribado por digestión con enzimas de restricción para la selección de colonias positivas, y se llevó a cabo una purificación preparativa.

Los oligonucleótidos empleados para las distintas clonaciones y subclonaciones fueron los siguientes:

pBluescriptKSLiendoG

5'GGGGGATCCATCCATGAGTTCCAGCGCGATGATC3'

5'GGGCTCGAGTCAGCGTCGCTCTGC3'

pIRmcs3(-)eGFP

5'GGGAGATCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGA3'

5'GGGCATATGTTACTTGTACAGCTCGTCCA3'

pIRmcs3(-)LiendoG₁₋₄₀::eGFP

5'CCCAGATCTATGAGTGCCAGTGCGGCGA3'

5'CCCAGATCTCTGCACCACAAGCTGTGTG3'

pIRmcs3(-)ARNasaHIIC₁₋₄₀::eGFP

5'CCCAGATCTATGCTCCACGCATGGCGCTTC3'

5'CCCAGATCTTGGCCTGAAAGGGGAATAG3'

pIRmcs3(-)LiendoG:eGFP

5'CCCAGATCTATGAGTGCCAGTGCGGCGA3'

5'CCCAGATCTGCGTCGCTCTGCCTGGTC3'

pUC195'UTRLiendoG:puro y pUC195'UTRLiendoG:neo

5'GGGGAATTCTGAACATCACAGTGTGGAG3'

5'CTCATGGGTACCTGATGAATCGTTTCGCGCA3'

pUC195'UTRLiendoG:puro:3'UTRLiendoG

y pUC195'UTRLiendoG:neo:3'UTRLiendoG

5'GGGCTGCAGCTTGTCGCGGTTTTGG3'

5'GGGGGATCCTTGGGGTTGCCCTCGTTGC3'

pIRmcs3(-)LiendoGΔ144-180 y pRSETLiendoGΔ144-180

5'GGGGGATCCATCCATGAGTTCCAGCGCGATGATC3'

5'GCTGCGGTTGCGCGAGACCGCGTCGTTTTTCGCGAGCTTGCGGTAGTCAACCAC3'

5'GACTACCGCAAGCTCGCGAAAAACGACGCGGTCTCGCGCAACCGCAGCAAC3'

5'GGGCTCGAGTCAGCGTCGCTCTGC3'

Transfección y mantenimiento de promastigotes recombinantes

Para cada transfección, se centrifugaron 24×10^6 parásitos en fase logarítmica a $1000 \times g$ durante 5 minutos y se lavaron en el mismo volumen original con tampón de electroporación (NaCl 132mM, KCl 8mM, Na_2HPO_4 8mM, KH_2PO_4 1,5mM, MgOAc_2 0,5mM, CaOAc_2 90 μM , pH 7,0 con ácido acético, esterilizado por filtración). Posteriormente los parásitos fueron nuevamente centrifugados y tras aspirar el sobrenadante, se resuspendieron en 400 μl de tampón de electroporación a una concentración de 6×10^7 parásitos/mL. Dicha suspensión se transfirió a una cubeta de electroporación de 2mm de ancho junto con 3 μg de ADN previamente

linearizado con la enzima de restricción SmaI (en el caso las construcciones hechas en pIRmcs3(-)), o ScaI (para las construcciones hechas en pUC19); o bien sin ADN, en el caso del control negativo de la transfección. La electroporación se llevó a cabo en un electroporador ELECTRO CELL MANIPULATOR 600 (BTX) utilizando las siguientes condiciones: T= 2.5 KV, R2 (24Ohms), S = 1.5KV. Posteriormente los parásitos fueron transferidos a 10mL de medio suplementado con un 20% de SBF. Transcurridas 24 horas tras la transfección se procedió a la adición al medio de cultivo de nourseotricina a 100µg/mL para aquellos parásitos transfectados con las construcciones hechas en pIRmcs3(-), y de G418 a 30µg/mL o bien puromicina a 20µg/mL para los parásitos transfectados con las construcciones hechas en pUC19, dependiendo de si la construcción contenía el gen de resistencia a neomicina o a puromicina, respectivamente. Se obtuvieron poblaciones positivas después de un proceso de selección de unos 7-10 días. Finalmente, se procedió al aislamiento clonal de cada población siguiendo un método adaptado de Quijada *et al.*(2003) (154), en el cual los parásitos se siembran sobre una placa de agar/sangre semisólido (agar al 0.7%, NaCl al 0.6%, sangre de conejo inactivada al 6%, RPMI 0.5X) y se incuban a 26°C durante 7 días. Transcurridos los 7 días, se procedió a seleccionar entre 10-20 colonias, las cuales se crecieron en 200 µL de RPMI1640/20% SBF en placas de 96 pocillos con fondo en U, para finalmente pasar los parásitos a un volumen de cultivo mayor (10mL) y crecerlos con el fin de testar los niveles de expresión de la proteína deseada.

Curva de crecimiento de parásitos

Para comparar el crecimiento de los parásitos con bajos niveles de expresión de LiEndoG con respecto a los parásitos silvestres, se contaron los parásitos con la cámara de Neubauer (Marienfeld) y se dejaron en un volumen de 2mL, a una concentración de 500.000 parásitos/mL en placas de 24 pocillos, por triplicados. En los días sucesivos se fueron contando cada uno de los pocillos, y cuando la concentración excedía los 5×10^6 parásitos/mL, se diluía el pocillo correspondiente

en medio RPMI suplementado, en una proporción 1:5. Para la elaboración de la curva de crecimiento se tuvieron en consideración dichas diluciones, y posteriormente se le aplicó el \log_2 a los valores obtenidos para cada pocillo, cada día.

Expresión y purificación de LiEndoG recombinante (rLiEndoG)

Se utilizó la construcción pRSET*LiendoG* para transformar bacterias de la cepa de expresión de *E. coli* BL21(DE3). Posteriormente, las bacterias se crecieron en medio LB líquido en presencia de los antibióticos ampicilina (200 μ g/mL) y kanamicina (50 μ g/mL) hasta alcanzar una densidad óptica de 0,6 ($\lambda = 600$ nm), momento en el cual se indujo la expresión de rLiEndoG por adición de IPTG 1mM a 37°C durante 30 minutos. Debido a que la mayor parte de la proteína expresada se encontraba en la fracción no soluble, las bacterias fueron lisadas en presencia de GuHCl 6M. El sobrenadante de la lisis fue cargado en una columna con resina de Ni-NTA (Qiagen) para realizar la purificación en condiciones desnaturizantes siguiendo las instrucciones del protocolo QIAexpressionist (Qiagen). Para la obtención de proteína nativa, una vez cargado el lisado en la columna, se realizó un proceso de renaturalización de la proteína anclada a la resina mediante un gradiente decreciente de urea (6M-1M), y, finalmente, se eluyó en imidazol 250mM.

Obtención de anticuerpos policlonal y monoclonal antiEndoG

Para la obtención de suero policlonal α -rLiEndoG se inocularon tres conejos cada 15 días con 500 μ g de rLiEndoG en PBS1X, mezclada en proporción 1:1 con Adyuvante completo de Freund en el caso de la primera inoculación, y con Adyuvante incompleto de Freund en los sucesivos inóculos. Tras la titulación del suero por ELISA se escogió uno de los conejos y se sacrificó a las 8 semanas

obteniendo un suero con un título aproximado de 1:50000. Para la obtención del anticuerpo monoclonal se siguió el protocolo estándar descrito por Yokoyama *et al.* (2006) (155).

Inmuno-blot

Para cada muestra se lisaron 40×10^6 parásitos en 100 μ L de tampón *Laemmli* (Tris 187.5 mM pH 6,8, SDS al 6%, glicerol al 30%, Azul de Bromofenol al 0,01%, 2-mercaptoetanol al 15%), y 20 μ L de cada muestra fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% para ser después transferidos a membranas de nitrocelulosa, las cuales fueron bloqueadas durante 1 hora con leche al 5% en TBS-T (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, Tween 20 al 0,1% (v/v), pH 7,4). Posteriormente, las membranas se incubaron 2 horas en leche al 5% con los anticuerpos primarios α -rLiEndoG policlonal 1:50000, sobrenadante α -rLiEndoG monoclonal sin diluir, α -Hsp70 1:5000, α -Hsp60 1:2500, α -Hsp90 1:2500 o α -H2A 1:100, generosamente cedido por el Dr. Jose María Requena, del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC - Universidad Autónoma de Madrid). Los anticuerpos contra las proteínas de choque térmico fueron generosamente cedidos por el Dr. Joachim Clos, del Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine de Hamburgo. Finalmente, las membranas se incubaron durante 1 hora en leche al 5% con los anticuerpos secundarios α -ratón 1:5000, α -conejo 1:2000 o α -gallina 1:5000 (Santa Cruz Biotechnology). Para la detección de la señal quimioluminiscente se usó el Kit de ECL (Pierce).

Fraccionamiento celular

Se centrifugaron 20×10^6 parásitos en fase logarítmica y se procesaron siguiendo las instrucciones del fabricante (ProteoExtract Subcellular Proteome extraction kit; Calbiochem) para finalmente realizar un inmuno-blot con el anticuerpo

policlonal α -rLiEndoG. Los anticuerpos α -Hsp60, α -Hsp90 y α -H2A se utilizaron como controles para demostrar que cada proteína es especialmente abundante en cada una de las fracciones celulares obtenidas (Hsp60 en la mitocondria, Hsp90 en el citosol y H2A en el núcleo).

Microscopía confocal

Todas las preparaciones fueron realizadas partiendo de 20×10^6 parásitos logarítmicos y observadas mediante un microscopio Leica TCS SL (Leica Microsystems GmbH) dotado de dos LASER de excitación (Arg 488nm y He-Ne 543nm).

Para los experimentos de co-localización los parásitos fueron centrifugados, resuspendidos en RPMI en presencia de la sonda Mito-Tracker Red CMXRos (Molecular Probes) a 40nM, e incubados durante 45 minutos a 26°C. Posteriormente, se realizó un lavado de media hora en RPMI a 26°C. La fijación de los parásitos se realizó en paraformaldehído al 4% durante 10 minutos y para permeabilizar se utilizó el reactivo de permeabilización (solución A) del Kit IntraStain for Flow Cytometry (DakoCytomation) durante 15 minutos; en ambos casos las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente. Los núcleos fueron teñidos durante 5 minutos con 2,5 μ g/mL de ioduro de propidio (IP) tras una incubación de 30 minutos a 37°C con ARNasa a 100 μ g/mL. Para los ensayos de inmuno-localización, los parásitos fijados y permeabilizados fueron bloqueados con BSA al 1% en PBS1X, incubados durante 1 hora con el anticuerpo monoclonal α -rLiEndoG en una proporción 1:1 con BSA al 1% en PBS1X, y posteriormente incubados 1 hora con α -ratón 1:2000 unido a Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) en BSA al 1%; ambas incubaciones con los anticuerpos fueron realizadas a 37°C. Finalmente, los parásitos fueron centrifugados y se procedió al montaje sobre los portaobjetos. Las preparaciones se dejaron secar durante 24 horas en oscuridad antes de ser observadas en el microscopio.

Ensayos *in vitro* de la actividad nucleasa de rLiEndoG

- **Detección mediante gel de agarosa**

Se digirió 1µg de los vectores pRSET o pTRACER en un volumen final de 20µL con 1,68µg de rLiEndoG nativa para el control de digestión y 0,21µg para los ensayos con distintos iones: Mg²⁺, Mn²⁺ y Co²⁺. Para el Ca²⁺ se realizó un ensayo de competición frente a una concentración de Mg²⁺ 1mM. Los ensayos de inhibición para el estudio del efecto de Na⁺ y K⁺ se hicieron en presencia de Mg²⁺ 6,25µM. Tras 1h de digestión, se corrieron los productos en un gel de agarosa al 1% peso/volumen teñido con bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz ultravioleta. Para la detección de la actividad nucleasa de las distintas mutantes de rLiEndoG se procedió del mismo modo que para la proteína silvestre. Para determinar el efecto del pH sobre la actividad, la digestión se realizó en presencia de tampón AcNa 10mM, Mes 10mM y Tris 20mM a distintos pHs (4,5-10). Para determinar el efecto de los compuestos β-mercaptoetanol (β-ME) y ácido aurintricarboxílico (ATA) sobre la actividad de rLiEndoG, se añadieron concentraciones crecientes de los mismos a la digestión. Para determinar si LiEndoG produce cortes preferencialmente en una de las hebras de ADN o bien corta ambas hebras simultáneamente en el mismo lugar, se procedió a la desnaturalización de las muestras (una vez digeridas con concentraciones crecientes de rLiEndoG). Para desnaturalizarlas se añadieron 0,1 volúmenes de NaOH 1M, se calentaron durante 2 minutos a 55°C, se neutralizaron con 0,2 volúmenes de TrisHCl 1M pH 4, se enfriaron en hielo y finalmente se diluyeron en agua miliQ (evitando así los efectos de la concentración de sales en el desplazamiento durante la electroforesis).

- **Detección mediante geles de poliacrilamida-SDS-ADN**

Para detectar actividad nucleasa de modo directo tanto para la proteína silvestre como para los mutantes, se utilizó el análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS-ADN basado en el protocolo descrito por Navin *et al.* (2007) (156). Para ello, 4µg de proteína fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% conteniendo 1mg/mL de ADN de esperma de salmón. Posteriormente, y con el fin de eliminar el SDS presente en el gel, se hicieron dos lavados rápidos del gel en agua destilada, un lavado en tampón TEM (Tris-HCl 50mM, EDTA 1mM, MgCl₂ 2mM) durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente, un nuevo lavado con agua destilada y finalmente un lavado en TEM durante toda la noche a 37°C para favorecer el plegamiento de la proteína y la actividad nucleasa. Por último, se procedió a la tinción del gel en TEM con 0,25mg/mL de bromuro de etidio durante 30 minutos y se visualizó bajo luz ultravioleta. Paralelamente, se realizó una electroforesis con las mismas muestras y en las mismas condiciones, pero en este caso tiñendo el gel con Azul de Coomassie para tener un control del tamaño de la proteína gracias a la presencia de un marcador de peso molecular.

- **Detección por fluorimetría**

Para el estudio de las características cinéticas de rLiEndoG (silvestre y mutantes) durante la degradación de ADN de cadena simple, se digirieron concentraciones crecientes (6nM-540nM) de la sonda FAM5'CTGTCGCTACCTGTGG3'TAMRA (Applied Biosystems) en presencia de 1,26µg de rLiEndoG. Las digestiones se realizaron en tampón con TrisHCl 10mM y MgCl₂ 1mM, a pH 7,4. Para las digestiones en presencia del compuesto LEI-49, se utilizó ADN de doble cadena procedente de la hibridación de la sonda FAM5'CTGTCGCTACCTGTGG3' con la sonda reversa y complementaria 5'CCACAGGTAGCGACAG3'TAMRA. La hibridación

de las sondas se realizó en fosfato potásico 20mM (pH 7,5), realizando un descenso gradual de la temperatura cada 45 segundos desde 95°C hasta 20°C en un termociclador. Las digestiones fueron monitorizadas en tiempo real utilizando los fluorímetros Luminiscence Spectrometer LS 50 B (PerkinElmer) y Victor 1420 Multilabel Counter (Wallac). La longitud de onda de excitación para FAM5' es de 492nm y la de emisión, 517nm.

- **Ensayos de actividad exonucleasa**

Se amplificó por PCR un fragmento de ADN genómico de 500 pares de bases escogido al azar, utilizando uno de los oligonucleótido marcado en su extremo 5' con el fluoróforo FAM (Applied Biosystems). El ADN amplificado y marcado fue purificado por columna (Qiagen) y se utilizó para montar reacciones de digestión como las descritas en el apartado de detección de actividad mediante geles de agarosa, bien con rLiEndoG, o bien la endonucleasa ADNasaI o la exonucleasa T7. De los 20µl de digestión, 15µl se utilizaron para ser sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1% y 5µl fueron diluidos en proporción 1:10 para ser sometidos a una electroforesis capilar utilizando el secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Los resultados de la electroforesis capilar fueron analizados con el software Peak Scanner v1.0.

Citometría de flujo

Los ensayos de citometría de flujo se realizaron en los equipos Beckton Dickinson FACScalibur (BD Biosciences) y Cytomics FC 500 MPL Flow Cytometry (Beckman Coulter), ambos equipados con un láser de 488nm. Los resultados obtenidos fueron analizados con los programas CELLQUEST V4.0 (BD Biosciences) y MXP Software (Beckman Coulter).

- **Viabilidad celular**

Se utilizaron 400µL de cultivo de parásitos logarítmicos a los que se les adicionaron 5µg/mL de yoduro de propidio (Molecular Probes), el cual se incubó con cada muestra durante 5 minutos a temperatura ambiente. El patrón de fluorescencia de la población fue analizado en el canal FL4 (λ : 675nm).

- **Contaje relativo de parásitos**

Para comparar el número de parásitos que habían crecido en cada frasco tras el proceso de selección con antibiótico de las distintas electroporaciones realizadas con la construcción pIRmcs3(-)*LiendoGΔ144-180*, se tomaron 200 µL de cultivo y se les adicionó yoduro de propidio a 5µg/mL, el cual se incubó con las muestras durante 5 minutos a temperatura ambiente para poder distinguir a los parásitos vivos de los muertos. Las muestras fueron analizadas por citometría contando los eventos registrados durante un intervalo de 10 segundos. El número de parásitos vivos registrados en los frascos de parásitos transfectados con el vector vacío fue considerado como el 100%, y a partir de ahí se calcularon los porcentajes relativos de parásitos vivos presentes en las otras transfecciones.

- **Contenido de ADN (ciclo celular)**

Para la determinación del contenido relativo de ADN los parásitos fueron centrifugados durante 5 minutos a 1000xg y resuspendidos en 100µL de PBS1X. Posteriormente, se les añadió 700µl de etanol al 70% a una temperatura de -20°C, y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Tras esta incubación, los parásitos fueron centrifugados 5 minutos a 1500xg y rehidratados en 1mL de PBS1X/EDTA 50mM. Se centrifugaron nuevamente 5 minutos a 1500xg y se resuspendieron en 500µL de PBS1X con EDTA50mM, ARNasa 10µg/mL y yoduro de propidio 10µg/mL, para

su incubación a 37°C durante 30 minutos. Finalmente se analizó el patrón de fluorescencia del ciclo celular en el canal FL4 (λ : 675nm).

- **TUNEL**

Se centrifugaron 10×10^6 promastigotes logarítmicos los cuales fueron marcados utilizando el kit Fluorescein Frag-El ADN Fragmentation Detection (Calbiochem), siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente se analizó el patrón de fluorescencia en el canal FL1 (λ : 520nm).

Análisis de secuencia y estructura

Para realizar los alineamientos de secuencias se utilizaron las bases de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) y el *European Bioinformatics Institute* (EBI), utilizando el algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (157). Como métodos de predicción de estructura secundaria y perfil de plegamiento se utilizaron PsiPred (158) y mGenThreader (159), respectivamente. El servidor Phyre v. 02 (160) utilizó esta información para identificar como análogos estructurales de LiEndoG, en su modo por defecto y con una confianza del 100%, a la nucleasa NucA de *Anabaena* sp. (código del Protein Data Bank 1ZM8) y a la endonucleasa de *Serratia marcescens* (código PDB 1G8T), las cuales sirvieron como plantillas para la construcción de un modelo por homología de LiEndoG. Sin embargo, la base de datos de este servidor no incluía todavía la estructura cristalográfica de la Endonucleasa G de *Drosophila melanogaster* (DmEndoG), que ha sido publicada recientemente (código PDB 3ISM) (137). Por esta razón procedimos a utilizar el modo avanzado de Phyre¹ y también el servidor Swiss Model (161), (162), de modo que fuimos capaces de suministrar nuestro propio alineamiento de secuencias y especificar como molde la estructura

¹ <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/html/advanced.html>

tridimensional de DmEndoG. Como resultado obtuvimos un modelo adicional para LiEndoG que pudimos superponer y comparar con el modelo obtenido anteriormente. Esta superposición sirvió para optimizar la disposición de las cadenas laterales de los aminoácidos no conservados entre la secuencia de la proteína utilizada como molde y la de LiEndoG, mediante la selección de rotámeros implementada en el programa de gráficos moleculares PyMOL (DeLano, W. PyMOL, versión 0.99, DeLano Scientific LLC, South Francisco, CA. (<http://pymol.sourceforge.net/>)). Como en ninguna de estas enzimas cristalizadas está presente un fragmento de ADN que indique el modo de unión del sustrato, recurrimos a la estructura de la nucleasa periplásmica de *Vibrio vulnificus*, que sí ha sido co-cristalizada con un pequeño oligonucleótido de doble cadena por Hor *et al.* (2003) (163) y Wang *et al.* (2007) (164). A pesar de que el grado de identidad de secuencia y homología estructural con las nucleasas anteriores es bajo, el motivo $\beta\beta\alpha$ de unión al catión metálico está altamente conservado, por lo que fue posible realizar una superposición y así disponer de una localización tentativa del ADN en el sitio activo de LiEndoG.

Mutagénesis dirigida

A la vista del modelo por homología consenso obtenido para LiEndoG, se decidió realizar las siguientes mutaciones: S211A, S211D, H214A y R212A. El diseño de los oligonucleótidos necesarios se llevó a cabo utilizando el servidor que ofrece la casa Stratagene². Las reacciones de mutagénesis se realizaron amplificando por PCR la secuencia codificante para LiEndoG a partir de la construcción pRSET*LiendoG* por medio del kit Quick Change XL-Site Directed Mutagenesis (Cat#200516; Stratagene), específico para provocar mutaciones de un solo aminoácido, y siguiendo las instrucciones del fabricante. La presencia de las mutaciones fue verificada por secuenciación. Posteriormente, se procedió a

² <http://www.stratagene.com/sdmdesigner/default.aspx>

transformar bacterias *E. coli* BL21(DE3) con las distintas construcciones. Para la expresión y purificación de cada una de las enzimas mutantes se llevaron a cabo los protocolos descritos previamente para la proteína silvestre. Por último, y a partir de una de las construcciones previamente mutadas (S211D), se llevó a cabo una nueva reacción de mutagénesis (A247R) siguiendo el mismo protocolo que se acaba de describir.

Análisis estadístico

En los análisis estadísticos se realizó una comparación de medias con el T-test de dos colas y no pareado con el software Excel (Microsoft).

Resultados

“When you make the finding yourself – even if you’re the last person on Earth to see the light – you’ll never forget it.”

Carl Sagan

RESULTADOS

Identificación de la secuencia codificante para la putativa EndoG de *Leishmania infantum* (LiEndoG)

Muchos son los estímulos que han sido descritos como inductores de procesos similares a apoptosis en *Leishmania*: estaurosporina (100), peróxido de hidrógeno (107), óxido nítrico (108), *Pentostam*®, anfotericina B (101), antimicina A (102), choque térmico (93,109), miltefosina (103), edelfosina (104), novobiocina (105) o camptotecina (106), entre otros. Como respuesta a estos estímulos se han observado en el parásito muchas de las características que definen el proceso apoptótico en eucariotas superiores, entre ellas, de forma especialmente frecuente, la degradación del ADN genómico. Además, mediante electroforesis de poliacrilamida-SDS-ADN se ha detectado la presencia de proteínas con actividad nucleasa en lisados de distintas especies de *Leishmania*, sugiriendo que alguna de ellas podría ser la responsable de la degradación del ADN observada durante el proceso similar a apoptosis (111). Con objeto de localizar a la nucleasa responsable de dicha actividad, decidimos buscar en el genoma del parásito alguna secuencia con similitud a las secuencias de nucleasas conocidas implicadas en el proceso apoptótico en otros organismos. La principal nucleasa involucrada en la degradación del ADN durante la apoptosis de eucariotas superiores es CAD (ADNasa activada por caspasas), llamada originariamente DFF (factor de fragmentación del ADN) (117). Así mismo, la participación de una nucleasa mitocondrial denominada Endonucleasa G o EndoG ha sido demostrada incluso en ciertos procesos independientes de caspasas (82,165). Al realizar un análisis de comparación de secuencias de la proteína CAD humana con las proteínas hipotéticamente codificadas por el genoma de distintas especies de *Leishmania* mediante el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (157) del NCBI (National Center for Biotechnology Information), no fue posible encontrar ninguna secuencia con un grado de similitud significativo. Al repetir el procedimiento utilizando la secuencia de la EndoG humana, encontramos que

Al analizar en detalle la secuencia de la putativa EndoG de *Leishmania* (LiEndoG), comprobamos que existe una región que presenta una alta similitud con las regiones correspondientes a los sitios catalíticos de las Endonucleasas G humana (43%), bovina (43%), de levaduras (36%) y de *Trypanosoma cruzi* (59%) (Figura 2). Dentro de esta región se encuentra el motivo SRGH, localizado en una posición equivalente al motivo DRGH característico de las Endonucleasas G de eucariotas superiores. Resulta interesante destacar que el ácido aspártico (D) del característico sitio DRGH, se encuentra reemplazado en tripanosomátidos por una serina (S) (Ser211 en el caso de LiEndoG).



Figura 2. Alineamiento realizado por ClustalW de parte de la secuencias de EndoG humana (HsEdG), bovina (BtEdG), de levaduras (ScEdG), de *T. cruzi* (TcEdG) y de LiEndoG (LiEdG). “*” significa que los aminoácidos son idénticos en todas las secuencias del alineamiento. “:” significa que se ha producido una sustitución conservativa de un aminoácido por otro. “.” significa que se ha producido una sustitución semi-conservativa de un aminoácido por otro. Código de colores: Magenta (residuo básico), azul (residuo ácido), rojo (residuo hidrófobo) y verde (residuo polar). El recuadro verde engloba el característico dominio (D/S)RGH.

Una nueva e interesante diferencia con respecto a otras EndoGs surge al realizar una comparación de la secuencia completa de la proteína, pues se observa que LiEndoG es considerablemente más larga que cualquiera de las otras EndoGs de eucariotas superiores, con un peso molecular estimado de 54kDa frente a los 37,2kDa de *Saccharomyces cerevisiae*, los 32,3kDa de *Bos taurus* o los 32,6kDa de *Homo sapiens* (datos no mostrados).

Modelado y análisis estructural de LiEndoG

Una vez que conocida la secuencia de LiEndoG, y a falta de cualquier otro resultado experimental, nos propusimos construir un modelo tridimensional de esta proteína con detalle atómico mediante el empleo de herramientas bioinformáticas que permiten predecir con un grado de fiabilidad aceptable tanto su estructura secundaria, como su patrón global de plegamiento y la estructura tridimensional de parte, o partes de la secuencia utilizando como molde o plantilla una o más estructuras determinadas experimentalmente y disponibles en el *Protein Data Bank*³ (166).

El servidor Phyre (160) determinó automáticamente que tanto la endonucleasa de *Serratia marcescens* (167,168) como la nucleasa A (NucA) de *Anabaena* sp. (169) presentan un elevado porcentaje de identidad de secuencia con LiEndoG y un patrón de plegamiento similar, lo que permitió construir un modelo tridimensional (Figura 3.A) con un alto nivel de confianza ($p < 0,0001$), pero en el que no aparece el segmento comprendido entre los aminoácidos 145 y 185. Esto es debido a que estos 40 aminoácidos constituyen una inserción en LiEndoG con respecto a otras EndoGs caracterizadas.

Como consecuencia de la publicación en 2009 de la estructura cristalográfica de la Endonucleasa G de *Drosophila melanogaster* (DmEndoG) en complejo con su proteína inhibidora (137), y dado que esta nucleasa también presenta un alto porcentaje de identidad de aminoácidos y un patrón de plegamiento similar a las de *S. marcescens* y *Anabaena*, decidimos construir un nuevo modelo de LiEndoG que utilizara como molde a DmEndoG. Sin embargo, los procedimientos automatizados de Phyre no incluían a esta proteína en su base de datos, por lo que hubo que recurrir al modo avanzado de utilización de este servidor. Adicionalmente, empleamos otro servidor de modelado de proteínas por homología, el popular Swiss Model (161,162), con el mismo propósito. De este modo obtuvimos un nuevo modelo para LiEndoG (Figura 3.B), muy parecido al

³ <http://www.pdb.org>

obtenido anteriormente, pero con la ventaja añadida de que proporcionaba información estructural sobre algunos aminoácidos no representados en el primer modelo, si bien el grado de fiabilidad de estas regiones no era muy elevado. Sin embargo, el aspecto novedoso más importante fue que dispusimos de una sugerencia para parte de un posible dominio de dimerización, así como para un posible dominio de autoinhibición en el segmento comprendido entre los aminoácidos 144 y 180, como se explicará más adelante.

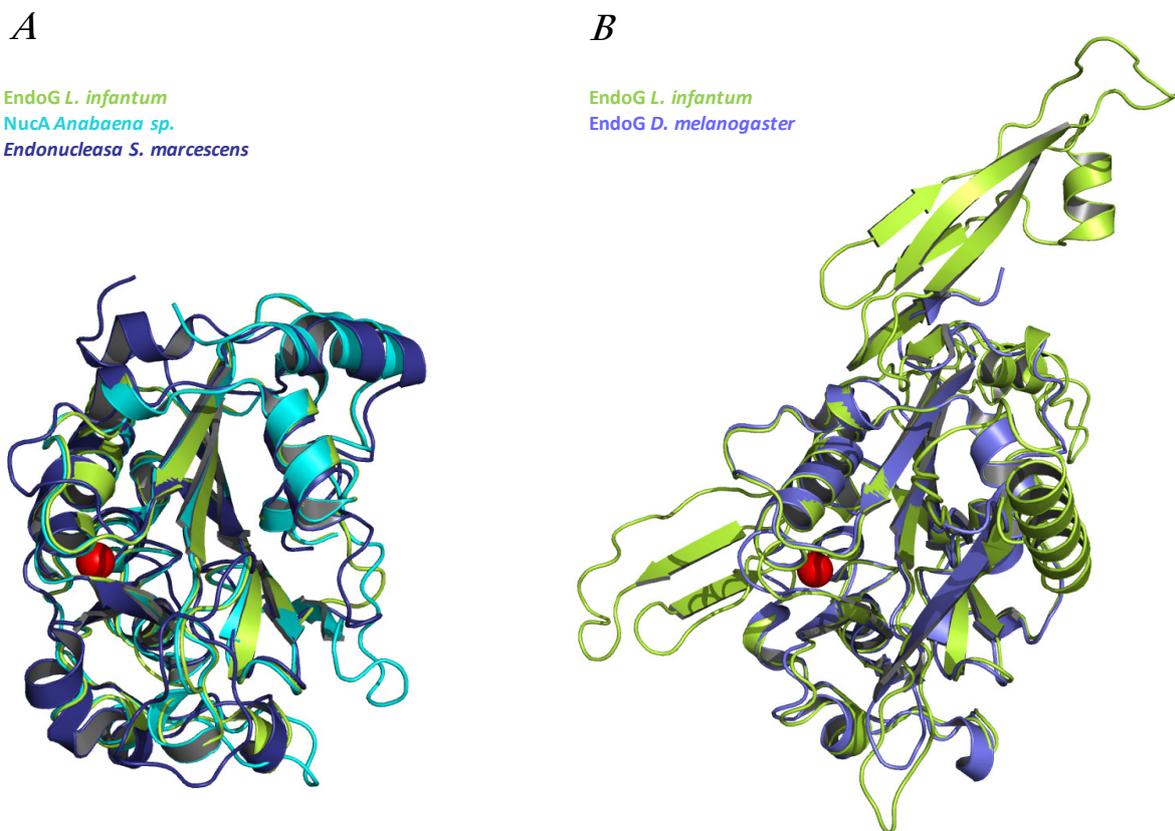


Figura 3. Modelos por homología de LiEndoG. A) Superposición de las estructuras experimentalmente resueltas de la endonucleasa de *S. marcescens*, NucA de *Anabaena sp.* y el modelo por homología de LiEndoG realizado a partir de dichos cristales. B) Superposición de la estructura experimentalmente resuelta de DmEndoG y del modelo por homología de LiEndoG realizado en base a dicho cristal.

Al analizar estos modelos pudimos comprobar que el sitio activo de LiEndoG está optimizado para la unión de un catión divalente parcialmente hidratado, que

estaría coordinado directamente a la proteína a través del grupo carbonilo de la cadena lateral de la Asn246 (Figura 4), un aminoácido estrictamente conservado en esta familia de nucleasas. Una de las moléculas de agua unidas al ión metálico está, a su vez, fijada mediante un enlace de hidrógeno al ND1 del imidazol de la His214 (Figura 4). Esto sugiere que esta histidina se comporta como una base general para activar la molécula de agua que efectuará el ataque nucleofilo al átomo de fósforo del ADN durante la reacción de hidrólisis del fosfato. La carga positiva de la Arg212, por su parte, parece ser importante para establecer una interacción electrostática favorable con un grupo fosfato del sustrato (Figura 4).

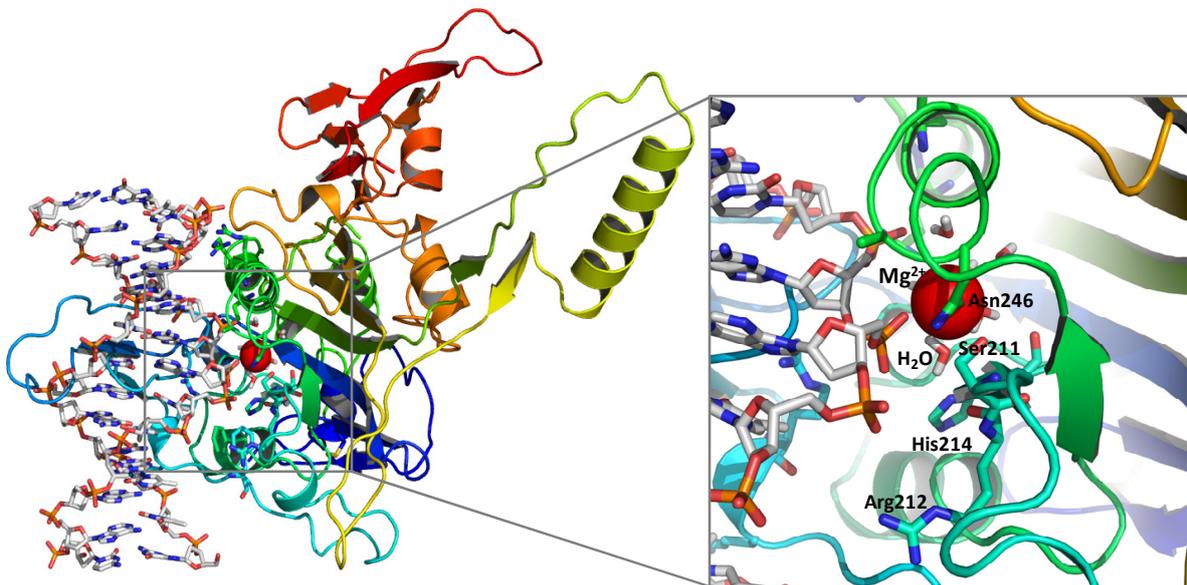


Figura 4. Modelo por homología de LiEndoG en complejo con un oligodesoxinucleótido y detalle del centro activo de la nucleasa. Predicción de la estructura de LiEndoG (basada en la estructura de DmEndoG) formando complejo con un oligodesoxinucleótido. En el detalle mostrado a la derecha de la figura aparecen destacados algunos de los residuos que forman parte del motivo SRGH (Ser211, His214 y Arg212), así como la Asn catalítica (Asn246).

El modelo también indica la posibilidad de la existencia de un enlace disulfuro entre las cisteínas presentes en las posiciones 100 y 116. En relación con esta suposición, es llamativo que, si bien no hay una homología estructural estricta, este puente disulfuro aparecería en una región esencialmente superponible a la que

alberga uno muy similar en la estructura de la endonucleasa de *S. marcescens*, próximo al extremo N-terminal, y que se sabe que es fundamental para la actividad de la nucleasa bacteriana (Figura 5).

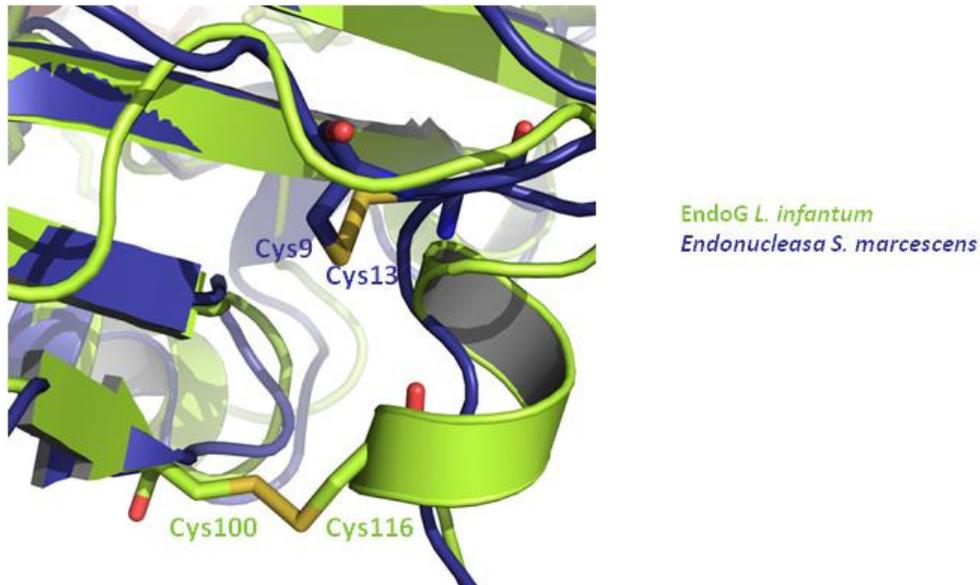


Figura 5. Predicción de la formación de un puente disulfuro entre la Cys100 y la Cys116 de LiEndoG. El puente disulfuro predicho para el modelo de LiEndoG es virtualmente superponible con el puente disulfuro existente en la estructura cristalográfica de la endonucleasa de *S. marcescens*.

Clonación y expresión de LiEndoG en *E. coli*

Con el fin de determinar si la secuencia de LiEndoG codifica para una nucleasa con propiedades bioquímicas similares a aquellas que caracterizan a las Endonucleasas G de otros organismos, dicha secuencia, después de su amplificación a partir de ADN genómico, fue clonada en el plásmido de expresión en bacterias pRSET. El vector pRSET confiere a las proteínas una cola de 6 histidinas, las cuales se unen al níquel de la resina de purificación permitiendo la retención de la proteína de interés. Los oligonucleótidos utilizados para el proceso de clonación fueron diseñados a partir de la secuencia de la cepa de referencia de *L. infantum* JPCM5 (XM_001463677) presente en GenBank. La secuencia

obtenida tras la amplificación a partir de nuestra cepa (M/CAN/ES/96/BCN150 MON-1), fue depositada en GenBank con el número de acceso EU402956. La construcción pRSET*LiendoG* se utilizó para transformar bacterias de la cepa de expresión *E. coli* BL21(DE3). Posteriormente, se realizó un ensayo de inducción de la expresión con IPTG 1mM obteniéndose una inducción máxima de la proteína recombinante (rLiEndoG) entre los 30 y los 60 minutos (Figura 6.A). Al realizar un test para determinar la solubilidad de la proteína utilizando un tampón para lisis en condiciones nativas, observamos que la proteína se encontraba presente en la fracción no soluble (Figura 6.B). Debido a que los intentos posteriores por tratar de obtener proteína nativa soluble utilizando distintas condiciones de inducción fueron infructuosos, se procedió a la purificación de la proteína en condiciones desnaturalizantes.

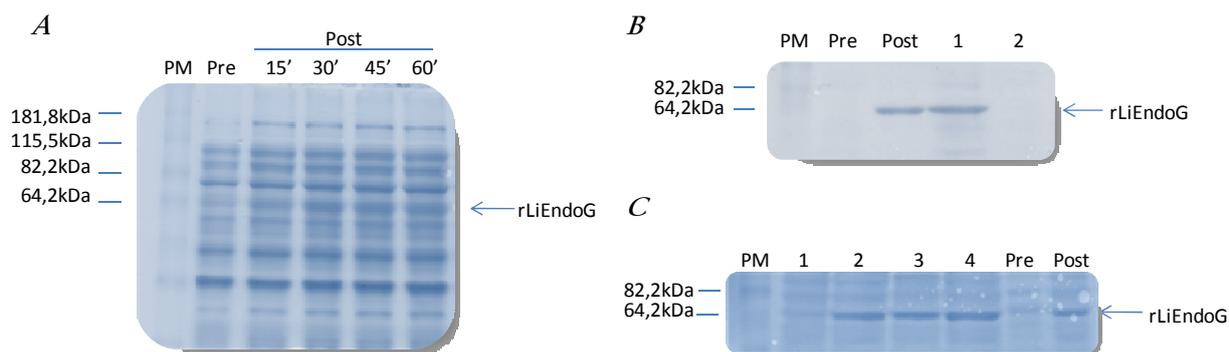


Figura 6. Expresión y solubilidad de rLiEndoG. A) Inducción de la expresión de rLiEndoG en *E. coli* BL21 (DE3). PM: Marcador de peso molecular. Pre: Pre-inducción. Post: Post-inducción a los 15, 30, 45 y 60 minutos. B) Test de solubilidad de rLiEndoG en condiciones nativas. PM: Marcador de peso molecular. Pre: Pre-inducción. Post: Post-inducción. 1: Fracción no soluble. 2: Fracción soluble. C) Test de solubilidad de rLiEndoG en condiciones desnaturalizantes. PM: Marcador de peso molecular. 1: Fracción soluble con urea 8M. 2: Fracción no soluble con urea 8M. 3: Fracción soluble con GuHCl 6M. 4: Fracción no soluble con GuHCl 6M. Pre: Pre-inducción. Post: Post-inducción.

Tras un primer intento de lisar las bacterias en presencia de urea, y dado que no se alcanzaba una adecuada solubilización de la proteína en estas condiciones (Figura 6.C; carriles 1 y 2), se procedió a realizar la lisis en guanidina-ácido

clorhídrico 6M (GuHCl), un agente desnaturizante más potente capaz de solubilizar en mayor medida los cuerpos de inclusión, como se observa en la Figura 6.C (carriles 3 y 4). El sobrenadante procedente de la lisis se incubó con resina de Ni-NTA y el complejo proteína-resina se cargó y empaquetó en una columna. Tras sucesivos lavados, se procedió a la purificación de la proteína (Figura 7.A) siguiendo el protocolo de QIAexpressionist (Qiagen). Dicha proteína se utilizó posteriormente para la obtención del anticuerpo policlonal α -rLiEndoG, como se explicará en apartados posteriores.

La purificación en condiciones desnaturizantes no nos permitía realizar un estudio de la actividad enzimática de la proteína. Por ello, y con el fin de obtener proteína nativa, tras la lisis en condiciones desnaturizantes previamente mencionada se llevó a cabo una renaturalización de la proteína anclada a la columna mediante la adición de un gradiente lineal y decreciente de urea (6M-1M). Finalmente se eluyó la proteína en imidazol 250mM (Figura 7.B).

rLiEndoG presenta un peso molecular aparente de unos 64kDa. Este peso supone 5kDa más de los 59kDa predichos para la secuencia de LiEndoG si consideramos además de su secuencia de aminoácidos, la cola de histidinas y el lugar de reconocimiento para la enzima enteroquinasa (ambos procedentes del vector pRSET). Este extraño patrón de migración no se observa en los inmuno-blots realizados frente a lisados de promastigotes cuando la secuencia codificante para LiEndoG se utiliza para transfectar los parásitos (Figura 19), lo cual indica que la presencia adicional de los aminoácidos aportados por el vector pRSET es responsable del cambio de movilidad de rLiEndoG. La proteína recombinante nativa obtenida se utilizó posteriormente para los ensayos de actividad nucleasa así como para la obtención de un anticuerpo monoclonal α -rLiEndoG, como se explica en apartados posteriores.

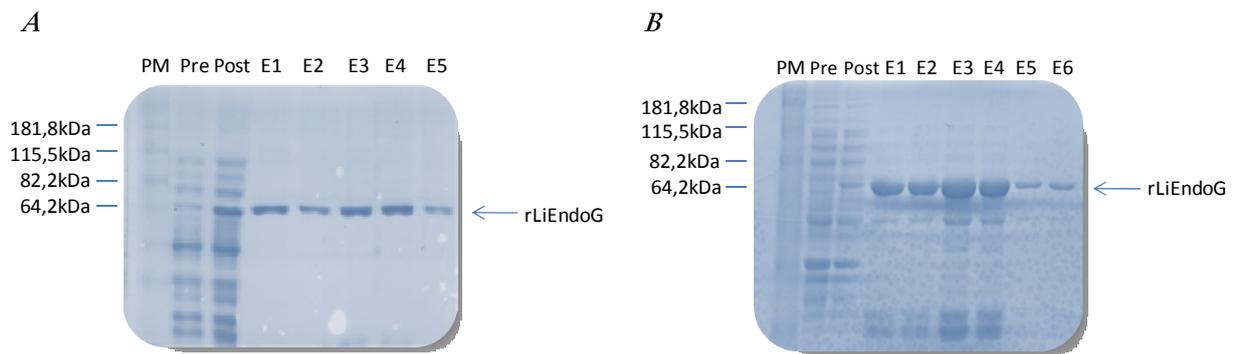


Figura 7. Purificación de rLiEndoG. A) Purificación de rLiEndoG en condiciones desnaturalizantes. MP: Marcador de peso molecular. Pre: Pre-inducción. Post: Post-inducción. E1: Fracción de elución 1. E2: Fracción de elución 2. E3: Fracción de elución 3. E4: Fracción de elución 4. E5: Fracción de elución 5. B) Purificación de rLiEndoG por renaturalización en la columna. MP: Marcador de peso molecular. Pre: Pre-inducción. Post: Post-inducción, E1: Fracción de elución 1. E2: Fracción de elución 2. E3: Fracción de elución 3. E4: Fracción de elución 4. E5: Fracción de elución 5. E6: Fracción de elución 6.

rLiEndoG presenta actividad endonucleasa

Para determinar si rLiEndoG presenta actividad nucleasa, como cabría esperar en caso de que realmente se tratase de la EndoG de *L. infantum*, en primer lugar se realizó un ensayo de actividad *in vitro* para comprobar la capacidad de la proteína purificada para digerir un plásmido superenrollado. Como se observa en la Figura 8.A, rLiEndoG presenta una actividad endonucleasa capaz de degradar un plásmido, actividad que aumenta conforme se incrementa la cantidad de proteína en la reacción de digestión.

Con el propósito de confirmar que esta actividad se debe a rLiEndoG y no a algún otro contaminante presente en el extracto proteico obtenido tras la elución de la proteína durante el proceso de purificación, la proteína purificada se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida conteniendo SDS y ADN de espermatozoos de salmón. Tras la electroforesis, se realizaron sucesivos lavados del gel en agua y en

tampón TEM con el objetivo de eliminar el SDS que mantenía desnaturalizada a la proteína, y un último lavado en tampón TEM durante toda la noche a 37°C para permitir el proceso de renaturalización y poder detectar la actividad nucleasa. Al teñir el gel con bromuro de etidio, el ADN presente en el gel puede visualizarse mediante iluminación con luz ultravioleta. La ausencia de fluorescencia en la posición ocupada por rLiEndoG es indicativa de la existencia de una actividad nucleasa que causa la degradación del ADN presente en esa posición del gel (Figura 8.B). Estos resultados confirman que la actividad nucleasa observada previamente se debe a la proteína recombinante.

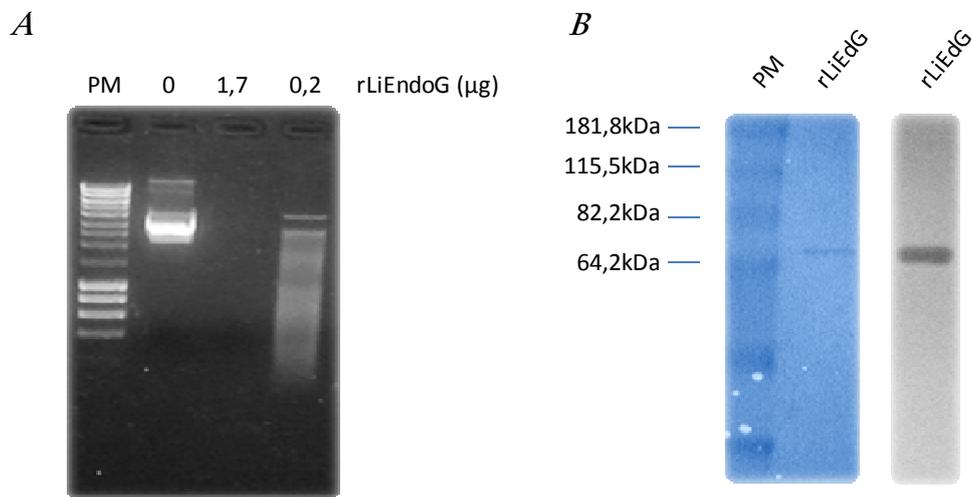


Figura 8. rLiEndoG presenta actividad endonucleasa. A) Digestión del plásmido pRSET con rLiEndoG. 1µg de plásmido fue digerido durante 1h con 1,7µg y 0,2µg de rLiEndoG. Los productos de la digestión fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1% y visualizados bajo luz UV. B) Electroforesis de rLiEndoG en gel de poliacrilamida-SDS-ADN. Izquierda: gel teñido con Azul de Coomassie como control de peso molecular. Derecha: gel incubado en tampón TEM a 37°C durante 16h, teñido con 1mg/ml de bromuro de etidio y visualizado bajo luz UV.

El ácido auríntricoarboxílico inhibe la actividad de rLiEndoG

El ácido auríntricoarboxílico (ATA) ha sido descrito como un inhibidor de endonucleasas (170), pues se ha sugerido que compite con el ácido nucleico por la

unión al sitio activo de estas proteínas (171). Al añadir ATA a la reacción de digestión de un plásmido con rLiEndoG, observamos cómo ya desde concentraciones muy bajas del ácido (0,1 μ M) la actividad de la nucleasa se encuentra fuertemente inhibida (Figura 9).

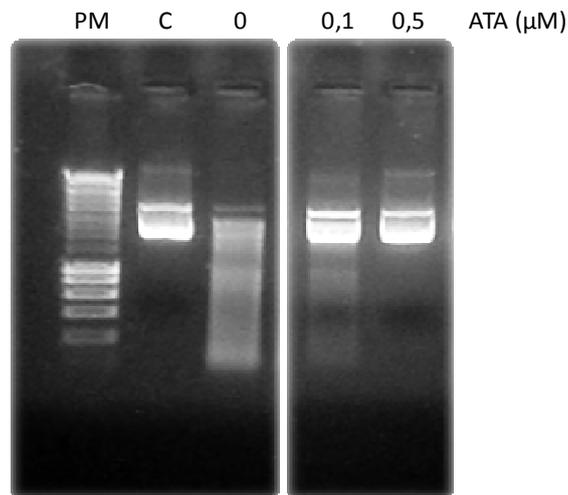


Figura 9. Efecto del ATA sobre la actividad de rLiEndoG. 1 μ g de plásmido fue digerido en presencia de 0,2 μ g de rLiEndoG y concentraciones crecientes de ATA. Como control (C) se utilizó plásmido sin digerir. Los productos de la digestión fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 1% y visualizados bajo luz UV.

La actividad de rLiEndoG es dependiente de Mg²⁺, Mn²⁺ o Co²⁺, se inhibe por la presencia de Na⁺, K⁺ y Ca²⁺ y tiene un pH óptimo de 6,5

Las Endonucleasas G de otros organismos eucariotas requieren la presencia de determinados iones divalentes como Mg²⁺, Mn²⁺ o Co²⁺, descritos como sus principales cofactores necesarios para llevar a cabo la degradación del ADN (130,131). De hecho, en el centro activo del cristal de la EndoG de *D. melanogaster* hay situado un átomo de Mg²⁺ y, en base a ello, ese átomo también aparece incorporado en nuestro modelo de LiEndoG. Como es de esperar, al igual que sucede para otras Endonucleasas G, nuestros resultados demuestran que la actividad de rLiEndoG se incrementa al añadir a la reacción de digestión

concentraciones crecientes de los iones divalentes Mg^{2+} (Figura 10.A), Mn^{2+} (Figura 10.B) o Co^{2+} (Figura 10.C). Concretamente, la máxima actividad se observa en presencia del ión Mn^{2+} . Además, y también al igual que para otras Endonucleasas G previamente caracterizadas (130,131), la actividad de rLiEndoG se inhibe en presencia de concentraciones moderadas de K^+ (150mM) (Figura 10.D), concentraciones algo superiores de Na^+ (300mM) (Figura 10.E) y Ca^{2+} (Figura 10.F).

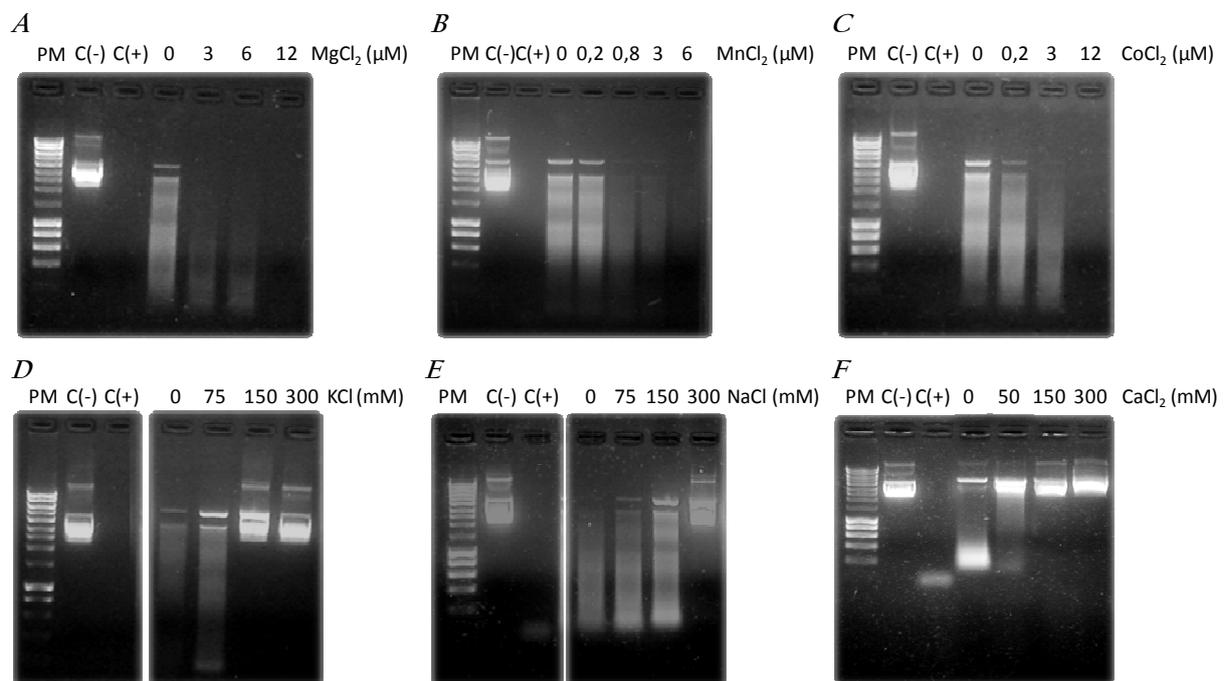


Figura 10. Modulación de la actividad de rLiEndoG por la presencia de iones. 1 μg de plásmido fue digerido en presencia de 0,2 μg de rLiEndoG y concentraciones crecientes de A) $MgCl_2$, B) $MnCl_2$, C) $CoCl_2$, D) KCl, E) NaCl, F) $CaCl_2$. Como controles se utilizaron plásmido sin digerir C(-) y digerido C(+) con 1,7 μg de rLiEndoG. Los productos de la digestión fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1% y visualizados bajo luz UV.

Para continuar con la caracterización de nuestra proteína, quisimos determinar la influencia del pH en la actividad de rLiEndoG. Para ello, realizamos digestiones en presencia de tampón AcNa 10mM, Mes 10mM y Tris 20mM a distintos pHs

(4,5-10). Como se observa en la Figura 11, rLiEndoG tiene una actividad máxima entorno a un pH de 6,5, similar a lo que se ha descrito para otras Endonucleasas G (127,131), y se encuentra claramente inhibida a partir de $\text{pH} \leq 5,5$ o bien $\text{pH} > 8$ (Figura 11).

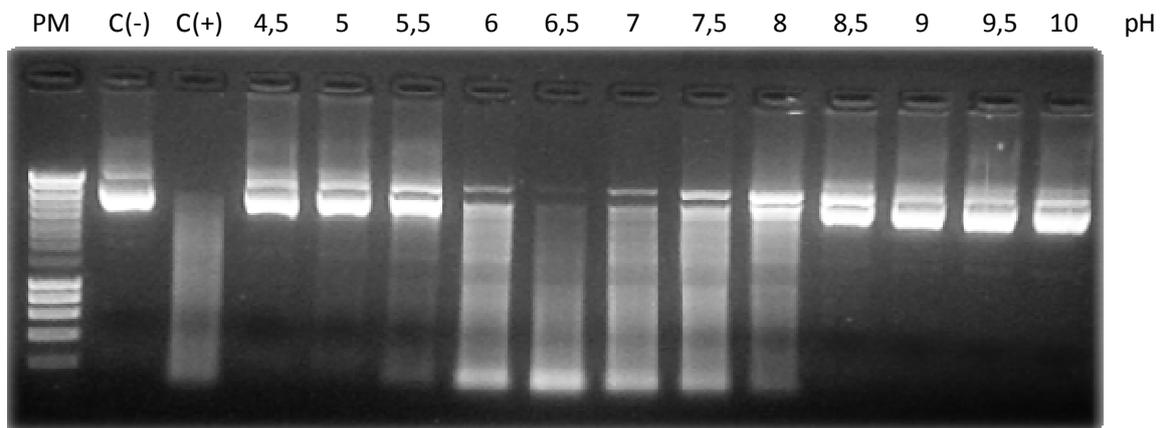


Figura II. Efecto del pH sobre la actividad de rLiEndoG. 1 μ g de plásmido fue digerido en presencia de 0,2 μ g de rLiEndoG en tampón AcNa 10mM, Mes 10mM y Tris 20mM a distintos pHs (4,5-10). Como controles se utilizaron plásmido sin digerir C(-) y digerido C(+) con 0,2 μ g de rLiEndoG en agua. Los productos de la digestión fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1% y visualizados bajo luz UV.

El β -mercaptoetanol afecta a la actividad de rLiEndoG

Se ha descrito la existencia de mecanismos de activación basados en la formación de puentes disulfuro para las nucleasas extracelulares de *S. marcescens* (172) y *Vibrio vulnificus* (173). En estos casos se observa que la presencia de β -mercaptoetanol (β -ME) puede conducir a la inactivación de las nucleasas al provocar la ruptura de dichos puentes. Dado que nuestro modelo predice la formación de un puente disulfuro entre las cisteínas presentes en las posiciones 100 y 116 en una localización espacial muy similar a la del puente disulfuro fundamental para la actividad de la endonucleasa de *Serratia*, se realizaron

digestiones con rLiEndoG en presencia de concentraciones crecientes de β -ME. Los resultados obtenidos (Figura 12) muestran que la presencia de este agente tiene como resultado la pérdida de actividad nucleasa, lo que demuestra la importancia de este puente disulfuro, que es el único existente en el modelo de LiEndoG.

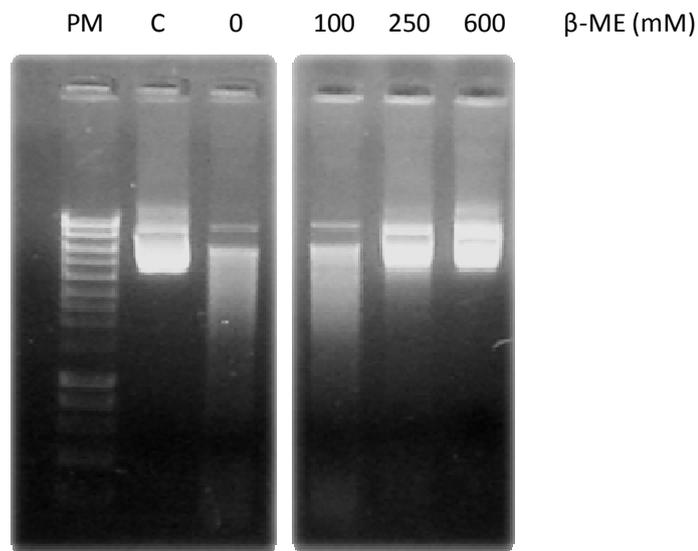


Figura 12. Efecto del β -ME sobre la actividad de rLiEndoG. 1 μ g de plásmido fue digerido en presencia de 0,2 μ g de rLiEndoG y concentraciones crecientes de β -ME. Como control se utilizó plásmido sin digerir. Los productos de la digestión fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1% y visualizados bajo luz UV.

rLiEndoG genera preferentemente cortes de cadena sencilla en la doble hélice de ADN

Las nucleasas catalizan la rotura de enlaces fosfodiéster en el ADN. En ocasiones, al digerir la doble hélice, estos cortes se producen en ambas cadenas en posiciones idénticas o muy próximas, tal y como ocurre con las endonucleasas de restricción, que al cortar una molécula de ADN dan lugar a dos fragmentos, cada uno de ellos de doble cadena. En otras ocasiones los cortes se generan de forma aleatoria en distintas posiciones en cada una de las hebras. Estos cortes aleatorios, en caso de

generarse con poca frecuencia, se manifiestan simplemente en forma de roturas de cadena sencilla que permiten que las dos hebras de la doble hélice todavía se mantengan unidas. Estas digestiones son fácilmente detectables, pues provocan la pérdida del superenrollamiento en los plásmidos, generando moléculas circulares abiertas que presentan una movilidad electroforética claramente inferior a la de la forma superenrollada. Al aumentar la frecuencia de estos cortes como consecuencia de una exposición prolongada a la actividad nucleasa, comienzan a generarse pequeños oligonucleótidos en los que las dos hebras que los componen terminan por desaparecer. En este caso es ya posible detectar una clara disminución del peso molecular del ADN digerido, hecho que se manifiesta con la aparición de múltiples bandas con distinta movilidad electroforética, siempre mayor que la del fragmento de ADN sin digerir (tal y como se ha descrito para DmEndoG (137)).

Para determinar si rLiEndoG es capaz de generar un corte en el mismo punto en ambas hebras o si por el contrario realiza cortes en distintas posiciones de cada una de ellas, se incubó 1 µg del plásmido pRSET con concentraciones crecientes de rLiEndoG (Figura 13). Las distintas digestiones se realizaron por duplicado y una de las réplicas fue desnaturalizada para observar las distintas formas del ADN generadas tras la digestión en cada una de las hebras. Con objeto de asegurar que cualquier posible degradación observada sea debida a la presencia de la nucleasa y no al tratamiento utilizado para desnaturalizar las muestras, en el ensayo se incluyó un control negativo con nucleasa a la máxima concentración empleada pero previamente desnaturalizada por calor (Figura 13, 160ng rLiEndoG (PD)). Como control de ADN lineal se trató el plásmido con la enzima de restricción BglII (Figura 13, BglII), que presenta un único sitio de corte en el plásmido pRSET. Como se observa en la Figura 13, rLiEndoG conduce preferentemente a la aparición de moléculas circulares abiertas que son el resultado de cortes aleatorios en distintos puntos de las dos cadenas. Finalmente, y por acumulación de sucesivos cortes en la doble hebra, la molécula de ADN es fragmentada en multitud de oligonucleótidos que, al desaparecer, migran como pequeños

fragmentos de cadena sencilla no detectables en la tinción con bromuro de etidio. Sin embargo, es importante destacar que una pequeña proporción del plásmido migra en la posición de la forma lineal, probablemente como consecuencia de la aparición por azar de dos cortes próximos, uno en cada hebra.

Por su parte, la digestión con BglIII da lugar a la aparición de una molécula lineal que refleja la existencia de un corte de las dos cadenas en posiciones muy próximas. En las muestras desnaturalizadas se observa la presencia de dos bandas con una elevada movilidad electroforética que presumiblemente corresponden a la separación de las dos cadenas del ADN circular abierto, una de ellas lineal (la que fue digerida por rLiEndoG) y otra circular (la hebra no digerida).

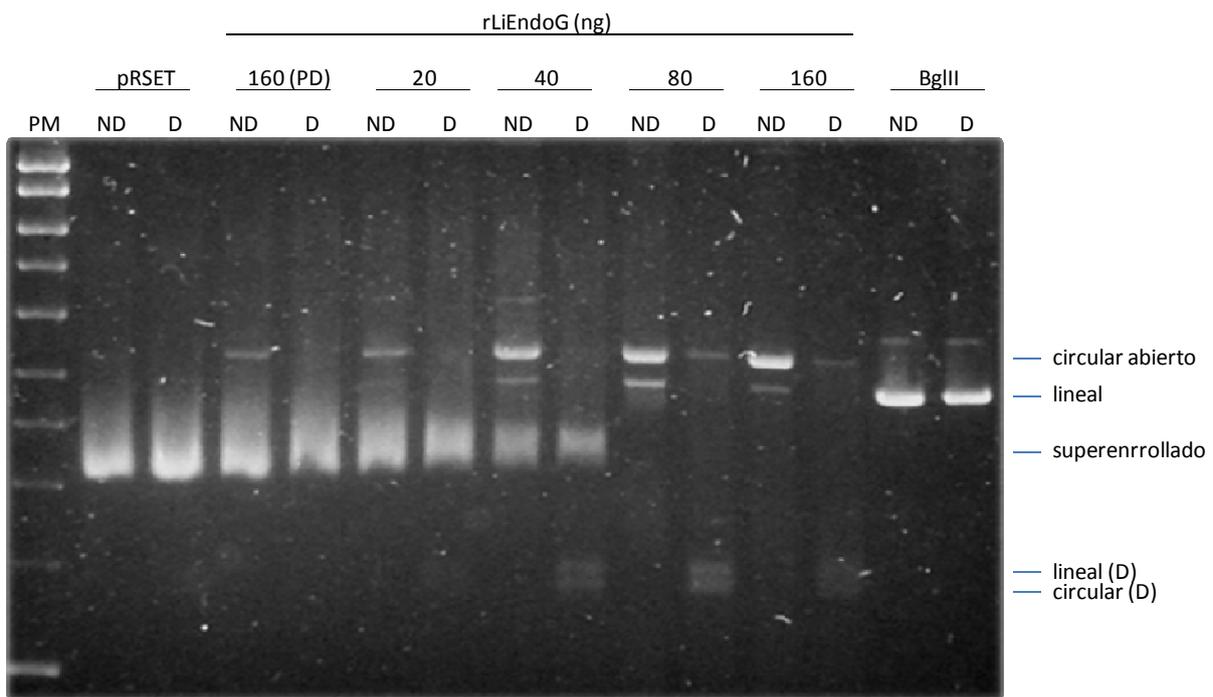


Figura 13. Análisis de los cortes producidos por rLiEndoG en ADN de cadena doble. 1µg de plásmido fue digerido con cantidades crecientes de rLiEndoG y un control negativo con rLiEndoG previamente desnaturalizada (PD). La enzima de restricción BglIII se utilizó para obtener un control de ADN linealizado. Las digestiones se realizaron por duplicados, siendo una de ellas posteriormente desnaturalizada (D) y la otra no (ND). Los productos de la digestión fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1% y visualizados bajo luz UV.

rLiEndoG presenta actividad endo-exonucleasa

Las Endonucleasas G de eucariotas superiores presentan únicamente actividad endonucleasa. Sin embargo, se sabe que la proteína Nuc1p de *S. cerevisiae* (equivalente a la Endonucleasa G de eucariotas superiores) presenta además actividad exonucleasa 5' (174). Considerando que *Leishmania* es un eucariota inferior, nos planteamos la posibilidad de que LiEndoG presentase la actividad exonucleasa descrita en levaduras. Para comprobarlo, se procedió a la digestión con rLiEndoG de un fragmento de ADN de 500 pares de bases que había sido marcado con el fluoróforo FAM en el extremo 5' de una de las dos hebras. Con el fin de disponer de patrones de digestión característicos de endonucleasas y exonucleasas, distintas alícuotas del fragmento marcado se digirieron con la endonucleasa ADNasaI y con la exonucleasa T7 (que presenta actividad exonucleasa 5' sobre ADN de doble cadena). Los productos de estas digestiones fueron analizados paralelamente mediante electroforesis capilar y mediante electroforesis en gel de agarosa. En la Figura 14 se puede observar como concentraciones de rLiEndoG y ADNasaI que generan un patrón similar de degradación en el gel de agarosa, caracterizado por la existencia de numerosos fragmentos de distinto tamaño (gel de la Figura 14.A: 0,1µg de rLiEndoG; gel de la Figura 14.B: 0,01U de ADNasaI), dan lugar a la aparición de un distinto patrón cuando los fragmentos se analizan por electroforesis capilar. Mediante esta técnica, la digestión con ADNasaI da lugar a una distribución homogénea de picos correspondientes a fragmentos con una gran variedad de tamaños, que se pueden detectar gracias a su marcaje con el fluoróforo FAM en su extremo 5' (histograma 2 de la Figura 14.B: 0,01U de ADNasaI). En el caso de la digestión con rLiEndoG, aunque también se observa un patrón de picos dispersos que corresponden a fragmentos de distinto tamaño, existe una clara tendencia a la acumulación de la señal fluorescente en unos pocos picos próximos al origen del eje de abscisas, correspondientes a fragmentos de reducido tamaño producto de digestiones muy cercanas al extremo 5' (histograma 4 de la Figura 14.A: 0,1µg de rLiEndoG). La presencia mayoritaria de estos fragmentos de degradación no

puede ser atribuida a una digestión tan exhaustiva del ADN que termine por generar tan solo fragmentos de pequeño tamaño, ya que puede comprobarse en el histograma la presencia de un pico, todavía mayoritario, correspondiente al fragmento de 500 pares de bases sin degradar. Por tanto, el patrón de distribución de la señal fluorescente obtenido es indicativo de una intensa actividad exonucleasa acompañada de una moderada actividad endonucleasa.

El patrón obtenido en el gel de agarosa mediante la digestión con la exonucleasa T7 es muy distinto al generado por las proteínas que tienen actividad endonucleasa, pues la liberación de mononucleótidos y oligonucleótidos correspondientes al extremo 5' (que debido a su pequeño tamaño no pueden ser visualizados en este gel), conduce a una clara disminución de la señal fluorescente correspondiente al plásmido sin degradar, sin que sea posible detectar pequeños fragmentos de DNA (gel de la Figura 14.C: 20U de ExoT7). En los resultados analizados por electroforesis capilar observamos que la actividad puramente exonucleasa no deja un patrón homogéneo de picos de distinto tamaño, si no que genera preferentemente un único pico próximo al inicio del eje de abscisas (histograma 2 de la Figura 14.C: 20U de ExoT7). Considerando que la exonucleasa T7 libera preferentemente mononucleótidos (175), nos llamó la atención que el pico mayoritario generado por la misma se encuentre tan alejado del origen del eje de abscisas, lo que a priori parece incompatible con la liberación mayoritaria de mononucleótidos. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que el marcaje con FAM del mononucleótido situado en posición 5' supone una adición de masa que no va acompañada de un aumento en la carga. En definitiva, supone una alteración apreciable de la relación carga/masa de este mononucleótido respecto de la de los polinucleótidos marcados. Según nuestra interpretación, esta variación de la relación carga/masa es la responsable de la menor migración del mononucleótido marcado.

Los resultados obtenidos de la comparación de las digestiones con ADNasa I y rLiEndoG indican que esta última tiene preferencia por atacar a los polinucleótidos por su extremo 5', aunque no nos demuestran si la digestión tiene

lugar en el fosfodiéster del primer nucleótido o a cierta distancia del mismo. Sabiendo que la ExoT7 digiere extremos 5' y libera de forma mayoritaria mononucleótidos, procedimos a realizar una digestión secuencial con rLiEndoG y con ExoT7. En el caso de que la digestión con rLiEndoG tuviera lugar a nivel del primer nucleótido, el patrón de picos generado tras la digestión con rLiEndoG no debería ser distinto del obtenido con la digestión secuencial rLiEndoG + ExoT7. Por el contrario, si la digestión con rLiEndoG tiene lugar a cierta distancia del extremo 5', la posterior digestión con ExoT7 causaría una reducción en el tamaño de los fragmentos que se vería reflejada en un desplazamiento de la posición de los picos. Los resultados obtenidos se ajustan a esta segunda descripción (comparar histogramas 1 y 3 de la Figura 14.C), pues los picos generados en la digestión con rLiEndoG sufren un desplazamiento hacia la derecha tras la subsecuente digestión con ExoT7. Dado que la digestión con ExoT7 sólo puede conducir a una reducción en el tamaño de los fragmentos, podemos concluir que la actividad exonucleasa de rLiEndoG genera cortes a una cierta distancia del extremo 5', dando lugar a la aparición de pequeños oligonucleótidos que son susceptibles de ser posteriormente digeridos con ExoT7 para generar mononucleótidos.

Por lo tanto, y a la vista de los resultados, podemos afirmar que rLiEndoG presenta actividad endo-exonucleasa, aunque su actividad exonucleasa parece generar mayoritariamente oligonucleótidos cuyo tamaño exacto no ha podido ser determinado al no disponer de un marcador de peso molecular suficientemente pequeño.

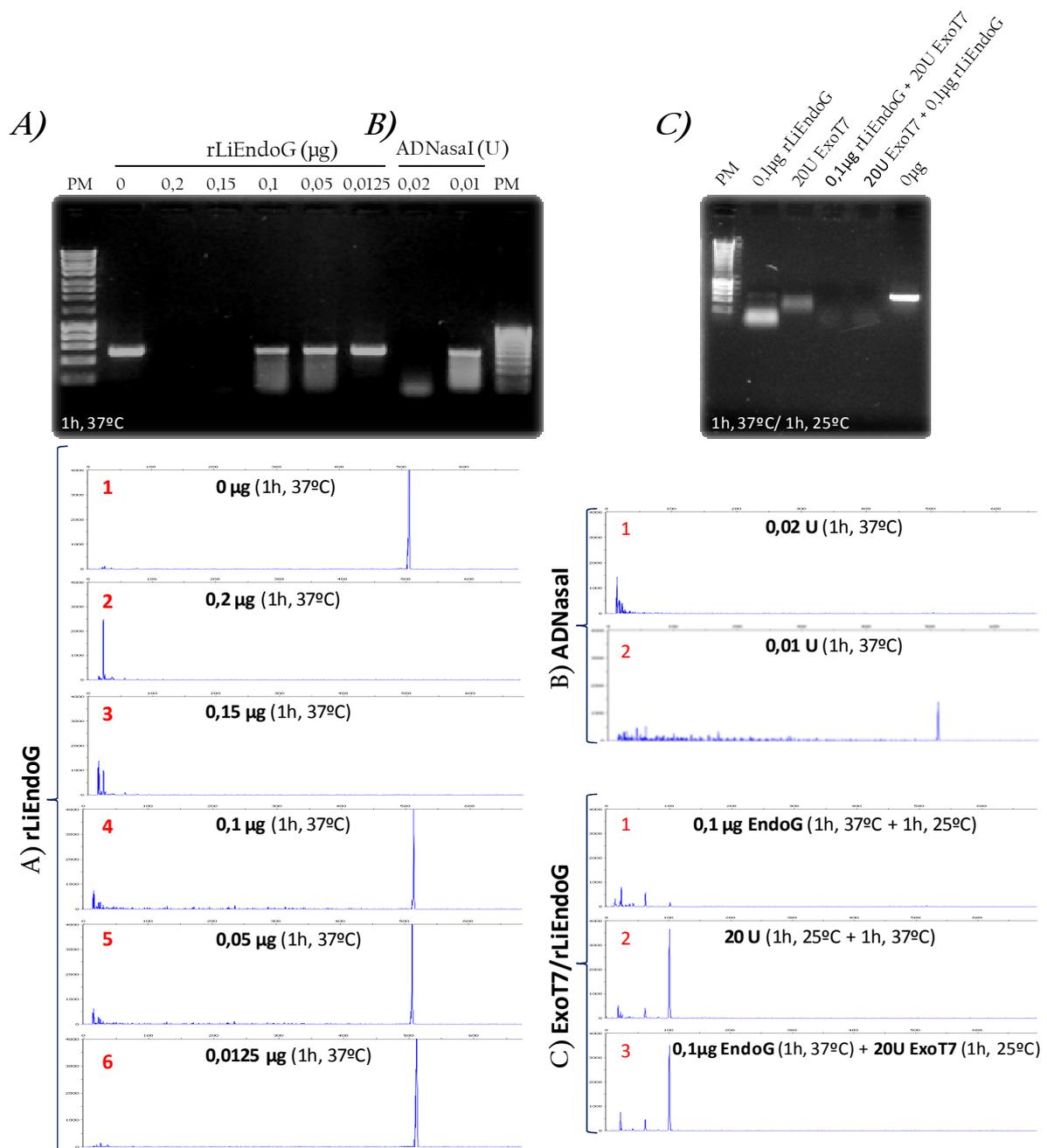
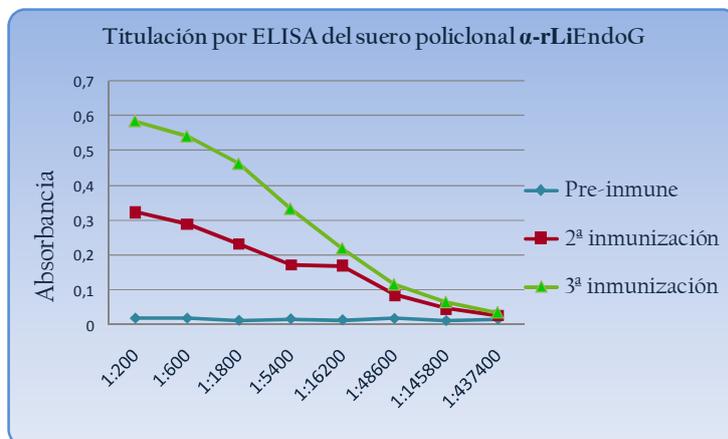


Figura 14. Actividad endo-exonucleasa de rLiEndoG. 500ng de un fragmento de PCR marcado en 5' con el fluoróforo FAM fueron digeridos con rLiEndoG, DNasaI o ExoT7. Los productos de la digestión fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1% y a electroforesis capilar, tras lo cual se analizaron los picos de fluorescencia obtenidos por este último procedimiento mediante el Software Peak Scanner (Applied Biosystems). A) Digestiones realizadas en presencia de rLiEndoG. B) Digestiones realizadas en presencia de ADNasaI. C) Digestiones realizadas en presencia de ExoT7 y/o rLiEndoG.

Producción de anticuerpos α -rLiEndoG

Para la obtención de suero policlonal α -rLiEndoG se inocularon tres conejos con la proteína obtenida tras un proceso de purificación en condiciones desnaturalizantes. En primer lugar, se extrajo una muestra de suero pre-inmune de cada conejo y, posteriormente, se les inyectaron 500 μ g de proteína cada 15 días. Durante todo este periodo, y cada vez que se llevaba a cabo una inmunización con la proteína, se realizó un seguimiento por ELISA de la presencia de anticuerpos específicos frente a rLiEndoG en los sueros de los conejos inoculados. Uno de los conejos produjo un suero de título 1:50.000 (Figura 15.A) capaz de reconocer a LiEndoG mediante inmuno-blot tanto en lisados de bacterias que expresan rLiEndoG (Figura 15.B.a), como en lisados de parásitos conteniendo LiEndoG endógena (Figura 15.B.b). El patrón de expresión de esta proteína no varía con el estadio del parásito, logarítmico o estacionario (Figura 15.B.b).

A



B

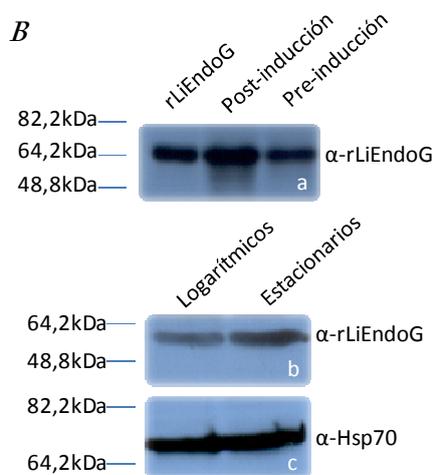


Figura 15. Obtención de suero policlonal α -rLiEndoG. A) Titulación por ELISA del suero policlonal α -rLiEndoG tras incubación de 1 μ g de rLiEndoG en presencia de distintas diluciones seriadas del mismo. B) Inmuno-blot llevado a cabo con suero policlonal α -rLiEndoG: Se realizó un inmuno-blot con α -rLiEndoG (1:50000) frente a rLiEndoG purificada y lisados de *E. coli* BL21(DE3) que expresaban la proteína recombinante (a), y frente a lisados de promastigotes logarítmicos y estacionarios (b). El suero α -Hsp70 (1:5000) se utilizó como control de carga de este último inmuno-blot (c).

La obtención de anticuerpos monoclonales se realizó en el Instituto Carlos III con la colaboración de la Dra. Dña. Mercedes Domínguez. Para ello, se inocularon 5 ratones con 20µg de rLiEndoG nativa cada 14 días siguiendo el protocolo habitual descrito por Yokoyama *et al.* (2006) (155). Ese mismo protocolo fue el que se siguió durante todas las etapas que llevaron a la obtención del anticuerpo monoclonal. Antes de proceder a realizar la fusión de las células B de ratón con las células de mieloma, se realizó un ELISA con sueros procedentes de los 5 ratones, se escogió aquel para el cual la señal era mayor, y se realizó una primera prueba de inmuno-citometría con distintas diluciones del suero obteniéndose señal positiva, aunque todavía débil (datos no mostrados). Tras el proceso de fusión y la consecuente aparición de los primeros hibridomas, cada uno de los sobrenadantes fue analizado por ELISA e inmuno-citometría. Como control para comprobar que el anticuerpo producido estaba reconociendo específicamente a nuestra proteína y no a la cola de histidinas procedente de la clonación en pRSET, se realizó también un ELISA contra otra proteína con cola de histidinas purificada en nuestro laboratorio (SelB humana), y así poder corregir los valores obtenidos para LiEndoG. La inmuno-citometría se realizó sobre promastigotes transfectados con la construcción pIRmcs3(-)*LiendoG* (de cuya obtención hablaremos más adelante), en los que se había comprobado previamente la sobre-expresión de *LiendoG* mediante inmuno-blot utilizando el anticuerpo policlonal. Posteriormente se procedió a la expansión de los 24 pocillos para los que se obtuvo una mejor señal, y se continuó con la dilución clonal. Los sobrenadantes obtenidos tras la nueva dilución fueron testados por inmuno-blot (datos no mostrados) y los mejores fueron seleccionados para continuar sucesivos procesos de clonación y, finalmente, la expansión de los clones elegidos. El clon 31.1.1 fue el elegido para realizar los sucesivos experimentos de detección de LiEndoG presentados en esta tesis, debido a su capacidad para reconocer tanto a la proteína recombinante rLiEndoG como a la proteína endógena del parásito con alta especificidad (Figura 16.a).

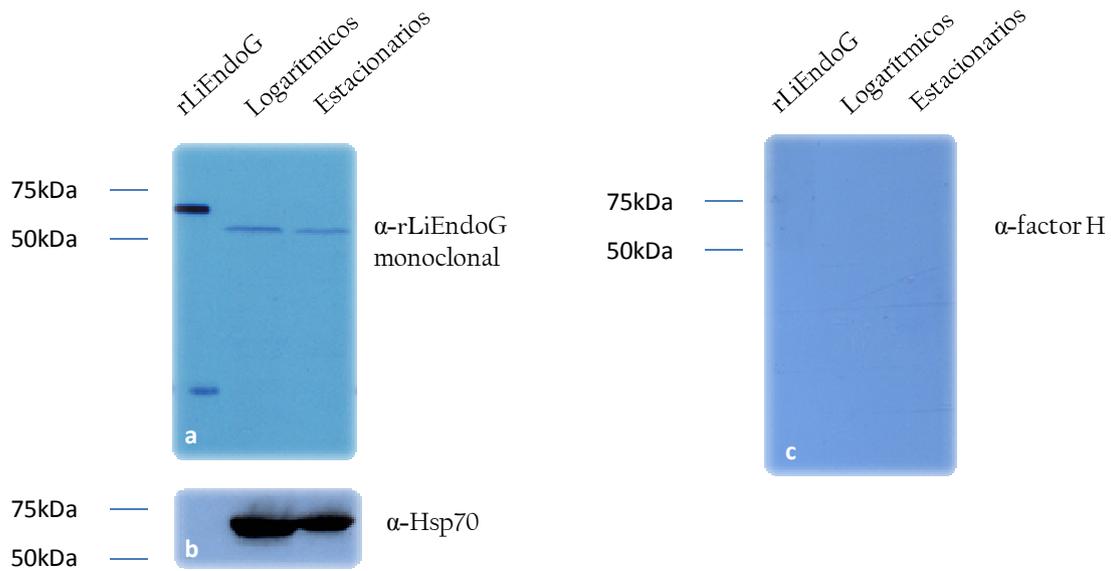


Figura 16. Inmuno-blot utilizando el anticuerpo monoclonal α -rLiEndoG. (a) Inmuno-blot utilizando el sobrenadante del clon 31.1.1 frente a rLiEndoG purificada y lisados de promastigotes logarítmicos y estacionarios. (b) El suero policlonal α -Hsp70 (1:5000) se utilizó como control de carga. (c) Control negativo utilizando el anticuerpo monoclonal α -factor H frente a las mismas muestras de rLiEndoG purificada y lisados de promastigotes logarítmicos y estacionarios.

LiEndoG contiene un péptido señal que le dirige a la mitocondria

La principal característica que diferencia a una Endonucleasa G de otras nucleasas celulares es su localización mitocondrial. Del mismo modo que la gran mayoría de las proteínas mitocondriales de eucariotas, las EndoGs descritas están codificadas por un gen nuclear y, tras su traducción en el citoplasma, son dirigidas a la mitocondria gracias a la presencia de un péptido señal en su extremo amino terminal (121). Con el objetivo de comprobar si este péptido señal está presente también en LiEndoG, realizamos una primera aproximación en la que se analizó su secuencia utilizando el algoritmo de predicción de señales de localización mitocondrial del programa MITOPROT, que predijo la existencia de un posible péptido señal en los primeros 25 aminoácidos de la proteína. Una vez obtenida esta información, procedimos a realizar la fusión de la secuencia codificante para los primeros 40 aminoácidos de LiEndoG al extremo 5' de la secuencia codificante

para la proteína fluorescente verde (eGFP) en el plásmido integrativo de *Leishmania* pIRmcs3(-). El hecho de escoger los primeros 40 aminoácidos en lugar de solamente los 25 predichos por el algoritmo se debió únicamente a razones técnicas, pues es mucho más cómodo trabajar con fragmentos de PCR mayores, que pueden ser fácilmente visualizados en geles de agarosa. En paralelo al clonaje descrito, se realizó otra construcción que contenía la región codificante para los primeros 40 aminoácidos de la ARNasaH HIIC, proteína de conocida localización mitocondrial en *Leishmania* (176), también fusionada a eGFP.

Las dos construcciones resultantes, pIRmcs3(-)*LiEndoG*₁₋₄₀::eGFP y pIRmcs3(-)*ARNasaHIIC*₁₋₄₀::eGFP, se utilizaron para transfectar promastigotes de *L. infantum*. Como se observa en la Figura 17.A, los 40 primeros aminoácidos de rLiEndoG, al igual que sus homólogos de la ARNasaHIIC, son suficientes para dirigir a la proteína eGFP al interior de la mitocondria del parásito, lo cual queda demostrado debido a su clara co-localización con la fluorescencia asociada a la sonda mitocondrial Mito-Tracker (Molecular Probes). En ausencia del péptido señal, eGFP se distribuye homogéneamente a lo largo del cuerpo del parásito (Figura 17.A: pIRmcs3(-)*eGFP*).

Los resultados descritos indican que LiEndoG contiene un péptido de señalización mitocondrial. Con objeto de confirmar que, efectivamente, esta proteína se localiza en la mitocondria, procedimos a fusionar su secuencia codificante completa con la secuencia del gen de eGFP. Podemos comprobar que tal y como se muestra en la Figura 17.B, esta nueva proteína de fusión también se encuentra localizada en la mitocondria.

Como prueba definitiva de que la proteína endógena del parásito se localiza en la mitocondria en condiciones normales de crecimiento, procedimos a fijar y permeabilizar promastigotes de *L. infantum* para posteriormente incubarlos con el anticuerpo monoclonal α -rLiEndoG. Al igual que lo mostrado anteriormente, dicha proteína co-localiza claramente con la señal fluorescente de la sonda Mito-Tracker (Figura 17.C).

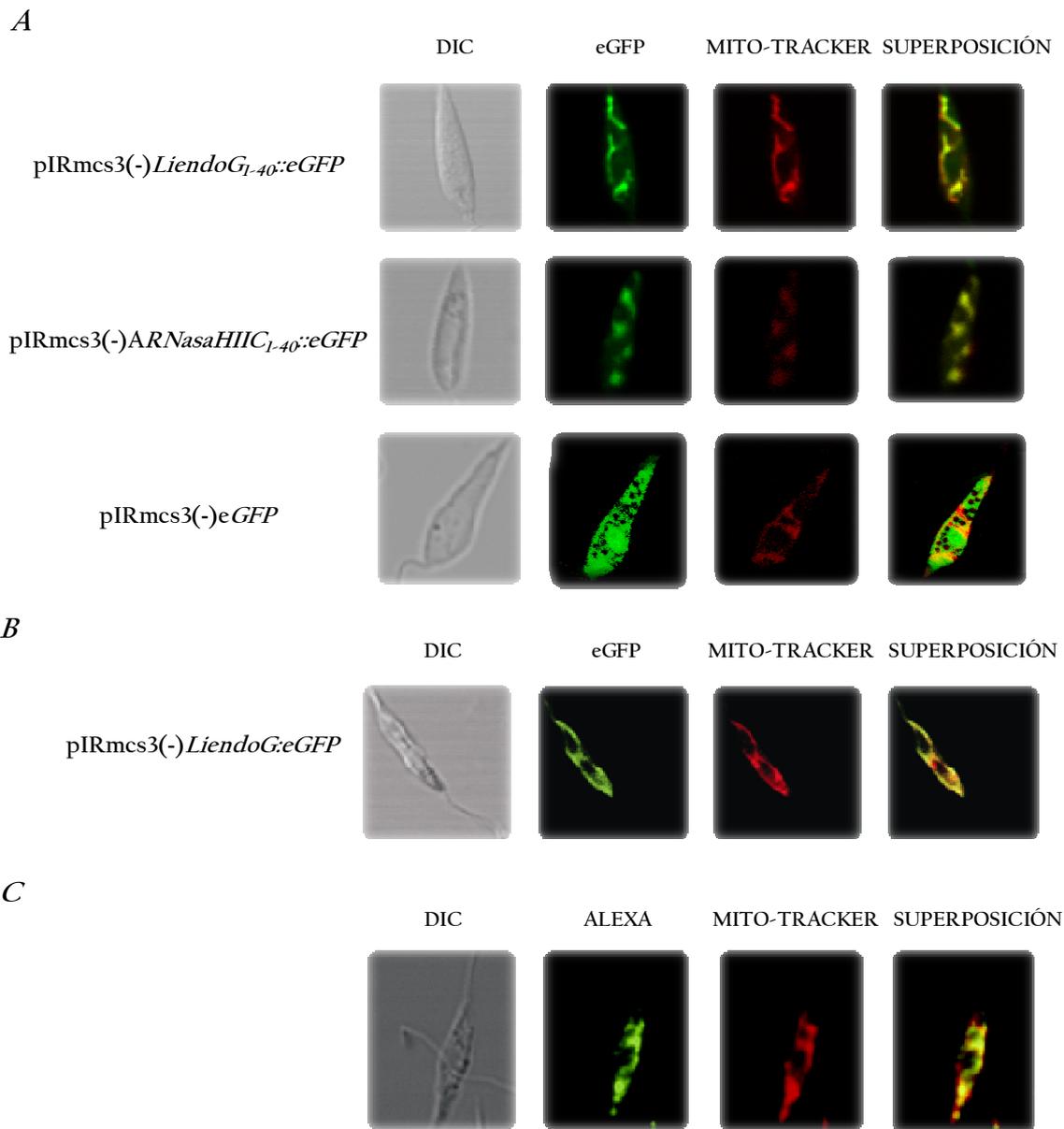


Figura 17. LiEndoG se encuentra localizada en la mitocondria de *L. infantum*. Imágenes de microscopía confocal mostrando: A) Promastigotes marcados con eGFP y Mito-Tracker. pIRmcs3(-)*LiendoG₁₋₄₀::eGFP*: Parásitos expresando los primeros 40 aminoácidos de LiEndoG fusionados a eGFP. pIRmcs3(-)*ARNasaHIIC₁₋₄₀::eGFP*: Parásitos expresando los primeros 40 aminoácidos de la ARNasaH de *L. infantum* fusionados a eGFP. pIRmcs3(-)*eGFP*: Parásitos expresando eGFP. B) Promastigotes marcados con eGFP y Mito-Tracker. pIRmcs3(-)*LiendoG::eGFP*: Parásitos expresando la fusión de LiEndoG completa a eGFP. C) Promastigotes marcados con el anticuerpo monoclonal α -rLiEndoG y Mito-Tracker. DIC: Contraste de interferencia diferencial. eGFP: Fluorescencia verde asociada a eGFP. Mito-Tracker: Fluorescencia roja asociada a la sonda Mito-Tracker. ALEXA: Fluorescencia verde asociada a la fluorescencia del anticuerpo secundario Alexa-Fluor, que está unido a su vez al anticuerpo monoclonal α -rLiEndoG. Superposición: Señales fluorescentes superpuestas procedentes de eGFP y Mito-Tracker, o bien del anticuerpo Alexa-Fluor y la sonda Mito-Tracker.

La sobre-expresión de *LiendoG* produce un incremento en el número de parásitos con el ADN degradado tras la inducción de muerte con un estímulo apoptótico

Con el fin de determinar si la sobre-expresión de *LiendoG* puede tener algún efecto deletéreo en *Leishmania*, se procedió a clonar la secuencia codificante para la proteína en el plásmido pIRmcs3(-). La construcción resultante pIRmcs3(-)*LiendoG* se utilizó para electroporar promastigotes de *L. infantum*. Tras la electroporación y el proceso de selección con el antibiótico, se procedió a la obtención de clones aislados mediante la siembra de los parásitos en agar sangre. Al cabo de 7 días se obtuvieron varios clones de parásitos que sobre-expresaban claramente la proteína con respecto a los parásitos control transfectados con el vector vacío (Figura 19).

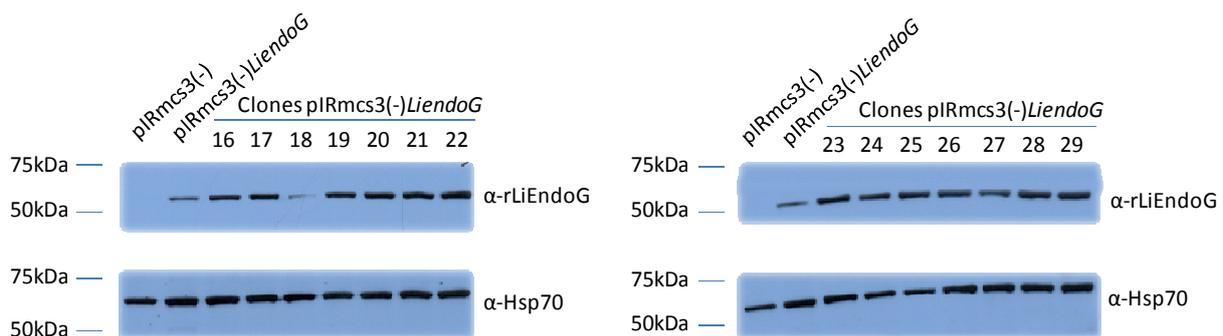


Figura 19. Sobre-expresión de *LiendoG* en promastigotes de *L. infantum*. Inmuno-blot con el anticuerpo monoclonal α -rLiEndoG frente a extractos celulares de promastigotes transfectados con el vector pIRmcs3(-) y de clones obtenidos por plaqueo en agar sangre tras la transfección de parásitos con la construcción pIRmcs3(-)*LiendoG*. Control de carga con suero policlonal α -Hsp70 (1:5000).

Diversos grupos han demostrado la actividad leishmanicida de los análogos de alquilfosfolípidos miltefosina y edelfosina (60,177,178). Paris *et al.* (2004) (103), demostraron que el proceso de muerte provocado por miltefosina en *Leishmania* cursa con características similares a un proceso apoptótico, y trabajos previos realizados en nuestro grupo demuestran que ocurre lo mismo cuando se trata a los

parásitos con edelfosina (104). Por lo tanto, decidimos usar estos fármacos para determinar el posible efecto de la sobre-expresión de *LiendoG* en *Leishmania* bajo un estímulo de carácter apoptótico. Para ello, escogimos al azar dos clones de parásitos (17 y 28) de los múltiples obtenidos que sobre-expresan la proteína.

Tras el tratamiento de los promastigotes de *L. infantum* con edelfosina 40µM durante 24h, pudimos comprobar que el porcentaje de parásitos hipoploides es significativamente superior en los parásitos que sobre-expresan *LiendoG* respecto de los parásitos transfectados con el vector vacío (Figura 20).

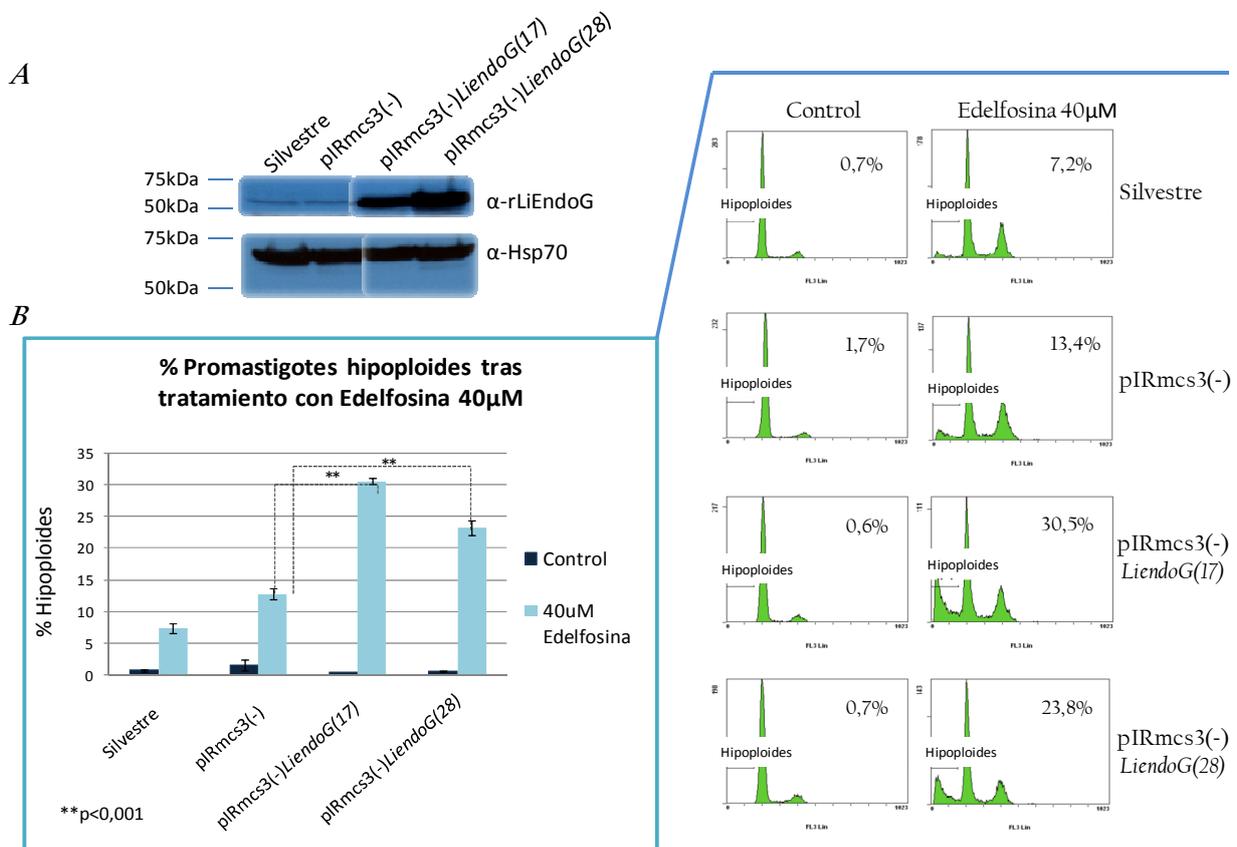


Figura 20. Porcentaje de promastigotes hipoploides tras tratamiento con edelfosina. A) Inmunoblot con el anticuerpo monoclonal α -rLiEndoG frente a extractos celulares de promastigotes transfectados con el vector pIRmcs3(-) y de los clones 17 y 28 obtenidos por plaqueo en agar sangre tras la transfección de parásitos con la construcción pIRmcs3(-)LiendoG. Control de carga con suero policlonal α -Hsp70 (1:5000). B) Ciclo celular de promastigotes control (sin tratar) y tratados con edelfosina 40µM.

Con el fin de confirmar que las poblaciones de parásitos que sobre-expresan *LiendoG* presentan un mayor porcentaje de parásitos con su ADN degradado en respuesta al tratamiento con edelfosina, realizamos un experimento similar al anterior, pero en el que la degradación de ADN se determinó mediante TUNEL. Esta técnica, que marca con un fluoróforo los extremos 3'OH generados durante la degradación del ADN, ha sido utilizada por numerosos grupos para caracterizar el proceso apoptótico (90,140,179-181). Como se observa en la Figura 21, la sobre-expresión de *LiendoG* no causa ninguna alteración en el patrón de fluorescencia de los parásitos en condiciones normales de crecimiento (histogramas vacíos).

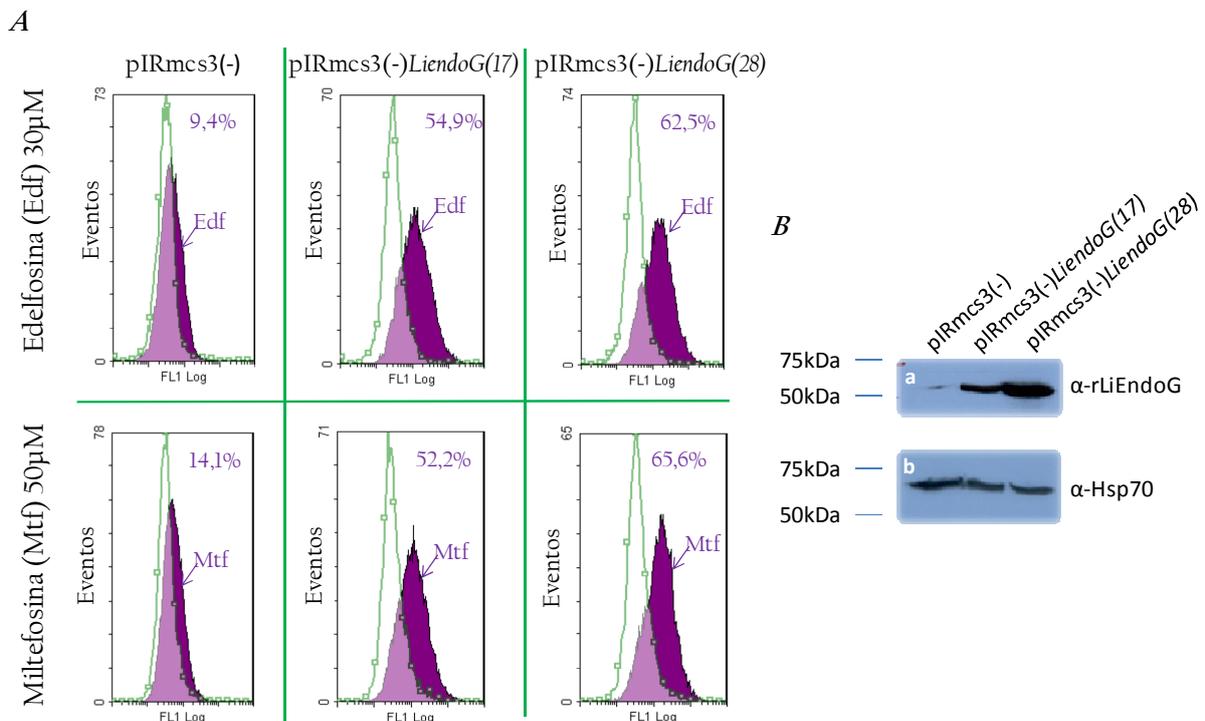


Figura 21. Efecto de la sobre-expresión de *LiendoG* en promastigotes de *L. infantum* bajo un estímulo apoptótico. A) Tinción con TUNEL de promastigotes no tratados (histograma vacío) y tratados (histograma violeta) con edelfosina 30µM o miltefosina 50µM. B) (a) Inmuno-blot con el anticuerpo monoclonal α-rLiEndoG frente a extractos celulares de promastigotes transfectados con el vector pIRmcs3(-) y 2 clones transfectados con la construcción pIRmcs3(-)LiendoG. (b) Control de carga con suero policlonal α-Hsp70 (1:5000).

Por el contrario, tras el tratamiento con edelfosina 30 μ M (histogramas violetas), el porcentaje de parásitos TUNEL positivos se incrementa significativamente en los dos clones que sobre-expresan la proteína con respecto a los parásitos control. Los mismos resultados se obtienen cuando se realiza el tratamiento con miltefosina 50 μ M (Figura 21).

La reducción en los niveles de expresión de LiEndoG produce una disminución en el crecimiento de los promastigotes de *L. infantum*, pero los hace más resistentes a estímulos apoptóticos

Con el fin de observar si la disminución de los niveles de LiEndoG endógena podría tener algún tipo de efecto en el crecimiento de los promastigotes, y dado que el gen que codifica para LiEndoG es un gen de copia única, se procedió a delecionar en primer lugar uno de los alelos correspondientes a dicho gen, y una vez obtenida la delección simple, se trató de realizar la delección del segundo alelo para eliminar completamente el gen del parásito. Para ello, y empezando por el objetivo de eliminar el primer alelo, se clonaron en el plásmido pUC19 los extremos 5' UTR y 3' UTR (regiones que no se traducen) del gen de LiEndoG y, entre ambos, un gen de resistencia a puromicina (pUC195'UTRLiendoG:puro:3'UTRLiendoG). Así, por un proceso de recombinación homóloga de las regiones no codificantes del gen, se reemplaza uno de los alelos de LiEndoG por el gen de resistencia al antibiótico. La puromicina se utilizó posteriormente para la selección de los parásitos que hubiesen sufrido el proceso de recombinación.

Tras la transfección con la construcción cuya finalidad era delecionar el primer alelo, la población resistente al antibiótico no parecía presentar menor nivel de proteína endógena en comparación con los parásitos silvestres, por lo que procedimos a realizar un proceso de selección clonal. Tras el aislamiento en agar

sangre se obtuvieron dos clones que presentaban niveles de expresión menores para LiEndoG (Figura 22.A). Tal y como se observa en la Figura 22.B, ambos clones crecen más despacio que los parásitos silvestres en condiciones normales de crecimiento, alcanzándose en uno de ellos una tasa de división inferior a la mitad de la de los controles.

Para realizar la delección del otro alelo, se repitió el proceso de clonaje y de transfección, pero con una construcción que presentaba un gen de resistencia para el antibiótico neomicina (pUC195'UTRLiendoG:neo:3'UTRLiendoG). Todos los intentos realizados para delecionar la segunda copia del gen fueron infructuosos, pues ningún parásito sobrevivió al proceso de selección con los dos antibióticos tras sucesivos intentos de transfección.

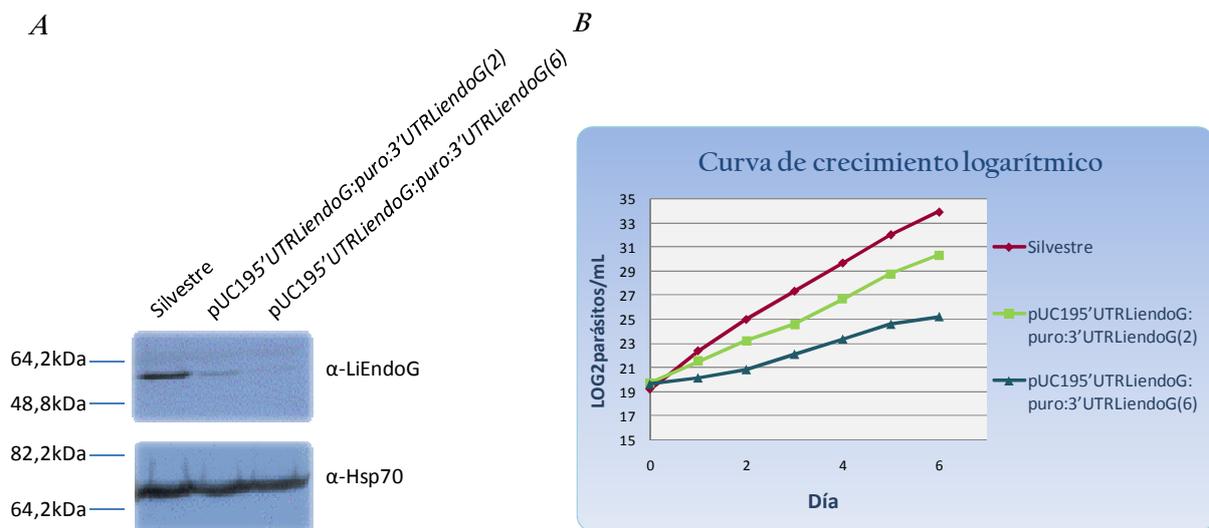


Figura 22. Efecto de la reducción de los niveles de expresión de LiEndoG en el crecimiento de promastigotes de *L. infantum*. A) Inmuno-blot con el anticuerpo monoclonal α -rLiEndoG frente a extractos celulares de promastigotes silvestres y de dos clones de promastigotes transfectados con la construcción pUC195'UTRLiendoG:puro:3'UTRLiendoG. Se realizó un control de carga con suero policlonal α -Hsp70 (1:5000). B) Curva de crecimiento logarítmica de promastigotes silvestres y de 2 clones de promastigotes transfectados con la construcción pUC195'UTRLiendoG:puro:3'UTRLiendoG. Dicha curva está expresada como el logaritmo en base 2 del número de parásitos por mL.

Al tratar con edelfosina los parásitos que presentan uno de los alelos de LiEndoG deletionados, observamos que éstos son más resistentes a la muerte por acción de este fármaco que los parásitos silvestres, pues hay un menor porcentaje de parásitos TUNEL positivos en los dos clones de parásitos que presentan bajos niveles de expresión de la proteína (pUC195'UTRLiendoG:puro:3'UTRLiendoG (2) y (6)), comparado con los parásitos que presentan niveles normales de expresión (Figura 23).

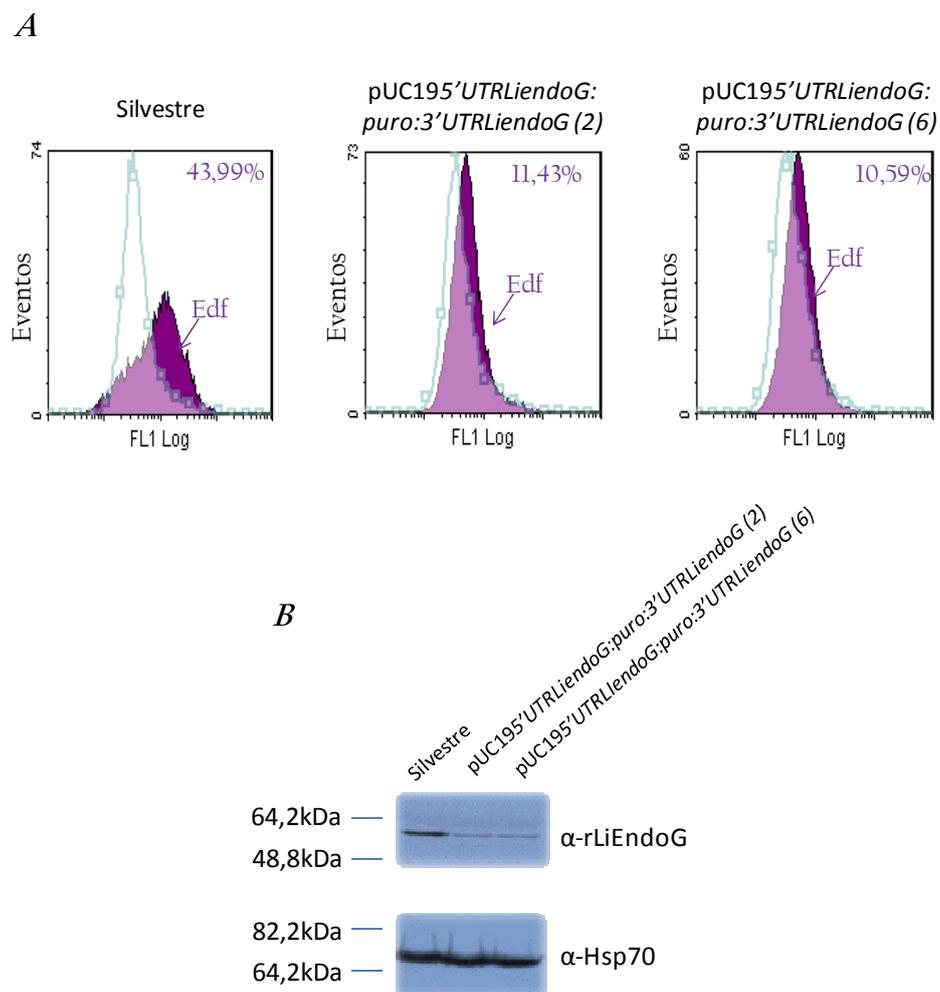


Figura 23. Efecto de la reducción de los niveles de expresión de LiEndoG en promastigotes de *L. infantum* bajo un estímulo apoptótico. A) Tinción con TUNEL de promastigotes de *L. infantum* no tratados (histograma vacío) y tratados con edelfosina 30 μ M (histograma violeta). B) Inmuno-blot con el anticuerpo monoclonal α -rLiEndoG frente a extractos celulares de promastigotes silvestres y de 2 clones de promastigotes transfectados con la construcción pUC195'UTRLiendoG:puro:3'UTRLiendoG. Se realizó un control de carga con suero policlonal α -Hsp70 (1:5000).

LiEndoG se transloca desde la mitocondria hasta el núcleo tras la inducción de muerte con un estímulo apoptótico

En los últimos años se ha demostrado que en otros organismos EndoG se transloca desde la mitocondria hasta el núcleo incluso durante ciertos procesos apoptóticos independientes de caspasas, donde interviene en la degradación del ADN genómico que tiene lugar en las últimas etapas del proceso de muerte celular programada (82,140). Para comprobar si esto mismo le sucede a LiEndoG, los parásitos que expresan la construcción pIRmcs3(-)*LiendoG:eGFP* se trataron con la droga edelfosina durante un período de 24 horas. Tal y como se ha demostrado previamente (Figura 17.B), en ausencia de un estímulo de muerte la proteína de fusión se encuentra localizada en la mitocondria (Figura 24 A, Control). Sin embargo, el tratamiento con edelfosina 40 μ M provoca la salida de la proteína desde la mitocondria al citosol, para pasar posteriormente al núcleo. La localización nuclear de LiEndoG se deduce por el intenso color amarillo observado en el 30% de los núcleos teñidos con ioduro de propidio, como consecuencia de la co-localización de la señal roja de esta sonda intercalante del ADN con la señal verde de la fluorescencia asociada a eGFP (Figura 24.A, edelfosina 40 μ M). Los núcleos de los parásitos no tratados solo presentan coloración roja. En la Figura 24.B se observa un detalle de la co-localización tanto de la proteína de fusión (panel g) como de la proteína endógena incubada con el anticuerpo monoclonal α -rLiEndoG (panel h) con el ioduro de propidio presente en el núcleo, como resultado del tratamiento con edelfosina. Los mismos resultados fueron obtenidos con el tratamiento con miltefosina (Figura 25).

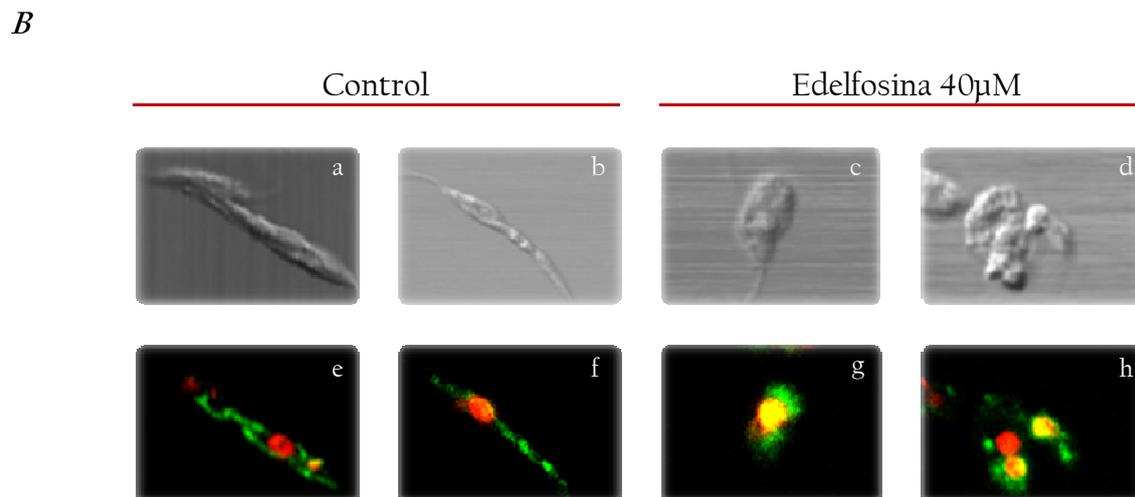
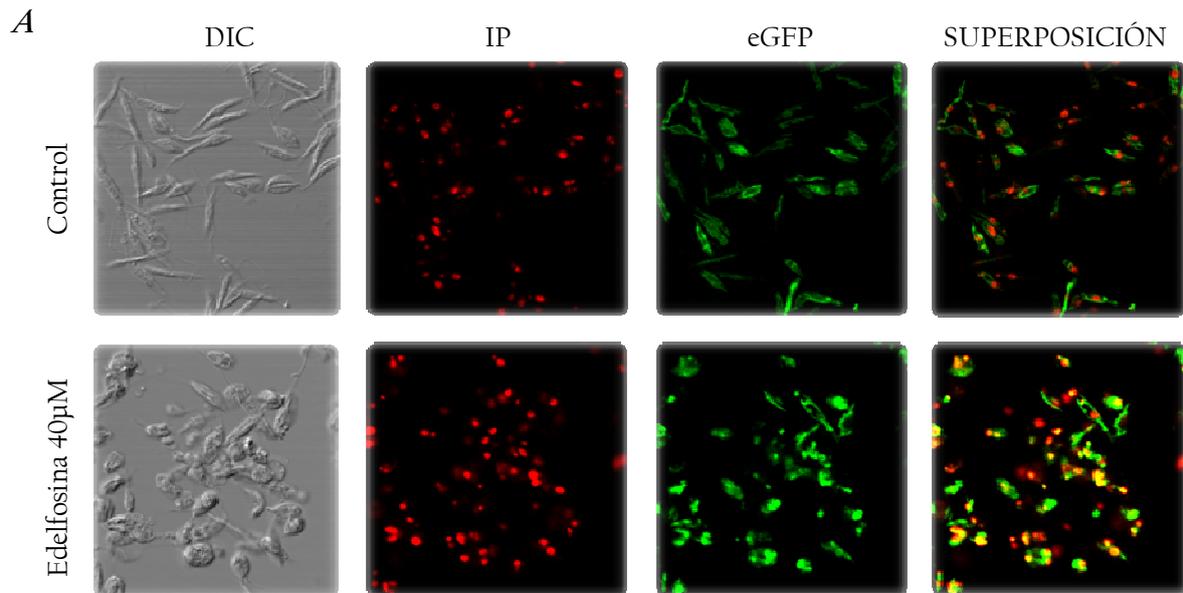


Figura 24. LiEndoG se transloca desde la mitocondria hasta el núcleo tras la inducción de muerte con edelfosina. A) Imagen de microscopía confocal de promastigotes de *L. infantum* expresando una proteína quimérica resultante de la fusión de LiEndoG a eGFP. DIC: Contraste de interferencia diferencial. IP: Fluorescencia roja asociada a la sonda nuclear yoduro de propidio. eGFP: Fluorescencia verde asociada a la proteína de fusión LiEndoG:eGFP. Superposición: Imágenes superpuestas de eGFP e IP. Control: Parásitos no tratados. Edelfosina 40µM: Parásitos tratados con edelfosina 40µM durante 24h. B) Detalle de imágenes de parásitos control y tratados con edelfosina 40µM. (a-d): Imágenes de DIC. (e y g): Promastigotes expresando la proteína de fusión LiEndoG:eGFP y teñidos con yoduro de propidio. (f y h): Promastigotes teñidos con anticuerpo monoclonal α -rLiEndoG unido a ALEXA y yoduro de propidio.

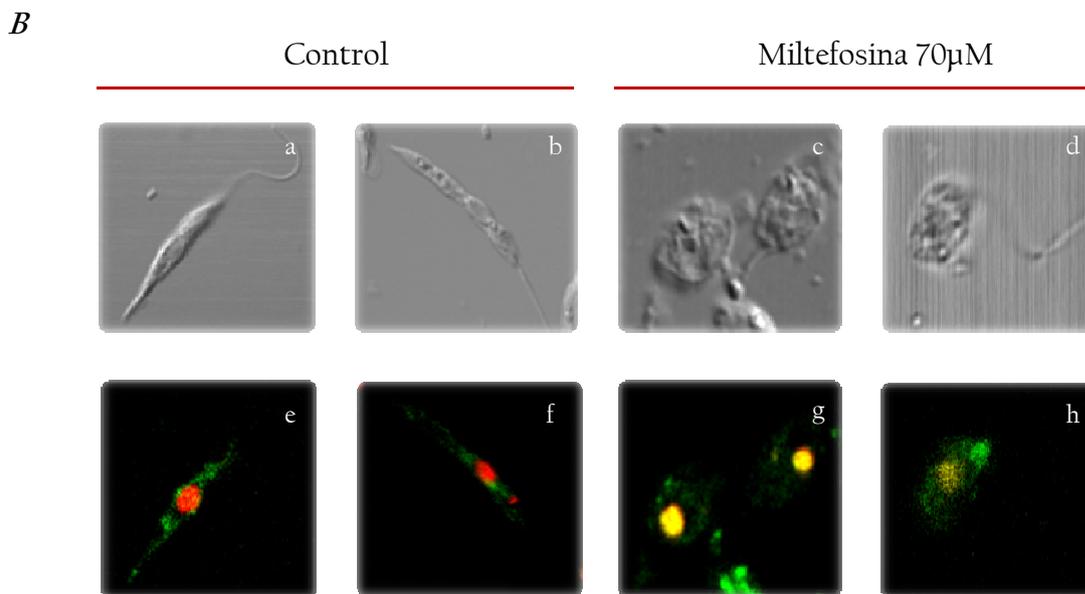
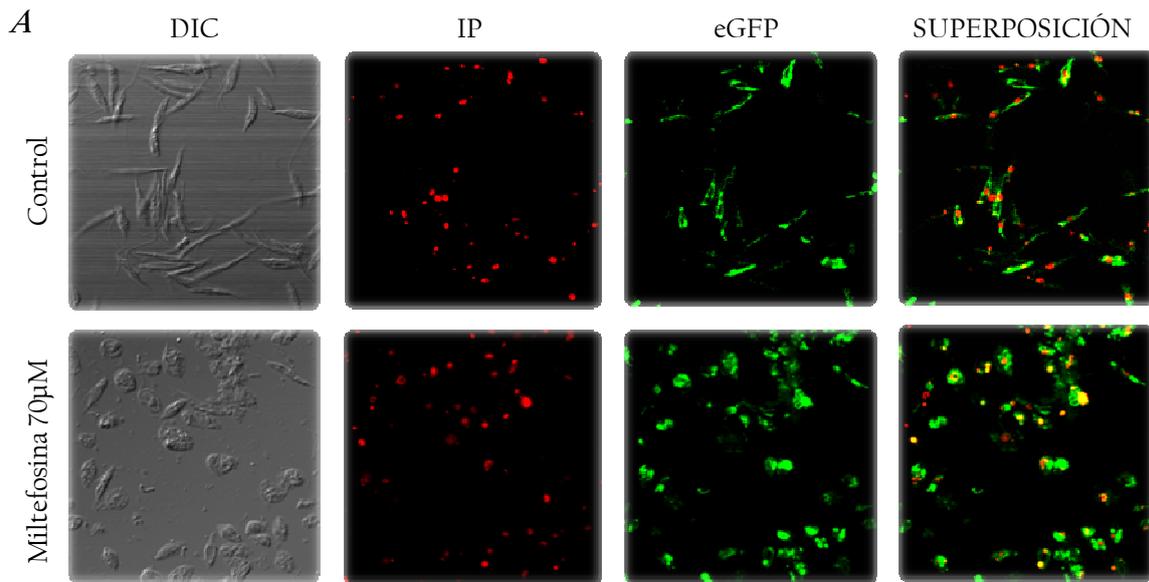


Figura 25. LiEndoG se transloca desde la mitocondria hasta el núcleo tras la inducción de muerte con miltefosina. A) Imagen de microscopía confocal de promastigotes de *L. infantum* expresando una proteína quimérica resultante de la fusión de LiEndoG a eGFP. DIC: Contraste de interferencia diferencial. IP: Fluorescencia roja asociada a la sonda nuclear yoduro de propidio. eGFP: Fluorescencia verde asociada a la proteína de fusión LiEndoG:eGFP. Superposición: Imágenes superpuestas de eGFP e IP. Control: Parásitos no tratados. Miltefosina 70µM: Parásitos tratados con miltefosina 70µM durante 24h. B) Detalle de imágenes de parásitos control y tratados con miltefosina 70µM. (a-d): Imágenes de DIC. (e y g): Promastigotes expresando la proteína de fusión LiEndoG:eGFP y teñidos con yoduro de propidio. (f y h): Promastigotes teñidos con anticuerpo monoclonal α -rLiEndoG unido a ALEXA y yoduro de propidio.

Con objeto de contrastar estos resultados con una segunda técnica, parásitos control y parásitos tratados con edelfosina fueron sometidos a un fraccionamiento sub-celular. Cada una de las fracciones obtenidas se analizó mediante electroforesis y un posterior inmuno-blot. En la Figura 26.A se puede comprobar que en los parásitos no tratados con edelfosina (parásitos control: carriles C) LiEndoG se encuentra mayoritariamente localizada en la mitocondria. También es posible identificar una banda de baja intensidad que indica la presencia de la proteína en la fracción nuclear y, todavía con mucha menos intensidad, en el citosol. Esta localización no mitocondrial en células control también fue observada en el caso de la nucleasa NucA de levaduras por Buttner *et al.* (2007), que atribuyen este hecho a las duras condiciones a las que se ven sometidas las células durante el proceso de fraccionamiento (140). El análisis de las mismas fracciones en el caso de parásitos tratados con edelfosina solo permite detectar la proteína en la fracción nuclear (Figura 26.A-carriles Edf), si bien hay que tener en cuenta que la cantidad de proteína presente en las fracciones de los parásitos tratados es mucho menor como consecuencia del proceso de muerte celular masivo causado por el fármaco. Por tanto, los resultados obtenidos tras la localización de la proteína en las distintas fracciones celulares corroboran la migración de LiEndoG desde la mitocondria al núcleo de los parásitos tras un estímulo apoptótico. Con objeto de garantizar la calidad del fraccionamiento, las tres fracciones fueron sometidas a un inmuno-blot con anticuerpos frente a proteínas características de cada una de ellas: H2A para la fracción nuclear (182), Hsp90 para la fracción citosólica (183) y Hsp60 para la fracción mitocondrial (184) (Figura 26.B).

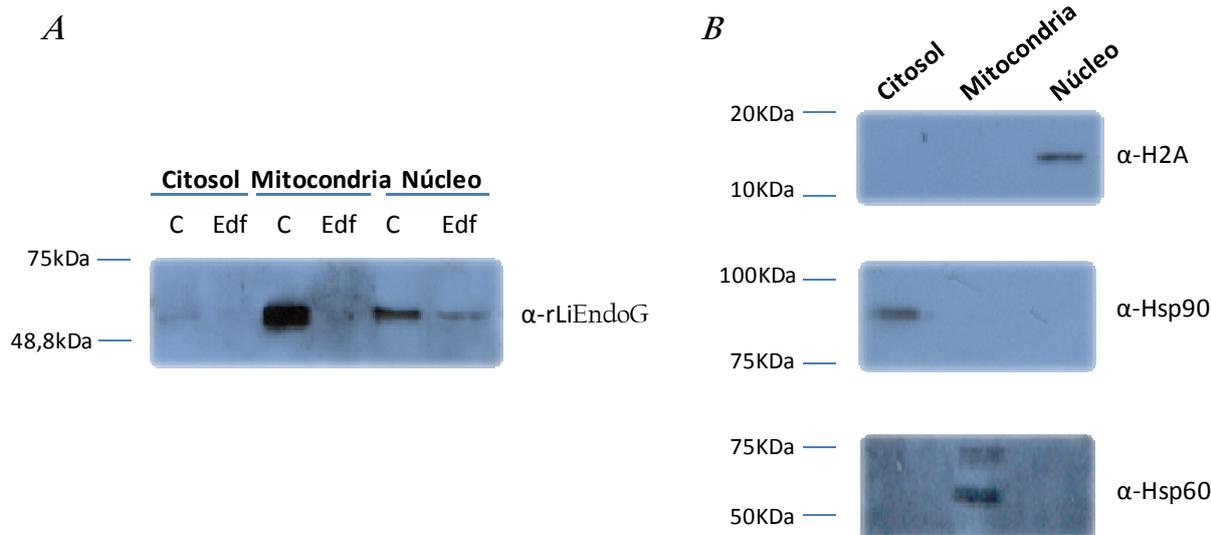


Figura 26. LiEndoG se transloca desde la mitocondria hasta el núcleo tras la inducción de muerte con edelfosina. A) Inmuno-blot con el anticuerpo policlonal α -rLiEndoG frente a fracciones citosólica, mitocondrial y nuclear de lisados de promastigotes control (C) y promastigotes tratados con edelfosina 40 μ M (Edf). B) Inmuno-blots utilizando los anticuerpos α -H2A (control de fracción nuclear), α -Hsp90 (control de fracción citosólica) y α -Hsp60 (control de fracción mitocondrial) frente a fracciones nuclear, citosólica y mitocondrial de lisados de promastigotes control (no tratados) de *L. infantum*.

Análisis de la función de los residuos más conservados en el centro activo de LiEndoG

La inspección visual detallada del modelo estructural de LiEndoG nos permitió postular las funciones de los distintos residuos que componen el característico motivo SRGH. Dado que, como hemos explicado previamente, la His214 presente en este dominio parece jugar un papel fundamental en el ataque nucleofilo, realizamos la mutación H214A esperando como resultado una proteína totalmente inactiva. Igualmente, debido a que la Arg212 parece estar involucrada en la interacción del centro activo con el ADN decidimos realizar la mutación R212A, esperando observar una bajada importante de la actividad nucleasa. Por otra parte,

considerando que en la mayoría de organismos encontramos un Asp en la posición equivalente a la Ser 211 de LiEndoG, pensamos en la posibilidad de que la presencia de esta serina pudiera estar relacionada con un mecanismo de regulación por fosforilación, ya que una serina fosforilada constituye un biomimético de un aspartato (185). Por ello decidimos llevar a cabo la mutación S211D, esperando un incremento de la actividad nucleasa, así como la mutación S211A, con la cual esperábamos reducir significativamente esta actividad.

Las secuencias codificantes para cada una de las proteínas mutantes se generaron mediante un proceso de mutagénesis dirigida sobre pRSET*LiendoG*. Las nuevas construcciones se utilizaron para transformar bacterias *E. coli* BL21(DE3) y posteriormente se realizaron los mismos protocolos de expresión y purificación aplicados para la obtención de rLiEndoG silvestre nativa (Figura 28).

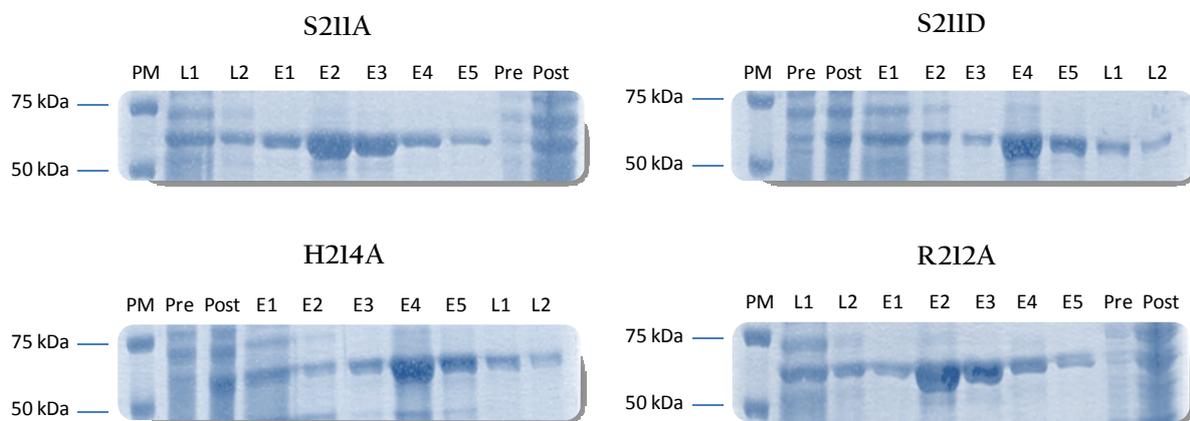


Figura 28. Purificación de las distintas mutantes de LiEndoG: rLiEndoG-S211A, rLiEndoG-S211D, rLiEndoG-H214A y rLiEndoG-R212A por renaturalización en la columna. PM: Marcador de peso molecular. Pre: Pre-inducción. Post: Post- inducción. L1: 1^{er} lavado. L2: 2^o lavado. E1: Fracción de elución 1. E2: Fracción de elución 2. E3: Fracción de elución 3. E4: Fracción de elución 4. E5: Fracción de elución 5.

Un primer análisis de la actividad de las distintas mutantes mediante digestión de ADN superenrollado *in vitro* y posterior análisis de las muestras mediante electroforesis en gel de agarosa revela que, tal y como cabía esperar, las mutantes rLiEndoG-H214A y rLiEndoG-R212A son completamente inactivas (Figura 29.A; carriles H214A y R212A) dado el importante papel predicho para ambas: como base general que ataca al agua durante el ataque nucleófilo (His214), y como uno de los residuos responsables de interactuar con el ADN (Arg212). Por otro lado, y sorprendentemente, considerando que la mayoría de las EndoG descritas en la literatura presentan un dominio DRGH en lugar del SRGH característico de los tripanosomátidos, la mutación S211D genera una proteína prácticamente inactiva (Figura 29.A; carril S211D). Por el contrario, la mutación S211A tan sólo genera una ligera pérdida de actividad, sin llegar a inactivar a la proteína por completo (Figura 29.A; carril S211A). Como cabía esperar, la adición de Mg^{2+} (12,5 μ M) a la reacción de digestión aumenta la actividad de la proteína silvestre, efecto que también se observa en la mutante rLiEndoG-S211A (Figura 29.B; silvestre y S211A), pero no en las mutantes S211D, H214A y R212A (Figura 29.B; S211D, H214A y R212A)

Resultados equivalentes se obtuvieron para el ensayo de actividad tras electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS-ADN, donde solo se observa actividad para la proteína silvestre y para la mutante rLiEndoG-S211A (Figura 29.C). El hecho de que todas las versiones de la proteína tengan la posibilidad de renaturalizar en el gel en las mismas condiciones permite descartar que las distintas actividades observadas en los ensayos de digestión de ADN puedan ser debidas a variaciones en las condiciones de renaturalización de las proteínas durante su proceso de purificación.

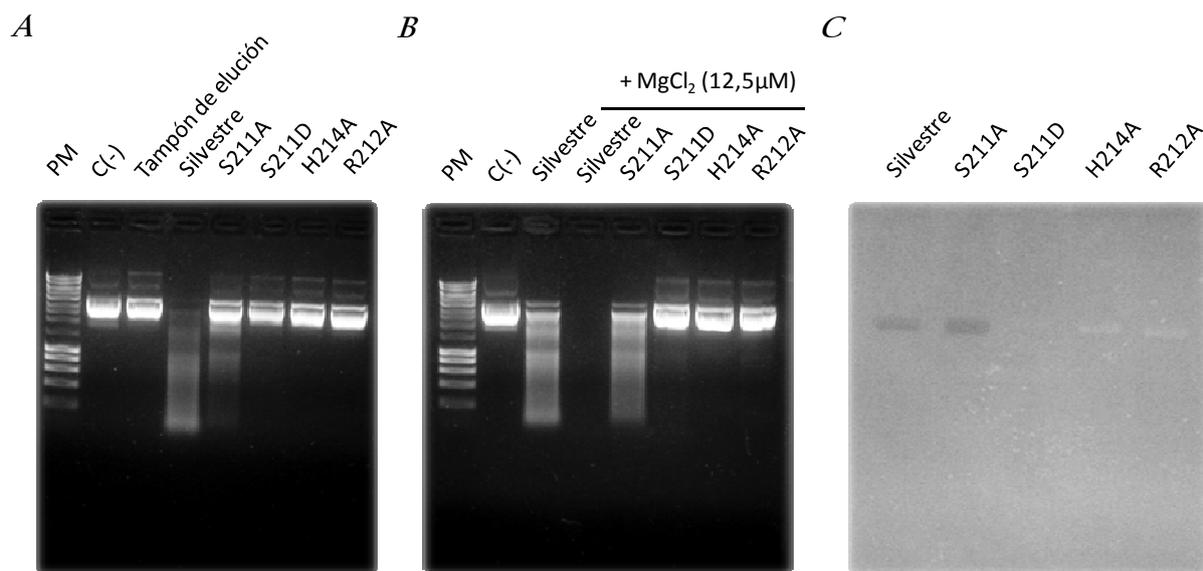
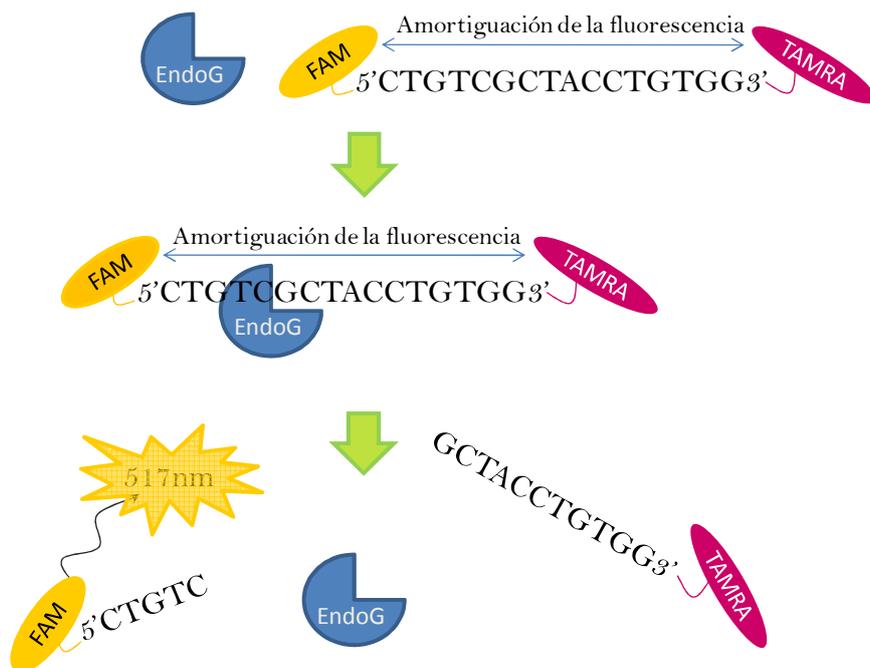


Figura 29. Digestiones con rLiEndoG y las mutantes rLiEndoG-S211A, rLiEndoG-S211D, rLiEndoG-H214A y rLiEndoG-R212A. A) 1μg de pRSET fue digerido durante 1h con 0,2μg de rLiEndoG y las distintas mutantes del dominio SRGH. Los productos de la digestión fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1% y visualizados bajo luz UV. B) 1μg de pRSET fue digerido durante 1h con 0,2μg de rLiEndoG y las distintas mutantes del dominio SRGH en presencia de 12,5μM de MgCl₂. Los productos de la digestión fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1% y visualizados bajo luz UV. C) Electroforesis de poliacrilamida-SDS-ADN: 4μg de cada proteína fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida conteniendo SDS y ADN de esperma de salmón. El gel fue incubado en TEM a 37°C durante 16h, teñido con 1mg/ml de bromuro de etidio y visualizado bajo luz UV.

Para comparar las propiedades cinéticas de cada una de las mutantes con respecto a las de rLiEndoG silvestre, se realizó una monitorización en tiempo real de las digestiones mediante un ensayo fluorimétrico. Como sustrato para la digestión se utilizaron concentraciones crecientes de la sonda de cadena sencilla FAM5'CTGTCGCTACCTGTGG3'TAMRA (Molecular Probes). En la sonda intacta, el extremo 3' marcado con el fluoróforo TAMRA actúa bloqueando la señal emitida por el fluoróforo FAM, situado en el extremo 5'. Cuando rLiEndoG produce un corte en la sonda, los fluoróforos se separan y la señal de FAM queda desbloqueada, de modo que podemos correlacionar el incremento de la señal con la degradación producida por la nucleasa.



La Figura 30 muestra la evolución de la señal fluorescente a distintas concentraciones de sustrato y una misma concentración de enzima.

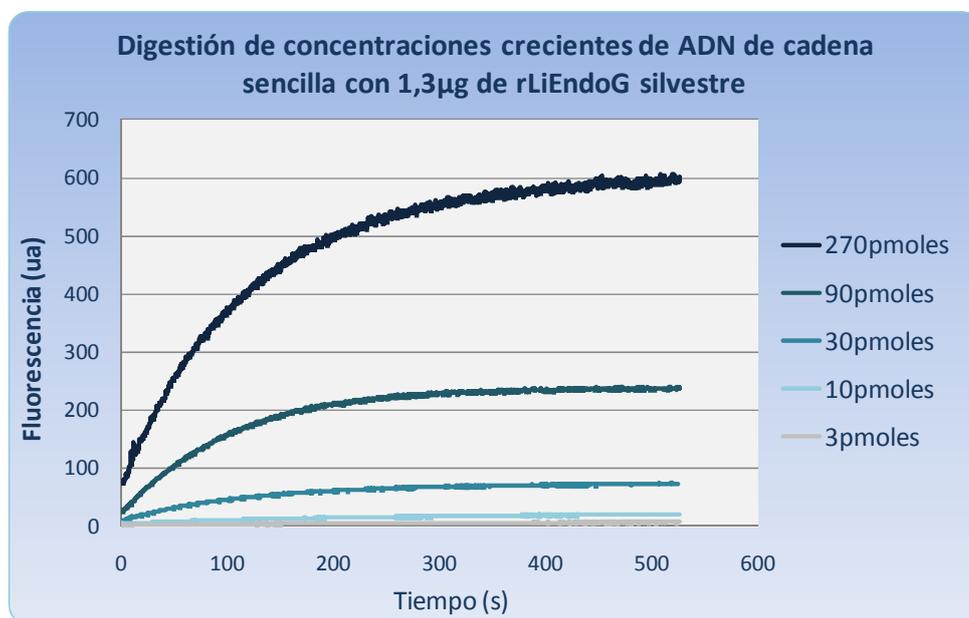


Figura 30. Digestión de ADN de cadena sencilla con rLiEndoG visualizada en tiempo real mediante fluorimetría. Se digirieron distintas cantidades (3pmoles, 10pmoles, 30pmoles, 90pmoles y 270pmoles) de la sonda de cadena sencilla FAM5'CTGTCGCTACCTGTGG3'TAMRA con 1,3µg de rLiEndoG silvestre. Las digestiones fueron monitorizadas en tiempo real por fluorimetría.

Con objeto de intentar determinar las constantes cinéticas tanto de la proteína silvestre como de cada una de sus mutantes, se realizó un barrido de actividad con 6 concentraciones distintas de la sonda de ADN (6nM, 12nM, 20nM, 60nM, 180nM y 240nM) (Figura 31). La mutante rLiEndoG-H214A se excluyó del estudio dada su nula actividad. Por motivos similares, la actividad de rLiEndoG-R212A se analizó tan solo a las tres concentraciones de sustrato más altas, mostrando una capacidad para degradar la sonda prácticamente nula. Al igual que lo observado en los geles de agarosa y poliacrilamida, la mutante rLiEndoG-S211A presenta una actividad ligeramente menor que la proteína silvestre, y la mutante rLiEndoG-S211D, una caída de actividad muy pronunciada (Figura 31).

Con los datos obtenidos pretendimos calcular las velocidades iniciales de reacción a cada una de las concentraciones de sustrato, y con ellas determinar las constantes cinéticas de la proteína silvestre y de cada una de las mutantes mediante el software Grafit6 (Erithacus). Para nuestra sorpresa, tanto los métodos de regresión lineal como los de regresión no lineal fueron incapaces de ajustar los datos obtenidos a la ecuación de Michaelis Menten. La causa probable de ello radica en el hecho de que nuestro método tan solo detecta el primero de los cortes producidos por la nucleasa en el oligonucleótido, aquel que causa la separación entre FAM y TAMRA. La actividad nucleasa sobre el resto de los enlaces fosfodiéster del oligonucleótido no es detectada, por lo que un elevado porcentaje de la actividad no es estimado, lo que imposibilita el ajuste.

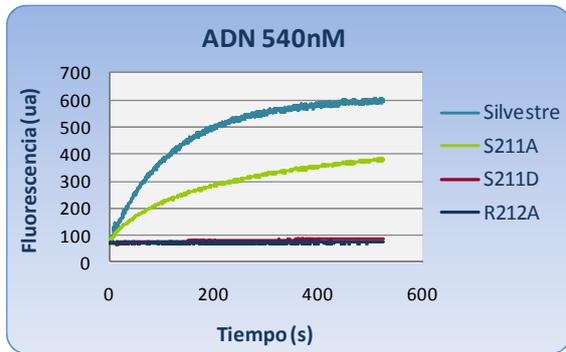
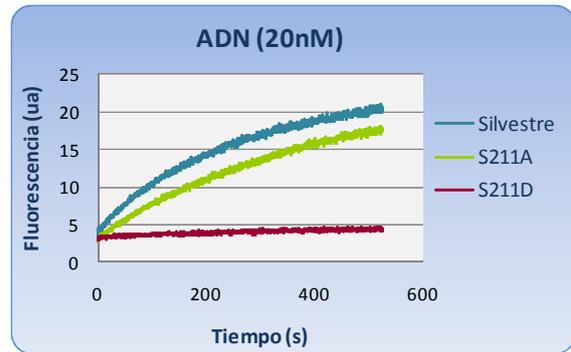
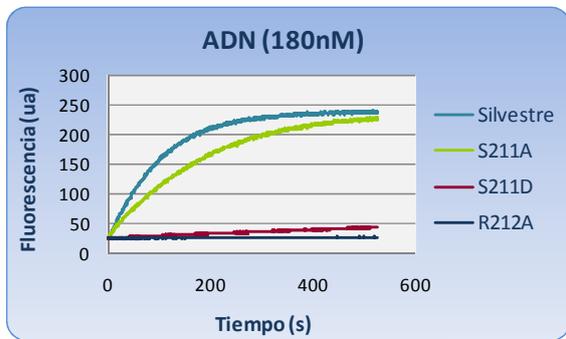
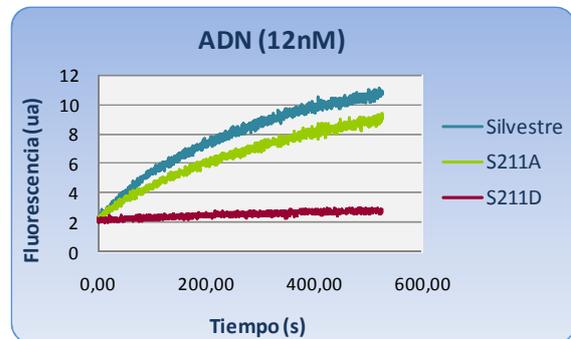
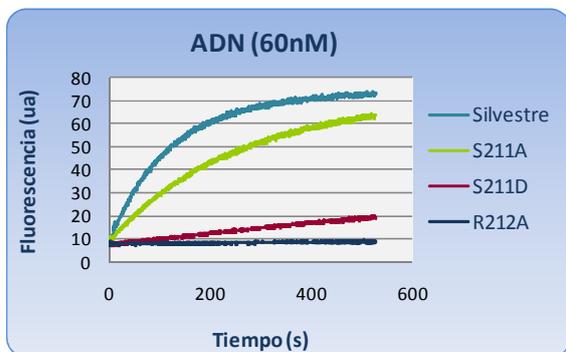
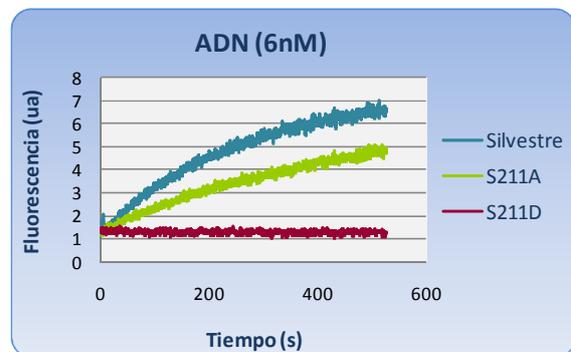
A*D**B**E**C**F*

Figura 3I. Digestión de ADN de cadena sencilla por rLiEndoG y las mutantes rLiEndoG-S211A, rLiEndoG-S211D y rLiEndoG-R212A visualizada en tiempo real mediante fluorimetría. Se utilizaron 1,3 μ g de rLiEndoG silvestre y de las distintas mutantes del dominio SRGH para la digestión de la sonda de cadena sencilla FAM5'CTGTCGCTACCTGTGG3'TAMRA a una concentración de: A) 540nM. B) 180nM. C) 60nM. D) 20nM. E) 12nM. F) 6nM.

Estudio del papel del residuo 211 en el motivo S/DRGH

En un principio, y debido al alto grado de conservación en tripanosomátidos de la Ser en el motivo SRGH (en lugar del motivo DRGH presente en la mayoría de las nucleasas de esta familia), pensamos que la Ser₂₁₁ podría ser importante para la catálisis, ofreciendo apoyo estructural a la cadena lateral de la Asn₂₄₆. Por esta razón llevamos a cabo la mutación S₂₁₁A, encontrando que esta sustitución no afecta prácticamente a la actividad de la nucleasa. Este hallazgo parece descartar un papel fundamental para la Ser₂₁₁ en el mecanismo catalítico de esta enzima. Por otra parte, considerando que el Asp es el aminoácido equivalente a la Ser que está presente en el centro activo de gran parte de las EndoGs de otros organismos, realizamos también la mutación S₂₁₁D. Sorprendentemente este cambio provocó una importante pérdida de actividad.

En un intento de comprender por qué la sustitución S₂₁₁D causa un efecto tan drástico en la actividad de la nucleasa, iniciamos un estudio del posible papel del residuo de Asp en el centro activo de DmEndoG. El análisis de la estructura de esta proteína revela que dicho aspártico interacciona mediante dos enlaces de hidrógeno con la Arg₁₈₈, causando una deformación en el extremo de la hélice α que forma parte del sitio activo, que facilita el que este segmento de secuencia aporte varios residuos a la esfera de coordinación del catión Mg²⁺. Según nuestro modelo, LiEndoG presenta un residuo de Ala en el lugar de dicha Arg. Parece evidente que esta Ala no presenta ninguna capacidad para interaccionar con el Asp característico del motivo DRGH, debido a su pequeño tamaño y a su carácter apolar. Con el fin de intentar reproducir en LiEndoG-S₂₁₁D la interacción Arg–Asp observada en el centro activo de la DmEndoG, procedimos a introducir en esta enzima mutante una segunda sustitución, concretamente incorporar una Arg en la posición de la Ala₂₄₇ con el objetivo de recuperar la actividad nucleasa (Figura 32).

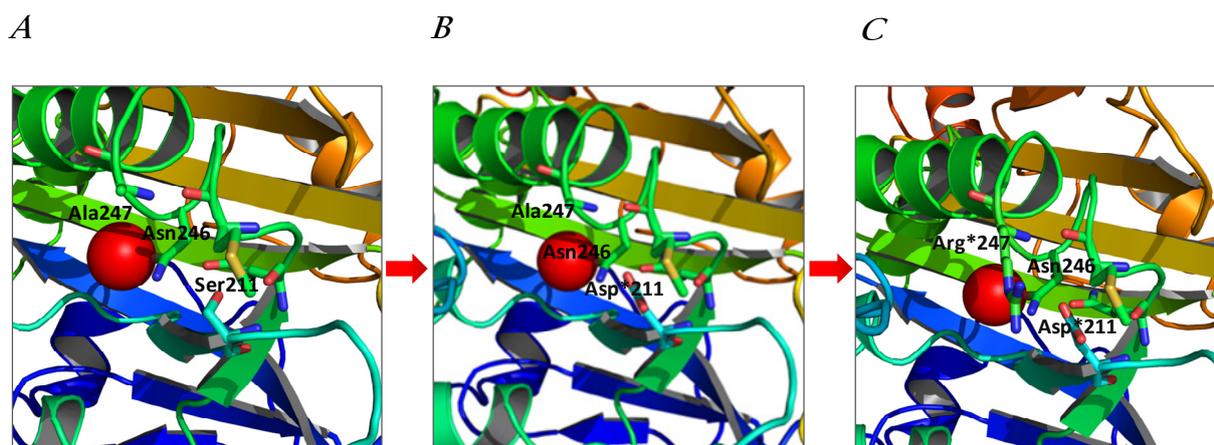


Figura 32. Base estructural para las mutaciones en las posiciones 211 y 247 de LiEndoG. A) Tipo silvestre. B) Mutante S211D. C. Doble mutante S211D/A247R. Obsérvese la proximidad espacial de estos dos últimos residuos y la interacción electrostática favorable entre sus cadenas laterales. Las mutaciones se realizaron sobre el modelo de LiEndoG utilizando el programa PyMol.

Tras la expresión y purificación de esta nueva enzima mutante (LiEndoG-S211D/A247R (Figura 33.A), observamos efectivamente un rescate de la actividad nucleasa (Figuras 33.B y 33.C), confirmándose así por extrapolación la relevancia funcional de la interacción entre estos dos residuos, al menos en DmEndoG. Sin embargo, estos resultados, por sí mismos, no nos permiten explicar el efecto inactivante de LiEndoG por la mutación S211D.

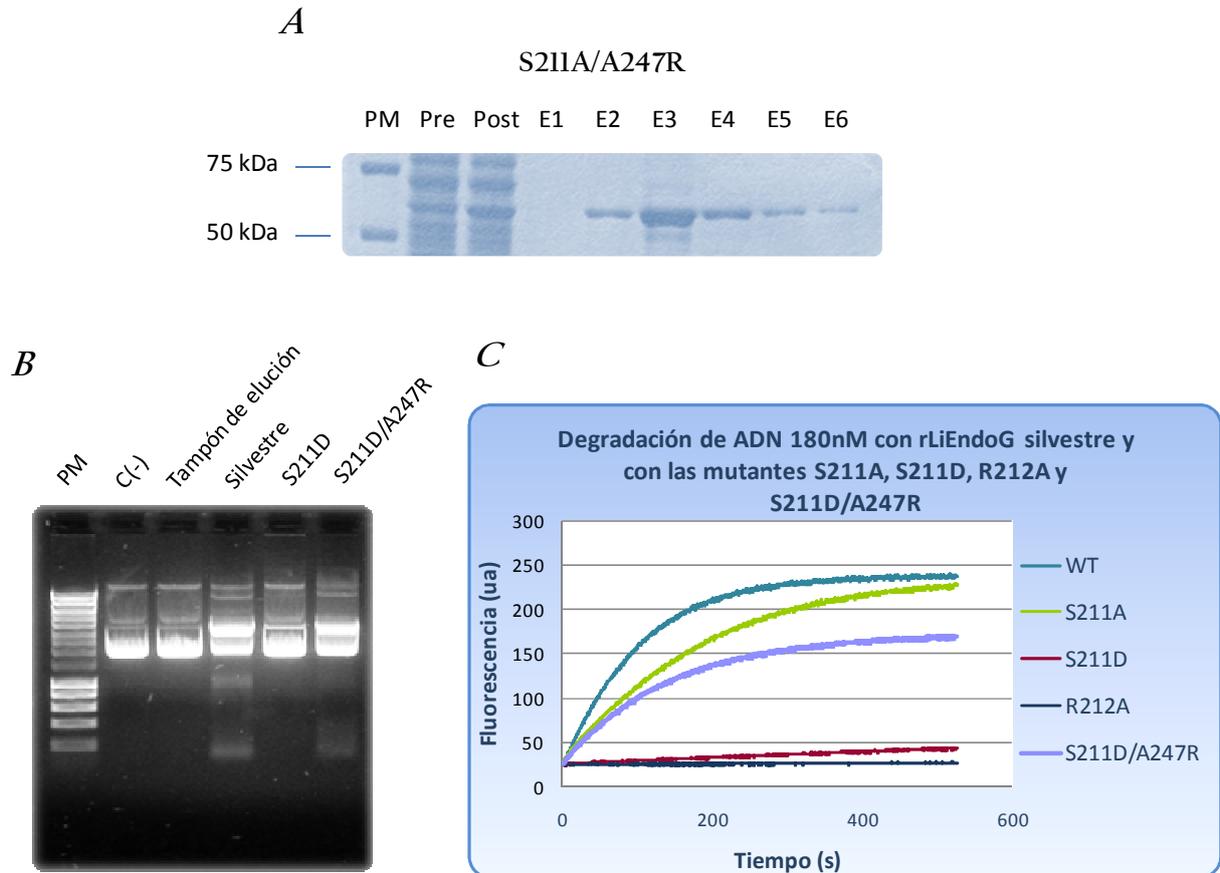


Figura 33. Purificación y actividad de la mutante rLiEndoG-S211D/A247R. A) Purificación por renaturalización de la mutante rLiEndoG-S211/A247R. PM: Marcador de peso molecular. Pre: Pre-inducción. Post: Post-inducción. E1: Fracción de elución 1. E2: Fracción de elución 2. E3: Fracción de elución 3. E4: Fracción de elución 4. E5: Fracción de elución 5. E6: Fracción de elución 6. B) Análisis de la actividad de la mutante rLiEndoGS211D/A247R en comparación con la proteína silvestre y distintas mutantes del motivo SRGH mediante electroforesis en gel de agarosa. 1µg de pRSET fue digerido durante 1h con 0,2µg de rLiEndoG y de las distintas mutantes. Se incluyó un control sin digerir, C(-), y un control del plásmido en presencia del tampón de elución utilizado en la purificación de las proteínas. C) Análisis de la actividad de la mutante rLiEndoGS211D/A247R por fluorimetría en comparación con la proteína silvestre y otras mutantes disponibles.

LiEndoG presenta un posible dominio de autoinhibición

Como hemos comentado previamente, LiEndoG guarda alta identidad de secuencia con su homóloga en *D. melanogaster* (cristalizada recientemente en un

complejo con su inhibidor EndoGI (137)), lo que nos permitió actualizar nuestro modelo por homología. Al analizar en detalle dicho modelo nos percatamos de que la región correspondiente a los aminoácidos 144–180, que solo está presente en la proteína de *Leishmania* y que por lo tanto no guarda identidad con la de *Drosophila*, se localiza prácticamente en la misma región espacial en la que se ubica EndoGI para bloquear el sitio catalítico en la estructura experimentalmente resuelta del complejo EndoG/EndoGI de DmEndoG (Figura 34, regiones en púrpura).

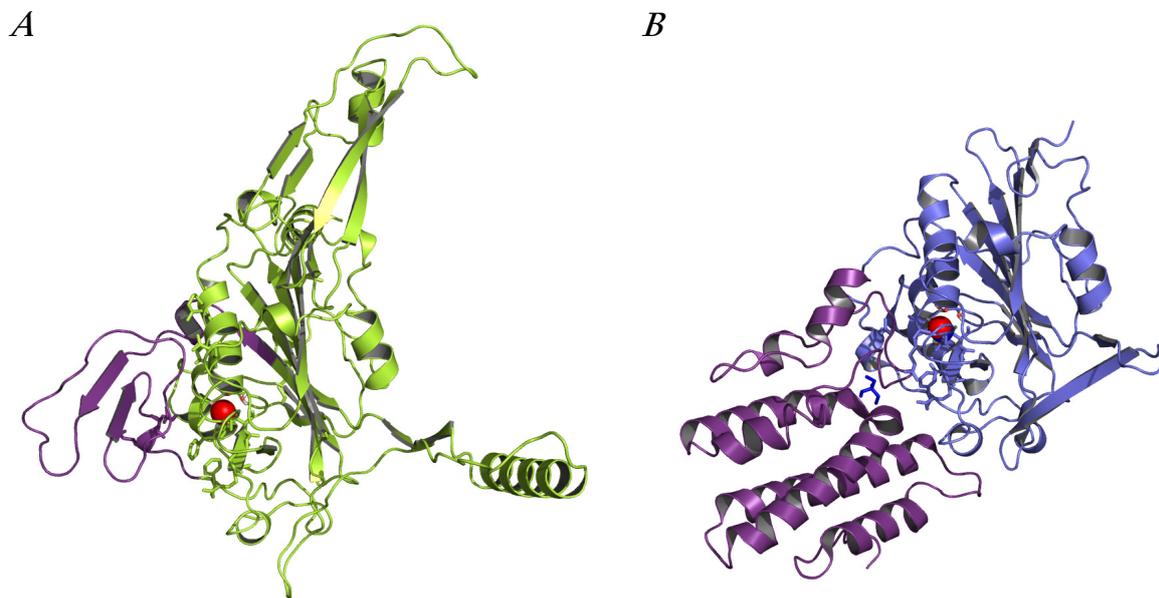


Figura 34. Comparación de la localización espacial del posible dominio de autoinhibición de LiEndoG y la ubicación del inhibidor EndoGI en el complejo que forma con DmEndoG. A) Modelo de LiEndoG (verde) con los residuos que coinciden con la localización de EndoGI en púrpura. B) Estructura de DmEndoG (azul) y su inhibidor EndoGI (en púrpura).

Más aún, resulta especialmente llamativo comprobar que este dominio (próximo en la secuencia primaria al motivo SRGH de LiEndoG, Figura 35) está constituido por una región presuntamente desordenada estructuralmente que es muy rica en aminoácidos de carácter ácido y que sería capaz de competir con el ADN por su unión al centro activo de la nucleasa, de modo semejante a como lo hace el parche cargado negativamente en la superficie molecular de los dominios 1 y 2 del inhibidor EndoGI de *Drosophila*.

```

LiEndoG      MSASAAIARLLGAASLALFGVTAYWAYSTQASKRIQLVVPGRSLVTTANATPSIVSAGS 60
LmEndoG      ----MIARLLGAASVGLFSVTAYWYSTQASKRIQLVVPGRSLVTTATAKPSIGSAGS 55
LbEndoG      MSINAAIGRLFGAASVALFVVAAYWYSAQASKRSQLVVQPGCSLVTTATATPSTVSTG- 59
DmEndoG      ----MSAPRVGGVLALGATALGAFYLGTHVERERQ-----H 32
              *: *. :. :. :*:: :   :*
              .

LiEndoG      DSSSQGSVVGDAALAFVVLPPHTPPAQASTLTADFLQQCN-EAAAHGLPSTA-EVRCYGG 119
LmEndoG      DSSSQGSVVGDAALAFVVLPPHTPPAQASTLTADFLQQCN-EAAAHGLPSTA-EVRCYGG 114
LbEndoG      NGSSQGSVSSDVALWFPVLPHTSPAQASTLTANFLQQCN-EAAAHGLPSTA-EVRCYGG 118
DmEndoG      NGSTSGLPRLPGLPTFGTVSAASLIPAQENNVSLTATPFRIGQIMKYGFPLDHRVSHSD 92
              :*:. *   * . * .. *** ..:: .   :   :*:. * . * :. . .

LiEndoG      YLASLNYERRIPNWMEVVDYRKIHSGRRPSSPAAAAANRDDAAQAADDEGSDGSRGGG 179
LmEndoG      YLASLNYERRIPNWMEVVDYRKLHPGRRPSSPAAAAASRDDAAQDEEDEGSDGSRGGG 174
LbEndoG      YLASLNYERRIPNWMEVVDYRKIHSGRRPSSPAVAATSGDDAAP--GEEVGCDSRGGG 176
DmEndoG      YVLSYDRRNKRVPHWVFEHLTAESV----- 120
              *: * : . : * : * : * : . . :
              .

LiEndoG      IVSRNRNSNFYADDTPAAFRVGPNSYISRGNSSGHAAAQLHKASQAEMDATFMNNANIV 239
LmEndoG      IVSRNRNSNFYADDTPAAFRVGPSSYISRGNSSGHAAAQLHKASQAEMDATFMNNANIV 234
LbEndoG      IVSRNRNSNFYADDTPAAFRVGPDSYISRGNSSGHAAAQLHKASQAEMDATFMNNANIV 236
DmEndoG      IVDRSKCDFKQDESIFPFRSQNTDYRRSGVSSGHMAAAGNHLRHQKHCDDET FYLSNMAP 180
              * . * . : . * * : : . * * . * * : * : * * * * : .
              .

LiEndoG      PQDMLNAVDWLRLEGLTRKLSKEVSVGLQQQQPGRVQRGDSPPAGNTAKAEDAGSSGK 299
LmEndoG      PQDMLNAVDWLRLEGLTRKLSKEVSVGFPQQQPGRGRQRGHSPPAGNTTAEAGGSSGK 294
LbEndoG      PQDMLNAVDWLRLEGLTRKLSKEVSVG--QQQPGRGQRRGDSPPAANTGEAEVGSAGK 294
DmEndoG      QVGGFNRDawnTLEAHVRLTKT-----YSN 207
              . : *   * * . * : * : *
              .

LiEndoG      LYVVTGPAFVPRLMRVEHRPDGTEVHVPLSSADANAAPWKSAAPVKLMMTYELTGHFARG 359
LmEndoG      LYVVTGPAFVPRLMRVEHRPDGTEVHVPLSSADASAAPWKSAAPVKLMMTYELTGHFARG 354
LbEndoG      LYVVSQPAFVPRFMRVEHRPDGTEIHAPLSSADVSAALRKTAAPVKLMMTYELTGNPARG 354
DmEndoG      VYVCTGPLYLP-----HKED-----DGKSYVKYEVIG----A 235
              : * : * : *   * : *   *   * : * : * : *
              .

LiEndoG      TPVAVPShLFKVFVLAEEENGGRSHSVAAFMMPNGPIIEELPLTAYQVPIERLQRITGLQFF 419
LmEndoG      TLVAVPShLFKVFVLAEEENGQSHSVAAFMMPNGPIVEELPLTAYQVPIEQRLQRITGLQFF 414
LbEndoG      TPVAVPShLFKVFVLAEEEDGGGRSHSAAAFMMPNGPIVEQLPLTAYQVPIEQRLQRITGLQFF 414
DmEndoG      NTVAVPThfYKVIVG-ESADHKLHMEsYVMPNQVISNDTPIsVfQVpPESVesAGLlFF 294
              . * * * : * : * : . * . . . . : : * * * * * : : * : : * * * * *
              .

LiEndoG      FGMDATRLPDLCKTHKCDARPSALFQRYRQVAQLRAADSVPQLRQTYAALQASAAGGKLD 479
LmEndoG      FGMDVTRLPDLCKAHKCDARPSALFQRYRQVAQLRAADSVPQLQQAAYALQASAAGGKLD 474
LbEndoG      FGMDATRLPDLCKTHQCDARPPALFQRYRQVAQLRAAKSVPRLRQTYATLQASAAGGKLD 474
DmEndoG      DQINRKQLTtingkV----- 310
              : : . * . :   :
              .

LiEndoG      EAVVHEFQNRMEELVAAAVGLIDQAERR-- 507
LmEndoG      EAVVHEFQNRMEELVAAAVGLIDQAERR-- 502
LbEndoG      ETVVREYERRAEELLAGAAGSGGEEWRD 504
DmEndoG      -----

```

Figura 35. Alineamiento realizado por ClustalW de las secuencias de las EndoG de *L. infantum*, *L. major*, *L. braziliensis* y *D. melanogaster*. “*” significa que los aminoácidos son idénticos en todas las secuencias del alineamiento. “:” significa que se ha producido una sustitución conservativa de un aminoácido por otro. “.” significa que se ha producido una sustitución semi-conservativa de un aminoácido por otro. Código de colores: Magenta (residuo básico), azul (residuo ácido), rojo (residuo hidrófobo) y verde (residuo polar). El recuadro verde engloba el característico dominio (D/S)RGH. Los recuadros azules engloban los aminoácidos que forman parte del dominio de LiEndoG cuya localización espacial se espera que coincida con la de EndoGI. Los recuadros rosados engloban los aminoácidos de la secuencia de DmEndoG que fueron incluidos en la secuencia de LiEndoG durante el proceso de mutagénesis.

Es necesario señalar que no ha sido posible modelar de forma fiable este dominio ya que no guarda homología de secuencia con ninguna de las proteínas presentes en el PDB y se predice como una región intrínsecamente desordenada, lo cual sugiere un papel regulador (186). Por las razones anteriores nos planteamos la posibilidad de que esta región pudiese estar desempeñando en LiEndoG una función equivalente a la de EndoGI en *Drosophila*, es decir, que se tratara de un dominio de autoinhibición de la propia nucleasa (en determinadas circunstancias). En consecuencia, procedimos a clonar en el plásmido integrativo pIRmcs3(-) la secuencia de LiEndoG pero eliminando esta región. En el caso de que realmente esta secuencia desempeñe un papel autoinhibidor, sería esperable que los parásitos transfectados con esta construcción expresasen una proteína constitutivamente activa que podría conducir a una degradación no regulada de su ADN y a una limitación de su viabilidad.

Con el fin de expresar una proteína que careciera de este posible dominio inhibidor (LiEndoG Δ 144-180), los 36 residuos comprendidos entre las posiciones 144 y 180 de LiEndoG (Figura 35, recuadros azules) fueron sustituidos por los 5 residuos comprendidos entre las posiciones 117 y 121 de la proteína homóloga DmEndoG (Figura 35, recuadros rosados), en un intento de minimizar las posibles alteraciones que esta delección pudiera causar sobre el resto de la estructura de la proteína.

La secuencia de nucleótidos correspondiente a LiEndoG Δ 144-180 fue clonada en primer lugar en el vector de expresión en bacterias pRSET, procediéndose a la purificación de la proteína mutada según las condiciones ya descritas (Figura 36.A). Los resultados mostrados en la Figura 36.B demuestran que la nueva versión de la proteína presenta una actividad *in vitro* similar a la de la proteína silvestre, lo que demuestra que LiEndoG Δ 144-180 es capaz de plegarse de forma correcta manteniendo su actividad enzimática.

A



B

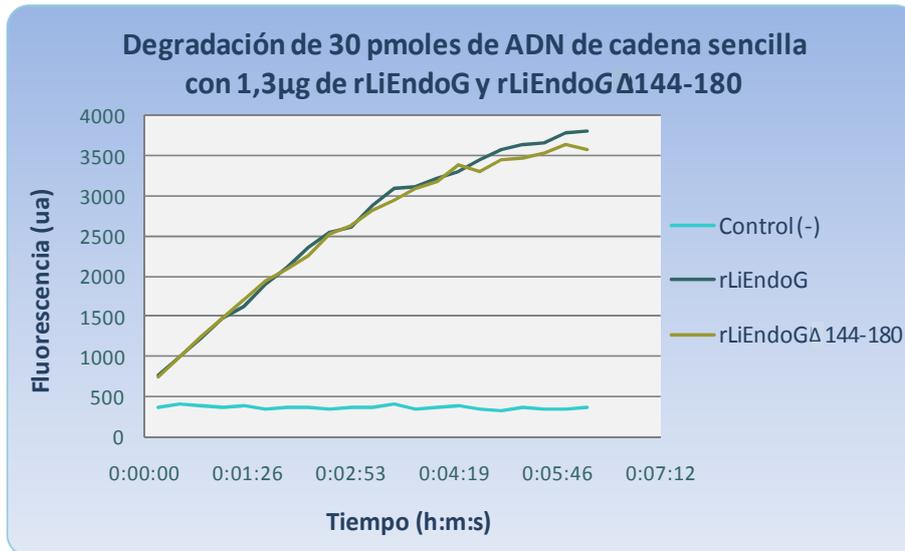


Figura 36. rLiEndoG Δ 144-180 presenta actividad nucleasa. A) Purificación de rLiEndoG Δ 144-180. PM: Marcador de peso molecular. Pre: Pre-inducción. Post: Post-inducción. E1: Fracción de elución 1. E2: Fracción de elución 2. E3: Fracción de elución 3. E4: Fracción de elución 4. E5: Fracción de elución 5. B) Digestión de 30 pmoles de ADN de cadena sencilla con 1,3 μ g de rLiEndoG y rLiEndoG Δ 144-180, visualizada en tiempo real mediante fluorimetría.

Una vez comprobada la estabilidad de la proteína mutante, procedimos a intentar evaluar su posible efecto sobre los parásitos. Para ello se clonó su secuencia codificante en el vector integrativo pIRmcs3(-), generándose la construcción pIRmcs3(-)LiendoG Δ 144-180. El ADN de dicha construcción junto con los de la construcción pIRmcs3(-)LiendoG y el vector vacío pIRmcs3(-) se utilizaron para transfectar promastigotes silvestres de *L. infantum*. Todas las transfecciones se realizaron por triplicado. Tras completar el proceso de selección por antibiótico, pudimos observar que el número de parásitos presentes en los tres triplicados que

contenían parásitos transfectedados con la construcción *pIRmcs3(-)LiendoGΔ144-180* era significativamente menor al número de parásitos transfectedados con la construcción *pIRmcs3(-)LiendoG* o con el vector vacío (Figura 37). Nuestros resultados indican que la expresión de *LiendoGΔ144-180* en los promastigotes tiene un efecto deletéreo. La toxicidad de esta versión de la proteína avala la hipótesis de que la región comprendida entre los residuos 144 y 180 constituye un dominio de autoinhibición.

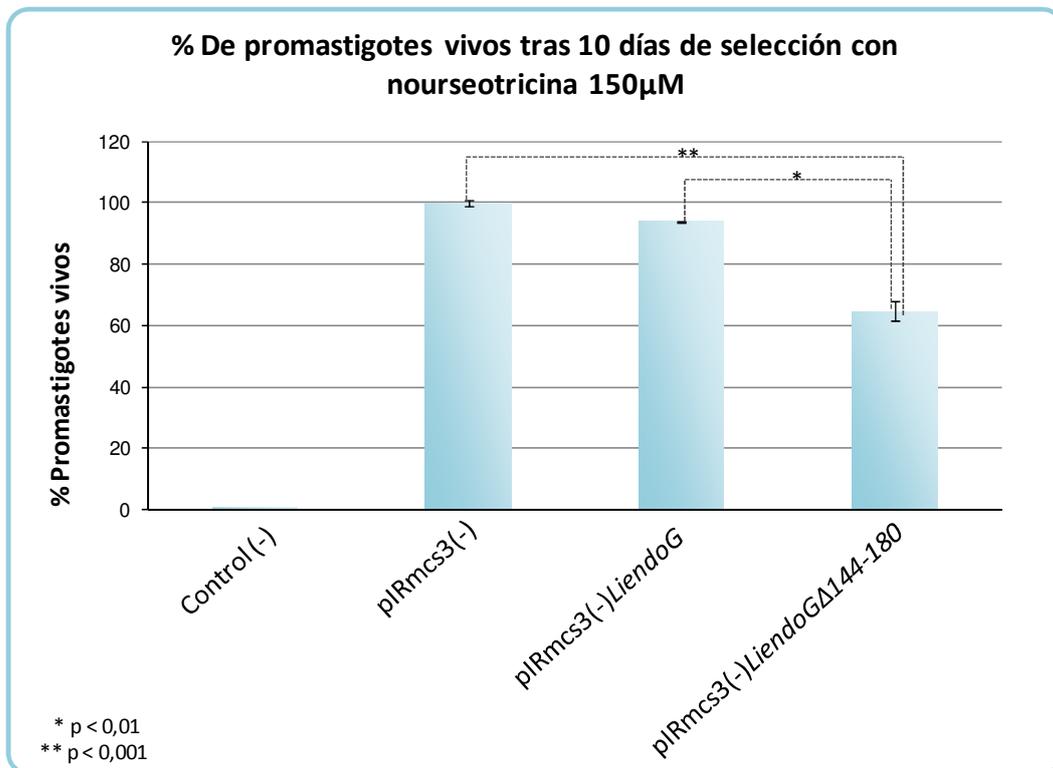


Figura 37. Porcentaje de promastigotes vivos transfectedados con la construcción *pIRmcs3(-)LiendoGΔ144-180* tras el proceso de selección con antibiótico. 40×10^6 parásitos fueron electroporados con $3 \mu\text{g}$ de *pIRmcs3(-)*, *pIRmcs3(-)LiendoG*, *pIRmcs3(-)LiendoGΔ144-180*, así como en ausencia de ADN (Control -) y seleccionados con nourseotricina $150 \mu\text{M}$ durante 10 días. El conteo de parásitos vivos se realizó de forma cualitativa mediante citometría de flujo, discriminando los parásitos muertos por marcaje con yoduro de propidio.

Los dominios de autoinhibición presentes en las proteínas están habitualmente sometidos a procesos de regulación que modifican su estructura y permiten, de esta manera, regular la actividad del enzima. Así ocurre, por ejemplo, en el caso de la glutatión-S-transferasa (187), cuya actividad se ve regulada mediante el efecto que la variación del pH tiene sobre su dominio de inhibición. En este sentido, y dada la relevancia de las cargas negativas asociadas a los residuos de aspártico de la región inhibidora, nos planteamos comparar la actividad de rLiEndoG y de rLiEndoG Δ 144-180 a lo largo de un rango de pH. En la Figura 38 podemos observar cómo ambas proteínas son inactivas a pHs ácidos, y presentan un pH óptimo de 6,5. Pero rLiEndoG Δ 144-180 presenta también actividad óptima a pH 7,5 y mucha mayor actividad que la proteína silvestre a pH 8,5 y 9,5, demostrando que efectivamente existen diferencias en la actividad de ambas versiones de la nucleasa en función del pH.

Asumiendo que, tal y como se ha demostrado para otras proteínas, los pKa aparentes de los residuos de aspártico pueden variar significativamente en función del entorno proteico en que estén situados, podemos considerar que la inhibición de la proteína silvestre a pHs básicos es consecuencia del incremento de cargas negativas en la región inhibidora según aumenta el pH. De esta forma, dicha región se estructuraría bloqueando el acceso del ADN al centro activo. La ausencia del dominio de inhibición en LiEndoG Δ 144-180 permitiría a la nucleasa mantener su actividad a pH básico.

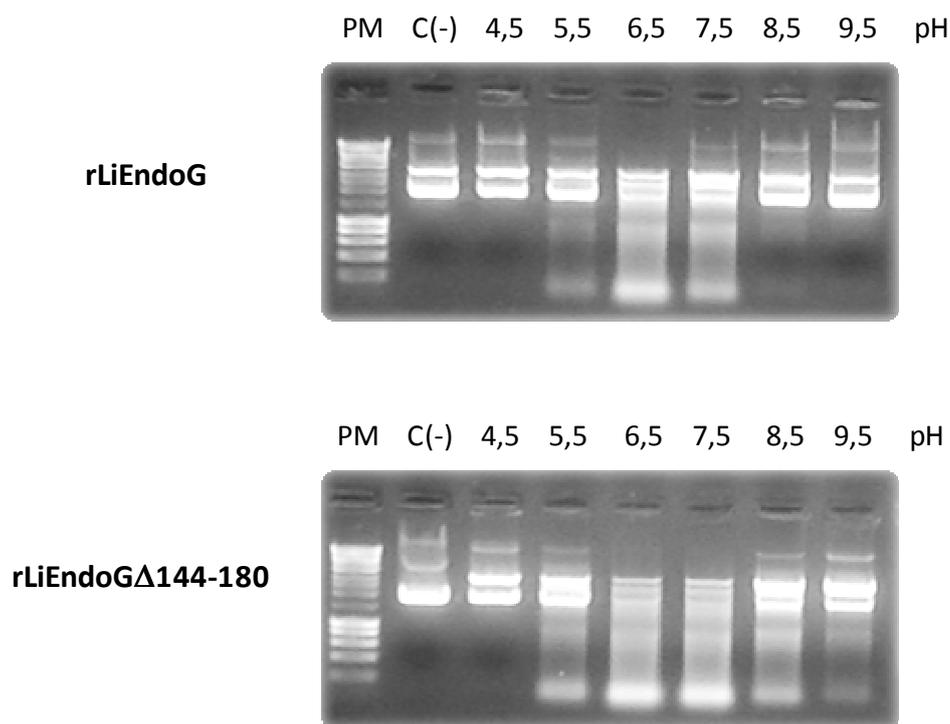
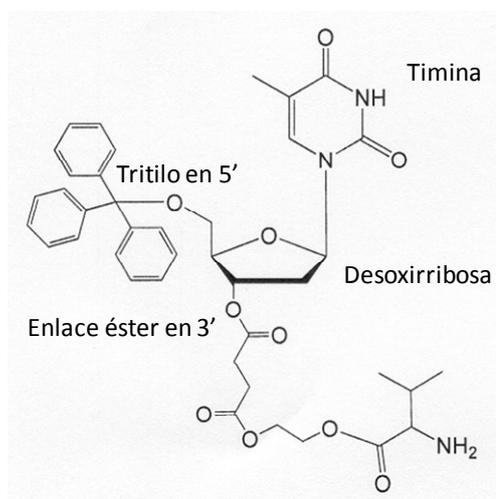


Figura 38. rLiEndoG Δ 144-180 y rLiEndoG presentan diferencias en su actividad en función del pH. 1 μ g de plásmido fue digerido en presencia de 0,2 μ g de rLiEndoG o rLiEndoG Δ 144-180 en tampón AcNa 10mM, Mes 10mM y Tris 20mM a distintos pHs (4,5-9,5) durante 1h a 37°C. Como control se utilizó plásmido sin digerir, C(-). Los productos de la digestión fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1% y visualizados bajo luz UV.

El compuesto LEI-49 inhibe la actividad de rLiEndoG

En los últimos años nuestro laboratorio ha puesto a punto un protocolo de cribado de compuestos procedentes de diversos laboratorios de síntesis, con el objetivo de encontrar algún compuesto con actividad leishmanicida y baja citotoxicidad (bajos efectos adversos en las células del hospedador mamífero). Para ello, se han testado dichos compuestos tanto en la forma promastigote como en la forma amastigote de *Leishmania*, en líneas celulares hospedadoras (estudios de citotoxicidad), y estudios de actividad anti-*Leishmania* en células hospedadoras infectadas con amastigotes. Para determinar el porcentaje de muerte de los parásitos en cultivo,

se realizaron ensayos de incorporación de yoduro de propidio tras el tratamiento con los distintos compuestos. Algunos de estos compuestos resultaron ser muy eficaces, presentando un alto efecto leishmanicida y baja citotoxicidad. Es por ello que nuestra curiosidad nos llevó a testar aquellos compuestos que eran más efectivos con algunas de las líneas transgénicas de *L. infantum* creadas en nuestro laboratorio, y entre las cuales se encuentra la línea que sobre-expresa *LiendoG*. Sorprendentemente, algunos de los compuestos resultaron ser menos eficaces a la hora de matar a los parásitos que sobre-expresan *LiendoG*, en comparación con los resultados obtenidos al tratar los parásitos silvestres. Dichos compuestos son análogos de nucleósidos que habían sido descritos con anterioridad como inhibidores de la timidina-quinasa (188). Su actividad anti-*Leishmania* parece requerir la presencia de un grupo tritilo en la posición 5' del nucleósido y un enlace éster en la posición 3', según estudios de relación estructura-actividad realizados en nuestro laboratorio en colaboración con el laboratorio de síntesis. Un ejemplo de estos compuestos optimizados es el compuesto LEI-49, análogo de timidina cuya estructura se puede observar en el siguiente esquema:



En la Figura 39 se demuestra que los parásitos que sobre-expresan *LiendoG* son más resistentes a la muerte por acción de el compuesto LEI-49 que los parásitos transfectados con el vector vacío, según se deduce del análisis del número de parásitos que han incorporado yoduro de propidio.

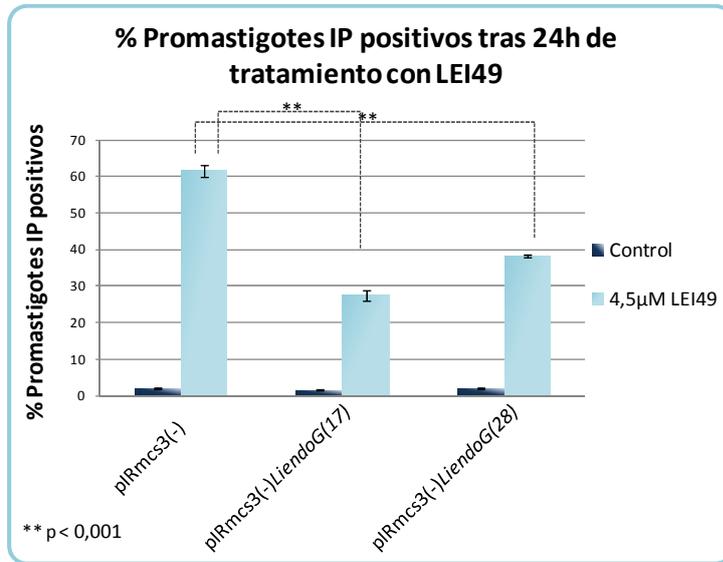
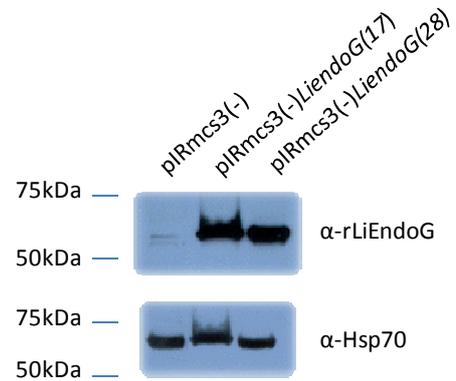
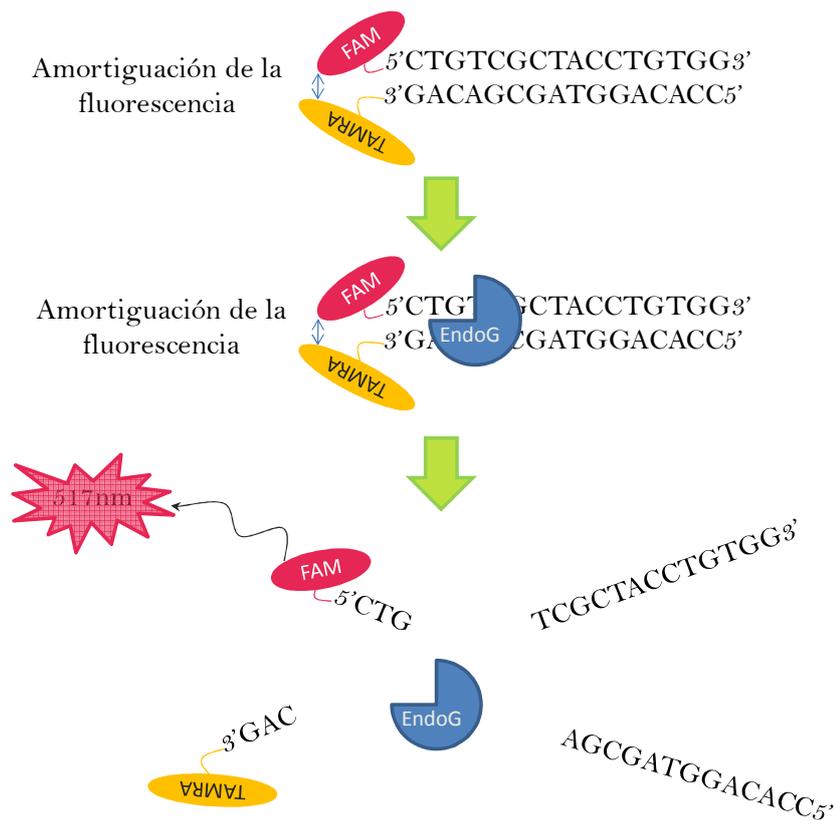
A**B**

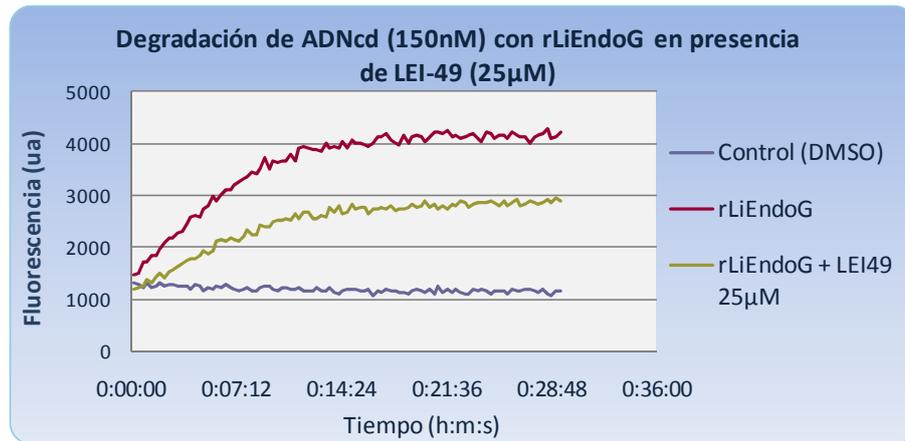
Figura 39. La sobre-expresión de *LiendoG* protege de la muerte inducida por el compuesto LEI-49. A) 2×10^6 promastigotes transfectados con el vector vacío pIRmcs3(-) y dos clones transfectados con la construcción pIRmcs3(-)*LiendoG* fueron tratados durante 24h con el compuesto LEI49 a una concentración de $4,5 \mu\text{M}$. El porcentaje de parásitos IP positivos fue medido mediante citometría de flujo. B) Inmuno-blot de lisados de parásitos transfectados con el vector pIRmcs3(-) y dos clones transfectados con la construcción pIRmcs3(-)*LiendoG* frente al anticuerpo monoclonal α -rLiEndoG. Control de carga realizado con el anticuerpo policlonal Hsp70 (1:5000).

Este resultado nos llevó a pensar que esta clase de compuestos pudiesen estar interfiriendo de alguna manera con la actividad de LiEndoG. Por ello, realizamos un ensayo de actividad con rLiEndoG sobre ADN de cadena doble (ADNcd) en presencia del compuesto LEI-49. Para obtener una sonda fluorescente de cadena doble, hibramos dos oligonucleótidos reversos y complementarios, marcando uno de ellos en el extremo 5' con el fluoróforo TAMRA, y el otro en el extremo 3' con el fluoróforo FAM, de tal forma que al hibridar ambos oligos, TAMRA bloquea la fluorescencia emitida por FAM. Cuando rLiEndoG digiere la doble hebra, las cadenas se separan y TAMRA se distancia de FAM, dejando de bloquear su fluorescencia, como se muestra en el siguiente esquema:

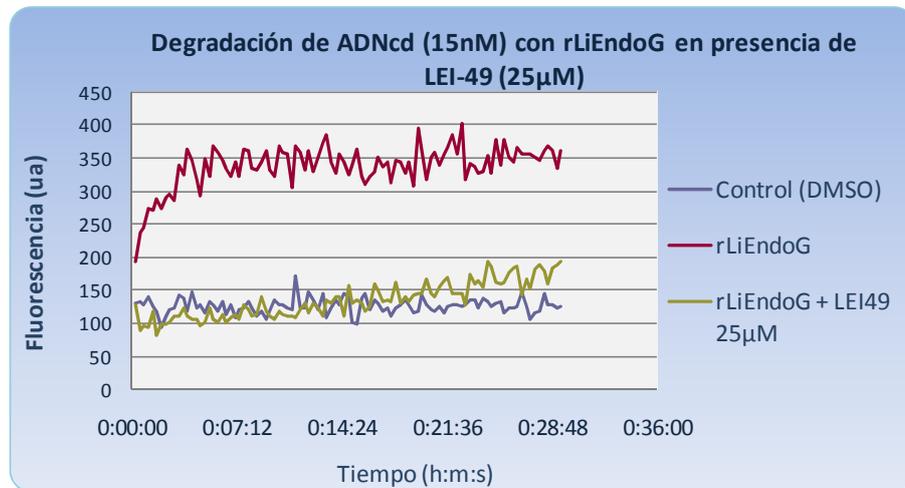


Al digerir el ADNcd con rLiEndoG en presencia de LEI-49, observamos que el compuesto produce una inhibición de la actividad nucleasa, que es inversamente proporcional a la cantidad de ADN presente en la reacción (Figura 40.A, ADN 150nM y 40.B, ADN 15nM). A la vista de estos resultados, nos preguntamos si el compuesto LEI-49 sería capaz de inhibir la actividad de otras nucleasas, y para ello realizamos una digestión de la sonda de doble cadena con la endonucleasa ADNasaI en presencia del compuesto. Como se muestra en la Figura 40.C, el compuesto LEI-49 no inhibe en absoluto la actividad de la ADNasaI. Este resultado confirma además que el compuesto no presenta ningún tipo de actividad amortiguadora de la señal fluorescente que pudiera estar interfiriendo con el ensayo.

A



B



C

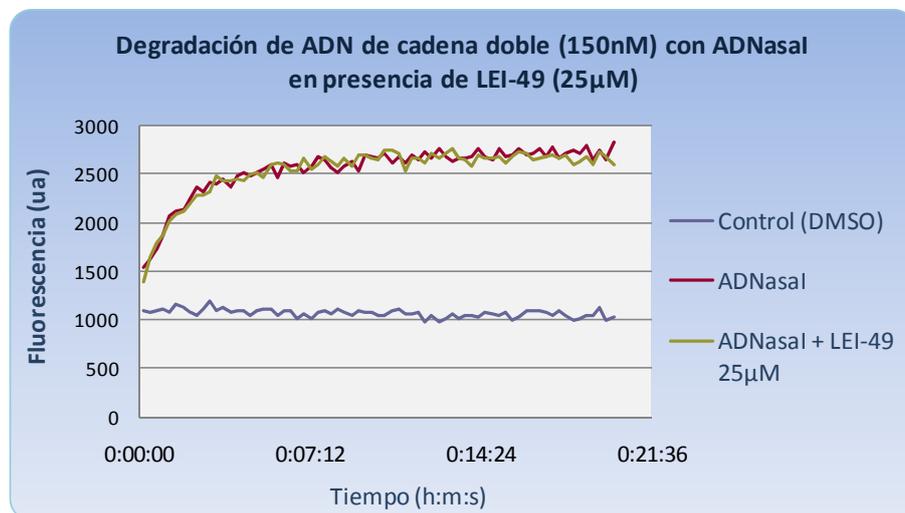


Figura 40. El compuesto LEI-49 inhibe la actividad de rLiEndoG pero no la de la ADNasal. Detección mediante fluorimetría de: A) Digestión de ADNcd (150nM) con 0,21µg de rLiEndoG en presencia del compuesto LEI-49. B) Digestión de ADNcd (15nM) con 0,21µg de rLiEndoG en presencia del compuesto LEI-49. C) Digestión de ADNcd (150nM) con 20U de ADNAsal en presencia del compuesto LEI-49.

Discusión

“He who asks is a fool for five minutes, but he who does not ask remains a fool forever”.

Chinese Proverb

DISCUSIÓN

EndoG: la primera proteína efectora del proceso apoptótico descrita en tripanosomátidos

Como hemos comentado en la introducción de esta tesis, la MCP en metazoos es un proceso bien caracterizado que tiene una función clave tanto en el desarrollo del organismo, regulando procesos de morfogénesis y diferenciación sexual, como en la vida adulta permitiendo la homeostasis de los tejidos, la eliminación de células dañadas o anormales y como defensa contra las infecciones. Sin embargo, la presencia de fenotipos que se corresponden con procesos de MCP en organismos unicelulares ha sido motivo de controversia durante mucho tiempo, si bien es cierto que el alto número de estudios realizados al respecto durante los últimos años ha llevado a la aceptación de su existencia y al reconocimiento de su relevancia. De todos modos, todavía queda mucho camino para la completa comprensión de este proceso y son pocos los factores involucrados en el mismo que han sido descritos en organismos unicelulares.

Los avances en la secuenciación completa de diversos genomas de protozoos han permitido la búsqueda de secuencias de ADN que puedan codificar proteínas similares a aquellas relacionadas con procesos de MCP en organismos superiores. La búsqueda de genes implicados en el proceso de autofagia en tripanosomátidos ha sido fructífera y se han encontrado varios homólogos a genes ATG (genes relacionados con autofagia), si bien parece que el número de genes involucrados en autofagia es mucho más limitado en estos parásitos que, por ejemplo, en levaduras, las cuales cuentan con hasta 31 genes ATG (97). Estos genes han sido objeto de estudio durante los últimos años y se ha comprobado su especial relevancia en la diferenciación y adaptación a los cambios sufridos durante el ciclo de vida de tripanosomátidos. Estos parásitos, por otra parte, constituyen un modelo sencillo que podría ayudarnos a la mejor comprensión del proceso autofágico en eucariotas superiores (189-191).

Por otra parte, durante la búsqueda de genes implicados en el proceso apoptótico en tripanosomátidos, no ha sido posible encontrar ningún gen con secuencia similar a aquellos que codifican para proteínas de la familia Bcl-2, que como hemos comentado previamente son las principales reguladoras del proceso apoptótico en metazoos. Tampoco se han encontrado homólogos para los genes codificantes de caspasas, otra familia de proteínas con un importante papel en la muerte por apoptosis. Sin embargo, la demostración de que promastigotes transfectados con la secuencia codificante de la proteína Bcl-X_L humana son más resistentes a la muerte por choque térmico (192) (estímulo fisiológico que cursa con un fenotipo apoptótico en *Leishmania* (93)), la detección de actividad proteasa similar a caspasas (101,107) y el hecho de que los inhibidores de caspasas sean capaces de modular la respuesta celular de este parásito a diversos estímulos de muerte (105,107,193), sugiere que algunos de los factores implicados en los procesos similares a apoptosis observados en *Leishmania* deben ser análogos a factores ya descritos en otros organismos. De hecho, la comparación de secuencias con un amplio espectro de organismos ha permitido la identificación en el genoma de distintas especies de *Leishmania*, de genes que muestran un alto grado de similitud con los genes de metacaspasas. Los productos de estos genes interfieren con la regulación del ciclo celular (112), producen un incremento de la sensibilidad de los parásitos a la muerte inducida por peróxido de hidrógeno (114) e incluso pueden reemplazar a una metacaspasa de levaduras (113), pero no parecen estar directamente relacionados con la actividad similar a caspasas previamente mencionada.

Mientras que la búsqueda de genes implicados en la regulación de la muerte similar a apoptosis en el parásito parece por el momento una tarea más complicada, el análisis de los genomas de protozoos sí ha permitido la identificación de genes codificantes para putativas proteínas efectoras, basándose en su similitud de secuencia con sus homólogos en metazoos. Este es el caso de la EndoG de *L. infantum* (LiEndoG), cuyo alto grado de similitud con las secuencias de Endonucleasas G de otros organismos la convirtió en una gran candidata para

el estudio de proteínas implicadas en los procesos similares a apoptosis observados en el parásito.

LiEndoG se localiza en la mitocondria de los parásitos sanos, pero se transloca al núcleo bajo un estímulo apoptótico

Una de las principales características de las Endonucleasas G es su localización en el interior de la mitocondria, adonde son transportadas gracias a un péptido señal presente en su extremo amino terminal (138). Al analizar la secuencia de LiEndoG utilizando el algoritmo de predicción de señales de localización mitocondrial del programa MITOPROT, se obtuvo una secuencia putativa correspondiente a 25 aminoácidos. Esta secuencia es completamente distinta a la del péptido señal de la EndoG de mamíferos, y también distinta a la codificante para el péptido señal de la ARNasa HIIC de *Leishmania*, proteína de conocida localización mitocondrial en el parásito (176). A pesar de estas diferencias, los primeros 40 aminoácidos de LiEndoG son suficientes para localizar a la proteína eGFP en la mitocondria del parásito. Dicha localización se confirmó para la fusión de la secuencia codificante completa de LiEndoG con eGFP, así como para la proteína endógena.

La edelfosina y la miltefosina son derivados de alquil-fosfolípidos capaces de inducir un proceso similar a apoptosis en *Leishmania* (103,104). Por esa razón utilizamos ambos fármacos para seguir los posibles cambios en la distribución de LiEndoG bajo un estímulo apoptótico. Al igual que sucede con otras Endonucleasas G descritas (82,140), nuestros resultados demuestran que LiEndoG migra al núcleo durante el proceso apoptótico. El hecho de que, tras el tratamiento con edelfosina y miltefosina, se observe un mayor número de parásitos TUNEL positivos en los parásitos que sobre-expresan *LiendoG* indica que la proteína participa en los procesos de degradación del ADN nuclear característicos de la muerte similar a apoptosis que se produce en el parásito. Se trata por tanto de la primera proteína efectora involucrada en el proceso similar a apoptosis observado en *Leishmania* que se ha caracterizado hasta la fecha.

La variación en los niveles de expresión de LiEndoG afecta al crecimiento celular y a la supervivencia de los promastigotes de *L. infantum*

Nuestros resultados indican que la sobre-expresión de *LiendoG* en los promastigotes no parece tener ningún efecto sobre el crecimiento normal de los parásitos. Sin embargo, como hemos mencionado en el apartado anterior, tras el tratamiento con un estímulo de muerte el número de parásitos TUNEL positivos es mayor en el caso de los parásitos que sobre-expresan *LiendoG* que en los parásitos transfectados con el vector vacío. En este mismo sentido, cuando eliminamos una de las copias del gen que codifica LiEndoG y, en consecuencia, reducimos la concentración de dicha proteína en los parásitos, observamos que el tratamiento con edelfosina da lugar a un menor número de parásitos TUNEL positivos. Un resultado análogo ha sido descrito muy recientemente para la EndoG de *L. donovani* tras tratamiento con peróxido de hidrógeno (194).

Nuestros resultados demuestran la existencia de un crecimiento más lento en condiciones normales de cultivo en aquellos clones en los que se ha producido la delección de uno de los alelos del gen de copia única de EndoG existente en *L. infantum*. Nuestros intentos por tratar de obtener parásitos con ambas copias del gen delecionadas fueron infructuosos dado que condujeron a la muerte de todos los parásitos tras el tratamiento con los dos antibióticos empleados para seleccionar los individuos portadores de la delección. Estos resultados sugieren que la eliminación de LiEndoG en *L. infantum* es letal. Sin embargo, los resultados mostrados por Gannavaram y colaboradores (194) mediante silenciamiento de la expresión de EndoG por ARNi, no parecen indicar ningún efecto en respuesta a la reducción de los niveles de EndoG en el crecimiento de *Trypanosoma brucei*, parásito perteneciente a la misma familia que *Leishmania*.

Por lo tanto, según nuestros resultados. LiEndoG estaría interviniendo no solo durante el proceso similar a apoptosis observado en el parásito, sino que también podría estar jugando un papel pro-vida, de modo similar al descrito para su homóloga en levaduras, Nuc1p (140). El efecto de la depleción de EndoG sobre el

crecimiento de los parásitos, conjuntamente con los resultados mostrados previamente acerca de su actividad endo-exonucleasa, sugieren la idea de su posible implicación en procesos de reparación, replicación y recombinación del ADNk. Un posible papel en la recombinación del ADN mitocondrial también ha sido sugerido para explicar la ralentización (140) y la eliminación selectiva de células poliploides durante el crecimiento exponencial en levaduras causado por la delección de Nuc1p (195). Así mismo, también se le han atribuido funciones relacionadas con reparación, recombinación o replicación del ADN mitocondrial a otras EndoGs presentes en organismos como *Drosophila*, *C. elegans*, y en mamíferos, tras numerosos experimentos realizados *in vitro* y de los cuales hemos hecho un amplio resumen en la introducción de esta tesis (128,138,146,148-152). Sin embargo, estas funciones pro-vida de EndoG están pendientes de una confirmación definitiva *in vivo*, pues por ejemplo, los resultados acerca de la importancia de la eliminación de EndoG en la supervivencia de ratones son contradictorios. Como mencionamos en la introducción de esta tesis, es importante mencionar que el gen de EndoG en ratones se encuentra solapado con otro gen de función desconocida. Los grupos que no han conseguido ver ninguna clase de fenotipo en estos animales, se limitan a eliminar solamente el gen que codifica para EndoG (141,142); por el contrario, en el trabajo en el cual se describe la muerte de los ratones por efecto de la supresión de EndoG, ambos genes han sido eliminados (143). Este último trabajo concuerda con los resultados que indican que la disminución de los niveles de EndoG por ARNi en células de mamífero causa un defecto de la proliferación celular (135). Por lo tanto, merece la pena ahondar en el estudio del posible papel que EndoG está ejerciendo en la mitocondria de *Leishmania*, con el fin de explicar por qué parece ser una proteína importante para el crecimiento del parásito en condiciones normales de cultivo y, simultáneamente, para la muerte celular ante un estímulo apoptótico.

Caracterización molecular de LiEndoG

Construcción y análisis de un modelo estructural para LiEndoG

Una vez conseguimos el producto del gen que codifica la supuesta LiEndoG, nos dispusimos a construir un modelo tridimensional de la proteína para comprender su estructura y caracterizar los principales residuos implicados en el mecanismo catalítico. Las predicciones de los elementos de estructura secundaria y el patrón de plegamiento global sugirieron de forma inequívoca que LiEndoG es estructuralmente homóloga a otras EndoGs previamente caracterizadas en diversos organismos y forma parte de la superfamilia de nucleasas que presentan un motivo $\beta\beta\alpha$ de unión a un catión metálico. Más aún, fue posible obtener dos modelos tridimensionales de LiEndoG tomando como moldes las estructuras cristalográficas de las nucleasas de *Serratia marcescens* y NucA de *Anabaena* sp., así como de la Endonucleasa G de *Drosophila melanogaster* (DmEndoG), cristalizada más recientemente. LiEndoG guarda una manifiesta homología general con estas otras proteínas y comparte con ellas el característico motivo DRGH, considerado el principal responsable de la catálisis (133), con la salvedad de que el Asp (D) se encuentra reemplazado en *Leishmania* por una Ser (S211 en *L. infantum*). Esta sustitución se encuentra conservada en todos los tripanosomátidos (194).

Una primera inspección visual de nuestro modelo con el fin de explicar el porqué del reemplazamiento de un Asp tan conservado en otras especies por una Ser nos llevó a pensar que el grupo hidroxilo de la S211 de LiEndoG podría estar interviniendo en el apoyo estructural de la cadena lateral de la Asn catalítica (Asn246), encargada de coordinar al catión metálico. Sin embargo, cuando realizamos la mutación S211A, la proteína mutante mostró una actividad prácticamente idéntica a la de la proteína silvestre. Considerando que, debido a su pequeño tamaño y a su carácter apolar, la cadena lateral de la Ala incorporada no podría servir de soporte a la Asn246, los resultados parecen indicar que el papel de la Ser211 en la actividad catalítica no es muy relevante. Por lo tanto, esa función

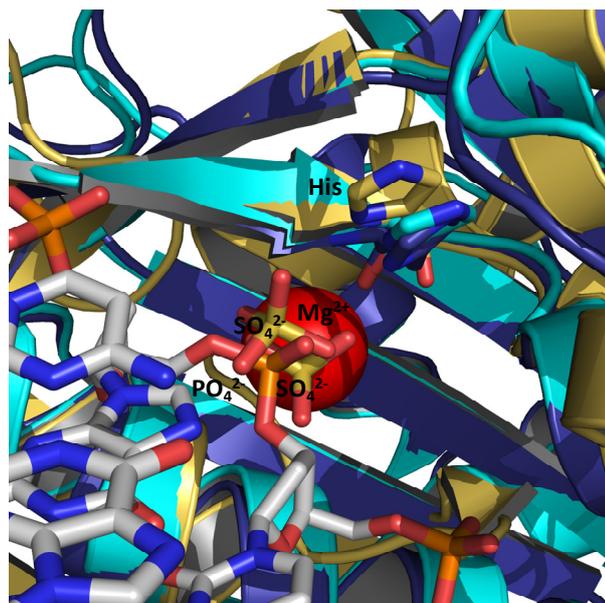
de soporte a la Asn catalítica, si realmente existe, estaría desempeñada en *L. infantum* por otros residuos de la proteína.

Con objeto de reconstituir el característico motivo DRGH en LiEndoG, mutamos la Ser²¹¹ a Asp (rLiEndoG-S²¹¹D). Sorprendentemente, esta enzima mutante pierde gran parte de su actividad. Al analizar la estructura de aquellas EndoGs que presentan el dominio DRGH, observamos que el Asp está siendo reconocido o bien por una Arg (como por ejemplo, en *Drosophila melanogaster*), o bien por una Gln (sirva como ejemplo la endonucleasa de *Serratia marcescens*). Este reconocimiento parece ser importante para que se produzca la distorsión de una hélice que está encargada de la correcta orientación de la Asn catalítica y que debe exponer al sitio activo un grupo carbonilo del esqueleto peptídico. Por tanto, según nuestra interpretación, esta interacción entre el Asp del dominio DRGH y la Arg de la hélice que constituye una de las paredes del centro activo es esencial para constituir la arquitectura óptima del sitio activo que permite efectuar la catálisis en la EndoG de *Drosophila melanogaster*. Nuestro modelo predice una organización global del centro activo de LiEndoG muy similar al de las otras nucleasas de la superfamilia, si bien está ausente la interacción Asp/Arg descrita anteriormente. Dada la aparente relevancia de la distorsión de la hélice que contiene la Asn catalítica, postulamos que en el caso de LiEndoG existen una serie de residuos apolares próximos al sitio catalítico que se encargan de forzar esta conformación activa. Esta interpretación nos permite explicar el drástico efecto de la introducción de un grupo cargado negativamente como el Asp en sustitución del hidroxilo de la Ser en el motivo SRGH y se ve apoyada por el hecho de que sea posible restaurar la actividad de la nucleasa tras una segunda mutación de la Ala²⁴⁷ por una Arg en el doble mutante LiEndoG-S²¹¹D/A²⁴⁷R. La aparente ausencia de función de la Ser²¹¹ choca con su elevado grado de conservación en esta posición en tripanosomátidos. Vista la drástica pérdida de actividad tras su sustitución por un Asp, es posible hipotetizar que su conservación en tripanosomátidos se asocie a su capacidad para poder ser fosforilada y, de esta manera, comportarse de forma análoga a como lo hace el Asp en la versión

mutante de la proteína, permitiéndose así una inhibición de la actividad enzimática por fosforilación.

Por otro lado, el grupo guanidinio cargado positivamente de la Arg212 presente en el motivo SRGH está seguramente implicado en la unión directa a un grupo fosfato del sustrato oligonucleotídico, ya que rLiEndoG pierde su actividad cuando sustituimos dicha Arg por una Ala. El análisis de la estructura de LiEndoG revela una función similar para la Arg185.

Por otra parte, la His214 del motivo (D/S)RGH también resulta clave para la actividad nucleasa de LiEndoG debido a su unión mediante puente de hidrógeno a una de las aguas que forman parte de la esfera de coordinación del Mg^{2+} y que podría, tras su activación, estar directamente implicada en la ruptura del enlace fosfodiéster. De hecho, tanto en el cristal de NucA de *Anabaena* sp. (169) como en el de la endonucleasa de *Serratia marcescens* (168) aparece un ión sulfato situado entre la His catalítica equivalente y el catión metálico (Figura 41), lo cual nos llevó a pensar que el lugar de ese sulfato podría ser ocupado por los grupos fosfato del oligonucleótido sustrato a degradar. Esta suposición se confirma al observar la estructura de la nucleasa Vvn de *V. vulnificus*, que fue cristalizada formando complejo con una doble hebra de ADN (163). Como se muestra en la Figura 41, los grupos sulfato de las nucleasas de *Anabaena* y *S. marcescens* se superponen espacialmente con uno de los grupos fosfato del oligonucleótido cristalizado con Vvn.



NucA *Anabaena* sp.
Endonuclease *S. marcescens*
Nuclease Vvn *V. vulnificus*

Figura 41. Detalle de la superposición de las estructuras de las nucleasas de *Anabaena* sp., *S. marcescens* y *V. vulnificus*. Los grupos sulfato de las estructuras de las nucleasas de *Anabaena* sp. y *S. marcescens* coinciden en el espacio y se ubican en el lugar ocupado por el fosfato del ADN cristalizado con la nucleasa Vvn de *V. vulnificus*. Las histidinas catalíticas de las tres nucleasas también coinciden en el espacio.

Possible catalytic mechanism of LiEndoG

Después del análisis de los principales residuos que forman parte del centro activo de LiEndoG, y tras considerar los mecanismos de catálisis propuestos para la endonuclease de *S. marcescens* por Shlyapnikov *et al.* (2000) (168), Miller *et al.* (1999) (167) y Friedhoff *et al.* (2009) (196), y para la nucleasa NucA de *Anabaena* sp. (169) podemos postular algunos detalles del mecanismo catalítico: la His214 se comporta como una base general por medio del nitrógeno (ND1) de su anillo de imidazol que abstrae un protón de una de las aguas de coordinación del ión magnesio. El átomo de oxígeno del grupo HO⁻ resultante es capaz de atacar y formar un enlace con el fósforo del grupo fosfato que va ser hidrolizado, dando lugar así al estado de transición de la reacción, que es estabilizado por el guanidinio de la Arg185 y evoluciona hacia los productos con extremos 5'-fosfato y 3'-OH. El posible mecanismo catalítico de LiEndoG queda resumido en la Figura 42.

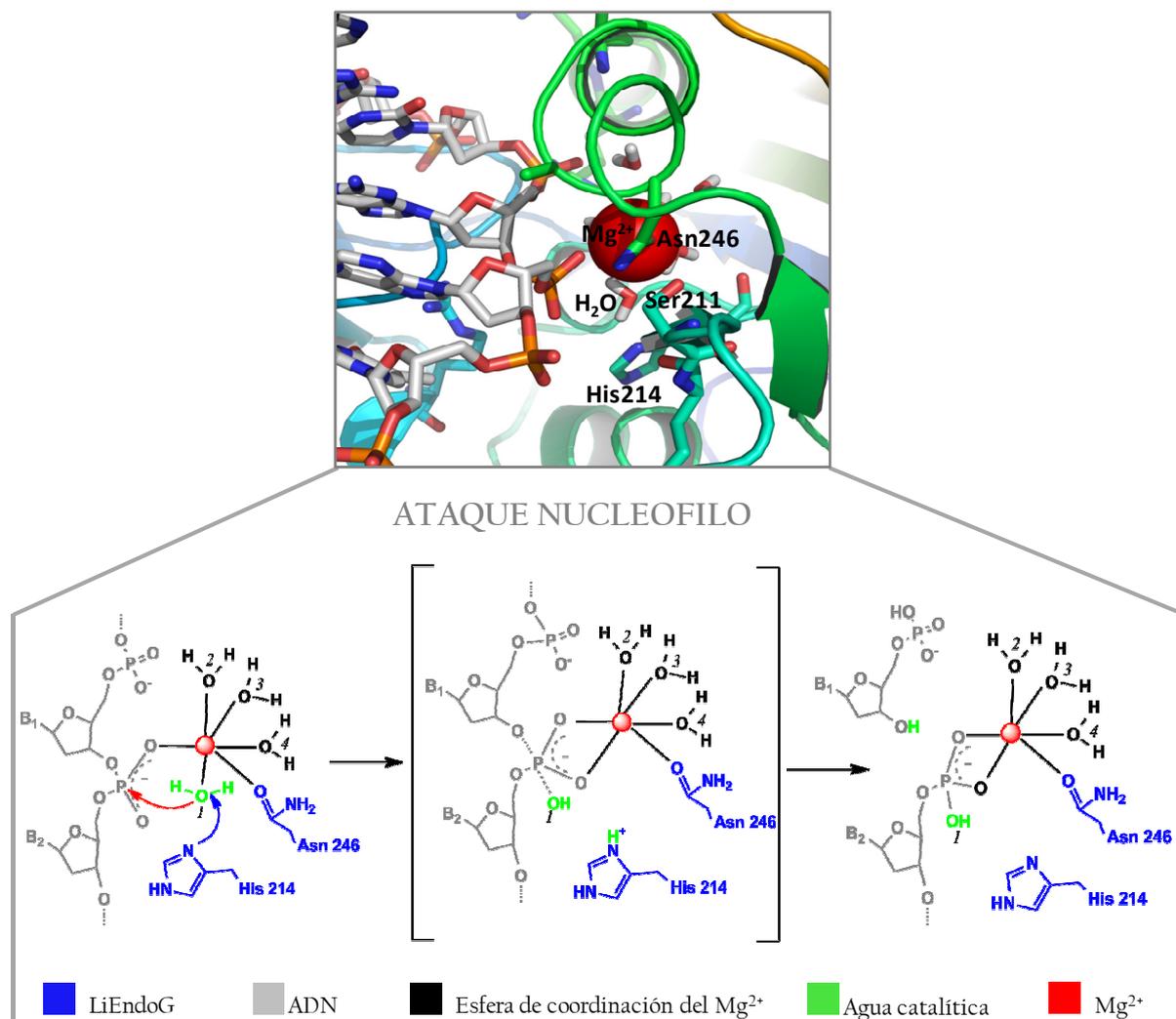


Figura 42. Mecanismo propuesto para el ataque nucleofilo de LiEndoG sobre el ADN. En la figura se muestran los aminoácidos esenciales de LiEndoG implicados en la catálisis. El agua de coordinación que actúa como agua catalítica tras ser activada por la His214 se encuentra destacada en verde. El estado de transición de la reacción se encuentra representado entre corchetes [].

Possible regulation of LiEndoG by oxidation/reduction of its thioles/disulfide bridges

The treatment with β -ME produces the inactivation of LiEndoG. Similar results have been described for the extracellular nucleases of *Serratia marcescens* (172) and *Vibrio vulnificus* (173). Both bacterial nucleases present mechanisms of

activación basados en la formación de puentes disulfuro, y la ruptura de dichos puentes puede conducir a su inactivación. Cuando construimos el modelo de LiEndoG basándonos en la estructura resuelta experimentalmente de DmEndoG, observamos la posibilidad de formación de un puente disulfuro entre la Cys100 y la Cys116 de la nucleasa del parásito. Como hemos mostrado en los resultados, dicho puente se encuentra situado en una región espacialmente equivalente a la del puente disulfuro descrito como fundamental para la regulación de la actividad de la endonucleasa de *S.marcescens*. Por lo tanto, la reducción de este puente disulfuro en LiEndoG podría ser la responsable de la pérdida de actividad observada cuando adicionamos β -ME a la reacción de digestión llevada a cabo por rLiEndoG. Esta posible regulación de la actividad de LiEndoG en función del estado de oxidación de esta pareja de cisteínas podría permitir la adaptación de la actividad de la nucleasa a los niveles de estrés oxidativo presentes en la célula. De hecho, en el caso de la EndoG humana, se ha podido demostrar que la actividad de la enzima correlaciona directamente con los niveles de consumo de oxígeno por las mitocondrias y, por tanto, presumiblemente con la tasa de daño oxidativo en el ADNmt. (150).

Caracterización de la actividad nucleasa de rLiEndoG

Una vez purificada, observamos que rLiEndoG presenta actividad endonucleasa, tal y como se deduce de su capacidad para digerir un plásmido superenrollado. Además, la actividad nucleasa de rLiEndoG puede ser inhibida por acción del ATA, ácido que compite con el ADN por unirse al sitio activo de nucleasas (170), (171). Así mismo, la actividad de rLiEndoG depende de diversos factores, como son la presencia de distintos iones y el pH:

- **Iones:**

Al igual que se ha descrito para las Endonucleasas G de otros organismos (130,131) nuestros resultados demuestran que la actividad de la LiEndoG depende de la presencia de cationes como Mg^{2+} , Mn^{2+}

o Co^{2+} , y se inhibe con concentraciones moderadas de K^+ (150mM), algo superiores de Na^{2+} (300mM), así como con Ca^{2+} . Si tenemos en cuenta que la concentración de K^+ existente en promastigotes sanos es de 140mM (193), podemos postular que la actividad de LiEndoG debe estar inhibida en condiciones normales de crecimiento. En el mismo trabajo, Sen *et al.* (2004) describen también una caída de los niveles de K^+ a 60mM 3,5h después del tratamiento con camptotecina, fármaco capaz de producir un fenotipo similar a apoptosis en los parásitos. Considerando que, según nuestros resultados, la actividad de LiEndoG está solo débilmente inhibida a 75mM, se puede postular que este cambio en la concentración del K^+ podría estar contribuyendo a la activación de la proteína durante el proceso similar a apoptosis.

- **pH:**

Nuestros resultados demuestran que rLiEndoG presenta un pH óptimo de 6,5, similar al descrito para otras Endonucleasas G (127,131). Sen *et al.* (2004) también describen una disminución del pH desde 7,4 a 6,8 en los parásitos tras ser tratados con camptotecina. De nuevo, cabe postular una posible regulación de la actividad de la nucleasa en función del pH celular, que alcanza valores muy cercanos a los óptimos para LiEndoG durante el proceso de muerte descrito.

El análisis de los patrones de digestión de rLiEndoG sobre plásmidos superenrollados indica que su actividad inicial sobre los mismos consiste en la relajación de la forma superenrollada, dando lugar a la aparición de moléculas circulares abiertas. Solo en presencia de altas concentraciones de nucleasa es posible detectar la aparición de formas lineales. Nuestros resultados sugieren que LiEndoG no es capaz de generar dos cortes próximos en ambas hebras que permitirían la linearización del plásmido (como en el caso de la actividad de una enzima de restricción), sino que corta de forma aleatoria las dos cadenas y la

linearización sólo ocurre cuando se han generado suficientes cortes independientes en cada una de las cadenas como para que el apareamiento de bases ya no sea suficiente para mantener la estructura de doble hélice. Nuestros resultados son similares a los observados en el caso de DmEndoG (137). En el cristal de esta proteína se observa que los dos sitios activos correspondientes a cada uno de los monómeros que la forman se disponen de tal modo que no serían capaces de procesar oligonucleótidos de doble cadena de forma simultánea sin que se produjese una gran curvatura del ADN. Esta misma conclusión se extrae del análisis de nuestro modelo al representar LiEndoG como un dímero (Figura 43), si bien todavía no ha sido demostrado que la nucleasa de *Leishmania* esté en forma dimérica.

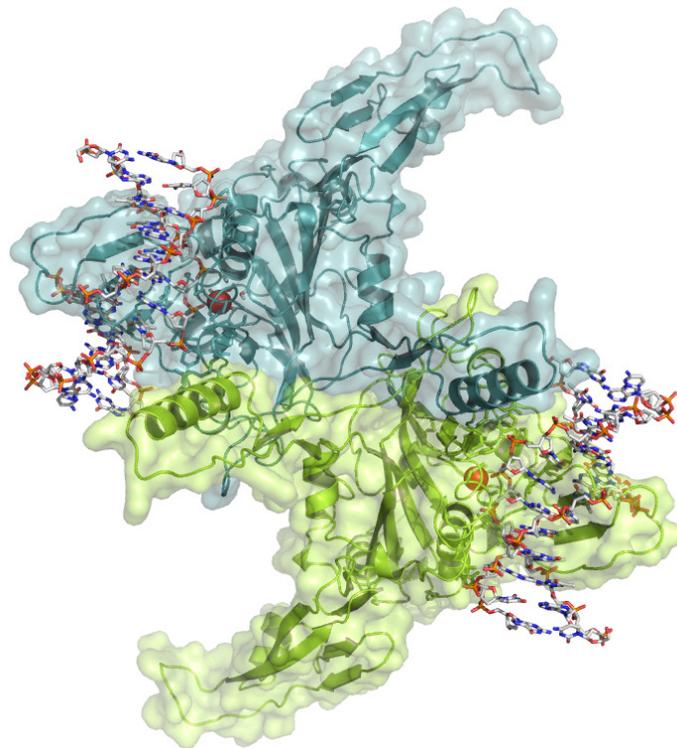


Figura 43. Modelo de LiEndoG en forma dimérica. Si bien todavía no se ha demostrado que LiEndoG sea un dímero, al representarla como tal en el modelo, cada uno de los monómeros de la enzima (en verde y azul) procesaría distintas hebras de ADN de forma independiente.

Si bien las EndoGs de metazoos presentan actividad exclusivamente endonucleasa, se ha podido comprobar que su homóloga en levaduras (Nuc1p) muestra tanto actividad endonucleasa como exonucleasa (197). Nuestros resultados indican que rLiEndoG muestra una clara preferencia en la generación de cortes cercanos al extremo 5' de una de las cadenas de una molécula lineal de ADN, lo que demuestra la existencia de una actividad exonucleasa. Por tanto rLiEndoG es una endo-exonucleasa. De la doble digestión con rLiEndoG y ExoT7 se deduce que nuestra enzima libera de forma preferente oligonucleótidos siendo aparentemente incapaz de liberar mononucleótidos.

Recientemente se ha caracterizado la presencia en humanos de EXOG, una endo-exonucleasa mitocondrial. Estudios filogenéticos sugieren la generación de una duplicación génica en la línea evolutiva que ha conducido a la aparición de los animales, una vez que éstos se separaron de la línea que ha generado los actuales hongos. Esta duplicación génica y posteriores mutaciones habrían permitido la existencia de las dos enzimas en humanos. En mamíferos, EndoG solamente presenta actividad endonucleasa, la cual es suficiente para intervenir en el proceso de degradación del ADN genómico durante la apoptosis. Teniendo en cuenta que los resultados que implican a EndoG en un papel pro-vida en mamíferos son en ocasiones contradictorios, como hemos comentado previamente (141-143), se ha sugerido la posibilidad de que EXOG pudiera desempeñar aquellas funciones que dependen de la actividad exonucleasa: recombinación, replicación y reparación del ADN mitocondrial (147). Es interesante señalar que EXOG, al igual que LiEndoG, presenta también una Ser en lugar del típico Asp en el característico motivo S/DRGH. Ambas nucleasas presentan también un extremo C-terminal unos 70 aminoácidos más largo que el de la EndoG humana. Todas estas similitudes, podrían apoyar la teoría de que LiEndoG estuviese desempeñando en *Leishmania* las funciones que en mamíferos estarían repartidas entre EndoG y EXOG, pero evidentemente, todavía queda mucho que investigar al respecto para poder determinar si esto es así.

LiEndoG presenta un posible dominio de autoinhibición

Cuando eliminamos de la secuencia de LiEndoG una inserción rica en residuos de carácter ácido que no está presente en otras EndoGs de organismos más evolucionados, y que hemos hipotetizado que podría constituir un dominio de autoinhibición, comprobamos que a pHs básicos la nucleasa con este segmento delecionado (rLiEndoG Δ 144-180) es más activa que la proteína silvestre. Este cambio parece bastante significativo si consideramos que por el ensayo de fluorimetría (el cual no se pudo utilizar para testar la actividad a distintos pHs porque tanto los pHs ácidos como los altos desestabilizaban la sonda de ADN a digerir), tanto la nucleasa silvestre como rLiEndoG Δ 144-180 presentan la misma actividad. Estas diferencias podrían indicar que a pHs altos, los residuos ácidos del posible dominio de autoinhibición estarían desprotonados y, por lo tanto, dicha región podría interactuar con el sitio activo, mimetizando a la cadena polianiónica del oligonucleótido sustrato y bloqueando la actividad enzimática. Al bajar el pH, los residuos se irían protonando y este segmento polipeptídico cambiaría su conformación perdiendo afinidad por el sitio activo, que quedaría así accesible al sustrato polinucleotídico. En el caso de rLiEndoG Δ 144-180, este posible mecanismo de regulación no ocurriría al no existir tal región, por lo que el centro activo podría interactuar con el ADN y proceder a su digestión a pHs más elevados. Por lo tanto, cabe la posibilidad de que exista un mecanismo de auto-regulación que impediría a la nucleasa degradar el ADN del parásito en condiciones normales. Al producirse un estímulo de muerte y con éste la bajada del pH celular, la proteína podría ser activada, si bien probablemente existan muchos otros factores implicados en este mecanismo de regulación. La falta de regulación por ausencia de la posible región de autoinhibición explicaría por qué una gran proporción de los parásitos electroporados con rLiEndoG Δ 144-180 mueren al expresarla sin necesidad de la presencia de ningún estímulo de muerte; el hecho de que tras el proceso de selección haya menos parásitos con respecto a los controles electroporados con el vector vacío o con la construcción que expresa la proteína silvestre apoya esta afirmación.

El compuesto LEI-49 inhibe la actividad de LiEndoG

A la vista de los resultados presentados en esta tesis, podemos afirmar que *L. infantum* presenta una proteína efectora análoga a las EndoGs descritas en metazoos, que participa en el proceso de muerte similar a apoptosis que tiene lugar en los parásitos, y que también desempeña un rol pro-vida, aunque todavía queda por determinar exactamente cuál es su función a este respecto. Este papel dual podría convertir a LiEndoG en una interesante diana farmacológica. Nuestros resultados obtenidos para el análogo de timidina LEI-49 demuestran su capacidad para actuar como un inhibidor de LiEndoG sin inhibir a otras nucleasas como la ADNasaI, si bien todavía queda por definir cómo de específica es su acción sobre LiEndoG, y concretar el tipo de inhibición que ejerce sobre ella. Además, y en colaboración con el laboratorio de síntesis de la Dra. Pérez-Pérez, sería interesante estudiar la posibilidad de nuevos sustituyentes en la posición 3' del nucleósido, que pudiesen mejorar los resultados obtenidos hasta el momento, que no dejan de ser preliminares.

Los resultados obtenidos durante la realización de la presente tesis revelan el interés del estudio de éste y de otros efectores implicados en los procesos de muerte similar a apoptosis que tiene lugar en estos parásitos, así como el estudio de sus interacciones y de las diferencias existentes con las rutas de señalización presentes en mamíferos. Recientemente, se ha descrito que la EndoG de *L. donovani* forma un degradosoma con las nucleasas FEN-1 y TatD para degradar el ADN durante el proceso apoptótico inducido por bacaleína en estos parásitos (198).

El conocimiento de los mecanismos que regulan la supervivencia y la muerte de este parásito puede ser de gran relevancia para el desarrollo de nuevas estrategias dirigidas a tratar de erradicar la leishmaniasis.

CONCLUSIONS

1. *Leishmania infantum* expresses a protein that shows high sequence similarity with human, bovine and yeast Endonucleases G and contains the same active site signature.
2. Based on the similarities between *L. infantum* EndoG and the nucleases Nuc A from *Anabaena* sp., endonuclease from *S.marcescens* and DmEndoG from *Drosophila melanogaster*, for which experimentally determined structures are available, we have built a structural model for *L. infantum* EndoG.
3. We have cloned, expressed and purified rLiEndoG. The recombinant protein shows a molecular weight similar to that predicted for the putative EndoG annotated in the GeneBank database.
4. The recombinant protein purified under denaturing conditions and subsequently refolded on-column is able to digest circular supercoiled plasmid DNA *in vitro* and shares similar pH and cations requirements with other EndoGs.
5. rLiEndoG shows endo-exonuclease activity.
6. rLiEndoG activity is inhibited by addition of the nuclease inhibitor ATA.
7. β -mercaptoethanol inactivates rLiEndoG, most likely by reduction of the disulfide bond formed between Cys100 and Cys116.
8. rLiEndoG processes each DNA strand in the double helix independently.
9. *L. infantum* EndoG contains a signal peptide that localizes the protein in the mitochondrion under normal growing conditions.
10. *LiendoG* overexpression does not have any effect on promastigotes under normal growing conditions. Expression of reduced levels of endogenous EndoG, on the other hand, decreases the parasite's growth rate.
11. *LiendoG* overexpression increases the percentage of TUNEL-positive promastigotes after induction of cell death. Reductions in the levels of the endogenous protein show the opposite effect, and the parasites become more resistant to death stimuli.

12. LiEndoG translocates from the mitochondrion to the nucleus after induction of cell death.
13. The serine located within the SRGH motif of the protein does not seem to be essential for the nuclease activity. Nevertheless, the arginine and histidine residues from this same motif are indispensable for the nuclease activity due to their role in substrate binding and catalysis, respectively.
14. LiEndoG may contain an auto-inhibitory domain spatially located close to the catalytic site of the protein that would play a similar role to that of the EndoGI inhibitor of *Drosophila melanogaster* on DmEndoG. Possible structural changes associated to pH, and maybe other factors, could be important for keeping the nuclease activity under control in healthy growing parasites.
15. The synthetic compound LEI-49 is able to inhibit rLiEndoG but not DNaseI nuclease activity. Parasites overexpressing LiEndoG are more resistant to the death process induced by this compound than parasites transfected with the empty vector.

REFERENCIAS:

1. Banuls, A.L., Hide, M. and Prugnolle, F. (2007) Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv. Parasitol.*, **64**, 1-109.
2. Killick-Kendrick, R. (1990) Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med. Vet. Entomol.*, **4**, 1-24.
3. Cox, F.E. (2002) History of human parasitology. *Clin. Microbiol. Rev.*, **15**, 595-612.
4. Calvopina, M., Armijos, R.X. and Hashiguchi, Y. (2004) Epidemiology of leishmaniasis in Ecuador: current status of knowledge -- a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **99**, 663-672.
5. Sogin, M.L. and Silberman, J.D. (1998) Evolution of the protists and protistan parasites from the perspective of molecular systematics. *Int. J. Parasitol.*, **28**, 11-20.
6. Fevre, E.M., Picozzi, K., Jannin, J., Welburn, S.C. and Maudlin, I. (2006) Human African trypanosomiasis: Epidemiology and control. *Adv. Parasitol.*, **61**, 167-221.
7. Teixeira, A.R., Nitz, N., Guimaro, M.C., Gomes, C. and Santos-Buch, C.A. (2006) Chagas disease. *Postgrad. Med. J.*, **82**, 788-798.
8. Piscopo, T.V. and Mallia Azzopardi, C. (2007) Leishmaniasis. *Postgrad. Med. J.*, **83**, 649-657.
9. Rioux, J.A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P. and Perieres, J. (1990) Taxonomy of Leishmania. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **65**, 111-125.
10. (1990) Control of the leishmaniasis. Report of a WHO Expert Committee. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.*, **793**, 1-158.
11. Lukes, J., Mauricio, I.L., Schonian, G., Dujardin, J.C., Soteriadou, K., Dedet, J.P., Kuhls, K., Tintaya, K.W., Jirku, M., Chocholova, E. *et al.* (2007) Evolutionary and geographical history of the Leishmania donovani complex with a revision of current taxonomy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**, 9375-9380.
12. Peacock, C.S., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J.C., Quail, M.A., Peters, N., Adlem, E., Tivey, A., Aslett, M. *et al.* (2007) Comparative genomic analysis of three Leishmania species that cause diverse human disease. *Nat. Genet.*, **39**, 839-847.

13. Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno, J. and Nieto, J. (2004) Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.*, **57**, 1-88.
14. Dantas-Torres, F. (2007) The role of dogs as reservoirs of Leishmania parasites, with emphasis on Leishmania (Leishmania) infantum and Leishmania (Viannia) braziliensis. *Vet. Parasitol.*, **149**, 139-146.
15. Bates, P.A. (2007) Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int. J. Parasitol.*, **37**, 1097-1106.
16. Brittingham, A., Morrison, C.J., McMaster, W.R., McGwire, B.S., Chang, K.P. and Mosser, D.M. (1995) Role of the Leishmania surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J. Immunol.*, **155**, 3102-3111.
17. Cunningham, A.C. (2002) Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. *Exp. Mol. Pathol.*, **72**, 132-141.
18. Wilson, M.E., Hardin, K.K. and Donelson, J.E. (1989) Expression of the major surface glycoprotein of Leishmania donovani chagasi in virulent and attenuated promastigotes. *J. Immunol.*, **143**, 678-684.
19. van Zandbergen, G., Bollinger, A., Wenzel, A., Kamhawi, S., Voll, R., Klinger, M., Muller, A., Holscher, C., Herrmann, M., Sacks, D. *et al.* (2006) Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 13837-13842.
20. Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L. and Henson, P.M. (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.*, **148**, 2207-2216.
21. McDonald, P.P., Fadok, V.A., Bratton, D. and Henson, P.M. (1999) Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF-beta in macrophages that have ingested apoptotic cells. *J. Immunol.*, **163**, 6164-6172.
22. Laufs, H., Muller, K., Fleischer, J., Reiling, N., Jahnke, N., Jensenius, J.C., Solbach, W. and Laskay, T. (2002) Intracellular survival of Leishmania major in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect. Immun.*, **70**, 826-835.
23. van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W. and Laskay, T. (2004) Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages. *J. Immunol.*, **173**, 6521-6525.

24. Antoine, J.C., Prina, E., Lang, T. and Courret, N. (1998) The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol.*, **6**, 392-401.
25. Chang, K.P. and Dwyer, D.M. (1976) Multiplication of a human parasite (*Leishmania donovani*) in phagolysosomes of hamster macrophages in vitro. *Science*, **193**, 678-680.
26. Rittig, M.G., Schroppel, K., Seack, K.H., Sander, U., N'Diaye, E.N., Maridonneau-Parini, I., Solbach, W. and Bogdan, C. (1998) Coiling phagocytosis of trypanosomatids and fungal cells. *Infect. Immun.*, **66**, 4331-4339.
27. Dominguez, M. and Torano, A. (1999) Immune adherence-mediated opsonophagocytosis: the mechanism of *Leishmania* infection. *J. Exp. Med.*, **189**, 25-35.
28. de Freitas Balanco, J.M., Moreira, M.E., Bonomo, A., Bozza, P.T., Amarante-Mendes, G., Pirmez, C. and Barcinski, M.A. (2001) Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. *Curr. Biol.*, **11**, 1870-1873.
29. Barak, E., Amin-Spector, S., Gerliak, E., Goyard, S., Holland, N. and Zilberstein, D. (2005) Differentiation of *Leishmania donovani* in host-free system: analysis of signal perception and response. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **141**, 99-108.
30. Ghedin, E., Debrabant, A., Engel, J.C. and Dwyer, D.M. (2001) Secretory and endocytic pathways converge in a dynamic endosomal system in a primitive protozoan. *Traffic*, **2**, 175-188.
31. Mullin, K.A., Foth, B.J., Ilgoutz, S.C., Callaghan, J.M., Zawadzki, J.L., McFadden, G.I. and McConville, M.J. (2001) Regulated degradation of an endoplasmic reticulum membrane protein in a tubular lysosome in *Leishmania mexicana*. *Mol. Biol. Cell*, **12**, 2364-2377.
32. Besteiro, S., Williams, R.A., Coombs, G.H. and Mottram, J.C. (2007) Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int. J. Parasitol.*, **37**, 1063-1075.
33. Alexander, J. (1978) Unusual axonemal doublet arrangements in the flagellum of *Leishmania amastigotes*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **72**, 345-347.
34. Campo-aasen, I., Aleman, C. and Convit, J. (1973) New organelle observed in *Leishmania brasiliensis*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **67**, 122-124.

35. Schaible, U.E., Schlesinger, P.H., Steinberg, T.H., Mangel, W.F., Kobayashi, T. and Russell, D.G. (1999) Parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana* acquire macromolecules from the host cell cytosol via two independent routes. *J. Cell Sci.*, **112 (Pt 5)**, 681-693.
36. Myler, P.J. and Fasel, N. (2008) *Leishmania*, after the genome. *Caister Academic Press*, 123-158.
37. de Souza, W., Attias, M. and Rodrigues, J.C. (2009) Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **41**, 2069-2080.
38. Britto, C., Ravel, C., Bastien, P., Blaineau, C., Pages, M., Dedet, J.P. and Wincker, P. (1998) Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. *Gene*, **222**, 107-117.
39. Wincker, P., Ravel, C., Blaineau, C., Pages, M., Jauffret, Y., Dedet, J.P. and Bastien, P. (1996) The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 1688-1694.
40. Ivens, A.C., Peacock, C.S., Wortley, E.A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M.A., Adlem, E., Aert, R. *et al.* (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*, **309**, 436-442.
41. Mair, G., Shi, H., Li, H., Djikeng, A., Aviles, H.O., Bishop, J.R., Falcone, F.H., Gavrilescu, C., Montgomery, J.L., Santori, M.I. *et al.* (2000) A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. *RNA*, **6**, 163-169.
42. Martinez-Calvillo, S., Nguyen, D., Stuart, K. and Myler, P.J. (2004) Transcription initiation and termination on *Leishmania major* chromosome 3. *Eukaryot. Cell*, **3**, 506-517.
43. Martinez-Calvillo, S., Yan, S., Nguyen, D., Fox, M., Stuart, K. and Myler, P.J. (2003) Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol. Cell*, **11**, 1291-1299.
44. Myler, P.J., Audleman, L., deVos, T., Hixson, G., Kiser, P., Lemley, C., Magness, C., Rickel, E., Sisk, E., Sunkin, S. *et al.* (1999) *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 2902-2906.
45. Papadopoulou, B., Roy, G. and Ouellette, M. (1994) Autonomous replication of bacterial DNA plasmid oligomers in *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **65**, 39-49.

46. Martinez-Calvillo, S., Vizuet-de-Rueda, J.C., Florencio-Martinez, L.E., Manning-Cela, R.G. and Figueroa-Angulo, E.E. Gene expression in trypanosomatid parasites. *J. Biomed. Biotechnol.*, **2010**, 525241.
47. Djikeng, A., Shi, H., Tschudi, C. and Ullu, E. (2001) RNA interference in *Trypanosoma brucei*: cloning of small interfering RNAs provides evidence for retroposon-derived 24-26-nucleotide RNAs. *RNA*, **7**, 1522-1530.
48. Monnerat, S., Martinez-Calvillo, S., Worthey, E., Myler, P.J., Stuart, K.D. and Fasel, N. (2004) Genomic organization and gene expression in a chromosomal region of *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **134**, 233-243.
49. Robinson, K.A. and Beverley, S.M. (2003) Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **128**, 217-228.
50. Desjeux, P. (2004) Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **27**, 305-318.
51. Gradoni, L., Gramiccia, M., Leger, N., Pesson, B., Madulo-Leblond, G., Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M. and Walton, B.C. (1991) Isoenzyme characterization of *Leishmania* from man, dog and sandflies in the Maltese islands. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **85**, 217-219.
52. Wilson, M.E. and Streit, J.A. (1996) Visceral leishmaniasis. *Gastroenterol. Clin. North Am.*, **25**, 535-551.
53. Alvar, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Den Boer, M., Canavate, C., Dedet, J.P., Gradoni, L., Ter Horst, R., Lopez-Velez, R. and Moreno, J. (2008) The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin. Microbiol. Rev.*, **21**, 334-359, table of contents.
54. Ramesh, V., Singh, R. and Salotra, P. (2007) Short communication: post-kala-azar dermal leishmaniasis--an appraisal. *Trop. Med. Int. Health*, **12**, 848-851.
55. Murray, H.W., Berman, J.D., Davies, C.R. and Saravia, N.G. (2005) Advances in leishmaniasis. *Lancet*, **366**, 1561-1577.
56. David, C.V. and Craft, N. (2009) Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatologic therapy*, **22**, 491-502.
57. Frezard, F., Demicheli, C. and Ribeiro, R.R. (2009) Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules*, **14**, 2317-2336.
58. Maltezou, H.C. Drug resistance in visceral leishmaniasis. *J. Biomed. Biotechnol.*, **2010**, 617521.

59. Bern, C., Adler-Moore, J., Berenguer, J., Boelaert, M., den Boer, M., Davidson, R.N., Figueras, C., Gradoni, L., Kafetzis, D.A., Ritmeijer, K. *et al.* (2006) Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.*, **43**, 917-924.
60. Croft, S.L. and Engel, J. (2006) Miltefosine--discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **100 Suppl 1**, S4-8.
61. Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R.W., Alvar, J. and Boelaert, M. (2007) Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microbiol.*, **5**, 873-882.
62. Baneth, G. and Shaw, S.E. (2002) Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.*, **106**, 315-324.
63. El-On, J. (2009) Current status and perspectives of the immunotherapy of leishmaniasis. *Isr. Med. Assoc. J.*, **11**, 623-628.
64. Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R. *et al.* (2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.*, **16**, 3-11.
65. Raff, M.C. (1992) Social controls on cell survival and cell death. *Nature*, **356**, 397-400.
66. Rich, T., Allen, R.L. and Wyllie, A.H. (2000) Defying death after DNA damage. *Nature*, **407**, 777-783.
67. Mehmet, H. (2000) Caspases find a new place to hide. *Nature*, **403**, 29-30.
68. Wang, J., Silva, J.P., Gustafsson, C.M., Rustin, P. and Larsson, N.G. (2001) Increased in vivo apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 4038-4043.
69. Ameisen, J.C. (2002) On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death Differ.*, **9**, 367-393.
70. Kroemer, G. and Martin, S.J. (2005) Caspase-independent cell death. *Nat. Med.*, **11**, 725-730.
71. Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, **26**, 239-257.

72. Horvitz, H.R. (1999) Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res.*, **59**, 1701s-1706s.
73. Meier, P., Finch, A. and Evan, G. (2000) Apoptosis in development. *Nature*, **407**, 796-801.
74. Kroemer, G., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Peter, M.E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M.V., Malorni, W., Knight, R.A. *et al.* (2005) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.*, **12 Suppl 2**, 1463-1467.
75. Igney, F.H. and Krammer, P.H. (2002) Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 277-288.
76. Elmore, S. (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.*, **35**, 495-516.
77. Hill, M.M., Adrain, C., Duriez, P.J., Creagh, E.M. and Martin, S.J. (2004) Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *EMBO J.*, **23**, 2134-2145.
78. Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G. and Vandenabeele, P. (2004) Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, **23**, 2861-2874.
79. Schimmer, A.D. (2004) Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res.*, **64**, 7183-7190.
80. Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Nagata, S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, **391**, 43-50.
81. Joza, N., Susin, S.A., Daugas, E., Stanford, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y., Sasaki, T., Elia, A.J., Cheng, H.Y., Ravagnan, L. *et al.* (2001) Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, **410**, 549-554.
82. Li, L.Y., Luo, X. and Wang, X. (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, **412**, 95-99.
83. Cory, S. and Adams, J.M. (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 647-656.
84. Li, H., Zhu, H., Xu, C.J. and Yuan, J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, **94**, 491-501.

85. Enoksson, M., Robertson, J.D., Gogvadze, V., Bu, P., Kropotov, A., Zhivotovsky, B. and Orrenius, S. (2004) Caspase-2 permeabilizes the outer mitochondrial membrane and disrupts the binding of cytochrome c to anionic phospholipids. *J. Biol. Chem.*, **279**, 49575-49578.
86. Hengartner, M.O. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature*, **407**, 770-776.
87. Slee, E.A., Adrain, C. and Martin, S.J. (2001) Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **276**, 7320-7326.
88. Sakahira, H., Enari, M. and Nagata, S. (1998) Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, **391**, 96-99.
89. Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Kohts, K., Kwiatkowski, D.J. *et al.* (1997) Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*, **278**, 294-298.
90. Arambage, S.C., Grant, K.M., Pardo, I., Ranford-Cartwright, L. and Hurd, H. (2009) Malaria ookinetes exhibit multiple markers for apoptosis-like programmed cell death in vitro. *Parasit. Vectors*, **2**, 32.
91. Ameisen, J.C., Idziorek, T., Billaut-Mulot, O., Loyens, M., Tissier, J.P., Potentier, A. and Ouaiissi, A. (1995) Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Cell Death Differ.*, **2**, 285-300.
92. Christensen, S.T., Wheatley, D.N., Rasmussen, M.I. and Rasmussen, L. (1995) Mechanisms controlling death, survival and proliferation in a model unicellular eukaryote *Tetrahymena thermophila*. *Cell Death Differ.*, **2**, 301-308.
93. Moreira, M.E., Del Portillo, H.A., Milder, R.V., Balanco, J.M. and Barcinski, M.A. (1996) Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *J. Cell. Physiol.*, **167**, 305-313.
94. Bera, A., Singh, S., Nagaraj, R. and Vaidya, T. (2003) Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **127**, 23-35.
95. Delgado, M., Anderson, P., Garcia-Salcedo, J.A., Caro, M. and Gonzalez-Rey, E. (2009) Neuropeptides kill African trypanosomes by targeting intracellular compartments and inducing autophagic-like cell death. *Cell Death Differ.*, **16**, 406-416.

96. Besteiro, S., Williams, R.A., Morrison, L.S., Coombs, G.H. and Mottram, J.C. (2006) Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of *Leishmania major*. *J. Biol. Chem.*, **281**, 11384-11396.
97. Herman, M., Gillies, S., Michels, P.A. and Rigden, D.J. (2006) Autophagy and related processes in trypanosomatids: insights from genomic and bioinformatic analyses. *Autophagy*, **2**, 107-118.
98. Williams, R.A., Tetley, L., Mottram, J.C. and Coombs, G.H. (2006) Cysteine peptidases CPA and CPB are vital for autophagy and differentiation in *Leishmania mexicana*. *Mol. Microbiol.*, **61**, 655-674.
99. Shaha, C. (2006) Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. *Indian J. Med. Res.*, **123**, 233-244.
100. Arnoult, D., Akarid, K., Grodet, A., Petit, P.X., Estaquier, J. and Ameisen, J.C. (2002) On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. *Cell Death Differ.*, **9**, 65-81.
101. Lee, N., Bertholet, S., Debrabant, A., Muller, J., Duncan, R. and Nakhasi, H.L. (2002) Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. *Cell Death Differ.*, **9**, 53-64.
102. Mehta, A. and Shaha, C. (2004) Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. *J. Biol. Chem.*, **279**, 11798-11813.
103. Paris, C., Loiseau, P.M., Bories, C. and Breard, J. (2004) Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 852-859.
104. Alzate, J.F., Arias, A., Mollinedo, F., Rico, E., de la Iglesia-Vicente, J. and Jimenez-Ruiz, A. (2008) Edelfosine induces an apoptotic process in *Leishmania infantum* that is regulated by the ectopic expression of Bcl-XL and Hrk. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **52**, 3779-3782.
105. Singh, G., Jayanarayan, K.G. and Dey, C.S. (2005) Novobiocin induces apoptosis-like cell death in topoisomerase II over-expressing arsenite resistant *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **141**, 57-69.
106. Sen, N., Das, B.B., Ganguly, A., Mukherjee, T., Tripathi, G., Bandyopadhyay, S., Rakshit, S., Sen, T. and Majumder, H.K. (2004) Camptothecin induced mitochondrial dysfunction leading to programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. *Cell Death Differ.*, **11**, 924-936.

107. Das, M., Mukherjee, S.B. and Shaha, C. (2001) Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J. Cell Sci.*, **114**, 2461-2469.
108. Holzmüller, P., Sereno, D., Cavaleyra, M., Mangot, I., Daulouede, S., Vincendeau, P. and Lemesre, J.L. (2002) Nitric oxide-mediated proteasome-dependent oligonucleosomal DNA fragmentation in *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Infect. Immun.*, **70**, 3727-3735.
109. Alzate, J.F., Arias, A.A., Moreno-Mateos, D., Alvarez-Barrientos, A. and Jimenez-Ruiz, A. (2007) Mitochondrial superoxide mediates heat-induced apoptotic-like death in *Leishmania infantum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **152**, 192-202.
110. Ridgley, E.L., Xiong, Z.H. and Ruben, L. (1999) Reactive oxygen species activate a Ca²⁺-dependent cell death pathway in the unicellular organism *Trypanosoma brucei brucei*. *Biochem. J.*, **340 (Pt 1)**, 33-40.
111. Zangger, H., Mottram, J.C. and Fasel, N. (2002) Cell death in *Leishmania* induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis? *Cell Death Differ.*, **9**, 1126-1139.
112. Ambit, A., Fasel, N., Coombs, G.H. and Mottram, J.C. (2008) An essential role for the *Leishmania* major metacaspase in cell cycle progression. *Cell Death Differ.*, **15**, 113-122.
113. Gonzalez, I.J., Desponds, C., Schaff, C., Mottram, J.C. and Fasel, N. (2007) *Leishmania* major metacaspase can replace yeast metacaspase in programmed cell death and has arginine-specific cysteine peptidase activity. *Int. J. Parasitol.*, **37**, 161-172.
114. Lee, N., Gannavaram, S., Selvapandiyar, A. and Debrabant, A. (2007) Characterization of metacaspases with trypsin-like activity and their putative role in programmed cell death in the protozoan parasite *Leishmania*. *Eukaryot. Cell*, **6**, 1745-1757.
115. Wyllie, A.H. (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, **284**, 555-556.
116. Liu, X., Zou, H., Slaughter, C. and Wang, X. (1997) DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*, **89**, 175-184.
117. Liu, X., Li, P., Widlak, P., Zou, H., Luo, X., Garrard, W.T. and Wang, X. (1998) The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 8461-8466.

118. Nagata, S., Nagase, H., Kawane, K., Mukae, N. and Fukuyama, H. (2003) Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ.*, **10**, 108-116.
119. Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M. *et al.* (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, **397**, 441-446.
120. Susin, S.A., Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M. and Kroemer, G. (1996) Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J. Exp. Med.*, **184**, 1331-1341.
121. Gerschenson, M., Houmiel, K.L. and Low, R.L. (1995) Endonuclease G from mammalian nuclei is identical to the major endonuclease of mitochondria. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 88-97.
122. Curtis, P.J., Burdon, M.G. and Smellie, R.M. (1966) The purification from rat liver of a nuclease hydrolysing ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.*, **98**, 813-817.
123. Curtis, P.J. and Smellie, R.M. (1966) Properties of a purified rat-liver nuclease. *Biochem. J.*, **98**, 818-825.
124. Morais, R., Blackstein, M. and de Lamirande, G. (1967) Partial purification and some properties of a 5'-RNase from rat liver mitochondrial fraction. *Arch. Biochem. Biophys.*, **121**, 711-716.
125. Parrish, J., Li, L., Klotz, K., Ledwich, D., Wang, X. and Xue, D. (2001) Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature*, **412**, 90-94.
126. Arnoult, D., Gaume, B., Karbowski, M., Sharpe, J.C., Cecconi, F. and Youle, R.J. (2003) Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J.*, **22**, 4385-4399.
127. Widlak, P., Li, L.Y., Wang, X. and Garrard, W.T. (2001) Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates: cooperation with exonuclease and DNase I. *J. Biol. Chem.*, **276**, 48404-48409.
128. Parrish, J.Z., Yang, C., Shen, B. and Xue, D. (2003) CRN-1, a *Caenorhabditis elegans* FEN-1 homologue, cooperates with CPS-6/EndoG to promote apoptotic DNA degradation. *EMBO J.*, **22**, 3451-3460.
129. Low, R.L. (2003) Mitochondrial Endonuclease G function in apoptosis and mtDNA metabolism: a historical perspective. *Mitochondrion*, **2**, 225-236.

130. Ruiz-Carrillo, A. and Renaud, J. (1987) Endonuclease G: a (dG)_n X (dC)_n-specific DNase from higher eukaryotes. *EMBO J.*, **6**, 401-407.
131. Schafer, P., Scholz, S.R., Gimadutdinow, O., Cymerman, I.A., Bujnicki, J.M., Ruiz-Carrillo, A., Pingoud, A. and Meiss, G. (2004) Structural and functional characterization of mitochondrial EndoG, a sugar non-specific nuclease which plays an important role during apoptosis. *J. Mol. Biol.*, **338**, 217-228.
132. Cote, J., Renaud, J. and Ruiz-Carrillo, A. (1989) Recognition of (dG)_n.(dC)_n sequences by endonuclease G. Characterization of the calf thymus nuclease. *J. Biol. Chem.*, **264**, 3301-3310.
133. Wu, S.L., Li, C.C., Chen, J.C., Chen, Y.J., Lin, C.T., Ho, T.Y. and Hsiang, C.Y. (2009) Mutagenesis identifies the critical amino acid residues of human endonuclease G involved in catalysis, magnesium coordination, and substrate specificity. *J. Biomed. Sci.*, **16**, 6.
134. Cummings, O.W., King, T.C., Holden, J.A. and Low, R.L. (1987) Purification and characterization of the potent endonuclease in extracts of bovine heart mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **262**, 2005-2015.
135. Huang, K.J., Ku, C.C. and Lehman, I.R. (2006) Endonuclease G: a role for the enzyme in recombination and cellular proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 8995-9000.
136. Yoon, S.M., Song, H.N., Yang, J.H., Lim, M.Y., Chung, Y.J., Ryu, S.E. and Woo, E.J. (2009) Purification, crystallization and data collection of the apoptotic nuclease endonuclease G. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, **65**, 504-507.
137. Loll, B., Gebhardt, M., Wahle, E. and Meinhart, A. (2009) Crystal structure of the EndoG/EndoG1 complex: mechanism of EndoG inhibition. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 7312-7320.
138. Cote, J. and Ruiz-Carrillo, A. (1993) Primers for mitochondrial DNA replication generated by endonuclease G. *Science*, **261**, 765-769.
139. Ohsato, T., Ishihara, N., Muta, T., Umeda, S., Ikeda, S., Mihara, K., Hamasaki, N. and Kang, D. (2002) Mammalian mitochondrial endonuclease G. Digestion of R-loops and localization in intermembrane space. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 5765-5770.
140. Buttner, S., Eisenberg, T., Carmona-Gutierrez, D., Ruli, D., Knauer, H., Ruckenstuhl, C., Sigrist, C., Wissing, S., Kollrosier, M., Frohlich, K.U. *et al.* (2007) Endonuclease G regulates budding yeast life and death. *Mol. Cell*, **25**, 233-246.
141. David, K.K., Sasaki, M., Yu, S.W., Dawson, T.M. and Dawson, V.L. (2006) EndoG is dispensable in embryogenesis and apoptosis. *Cell Death Differ.*, **13**, 1147-1155.

142. Irvine, R.A., Adachi, N., Shibata, D.K., Cassell, G.D., Yu, K., Karanjawala, Z.E., Hsieh, C.L. and Lieber, M.R. (2005) Generation and characterization of endonuclease G null mice. *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 294-302.
143. Zhang, J., Dong, M., Li, L., Fan, Y., Pathre, P., Dong, J., Lou, D., Wells, J.M., Olivares-Villagomez, D., Van Kaer, L. *et al.* (2003) Endonuclease G is required for early embryogenesis and normal apoptosis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 15782-15787.
144. Zassenhaus, H.P. and Denniger, G. (1994) Analysis of the role of the NUC1 endo/exonuclease in yeast mitochondrial DNA recombination. *Curr. Genet.*, **25**, 142-149.
145. Fraser, M.J., Hatahet, Z. and Huang, X.T. (1989) The actions of *Neurospora* endo-exonuclease on double strand DNAs. *J. Biol. Chem.*, **264**, 13093-13101.
146. Huang, K.J., Zemelman, B.V. and Lehman, I.R. (2002) Endonuclease G, a candidate human enzyme for the initiation of genomic inversion in herpes simplex type 1 virus. *J. Biol. Chem.*, **277**, 21071-21079.
147. Cymerman, I.A., Chung, I., Beckmann, B.M., Bujnicki, J.M. and Meiss, G. (2008) EXOG, a novel paralog of Endonuclease G in higher eukaryotes. *Nucleic Acids Res.*, **36**, 1369-1379.
148. Boyd, J.B., Sakaguchi, K. and Harris, P.V. (1990) *mus308* mutants of *Drosophila* exhibit hypersensitivity to DNA cross-linking agents and are defective in a deoxyribonuclease. *Genetics*, **125**, 813-819.
149. Sakaguchi, K., Harris, P.V., van Kuyk, R., Singson, A. and Boyd, J.B. (1990) A mitochondrial nuclease is modified in *Drosophila* mutants (*mus308*) that are hypersensitive to DNA crosslinking agents. *Mol. Gen. Genet.*, **224**, 333-340.
150. Houmiel, K.L., Gerschenson, M. and Low, R.L. (1991) Mitochondrial endonuclease activity in the rat varies markedly among tissues in relation to the rate of tissue metabolism. *Biochim. Biophys. Acta*, **1079**, 197-202.
151. Ikeda, S. and Ozaki, K. (1997) Action of mitochondrial endonuclease G on DNA damaged by L-ascorbic acid, peplomycin, and cis-diamminedichloroplatinum (II). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **235**, 291-294.
152. Kalinowska, M., Garncarz, W., Pietrowska, M., Garrard, W.T. and Widlak, P. (2005) Regulation of the human apoptotic DNase/RNase endonuclease G: involvement of Hsp70 and ATP. *Apoptosis*, **10**, 821-830.
153. Harrington, J.J. and Lieber, M.R. (1994) The characterization of a mammalian DNA structure-specific endonuclease. *EMBO J.*, **13**, 1235-1246.

154. Quijada, L., Soto, M., Alonso, C. and Requena, J.M. (2003) High-efficiency plating method for *Leishmania infantum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **130**, 139-141.
155. Yokoyama, W.M., Christensen, M., Santos, G.D. and Miller, D. (2006) Production of monoclonal antibodies. *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al, Chapter 2*, Unit 2 5.
156. Verma, N.K., Singh, G. and Dey, C.S. (2007) Miltefosine induces apoptosis in arsenite-resistant *Leishmania donovani* promastigotes through mitochondrial dysfunction. *Exp. Parasitol.*, **116**, 1-13.
157. Smith, T.F. and Waterman, M.S. (1981) Identification of common molecular subsequences. *J. Mol. Biol.*, **147**, 195-197.
158. McGuffin, L.J., Bryson, K. and Jones, D.T. (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics*, **16**, 404-405.
159. Jones, D.T., Bryson, K., Coleman, A., McGuffin, L.J., Sadowski, M.I., Sodhi, J.S. and Ward, J.J. (2005) Prediction of novel and analogous folds using fragment assembly and fold recognition. *Proteins*, **61 Suppl 7**, 143-151.
160. Bennett-Lovsey, R.M., Herbert, A.D., Sternberg, M.J. and Kelley, L.A. (2008) Exploring the extremes of sequence/structure space with ensemble fold recognition in the program Phyre. *Proteins*, **70**, 611-625.
161. Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J. and Schwede, T. (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, **22**, 195-201.
162. Kiefer, F., Arnold, K., Kunzli, M., Bordoli, L. and Schwede, T. (2009) The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Res.*, **37**, D387-392.
163. Li, C.L., Hor, L.I., Chang, Z.F., Tsai, L.C., Yang, W.Z. and Yuan, H.S. (2003) DNA binding and cleavage by the periplasmic nuclease Vvn: a novel structure with a known active site. *EMBO J.*, **22**, 4014-4025.
164. Wang, Y.T., Yang, W.J., Li, C.L., Doudeva, L.G. and Yuan, H.S. (2007) Structural basis for sequence-dependent DNA cleavage by nonspecific endonucleases. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 584-594.
165. Widlak, P. and Garrard, W.T. (2005) Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *J. Cell. Biochem.*, **94**, 1078-1087.

166. Berman, H.M., Battistuz, T., Bhat, T.N., Bluhm, W.F., Bourne, P.E., Burkhardt, K., Feng, Z., Gilliland, G.L., Iype, L., Jain, S. *et al.* (2002) The Protein Data Bank. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **58**, 899-907.
167. Miller, M.D., Cai, J. and Krause, K.L. (1999) The active site of *Serratia* endonuclease contains a conserved magnesium-water cluster. *J. Mol. Biol.*, **288**, 975-987.
168. Shlyapnikov, S.V., Lunin, V.V., Perbandt, M., Polyakov, K.M., Lunin, V.Y., Levdikov, V.M., Betzel, C. and Mikhailov, A.M. (2000) Atomic structure of the *Serratia marcescens* endonuclease at 1.1 Å resolution and the enzyme reaction mechanism. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **56**, 567-572.
169. Ghosh, M., Meiss, G., Pingoud, A., London, R.E. and Pedersen, L.C. (2005) Structural insights into the mechanism of nuclease A, a betabeta alpha metal nuclease from *Anabaena*. *J. Biol. Chem.*, **280**, 27990-27997.
170. Hallick, R.B., Chelm, B.K., Gray, P.W. and Orozco, E.M., Jr. (1977) Use of aurintricarboxylic acid as an inhibitor of nucleases during nucleic acid isolation. *Nucleic Acids Res.*, **4**, 3055-3064.
171. Gonzalez, R.G., Haxo, R.S. and Schleich, T. (1980) Mechanism of action of polymeric aurintricarboxylic acid, a potent inhibitor of protein--nucleic acid interactions. *Biochemistry*, **19**, 4299-4303.
172. Ball, T.K., Suh, Y. and Benedik, M.J. (1992) Disulfide bonds are required for *Serratia marcescens* nuclease activity. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 4971-4974.
173. Wu, S.I., Lo, S.K., Shao, C.P., Tsai, H.W. and Hor, L.I. (2001) Cloning and characterization of a periplasmic nuclease of *Vibrio vulnificus* and its role in preventing uptake of foreign DNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 82-88.
174. Dake, E., Hofmann, T.J., McIntire, S., Hudson, A. and Zassenhaus, H.P. (1988) Purification and properties of the major nuclease from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **263**, 7691-7702.
175. Kerr, C. and Sadowski, P.D. (1972) Gene 6 exonuclease of bacteriophage T7. I. Purification and properties of the enzyme. *J. Biol. Chem.*, **247**, 305-310.
176. Misra, S., Bennett, J., Friew, Y.N., Abdulghani, J., Irvin-Wilson, C.V., Tripathi, M.K., Williams, S., Chaudhuri, M. and Chaudhuri, G. (2005) A type II ribonuclease H from *Leishmania* mitochondria: an enzyme essential for the growth of the parasite. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **143**, 135-145.

177. Azzouz, S., Maache, M., Garcia, R.G. and Osuna, A. (2005) Leishmanicidal activity of edelfosine, miltefosine and ilmofosine. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **96**, 60-65.
178. Escobar, P., Matu, S., Marques, C. and Croft, S.L. (2002) Sensitivities of Leishmania species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH(3) (edelfosine) and amphotericin B. *Acta Trop.*, **81**, 151-157.
179. Gavrieli, Y., Sherman, Y. and Ben-Sasson, S.A. (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.*, **119**, 493-501.
180. Gorczyca, W., Gong, J. and Darzynkiewicz, Z. (1993) Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res.*, **53**, 1945-1951.
181. Yang, D.S., Kumar, A., Stavrides, P., Peterson, J., Peterhoff, C.M., Pawlik, M., Levy, E., Cataldo, A.M. and Nixon, R.A. (2008) Neuronal apoptosis and autophagy cross talk in aging PS/APP mice, a model of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.*, **173**, 665-681.
182. Soto, M., Quijada, L., Alonso, C. and Requena, J.M. (2000) Histone synthesis in Leishmania infantum is tightly linked to DNA replication by a translational control. *Biochem. J.*, **346 Pt 1**, 99-105.
183. Wiesgigl, M. and Clos, J. (2001) The heat shock protein 90 of Leishmania donovani. *Med. Microbiol. Immunol.*, **190**, 27-31.
184. Schluter, A., Wiesgigl, M., Hoyer, C., Fleischer, S., Klaholz, L., Schmetz, C. and Clos, J. (2000) Expression and subcellular localization of cpn60 protein family members in Leishmania donovani. *Biochim. Biophys. Acta*, **1491**, 65-74.
185. Leger, J., Kempf, M., Lee, G. and Brandt, R. (1997) Conversion of serine to aspartate imitates phosphorylation-induced changes in the structure and function of microtubule-associated protein tau. *J. Biol. Chem.*, **272**, 8441-8446.
186. Garza, A.S., Ahmad, N. and Kumar, R. (2009) Role of intrinsically disordered protein regions/domains in transcriptional regulation. *Life Sci.*, **84**, 189-193.
187. Sagermann, M., Chapleau, R.R., DeLorimier, E. and Lei, M. (2009) Using affinity chromatography to engineer and characterize pH-dependent protein switches. *Protein Sci.*, **18**, 217-228.

188. Van Poecke, S., Negri, A., Gago, F., Van Daele, I., Solaroli, N., Karlsson, A., Balzarini, J. and Van Calenbergh, S. 3'-[4-Aryl-(1,2,3-triazol-1-yl)]-3'-deoxythymidine analogues as potent and selective inhibitors of human mitochondrial thymidine kinase. *J. Med. Chem.*, **53**, 2902-2912.
189. Denninger, V., Koopmann, R., Muhammad, K., Barth, T., Bassarak, B., Schonfeld, C., Kilunga, B.K. and Duszenko, M. (2008) Kinetoplastida: model organisms for simple autophagic pathways? *Methods Enzymol.*, **451**, 373-408.
190. Kiel, J.A. Autophagy in unicellular eukaryotes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **365**, 819-830.
191. Rigden, D.J., Michels, P.A. and Ginger, M.L. (2009) Autophagy in protists: Examples of secondary loss, lineage-specific innovations, and the conundrum of remodeling a single mitochondrion. *Autophagy*, **5**, 784-794.
192. Alzate, J.F., Alvarez-Barrientos, A., Gonzalez, V.M. and Jimenez-Ruiz, A. (2006) Heat-induced programmed cell death in *Leishmania infantum* is reverted by Bcl-X(L) expression. *Apoptosis*, **11**, 161-171.
193. Sen, N., Das, B.B., Ganguly, A., Mukherjee, T., Bandyopadhyay, S. and Majumder, H.K. (2004) Camptothecin-induced imbalance in intracellular cation homeostasis regulates programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.*, **279**, 52366-52375.
194. Gannavaram, S., Vedvyas, C. and Debrabant, A. (2008) Conservation of the pro-apoptotic nuclease activity of endonuclease G in unicellular trypanosomatid parasites. *J. Cell Sci.*, **121**, 99-109.
195. Buttner, S., Carmona-Gutierrez, D., Vitale, I., Castedo, M., Ruli, D., Eisenberg, T., Kroemer, G. and Madeo, F. (2007) Depletion of endonuclease G selectively kills polyploid cells. *Cell Cycle*, **6**, 1072-1076.
196. Friedhoff, P., Franke, I., Krause, K.L. and Pingoud, A. (1999) Cleavage experiments with deoxythymidine 3',5'-bis-(p-nitrophenyl phosphate) suggest that the homing endonuclease I-Ppol follows the same mechanism of phosphodiester bond hydrolysis as the non-specific *Serratia* nuclease. *FEBS Lett.*, **443**, 209-214.
197. Kieper, J., Lauber, C., Gimadutdinov, O., Urbanska, A., Cymerman, I., Ghosh, M., Szczesny, B. and Meiss, G. Production and characterization of recombinant protein preparations of Endonuclease G-homologs from yeast, *C. elegans* and humans. *Protein Expr. Purif.*, **73**, 99-106.

198. BoseDasgupta, S., Das, B.B., Sengupta, S., Ganguly, A., Roy, A., Dey, S., Tripathi, G., Dinda, B. and Majumder, H.K. (2008) The caspase-independent algorithm of programmed cell death in Leishmania induced by baicalein: the role of LdEndoG, LdFEN-1 and LdTatD as a DNA 'degradesome'. *Cell Death Differ.*, **15**, 1629-1640.

Anexo



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular & Biochemical Parasitology



Leishmania infantum expresses a mitochondrial nuclease homologous to EndoG that migrates to the nucleus in response to an apoptotic stimulus[☆]

Eva Rico^a, Juan Fernando Alzate^b, Andrés Augusto Arias^a, David Moreno^a, Joachim Clos^c, Federico Gago^d, Inmaculada Moreno^e, Mercedes Domínguez^e, Antonio Jiménez-Ruiz^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain

^b Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

^c Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Bernhard Nocht St. 74, D-20359 Hamburg, Germany

^d Departamento de Farmacología, Campus Universitario, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain

^e Servicio de Inmunología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 February 2008
Received in revised form 8 September 2008
Accepted 12 September 2008
Available online xxx

Keywords:

Leishmania
Endonuclease
EndoG
Programmed cell death
Apoptosis

ABSTRACT

It is increasingly accepted that single-celled organisms, such as *Leishmania* parasites, are able to undergo a cell death process that resembles apoptosis in metazoans and is induced by a variety of stimuli. However, the molecular mechanisms that participate and regulate this death process are still very poorly described, and very few of the participating molecules have been identified. Because DNA degradation is probably the most frequently characterized event during programmed cell death in *Leishmania* parasites, we have focused on identifying a candidate nuclease responsible for this effect during the cell death process. The results presented herein demonstrate that *Leishmania infantum* promastigotes express a nuclease similar to the endonuclease G of higher eukaryotes which, according to its predicted structure, belongs to the $\beta\beta\alpha$ metal superfamily of nucleases. Its cation dependence resembles that of the EndoGs present in other organisms and, similarly to them, it is inhibited by moderate concentrations of K^+ or Na^+ . *L. infantum* EndoG contains a signal peptide that causes its translocation to the mitochondrion where it is maintained under normal growth conditions. However, under the pressure of a death stimulus such as edelfosine treatment, *L. infantum* EndoG is released from the single mitochondrion and translocates to the nucleus, where it is thought to participate in the process of DNA degradation that is associated with programmed cell death. Our results also demonstrate that overexpression of the nuclease in edelfosine-treated promastigotes causes a significant increase in the percentage of TUNEL-positive parasites.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Leishmania is a genus of protozoan parasites that belongs to *Trypanosomatidae*, a family of organisms that includes several other human-infecting parasites such as *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease, and *Trypanosoma brucei*, the causative agent of sleeping sickness. These organisms present many biochemical peculiarities that differentiate them from most of the

rest of the eukaryotes, which probably is a consequence of its very ancient origin and their early divergence from the eukaryotic phylogenetic tree. One of these peculiarities is the presence of a single large mitochondrion that extends through most of the cellular body of the parasite. Close to the basal body of the flagellum, the mitochondrion concentrates a vast network of maxi and mini circles of DNA in a structure named the kinetoplast, which can be easily observed with DNA-staining techniques. This characteristic organelle has been used to group the *Bodonidae* and *Trypanosomatidae* families into the order *Kinetoplastida* [1].

Leishmania species are the causative agent of leishmaniasis, one of the most prevalent tropical diseases according to criteria from the World Health Organization. It is endemic in 88 countries, and it is estimated that about 12 million people are currently infected and 350 million more are at risk of contracting the disease [2,3]. Depending on the *Leishmania* species, the disease leads to cutaneous lesions [4], mucocutaneous lesions, or fatal, generalized visceral infection [5]. The parasite is transmitted by sand flies of the genus *Lutzomyia* or *Phlebotomus* [6]. The parasites proliferate

Abbreviations: CAD, caspase-activated DNase; eGFP, enhanced green fluorescent protein; EndoG, mitochondrial endonuclease G; GuHCl, guanidine hydrochloride; IPTG, isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside; NucA, nuclease A from *Anabaena* sp.; rLiEndoG, *Leishmania infantum* recombinant EndoG; PCD, programmed cell death; PI, propidium iodide; SDS, sodium dodecyl sulphate; TEM, 50 mM Tris/1 mM EDTA/2 mM magnesium.

[☆] Note: The nucleotide sequence has been deposited in the GenBank Database under accession number EU402956.

* Corresponding author. Tel.: +34 91 885 5109; fax: +34 91 885 4585.

E-mail address: antonio.jimenez@uah.es (A. Jiménez-Ruiz).

as extracellular promastigotes within the gut of the sand fly vector and as intracellular amastigotes within the macrophages of the mammalian host.

Apoptosis, one of the most important mechanisms of programmed cell death (PCD), is present in all multicellular organisms and participates in processes such as development, aging, immunity and tissue homeostasis [7–9]. It has been discovered that PCD also plays a relevant role in unicellular organisms, in which it is important to control population size, viral infections [10], and also, in the case of parasitic protozoa, to facilitate host infection [11]. In this regard, it has been demonstrated recently that progression of leishmaniasis in the vertebrate host depends on the presence of apoptotic promastigotes during the initial events of infection [11]. The apoptotic program in *Leishmania* has been repeatedly studied and shown to be executed under a great variety of death stimuli: serum deprivation, oxidative stress, heat shock, and drug treatment, among others [12–14]. This death process is characterized by changes in cell morphology, DNA degradation, phosphatidylserine exposure, changes in mitochondrial membrane potential, activation of proteases and, finally, plasma membrane permeabilization. Despite the great number of reports describing this cell death process, the molecular basis is still largely unknown. The *Leishmania* Genome Projects have not revealed any genes that might code for proteins similar to those mainly involved in regulating apoptosis in higher eukaryotes, e.g. members of the Bcl-2 family and caspases. However, a metacaspase from *L. major* that is able to replace yeast metacaspase in PCD has been recently characterized [15], and the ectopic expression of the anti-apoptotic Bcl-X_L protein has been shown by our group to play a role in the protection against heat-induced cell death in *Leishmania infantum* [16].

Most of the studies devoted to the analysis of the cell death process in *Leishmania* indicate that the parasite quickly degrades its DNA [17]. The analysis of the *Leishmania* genome does not reveal the existence of a nuclease similar to mammalian caspase-activated DNase (CAD), the nuclease mainly involved in DNA degradation during apoptosis in mammals [18]. In addition to CAD, mammalian cells possess a second nuclease activity, endonuclease G (EndoG), a mitochondrial nuclease that translocates to the nucleus during apoptosis to degrade chromatin DNA into nucleosomal fragments in several caspase-independent cell death models [19,20]. This nuclease is encoded in a nuclear gene and it is transported to the mitochondria where it serves diverse functions related to replication, repair and degradation of mitochondrial DNA (mtDNA) [21]. EndoG belongs to the $\beta\beta\alpha$ -metal superfamily of DNA/RNA non-specific nucleases, requires Mg²⁺ or other divalent cations for activity, and it is inhibited by moderate salt concentrations (100–150 mM NaCl) [21,22]. Orthologs of this protein have also been found to participate in apoptosis in *Caenorhabditis elegans* [23], *Saccharomyces cerevisiae* [24] and in *T. brucei* and *Leishmania donovani* [25].

In the present paper we show that *L. infantum* expresses a protein with structural and functional characteristics that strongly resemble those of endonucleases G from higher eukaryotes, including mitochondrial localization and migration to the nucleus in response to a death stimulus. Moreover, overexpression of this protein significantly increases the percentage of TUNEL-positive promastigotes in response to the anti-*Leishmania* drug edelfosine.

2. Materials and methods

2.1. Cells and culture conditions

L. infantum promastigotes (M/CAN/ES/96/BCN150 MON-1), kindly provided by Dr. Alonso (CBMSO-Universidad Autónoma Madrid, Spain), were grown in RPMI-1640 medium (Gibco, Pais-

ley, UK) supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum (FCS), antibiotics, and 25 mM HEPES at 26 °C. Parasite death was induced by addition of edelfosine to the culture medium. Edelfosine was kindly provided by Dr. Mollinedo from Centro de Investigación del Cáncer, Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C.)-Universidad de Salamanca.

2.2. EndoG expression and purification

E. coli BL21(DE3) pLys bacterial cells were transformed with pRSET-*endoG*. The expression of the rLiEndoG was then induced during 30 min with 1 mM IPTG at 37 °C. Because most of the expressed protein was found in the non-soluble fraction, *E. coli* cells were lysed in 6 M GuHCl and the cleared lysate was loaded in a Ni-NTA resin to be purified under denaturing and refolding conditions according to the manufacturer's instructions (Qiagen). The protein was used for monoclonal antibody production according to standard protocols [26].

2.3. In vitro activity assays

One microgram of plasmid DNA (pRSETa) was digested in a final volume of 20 μ L with 0.2 μ g rLiEndoG, 1 h at 37 °C. Inhibitory activity of K⁺ and Na⁺ was assayed in the presence of 6.25 μ M MgCl₂. Digested DNA was resolved on agarose gels at 1.2% (w/v), stained with ethidium bromide and visualized under UV light. Direct DNase activity was measured by SDS-DNA-PAGE analysis as previously described [27].

2.4. EndoG coding sequence cloning and construct design

The putative EndoG coding sequence was amplified from *L. infantum* genomic DNA with the primers 5'GGGGATCCATGAGTTC-CAGCGCATGATC3' and 5'GGGCTCGAGTCAGCGTCGCTCTGC3', cloned into pBluescript KS and sequenced. The coding region was subcloned into pRSETa with the restriction endonucleases BamHI and XhoI. Subcloning into pIRmcs3(-) vector [28] was carried out by digestion with the restriction endonucleases BamHI and XhoI and ligation into the pIRmcs3(-) BglIII and XhoI restriction sites. The coding sequence of eGFP was PCR-amplified from the p6.5-eGFP construct kindly provided by Dr. K.P. Chang (Chicago Medical School – Rosalind Franklin University, North Chicago, IL) with the following primers: 5'GGGAGATCTATGGTGGAGCAAGGGCGAGGA3' and 5'GGGCATATGTTACTTGTACAGCTCGTCCA3'. The PCR product was purified and doubly digested, as well as the vector pIRmcs3(-), with the restriction endonucleases NdeI/BglIII. Chimeric constructs of eGFP with the signal peptides of EndoG and RNase HIIC were obtained by insertion of the region coding for the first 40 amino acids of these genes into the 5' end of the eGFP coding region, using the restriction site BglIII. The signal peptide of EndoG was amplified with the primers-5'CCCAGATCTATGAGTGCCAGTGCGGCGA3' and 5'CCCAGATCTCTGCACCACAAGCTGTGTG3'. The coding region of the signal peptide of RNase HIIC was amplified with the primers: 5' CCCAGATCTATGCTCCACGCATGGCGCTTC 3' and 5' CCCAGATCTTGGCCTGAAAGGGGAATAG 3'. The chimeric construct of the complete EndoG fused to the eGFP was obtained after amplification of the EndoG coding sequence with the primers 5' CCCAGATCTATGAGTGCCAGTGCGGCGA 3' and 5' CCCAGATCTGCGTCTGCTCTGCTGGTC 3' and cloning into the BglIII site of the pIRmcs3-eGFP construct.

2.5. Promastigote transfection

The parasites were harvested in logarithmic growth phase and transfected by electroporation as previously described [16]. Sta-

ble transfected strains were selected at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nourseothricin (Axxora cat# JBS-AB-101L) in RPMI/20%FCS. The pIRmcs3(–) constructs were linearized with the enzyme *Swa*I and gel purified (Illustra GFX gel purification kit, General Electric) prior to transfection. Individual clones were isolated in agar plates [29].

2.6. Cell fractionation

Logarithmically growing promastigotes (20×10^6 cells) were pelleted and processed according to manufacturer instructions (ProteoExtract Subcellular Proteome extraction Kit; Calbiochem). Anti-Hsp90, anti-Hsp60 and anti-H2A antibodies were used to demonstrate that each marker protein is specifically enriched within the appropriate fraction.

2.7. Confocal microscopy

All experiments were done starting with 20 million logarithmically growing promastigotes and visualized under a Leica TCS SL confocal microscope. Mito-Tracker Red CMXRos (Molecular Probes) was used for mitochondrial localization. Nuclei were labelled by propidium iodide (PI) staining after parasite fixation with 4% paraformaldehyde and subsequent permeabilization (IntraStain Kit for Flow Cytometry; DakoCytomation).

2.8. TUNEL assay

Logarithmically growing promastigotes (10×10^6 cells) were pelleted and labeled according to manufacturer's instructions (Fluorescein Frag-El DNA Fragmentation Detection Kit; Calbiochem). Parasites were analyzed using a FC500 MPL flow cytometer (Beckman-Coulter).

2.9. Sequence and structure analysis

The PsiPred [30] and mGenThreader profile-based fold recognition [31] methods were used to calculate the putative secondary structure of *L. infantum* endonuclease G and to identify possible structural neighbors. A homology model for *L. infantum* EndoG was then constructed using the protein fold recognition server Phyre [32], which provided two confident structural matches for the sequence encompassing residues 100–434 (except for a gap between 145 and 185). Rotamer selection for replaced amino acids was improved by visual inspection of individual residues using the built-in facility available in PyMOL (DeLano, W. PyMOL version 0.99, DeLano Scientific LLC, South San Francisco, CA. URL: <http://pymol.sourceforge.net/>). A Mg^{2+} ion was incorporated into the structure using the high-resolution structure of *Serratia* as a template [33]. Finally, a short double-stranded oligonucleotide was added to the model by molecular superimposition of the equivalent $\beta\beta\alpha$ -metal-binding motif present in the structure of the related periplasmic nuclease (DNase) from *Vibrio vulnificus*, which has been co-crystallized with DNA [34,35].

3. Results

3.1. Identification of the sequence coding for *L. infantum* EndoG

Bioinformatic analysis of the genome of *L. infantum*, *L. major* and *L. braziliensis* revealed that the three species contain a gene with significant similarity to human EndoG. Moreover, a region could be found in *L. infantum* EndoG protein (Fig. 1A) that showed high sequence identity with regions encompassing the catalytic site in human (43%), bovine (43%), yeast (36%), and *T. cruzi* (59%) endonucleases G. Interestingly, the aspartic acid in the characteristic DRGH

Prosit motif (PDOC00821) is replaced in the trypanosomatids by a serine (Ser211 in the *L. infantum* sequence). Besides, comparison of the full protein sequences (data not shown) reveals that *L. infantum* EndoG is considerably larger than any of the other three eukaryotic proteins, having a predicted molecular weight of 54 kDa compared to 37.2 kDa (*S. cerevisiae*), 32.3 kDa (*Bos taurus*) and 32.6 kDa (*Homo sapiens*). No significant similarity to other functional sequence motifs was found for the additional amino acids present in *L. infantum* EndoG.

3.2. Comparative molecular modeling of the core catalytic domain of *L. infantum* EndoG

The experimentally solved structures of both the endonuclease from *Serratia marcescens* [36] and nuclease A (NucA) from *Anabaena* sp. [37] were predicted to be close structural homologues of *L. infantum* endoG, with a very high confidence level (p -value < 0.0001). These two proteins are members of the $\beta\beta\alpha$ -metal superfamily of nucleases, which comprises non-specific, structure-specific, and sequence-specific enzymes that share a structurally conserved active site scaffold and utilize a divalent metal ion. The deduced overall similarity in amino acid arrangement, the inferred presence of an equivalent multistranded β -sheet core and the finding of a characteristic $\beta\beta\alpha$ -metal-binding motif (Fig. 1B) strongly indicate that *L. infantum* EndoG employs the same mechanism of phosphodiester bond hydrolysis as the related nucleases from *Serratia* and *Anabaena*.

Thus, the active site appears to be optimized for binding a hydrated divalent cation, which is co-ordinated directly to the protein only through the side chain carbonyl group of Asn246 (Fig. 1C). One of the metal-bound water molecules is hydrogen-bonded to the imidazole ND1 of His214, which behaves as a general base to activate the water for the nucleophilic in-line attack on the phosphorus atom. A second metal-bound water molecule acts as a general acid to provide a proton to the leaving oxygen group. On the other hand, Arg185, which appears to occupy a position equivalent to that of Arg57 in the *Serratia* nuclease, could be the residue responsible for decelerating the reverse reaction through stabilization of the product relative to the transition state (through a hydrogen bonding interaction with the 5'-phosphate).

In addition, two disulfide bonds were predicted with high confidence by the DISULFIND server [38], one between Cys100 and Cys116 and another between Cys434 and Cys439. The homology model points to the feasibility of these connections although a detailed structural analysis of the full protein is precluded at the present time because of uncertainties in the structure of both N- and C-terminal domains.

3.3. Nuclease activity of *L. infantum* EndoG

In order to determine whether the *L. infantum* sequence described above encodes a nuclease with biochemical properties similar to those characteristics of Endonuclease G from other organisms, the *L. infantum* EndoG coding sequence was cloned in the pRSET prokaryotic expression vector (Invitrogen) after its amplification from total genomic DNA. The oligonucleotides were designed according to the sequence reported in GeneBank for the *L. infantum* genome reference strain JPCM5 (XM.001463677). The EndoG coding sequence was amplified from *L. infantum* strain (M/CAN/ES/96/BCN150 MON-1) genomic DNA and its sequence deposited at GenBank with the accession number EU402956. This construct (pRSET-EndoG) was used to transfect *E. coli* BL21(DE3) pLys cells, and protein expression was induced for 30 min with 1 mM IPTG. Because most of the expressed protein was found in the non-soluble fraction, *E. coli* cells were lysed in 6 M GuHCl and

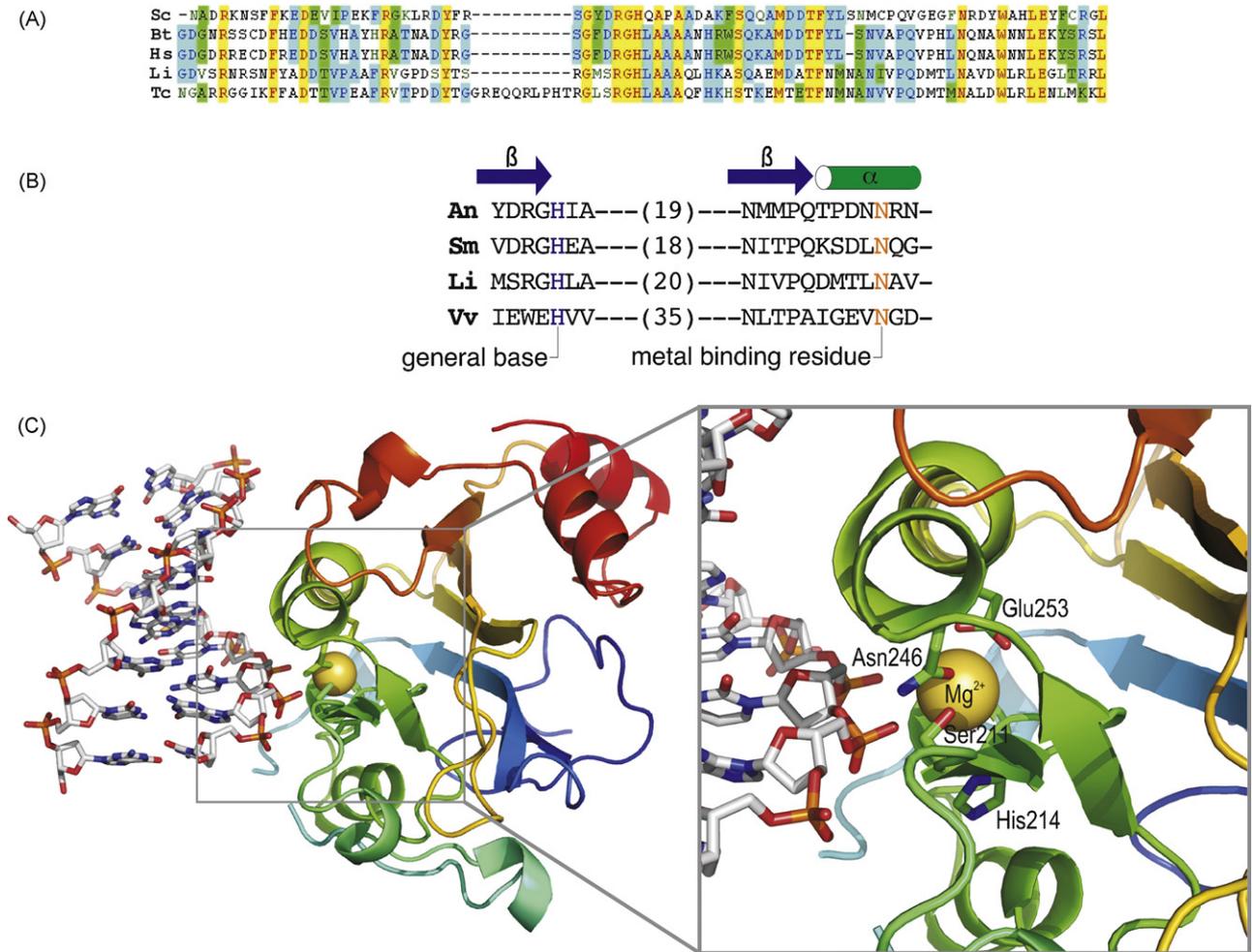


Fig. 1. Sequence and predicted structure of *Leishmania infantum* EndoG. (A) Alignment of the amino acid sequences of the catalytic domains of endonucleases G from (*Sc*) *S. cerevisiae* (NP_012327), (*Bt*) *Bos Taurus* (P38447), (*Hs*) *Homo sapiens* (Q14249), (*Li*) *Leishmania infantum* (ABY89724), and (*Tc*) *Trypanosoma cruzi* (EAN91160). Color code for residues: black = non-similar; blue on cyan = consensus with occurrence greater than 50%; black on green = similar with occurrence greater than 50%; red on yellow = completely conserved; green = weakly similar to consensus at a given position. (B) Comparison of the $\beta\alpha$ -metal-binding motif present in (*An*) *Anabaena* sp. nuclease A (P38446), (*Sm*) *Serratia marcescens* extracellular endonuclease (P13717), (*Li*) *L. infantum* EndoG (ABY89724), and (*Vv*) *Vibrio vulnificus* nuclease (Q7MHK3). The two β -sheets and the α -helix are indicated. The histidine that behaves as a general base is colored in blue and the asparagine necessary for metal binding is colored in red. (C) Predicted structure of *L. infantum* EndoG (ribbon representation) in complex with a short DNA molecule (shown as sticks). Protein residues important for catalytic activity are also shown as sticks and have been labeled.

the cleared lysate was loaded on a Ni-NTA resin. After washing, the denatured EndoG was refolded while still bound to the Ni-NTA matrix by using a linear 6–1 M urea gradient. Once the protein was in the 1 M urea buffer, it was eluted by the addition of 250 mM imidazole (Fig. 2A). The recombinant protein (rLiEndoG) shows an apparent molecular mass of more than 64 kDa, which is about 6 kDa higher than the 59 kDa expected for the *L. infantum* EndoG amino acid sequence plus the His tag and the enterokinase recognition sequence present in the pRSET vector. These abnormalities in protein migration are not observed when the *EndoG* nucleotide sequence is used to transfect *L. infantum* promastigotes, which indicates that the additional amino acids incorporated in the protein expressed in *E. coli* are responsible for the anomalous mobility.

Endonuclease activity of the purified refolded EndoG was demonstrated by its ability to fully degrade circular, supercoiled plasmid DNA (Fig. 2B). In order to confirm that this nuclease activity was due to the purified protein and not to a contaminant present in the protein extract, purified EndoG was electrophoresed in an SDS-polyacrylamide gel containing denatured salmon sperm DNA. After electrophoresis, the protein was refolded *in situ* by incubation in TEM buffer for 24 h. Staining of the gel with ethidium bromide

revealed a stain-free band, due to DNA degradation, at the position of the EndoG. This finding was taken as clear evidence for the nuclease activity of the purified protein (Fig. 2C).

It has been described previously that other Endonucleases G isolated from unicellular and multicellular eukaryotes require Mg^{2+} or Mn^{2+} to degrade DNA. The results presented in Fig. 3 also demonstrate that *L. infantum* EndoG activity is dramatically enhanced when Mg^{2+} (Fig. 3A), Mn^{2+} (Fig. 3B), or Co^{2+} (Fig. 3C) ions are present during DNA digestion. Moreover, as shown for several other Endonucleases G, *L. infantum* EndoG activity is clearly inhibited by moderate concentrations of K^+ (150 mM) (Fig. 3D) or higher concentrations of Na^+ (300 mM) (Fig. 3E).

As indicated above, two disulfide bonds are predicted in the structure of *L. infantum* EndoG. Activation mechanisms based on the formation of disulfide bonds have been described for extracellular nucleases from *S. marcescens* [39] and *V. vulnificus* [40]. In order to test whether the nuclease activity of *L. infantum* EndoG could depend on disulfide bond formation, its capacity to degrade plasmid DNA was tested in the presence of increasing concentrations of β -mercaptoethanol. The results shown in Fig. 3F clearly indicate that the progressive disruption of disulfide

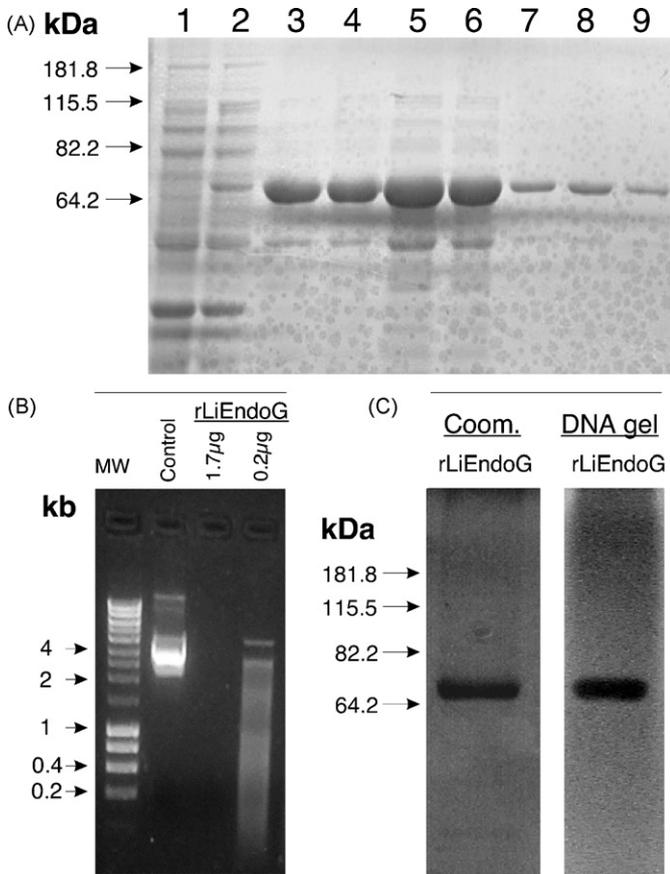


Fig. 2. rLiEndoG purification and nuclease activity. (A) SDS PAGE analysis of different samples obtained during the purification process of rLiEndoG. 1. Lysate from non-induced *E. coli* BL21(DE3) pLys transformed with pRSET-*endog*. 2. Lysate from 1 mM IPTG-induced bacteria. 3–9. Fractions obtained after washing with elution buffer. Fractions 3 and 4 were selected for nuclease activity analysis. (B) Nuclease activity of rLiEndoG. Agarose gel electrophoresis of 1 µg of supercoiled plasmid DNA incubated for 1 h in the absence (control) or in the presence of 1.7 µg or 0.2 µg of rLiEndoG. (C) DNase activity by SDS-DNA-PAGE analysis (10% gel). Four micrograms of purified rLiEndoG were electrophoresed in a SDS-DNA polyacrylamide gel. Left lane: gel stained with Coomassie Blue. Right lane: gel incubated in TEM at 37 °C overnight, then stained with 1 mg/ml ethidium bromide and visualized under UV light.

bonds associated with the presence of this agent results in enzyme inactivation.

3.4. *L. infantum* EndoG contains a signal peptide that localizes the protein into the mitochondrion

The main characteristic that differentiates EndoG from other cellular nucleases is its mitochondrial localization. In a similar way to the vast majority of mitochondrial proteins, EndoG in eukaryotes is encoded in a nuclear gene and is imported into the organelle after translation. This trafficking is facilitated by an N-terminal signal peptide. In order to test whether such a signal peptide might exist in *L. infantum* EndoG, we fused the sequence coding for the first 40 amino acids of this protein to the 5' end of the eGFP coding sequence and transfected *L. infantum* promastigotes with the resulting construct, pLRmcs3(-)EndoG₁₋₄₀::eGFP. The results presented in Fig. 4A clearly demonstrate that the presence of the first 40 amino acids of EndoG protein at the N-terminal region of this chimeric eGFP is sufficient to translocate the protein to the parasite mitochondrion, as demonstrated by its clear co-localization with the fluorescence associated to the Mito-Tracker probe. A similar staining pattern is obtained when eGFP is directed to the mitochondrion by means

of the first 40 amino acids of *L. infantum* RNase HIIC, a protein that has already been shown to localize to this organelle [41]. As expected, in the absence of this signal peptide, eGFP is almost homogeneously distributed throughout the cytoplasm of the parasite (Fig. 4A, pLRmcs3(-)eGFP). Similarly to the results shown for the fusion of the first 40 amino acids of LiEndoG with eGFP, the protein that results from the fusion of the entire EndoG with eGFP is also clearly located inside the single mitochondrion of the parasite (Fig. 4B).

To further confirm that *L. infantum* EndoG is located in the parasite mitochondrion, *L. infantum* promastigotes were fixed, permeabilized and incubated with a mouse monoclonal antibody raised against the recombinant EndoG protein purified from *E. coli* (anti-rLiEndoG). As shown in Fig. 4C, colocalization of the anti-rLiEndoG antibody and the Mito-Tracker probe was clearly observed. The specificity of the monoclonal anti-rLiEndoG antibody was demonstrated by its ability to detect a single band corresponding to a protein of the expected size in western blots (Fig. 4D). This protein is similarly expressed in logarithmic and stationary phase promastigotes.

3.5. EndoG overexpression increases the percentage of TUNEL-positive promastigotes after induction of cell death

In order to test whether overexpression of EndoG might have a deleterious effect on *Leishmania* parasites, *L. infantum* promastigotes were stably transfected with a pLRmcs3(-) construct containing the *L. infantum* EndoG-coding sequence. The results shown in the western blots (Fig. 5A) demonstrate that two different clones randomly selected after transfection with the described plasmid construct express the EndoG protein at much higher rates than do control parasites transfected with the empty vector (pLRmcs3(-)). Overexpression of this protein did not cause any significant alteration in the pattern of TUNEL staining in the logarithmically growing populations (Fig. 5B), which indicates that this protein does not have any deleterious effect on the parasites under favorable growth conditions. However, after treatment with the antileishmanial drug edelfosine, a highly significant increase in the number of TUNEL-positive parasites was observed in the clones that overexpress EndoG protein (Fig. 5B).

3.6. EndoG translocates from the mitochondrion to the nucleus after cell death induction

To track the migration of EndoG within the cell in response to a death stimulus, we expressed a chimeric protein consisting of the full coding regions of EndoG and eGFP (EndoG-eGFP). As shown above for the endogenous *L. infantum* EndoG and the eGFP containing the EndoG mitochondrial localization signal, the EndoG-eGFP fusion protein is also imported into the mitochondrion and is completely excluded from the nucleus in the parasites under normal growth conditions (Fig. 6A). However, treatment with 40 µM edelfosine for 24 h causes the migration of EndoG-eGFP to the nucleus, as revealed by the intense yellow color that can be observed in 30% of the nuclei resulting from the co-localization of the green (eGFP) and red (PI) fluorescence signals. Not a single yellow nucleus was detected in the untreated controls. Parasites at a higher magnification showing the nuclear localization of either the fusion protein or the endogenous protein stained with anti-rLiEndoG after edelfosine treatment are shown in Fig. 6B (panels g and h).

Detection of endogenous EndoG after cell fractionation (Fig. 6C) confirms that, in the untreated controls, this protein is mainly located in mitochondria even though it can also be observed in the nucleus and, to a very minor extent, in the cytosol. Nuclear local-

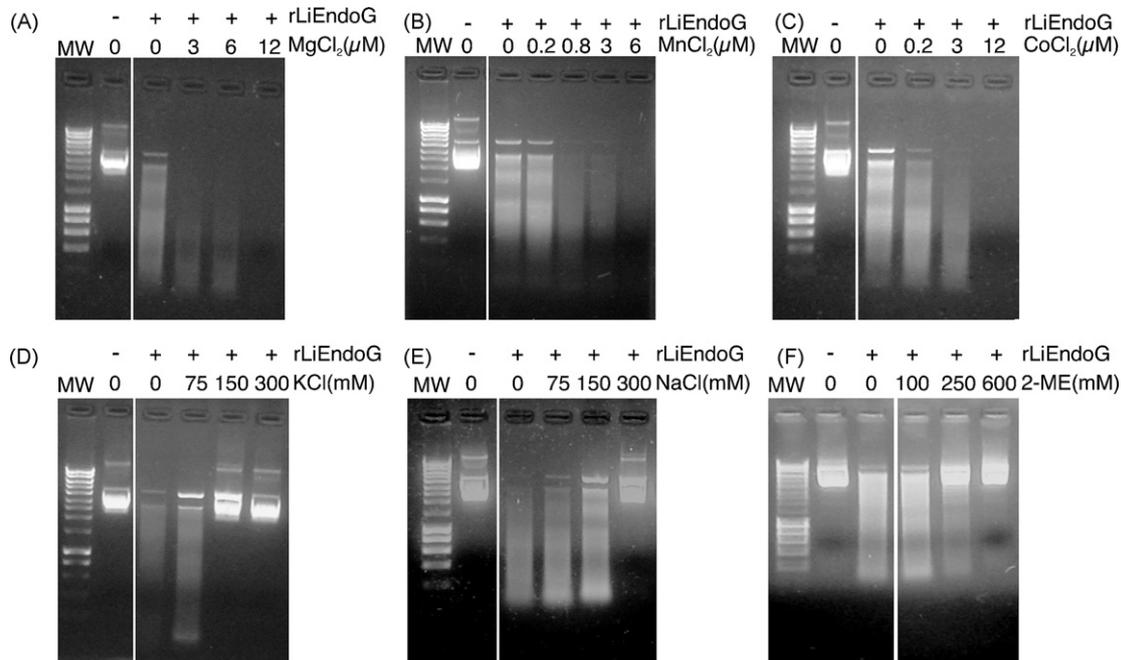


Fig. 3. Modulation of rLiEndoG nuclease activity by cations and 2-mercaptoethanol. One microgram plasmid DNA was digested with 0.2 μ g rENDOg under increasing concentrations of (A) $MgCl_2$, (B) $MnCl_2$, (C) $CoCl_2$, (D) KCl, (E) NaCl, and (F) β -mercaptoethanol.

ization of the EndoG ortholog protein Nuc1p in the absence of any stress has also been described in yeasts by Buttner et al., who considered it a consequence of the stressful conditions that cells have to endure during fractionation [24]. Conversely, in the edelfosine-treated parasites, even though the signal is much weaker because less protein is present as a result of massive cell death, EndoG can be detected only in the nuclear fraction. Anti-H2A, anti-Hsp90 and anti-Hsp60 antibodies were used to demonstrate that each marker protein is specifically enriched within the appropriate fraction (Fig. 6D).

Taken together, our results indicate that *L. infantum* EndoG, similarly to the Endonucleases G from higher eukaryotes, is retained in the mitochondrion during normal growth and migrates to the nucleus during PCD.

4. Discussion

Apoptosis in metazoan cells is a well-characterized process necessary for the correct development and maintenance of tissues and organisms. The notion that a similar mechanism of PCD might exist in single-celled organisms has been a matter of controversial discussion for a few years, although this idea is now widely accepted. It has been repeatedly demonstrated that processes similar to those observed in metazoan apoptosis exist in several protozoan species. However, the mechanisms that regulate this process and the proteins involved are still largely unknown.

The completion of several protozoan genome projects has allowed a search for DNA sequences that code for proteins similar to those known to regulate apoptosis in higher eukaryotes. In *Leishmania*, this search did not yield any proteins with sequences similar to those of members of the Bcl-2 or caspase families, the two major protein families involved in regulation of apoptosis in mammals. However, the demonstration that transfection of *L. infantum* promastigotes with the gene sequence coding for Bcl X_L protects the parasites from heat-induced cell death [16] and also that caspase inhibitors are able to modify the cellular response of this parasite to several death stimuli [13,42,43] clearly suggest that some of the

players in the mechanism that regulates PCD in *Leishmania* spp. may be counterparts of those already described in mammalian cells. Indeed, sequence comparisons performed with a broad spectrum of organisms have allowed the identification of a gene in the *Leishmania* genome that shows significant similarity to metacaspase genes. The product of this gene was shown to interfere with cell cycle regulation [44] and to confer enhanced sensitivity to hydrogen peroxide-induced PCD [45] or to act as a surrogate of yeast metacaspase [15].

While the search for death-regulating genes still appears to be a difficult task, analysis of the protozoan genomes has allowed the identification of putative death effector proteins on the basis of detected sequence similarities with their metazoan counterparts. This is the case for *L. infantum* EndoG, whose degree of sequence similarity with Endonuclease G proteins from other organisms made it a clear candidate in the search for molecules involved in the apoptotic process in this primitive parasite. Furthermore, secondary structure prediction and profile-based structure recognition methods strongly suggest that this protein is a close structural homologue of NucA from *Anabaena* sp. and the extracellular endonuclease from *S. marcescens*, for both of which an X-ray crystal structure is available. This indicates that *L. infantum* EndoG should also be included in the $\beta\beta\alpha$ -metal superfamily of nucleases.

Despite this overall structural homology, the characteristic DRGH motif present in most of the members of this superfamily is modified in *L. infantum* EndoG because a serine residue (Ser211) occupies the position of the aspartate (SRGH). This substitution is strongly conserved in similar sequences from other *Leishmania* and *Trypanosoma* species [25]. Since the role of the aspartate in this signature pattern appears to be providing structural support to the side chain of the asparagine that participates in coordinating the metal ion, it is likely that this role can be performed equally well by the serine hydroxyl group. A more detailed analysis of the residues putatively involved in the catalytic process further suggests that the mechanism of phosphodiester bond hydrolysis in *L. infantum* EndoG is similar to that observed in the related nucleases from *Serratia* and *Anabaena*. Another structural similarity between *L. Infantum*

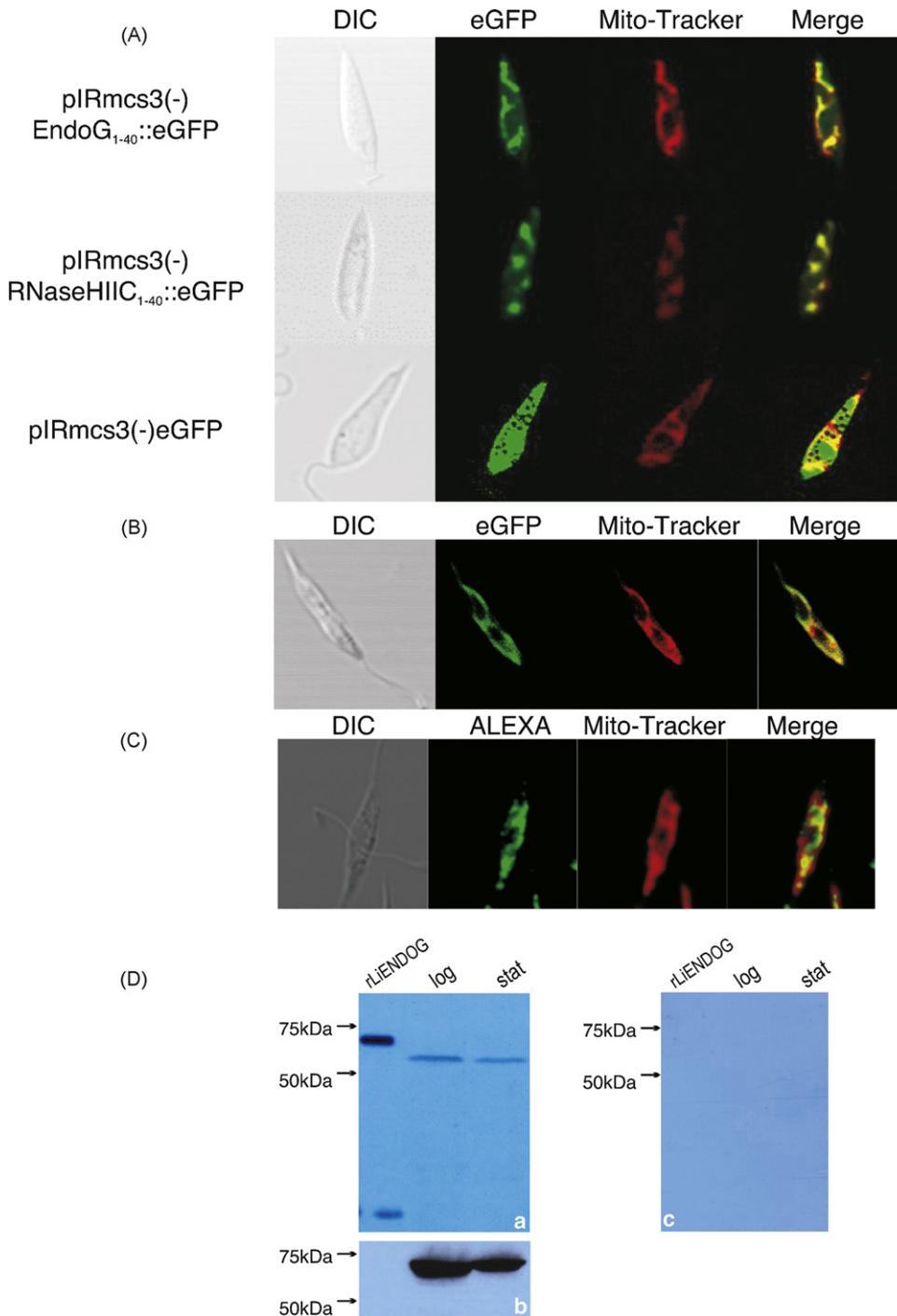


Fig. 4. EndoG localizes in the mitochondrion in *L. infantum*. (A) Confocal microscopy images of eGFP-labeled and Mito-Tracker Red-labeled *L. infantum* promastigotes. *DIC*: Differential interference contrast. *eGFP*: Green fluorescence associated to eGFP. *Mito-Tracker*: Red fluorescence associated to Mito-Tracker Red. *Merge*: eGFP and Mito-Tracker Red combined images. *pIRmcs3(-)EndoG₁₋₄₀::eGFP*: Parasites expressing the first 40 amino acids of *L. infantum* EndoG fused to eGFP. *pIRmcs3(-)RNaseHIIC₁₋₄₀::eGFP*: Parasites expressing the first 40 amino acids of *L. infantum* RNase HIIC fused to eGFP. *pIRmcs3(-)eGFP*: Parasites expressing eGFP without any signal peptide. (B) Confocal microscopy images of *L. infantum* promastigotes expressing the entire LiEndoG fused to eGFP. (C) Confocal microscopy images of *L. infantum* parasites stained with the mouse monoclonal anti-rLiEndoG antibody. *ALEXA*: Alexa-Fluor fluorescence associated to anti-rLiEndoG antibodies. *Merge*: anti-rLiEndoG antibodies and Mito-Tracker Red combined images. (D) Immunoblot with (a) monoclonal α -rLiEndoG to detect endogenous EndoG, (b) polyclonal α -LiHSP70 to detect endogenous Hsp70, or (c) monoclonal α -rabbit H-factor antibody as a negative control. *rLiEndoG*: *E. coli*-purified recombinant LiEndoG. *Log*: Logarithmically growing *L. infantum* promastigotes. *Stat*: *L. infantum* promastigotes in the stationary phase.

EndoG and the *Serratia* extracellular endonuclease seems to be the requirement of disulfide bonds for catalytic activity, as revealed by the inactivation of *L. infantum* EndoG by 2-mercaptoethanol treatment, an effect already described for the *Serratia* endonuclease [46]. This result raises the interesting possibility that the activity

of *L. infantum* nuclease can be subjected to redox regulation in a fashion similar to that postulated for the related extracellular nucleases from *S. marcescens* [39] and *V. vulnificus* [40].

It has been previously reported that expression of the EndoG protein from *L. major* was toxic in *E. coli*, which frustrated any

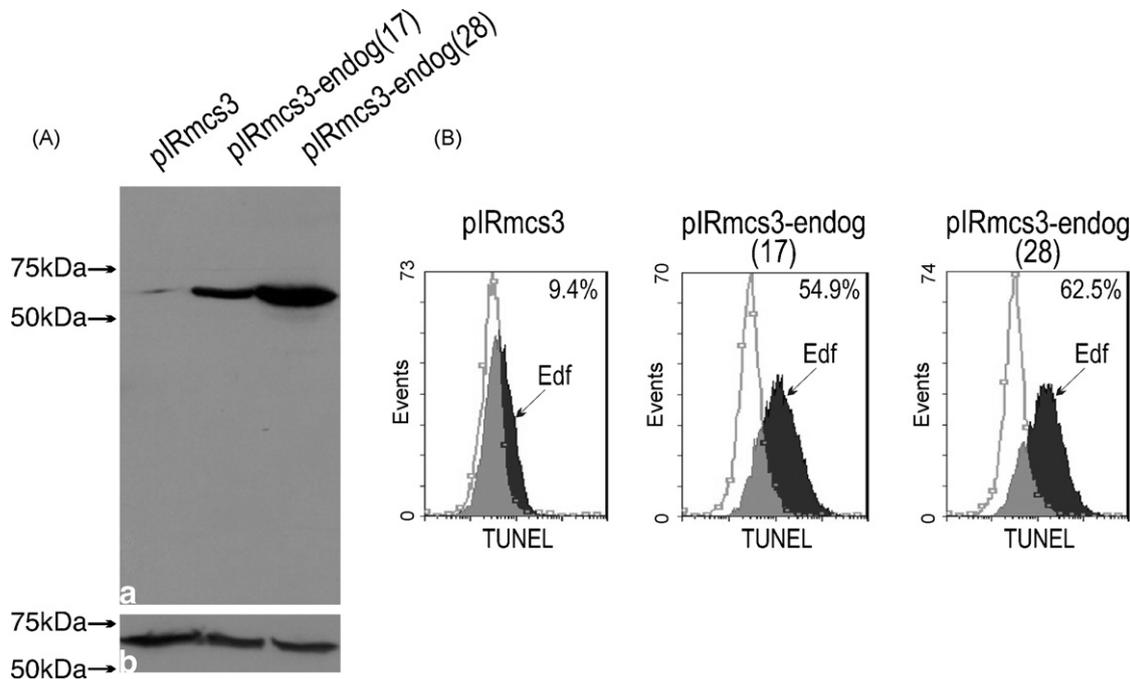


Fig. 5. Effect of overexpressing EndoG in *L. infantum* promastigotes. (A) Immunoblot of cellular extracts from parasites transfected with an empty pIRmcs3(-) vector or with pIRmcs3-endoG construction. (a) Monoclonal α -rLiEndoG antibody. (b) Polyclonal α -HSP70 antibodies. pIRmcs3: Parasites transfected with an empty pIRmcs3(-) vector. pIRmcs3-endoG(17): Isolated clone #17 from a pIRmcs3-endoG transfection. pIRmcs3-endoG(28): Isolated clone #28 from a pIRmcs3-endoG transfection. (B) TUNEL staining of untreated (empty histogram) or 30 μ M edelfosine-treated (filled histogram) *L. infantum* promastigotes.

attempts to purify this protein when expressed in bacteria [25]. The results presented in this paper show that, under our experimental conditions, *L. infantum* EndoG can be successfully expressed and subsequently purified as a recombinant protein in *E. coli*. We have observed that after induction of expression, this protein quickly aggregates and precipitates, which might be the reason why it does not cause any significant deleterious effects in the bacterial cells. This is also the reason why the protein had to be denatured in GuHCl in order to be purified on the Ni-NTA column.

Nuclease activity of the recombinant protein could be recovered by matrix-assisted refolding using a linear 6–1 M urea gradient. In common with findings for other EndoGs from several unicellular and multicellular eukaryotes [21], our results indicate that the nuclease activity of *L. infantum* EndoG requires divalent cations such as Mg^{2+} , Mn^{2+} or Co^{2+} . By contrast, Na^+ and, most importantly, K^+ ions show a strong inhibitory effect on the nuclease activity. Thus, 150 mM K^+ completely inhibited the activity of the purified rLiEndoG whereas, in order to achieve the same effect, Na^+ concentrations of 300 mM were required. According to Sen et al. [13], the intracellular K^+ ion concentration in healthy growing promastigotes is 140 mM, which means that EndoG activity should be almost completely repressed in these parasites. These authors also show that the K^+ concentration drops to 60 mM 3.5 h after treatment with camptothecin, a drug that induces PCD in *Leishmania* promastigotes. Our results demonstrate that EndoG nuclease activity is only slightly inhibited at 75 mM K^+ , which means that the described decrease in K^+ concentration in apoptotic parasites could contribute to inducing the activation of the nuclease activity of EndoG during apoptosis.

Endonuclease G is typically located in the mitochondrion of metazoans as a consequence of the presence of a signal peptide at its N-terminus. Analysis of the amino acid sequence of *L. infantum* EndoG, using the mitochondrial targeting sequence prediction algorithm implemented in the MITOPROT program, revealed a putative targeting sequence of about 25 amino acids. No signif-

icant similarity was found between this sequence and the one present in mammalian EndoGs, or between this sequence and the mitochondrial targeting sequence present at the N-terminus of *L. infantum* RNase HIIC, another well-characterized mitochondrial protein present in this parasite. Despite these sequence differences, but as predicted by the algorithm, the first 40 amino acid residues could direct eGFP to the single mitochondrion of *L. infantum*. Mitochondrial localization of the *L. infantum* EndoG was further confirmed by immunostaining techniques, using the antibodies raised against the recombinant protein expressed in *E. coli*.

The chimeric protein EndoG-eGFP and anti-rLiEndoG antibodies were used to track migration of the protein in response to treatment with edelfosine, a drug that has been shown to cause PCD in *Leishmania* promastigotes [47]. Under normal growth conditions, EndoG is completely absent from the nucleus and clearly located in the mitochondrion, an intracellular distribution that is reversed as a consequence of drug treatment. The results obtained after cell fractionation of control and edelfosine-treated parasites confirm this migration. Similar observations showing nuclear localization of *L. donovani* EndoG after treatment with the topoisomerase IB inhibitor baicalein, and an association of EndoG with LdFEN-1 and LdTATD-like nucleases during nuclear DNA degradation, has been recently published [48]. All of these observations are consistent with the expected role of EndoG during the PCD process and reinforce the idea that *Leishmania* EndoGs are orthologous to the EndoGs from higher eukaryotes. Mitochondrial localization and translocation to the nucleus upon PCD induction have also been described for the yeast EndoG ortholog Nuc1p [24].

Overexpression of EndoG in *L. infantum* promastigotes dramatically increases the percentage of TUNEL-positive cells in response to edelfosine treatment, strongly suggesting that EndoG participates in the molecular events that lead to PCD. A decrease in survival after sensitizing cells to apoptosis caused by low doses of H_2O_2 has also been demonstrated for yeast cells overexpressing Nuc1p [24]. Conversely, protection against baicalein-induced PCD was achieved

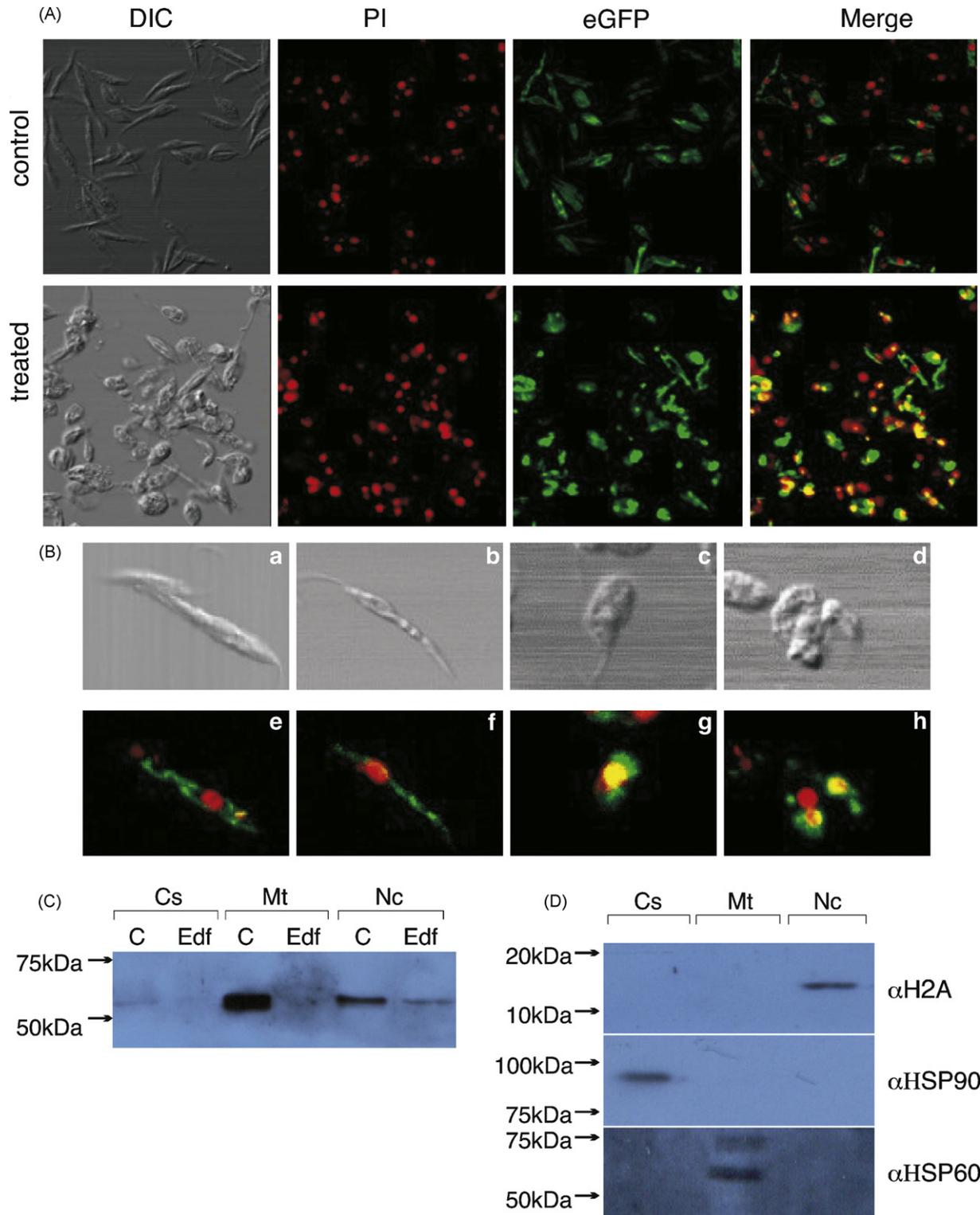


Fig. 6. EndoG translocates from the mitochondrion to the nucleus after cell death induction. (A) Confocal microscopy images of *L. infantum* promastigotes that express a chimeric protein resulting from the fusion of the complete EndoG and eGFP proteins. *DIC*: Differential interference contrast. *PI*: Red fluorescence associated to propidium iodide. *eGFP*: Green fluorescence associated to EndoG-eGFP fusion protein. *Merge*: EndoG-eGFP and PI combined images. Control: untreated control parasites. Treated: parasites treated with 40 μM edelfosine for 24 h. (B) High-magnification images of control and edelfosine-treated parasites. (a–d) DIC images. (e–h) Combined fluorescence images. (a and e) Untreated control promastigotes expressing EndoG-eGFP fusion protein (green signal) stained with PI (red signal). (b and f) Untreated control promastigotes incubated with monoclonal α-rLiEndoG antibody (green) and stained with PI (red signal). (c and g) 40 μM edelfosine-treated promastigotes expressing EndoG-eGFP fusion protein stained with PI. (d and h) 40 μM edelfosine-treated promastigotes incubated with monoclonal α-rLiEndoG antibody and stained with PI. The yellow signal in g and h reveals co-localization of the green and red fluorescence as a consequence of EndoG migration to the nucleus. (C) Immunoblot of cytosolic (Cs), mitochondrial (Mt) and nuclear (Nc) fractions of untreated (C) or 40 μM edelfosine-treated (Edf) *L. infantum* promastigotes. The blot was probed with the monoclonal α-rLiEndoG antibody. (D) Immunoblot of cytosolic (Cs), mitochondrial (Mt) and nuclear (Nc) fractions of untreated control *L. infantum* promastigotes. The blot was probed with antibodies against histone H2A (αH2A; nuclear fraction), or HSP90 [49] (αHSP90; cytosolic fraction), or HSP60 [50] (αHSP60; mitochondrial fraction).

after conditional antisense knockdown of EndoG in *L. donovani* [48].

In conclusion, the results presented in this paper demonstrate that *L. infantum* EndoG is an endonuclease able to degrade DNA in the presence of Mg²⁺, Mn²⁺ or Co²⁺ ions. Like the EndoGs from higher eukaryotes, *L. infantum* EndoG is inhibited by moderate K⁺ concentrations and also by slightly higher concentrations of Na⁺. Because of the existence of an N-terminal signal peptide, the protein localizes to the single mitochondrion of the parasite under normal growth conditions. However, in response to edelfosine treatment, *L. infantum* EndoG migrates from the mitochondrion to the nucleus. Furthermore, in the presence of this drug, overexpression of this protein causes a highly significant increase in the percentage of TUNEL-positive parasites. Our results, together with those presented by other authors [25,48], strongly support the conclusion that *Leishmania* parasites express an ortholog of mammalian EndoG that participates in the execution of the PCD process.

Acknowledgements

We thank Isabel Trabado for her assistance with confocal microscopy. We also thank Alberto Álvarez-Barrientos for his helpful discussions and Jose María Requena for providing anti-H2A antibodies. This work was supported by grants from Ministerio de Educación y Ciencia (SAF 2006-12713-CO2-02) and Comunidad de Madrid-Universidad de Alcalá (CCG07-UAH/AGR-21234).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.molbiopara.2008.09.007.

References

- [1] Piontkivska H, Hughes AL. Environmental kinetoplastid-like 18S rRNA sequences and phylogenetic relationships among Trypanosomatidae: paraphyly of the genus *Trypanosoma*. *Mol Biochem Parasitol* 2005;144(1):94–9.
- [2] Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001;95(3):239–43.
- [3] Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet* 1999;354(9185):1191–9.
- [4] Bailey MS, Lockwood DN. Cutaneous Leishmaniasis. *Clin Dermatol* 2007;25(2):203–11.
- [5] Duarte MI, Mariano ON, Corbett CE. Liver parenchymal cell parasitism in human visceral leishmaniasis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1989;415(1):1–6.
- [6] Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 2000;30(12–13):1269–81.
- [7] Horvitz HR, Shaham S, Hengartner MO. The genetics of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1994;59:377–85.
- [8] Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, et al. Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *Int J Oncol* 2002;21(1):165–70.
- [9] Vaux DL, Strasser A. The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(6):2239–44.
- [10] Ameisen JC, Idziorek T, Billaut-Mulot O, et al. Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Cell Death Differ* 1995;2(4):285–300.
- [11] van Zandbergen G, Bollinger A, Wenzel A, et al. Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(37):13837–42.
- [12] Paris C, Loiseau PM, Bories C, Breard J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(3):852–9.
- [13] Sen N, Das BB, Ganguly A, Mukherjee T, Bandyopadhyay S, Majumder HK. Camptothecin-induced imbalance in intracellular cation homeostasis regulates programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 2004;279(50):52366–75.
- [14] Zangger H, Mottram JC, Fasel N. Cell death in *Leishmania* induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis? *Cell Death Differ* 2002;9(10):1126–39.
- [15] Gonzalez JJ, Desponds C, Schaff C, Mottram JC, Fasel N. *Leishmania major* metacaspase can replace yeast metacaspase in programmed cell death and has arginine-specific cysteine peptidase activity. *Int J Parasitol* 2007;37(2):161–72.
- [16] Alzate JF, Alvarez-Barrientos A, Gonzalez VM, Jimenez-Ruiz A. Heat-induced programmed cell death in *Leishmania infantum* is reverted by Bcl-X (L) expression. *Apoptosis* 2006;11(2):161–71.
- [17] Prina E, Roux E, Mattei D, Milon G. *Leishmania* DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. *Microbes Infect* 2007;9(11):1307–15.
- [18] Nagata S. DNA degradation in development and programmed cell death. *Annu Rev Immunol* 2005;23:853–75.
- [19] Ishihara Y, Shimamoto N. Involvement of endonuclease G in nucleosomal DNA fragmentation under sustained endogenous oxidative stress. *J Biol Chem* 2006;281(10):6726–33.
- [20] Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 2001;412(6842):95–9.
- [21] Low RL. Mitochondrial Endonuclease G function in apoptosis and mtDNA metabolism: a historical perspective. *Mitochondrion* 2003;2(4):225–36.
- [22] Schafer P, Scholz SR, Gimadudinow O, et al. Structural and functional characterization of mitochondrial EndoG, a sugar non-specific nuclease which plays an important role during apoptosis. *J Mol Biol* 2004;338(2):217–28.
- [23] Parrish J, Li L, Klotz K, Ledwich D, Wang X, Xue D. Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature* 2001;412(6842):90–4.
- [24] Buttner S, Eisenberg T, Carmona-Gutierrez D, et al. Endonuclease G regulates budding yeast life and death. *Mol Cell* 2007;25(2):233–46.
- [25] Gannavaram S, Vedvyas C, Debrabant A. Conservation of the pro-apoptotic nuclease activity of endonuclease G in unicellular trypanosomatid parasites. *J Cell Sci* 2008;121(Pt 1):99–109.
- [26] Yokoyama WM, Christensen M, Dos Santos G, Miller D. Production of monoclonal antibodies. In: *Current protocols in immunology*, vol. 2.5. John Wiley & Sons; 2006. pp. 2.5.1–2.5.25.
- [27] Verma NK, Singh G, Dey CS. Miltefosine induces apoptosis in arsenite-resistant *Leishmania donovani* promastigotes through mitochondrial dysfunction. *Exp Parasitol* 2007;116(1):1–13.
- [28] Hoyer C, Zander D, Fleischer S, et al. A *Leishmania donovani* gene that confers accelerated recovery from stationary phase growth arrest. *Int J Parasitol* 2004;34(7):803–11.
- [29] Quijada L, Soto M, Alonso C, Requena JM. High-efficiency plating method for *Leishmania infantum*. *Mol Biochem Parasitol* 2003;130(2):139–41.
- [30] McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* 2000;16(4):404–5.
- [31] Jones DT, Bryson K, Coleman A, et al. Prediction of novel and analogous folds using fragment assembly and fold recognition. *Proteins* 2005;61(Suppl. 7):143–51.
- [32] Bennett-Lovsey RM, Herbert AD, Sternberg MJ, Kelley LA. Exploring the extremes of sequence/structure space with ensemble fold recognition in the program Phyre. *Proteins* 2007;70(3):611–25.
- [33] Shlyapnikov SV, Lunin VV, Perbandt M, et al. Atomic structure of the *Serratia marcescens* endonuclease at 1.1 Å resolution and the enzyme reaction mechanism. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2000;56(Pt 5):567–72.
- [34] Li CL, Hor LI, Chang ZF, Tsai LC, Yang WZ, Yuan HS. DNA binding and cleavage by the periplasmic nuclease Vvn: a novel structure with a known active site. *EMBO J* 2003;22(15):4014–25.
- [35] Wang YT, Yang WJ, Li CL, Doudeva LG, Yuan HS. Structural basis for sequence-dependent DNA cleavage by nonspecific endonucleases. *Nucleic Acids Res* 2007;35(2):584–94.
- [36] Miller MD, Cai J, Krause KL. The active site of *Serratia* endonuclease contains a conserved magnesium–water cluster. *J Mol Biol* 1999;288(5):975–87.
- [37] Ghosh M, Meiss G, Pingoud A, London RE, Pedersen LC. Structural insights into the mechanism of nuclease A, a betabeta alpha metal nuclease from *Anabaena*. *J Biol Chem* 2005;280(30):27990–7.
- [38] Ceroni A, Passerini A, Vullo A, Frascioni P. DISULFIND: a disulfide bonding state and cysteine connectivity prediction server. *Nucleic Acids Res* 2006;34(Web Server issue):W177–81.
- [39] Ball TK, Suh Y, Benedik MJ. Disulfide bonds are required for *Serratia marcescens* nuclease activity. *Nucleic Acids Res* 1992;20(19):4971–4.
- [40] Wu SL, Lo SK, Shao CP, Tsai HW, Hor LI. Cloning and characterization of a periplasmic nuclease of *Vibrio vulnificus* and its role in preventing uptake of foreign DNA. *Appl Environ Microbiol* 2001;67(1):82–8.
- [41] Misra S, Bennett J, Friew YN, et al. A type II ribonuclease H from *Leishmania* mitochondria: an enzyme essential for the growth of the parasite. *Mol Biochem Parasitol* 2005;143(2):135–45.
- [42] Das M, Mukherjee SB, Shaha C. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Cell Sci* 2001;114(Pt 13):2461–9.
- [43] Singh G, Jayanarayan KG, Dey CS. Novobiocin induces apoptosis-like cell death in topoisomerase II over-expressing arsenite resistant *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* 2005;141(1):57–69.
- [44] Ambit A, Fasel N, Coombs GH, Mottram JC. An essential role for the *Leishmania major* metacaspase in cell cycle progression. *Cell Death Differ* 2008;15(1):113–22.
- [45] Lee N, Gannavaram S, Selvapandiyam A, Debrabant A. Characterization of metacaspases with trypsin-like activity and their putative role in programmed cell death in the protozoan parasite *Leishmania*. *Eukaryot Cell* 2007;6(10):1745–57.
- [46] Filimonova MN, Balaban NP, Sharipova FP, Leshchinskaiya IB. Isolation and physico-chemical properties of homogenous nuclease from *Serratia marcescens*. *Biokhimiya* 1980;45(11):2096–104.

- [47] Alzate JF, Arias A, Mollinedo F, Rico E, de la Iglesia-Vicente J, Jimenez-Ruiz A. Edelfosine induces an apoptotic process in *Leishmania infantum* that is regulated by the ectopic expression of Bcl-XL and Hrk. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(10):3779–82.
- [48] Bosedasgupta S, Das BB, Sengupta S, et al. The caspase-independent algorithm of programmed cell death in *Leishmania* induced by baicalein: the role of LdEndoG, LdFEN-1 and LdTatD as a DNA 'degradesome'. *Cell Death Differ* 2008.
- [49] Brandau S, Dresel A, Clos J. High constitutive levels of heat-shock proteins in human-pathogenic parasites of the genus *Leishmania*. *Biochem J* 1995;310(Pt 1):225–32.
- [50] Schluter A, Wiesgigl M, Hoyer C, et al. Expression and subcellular localization of cpn60 protein family members in *Leishmania donovani*. *Biochim Biophys Acta* 2000;1491(1–3):65–74.