



Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

Los genes *HSP70* de *Leishmania*: importancia de la regulación traduccional y relevancia biológica del gen *HSP70-II*

Memoria para optar al grado de Doctor
Presentada por: *Cristina Folgueira Fernández*

Director: *José María Requena Rolanía*

Madrid, octubre de 2006

Agradecimientos

A lo largo de todos estos años han sido muchas las personas a las que he ido conociendo, y que de una forma u otra han contribuido a que hoy este trabajo sea una realidad. Me gustaría recordar y agradecer a todos ellas su colaboración y los buenos momentos pasados.

En primer lugar quiero expresar mi agradecimiento a mi director de tesis, el Dr. José María Requena, por la dirección y el apoyo científico que me ha brindado y por toda su ayuda a lo largo de estos años. Gracias por darme ánimos cuando las cosas no salían y por tu constante dedicación.

Al Dr. Carlos Alonso quiero agradecerle la oportunidad que me ofreció para entrar a formar parte del laboratorio, su apoyo y confianza.

Gracias de corazón al Dr. Luis Quijada, porque cuando empecé este trabajo fue él quien tuvo la paciencia de enseñarme de la mejor de las formas la mayor parte de las cosas que hoy sé de Biología Molecular. Gracias por transmitirme tu entusiasmo, optimismo y buen hacer. Gracias también porque siempre has estado dispuesto a escucharme y has sabido darme el mejor consejo en cada momento.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio y a aquellos, que aunque ya no están, en algún momento compartieron mesa conmigo: Daniel, Miguel Ángel, José Manuel, Ana Margarita, Salva, Ruth, Anabel, Alfonso, Paul, de todos he aprendido algo. Quiero recordar especialmente a Graci, por todos los buenos momentos que pasamos juntas y por su amistad desinteresada.

Al Dr. Manuel Soto gracias por todo lo que me ha enseñado.

A Victoria gracias por su eterno optimismo y su alegría tan contagiosa. Te deseo lo mejor para el futuro.

A Yago gracias por toda su ayuda con los temas informáticos y por todas las hamburguesas compartidas. Gracias por todas esas historias que tanto nos han hecho reír, por tu amistad y generosidad.

A Javier gracias por su ayuda y paciencia con los experimentos con animales, sin ti no habrían sido posibles los ensayos de infección en ratones. Gracias por ser un buen compañero y amigo, y porque con tu buen humor las cosas siempre parecen un poco mejores.

A Nuria quiero agradecerle toda la ayuda que me ha brindado a lo largo de estos años. Gracias por estar siempre tan pendiente de mi, por saber escucharme y aconsejarme, y por todos esos momentos de “ahora que estamos solas...”.

Gracias a todos los becarios y a todo el personal del CBMSO por aportar su granito de arena a este trabajo: Juan, Valentina y Conchi del Servicio de Cocinas y Lavado del CX, José Antonio del Servicio de Fotografía y personal de los Servicios de Microscopía, Animalario, Genómica, Citometría, Biblioteca, Compras, Instrumentación, Administración...

A Alberto Monteagudo del Servicio de Proteómica quiero agradecerle su paciencia a la hora de enseñarme la técnica de la electroforesis bidimensional, y a Jesús Revuelta del laboratorio CV-310, gracias por su inestimable ayuda en el fraccionamiento de los gradientes de sacarosa.

Gracias a la Dra. Carmen Cañavate y al Dr. José María Saugar por cederme la mayor parte de las cepas de *Leishmania* empleadas en este trabajo, y por su ayuda y asesoramiento en los ensayos de infección *in vitro*.

A Mada gracias por su inestimable ayuda con los asuntos de la burocracia y por recibirme siempre con una sonrisa. También quiero agradecer a Reyes su buen hacer y eficacia.

Tengo la gran suerte de contar en mi vida diaria con otras muchas personas que siempre han estado a mi lado, y que merecen también un recuerdo muy especial.

Gracias a todas mis amigas y amigos por todos los momentos maravillosos que hemos pasado juntos.

A mis padres gracias de corazón por todo el apoyo y el esfuerzo que han realizado para que yo llegara hasta aquí. Gracias por hacerme sentir que siempre puedo contar con vosotros, por cuidarme y quererme tanto.

A mi hermana Ana gracias por ayudarme siempre que lo he necesitado, por tu constante preocupación y por tu cariño. A Antonio gracias también por estar siempre dispuesto a echar una mano.

Gracias de todo corazón a Sergio, porque aunque ahora eres muy pequeño, espero que algún día al leer esto sepas lo importante que has sido para la “titi” durante los años de realización de esta tesis. Con tu inocencia y alegría todo ha sido un poco más fácil.

Gracias a mi abuela Josefa y a mi abuelo Benedicto, que ya no están conmigo, por todo lo que me han querido, y a mi abuela Asunción por ser siempre tan cariñosa conmigo.

Quiero recordar también al resto de mi familia, a todos mis tíos y primos por vuestro cariño y afecto, y a mi otra familia de Leganés por su cariño y aceptación.

A Raúl gracias por querer compartir conmigo todos estos años, por escucharme, por tu comprensión, por tu constante apoyo y por hacerme reír en los malos momentos. Gracias por hacerme tan feliz, sin ti todo esto no tendría sentido.

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación del Ministerio de Educación y Ciencia a través de su programa de becas “Formación del Profesorado Universitario” (Febrero 2003 – Septiembre 2006).

A mis padres

A Raúl

ÍNDICE

Abreviaturas	1
Summary	5
1. Introducción	9
1.1. <i>Leishmania</i> y leishmaniosis	11
1.1.1. Ciclo biológico y estructura del parásito	11
1.1.2. Interacción <i>Leishmania</i> -célula hospedadora	12
1.1.3. Clasificación filogenética y origen evolutivo	13
1.1.4. Leishmaniosis: distribución geográfica e incidencia	13
1.1.5. Profilaxis y tratamiento	15
1.2. Organización y expresión génica en <i>Leishmania</i>	15
1.2.1. El proyecto genoma de <i>Leishmania</i>	15
1.2.2. Organización génica	16
1.2.3. Transcripción y procesamiento de los transcritos	17
1.2.3.1. Transcripción policistronica	17
1.2.3.2. <i>Trans-splicing</i> y poliadenilación	18
1.2.4. Regulación de la expresión génica	19
1.2.4.1. Regulación a nivel de la maduración del ARN	20
1.2.4.2. Cambios en la estabilidad del ARN	20
1.2.4.3. Regulación traduccional y postraduccional	21
1.2.4.4. Regulación por mecanismos de amplificación génica	22
1.3. Respuesta al choque térmico	22
1.3.1. Características generales de la respuesta al choque térmico	22
1.3.2. Proteínas de choque térmico	23
1.3.2.1. Función como chaperonas moleculares	23
1.3.2.2. Principales familias de HSPs	24
1.4. La respuesta al choque térmico en <i>Leishmania</i>	26
1.4.1. Importancia del choque térmico en el ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	26
1.4.2. Genes de choque térmico en <i>Leishmania</i>	27
1.4.2.1. Organización y expresión génica	27
1.4.2.2. La familia HSP70 en <i>Leishmania</i>	29
2. Objetivos	31

3. Materiales y métodos	35
3.1. Productos, enzimas y soluciones	37
3.2. Material biológico	37
3.2.1. Bacterias	37
3.2.2. Parásitos	37
3.2.3. Animales de experimentación	37
3.2.4. Líneas celulares	37
3.3. Vectores de clonaje	38
3.4. Clones empleados	38
3.4.1. Clones con el gen reportero <i>CAT</i>	38
3.4.2. Clones pHAHSP70-II _s y pHAHSP70-II _{as}	39
3.4.3. Clon pNeo-II	40
3.4.4. Clon pHyg-II	41
3.5. Sondas de ADN y oligonucleótidos	41
3.6. Medios y condiciones de cultivo	42
3.6.1. Medio Luria-Bertani (LB)	42
3.6.2. Medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute)	42
3.6.3. Medio Schneider's	42
3.6.4. Medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) –(Met,Cys)	42
3.7. Técnicas de manipulación de ADN	42
3.7.1. Aislamiento de ADN de plásmidos	42
3.7.2. Aislamiento de ADN genómico de <i>Leishmania</i>	42
3.7.3. Cuantificación de ADN	43
3.7.4. Preparación y transformación de células competentes	43
3.7.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	43
3.7.6. Secuenciación de ADN	43
3.7.7. Transfección de promastigotes de <i>Leishmania</i>	43
3.7.8. Electroforesis de ADN y transferencia a membrana (<i>Southern blot</i>)	44
3.7.9. Marcaje radiactivo de ADN de doble cadena	44
3.7.10. Marcaje radiactivo de oligonucleótidos	44
3.7.11. Hibridaciones	44
3.8. Técnicas de manipulación de ARN	45
3.8.1. Aislamiento de ARN de <i>Leishmania</i>	45
3.8.2. Cuantificación y análisis de ARN	45
3.8.3. Electroforesis de ARN y transferencia a membrana (<i>Northern blot</i>)	45
3.8.4. Hibridaciones	46
3.8.5. Análisis de las fracciones polisómicas en gradientes de sacarosa	46

3.9. Técnicas de manipulación de proteínas	46
3.9.1. Extracción de proteínas totales de <i>Leishmania</i>	46
3.9.2. Cuantificación de proteínas	47
3.9.3. Marcaje radiactivo de proteínas de nueva síntesis en <i>Leishmania</i>	47
3.9.4. Ensayos de inmunoprecipitación	47
3.9.5. Electroforesis de proteínas y transferencia a membranas (<i>Western blot</i>)	47
3.9.6. Electroforesis bidimensional (EF-2D)	48
3.9.6.1. Preparación de los extractos proteicos	48
3.9.6.2. Primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF)	48
3.9.6.3. Segunda dimensión: PAGE-SDS	49
3.9.6.4. Fluorografía	49
3.10. Ensayos de infección <i>in vitro</i>	49
3.10.1. Activación de la línea promonocitos humanos U937	49
3.10.2. Infección de monocitos con promastigotes de <i>Leishmania</i>	49
3.10.3. Tinción con Giemsa	50
3.11. Ensayos de infección <i>in vivo</i>	50
3.11.1. Infección de ratones BALB/c	50
3.11.2. Estimación de la carga parasitaria: ensayos de dilución límite	50
3.12. Ensayos de citometría de flujo	50
3.12.1. Tinción de promastigotes de <i>Leishmania</i> con CFSE	50
3.12.2. Análisis de ciclo celular	51
3.13. Ensayos de ELISA	51
3.14. Análisis cuantitativo	51
4. Resultados	53
4.1. Mecanismos de regulación de la expresión de los genes <i>HSP70</i> de <i>L. infantum</i> durante el choque térmico	55
4.1.1. Expresión de los genes <i>HSP70</i> de <i>L. infantum</i> durante el choque térmico	55
4.1.2. La proteína <i>HSP70</i> se traduce activamente en respuesta al choque térmico	55
4.1.3. Análisis de los perfiles polisómicos de los mensajeros <i>HSP70-I</i> y <i>HSP70-II</i>	58
4.2. Análisis de posibles regiones reguladoras en los genes <i>HSP70</i>	61
4.2.1. Análisis del papel de las regiones UTR: construcciones plasmídicas con el gen reportero <i>CAT</i>	62
4.2.1.1. Regulación de los ARNm <i>CAT</i> en las líneas <i>CAT-I</i> y <i>CAT-II</i>	62
4.2.1.2. Expresión de la proteína <i>CAT</i> durante el choque térmico	63

4.2.1.3. Perfiles polisómicos de los ARNm <i>CAT</i>	65
4.2.2. Influencia de la región codificante <i>HSP70</i> : construcciones plasmídicas pHAHSP70	67
4.2.2.1. Regulación de los mensajeros <i>HAHSP70-II</i>	67
4.2.2.2. Expresión de la proteína HAHSP70 durante el choque térmico	68
4.2.2.3. Análisis de los perfiles polisómicos de los ARNm <i>HAHSP70-II</i>	71
4.3. Obtención de una línea de <i>L. infantum</i> deficiente para el gen <i>HSP70-II</i>	73
4.3.1. Regulación de los genes <i>NEO</i> e <i>HYG</i> durante el choque térmico en la línea <i>Δhsp70-II</i>	74
4.3.1.1. Expresión de los ARNm <i>NEO</i> e <i>HYG</i>	74
4.3.1.2. Expresión de la proteína HSP70 durante el choque térmico en la línea <i>Δhsp70-II</i>	75
4.3.1.2.1. Análisis de la expresión de la proteína HSP70 mediante electroforesis bidimensional	77
4.3.1.3. Análisis de los perfiles polisómicos de los ARNm <i>NEO</i> e <i>HYG</i> durante el choque térmico	78
4.3.2. Caracterización fenotípica de la línea <i>Δhsp70-II</i>	80
4.3.2.1. Crecimiento de los promastigotes <i>Δhsp70-II</i> en cultivo	80
4.3.2.2. Análisis del ciclo celular	82
4.3.2.3. Capacidad infectiva de la línea <i>Δhsp70-II</i>	85
4.3.2.3.1. Ensayos de infección <i>in vitro</i>	86
4.3.2.3.2. Ensayos de infección <i>in vivo</i>	88
4.4. Caracterización del locus <i>HSP70</i> en distintas especies de <i>Leishmania</i>	90
4.4.1. Organización genómica del locus <i>HSP70</i> en <i>Leishmania</i>	90
4.4.2. Expresión de los transcritos <i>HSP70</i> durante el choque térmico	93
4.4.3. Expresión de la proteína HSP70 durante el choque térmico	94
5. Discusión	97
5.1. Regulación de los genes <i>HSP70</i> de <i>L. infantum</i> durante el choque térmico	99
5.2. El gen <i>HSP70-II</i> de <i>L. infantum</i> y su importancia en diferentes procesos biológicos del parásito	105
5.3. Organización del locus <i>HSP70</i> en <i>Leishmania</i>	108

6. Conclusiones	111
7. Bibliografía	115
8. Anexo (artículos publicados con resultados de esta Tesis Doctoral)	133

ABREVIATURAS

ADN:	ácido desoxirribonucleico.
ADNc:	ADN complementario.
ARN:	ácido ribonucleico.
ARNm:	ARN mensajero.
ARNr:	ARN ribosomal.
ARNt:	ARN de transferencia.
BSA:	albúmina de suero bovino.
°C:	grados centígrados.
CAT:	cloranfenicol acetiltransferasa.
CBMSO:	Centro de Biología Molecular Severo Ochoa.
CD:	región codificante.
CFSE:	carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster.
Ci:	curios.
col.:	colaboradores.
cpm:	cuentas por minuto.
Cys:	cisteína.
DMEM:	medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium.
DMSO:	dimetil-sulfóxido.
DTT:	ditiotreitól.
EDTA:	ácido etilendiaminotetracético.
EF-2D:	electroforesis bidimensional.
ELISA:	del inglés <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> .
FCS:	suero fetal bovino (del inglés, <i>Fetal Calf Serum</i>) .
Fig.:	figura.
g:	aceleración de la gravedad.
GA:	Geldanamicina A.
h:	hora.
HA:	epítopo de la hemaglutinina HA-1 del virus de la gripe humana.
HSE:	elemento de choque térmico (del inglés, <i>Heat Shock Element</i>).
HSF:	factor de transcripción de choque térmico (del inglés, <i>Heat Shock Factor</i>).
HSP:	proteína de choque térmico (del inglés <i>Heat Shock Protein</i>).
HYG:	higromicina.
IEF:	isoelectroenfoque.
Ig:	inmunoglobulina.
IPG:	del inglés, <i>Immobilized pH gradient</i> .
IPTG:	iso-propil-tiogalactósido.
Kb:	kilobases.
KDa:	kilodalton.
LB:	medio de cultivo Luria-Bertani.
LC:	leishmaniosis cutánea.
LCD:	leishmaniosis cutánea difusa.
LDPK:	leishmaniosis dérmica post <i>kala azar</i> .
LMC:	leishmaniosis mucocutánea.
LPG:	lipofosfoglicano.
LV:	leishmaniosis visceral.
M:	molar.
Mb:	megabases.
mg:	miligramos.
medARN:	ARN del miniexón (del inglés, <i>mini-exon-derived ARN</i>).
Met:	metionina.

Abreviaturas

min.:	minutos.
ml:	mililitros.
mM:	milimolar.
µg:	microgramos.
µl:	microlitros.
µM:	micromolar.
µm:	micrometros.
NEO:	neomicina.
ng:	nanogramos.
nm:	nanometros.
nt:	nucleótidos.
OMS:	Organización Mundial de la Salud.
OPD:	ortofenilenediamina.
ORF:	marco de lectura abierto (del inglés, <i>Open Reading Frame</i>).
PAGE-SDS:	electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.
p/v:	peso/volumen.
pb:	pares de bases.
PBS:	tampón fosfato salino.
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i>).
PMA:	forbol-12-miristato-13-acetato.
PMSF:	fenil-metil-sulfonil fluoruro.
PPO:	2,5- difenil oxazol.
PT:	proteína total.
RE:	retículo endoplasmático.
rpm:	revoluciones por minuto.
RPMI:	medio Roswell Park Memorial Institute.
SDS:	dodecil sulfato sódico.
seg.:	segundos.
sHSP:	proteína de choque térmico de bajo peso molecular (del inglés, <i>small Heat Shock Protein</i>).
SIDA:	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.
t:	tiempo.
T:	temperatura.
TAE:	Tris-Acético-EDTA.
U:	unidades.
UTR:	región no traducida (del inglés <i>UnTranslated Region</i>).
UV:	ultravioleta.
V:	voltios.
V/h:	voltios/hora.
VIH:	Virus de Inmunodeficiencia Humana.
v/v:	volumen/volumen.
X-Gal:	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido.

Los términos ingleses sin clara traducción al castellano y de frecuente utilización en Biología Molecular se han escrito en cursiva.

SUMMARY

Protozoan parasites of the genus *Leishmania* are aetiological agents of leishmaniasis, one of the major health problems worldwide. During its digenetic life cycle, *Leishmania* is exposed to environmental changes, including a temperature shift, which is believed to be a triggering factor affecting gene expression and promoting stage differentiation. This temperature upshift encountered by *Leishmania* promastigotes in the mammalian host induces a typical heat-shock response, but due to the absence of transcriptional control in these organisms, *Leishmania* does not respond to heat shock by increasing the transcription of genes coding for heat shock proteins (HSPs). Instead, the regulation of the heat shock response occurs exclusively at the post-transcriptional level and often involves sequences within the 3'-untranslated regions (3'UTR) of mRNAs that modulate RNA stability and/or translational efficiency.

The *HSP70* locus in *L. infantum* is composed by six copies arranged in a head-to-tail tandem differing in their 3'UTRs. Although all genes are transcribed at similar rates, the abundance of the mRNAs derived from *HSP70* genes 1 to 5 (*HSP70-I*) increases following heat shock, while the mRNAs derived from *HSP70* gene 6 (*HSP70-II*) remain unaffected. We have demonstrated that exposing *L. infantum* promastigotes to heat shock temperatures leads to an increase in the *de novo* synthesis of HSP70. Thus, a 5-fold increase was detected after 1 hour of incubation at 37°C when compared with HSP70 synthesis rate at 26°C. Furthermore, a 3-fold increase in the synthesis of HSP70 was detected in promastigotes incubated at 39°C, which represents a severe heat shock temperature. To investigate the contribution of both types of *HSP70* genes to the enhanced synthesis of HSP70 during heat shock, we have investigated the translational efficiencies of *HSP70-I* and *HSP70-II* transcripts at the temperatures that the parasite encounters in the insect (26°C) and in the mammalian host (37°C). Interestingly, the *HSP70-I* transcripts were found associated with ribosomes at normal and heat shock temperatures, whereas the *HSP70-II* transcripts are bound to ribosomes only at heat shock temperatures. To analyze the function of UTRs in the *HSP70* gene regulation, we created a set of plasmid constructs. Our data indicate that the elements responsible of the translational control are localized in the 3'UTRs. Thus, the 3'UTR of *HSP70-II* gene is involved in the translational silencing of *HSP70-II* transcripts at 26°C. Furthermore, a null mutant for both *HSP70-II* alleles was created by targeted disruption ($\Delta hsp70-II$). This mutant synthesizes HSP70 at a lower rate than the wild type parasites. Overall, our data suggest that the role of the *HSP70-II* gene is to top up HSP70 levels under conditions of stress.

Important implications of *HSP70-II* gene have been uncovered after characterization of the $\Delta hsp70-II$ mutant line. These mutant parasites have morphological alterations, cell cycle distortion and a retarded growth when arriving the stationary phase. *Leishmania* promastigotes lacking the *HSP70-II* gene are able to invade monocytes but, inside the cells, they proliferate at a lower rate than the wild type parasites. Moreover, when the mutant parasites were inoculated into six BALB/c mice, only in two of them the infection was established, and the parasite load in the infected animals was lower than that one detected in mice infected with the wild type parasites.

Finally, we have analyzed the organization and expression of the *HSP70* locus in representative *Leishmania* species. The organization of the *HSP70* loci was found to be well conserved between *L. infantum* and the other species analyzed, with the exception of *L. braziliensis* that showed the most divergent organization. The two types of *HSP70* genes were present in all *Leishmania* species except for *L. braziliensis* that lacks the *HSP70-II* gene. Based on the polymorphisms in the *HSP70* loci is possible to differentiate the Old and New World species within the subgenus *Leishmania*. The expression analysis indicated that the temperature-dependent accumulation of the *HSP70-I* mRNAs is also conserved among *Leishmania* species except for *L. braziliensis*. However, in this species the analysis of the

Summary

HSP70 synthesis revealed that the *HSP70* mRNAs are also preferentially translated at heat shock temperatures.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Leishmania* y leishmaniosis

Las primeras alusiones a la enfermedad producida por *Leishmania* datan de los siglos XV y XVI, cuando se hace referencia a las úlceras cutáneas que presentaban los agricultores que regresaban de la zona de los Andes. En 1901, Sir William Boog Leishman detectó el parásito en biopsias viscerales y cutáneas de enfermos de la India, y en el aparato digestivo de los flebotomos. Años más tarde, en 1903, el capitán Charles Donovan confirmó el hallazgo, y posteriormente Ronald Ross relacionó estos organismos como causa del *kala-azar*, denominándolos *Leishmania donovani* (<http://www.who.int/topics/leishmaniasis/es/>).

1.1.1. Ciclo biológico y estructura del parásito

Los parásitos del género *Leishmania* son organismos unicelulares que tienen como característica sobresaliente el poseer una estructura denominada kinetoplasto. Éste se localiza en uno de los extremos de la única mitocondria que poseen, y se trata de una masa de ADN mitocondrial formada por una compleja red de maxicírculos y minicírculos de ADN. Morfológicamente, el parásito alterna en su ciclo biológico entre dos formas: el promastigote y el amastigote. La forma promastigote es de vida extracelular, posee flagelo y es alargada, con una longitud de 15-20 μm incluyendo el flagelo. Por el contrario, el amastigote es de vida intracelular, carece de flagelo y tiene forma redondeada, midiendo de 2-5 μm .

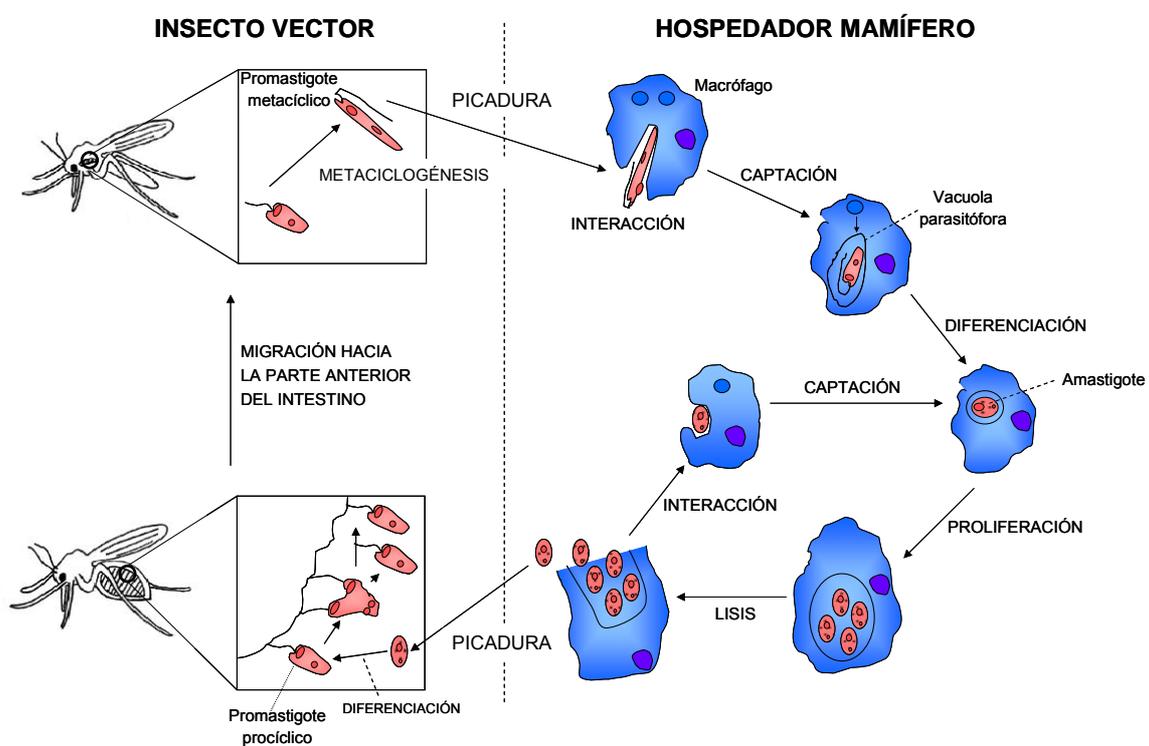


Figura 1. Representación esquemática del ciclo de vida de *Leishmania*.

El ciclo de vida de *Leishmania* es digenético, alternando entre un hospedador mamífero y un insecto vector (Fig. 1). El hospedador mamífero suele ser un cánido, roedor, simio o el hombre. El vector encargado de la transmisión del parásito son las hembras

hematófagas de insectos dípteros del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo, y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo, conociéndoseles vulgarmente como moscas de la arena o moscas jorobadas. Se ha demostrado que existe una especificidad significativa en la interacción entre el parásito y el insecto vector, así ciertas especies de *Leishmania* solamente pueden ser transmitidas por determinadas especies de *Phlebotomus* (Handman, 1999). La forma infectiva del parásito recibe el nombre de promastigote metacíclico (Sacks, 1989), y es inoculada en el mamífero mediante la picadura del insecto. El parásito infecta células del sistema mononuclear fagocítico, incluyendo macrófagos, monocitos y células de Langerhans, en las que penetra a través de la interacción con receptores de membrana. Las principales moléculas presentes en la superficie de los promastigotes infectivos responsables de la interacción con el macrófago son el lipofosfoglicano (LPG) y la metaloproteasa GP63 (Alexander y col., 1999). Una vez dentro de la célula, el promastigote queda englobado en una vacuola parasitófora donde se transforma en la forma amastigote en respuesta a los estímulos que recibe (Rittig y Bogdan, 2000). Los amastigotes, en el interior de las células, ponen en marcha toda una serie de mecanismos que les permiten eludir su destrucción por parte de la célula hospedadora, tales como: modulación de la producción de citoquinas, inhibición de la presentación antigénica y bloqueo de las moléculas co-estimuladoras necesarias para la activación de células T específicas de antígeno (revisado por Handman, 1999). Los amastigotes se multiplican en el interior de la vacuola parasitófora hasta provocar la lisis de la célula hospedadora, propagándose así la infección. Cuando el mamífero infectado es picado de nuevo por un insecto vector, los macrófagos infectados pasan al intestino del insecto donde son destruidos, liberándose así los amastigotes que se diferencian en promastigotes procíclicos. Éstos se multiplican activamente provocando la propagación del parásito en el intestino del insecto (Schlein, 1993). Tras 7-8 días, y después de pasar por varios estados morfológicos (Bates y Rogers, 2004), los promastigotes migran hacia la faringe donde se transforman finalmente en promastigotes metacíclicos no replicativos, pero con una elevada capacidad de infección (Sacks, 1989). El ciclo se completa cuando las formas metacíclicas son inoculadas en el mamífero mediante la picadura del insecto.

1.1.2. Interacción *Leishmania*-célula hospedadora

Para que la infección por *Leishmania* se establezca con éxito en el mamífero, los promastigotes metacíclicos, inoculados por el insecto, deben ser capaces de interaccionar y penetrar en los macrófagos, así como evitar su destrucción eludiendo la respuesta inmunológica innata desencadenada ante su presencia (revisado por Cunningham, 2002). La primera barrera que debe superar *Leishmania* es el sistema del complemento, sin embargo, *Leishmania* no solo es capaz de resistir la lisis del complemento, sino que utiliza algunos de sus componentes para conseguir la entrada en los macrófagos. La resistencia de los promastigotes metacíclicos a la lisis se debe a las modificaciones que sufren las moléculas de lipofosfoglicano en estas formas del parásito; así, la densa cubierta de LPG presente en las formas metacíclicas impide la penetración del complejo de ataque a membrana C5-C9 (Puentes y col., 1990). Por otro lado, en los parásitos metacíclicos existe una elevada expresión de la metaloproteasa GP63 que también inhibe la lisis mediada por el complemento, al escindir C3b en la forma inactiva C3bi (Brittingham y Mosser, 1996).

La principal célula hospedadora de *Leishmania* son los macrófagos, que cumplen un doble papel en la infección cursada por el parásito. Por un lado, el establecimiento de la infección depende de que el parásito sea fagocitado por los macrófagos, y por otra parte, el macrófago es la principal célula implicada en su destrucción. La interacción del parásito con el macrófago está mediada por un gran número de receptores. Tanto el LPG (Handman y

Goding, 1985), como la GP63 (Russell y Wilhelm, 1986) interaccionan directamente con el receptor CR3 del macrófago. Además, los receptores de complemento CR1 y CR3 interaccionan con los componentes del complemento C3b y C3bi, respectivamente, asociados a la membrana del parásito (Mosser y col., 1992). La unión está también mediada por otros receptores (Alexander y col., 1999), como el receptor manosa-fucosa, el receptor de fibronectina y los receptores de la fracción constante de las inmunoglobulinas (Fc γ R).

1.1.3. Clasificación filogenética y origen evolutivo

Los organismos del género *Leishmania* presentan un origen muy temprano en la evolución de los eucariotas. Su clasificación taxonómica ha sido revisada recientemente (Moreira y col., 2004) y es la siguiente:

Phylum: *Euglenozoa* (Cavalier-Smith, 1981)

Clase: *Kinetoplastea* (Vickerman, 1976)

Subclase: *Metakinetoplastina* (Moreira, 2004)

Orden: *Trypanosomatida* (Kent, 1880; Hollande, 1952)

Género: *Leishmania* (Ross, 1903)

Subgénero: *Leishmania* (Ross, 1903)

Subgénero: *Viannia* (Lainson y Shaw, 1987)

Se ha estimado que el linaje de los tripanosomátidos surgió en el escenario evolutivo hace aproximadamente 500 millones de años, en la misma época en que aparecieron los vertebrados (Maslov y Simpson, 1995). El origen de los diferentes estilos de vida parasitaria ha constituido un tema de gran controversia; mientras algunas teorías defienden la aparición de los parásitos digenéticos a partir de los monogénéticos, otras postulan la evolución de los parásitos digenéticos a partir de los organismos de vida libre, dando lugar de forma secundaria a los parásitos monogénéticos. Sin embargo, Fernandes y colaboradores (1993) proponen un modelo según el cual el parasitismo digenético habría surgido en varios momentos a lo largo del curso de la evolución.

En cuanto al origen del género *Leishmania* se propone que es diferente para cada uno de los subgéneros en los que se divide. Así, mientras el subgénero *Leishmania* habría surgido en África, el subgénero *Viannia* tendría origen neotropical, y la actual distribución de las distintas especies del subgénero *Leishmania* en el Neotrópico se explicaría como el resultado de múltiples introducciones de los parásitos en el Nuevo Mundo (Momen y Cupolillo, 2000).

1.1.4. Leishmaniosis: distribución geográfica e incidencia

La infección en humanos por parásitos del género *Leishmania* produce un amplio espectro de manifestaciones clínicas conocidas globalmente como leishmaniosis. Las distintas manifestaciones son debidas a la especie del parásito causante de la enfermedad, al estado de inmunocompetencia del hospedador, y a la variabilidad genética de los individuos afectados. Este conjunto de síndromes es producido por una veintena de especies de *Leishmania*, que son transmitidas por unas 30 especies de insectos vectores de la subfamilia *Phlebotominae* (Ashford, 2000). Las leishmaniosis son principalmente zoonosis en las que el hombre resulta infectado de forma accidental, siendo los principales reservorios naturales de la enfermedad roedores y cánidos.

La leishmaniosis está considerada en la categoría I de las enfermedades infecciosas (situación emergente e incontrolada) por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Según esta misma fuente existen 12 millones de personas infectadas en el mundo, describiéndose cada año alrededor de 2 millones de casos nuevos. Aproximadamente la décima parte de la población mundial está en riesgo de infección. Se trata de una enfermedad endémica en 66 países del Viejo Mundo y en 22 países del Nuevo Mundo.

De acuerdo a las manifestaciones clínicas de la enfermedad en humanos, las leishmaniosis se clasifican en cinco grupos:

- Leishmaniosis cutánea (LC) o Botón de Oriente: es causada por *L. major*, *L. tropica* y *L. aethiopica* en el Viejo Mundo, y por *L. mexicana* y *L. braziliensis* en el Nuevo Mundo. Es la forma más común y menos grave de la enfermedad, y se caracteriza por la formación de lesiones, normalmente localizadas en el punto inicial de la infección, que dan lugar a una pápula ulcerada. Generalmente estas lesiones curan espontáneamente transcurridos de tres a seis meses desde su aparición, aunque dejan cicatrices permanentes en los pacientes. Más del 90% de los casos de LC ocurren en Irán, Siria, Afganistán, Arabia Saudí, Brasil y Perú (OMS, 2003).
- Leishmaniosis visceral (LV) o kala-azar: los agentes causantes de esta enfermedad son *L. donovani* en África y Asia, *L. infantum* en la zona del Mediterráneo, y *L. chagasi* en América latina. Se trata de la forma más grave de la enfermedad, ya que puede ser mortal en el 75-95% de los casos si no se aplica tratamiento. La infección cursa de manera asintomática en la mayoría de los casos, sin que se observen lesiones en el punto de la infección, pero cuando se desarrolla la enfermedad, los afectados experimentan fiebre y sufren caquexia severa, hepatoesplenomegalia, anemia e hipergammaglobulinemia. La mayor parte de los casos de LV ocurren en Bangla Desh, Brasil, India y Sudán (OMS, 2003).
- Leishmaniosis mucocutánea (LMC) o espundia: es la enfermedad causada por la especie *L. braziliensis* y se localiza fundamentalmente en los países de América latina. La LMC aparece tras la aparente curación de la LC, incluso años después, y se produce debido a una metástasis de los parásitos hacia las mucosas nasofaríngeas que son destruidas produciendo graves desfiguraciones.
- Leishmaniosis cutánea difusa (LCD): causada por la infección de *L. mexicana* y *L. amazonensis*. La incidencia de la LCD está restringida a la cuenca del Amazonas y América Central. Se caracteriza por la presencia de numerosas lesiones diseminadas y crónicas en la piel, similares a las producidas por la lepra.
- Leishmaniosis dérmica post kala-azar (LDPK): es causada por *L. donovani* y se desarrolla en algunas personas tras la cura inicial de la LV producida por la misma especie. Se manifiesta por la aparición de lesiones deformantes, y la mayoría de los casos ocurren en la India.

En los últimos años se han incrementado considerablemente los casos de coinfección del virus del SIDA (VIH) y *Leishmania*. Los dos patógenos actuarían de forma sinérgica, favoreciendo la infección recíproca, lo que trae como consecuencia una mayor inmunosupresión y la progresión más rápida de ambas enfermedades (Wolday y col., 1999). Se estima que en los enfermos de SIDA el riesgo de contraer LV se incrementa de 100 a 1000 veces en regiones endémicas. La mayor frecuencia en los casos de coinfección se da en Brasil

y sobre todo en el sudoeste europeo, donde se detectaron 1440 (835 en España) de los 1700 primeros casos descritos de coinfección. La consecuencia de este hecho es una alteración en los patrones epidemiológicos de la leishmaniosis, ya que el SIDA al provocar la inmunosupresión de los enfermos, incrementa el riesgo de desarrollar LV en personas infectadas con el parásito, que en condiciones inmunológicas adecuadas se mantendrían asintomáticas (Alvar y col., 1997).

En España, la especie presente es *L. infantum*, siendo la LV una enfermedad endémica en la Península Ibérica. Además, la incidencia de la infección por *L. infantum* en cánidos es muy elevada, siendo este animal el principal reservorio (Moreno y Alvar, 2002).

1.1.5. Profilaxis y tratamiento

Las principales medidas de control recomendadas por la OMS para combatir la leishmaniosis son la detección eficaz de los casos y la aplicación del tratamiento adecuado en los casos en que esté indicado. Las dos vías que centran los esfuerzos para evitar la transmisión de la enfermedad son las siguientes (Murray y col., 2005):

- Control de la transmisión. Por un lado, la fumigación de las casas con insecticidas para impedir la entrada de los insectos podría reducir el riesgo de leishmaniosis cutánea, si bien estos programas de fumigación son insostenibles en la mayoría de las áreas endémicas. Por otro lado, en los casos de leishmaniosis visceral, dado que son infecciones fundamentalmente zoonóticas, los esfuerzos se dirigen hacia el control de los animales reservorios de la enfermedad para impedir su transmisión a los humanos.
- Vacunas. Hasta el momento han sido probados experimentalmente numerosos candidatos a vacunas y estrategias de vacunación: vacunas con parásitos vivos y muertos, vacunas basadas en fracciones purificadas de *Leishmania* y antígenos recombinantes (Requena y col., 2004). Algunos de ellos han mostrado resultados prometedores, sin embargo aún no existe una vacuna eficaz para el control de la leishmaniosis.

En cuanto a los tratamientos quimioterapéuticos frente a la enfermedad, de forma tradicional se vienen utilizando compuestos de antimonio pentavalente, como el estibogluconato de sodio (Pentostam[®]) y el antimoniato de meglumina (Glucantime[®]), empleándose como fármacos de segunda elección la anfotericina B y la pentamidina, debido a que se considera que estos últimos compuestos producen efectos tóxicos severos e irreversibles (revisado por Herwaldt, 1999). Recientemente se han comenzado a emplear otros compuestos como la mitelfosina o la paromomicina (Alvar y col., 2006).

1.2. Organización y expresión génica en *Leishmania*

1.2.1. El proyecto genoma de *Leishmania*

En el año 1994 comenzó a desarrollarse el proyecto de secuenciación del genoma de *Leishmania*, eligiéndose para este fin la cepa MHOM/IL/81/Friedlin de *L. major*. Recientemente, en el año 2005, se logró finalizar dicho proyecto (Ivens y col., 2005), lo que ha generado una valiosa fuente de información que será de gran ayuda para desvelar algunos de los enigmas que componen la biología de este protozoo. Toda esta información se encuentra accesible en el sitio GeneDB de Internet (<http://www.genedb.org/>; (Aslett y col.,

2005)). Actualmente se están llevando a cabo proyectos encaminados a determinar la secuencia del genoma de otras especies de *Leishmania*, como *L. infantum* y *L. braziliensis*.

Leishmania es un organismo diploide cuyo genoma tiene un tamaño aproximado de 35 Mb (Ivens y col., 1998) organizado en 34-36 cromosomas, cuyo tamaño oscila de 0,3 a 2,5 Mb (Wincker y col., 1996). En la actualidad se contabilizan 8.272 genes codificantes de proteínas en el genoma de *L. major*, de los cuales no se conoce su función en aproximadamente la mitad de los mismos. Sin embargo, la disponibilidad de la secuencia de estos genes facilitará en un futuro la búsqueda de factores de virulencia, enzimas clave, vías de regulación y candidatos a vacuna, lo que permitirá conocer en profundidad los mecanismos de acción del parásito y desarrollar métodos de control de las leishmaniasis.

1.2.2. Organización génica

Leishmania posee un genoma con un contenido en G/C del 59,7%, lo que representa un porcentaje relativamente elevado cuando se compara con el de otros tripanosomátidos. Las regiones que codifican para proteínas (ORF del inglés, *open reading frame*) presentan un porcentaje de G/C más elevado que aquellas regiones que no codifican para proteínas; asimismo, entre las regiones no traducidas (UTR del inglés, *un-translated region*) las 3'UTR son más ricas en G/C que las 5'UTR (Ivens y col., 2005).

Los organismos pertenecientes al género *Leishmania* divergieron muy temprano de la rama evolutiva de los eucariotas, y como reflejo de su posición filogenética, presentan características atípicas de organización y expresión génica (Donelson y col., 1999). El desarrollo del proyecto genoma de *Leishmania* puso de manifiesto la llamativa disposición de los genes en los cromosomas: éstos se encuentran formando largas agrupaciones con la misma orientación transcripcional. Así, por ejemplo, en el cromosoma I de *L. major* existe una región de 1,6 kb no codificante, a cuya izquierda se disponen 29 genes localizados en la misma hebra de ADN y orientados hacia el telómero izquierdo, mientras que a la derecha se encuentran 50 genes ordenados en la hebra contraria de ADN y orientados hacia el telómero derecho (Myler y col., 1999) (Fig. 2). Los estudios realizados en este cromosoma indican que la tasa de transcripción es mayor en la hebra codificante, y que la transcripción se inicia en una región de 100 pb incluida en la región de 1,6 kb que separa las dos agrupaciones génicas divergentes, propagándose unidireccionalmente hacia los telómeros (Martinez-Calvillo y col., 2003). Con la reciente publicación de la secuencia del genoma de *L. major*, se ha descrito una organización similar de los genes en todos los cromosomas del parásito, aunque en algunos de ellos, como es el caso de los cromosomas III y IV, las agrupaciones se disponen de forma convergente (Ivens y col., 2005).

En *Leishmania*, al igual que ocurre en otros tripanosomátidos, los genes codificantes para proteínas carecen de intrones, y se disponen en largas agrupaciones de genes ordenados en tándem. Los distintos genes están separados entre sí por regiones cortas de ADN que constituyen las regiones intergénicas. Algunos genes poseen una única copia por genoma, como es el caso del gen de la hidroximetilglutaril-CoA reductasa *HMG-CoA*, el gen de la proteína de unión a poli(A) *LmPAB1*, ambos de *L. major* (Bates y col., 2000) (Montalvetti y col., 2000), o los genes de *L. mexicana* codificantes para la enzima 3'nucleotidasa-nucleasa y la quitinasa *LmexCht1* (Joshi y col., 2005) (Sopwith y col., 2002), por poner algunos ejemplos. Sin embargo, con frecuencia los genes presentan varias copias dispuestas en tándem, siendo habitual que exista una elevada conservación en la secuencia de las regiones codificantes, encontrándose mayor divergencia en las regiones no traducidas 5'UTR y 3'UTR.

Este es el caso de los genes que codifican para las proteínas ácidas ribosomales (Soto y col., 1993a) (Soto y col., 1993b) y para la histona H2A (Soto y col., 2003) de *L. infantum*. Es frecuente que las diferencias existentes en las regiones UTR de un mismo gen se asocien con una expresión diferencial de los transcritos en las distintas fases del ciclo de vida del parásito. Este es el caso de los genes de la cistein-proteasa de *L. donovani*, que poseen cinco copias organizadas en tándem con tres regiones 3'UTR diferentes. Dos de estas 3'UTR son las responsables de la expresión constitutiva de sus respectivos genes, mientras que el tercer tipo de 3'UTR está implicada en la expresión específica de los transcritos en el estado promastigote (Mundodi y col., 2002). Otro ejemplo es el de los genes *GP63* o *MSP*, también presentes en múltiples copias organizadas en tándem, que se dividen en la mayoría de las especies de *Leishmania* en varios grupos en función de la región 3'UTR que poseen y cuya expresión es diferente en las distintas fases del ciclo de vida del parásito (Yao y col., 2003). En *L. major*, por ejemplo, existen siete copias del gen *GP63* organizadas en tándem. Las cinco primeras copias presentan una región 3'UTR idéntica y sus transcritos son muy abundantes en promastigotes, siendo apenas detectables en amastigotes; por el contrario, la sexta copia del locus posee una 3'UTR divergente a las anteriores y los mensajeros derivados de este gen apenas se expresan en promastigotes y amastigotes, mientras que el séptimo gen solamente se expresa durante la fase estacionaria y en amastigotes (Kelly y col., 2001).

Los genes que codifican para proteínas que son muy abundantes en la célula suelen presentar un número elevado de copias, como es el caso de los genes de la α -tubulina de *L. enriettii*, que presenta dos agrupaciones génicas localizadas en diferentes cromosomas, con 18-20 copias y 10-11 copias respectivamente (Curotto de Lafaille y Wirth, 1992). Los genes *A2*, cuya expresión está restringida a la forma amastigote, también presentan múltiples copias organizadas en tándem (Charest y Matlashewski, 1994). Otro ejemplo lo constituye el gen *HSP83* de *L. amazonensis* que está presente en 18 copias (Zilka y col., 2001).

1.2.3. Transcripción y procesamiento de los transcritos

Junto a las singularidades en la organización génica, *Leishmania* posee mecanismos de expresión génica y de procesamiento de los transcritos propios de los tripanosomátidos, como son la transcripción policistrónica y el procesamiento de los transcritos por *trans-splicing* (Stiles y col., 1999).

1.2.3.1. Transcripción policistrónica

En tripanosomátidos los genes se co-transcriben en largas moléculas de ARN denominadas policistrones, que son posteriormente procesadas para dar lugar a los ARN mensajeros (ARNm) monocistrónicos (Campbell y col., 2003).

Los primeros indicios sobre el fenómeno de la transcripción policistrónica surgen de los experimentos de inhibición de la transcripción por luz UV realizados en la década de los 80 (Johnson y col., 1987). Posteriormente, se observó que cuando los promastigotes son sometidos a condiciones de choque térmico, en los que se inhibe el proceso de *trans-splicing*, se acumulaban transcritos de la tubulina de alto peso molecular (Muhich y col., 1989). Más recientemente, los estudios realizados sobre la base del conocimiento de la disposición de los genes de *Leishmania* en forma de largas agrupaciones génicas, han revelado que éstas se transcriben desde su extremo 5' de forma unidireccional (Martinez-Calvillo y col., 2003) (Martinez-Calvillo y col., 2004).

En *Leishmania*, se ha descrito la existencia de los tres tipos de ARN polimerasas (I, II y III, en función de su sensibilidad a α -amanitina) (Campbell y col., 2003). La ARN

polimerasa I es la encargada de la transcripción de los ARN ribosomales (ARNr) al igual que ocurre en el resto de eucariotas; sin embargo, en tripanosomátidos esta polimerasa es también la encargada de transcribir los genes que codifican para la glicoproteína variable de superficie (VSG) y para la proteína procíclica ácida repetitiva (PARP) de *T. brucei*, habiéndose descrito en el caso de estos genes la presencia de promotores específicos de la ARN polimerasa I (revisado por Graham, 1995). Los genes del ARN de transferencia (ARNt) son transcritos por la ARN polimerasa III, que también es la responsable de la transcripción de la subunidad 5S del ARNr, y de algunos ARN nucleares de pequeño tamaño.

La ARN polimerasa II es la encargada de la transcripción de los genes codificantes de proteínas y del miniexón. Hasta el momento no se ha descrito la existencia de promotores específicos de esta polimerasa en el caso de los genes que codifican para proteínas (Myler y col., 2001). Los estudios realizados en los cromosomas I y III de *L. major*, han mostrado que la tasa de transcripción es mayor en la hebra de ADN codificante para proteínas que en la no codificante, y que el inicio de la transcripción ocurre en el extremo 5' de cada una de las largas agrupaciones génicas existentes, desplazándose a lo largo del cromosoma para dar lugar a los transcritos policistrónicos (Martínez-Calvillo y col., 2003) (Martínez-Calvillo y col., 2004). En cambio, en el caso de los genes del miniexón, que también son transcritos por la ARN polimerasa II, si se ha probado la existencia de promotores para esta polimerasa, con la presencia de elementos consenso iniciadores (Clayton, 2002).

1.2.3.2. *Trans-splicing* y poliadenilación

Hasta llegar a la formación de los ARNm monocistrónicos, el ARN policistrónico debe sufrir una serie de transformaciones que implican la adición de una secuencia consenso en el extremo 5' del gen (*trans-splicing*), y la adición de una cola de adeninas en el extremo 3' del mismo (poliadenilación) (Fig. 2).

El *trans-splicing* consiste en una reacción de corte y adición entre un fragmento de ARN conocido como medARN (del inglés *mini-exon-derived* ARN), y su sitio de adición en el policistrón (Agabian, 1990). Como resultado de ello, los 39 primeros nucleótidos del medARN, secuencia conocida con el nombre de miniexón o *spliced leader*, quedan adicionados al extremo 5' de todos los ARN del parásito que deben ser traducidos. Mediante este mecanismo, se añade al extremo 5' de los ARNm monocistrónicos la estructura *cap* o caperuza (denominada *cap4* en tripanosomátidos), con una función protectora similar a la que confiere a los ARNm la estructura *cap* típica del resto de eucariotas. Los genes del miniexón se encuentran altamente conservados entre las distintas especies de *Leishmania* y poseen un elevado número de copia dentro del genoma (100-200 genes). A diferencia de lo que ocurre con los genes codificantes, estos genes no se transcriben como unidades policistrónicas, sino de forma independiente, adquiriendo la estructura *cap* en las primeras etapas de la iniciación transcripcional (Saito y col., 1994). Los motivos de secuencia implicados en el mecanismo de *trans-splicing* están constituidos por una región rica en pirimidinas situada por encima del sitio de adición del miniexón, que se corresponde con el dinucleótido AG (Huang y Van der Ploeg, 1991).

En tripanosomátidos solamente ha sido descrito un caso de *cis-splicing* hasta la fecha. Se trata de los genes de la poli(A) polimerasa de *T. brucei* y *T. cruzi*, que contienen un intrón, con longitud variable en función de la especie, pero con secuencias idénticas en el extremo de los mismos. Estos genes sufrirían además del mecanismo de *trans-splicing* habitual, un

proceso de *cis-splicing* que eliminaría el intrón para dar lugar al ARN maduro (Mair y col., 2000).

El proceso de poliadenilación consiste en la adición de una cola de adeninas en el extremo 3' de los genes. Para este proceso, a diferencia de lo que ocurre en la mayoría de eucariotas, no se ha encontrado una secuencia consenso que señalice el lugar en que deben adicionarse las adeninas, pudiendo ocurrir en varios sitios dentro de un rango estrecho. Así, la poliadenilación se produce a una distancia determinada (aproximadamente 100-400 nucleótidos, dependiendo de la especie) por encima del sitio de adición del miniexón del gen situado corriente abajo (LeBowitz y col., 1993). Este hecho pone de manifiesto el acoplamiento que existe entre los dos procesos implicados en el procesamiento de los ARN policistrónicos, *trans-splicing* y poliadenilación. Además dichos procesos ocurrirían de forma co-transcripcional, según un modelo en el que tras la adición del miniexón en el dinucleótido AG, se acoplaría la maquinaria de poliadenilación que rastrearía el mensajero en dirección 3'→5' hasta encontrar un sitio de poliadenilación adecuado.

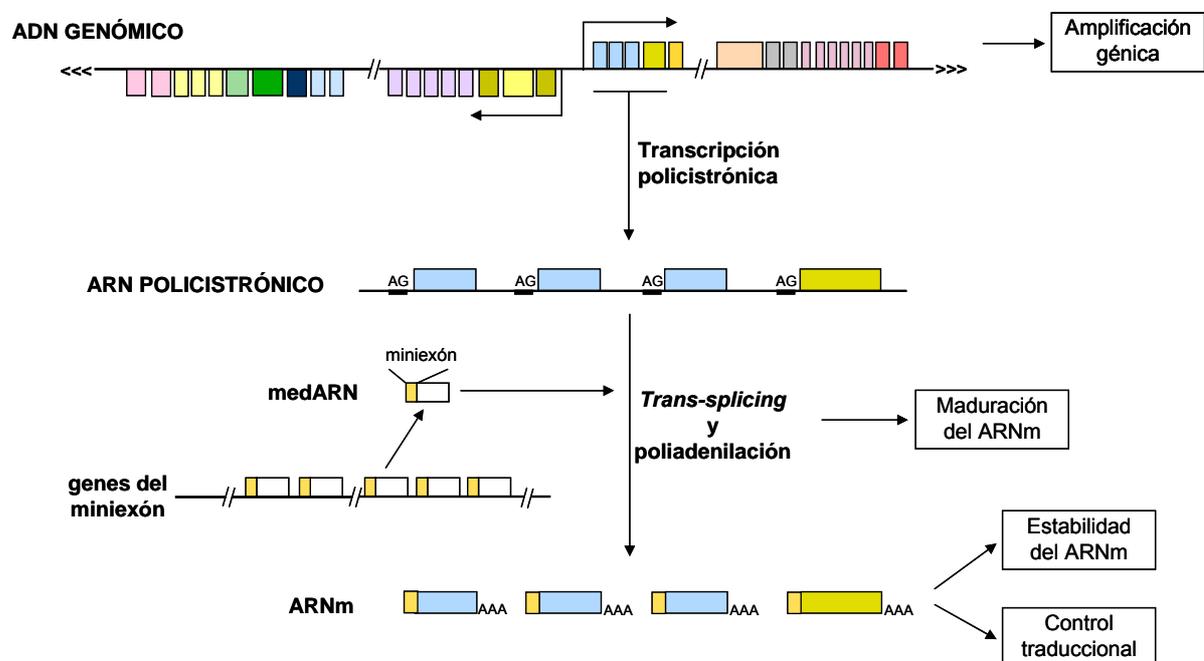


Figura 2. Transcripción y procesamiento de los ARNm en *Leishmania*. Los genes se encuentran formando agrupaciones con la misma orientación transcripcional. Como ejemplo, se muestra la estructura del cromosoma I de *L. major*. Los genes son transcritos en largas moléculas de ARN policistrónico, que son procesadas mediante *trans-splicing* y poliadenilación para dar lugar a los ARNm maduros. La regulación de la expresión génica ocurre principalmente a nivel post-transcripcional a través de diversos mecanismos: procesamiento de los transcritos, estabilidad del ARNm y control traduccional.

1.2.4. Regulación de la expresión génica

El hecho de que en *Leishmania* y otros tripanosomátidos la transcripción sea policistrónica, unida al hecho de que los mensajeros transcritos en un mismo policistrón presenten patrones de expresión diferentes a lo largo del ciclo de vida, indica que en estos organismos la regulación de la expresión génica ocurre fundamentalmente a nivel post-transcripcional (Stiles y col., 1999). Estos mecanismos desempeñan un papel muy importante durante la transmisión del parásito desde el insecto vector al mamífero y viceversa, ya que

durante este proceso deben producirse grandes cambios en la expresión génica que aseguren la adaptación y supervivencia del parásito a las nuevas condiciones.

Se han descrito varios mecanismos de regulación post-transcripcional (Fig. 2) que han puesto de manifiesto la importancia de las regiones UTR, especialmente de las 3'UTRs.

1.2.4.1. Regulación a nivel de la maduración del ARN

Los mecanismos de *trans-splicing* y poliadenilación, implicados en el procesamiento del ARN policistrónico para dar lugar a los ARN monocistrónicos maduros, proporcionan un punto de control en los patrones globales de expresión génica (LeBowitz y col., 1993). Un claro ejemplo de regulación a este nivel lo constituyen los genes de la fosfoglicerato quinasa (*PGK*) de *T. brucei*. Existen tres copias génicas (*PGKA*, *PGKB*, *PGKC*) que se co-transcriben en una misma molécula de ARN policistrónico. Esta molécula de ARN da lugar a niveles muy bajos de mensajeros del gen *PGKA*, mientras que los mensajeros *PGKB* y *PGKC* presentan niveles más elevados. Esta expresión diferencial se debe a la baja eficiencia de *splicing* en el primero de los genes *PGK* (Kapotas y Bellofatto, 1993). Otro ejemplo de este tipo de regulación se encuentra en los genes que codifican para la cistein proteasa (*CPB*) de *L. mexicana*. Existen 18 genes organizados en tándem; sin embargo, mientras que los genes *CPB1* y *CPB2* se expresan fundamentalmente en promastigotes metacíclicos, los genes *CPB3-CPB18* lo hacen en amastigotes. La principal diferencia encontrada entre los diferentes genes, es la presencia de un elemento denominado InS, situado en la región intercistrónica de los genes *CPB1* y *CPB2* y ausente en el resto de genes, que sería responsable de la regulación a la baja de los mensajeros *CPB1* y *CPB2* en el estado amastigote. Dado que este elemento está presente en el ARN policistrónico, pero no en el ARNm, indica que necesariamente la regulación de la expresión de los genes *CPB1* y *CPB2* ha de tener lugar a nivel de la maduración de los correspondientes ARNm (Brooks y col., 2001).

El proceso de poliadenilación también ha sido descrito como un punto de control en la expresión de un determinado gen. Así, los niveles de medARN aumentan en el estado amastigote en *L. donovani*; este incremento se debe a la presencia de un transcrito de 170 nt que es sintetizado específicamente a partir de una determinada clase de genes del miniexón, y que no aparece en el estado promastigote. Este nuevo mensajero, a diferencia de lo que ocurre en otros medARN, se encuentra poliadenilado en su extremo 3', lo que le conferiría una mayor estabilidad en el amastigote (Lamontagne y Papadopoulou, 1999).

1.2.4.2. Cambios en la estabilidad del ARN

Numerosos trabajos han puesto de manifiesto la variación en los niveles de mensajeros, ante determinados estímulos o en las distintas fases del ciclo de vida de *Leishmania*, como consecuencia de cambios en su estabilidad. Estas diferencias suelen deberse a la acción de factores proteicos que al unirse a determinadas regiones de los transcritos, principalmente a la 3'UTR, aumentan o disminuyen su vida media. Los genes que codifican para la proteasa mayor de superficie (*MSPL* o *GP63*) de *L. chagasi* regulan su expresión a través del control en la abundancia de sus mensajeros (Purdy y col., 2005). Estos mensajeros se expresan principalmente en promastigotes en fase logarítmica de crecimiento, y la inhibición de la síntesis de proteínas del parásito provoca un aumento de sus niveles. La secuencia responsable de este comportamiento se ha localizado entre los nucleótidos 303 y 505 de la región 3'UTR, que provocaría la desestabilización de los mensajeros mediante la unión de un factor proteico lábil.

En el caso de los genes del segmento paraflagelar (*PFR2*) de *L. mexicana*, que se expresan solamente en la forma promastigote, la regulación se debe a variaciones en la tasa de

degradación de los transcritos. Se ha definido un elemento de 10 nucleótidos, denominado PRE (del inglés *PFR regulatory element*), situado en la región 3'UTR que sería el responsable de la desestabilización de los mensajeros en la forma amastigote (Mishra y col., 2003).

En los genes homólogos de la amastina de *L. infantum*, los niveles de mensajeros son muy abundantes en la forma amastigote, siendo prácticamente indetectables en el promastigote. Estas diferencias se deben a que la vida media de los transcritos es tres veces mayor en el amastigote que en el promastigote, localizándose los elementos responsables de estas variaciones en la región 3'UTR (Wu y col., 2000).

Otros ejemplos de genes que regulan su expresión mediante la estabilización-desestabilización de sus mensajeros son los genes *A2*, *GP46*, varios transportadores de glucosa, *HSP83* y *HSP70* (Aly y col., 1994) (Beetham y col., 1997) (Burchmore y Landfear, 1998) (Charest y col., 1996) (Larreta y col., 2004) (Quijada y col., 2000) (Ver también sección 1.4.2.1).

1.2.4.3. Regulación traduccional y postraduccional

El control de la eficiencia de traducción de un ARNm, junto con la estabilidad de la proteína generada constituye otro de los puntos clave en la regulación de la expresión génica en tripanosomátidos. Anteriormente se ha descrito que los genes de la amastina de *L. infantum*, que sólo se expresan en la forma intracelular del parásito, presentan un mecanismo de regulación de la estabilidad de sus mensajeros que reside en su región 3'UTR (Wu y col., 2000). Además, recientemente se ha descrito un segundo mecanismo de regulación en estos genes que operaría a nivel traduccional (McNicoll y col., 2005). En la región 3'UTR de estos mensajeros existen dos elementos de 450 y 100 nucleótidos, que de forma sinérgica promueven su traducción en el estado amastigote, siendo este mecanismo de acción independiente del que controla la estabilidad de los mensajeros.

En los genes *HSP83* de *L. amazonensis* también se ha descrito la implicación de una región comprendida entre los nucleótidos 201 y 472 de la 3'UTR en la mayor eficiencia de traducción de los transcritos *HSP83* cuando los promastigotes son expuestos a temperaturas de choque térmico (Zilka y col., 2001). Esta regulación también ocurre en los genes *HSP83* de *L. infantum* (Larreta y col., 2004).

Los genes que codifican para las histonas de *L. infantum* no muestran variaciones en los niveles de sus mensajeros en las distintas fases del ciclo celular, sin embargo la síntesis de proteínas aumenta en la fase S, de forma paralela a la replicación del ADN. Se ha postulado que los cambios en la tasa de traducción de los transcritos de histonas estarían asociados a la unión a los mensajeros de un represor traduccional durante la fase G1, que se liberaría en la fase S permitiendo la unión de los transcritos a los ribosomas para su traducción (Soto y col., 2004).

Las modificaciones postraduccionales constituyen otro mecanismo de regulación de la expresión génica en *Leishmania*, si bien no se han descrito muchos ejemplos hasta la fecha. En *L. infantum*, ha sido caracterizado un gen *GP63* que da lugar a un molécula de ARNm de 3 kb; sin embargo, la expresión de este gen da lugar a dos polipéptidos de 58 y 60 kDa. La proteína de 60 kDa está claramente presente durante las distintas fases de crecimiento de los promastigotes (logarítmica y estacionaria), mientras que la expresión de la de 58 kDa es mínima en la fase logarítmica, alcanzando su máximo de expresión en promastigotes estacionarios. Ambos polipéptidos difieren en su patrón de glicosilación, que estaría asociado con la expresión diferencial de ambos (Gonzalez-Aseguinolaza y col., 1997).

1.2.4.4. Regulación por mecanismos de amplificación génica

Los procesos de amplificación génica han sido ampliamente descritos en los organismos pertenecientes al género *Leishmania*, no solo como un mecanismo de resistencia a drogas, sino también como un mecanismo de regulación génica (Beverley, 1991). Los mecanismos de amplificación génica pueden dividirse en dos categorías (revisado por Victoir y Dujardin, 2002). En una se incluirían los procesos de amplificación implícitos en la propia organización genómica del parásito, en el que existen numerosas repeticiones en tándem de genes cuyos productos se requieren en abundancia en todas las situaciones y fases del ciclo de vida, como es el caso de los genes de la tubulina, ARNr y genes del miniexón. Además de estos genes, existe otro grupo de genes con un elevado número de copias en el genoma implicados en procesos clave para la supervivencia del parásito, como es el caso de los genes *GP63*, implicados en la interacción parásito-hospedador (Victoir y col., 1995). En la segunda categoría, se agruparían los procesos de amplificación implicados en la resistencia a drogas que incluyen la amplificación de segmentos cromosómicos de mayor o menor tamaño en forma de ADN lineal o circular, y los cambios en la ploidía de cromosomas completos del genoma.

1.3. Respuesta al choque térmico

1.3.1. Características generales de la respuesta al choque térmico

La respuesta al choque térmico es un mecanismo genético que se encuentra muy conservado a lo largo de la evolución, y que ha sido descrito en todos los organismos, desde arqueobacterias hasta eucariotas superiores (Lindquist, 1986). Esta respuesta fue descrita por primera vez en 1962 al observarse la formación de abultamientos (*puffs*) en los cromosomas politénicos de las glándulas salivales de larvas de *Drosophila buschii* al incubarse a temperaturas elevadas (Ritossa, 1996). Posteriormente, en 1973 se asoció la aparición de esos abultamientos con la síntesis de un pequeño número de proteínas nuevas, que fueron denominadas proteínas de choque térmico o HSPs (del inglés *heat shock proteins*) (Tissieres y col., 1974). En la actualidad, está ampliamente aceptada la existencia en todos los organismos de un mecanismo común de respuesta al choque térmico, que implica grandes cambios en los patrones de expresión génica y la síntesis elevada de las HSPs. La importancia de estas proteínas radica en su actividad como chaperonas moleculares, que permiten la supervivencia de la célula en situaciones de estrés (Hartl, 1996).

La respuesta al choque térmico se desencadena cuando los organismos se ven expuestos a temperaturas que superan las consideradas como normales para su correcto crecimiento. Así pues, la temperatura a la que se desencadena esta respuesta varía en función de cada organismo, obteniéndose normalmente la máxima respuesta 10-15°C por encima de la temperatura óptima de crecimiento. Por ejemplo, en los ciliados antárticos del género *Euplotes*, la inducción se observa cuando se aumenta desde los 4°C de crecimiento habitual hasta los 20°C (La Terza y col., 2001), y en el alga verde *Chlamydomonas acidophila* cuando la temperatura aumenta hasta los 29°C (Gerloff-Elias y col., 2006). Además de la temperatura existe una amplia variedad de estímulos capaces de desencadenar esta respuesta, como son la radiación ultravioleta, los metales pesados o la falta de nutrientes entre otros (revisado por Morimoto y col., 1992). Estas observaciones han hecho que a las proteínas de choque térmico también se las conozca como proteínas de estrés.

En la mayoría de los organismos estudiados, la respuesta al choque térmico está regulada a nivel de la transcripción, mediante la unión de un factor de transcripción conocido

con el nombre de HSF (del inglés *heat shock factor*) a elementos de secuencia denominados HSE (del inglés *heat shock element*) localizados en la región del promotor de los genes de choque térmico (Sorger, 1991). Los factores de transcripción de choque térmico contienen en su extremo amino terminal dominios de unión a ADN, y para ser funcionales se requiere de una trimerización y fosforilación; en estas condiciones el complejo es capaz de desarrollar su actividad transcripcional. Estos factores tienen una elevada afinidad por secuencias del tipo nGAAn que aparecen como repeticiones invertidas en los elementos de choque térmico o HSE. Resulta interesante el hecho de que la activación del HSF esté mediada en parte por algunas proteínas de choque térmico. Así, se ha descrito en numerosos trabajos que la inhibición de la HSP90 o de la co-chaperona p23 en células no estresadas conduce a la activación del HSF, postulándose que la unión de un complejo multichaperona, que incluiría a la HSP90 y p23, al HSF impide su activación en condiciones normales, mientras que durante el choque térmico se liberaría este complejo permitiendo la activación del HSF (revisado por Voellmy, 2004). También se ha mostrado que la sobre-expresión de la proteína HSP70 y de la co-chaperona Hdj 1 provoca la represión del factor de transcripción de choque térmico HSF1 (Shi y col., 1998).

1.3.2. Proteínas de choque térmico

1.3.2.1. Función como chaperonas moleculares

Una de las principales características de la respuesta frente al choque térmico es el papel protector que desempeñan las HSPs, ya que protegen a las células de los efectos tóxicos del calor y otras formas de estrés. Existen varios hechos que ponen de manifiesto el papel protector de las proteínas de choque térmico (Parsell y Lindquist, 1993). En primer lugar, la inducción de las HSPs presenta las características de una respuesta de emergencia, siendo ésta rápida e intensa. En segundo lugar, aunque las HSPs se inducen a temperaturas muy diferentes según los organismos, en todos los casos la temperatura de inducción refleja condiciones de estrés para ese organismo. Finalmente, el grado de síntesis de HSPs se correlaciona con el grado de tolerancia a condiciones extremas en una gran variedad de organismos.

La presencia de proteínas mal plegadas en una célula parece ser la señal que desencadena la inducción de la respuesta al choque térmico. Existen dos mecanismos generales por los cuales las HSPs son capaces de proteger a la célula frente a la presencia de proteínas dañadas por el calor. Uno es la degradación de proteínas aberrantes, ya que ayudan en los mecanismos de proteólisis mediante la interacción con componentes de la maquinaria de degradación. El segundo consiste en prevenir la agregación de proteínas mal plegadas con el fin de promover su correcto plegamiento. En este último caso, las HSPs desempeñan un papel primordial actuando como chaperonas moleculares (Fink, 1999). El término chaperona molecular fue acuñado para describir la función de la nucleoplasmina, una proteína muy abundante en los oocitos de *Xenopus* que promueve el correcto ensamblaje de los componentes del nucleosoma (Laskey y col., 1978). Actualmente las chaperonas moleculares se definen como proteínas que se unen a conformaciones inestables de otras proteínas, estabilizándolas para permitir su correcto plegamiento (Hendrick y Hartl, 1993).

Las proteínas de choque térmico no solo ayudan al plegamiento de otras proteínas en condiciones de estrés, sino que también actúan en condiciones normales. El proceso de plegamiento de una proteína es aquel mediante el cual la información contenida en la secuencia de aminoácidos da lugar a una estructura tridimensional con plena funcionalidad. Es en este proceso en el que colaboran las chaperonas moleculares. Sin embargo, las proteínas con función chaperona no contienen información estérica acerca del plegamiento de una

determinada proteína, sino que facilitan el plegamiento al prevenir las interacciones incorrectas entre polipéptidos (Hartl, 1996). El plegamiento de una proteína en el interior de una célula, ocurre en un entorno muy complejo en el que la concentración de proteínas es muy elevada. Este hecho, aumenta la probabilidad de formación de agregados, ya que quedan expuestos residuos hidrofóbicos que estarán ocultos una vez que la proteína finalice su plegamiento. Las HSPs, como chaperonas moleculares, se unen a esos residuos activos previniendo la agregación de las cadenas polipeptídicas parcialmente plegadas durante su salida del ribosoma, y la de proteínas completas, para lo cual se unen a ellas estabilizándolas (Hartl y Hayer-Hartl, 2002). La unión y liberación de proteínas no plegadas a las HSPs suele estar acoplada a la hidrólisis de ATP, lo que provoca cambios conformacionales en las HSPs que varían su afinidad por las cadenas polipeptídicas, o su interacción con otras chaperonas y cochaperonas (Hendrick y Hartl, 1993). Por último, las HSPs desempeñan también un papel muy importante en la translocación de proteínas recién sintetizadas a los diferentes orgánulos de la célula (Young y col., 2004).

1.3.2.2. Principales familias de HSPs

Las proteínas de choque térmico están entre las proteínas más conservadas a lo largo de la evolución. En todos los organismos han sido descritos genes que codifican para las principales familias de proteínas de choque térmico. Las HSPs incluyen proteínas tanto de expresión constitutiva como de expresión inducible, y algunas de ellas están entre las proteínas más abundantes de la célula. Además, muchas de las HSPs se encuentran también en los distintos orgánulos celulares (Parsell y Lindquist, 1993).

Familia	Procariotas	Eucariotas	
		Miembros	Localización celular
HSP110	-	HSP110	Citosol
		GRP170	Retículo endoplasmático
HSP100	ClpA, ClpB	HSP104	Citosol
HSP90	Htp G	HSP83, HSP90	Citosol
		GRP94, GRP96	Retículo endoplasmático
		HSP75, TRAP1	Mitocondria
HSP70	Dna K	HSP70	Citosol
		HSC70	Citosol
		BiP, GRP78	Retículo endoplasmático
		mHSP70	Mitocondria
HSP40	Dna J	HSP40	Citosol
Chaperoninas	GroEL	HSP60, CPN60	Mitocondria, cloroplasto
	GroES	HSP10, CPN10	Mitocondria, cloroplasto

Tabla 1. Principales familias de proteínas de choque térmico en procariotas y eucariotas.

Las HSPs se agrupan en familias en función de su homología de secuencia y su peso molecular (Tabla 1). Estas familias están formadas por proteínas que pueden diferir en su localización intracelular, función e inducibilidad en respuesta al choque térmico. Las principales familias son:

- **Familia HSP110.** Después de la HSP70 y HSP90, la HSP110 es la tercera proteína más abundante en muchas líneas celulares y tejidos de mamífero. Se ha descrito la presencia de miembros de esta familia de proteínas en invertebrados, plantas y hongos (Easton y col., 2000). El representante de esta familia en el retículo endoplasmático (RE) recibe el nombre de Grp170, sin que se hayan encontrado homólogos de esta proteína en procariotas. Aún no se conoce mucho sobre la función de estas proteínas, pero parece que están implicadas en el plegamiento de otras proteínas (Easton y col., 2000).
- **Familia ClpB/HSP104.** Esta familia está constituida por proteínas inducibles, y sus miembros más representativos son la ClpB bacteriana, la HSP104 de levadura y la HSP101 de plantas (Lee y col., 2004). Estas proteínas han sido implicadas en la desagregación de proteínas, la degradación de proteínas aberrantes y el control de calidad de proteínas.
- **Chaperoninas del grupo I: HSP60 y HSP10.** Han sido descritas solamente en eubacterias y en orgánulos celulares de origen endosimbionte, siendo sus miembros proteínas de choque térmico inducibles. Forman grandes complejos cilíndricos compuestos por dos anillos con siete subunidades cada uno, y su función principal es ayudar al correcto plegamiento de proteínas recién sintetizadas. La proteína más característica de esta familia es la proteína GroEL de *E. coli*, mientras que a su homólogo en mitocondrias y cloroplastos se le denomina HSP60 ó CPN60. Estas proteínas actúan junto a un cofactor (GroES, HSP10 ó CPN10), formando un especie de almacén de forma cilíndrica en cuyo interior los polipéptidos no plegados son secuestrados para evitar su agregación y facilitar su plegamiento (Hartl y Hayer-Hartl, 2002).
- **Familia HSP90.** Los miembros más representativos de esta familia son la Hsp G bacteriana y la HSP83/90 de eucariotas, localizadas ambas en el citoplasma de las células. En el retículo endoplasmático se encuentra la GRP94, y en la mitocondria la HSP75/TRAP (Csermely y col., 1998) (Young y col., 2001). Las proteínas pertenecientes a esta familia se caracterizan por poseer un dominio de unión a ATP en su extremo amino terminal, y una región carboxilo terminal en la que se encuentra el dominio de dimerización (Csermely y col., 1998). Estas proteínas están implicadas en la activación y recambio de gran cantidad de proteínas. En muchos casos, estas proteínas han sido implicadas en mecanismos de control del ciclo celular y en transducción de señales (Pratt y Toft, 2003) (Whitesell y Lindquist, 2005).
- **Familia HSP70.** Está constituida por las proteínas más conservadas a lo largo de la evolución y están presentes en todo tipo de organismos. Comprende tanto proteínas inducibles por temperatura (HSP70), como proteínas que se expresan de forma constitutiva (HSC70). Estas proteínas están implicadas en muchos procesos esenciales para la célula, como el plegamiento de proteínas recién sintetizadas, unión a proteínas para evitar la formación de agregados, translocación de proteínas a través de membrana, degradación de proteínas inestables y control de la actividad de otras proteínas reguladoras (Mayer y Bukau, 2005). Las proteínas pertenecientes a esta familia se localizan en una amplia variedad de compartimentos celulares: citoplasma (DnaK, HSP70, HSC70), retículo endoplasmático (BiP, GRP78), mitocondrias (mHSP70) y cloroplastos. Su estructura se caracteriza por la presencia de un dominio de unión a ATP en la mitad amino terminal, y una parte carboxilo terminal

responsable de la unión a polipéptidos. Su actividad se basa en la unión, controlada por la hidrólisis de moléculas de ATP, a segmentos peptídicos hidrófobicos.

- **Familia HSP40.** Estas proteínas, en combinación con miembros de la familia HSP70, forman la maquinaria que asegura el correcto plegamiento de muchas proteínas. Se caracterizan por la presencia en su región amino terminal de una secuencia de aproximadamente 70 residuos conservados, elemento conocido con el nombre de dominio J, y que es esencial para su interacción con las HSP70s (Mayer y Bukau, 2005).
- **sHSPs (del inglés *small heat shock proteins*).** Conforman la familia de chaperonas moleculares menos conservadas, aunque comparten algunas características comunes: dominio *α -crystallin* formado por aproximadamente 90 aminoácidos, peso molecular de 12 a 43 kDa, se asocian formando de grandes oligómeros, son inducibles y su principal función es la de evitar la formación de agregados proteicos en procesos de estrés (Haslbeck y col., 2005).

1.4. La respuesta al choque térmico en *Leishmania*

1.4.1. Importancia del choque térmico en el ciclo de vida de *Leishmania*

Durante la transmisión de *Leishmania*, el parásito debe hacer frente a dos situaciones de estrés como son el aumento de temperatura y el descenso de pH. Estos dos factores, pH y temperatura, han sido descritos como dos de los principales agentes desencadenantes del proceso de diferenciación promastigote-amastigote, que conlleva toda una serie de cambios en los patrones de expresión génica (Garlapati y col., 1999) (Zilberstein y Shapira, 1994).

Mientras que en el insecto poiquilotermo los promastigotes de *Leishmania* se encuentran a temperaturas de 22-28°C, tras su transmisión al hospedador mamífero homeotermo quedan expuestos a temperaturas de 31-35°C en el caso de las especies cutáneas, o a temperaturas de 37°C en el caso de las especies viscerales. Por tanto, para asegurar su supervivencia en el mamífero, *Leishmania* debe ser capaz de adquirir mecanismos de termotolerancia, para lo cual resulta fundamental la respuesta al choque térmico desencadenada durante la transmisión. La exposición a elevadas temperaturas provoca en los promastigotes un aumento en la síntesis de dos de las principales proteínas de choque térmico, como son la HSP70 y la HSP83 (Lawrence y Robert-Gero, 1985). Sin embargo, este aumento de temperatura por si solo no es capaz de provocar cambios morfológicos en todas las especies de *Leishmania* (Zilberstein y Shapira, 1994). Se ha comprobado que en las especies de *Leishmania* del Viejo Mundo, la exposición a elevadas temperaturas es menos eficiente que en las especies del Nuevo Mundo a la hora de inducir la diferenciación de los promastigotes hacia la forma amastigote.

En eucariotas la respuesta a estímulos externos e internos se produce a través de la activación de las cascadas de señalización, que en la mayoría de los organismos culminan en la activación de factores de transcripción. Sin embargo en *Leishmania*, como se ha indicado anteriormente, la regulación de la expresión génica ocurre a nivel post-transcripcional. Este hecho sugiere que en estos parásitos la activación de las cascadas de señalización en respuesta a factores ambientales, tales como el aumento de temperatura o la acidificación del pH, debe tener como objetivo final la activación de moléculas implicadas en el procesamiento de los transcritos o en el control de su estabilidad (Parsons y Ruben, 2000). Hasta el momento se conoce poco sobre el conjunto de moléculas implicadas en la recepción de señales

extracelulares y las rutas de señalización en *Leishmania*, sin embargo, la reciente publicación de la secuencia del genoma de *L. major* ayudará en un futuro a la identificación de estas moléculas.

A pesar de la falta de conocimiento acerca de las cascadas de señalización activadas en *Leishmania* en respuesta a los cambios que acompañan a la transmisión del parásito, si se conoce que estas variaciones ambientales inducen grandes cambios en los patrones de expresión génica. En los últimos años, gracias al desarrollo de las técnicas de proteómica, se han podido analizar los patrones de expresión de las proteínas durante el proceso de diferenciación. Así, en *L. donovani* se han identificado 75 proteínas de un total de 682 que se expresan de forma diferencial en la forma amastigote; de ellas, 24 sólo se expresan en el amastigote, mientras que las 51 restantes se expresan de 1,2 a 5,7 veces más en la forma intracelular que en el promastigote (Walker y col., 2006).

Entre los genes que se expresan exclusivamente en la forma amastigote se encuentran los genes *A2* de *L. donovani*, utilizados frecuentemente como marcador de diferenciación (Charest y Matlashewski, 1994). Los genes *A2* se disponen en cuatro agrupaciones génicas, y están representados en el genoma por múltiples copias que se intercalan con otros genes (*A2rel*) cuya expresión es constitutiva (Zhang y Matlashewski, 2001). Se ha demostrado que la región 3'UTR de estos genes es la responsable del aumento en la estabilidad de los transcritos *A2* en promastigotes cultivados a 37°C y pH 4,5 (Charest y col., 1996). Sin embargo, la organización de estos genes es claramente distinta en especies cutáneas de *Leishmania* como es el caso de *L. major*. En *L. major* los genes *A2* parecen no expresarse, aunque existen secuencias parcialmente homólogas a los genes *A2* de *L. donovani*. Además, cuando se introduce el gen *A2* de *L. donovani* de forma episómica en promastigotes de *L. major* se produce una reducción clara en la formación de lesiones cutáneas en ratones infectados, mientras que la capacidad de estos parásitos para migrar desde la dermis hacia órganos internos aumenta, por lo que se ha implicado a estos genes en la capacidad de visceralización de las distintas especies de *Leishmania* (Zhang y Matlashewski, 2001) (Zhang y col., 2003). Otros ejemplos de genes que se expresan de forma exclusiva en el amastigote son los genes homólogos de la amastina de *T. cruzi*, los genes de la β -tubulina, los genes *VG7A5* de función desconocida, y el gen del antígeno P4 (Bellatin y col., 2002) (Kar y col., 2000) (Liu y col., 2000) (Wu y col., 2000).

En *Leishmania* también existen genes que se expresan exclusivamente en la forma promastigote. Entre ellos uno de los más estudiados es el gen *PFR-2* que codifica para una proteína del segmento paraflagelar (Moore y col., 1996).

Existen otros genes presentes en el genoma en varias copias, que se expresan de forma diferencial. En esta categoría se encuentran los genes de la cistein proteasa (*CPB*) de *L. mexicana*. Existen 19 copias, de las cuales las dos primeras (*CPB1* y *CPB2*) se expresan en promastigotes metacíclicos, mientras que las restantes (*CPB3-CPB19*) sólo se expresan en el amastigote (Mottram y col., 1997). Otro ejemplo lo constituyen los genes que codifican para proteínas transportadoras de glucosa en *L. mexicana* (*LMTG*), donde se han descrito tres genes dispuestos en tándem; el segundo de ellos (*LMTG2*) se expresa 15 veces más en promastigotes que en amastigotes, y los dos restantes (*LMTG1* y *LMTG3*) se expresan de forma constitutiva en ambas formas (Burchmore y Landfear, 1998).

1.4.2. Genes de choque térmico en *Leishmania*

1.4.2.1. Organización y expresión génica

Hasta el momento, en *Leishmania* han sido descritos y caracterizados algunos genes de choque térmico que codifican para HSPs de distintas familias.

El gen de *L. major* homólogo al gen *ClpB* bacteriano o al gen *HSP104* de levadura fue clonado por Hubel y colaboradores (1995). Este gen presenta una única copia en el genoma del parásito, y mediante el uso de anticuerpos específicos se comprobó que codifica para una proteína citoplasmática de 100 kDa, que solo es detectable en promastigotes cuando éstos son sometidos a temperaturas de choque térmico. Por ello, a este gen se le denominó *HSP100*. La obtención de líneas deficientes para el gen *HSP100* demostró que su ausencia no afecta a la viabilidad de los promastigotes en condiciones óptimas de cultivo (26°C y pH 7), pero reduce su termotolerancia de forma significativa (Hubel y col., 1997). Además, en ensayos de infección *in vivo* e *in vitro* se determinó que la proteína HSP100 desempeña un papel fundamental en la diferenciación hacia la forma amastigote. Posteriormente, se clonó el gen *HSP100* de la especie *L. donovani* (Krobitsch y col., 1998), y se mostró que la máxima expresión de la proteína se produce durante las primeras etapas del proceso de diferenciación promastigote-amastigote (Krobitsch y col., 1998). Sin embargo, y en contra de lo esperado, se encontró que la HSP100 no tiene ningún efecto sobre la termotolerancia o la viabilidad ni en promastigotes ni en amastigotes de *L. donovani*. En cambio, se ha demostrado la esencialidad de este gen durante el proceso de diferenciación, ya que cuando se diferencian promastigotes deficientes para el gen HSP100, los amastigotes presentan una morfología aberrante, y además no se detecta expresión de los genes *A2* (Krobitsch y Clos, 1999). Más recientemente se ha mostrado la relación entre los genes *A2* y el gen *HSP100* (Clos y col., 2001). Las proteínas *A2* y HSP100 co-localizan en el mismo foco dentro del citoplasma de los amastigotes, lo que ha llevado a postular una interacción de la HSP100 con la proteína *A2* para asegurar su correcto plegamiento, y contribuir a la diferenciación de los promastigotes en amastigotes.

La proteína HSP83 es una de las proteínas más abundantes del parásito, representando un 2,8% de la proteína total celular (Brandau y col., 1995). Los genes que codifican para esta proteína han sido ampliamente estudiados en distintas especies de *Leishmania*, poniendo de manifiesto que su organización es muy homogénea en todas ellas. *L. major*, *L. donovani* y *L. amazonensis* presentan 5-6 copias organizadas en tándem (Hubel y Clos, 1996), en tanto que en *L. infantum* se han detectado 7 copias igualmente dispuestas en tándem (Angel y col., 1996). Aparte de la conservación existente en cuanto a la organización génica, se ha descrito una elevada homología de secuencia entre los genes *HSP83* de las distintas especies tanto en la región codificante, como en la región intergénica. A pesar de esta elevada homología de secuencia, las mayores diferencias se localizan en la 3'UTR, tanto entre diferentes especies, como entre cepas de la misma especie (Hubel y Clos, 1996). En *L. amazonensis* los mensajeros de los genes *HSP83* se acumulan durante el choque térmico, situación en la que además se traducen de forma más eficiente. Los mensajeros *HSP83* son degradados rápidamente a 26°C, mientras que a temperaturas de choque térmico se produce un aumento en su estabilidad. La elevada tasa de degradación a 26°C es dependiente de la síntesis activa de proteínas, lo que sugiere la existencia de una nucleasa específica cuya actividad se ve disminuida a 37°C, permitiendo la acumulación de los mensajeros (Argaman y col., 1994). La región 3'UTR de estos genes es la responsable del aumento en la estabilidad de los mensajeros *HSP83* en el choque térmico, y se ha definido un elemento de esta región comprendido entre las posiciones 201 y 472 que resulta esencial para la traducción preferencial observada (Zilka y col., 2001). En *L. infantum* también se ha observado una mayor estabilidad de los transcritos a 37°C, sin embargo, en este caso la acumulación es dependiente de la síntesis activa de proteínas (Larreta y col., 2004). En *L. infantum* la región 3'UTR de los genes *HSP83* también ha sido definida como esencial en la mayor eficiencia de traducción de los mensajeros a temperaturas de choque térmico. Durante el proceso de diferenciación hacia la forma amastigote se ha observado que los mensajeros *HSP83*

aumentan rápidamente durante las dos primeras horas del proceso, y descienden hasta los niveles iniciales a las 9 horas para llegar a ser casi indetectables a las 24 horas. Estos cambios en los niveles de los mensajeros se corresponden con las variaciones observadas en la síntesis *de novo* de la proteína: la síntesis de la HSP83 aumenta hasta 8 veces tras 3 horas de diferenciación, cayendo hasta los niveles iniciales a las 9 horas y produciéndose 4 veces menos tras 24 horas (Larreta y col., 2004). El papel de la HSP83 durante el proceso de diferenciación ha sido estudiado en *L. donovani* (Wiesgigl y Clos, 2001). La inactivación de la proteína HSP83 mediante el uso de drogas específicas como la geldanamicina A (GA) o el radicicol, produce una parada en el crecimiento de los promastigotes, al tiempo que se inducen las HSPs. Además, como consecuencia del tratamiento con GA se induce la diferenciación de la forma amastigote. Por tanto, se ha sugerido que la homeostasis de la HSP83 controlaría el proceso de diferenciación del parásito.

En *Leishmania* el primer gen de la familia HSP83/90 con localización en el RE, denominado *GRP94*, fue identificado en *L. infantum* (Larreta y col., 2000). La proteína GRP94 está codificada por un gen de copia única y se ha mostrado su elevada inmunogenicidad durante la infección por el parásito. Posteriormente se describió la presencia de este gen en *L. donovani* como un gen implicado en el metabolismo del LPG (Descoteaux y col., 2002).

En cuanto a las proteínas de choque térmico pertenecientes a la familia de las chaperoninas del grupo I, el primero de los genes identificados fue el gen *HSP60* de *L. major* (Rey-Ladino y col., 1997). En *L. donovani* se han descrito dos genes de la familia *HSP60*, denominados *CPN60.1* y *CPN60.2*. El gen *CPN60.1* muestra una elevada homología de secuencia con el gen *HSP60* de *L. major*, sin embargo, aunque este gen se transcribe activamente, no se ha podido demostrar la expresión de la proteína. Por el contrario, el gen *CPN60.2*, que parece evolutivamente más cercano a los genes *HSP60/CPN60* de otros miembros de la clase *Kinetoplastea*, muestra un aumento en los niveles de expresión de la proteína de hasta 2,5 veces en promastigotes sometidos a temperaturas de choque térmico. Además, se ha demostrado que la proteína CPN60.2 se localiza en la matriz mitocondrial (Schluter y col., 2000). El cofactor de la proteína HSP60, la co-chaperonina HSP10, solamente ha sido identificada en *L. donovani* (Zamora-Veyl y col., 2005). En este caso el gen que codifica para dicha proteína llamado *CPN10*, está presente en una sola copia y se expresa de forma preferencial en situaciones de estrés térmico y en amastigotes axénicos. La proteína codificada por dicho gen se localiza en la mitocondria y co-precipita con la proteína CPN60.2.

1.4.2.2. La familia HSP70 en *Leishmania*

Las proteínas pertenecientes a la familia HSP70 se localizan en una gran variedad de compartimentos celulares. En el RE se localiza la proteína BiP de eucariotas, responsable de la translocación de proteínas desde el citoplasma a este orgánulo celular (Hartl, 1996). En *L. donovani* se ha caracterizado el gen homólogo al gen *BiP*, denominado *GRP78* (Jensen y col., 2001). La proteína GRP78 se localiza en el RE y presenta en su extremo carboxilo terminal la secuencia de retención en este orgánulo (MDDL).

Los miembros de la familia HSP70 localizados en la mitocondria han sido estudiados en *L. major*. En este parásito se clonó uno de los genes que codifican para dicha proteína (*LmHSP70.1*), y se mostró que su expresión es constitutiva en todas las formas del ciclo de vida del parásito, y que se localiza en la mitocondria (Searle y col., 1993).

La proteína HSP70 representa un 2,1% de la proteína total celular en los parásitos del género *Leishmania* (Brandau y col., 1995). Además, la síntesis de esta proteína aumenta durante la exposición de los promastigotes a temperaturas de choque térmico (35-37°C)

(Lawrence y Robert-Gero, 1985). Las proteínas HSP70 citoplasmáticas han sido las más estudiadas en *Leishmania*. *L. major* es la primera especie en la que se describió la organización y expresión de los genes *HSP70* (Lee y col., 1988). En esta especie se describió la presencia de cinco genes *HSP70*, cuatro de ellos organizados en tándem, mientras que el quinto gen se localiza en un locus diferente dentro del mismo cromosoma. Todos estos genes mostraron tener una elevada homología de secuencia en sus regiones codificantes, sin embargo a partir del quinto nucleótido por debajo del codón de parada (TAA), la secuencia del quinto gen se mostraba claramente divergente con respecto a la de los cuatro genes restantes. Además, los niveles de los transcritos de los cuatro genes organizados en tándem aumentaban durante el tratamiento de los promastigotes a 37°C, mientras que los niveles de mensajeros del quinto gen no sufrían variaciones.

Estudios preliminares llevados a cabo en la especie *L. donovani* indicaron la existencia de 12 a 15 copias de los genes *HSP70*, localizadas en el mismo cromosoma y dispuestas en tándem (MacFarlane y col., 1990).

La organización de los genes *HSP70* ha sido también estudiada en *L. amazonensis*. En estos trabajos se ha postulado la existencia de 7 genes *HSP70* organizados en tándem y un octavo gen *HSP70* localizado en el mismo cromosoma que los anteriores, pero en una posición más alejada (Bock y Langer, 1993). Los análisis de secuencia realizados en clones de ADNc sugerían la existencia de dos tipos de genes *HSP70* que se diferenciarían en su región 3'UTR.

Recientemente, la organización del locus *HSP70* ha sido analizada en *L. braziliensis* (Zurita y col., 2003). Los autores postulan la presencia de un único gen *HSP70* en el genoma de este parásito.

En *L. infantum*, hay 6 copias del gen *HSP70* que están localizadas en el mismo locus y organizadas en tándem (Quijada y col., 1997a). Todos los genes presentan una elevada homología de secuencia tanto en su región 5'UTR, como en la región codificante, salvo la región 3'UTR del gen situado en el extremo 3' del tándem (denominada 3'UTR-II) que es altamente divergente en secuencia con respecto a la misma región de las copias restantes (3'UTR-I). Por ello, a los genes *HSP70 1-5* se les denomina *HSP70-I*, mientras que el gen *HSP70-6* se denomina como *HSP70-II*. Los estudios realizados sobre la expresión de los dos tipos de genes *HSP70* mostraron que a pesar de que la tasa de transcripción es igual en ambos, los mensajeros *HSP70-II* son unas 50 veces más abundantes a 26°C que los transcritos *HSP70-I* (Quijada y col., 1997a). Sin embargo, mientras que la abundancia de los mensajeros *HSP70-I* aumenta cuando se somete a los promastigotes a temperaturas de choque térmico, los transcritos *HSP70-II* mantienen sus niveles de forma constitutiva con independencia de la temperatura. Los ensayos realizados con el empleo del inhibidor de la síntesis de proteínas actinomicina D mostraron que la acumulación de los mensajeros *HSP70-I* a 37°C es dependiente de la síntesis activa de proteínas, lo que sugeriría la existencia de un factor proteico específico que se induciría o activaría a temperaturas de choque térmico con el fin de estabilizar los transcritos *HSP70-I* (Quijada y col., 1997a). En trabajos más recientes se ha descrito la implicación de la región 3'UTR-I en el aumento de la estabilidad de los mensajeros *HSP70-I* a 37°C (Quijada y col., 2000). Mediante el empleo de construcciones plasmídicas con el gen reportero *CAT*, se ha determinado que la región de la 3'UTR-I responsable de esa acumulación se localiza entre las posiciones nucleotídicas 699 y 816.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Los protozoos de la familia *Trypanosomatidae* son agentes causantes de un amplio rango de enfermedades, tanto en animales como en humanos, que producen una elevada morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Su temprana separación de la rama evolutiva de los eucariotas hace que estos organismos presenten características moleculares de organización y expresión génicas muy diferentes a la del resto de eucariotas.

El objetivo principal de esta Tesis fue el seguir profundizando en el conocimiento de la regulación de la expresión génica en tripanosomátidos, utilizando como sistema modelo los genes *HSP70* de *L. infantum*. Con esta finalidad se plantearon los siguientes objetivos experimentales:

1. Análisis de la regulación traduccional de los dos tipos de genes, *HSP70-I* y *HSP70-II*.
2. Determinación de las secuencias reguladoras de los genes *HSP70* implicadas en la regulación traduccional.
3. Estudio del papel fisiológico desempeñado por cada uno de los dos tipos de genes *HSP70* en aspectos fundamentales de la biología del parásito.
4. Realizar un análisis comparativo de la organización y expresión de los genes *HSP70* en las principales especies del género *Leishmania*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Productos, enzimas y soluciones

Los reactivos empleados fueron suministrados fundamentalmente por las casas comerciales Roche (Mannheim, Alemania), Merck (Darmstadt, Alemania), Sigma (Steinheim, Alemania) y GE Healthcare (Uppsala, Suecia). Las endonucleasas utilizadas fueron suministradas por Roche y Fermentas (Maryland, EEUU).

Los marcadores de peso molecular de ADN, fago λ y fago $\Phi 29$ digeridos con *HindIII*, se adquirieron en el Servicio de Fermentación del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CBMSO). Como marcador de peso molecular de ARN se emplearon los ARN ribosomales de *Escherichia coli* (Roche). Los marcadores de peso molecular de proteínas fueron suministrados por Sigma.

3.2. Material biológico

3.2.1. Bacterias

Se empleó la cepa XL1Blue de *E. coli* (Qiagen; Hilden, Alemania).

3.2.2. Parásitos

Fueron empleadas las siguientes especies y cepas:

Leishmania infantum: cepa MCAN/ES/96/BCN/150, MON-1. Aislada a partir de un perro con leishmaniosis visceral en la Unidad de Parasitología y Enfermedades Parasitarias (Departamento de Medicina y Sanidad Animal) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura.

Leishmania major: cepa V1 (MHOM/IL/80/Friedlin). Esta cepa fue cedida por el Dr. Davis Sacks (NIAID, National Institutes of Health, Bethesda, EEUU).

Leishmania amazonensis (cepa IFLA/BR/67/pH-8), *Leishmania braziliensis* (cepa MHOM/BR/75/M-2904), *Leishmania mexicana* (cepa MNYC/BZ/62/M-379) y *Leishmania tropica* (cepa MHOM/SU/74/K-27), cedidas por la Dra. Carmen Cañavate (Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, España).

3.2.3. Animales de experimentación

Se emplearon ratones hembra de ocho semanas de edad pertenecientes a la cepa BALB/c, suministrados por Harlan Interfauna Ibérica (Barcelona, España).

3.2.4. Líneas celulares

Para los ensayos de infección *in vitro* con *Leishmania* se utilizó la línea celular U-937, generosamente cedida por el Dr. José María Saugar Cruz (Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, España).

3.3. Vectores de clonaje

Todos los clonajes descritos en esta tesis se realizaron tomando como base los siguientes vectores plasmídicos: pBluescript II KS- (Stratagen; Washington, EEUU) y pX63Neo, cedido por el Dr. S. Beverley (Washington University School of Medicine, St. Louis, EEUU).

3.4. Clones empleados

3.4.1. Clones con el gen reportero *CAT*

Las construcciones se realizaron en primer lugar sobre el vector pBICAT (Larreta y col., 2004), un derivado de pBluescript que contiene el gen *CAT*, codificante para la enzima cloranfenicol acetil transferasa de *E. coli*. Finalmente, las construcciones fueron transferidas al vector de expresión para tripanosomátidos pX63Neo (LeBowitz y col., 1991) (Fig. 3).

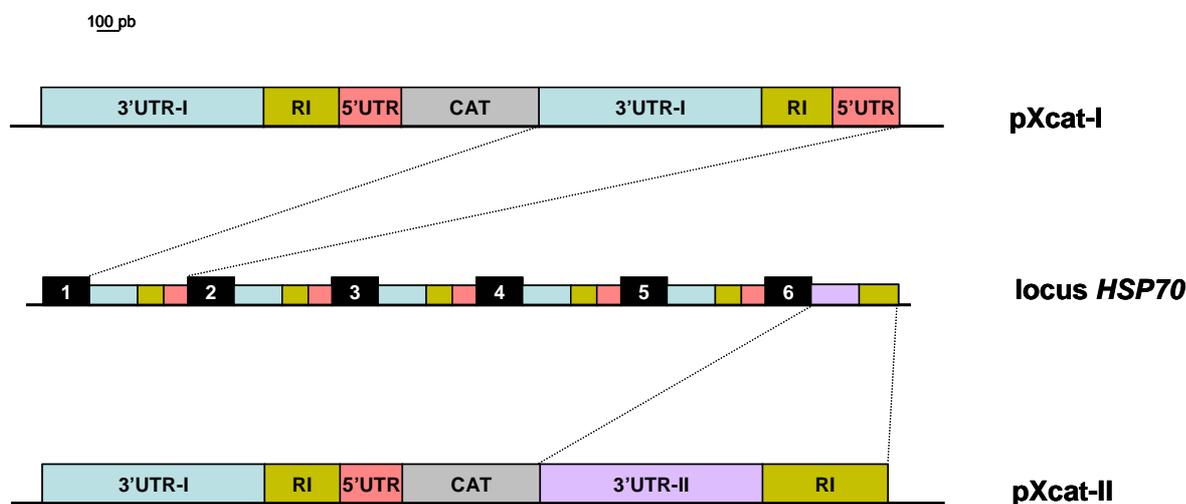


Figura 3. Esquema de las construcciones plasmídicas pXcat-I y pXcat-II. El gen *CAT* fue clonado entre la región 5'UTR, común a todos los genes *HSP70*, y la región 3'UTR de los genes *HSP70-I* (pXcat-I) o del gen *HSP70-II* (pXcat-II). En la parte central de la figura se incluye una representación esquemática del locus *HSP70* de *L. infantum*, donde se indica el origen de las regiones clonadas a ambos lados del gen *CAT*.

Para la obtención de las regiones reguladoras de los genes *HSP70*, se partió de los clones pUCB2C, que contiene el fragmento *SaI* de 5,72 kb procedente del clon genómico B2g3, y pUCB2F, que contiene el fragmento *SaI* de 3,81 kb procedente del clon genómico B2g6 (Quijada y col., 1997a).

El fragmento 3'UTR I-RI-5'UTR del locus *HSP70*, junto con 10 nucleótidos de la región codificante, se amplificó por PCR utilizando como molde el clon pUCB2F, con los siguientes oligonucleótidos: 1A, iniciador directo con dianas consecutivas *Xba*I (para el clonaje en pBICAT) y *Bg*III (para el clonaje final en pX63Neo), 5'- TCTAGA AGATCT CGGAAGTGCT GCAGAGCA -3', y 2A, iniciador reverso con una diana *Eco*RV, 5'- GATATCGATG GCGCCTTCGA ATGTCAT -3'. La digestión del producto de PCR con las enzimas *Xba*I y *Eco*RV, dio lugar a un fragmento de 1664 pb que fue clonado en el vector pBICAT para dar lugar al clon pCATC3'.

Para clonar la región 3'UTR-I de los genes *HSP70-I* se amplificó el fragmento 5'UTR-RI-3'UTR I, empleando como molde el clon pUCB2F, con los siguientes oligonucleótidos: 3A, iniciador directo con la diana *Hind*III, 5'- *AAGCTTATCG CCCGAGTGCG CCGGAA* -3', y 4B, iniciador reverso con las dianas *Xho*I (para el clonaje en CATC3') y *Bgl*II (para el clonaje final en pX63Neo), 5'- *CTCGAGATCT GATGGCGCCT TCGAATGTCA T* -3'. El fragmento amplificado fue digerido con *Hind*III y *Xho*I y clonado en CATC3' para dar lugar al clon CATC3'C4. Finalmente, CATC3'C4 fue digerido con la enzima *Bgl*II y el gen *CAT-HSP70-I* fue clonado en pX63Neo, generándose el clon **pXcat-I** (Fig. 3).

Con el fin de clonar la región 3'UTR-II se amplificó por PCR el fragmento 3'UTR II-RI del sexto gen del locus *HSP70*, empleando como molde el clon pUCB2C, y los siguientes oligonucleótidos: 5, iniciador directo con una diana *Hind*III, 5'- *AAGCTTATCG CCCGAGTGCT GTGAA* -3', y 7, iniciador reverso con dianas consecutivas *Sal*I (para el clonaje en CATC3') y *Bgl*II (para el clonaje final en pX63Neo), 5'- *GTCGAC AGATCT TGACGGGTGA ATGTGTTT* -3'. El producto de amplificación fue digerido con las enzimas *Hind*III y *Sal*I y clonado en el vector CATC3' para dar lugar al clon **pCATC3'C6**. Por último, este clon fue digerido con *Bgl*II y el gen *CAT-HSP70-II* fue clonado en el plásmido pX63Neo, dando lugar al clon **pXcat-II** (Fig. 3).

3.4.2. Clones pHAHSP70-IIs y pHAHSP70-IIas

Estos clones contienen la región codificante del gen *HSP70* de *L. infantum*, fusionada en su extremo 5' a la secuencia codificante para el epítipo HA, que se corresponde con los residuos 98-106 (Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala) de la hemaglutinina HA-1 del virus de la gripe humana. El gen *HSP70* fusionado a la secuencia codificante del epítipo HA fue flanqueado con las regiones 5'UTR y 3'UTR-II del locus *HSP70* (Fig. 4). El vector empleado para realizar esta construcción plasmídica fue **p5Neo3**. El clon p5Neo3 es un derivado de pBluescript que contiene el gen de resistencia a neomicina (gen *NEO*) flanqueado por las regiones 5'UTR y 3'UTR del gen *GRP94* de *L. infantum*.

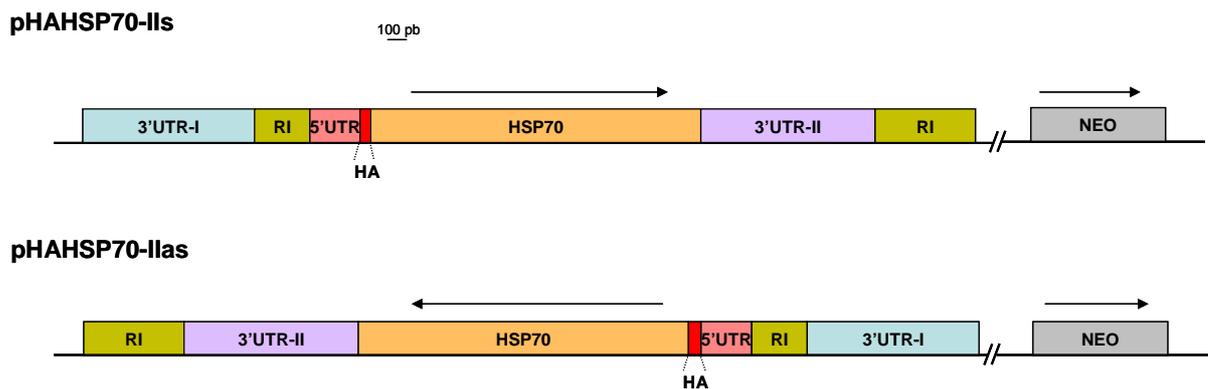


Figura 4. Representación esquemática de las construcciones plasmídicas pHAHSP70-IIs y pHAHSP70-IIas. El gen *HSP70* de *L. infantum* fusionado en su extremo 5' a la secuencia codificante del epítipo HA fue clonado en el contexto de la región 5'UTR y 3'UTR II del gen *HSP70-II*. Las flechas indican el sentido en el que se clonó el gen *HAHSP70* con respecto al gen de resistencia *NEO*.

El fragmento con la región correspondiente a la región 5'UTR (3'UTR I-RI-5'UTR) fue amplificado a partir del clon pUCB2F con los oligonucleótidos: 1A (descrito anteriormente) y 2B, iniciador reverso con la diana *EcoRV*, 5'- *GATATCCGCT GCGGCAGTGG TCGTGTG* - 3'. El producto amplificado de 1664 pb fue digerido con las enzimas *XbaI* y *EcoRV* y clonado en los mismos sitios del vector CATC3'C6, de forma que el fragmento *XbaI-EcoRV* de este clon fue reemplazado por el fragmento amplificado, generándose el clon **pBcat70-II**.

La secuencia de la región 3'UTR-II, junto con 600 pb de la región intergénica adyacente, fue amplificada utilizando como molde el clon pUCB2C, y los oligonucleótidos: 5 (descrito anteriormente), y 7B, iniciador reverso con dos dianas consecutivas *SalI* y *NotI*, 5'- *GTCGACGCGG CCGCTGACGG GTGAATGTGT TT* -3'. El producto de amplificación digerido con las enzimas *HindIII* y *SalI* se clonó en el vector pBcat70-II en sustitución del fragmento *HindIII-SalI*, dando lugar al clon **pBcat70-IIbis**.

Por último, se amplificó la región codificante del gen *HSP70* empleando como ADN molde el clon pBLsc70Li (Quijada y col., 1996) con los siguientes oligonucleótidos: HAHSP70, iniciador directo con la diana *EcoRV* y la secuencia codificante para el epítipo HA, 5'- *GATATCATGT ACCCGTACGA CGTTGCCGGA CTACGCGACAT TCGAAGGCGC CATCGGC* -3', y 3'-Lito, iniciador reverso con la diana *HindIII*, 5'- *GGAAGCTTTT AGTCGACCTC CTCGACCTTG G* -3'. El gen amplificado de 3616 pb digerido con las enzimas *EcoRV* y *HindIII* se clonó en sustitución del fragmento *EcoRV-HindIII* del clon pBcat70-IIbis, generando el clon **pBHA70-II**. Finalmente, el gen de fusión *HAHSP70-II* fue liberado del vector pBHA70-II mediante una digestión *NotI* y clonado en el mismo sitio del vector p5Neo3, generándose los clones **pHAHSP70-IIs** y **pHAHSP70-IIas**, en función de que el gen se clonara en sentido (pHAHSP70-IIs) o antisentido (pHAHSP70-IIas) con respecto al gen *NEO* (Fig. 4).

3.4.3. Clon pNeo-II

Este clon contiene la región codificante del gen de resistencia a neomicina flanqueado por las regiones 5'UTR y 3'UTR II del gen *HSP70-6* de *L. infantum* (Fig. 5).

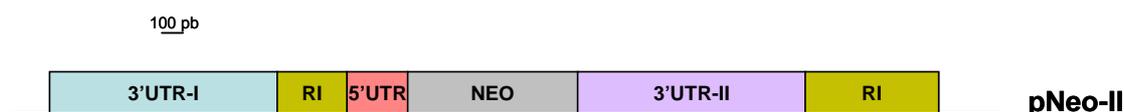


Figura 5. Esquema del plásmido pNeo-II. El gen de resistencia *NEO* fue clonado entre la región 5'UTR y la región 3'UTR II del gen *HSP70-II*.

Para realizar este clon se substituyó el fragmento CAT (*AsuII-HindIII*) del clon pCATC3'C6 por otro fragmento *AsuII-HindIII* con el gen *neomicina* (*NEO*). Para ello, se amplificó por PCR el gen *NEO* utilizando como molde el vector pcDNA3 (Invitrogen), y los siguientes oligonucleótidos: Neo5b, iniciador directo con la diana *AsuII* en su secuencia, 5'- *GGTTCGAAAT TGAACAAGAT GGATTGCA* -3', y Neo3, iniciador reverso con la diana *HindIII* 5'- *CCCAAGCTTT CAGAAGAAGT CGTCAAGAAG* -3'. El producto amplificado de 810 pb fue digerido con las enzimas *AsuII* y *HindIII*, y clonado en el vector pCATC3'C6 en sustitución del fragmento CAT, dando lugar al clon **pNeo-II**.

3.4.4. Clon pHyg-II

Contiene la región codificante del gen de resistencia a *higromicina* (gen *HYG*) flanqueada por las regiones 5'UTR y 3'UTR II del gen *HSP70-6* de *L. infantum* (Fig. 6). Este clon se obtuvo mediante el reemplazamiento del fragmento *CAT* (*AsuII-HindIII*) del clon pCATC3'C6 por el gen *HYG*.

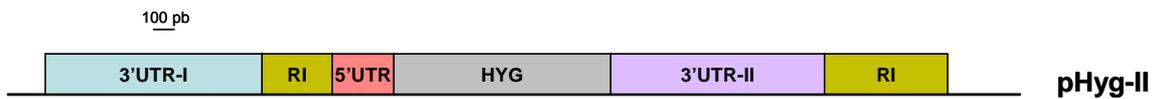


Figura 6. Representación esquemática del plásmido pHyg-II. El gen de resistencia *HYG* fue clonado entre la región 5'UTR y 3'UTR II del gen *HSP70-II*.

La amplificación del gen *HYG* se llevó a cabo utilizando como molde el plásmido pIRES1hyg (Clontech) y los oligonucleótidos: Hyg5b, iniciador directo con la diana *AsuII* en su secuencia, 5'- GGTTCTGAAGA TAGATCCGGA AAGCCTGA -3', e Hyg3, iniciador reverso con una diana *HindIII* en su secuencia, 5'- CCCAAGCTTC TATTCCTTTG CCTCGGACG -3'. El producto de PCR, de 1050 pb, digerido con las enzimas *AsuII* y *HindIII* fue clonado en el vector pCATC3'C6 en lugar del fragmento *CAT*, dando lugar al clon **pHyg-II**.

3.5. Sondas de ADN y oligonucleótidos

- **Sonda 3'UTR-I:** se corresponde con un fragmento de 1 Kb de la región 3'UTR-I del gen *HSP70-1* de *L. infantum*, obtenida mediante una digestión *BamHI* del clon pBls3'UTRI (Quijada y col., 1997a).
- **Sonda 3'UTR-II:** comprende un fragmento de 950 pb de la región 3'UTR-II del gen *HSP70-6* de *L. infantum*, y se obtuvo tras digestión *HindIII-SacI* del clon TC6, que es un derivado de pBluescript que contiene la región 3'UTR II completa del gen *HSP70-6* de *L. infantum*.
- **Sonda CD-70:** se corresponde con un fragmento de 460 pb de la región codificante del gen *HSP70* de *L. infantum*, obtenido mediante digestión *EcoRI* del clon pLd70.2. pLd70.2 es un derivado de pBluescript que contiene un ADNc correspondiente a las posiciones 1701-2138 de la secuencia con número de acceso Y08020 (EBI Data Bank).
- **Sonda α -tubulina:** corresponde al gen α -tubulina de *Trypanosoma cruzi*. Se obtiene por digestión con la enzima de restricción *EcoRI* del clon pT α 3 (Soares y col., 1989).
- **Sonda CAT:** contiene la región codificante completa del gen *CAT* de *E. coli*. Se obtuvo al realizar una doble digestión con las enzimas *EcoRV* y *HindIII* del clon pBICAT (Larreta y col., 2004).
- **Oligonucleótido HA-as:** 5'- CGCGTAGTCC GGCACGTCGT ACGGGTACAT -3'
- **Oligonucleótido HAHSP70:** 5'- GATATCATGTACCCGTACGACGTTGCCGGA CTACGCGACATTTCGAAGGCGCCATCGGC -3'.

3.6. Medios y condiciones de cultivo

3.6.1. Medio Luria-Bertani (LB)

Las bacterias de *E. coli* se crecieron a 37°C en medio LB (triptona 1% (p/v), NaCl 0,5% (p/v) y extracto de levadura 0,5% (p/v)), suplementado o no con el correspondiente antibiótico de selección: ampicilina (50 µg/ml), tetraciclina (12,5 µg/ml). Para crecer las bacterias en medio sólido se añadió agar al 1,5% (p/v) al medio LB.

3.6.2. Medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute)

El medio RPMI-1640 (Sigma) fue suplementado con un 10% (v/v) de suero fetal bovino (FCS, inactivado por calor durante 30 min. a 56°C), 0,1 mg/ml estreptomycin y 100 U/ml de penicilina. Este medio fue empleado para el crecimiento de los promastigotes de *Leishmania* realizado a 26°C, y para el crecimiento de promonocitos de la línea U937, realizado a 37°C y 5% de CO₂. Los cultivos de *Leishmania* en fase logarítmica se recolectaron tras 2-3 días de cultivo a una densidad de $6-9 \times 10^6$ células/ml, mientras que los utilizados en fase estacionaria se recogieron tras 6-7 días de cultivo, con una densidad celular de 2×10^7 células/ml.

3.6.3. Medio Schneider's

El medio de Schneider's (preparado por Juan Rebelles, del Servicio de cultivos del CBMSO) suplementado con un 20% (v/v) de FCS inactivado, 0,1 mg/ml estreptomycin y 100 U/ml de penicilina, se empleó para el cultivo de promastigotes infectivos de *Leishmania* utilizados en los ensayos de infección.

3.6.4. Medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) –(Met, Cys)

El medio DMEM sin metionina ni cisteína (Gibco; Paisley, Reino Unido), fue suplementado con un 10% de FCS (v/v) inactivado, 0,1 mg/ml de estreptomycin y 100 U/ml de penicilina. Se empleó para los ensayos de marcaje de proteínas de nueva síntesis en promastigotes de *Leishmania*.

3.7. Técnicas de manipulación de ADN

3.7.1. Aislamiento de ADN de plásmidos

El ADN de plásmidos se extrajo mediante el método de lisis alcalina empleando el sistema "Jetquick Plasmid Miniprep Spin Kit" (Genomed; Granada, España). En el caso de que los plásmidos fueran a ser empleados para realizar transfecciones en promastigotes de *Leishmania*, la purificación de los mismos se realizó con el sistema "Plasmid Maxi Kit" (Qiagen).

3.7.2. Aislamiento de ADN genómico de *Leishmania*

Se siguió el método descrito por Requena y colaboradores (1988) con algunas variaciones. Tras centrifugar a 1500 g, 10^8 promastigotes se resuspendieron en 0,5 ml de una solución de NaCl 0,15 M, EDTA 0,1 M, SDS 0,5% (p/v) y proteinasa K 0,1 mg/ml, incubándose 30 minutos a 50°C. La solución con el ADN se extrajo sucesivamente con fenol

(1 volumen), fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Posteriormente el ADN se precipitó en presencia de 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 7,0 y 2,5 volúmenes de etanol frío. El sedimento se resuspendió en 200 µl de tampón de Te (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 0,1 mM pH 8) con RNasa A a una concentración de 20 µg/ml, y se incubó la muestra a 37°C durante 30 minutos con el fin de eliminar el ARN. El ADN se purificó finalmente precipitándolo en presencia de alta concentración de sal (0,5 volúmenes de acetato amónico 7,5 M y 2 volúmenes de etanol).

3.7.3. Cuantificación de ADN

La cantidad y pureza del ADN extraído fue medida en el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies).

3.7.4. Preparación y transformación de células competentes

Para la preparación de células competentes y transformación de las mismas con plásmidos se siguió el método de Inoue (Inoue y col., 1990).

En el caso de que los plásmidos transformados presentasen el sistema de complementación β-galactosidasa, se trató la placa, antes de la siembra, con una mezcla de 50 µl de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) 50 mg/ml preparado en N,N-dimetilformamida, y 5 µl de IPTG (iso-propil-tiogalactósido) 1 M.

3.7.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR fueron suministrados por Isogen (Amsterdam, Holanda). Las reacciones se llevaron a cabo en condiciones estándar para la polimerasa AmpliTaq (Perkin-Elmer Cetus Corporation Norwalk, CT), con la adición de Betaína (Sigma) a una concentración final de 2 M. Las temperaturas y tiempos de reacción fueron: 5 min. a 94°C, 30 ciclos de 1 min. a 94°C, 1 min. a 55°C y 1 min. a 72°C, y una extensión final de 5 min. a 72°C.

3.7.6. Secuenciación de ADN

La secuenciación del ADN se llevó a cabo mediante el sistema “ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” (Perkin-Elmer, Foster City, EEUU), y fue realizada en el SIDI (Parque Científico de Madrid, UAM).

3.7.7. Transfección de promastigotes de *Leishmania*

Las transfecciones se realizaron en cultivos de promastigotes de *L. infantum* creciendo en fase logarítmica mediante electroporación (Robinson y Beverley, 2003), usando el tampón de transfección descrito por van den Hoff y colaboradores (1992). Tras la electroporación, las células se transfirieron a 10 ml de medio RPMI con un 10% de suero y las concentraciones de antibióticos habituales. Tras 24 h los promastigotes se sembraron en placas de agar-sangre (Quijada y col., 2003) con el antibiótico de selección geneticina (G418) a una concentración de 20 µg/ml y/o higromicina a una concentración de 50 µg/ml para seleccionar los transfectantes. Tras 10-12 días de incubación se observó la aparición de colonias, que fueron transferidas a medio líquido.

3.7.8. Electroforesis de ADN y transferencia a membrana (*Southern blot*)

La separación de los fragmentos de ADN se realizó en geles de agarosa en cubetas de desarrollo horizontal. Como tampón de carga de alta densidad se utilizó el descrito como tipo II por Sambrook y colaboradores (1989). El tampón de electroforesis utilizado fue TAE (Tris-acetato 40 mM y EDTA 2 mM pH 8).

Para la transferencia de los fragmentos de ADN a membrana de nailon (Hybond-N, suministrado por GE Healthcare) se siguió el método clásico de Southern (1975), con tiempos de desnaturalización y renaturalización de 30 minutos. La solución de desnaturalización se compone de NaCl 1,5 M y NaOH 0,5 M, y la de renaturalización de NaCl 3 M y Tris-HCl 0,5 M pH 7. Con el fin de aumentar la eficiencia de la transferencia de los fragmentos de alto peso molecular, los geles fueron pretratados durante 10 minutos con HCl 0,25 M. La transferencia se realizó durante 4 horas, y posteriormente el ADN fue fijado a la membrana por exposición a la luz UV durante 2 min.

3.7.9. Marcaje radiactivo de ADN de doble cadena

Las sondas de ADN fueron marcadas *in vitro* mediante el método de corrimiento del corte o *nick translation*, utilizando como nucleótido marcado [α - 32 P]dCTP (3000 Ci/mmol, GE Healthcare) (Rigby y col., 1977). Posteriormente el ADN marcado se separó de los nucleótidos no incorporados mediante purificación en columnas de Sephadex G50 por centrifugación (Sambrook y col., 1989). La actividad específica de las sondas marcadas se midió en un contador de centelleo (Liquid Scintillation Counter, 1209 Rackbeta).

3.7.10. Marcaje radiactivo de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos fueron marcados *in vitro* mediante la reacción de la T4 polinucleótido kinasa utilizando [γ - 32 P]ATP (6000 Ci/mmol, GE Healthcare) con una variación al método descrito por Sambrook y colaboradores (1989). Previamente al marcaje, 25 ng de oligonucleótido se incubaron durante 2 min. a 70°C en presencia de DMSO (dimetil-sulfoxido) al 5% (v/v). Inmediatamente después se enfriaron en hielo, y se añadieron los demás componentes de la mezcla de reacción: el nucleótido radiactivo, el tampón de la enzima y la polinucleótido kinasa T4. Esta modificación se llevó a cabo con el fin de marcar eficientemente oligonucleótidos con potencial para formar estructuras secundarias (Quijada y col., 1997b).

3.7.11. Hibridaciones

Las condiciones de hibridación de las membranas con ADN, con sondas marcadas por *nick translation* fueron: prehibridación de 2 h a 42°C en una solución que contiene 10× Denhart's (BSA 0,2% (p/v), Ficoll 400 0,2% (p/v) y polivinilpirrolidona 0,2% (p/v)), 6× SSC (NaCl 0,9 M, citrato sódico 0,09 M), SDS 1% (p/v) y 360 µg/ml de ADN de esperma de salmón sonicado y desnaturalizado; hibridación a 42°C durante 16 h en una solución cuya composición es formamida 50% (v/v), SDS 1% (p/v), 6× SSC, 150 µg/ml de esperma de salmón sonicado y desnaturalizado, y sonda de ADN desnaturalizada (actividad específica aproximada de 10⁸ cpm/µg). Tras la hibridación los filtros se lavaron con tres soluciones diferentes: 30 min. a temperatura ambiente en 10× SSC y SDS 1% (p/v), 45 min. a 42°C en 1× SSC y SDS 0,5% (p/v), y 30 min. a 42°C en 0,1× SSC y SDS 0,1% (p/v).

Cuando la hibridación de las membranas se realizó con oligonucleótidos marcados, los filtros se prehibridaron durante 2 h a 42°C en una solución que contiene: 5× Denhart's, 6× SSC, SDS 0,1% (p/v), EDTA 2mM pH 8 y 100 µg/ml de esperma de salmón sonicado y desnaturalizado. Las hibridaciones se realizaron a 55°C durante 16 h en una solución de NaCl 0,9 M, EDTA 6 mM pH 8, SDS 0,5% (p/v), Tris-HCl 0,09 M (pH 7,5), 100 µg/ml de esperma de salmón sonicado y desnaturalizado, y 25 ng de oligonucleótido marcado (actividad específica alrededor de 10⁹ cpm/µg). Los lavados se realizaron con 6× SSC en las siguientes condiciones: 15 min. a temperatura ambiente (2 veces), 30 min. a temperatura ambiente, 15 min. a 65°C y 15 min. a temperatura ambiente.

Los filtros se reutilizaron tras eliminar los restos de las sondas hibridadas anteriormente mediante el tratamiento de los mismos con SDS 0,1% (p/v) durante 30 min. a 95°C.

3.8. Técnicas de manipulación de ARN

3.8.1. Aislamiento de ARN de *Leishmania*

El ARN de *Leishmania* se obtuvo mediante el sistema “Total Quick RNA Cells and Tissues” (Talent, Trieste, Italia).

3.8.2. Cuantificación y análisis de ARN

La cantidad de ARN y su pureza fue cuantificada en el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies).

En los ensayos de análisis de las fracciones polisómicas, la distribución del ARNr entre las distintas fracciones fue analizada en el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies), utilizándose posteriormente el software Agilent 2100 Expert (Agilent Technologies) para el tratamiento de los datos.

3.8.3. Electroforesis de ARN y transferencia a membrana (*Northern blot*)

El ARN total fue desnaturalizado mediante el método de formamida-formaldehído y fraccionado de acuerdo a su peso molecular en geles de agarosa al 1% (p/v) y formaldehído al 6% (v/v) (Lehrach y col., 1977). Para la electroforesis se empleó el tampón MOPS (1× MOPS: MOPS 40 mM, Na-Acetato 10 mM y EDTA 1 mM pH 8).

Para la transferencia a membrana (Hybond-N) se usó el equipo Transphor Power Lid (Hoeffer, San Francisco, EEUU). Las condiciones de transferencia fueron: 30 min. a 0,25 amperios, 30 min. a 0,5 amperios y 1 hora a 1 amperio. Posteriormente el ARN fue fijado al filtro por exposición a luz UV durante 2 min.

Para comprobar la eficiencia de la transferencia, se utilizó el método de tinción del ARN con azul de metileno. Primero, la membrana con el ARN transferido fue incubada en una solución de ácido acético al 5% (v/v) durante 5 min. a temperatura ambiente. A continuación, se mantuvo en una solución de acetato sódico 0,5 M pH 5,2 y azul de metileno al 0,04% (p/v) durante 5-10 min. El exceso de tinción se retiró con agua destilada.

3.8.4. Hibridaciones

Se realizaron de la misma manera que en el caso de las membranas de ADN (apartado 3.7.11).

3.8.5. Análisis de las fracciones polisómicas en gradientes de sacarosa

La separación de las fracciones polisómicas se realizó en gradientes lineales de sacarosa (15-40%) según el método descrito por Mullner y García Sanz (1997) con algunas modificaciones. $2,5 \times 10^8$ promastigotes de *L. infantum* fueron lavados con PBS frío dos veces y resuspendidos en 1 ml de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Nonidet P40 0,5% (v/v) y heparina 0,6 mg/ml) suplementado con 240 U de SUPERase-In (Ambion, Austin, TX, EEUU). Tras la lisis, se centrifugaron las muestras en una microfuga a 3.000 g durante 2 min. a 4°C con el fin de sedimentar los núcleos. A los sobrenadantes se les añadió 150 µg/ml de cicloheximida, DTT 20 mM y PMSF (fenil-metil-sulfonil fluoruro) 1 mM, y se centrifugaron a 13.000 g durante 5 min. a 4°C para eliminar restos celulares y mitocondrias. Los sobrenadantes recogidos se depositaron sobre los gradientes de sacarosa y se centrifugaron en un rotor SW41T a 170.000 g durante 2 horas a 4°C. De los gradientes se extrajeron 15 fracciones de 800 µl, desde la superficie hacia el fondo, a las que se añadió SDS, EDTA pH 8 y proteinasa K a una concentración final de 1% (p/v), 10 mM y 200 mg/ml respectivamente. Tras incubarlas 30 min. a 37°C se realizó una extracción con una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), y el ARN fue precipitado con etanol a -20°C. Las muestras de ARN purificado de cada fracción se separaron en un gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes (apartado 3.8.3), y se transfirieron a una membrana de nailon. En los ensayos realizados con el fin de comprobar la asociación específica de los mensajeros con los ribosomas, los extractos citoplasmáticos obtenidos se trataron con EDTA 50 mM pH 8 a 4°C durante 30 min. para provocar la disociación de las subunidades ribosomales.

3.9. Técnicas de manipulación de proteínas

3.9.1. Extracción de proteínas totales de *Leishmania*

Se recolectaron 6×10^7 promastigotes y se lisaron en 150 µl de tampón Laemmli (1970), de forma que la concentración final fuera de 4×10^5 células/µl. Las muestras se sonicaron durante 10 min. a 4°C en baño de agua (Ultrasons; Selecta, Barcelona, España).

En el caso de que las proteínas fueran a ser empleadas para antigenar placas con el fin de realizar ensayos de E.L.I.S.A. (del inglés, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), la preparación se realizó de forma diferente a la indicada anteriormente. Se recolectaron 10^8 promastigotes que fueron lavados 2 veces con PBS y resuspendidos en 500 µl de PBS. La lisis de los parásitos se realizó sometiendo a los mismos a 5 ciclos de congelación (N₂ líquido) y descongelación (37°C). Posteriormente el lisado se sonicó con vástago 3 veces durante 10 seg. y se centrifugó durante 10 min. El sobrenadante constituye el extracto de proteínas totales de *Leishmania*.

3.9.2. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de la cantidad de proteínas se realizó por el método de Bradford (1976), utilizando el reactivo comercializado por Bio Rad (California, EEUU), consistente en azul de Coomassie G-250 disuelto en una mezcla de ácido fosfórico y metanol.

3.9.3. Marcaje radiactivo de proteínas de nueva síntesis en *Leishmania*

Para el marcaje de proteínas de nueva síntesis se partió de 10 ml de un cultivo a una densidad celular de 6×10^6 células/ml. Las células se resuspendieron en 100 μ l de medio DMEM sin metionina ni cisteína (Gibco) con un 10% de FCS inactivado. Tras 30 min. a 26°C se añadieron 100 μ Ci de [³⁵S]Met y [³⁵S]Cys (GE Healthcare; Redivue Pro-mix L-[³⁵S] in vitro cell labelling mix, 1000 Ci/mmol). Una vez aplicado el tratamiento correspondiente a las células, los parásitos se lavaron con PBS y se midió la cantidad de marca incorporada mediante un contador de centelleo (Liquid Scintillation Counter, 1209 Rackbeta).

3.9.4. Ensayos de inmunoprecipitación

Se partió de 10 ml de un cultivo de promastigotes en fase logarítmica. El marcaje de proteínas de nueva síntesis se realizó como se ha descrito en el apartado anterior (3.9.3). Tras el tratamiento, los parásitos fueron lisados durante 30 min. a 4°C en 100 μ l de tampón de lisis cuya composición es: Tris-HCl 0,05 M pH 7,5, NaCl 0,15 M, PMSF 1 mM, Tritón X100 1% (v/v), Leupeptina 8 μ g/ml, Pepstatina 4 μ g/ml y Aprotinina 4 μ g/ml. Posteriormente se sonicó el lisado de células durante 10 min. en un baño de agua a 4°C. Tras centrifugación en la microfuga durante 15 min. se recogieron 100 μ l de sobrenadante, de los cuales 25 μ l se emplearon para visualizar las proteínas totales y medir la cantidad de marca incorporada, y los 75 μ l restantes se incubaron durante 16 h con el anticuerpo correspondiente a la proteína que se quería inmunoprecipitar. A la mezcla de proteínas y anticuerpo se le añadió después 15 μ l de suspensión de proteína A-agarosa (Sigma), pre-equilibrada con 50 μ l de tampón de lisis, y se incubó 1 h a 4°C. El lavado de las muestras se realizó en tres soluciones diferentes: tres lavados con Tris-HCl 0,01 M pH 8, NaCl 0,03 M y Tritón X100 2% (v/v); dos lavados con Tris-HCl 0,1 M pH 8, NaCl 0,05 M y Tritón X100 0,1% (v/v), y un lavado con Tris-HCl 0,01 M pH 8 y Tritón X100 0,05% (v/v).

Para las inmunoprecipitaciones se emplearon los siguientes anticuerpos:

- Anticuerpo anti-CAT (Sigma): se empleó a una dilución 1/1000. Se trata de un anticuerpo policlonal obtenido en conejo.
- Anticuerpo anti-HSP70 policlonal: se trata de un suero de conejo inmunizado con la proteína recombinante HSP70 de *L. infantum* (Rico y col., 1999). Se empleó a una dilución 1/1000
- Anticuerpo anti-HA (Sigma): se empleó a una dilución 1/1000. Se trata de un anticuerpo policlonal desarrollado en conejo.

3.9.5. Electroforesis de proteínas y transferencia a membranas (*Western blot*)

Las proteínas se desnaturalizaron en tampón Laemmli (1970) durante 5 min. a 100°C y se separaron por tamaño mediante electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS), con un porcentaje de acrilamida del 10% - 11%, en función del tamaño de la proteína de interés, utilizando el equipo Mini-Protean II de

Bio-Rad. Las proteínas se visualizaron por tinción con azul de Coomassie. El desteñido de los geles se realizó utilizando dos soluciones diferentes: metanol 45,4% (v/v)-ácido acético 7,5% (v/v) y metanol 5% (v/v)-ácido acético 7,5% (v/v).

Para la transferencia de proteínas se emplearon membranas de nitrocelulosa PROTRAN[®] (Schleider & Schuell GmbH, Dassel, Alemania) utilizando el sistema de electrotransferencia en líquido de Bio-Rad. El tampón de transferencia empleado está compuesto por Tris base 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20% (v/v). Una vez realizada la transferencia se bloqueó la membrana durante 1 h con una solución de bloqueo, consistente en leche desnatada en polvo al 5% (p/v) y Tween-20 al 0,05% (v/v) en PBS. Las incubaciones con los anticuerpos se realizaron en la solución de bloqueo durante un tiempo mínimo de 2 h. Entre las dos incubaciones se lavaron las membranas tres veces con Tween-20 0,05% (v/v) en PBS durante 10 min. El revelado se realizó con el sistema "ECL Western blotting analysis system" (GE Healthcare).

Como anticuerpos primarios se emplearon:

- Anti-HSP70 policlonal: dilución 1/3000.
- Anti-HSP70 monoclonal (Perez-Alvarez y col., 2001): dilución 1/500.
- Anti-CAT: dilución 1/2000.
- Anti-HA: dilución 1/1000.

Como anticuerpos secundarios se emplearon:

- GAR/PO (IgG) (Nordic Immunological Laboratories; Tilburg, Países Bajos): dilución 1/6000.
- GAM/PO (IgM) (Nordic Immunological Laboratories): dilución 1/3000.

3.9.6. Electroforesis bidimensional (EF-2D)

3.9.6.1. Preparación de los extractos proteicos

Se recolectaron 1×10^8 promastigotes que se lavaron dos veces con PBS frío. La lisis de los parásitos se realizó en 200 μ l de tampón de lisis cuya composición es: Nonidet P40 0,5% (v/v), EDTA 1 mM pH 8, PMSF 0,1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,4 y DTT 1mM. Al lisado se le añadió un volumen de fenol y la mezcla se incubó durante 10 min. en hielo. Tras centrifugación a 2000 g durante 5 min. a 4°C se descartó la fase acuosa, y las proteínas fueron precipitadas durante 16 h a -20°C tras la adición de 1 ml de acetato de amonio 0,1 M en metanol puro. Tras centrifugar la muestra a 2000 g durante 10 min. a 4°C, las proteínas se lavaron con acetona al 80% (v/v) fría y se resuspendieron finalmente en 100 μ l de tampón de solubilización: urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4% (p/v), Tris-HCl 40 mM pH 8,8, tampón IPG 4-7 (GE Healthcare) 0,5% (v/v), PMSF 1 mM y DTT 20 mM. La muestra se incubó a 30°C durante 2 h para favorecer la solubilización de las proteínas.

3.9.6.2. Primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF)

Para llevar a cabo la separación de las proteínas en función de su punto isoeléctrico (IEF) se utilizaron geles con gradiente de pH inmovilizado del rango 4-7 (GE Healthcare). La rehidratación de los geles se realizó de forma simultánea a la carga de las muestras, mediante la aplicación de un campo eléctrico (rehidratación activa). Se cargaron 70 μ g de proteínas

totales preparadas en un volumen final de 340 µl de tampón de solubilización (descrito anteriormente), al que se añadió DTT a una concentración de 50 mM. Tanto la rehidratación como el IEF se realizaron en el sistema Ettan™ IPGphor II™ (GE Healthcare). Las condiciones de rehidratación fueron las siguientes: 30 V durante 6 h y 60 V durante 6 h. Las condiciones de IEF fueron: 120 V durante 1 h, 200 V durante 1h, 500 V durante 1 h, 1000V durante 30 min., gradiente 1000-8000 V durante 30 min. y 8000 V hasta alcanzar los 50.000 V/h.

3.9.6.3. Segunda dimensión: PAGE-SDS

Antes de realizar la separación de las proteínas en función de su peso molecular, los geles con las proteínas enfocadas fueron equilibrados de forma sucesiva con dos soluciones preparadas en tampón de equilibrado: urea 6 M, SDS 2% (p/v), Tris-HCl 375 mM pH 8,8, y glicerol 20% (v/v). La primera incubación se realizó durante 15 min. en 10 ml del tampón de equilibrado al que se le añadió 200 mg de DTT, mientras que la segunda se hizo 15 min. en 10 ml del tampón de equilibrado con 250 mg de Iodoacetamida. Posteriormente, las tiras se cargaron sobre geles de acrilamida al 10% y las proteínas se separaron utilizando el sistema Vertical Slab Gel Unit (Hoeffer).

3.9.6.4. Fluorografía

En el caso de muestras de proteínas marcadas radiactivamente, el revelado de los geles se realizó mediante fluorografía, previamente a la exposición con películas de rayos X con el fin de amplificar la señal de las mismas. Para ello los geles fueron fijados en primer lugar en una solución de metanol:ácido acético:agua (45:7,5:47,5) durante 30 min. Posteriormente el gel fue incubado dos veces durante 40 min. en DMSO, y después se trató 2 h y 30 min. con una solución de PPO (2,5-difenil oxazol) al 12% (p/v) en DMSO. A continuación el gel se lavó con agua destilada durante 30 min. y finalmente fue secado.

3.10. Ensayos de infección *in vitro*

3.10.1. Activación de la línea de promonocitos humanos U937

En los ensayos de infección *in vitro* se empleó la línea celular de promonocitos U937. Tras recoger las células del cultivo, éstas se lavaron dos veces con medio RPMI suplementado con 10% de FCS inactivado, y se resuspendieron en ese mismo medio a una concentración final de $2,5 \times 10^5$ células/ml. La activación de estas células se llevó a cabo mediante la adición de PMA (Forbol 12-miristato 13-acetato) (Sigma) a una concentración de 1×10^{-8} M, incubando las células durante 16 h a 37°C en atmósfera de 5% CO₂. En el caso de las preparaciones para analizar por microscopía óptica, las células se sembraron en cámaras Lab-Tek (Nunc; Nueva York, EEUU), mientras que en el caso de los ensayos para analizar por citometría de flujo, las células se sembraron en placas de 6 pocillos (Nunc).

3.10.2. Infección de monocitos con promastigotes de *Leishmania*

Para los ensayos de infección se emplearon promastigotes en fase estacionaria, que tras ser recolectados fueron lavados dos veces con PBS, y resuspendidos en medio RPMI con 10% de FCS inactivado a una densidad celular de $2,5 \times 10^6$ promastigotes/ml. Los monocitos activados se infectaron con estos promastigotes en una relación 1:5 (monocito:parásitos) y los cultivos se incubaron a 37°C y 5% CO₂. Tras 2 h de infección se retiró el medio de los

pocillos con el fin de eliminar los parásitos no adheridos a los monocitos, y se añadió medio fresco. Las muestras se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante distintos intervalos de tiempo.

3.10.3. Tinción con Giemsa

Para las tinciones se lavaron en primer lugar los pocillos de los Lab Tek con PBS, y después se fijaron las preparaciones con metanol puro durante 5 min. Tras dejar secar las preparaciones al aire, éstas se tiñeron durante 20 min. añadiendo 200 µl/pocillo de una solución Giemsa (Merck) diluida 1/20 en agua destilada. Finalmente se lavaron los pocillos 5 veces con agua destilada y las preparaciones se montaron empleando el pegamento Eukitt® (Panreac). Las preparaciones se observaron al microscopio óptico (microscopio vertical Axiophot (Zeiss) con motorización en el eje Z acoplado a cámara ccd de color).

3.11. Ensayos de infección *in vivo*

3.11.1. Infección de ratones BALB/c

Las infecciones se realizaron por vía intravenosa en la vena de la cola en ratones de la cepa BALB/c, con 10⁶ promastigotes en fase estacionaria preparados en un volumen de 100 µl de PBS. Durante el curso de la infección se realizaron extracciones de sangre del seno venoso retroorbitario, mediante punción del mismo con una pipeta Pasteur estéril. La sangre extraída se incubó durante 30 min. a 37°C, después 1 h a 4°C y finalmente se microfugó durante 10 min. para la obtención del suero que se glicerolizó en una relación 1:1 y se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso.

3.11.2. Estimación de la carga parasitaria: ensayos de dilución límite

La carga parasitaria se valoró en el bazo, y en una sección del hígado. Tras el sacrificio de los animales, se extrajo el bazo completo y una sección del hígado que se pesó en balanza de precisión. Los órganos se maceraron, con ayuda de un émbolo de vidrio, hasta la completa homogeneización en 1 ml de medio Schneider's suplementado con 20% (v/v) de FCS inactivado. Las diluciones seriadas se realizaron por duplicado en placas de 96 pocillos (Nunc). En el pocillo inicial se plaquearon 250 µl del homogeneizado, y a partir de éste se realizaron diluciones 1/4 en medio Schneider's completo en un volumen final de 250 µl/pocillo. Las placas se incubaron a 26°C. A partir del sexto día de cultivo se observaron las placas en el microscopio invertido con el fin de establecer el pocillo de mayor dilución en el que crecen parásitos. El número de parásitos por sección de tejido se calcula con la fórmula 4^x, donde x es el número del pocillo de mayor dilución en el que se detectan parásitos. Para determinar la carga parasitaria total en el hígado se tuvo en cuenta el peso de la sección analizada y el peso total del órgano.

3.12. Ensayos de citometría de flujo

3.12.1. Tinción de promastigotes de *Leishmania* con CFSE

Los promastigotes teñidos con CFSE fueron empleados en los ensayos de infección *in vitro*, así como en los ensayos de división celular, siguiéndose en ambos casos el mismo protocolo. Primero se recolectaron los promastigotes, y tras lavarlos 2 veces con PBS, se resuspendieron a una concentración de 1 × 10⁷ células/ml en PBS. Posteriormente se añadió el fluorocromo CFSE (Molecular Probes; Leiden, Holanda) hasta una concentración final de 5

μM y se incubaron los promastigotes durante 10 min. a 37°C en oscuridad. Transcurrido ese tiempo, se paró la reacción añadiendo medio RPMI completo enfriado a 4°C , y finalmente se lavaron los parásitos 2 veces con este medio. Las células teñidas con el marcador CFSE se analizaron en el citómetro FACScalibur (Becton Dickinson). La información obtenida se procesó con el software Cell Quest (Becton Dickinson).

3.12.2. Análisis de ciclo celular

Se recolectaron 4×10^6 promastigotes, que se lavaron dos veces con PBS. Las células se fijaron durante 1 h a 4°C en una solución de PBS:metanol (3:7). Pasado el tiempo de fijación, se centrifugaron las células y se resuspendieron en 500 μl de tampón citrato pH 7 (MgCl_2 45 mM, MOPS 20 mM, citrato sódico 30 mM y Tritón X-100 0,1% (v/v)). A la suspensión de células se le añadió RNasa A a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ y yoduro de propidio a 50 $\mu\text{g/ml}$, y las muestras se incubaron en oscuridad a 37°C durante 20 min. Finalmente las muestras se analizaron en el citómetro FACScalibur y los datos obtenidos se procesaron con el programa de análisis Cell Quest.

3.13. Ensayos de ELISA

Para la medida de la reactividad de sueros frente a proteínas se utilizó el sistema ELISA. Para este ensayo se emplearon placas de 96 pocillos (Nunc) que fueron saturados durante toda la noche a 4°C con 100 μl de proteínas totales de *L. infantum* (2 $\mu\text{g/ml}$). Posteriormente los pocillos fueron lavados tres veces con Tween 20 al 0,5% (v/v) en PBS, e incubados con solución de bloqueo (leche desnatada en polvo al 5% (p/v) y Tween 20 al 0,5% (v/v) en PBS) durante 2 h. Como anticuerpo primario se emplearon los sueros de ratones infectados con promastigotes de *Leishmania* (apartado 3.11.1) preparados en solución de bloqueo a distintas diluciones, y se incubaron durante 2 h. A continuación, y después de tres lavados, se incubaron los pocillos con un anticuerpo conjugado con peroxidasa, que reconoce específicamente las IgGs de ratón (Nordic Immunological Laboratories), a la dilución de 1:1500. Para el revelado de las placas se utilizó ortofenilenediamina (OPD, Dako) como sustrato para la peroxidasa. La reacción se paró añadiendo 50 μl de H_2SO_4 1 M. La absorbancia se midió a 450 nm en el lector 2001 de microplacas (Whittaker, Indiana, EEUU).

3.14. Análisis cuantitativo

Las autorradiografías fueron escaneadas con un densitómetro láser (Image Quant™ versión 3.0: Molecular Dynamics). Las medidas se realizaron en condiciones en las que existía una relación lineal entre la cantidad de proteína, ADN o ARNm y la intensidad de las bandas de la autorradiografía.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Mecanismos de regulación de la expresión de los genes *HSP70* de *L. infantum* durante el choque térmico

4.1.1. Expresión de los genes *HSP70* de *L. infantum* durante el choque térmico

En el genoma de *L. infantum* existen 6 copias del gen *HSP70* que se disponen en un tándem directo (Quijada y col., 1997a). La principal diferencia que existe entre las distintas copias reside en sus regiones 3'UTR: la región 3'UTR del gen *HSP70* situado en el extremo 3' del locus (3'UTR-II) es altamente divergente en secuencia respecto a la región 3'UTR de los 5 genes restantes (3'UTR-I) (Fig. 7). Teniendo en cuenta esta divergencia de secuencia de las regiones 3'UTR, a los cinco primeros genes *HSP70*, aquellos que portan la región 3'UTR-I, los hemos denominado genes *HSP70-I*, mientras que al sexto gen, portador de la región 3'UTR-II, lo denominamos como *HSP70-II*. Además de la divergencia de secuencia de sus regiones 3'UTR, los genes *HSP70-I* y *HSP70-II* presentan claras diferencias en cuanto a su expresión durante el choque térmico (Quijada y col., 1997a) (Fig. 7). Así, cuando los promastigotes de *Leishmania* son cultivados durante 2 h a las temperaturas de 26, 37, 39 y 41°C, se observa que los transcritos *HSP70-I* se acumulan 2-3 veces a 37°C con respecto a los niveles detectados a la temperatura de crecimiento normal de los promastigotes (26°C); a 39°C, los niveles de estos mensajeros son comparables a los existentes a 26°C, y a 41°C prácticamente no se detectan. Por el contrario, los transcritos *HSP70-II* mantienen sus niveles constantes a las diferentes temperaturas ensayadas, incluso a temperaturas extremas como 39 y 41°C.

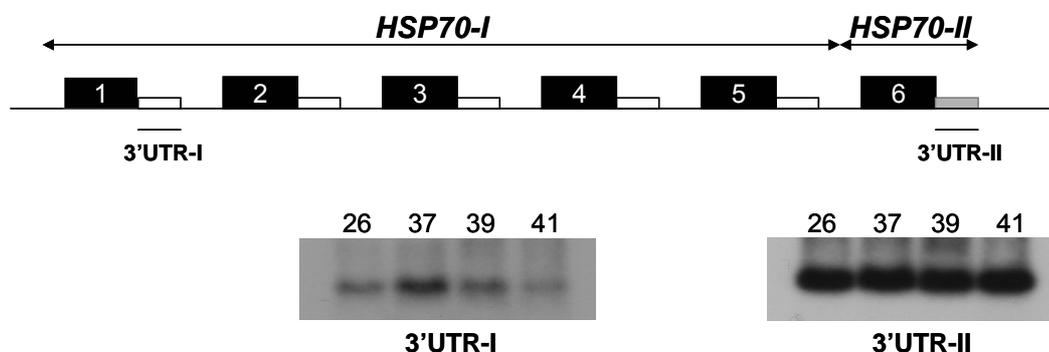


Figura 7. Organización y expresión del locus *HSP70* de *L. infantum*. En el panel superior se representa la organización de los genes *HSP70*; los rectángulos negros se corresponden con las regiones codificantes, los blancos con las regiones 3'UTR-I, y el gris con la región 3'UTR-II de los mismos. En el panel inferior se muestran las autorradiografías de un Northern blot realizado con ARN de promastigotes incubados a 26, 37, 39 y 41°C durante 2 h; las membranas fueron hibridadas con sondas de ADN correspondientes a las regiones 3'UTR-I (izquierda) y 3'UTR-II (derecha).

4.1.2. La proteína *HSP70* se traduce activamente en respuesta al choque térmico

El choque térmico, en la mayoría de los organismos, provoca la inhibición de la traducción de la mayoría de los ARNm, mientras que aquellos que codifican para las proteínas de choque térmico se traducen de forma muy eficiente debido, por ejemplo en *Drosophila*, a señales presentes en sus ARNm (Klemenz y col., 1985). Estudios iniciales en *Leishmania*

indicaron que los transcritos que codifican para las proteínas de choque térmico son traducidos activamente en promastigotes expuestos a la temperatura del hospedador mamífero (Shapira y col., 1988).

Como primer paso para analizar el efecto de la temperatura sobre la síntesis de la proteína HSP70 en *L. infantum*, nos planteamos determinar la cinética de acumulación de esta proteína en parásitos incubados a 37°C. Para ello, los promastigotes fueron sometidos a la temperatura de 37°C durante intervalos de 1 hora hasta un total de 8 horas. En la última hora de tratamiento, las proteínas fueron metabólicamente marcadas por la adición de aminoácidos marcados con ³⁵S. La síntesis *de novo* de HSP70 se determinó mediante inmunoprecipitación de la proteína con un anticuerpo específico (Fig. 8).

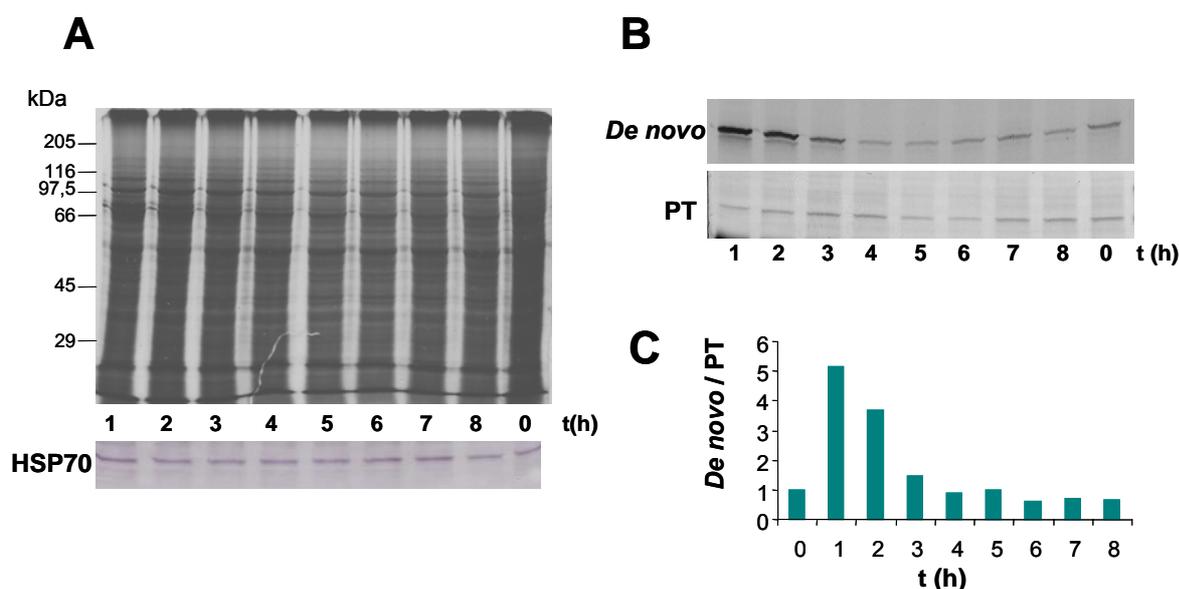


Figura 8. Expresión de la proteína HSP70 de *L. infantum* durante el choque térmico. (A) Los promastigotes fueron mantenidos a 37°C durante un periodo de 0 a 8 h, marcándose la síntesis de proteínas con ³⁵S-metionina y ³⁵S-cisteína en la última hora de tratamiento. Las proteínas marcadas se separaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10%, mostrándose en la figura la exposición autorradiográfica del mismo. En la parte inferior de la radiografía se muestra la cantidad total de HSP70 detectada por *Western blot* en un gel gemelo utilizando un anticuerpo policlonal frente a la proteína HSP70. (B) Inmunoprecipitación de la proteína HSP70 a partir de extractos de parásitos en los que se marcó la síntesis *de novo* de proteínas para los tiempos indicados. En la parte superior aparece la exposición autorradiográfica donde se refleja la proteína HSP70 de nueva síntesis (*De novo*), y en la parte inferior se muestra el resultado del *Western blot* como control de la cantidad de proteína HSP70 inmunoprecipitada en cada muestra (PT). (C) Histograma en el que se representa la relación entre la síntesis *de novo* de HSP70 y la cantidad total de proteína inmunoprecipitada para cada uno de los tiempos de tratamiento (*De novo*/PT); los datos se han normalizado con respecto a la muestra obtenida a tiempo cero, a la que se dio arbitrariamente un valor de 1.

En la figura 8A se muestra una autorradiografía de las proteínas que resultaron marcadas de forma metabólica a los diferentes tiempos de incubación; una primera conclusión de este estudio es que la incubación de los promastigotes de *L. infantum* a 37°C apenas tiene efecto sobre la síntesis global de proteínas. Este hecho indica que 37°C no es una temperatura de choque térmico severo en *L. infantum*, lo cual no resulta sorprendente puesto que se trata de una especie visceral que crece a esa temperatura cuando es transmitida al hospedador mamífero. Los ensayos de inmunoprecipitación indican que la proteína HSP70 se traduce

activamente en respuesta al tratamiento de choque térmico (Fig. 8B), mostrando su máximo de expresión en la primera hora de tratamiento a 37°C, con un aumento en sus niveles de 5-6 veces con respecto a la proteína sintetizada a 26°C (Fig. 8C). Tras 2 h de crecimiento a 37°C la proteína HSP70 de nueva síntesis es 4 veces más abundante que a 26°C, mientras que a partir de la tercera hora de tratamiento los niveles de la proteína prácticamente recuperan los valores iniciales. A pesar del aumento observado en la síntesis de la proteína HSP70 durante el choque térmico, no se detectan cambios en los niveles totales de la proteína (Fig. 8A, panel inferior). Este resultado es esperable teniendo en cuenta que la proteína HSP70 es muy abundante en estos parásitos, representando un 2,1% de la proteína total celular en promastigotes mantenidos a 26°C (Brandau y col., 1995).

Una vez que habíamos determinado el momento en que se produce el máximo de síntesis de HSP70 durante el tratamiento a 37°C, nos planteamos estudiar cómo se traduce ésta a diferentes temperaturas. Con este fin, se tomaron cultivos de promastigotes en los que se marcaron las proteínas de nueva síntesis durante la incubación de los mismos a varias temperaturas (26, 37, 39 y 41°C) durante 1 h, inmunoprecipitándose a continuación la proteína HSP70. En el panel A de la figura 9 se muestra el patrón global de proteínas sintetizadas para cada una de las temperaturas ensayadas. Este resultado indica que mientras que la incubación de los promastigotes a 37°C apenas afecta a la síntesis de proteínas, como se había mostrado anteriormente (Fig. 8A), las temperaturas de 39 y 41°C constituyen temperaturas de choque térmico severo, ya que la síntesis global de proteínas se ve fuertemente disminuida. En cuanto a la síntesis *de novo* de la proteína HSP70, se observa un aumento en el caso de promastigotes incubados a 37 y 39°C (Fig. 9B). La cantidad de HSP70 sintetizada *de novo* aumenta 4-5 veces a 37°C si se compara con los niveles producidos a 26°C; a 39°C el aumento es de 2-3 veces, mientras que a 41°C los niveles de síntesis de la proteína son prácticamente indetectables (Fig. 9C).

Los patrones de acumulación de los transcritos *HSP70-I* durante el choque térmico (Fig. 7), junto con el aumento de la síntesis *de novo* de la proteína HSP70 a 37 y 39°C (Fig. 9), nos llevó a plantear la hipótesis de que la mayor producción de la proteína durante el choque térmico estaría correlacionada con el aumento en los niveles de los ARNm *HSP70-I*. Para testar esta hipótesis, decidimos analizar los perfiles polisómicos de los transcritos *HSP70*.

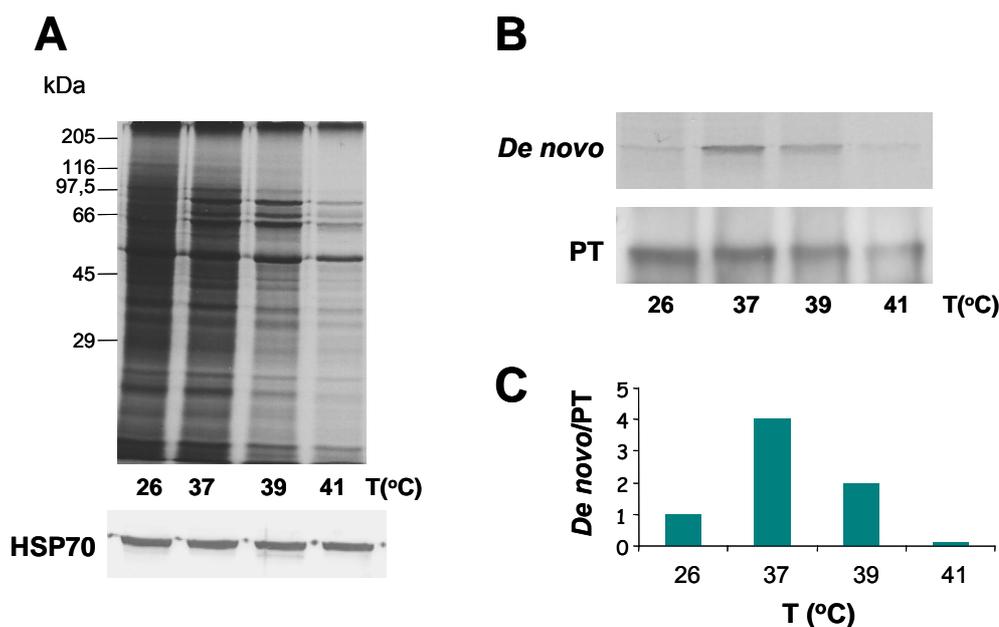


Figura 9. Expresión de la proteína HSP70 a diferentes temperaturas. (A) Exposición autorradiográfica del gel de poliacrilamida en el que se separaron proteínas totales de promastigotes incubados a 26, 37, 39 y 41°C durante 1 h, en los que se marcaron las proteínas de nueva síntesis mediante la adición de ^{35}S -metionina y ^{35}S -cisteína. En la parte inferior se muestra la cantidad total de HSP70 presente en las muestras, determinada por *Western blot*. (B) Inmunoprecipitación de la proteína HSP70 a partir de los extractos proteicos de promastigotes incubados a las temperaturas indicadas. En el panel superior se muestra la proteína HSP70 de nueva síntesis (*De novo*), y en la parte inferior el resultado del *Western blot* realizado para determinar la cantidad de HSP70 total cargada en cada carril (PT). (C) Histograma con la representación de la relación entre la síntesis *de novo* de HSP70 y la cantidad total de proteína (*De novo*/PT); los datos se han normalizado con respecto al valor para la temperatura de 26°C (tomado arbitrariamente como 1).

4.1.3. Análisis de los perfiles polisómicos de los mensajeros *HSP70-I* y *HSP70-II*

La distribución polisómica de un determinado mensajero es un reflejo de la eficiencia de traducción del mismo. Así, la eficacia con la que un ARNm se traduce está en relación al número de ribosomas que tiene unidos y esto se puede determinar analizando su distribución entre las fracciones libres de ribosomas y las fracciones polisómicas (Pradet-Balade y col., 2001). La tasa de traducción de los ARNm puede variar bajo diferentes condiciones, tales como proliferación, tratamiento con drogas o diferenciación (Mikulits y col., 2000) (Soto y col., 2004). Para estudiar la eficiencia de traducción de los ARNm *HSP70-I* y *HSP70-II*, se tomaron cultivos de promastigotes que se incubaron a 26, 37 y 39°C durante 2 h. Tras el tratamiento, los extractos citosólicos de los mismos fueron aplicados sobre un gradiente lineal de sacarosa 15-40%. Durante el fraccionamiento del gradiente se midió la absorbancia a 254 nm de cada una de las fracciones, y el ARN extraído de cada una de ellas fue separado en un gel de agarosa desnaturalizante y transferido a una membrana de nailon que se hibridó con diferentes sondas de ADN (Fig. 10). Los perfiles de A_{254} y la distribución de las subunidades de ARNr en cada una de las fracciones (Fig. 10A-B), indican que en las fracciones 1-4 no existen ribosomas funcionales. La relación equimolar entre los ARNr (18S, 24S α y 24S β) que componen el ribosoma de *Leishmania* se alcanza en la fracción 6 y sucesivas, indicando la existencia de ribosomas traduccionalmente activos en esta parte del gradiente.

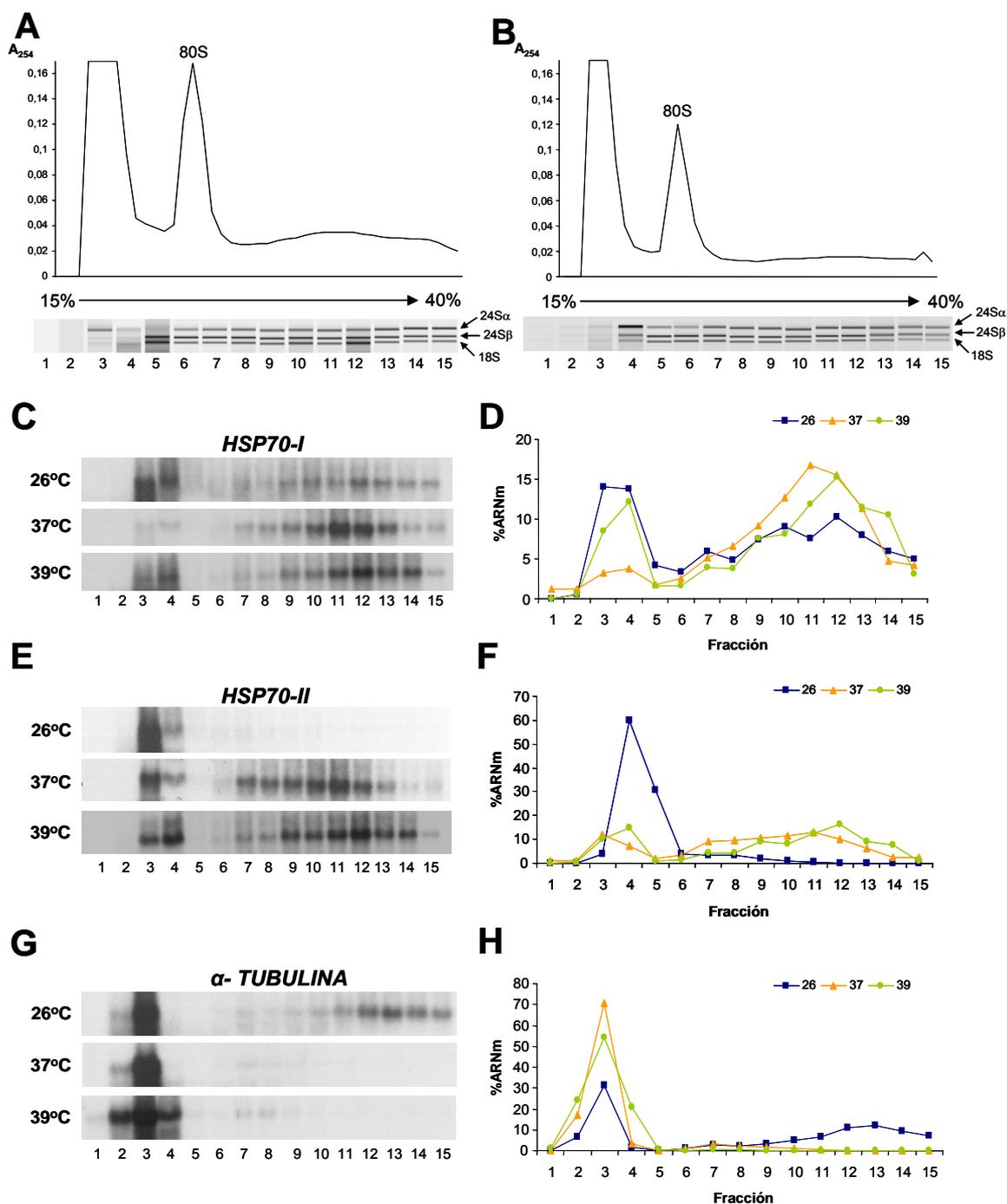


Figura 10. Perfiles polisómicos de los ARNm *HSP70* a diferentes temperaturas. Se obtuvieron extractos citoplasmáticos de promastigotes incubados a las temperaturas de 26, 37 y 39°C durante 2 h, y se separaron en un gradiente lineal de sacarosa 15-40%. (A) y (B) muestran los perfiles de absorbancia a 254 nm de los gradientes correspondientes a promastigotes crecidos a 26 y 37°C, respectivamente. Las muestras de ARN fueron analizadas en el Bioanalizador 2100 (Agilent Technologies); la posición de los ARNr 18S, 24S α y 24S β se indica con flechas en los paneles inferiores. Posteriormente el ARN fue analizado por *Northern blot* usando sondas de ADN específicas frente a la región 3'UTR de los genes *HSP70-I* (panel C), región 3'UTR del gen *HSP70-II* (panel E), y α -tubulina (panel G). En los paneles D, F y H se muestra el análisis densitométrico de las autorradiografías C, E y G, respectivamente. Los resultados se representan como el porcentaje de señal en cada fracción respecto al total de señal de hibridación (%ARNm).

En primer lugar se analizó el perfil polisómico de los ARNm *HSP70-I* en promastigotes de *L. infantum* incubados a 26, 37 ó 39°C (Fig. 10C-D). Estos mensajeros se detectaron tanto en las fracciones libres de ribosomas, como en las fracciones polisómicas a las tres temperaturas testadas, lo que implica que los transcritos *HSP70-I* se traducen a la temperatura normal de crecimiento de los promastigotes (26°C), y a temperaturas de choque térmico (37 y 39°C). Sin embargo, se encontró una mayor asociación de los mensajeros a los ribosomas a 37°C, aunque a 39°C también sigue siendo algo mayor que a 26°C (Fig. 10D), relacionado probablemente con el aumento que se produce en los niveles de los transcritos *HSP70-I* a esas temperaturas (Fig. 7).

Contrariamente a lo que suponíamos, el análisis del perfil polisómico de los ARNm *HSP70-II* resultó claramente afectado por el tratamiento de temperatura, con un comportamiento bastante diferente al de los perfiles de los ARNm *HSP70-I* (Fig. 10E-F). Estos transcritos se concentran en las fracciones libres de ribosomas a 26°C, indicando que apenas se traducen a dicha temperatura. Sin embargo, el tratamiento de choque térmico (37 y 39°C) produce un cambio radical en su distribución a lo largo del gradiente, de forma que la mayor parte de estos transcritos pasan a localizarse en las fracciones polisómicas. Este resultado permite concluir que la distribución polisómica de los mensajeros *HSP70-II* es afectada de forma clara por el choque térmico.

Como control del experimento se analizó también el perfil polisómico de un mensajero que no se regula durante el choque térmico, como es el caso de la α -tubulina (Fig. 10G-H). En este caso, la asociación de estos transcritos a los ribosomas a 26°C, disminuye claramente a las temperaturas de 37 y 39°C, indicando que la síntesis de esta proteína resulta disminuida a temperaturas de choque térmico.

Con el fin de comprobar que la distribución de los mensajeros *HSP70* en las fracciones polisómicas durante el choque térmico se debe a una asociación específica de los mismos con el aparato de traducción, se repitió el análisis de los perfiles polisómicos pero utilizando extractos citoplasmáticos pretratados con EDTA, quelante que ocasiona la disociación de las subunidades del ribosoma. En la figura 11A se muestra el efecto del EDTA sobre el perfil polisómico: en los extractos citoplasmáticos pretratados con EDTA todo el ARNr se localiza en las fracciones libres de ribosomas, sin que se llegue a alcanzar la relación equimolar entre las diferentes subunidades como ocurre en el caso de los extractos sin tratar. Los perfiles obtenidos para los transcritos *HSP70-I* (Fig. 11B) y *HSP70-II* (Fig. 11C) muestran que el tratamiento con EDTA ejerce un efecto drástico en la distribución de los mensajeros, independientemente de la temperatura de crecimiento de los parásitos, indicando que éstos permanecen unidos a la maquinaria de traducción a 37 y 39°C. De forma similar, en el caso de los mensajeros α -tubulina, el tratamiento con EDTA también afectó a la distribución de los transcritos a 26°C, que solo fueron detectados en las fracciones libres de ribosomas (Fig. 11D). Estos resultados, por tanto, sugieren que la presencia de los transcritos *HSP70* en fracciones de alta densidad es debida a su asociación con la maquinaria traduccional.

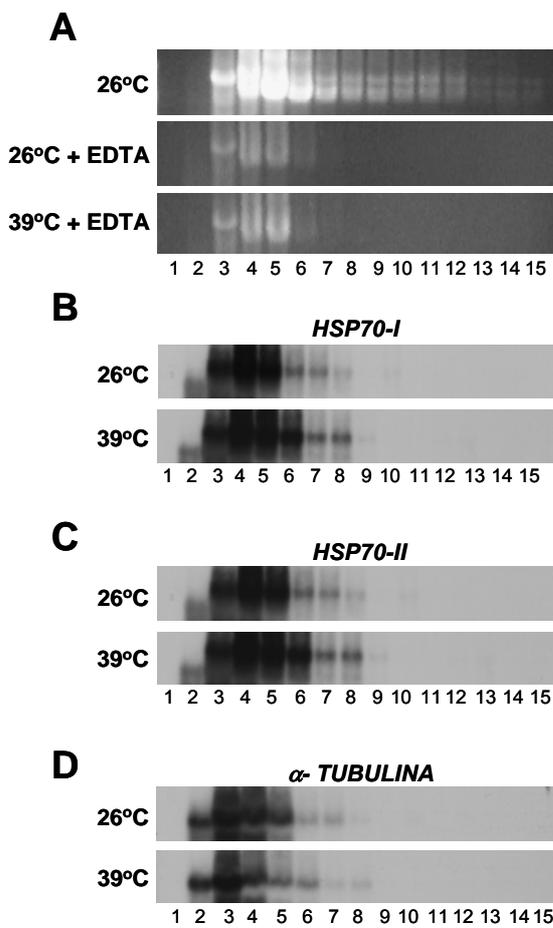


Figura 11. Perfiles polisómicos de los ARNm *HSP70* tras tratamiento con EDTA. Los extractos citoplasmáticos de promastigotes crecidos a 26 y 39°C durante 2 h se trataron con EDTA 50 mM durante 30 min., y después se separaron en un gradiente lineal de sacarosa 15-40%. Se recolectaron 15 fracciones desde la superficie del gradiente hacia el fondo y se extrajo el ARN en cada una de ellas. El ARN fue separado en un gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes que fue teñido con bromuro de etidio (A), y transferido a una membrana de nailon. Los filtros fueron hibridados secuencialmente con sondas de ADN frente a las regiones 3'UTR de los genes *HSP70-I* (panel B), región 3'UTR del gen *HSP70-II* (panel C), y α -tubulina (panel D).

4.2. Análisis de posibles regiones reguladoras en los genes *HSP70*

Los resultados obtenidos con los perfiles polisómicos de los dos tipos de transcritos *HSP70* indican que ambos se traducen a temperaturas de choque térmico (Fig. 10), sin embargo, los mecanismos que regulan su expresión parecen ser diferentes. Así, mientras la mayor traducción de los transcritos *HSP70-I* se correlacionaría con el aumento de sus niveles durante el choque térmico, los ARNm *HSP70-II* solamente se traducirían en respuesta al aumento de temperatura, a pesar de su expresión constitutiva, de forma que permanecerían silenciados a 26°C. Esta regulación traduccional de los genes *HSP70-II*, dados sus mayores niveles relativos (Quijada y col., 1997a), podría ser el mecanismo principal responsable del aumento en la síntesis de la proteína HSP70 durante el choque térmico. Según esta hipótesis, el aumento en los niveles de los mensajeros *HSP70-I* a 37°C no sería suficiente para producir la cantidad de proteína requerida por los promastigotes sometidos a temperaturas de choque térmico, y los ARNm *HSP70-II*, silenciados a 26°C, tendría la finalidad de ser traducidos durante el choque térmico para asegurar el aporte extra de proteína necesario en estas condiciones.

4.2.1. Análisis del papel de las regiones UTR: construcciones plasmídicas con el gen reportero *CAT*

Dado que la diferencia entre los genes *HSP70* reside en sus regiones 3'UTR, sería esperable que fuera en la 3'UTR-II de los genes *HSP70-II* donde se localizaran los elementos responsables de la regulación traduccional de sus ARNm, promoviendo su silenciamiento a 26°C. Para testar esta hipótesis se realizaron construcciones plasmídicas sobre el vector de expresión en tripanosomátidos pX63Neo, utilizando como gen reportero el gen *CAT* (ver apartado 3.4.1). En ellas se clonó la región 5'UTR, común a todos los genes *HSP70*, y la región 3'UTR-I de los genes *HSP70-I* y 3'UTR-II del gen *HSP70-II* a ambos lados de *CAT* dando lugar a los clones **pXcat-I** y **pXcat-II**, respectivamente (Fig. 3). Junto a las regiones UTR se incluyeron las regiones genómicas adyacentes para asegurar el correcto procesamiento de los transcritos. Los plásmidos generados fueron empleados para transfectar de forma estable promastigotes de *L. infantum*. Los parásitos transfectados fueron seleccionados por crecimiento selectivo en placa, estableciéndose las líneas clonales CAT-I y CAT-II, respectivamente.

4.2.1.1. Regulación de los ARNm *CAT* en las líneas CAT-I y CAT-II

En primer lugar se analizó la expresión de los mensajeros *CAT* en promastigotes de las líneas CAT-I y CAT-II. Para ello se tomaron cultivos de promastigotes de ambas líneas que se crecieron durante 2 h a las temperaturas de 26, 37, 39 y 41°C. Tras el tratamiento térmico se extrajo el ARN que se resolvió en un gel de agarosa desnaturalizante, y finalmente se transfirió a una membrana de nailon. Los filtros obtenidos fueron hibridados con una sonda de ADN correspondiente a la región codificante del gen *CAT* (Fig. 12). El tamaño de los mensajeros *CAT* expresados en las líneas CAT-I y CAT-II fue el esperado (1,7 kb), indicando que los mensajeros han sido procesados utilizando las señales derivadas de los genes *HSP70*. Además, el ARNm *CAT* de la línea CAT-I presenta un patrón de expresión inducible por choque térmico, aumentando sus niveles 2-3 veces a 37°C respecto a los niveles detectados a 26°C. Por el contrario, los mensajeros *CAT* de la línea CAT-II se expresan de forma constitutiva a las 4 temperaturas ensayadas. Este resultado se ajusta a lo esperado puesto que se había descrito, en la región 3'UTR-I de los genes *HSP70-I* de *L. infantum*, un elemento regulador responsable de la acumulación de los mensajeros *HSP70-I* a 37°C (Quijada y col., 2000). Así, es posible concluir que los transcritos *CAT*, de acuerdo con las regiones 3'UTR incluidas, tienen el comportamiento correspondiente a los transcritos *HSP70* (Fig. 7).

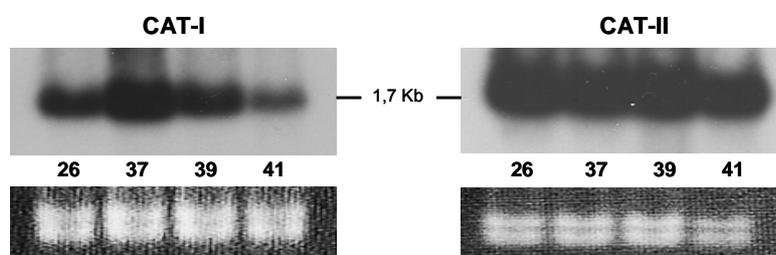


Figura 12. Expresión de los ARNm *CAT* en las líneas CAT-I y CAT-II. Promastigotes de las líneas CAT-I y CAT-II fueron incubados a las temperaturas indicadas (26, 37, 39 y 41°C) durante 2 h. El ARN fue extraído, resuelto en un gel de agarosa desnaturalizante y transferido a una membrana que se hibridó con una sonda de ADN correspondiente a la región codificante del gen *CAT*. En la parte inferior se muestra el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio como control de la cantidad de ARN cargada en cada carril.

4.2.1.2. Expresión de la proteína CAT durante el choque térmico

Tras comprobar que las líneas CAT-I y CAT-II expresan el mensajero *CAT* del tamaño correcto, y que sus niveles se regulan durante el choque térmico en función de la región 3'UTR que portan (Fig. 12), procedimos a analizar la expresión de la proteína CAT en respuesta a temperaturas de choque térmico. Se crecieron promastigotes de las dos líneas transfectadas a 26, 37, 39 y 41°C durante 1 h, marcándose la síntesis *de novo* de proteínas por la adición de metionina y cisteína marcadas con ^{35}S a los cultivos. A partir de los extractos proteicos obtenidos de cada uno de los tratamientos se inmunoprecipitó la proteína CAT. Los resultados obtenidos para la línea CAT-I se muestran en la figura 13. En la autorradiografía correspondiente a la síntesis global de proteínas a las diferentes temperaturas ensayadas se observa un aumento a 37 y 39°C, con respecto a 26°C, en la intensidad de las bandas correspondientes a las proteínas HSP70 y HSP83 (Fig. 13A). Sin embargo, no se aprecia ese aumento de intensidad en la banda correspondiente a la proteína CAT, cuyo peso molecular teórico es de 25663,13 Da. Los ensayos de inmunoprecipitación de CAT confirmaron que la síntesis de la proteína no se ve incrementada en respuesta al choque térmico (Fig. 13B). La cantidad de proteína CAT sintetizada durante el tratamiento a 37°C es equivalente a la cantidad producida en las condiciones óptimas de crecimiento de los promastigotes (26°C). A 39°C la síntesis *de novo* de CAT se ve fuertemente reducida, llegando a ser prácticamente indetectable a 41°C (Fig. 13C).

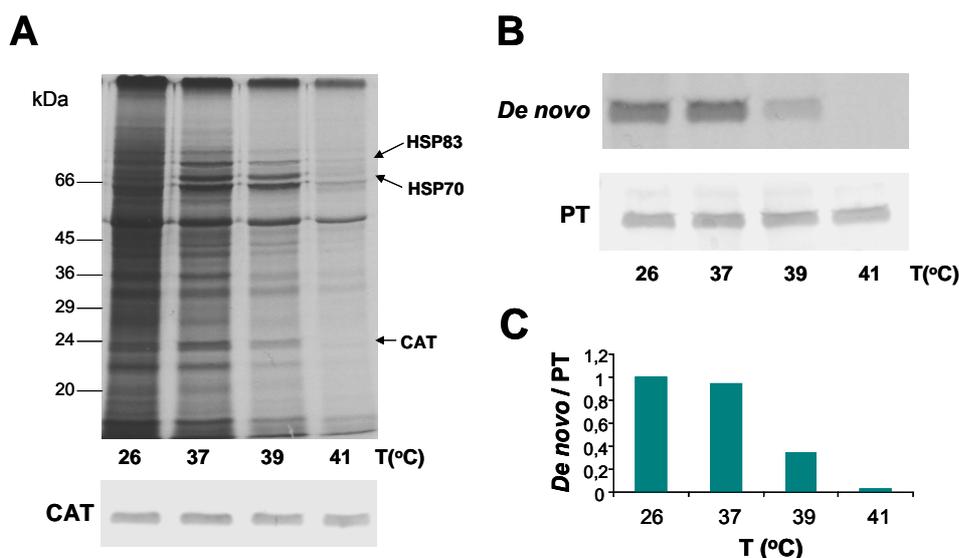


Figura 13. Expresión de la proteína CAT en la línea CAT-I. (A) Exposición autorradiográfica del gel de poliacrilamida en el que se separaron proteínas totales de promastigotes de la línea CAT-I incubados a 26, 37, 39 y 41°C durante 1 h, en los que se marcaron las proteínas de nueva síntesis en presencia de ^{35}S -metionina y ^{35}S -cisteína. En la parte inferior se muestra el *Western blot* realizado para determinar la cantidad total de proteína CAT presente en cada muestra. (B) Inmunoprecipitación de la proteína CAT a partir de los extractos proteicos de promastigotes incubados a las temperaturas indicadas. En el panel superior se muestra la proteína CAT de nueva síntesis (*De novo*), y en la parte inferior el resultado del *Western blot* con la cantidad de CAT total inmunoprecipitada en cada caso (PT). (C) Histograma de la relación entre la síntesis *de novo* de CAT y la cantidad total de proteína inmunoprecipitada (*De novo*/PT); los datos se han normalizado con respecto al valor obtenido a la temperatura de 26°C (tomado arbitrariamente como 1).

En la figura 14 se recogen los resultados obtenidos del estudio de la expresión de la proteína CAT en la línea CAT-II. En ella se observa también un aumento de intensidad en las bandas correspondientes a las proteínas HSP83 y HSP70, pero, de nuevo, ese aumento no resulta tan evidente en la banda correspondiente a la proteína CAT (Fig. 14A). Sin embargo, sí resulta evidente que esta línea produce mayor cantidad de proteína CAT que la línea CAT-I tanto a 26°C, como a 37 y 39°C (Fig. 13A). Los ensayos de inmunoprecipitación revelaron que la cantidad de proteína CAT sintetizada en respuesta al tratamiento de temperatura a 37 y 39°C es similar a la cantidad producida a 26°C (Fig. 14B-C), es decir, no existe regulación traduccional de CAT en respuesta al choque térmico. Si comparamos estos resultados con los obtenidos para la línea CAT-I (Fig. 13), podemos decir que ninguna de las dos construcciones plasmídicas recupera la regulación traduccional observada para los genes *HSP70* endógenos; sin embargo, los niveles de síntesis de la proteína CAT a 39°C son muy diferentes en ambas líneas: mientras que en la línea CAT-I apenas se produce proteína CAT (Fig. 13B), en la línea CAT-II su síntesis se mantiene en niveles similares a los producidos a 26°C (Fig. 14B). Este hecho indicaría que la región 3'UTR-II confiere, a los transcritos que la portan, la capacidad de seguir siendo traducidos en condiciones de choque térmico severo.

La elevada síntesis de proteína CAT a 26°C en la línea CAT-II fue un resultado en cierto modo sorprendente dado que, de acuerdo con los estudios de perfiles polisómicos, habíamos pensado que la presencia de la región 3'UTR-II en el mensajero *CAT-HSP70-II* debería inhibir su traducción a esta temperatura. Este resultado nos llevó a analizar los perfiles polisómicos de los ARNm *CAT* en ambas líneas.

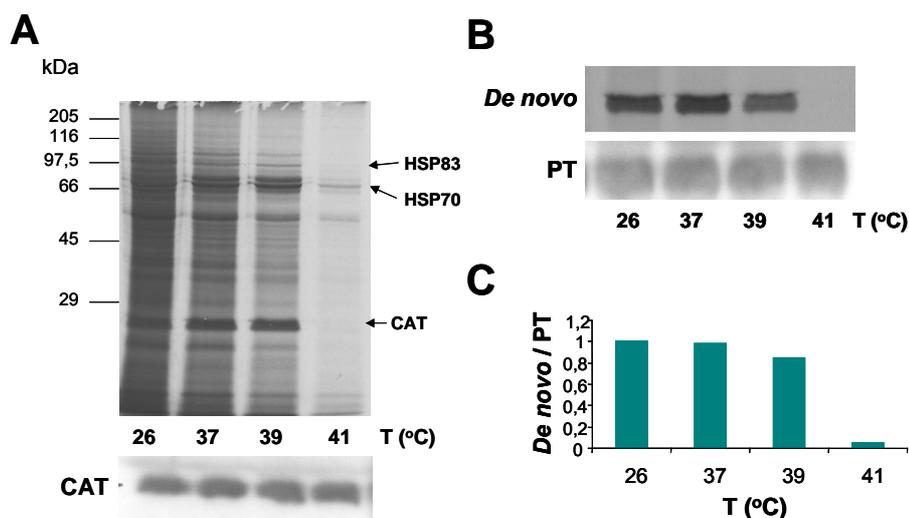


Figura 14. Expresión de la proteína CAT en la línea CAT-II. (A) Exposición autorradiográfica del gel de poliacrilamida en el que se separaron proteínas totales de promastigotes de la línea CAT-II incubados a 26, 37, 39 y 41°C durante 1 h, en los que se marcaron las proteínas de nueva síntesis mediante la adición de ^{35}S -metionina y ^{35}S -cisteína. En la parte inferior se muestra el *Western blot* realizado para determinar la cantidad de proteína CAT presente en los distintos tratamientos. (B) Inmunoprecipitación de la proteína CAT a partir de los extractos proteicos de promastigotes incubados a las temperaturas indicadas. En el panel superior se muestra la proteína CAT de nueva síntesis (*De novo*), y en la parte inferior el resultado del *Western blot* realizado para determinar la cantidad de CAT total cargada en cada carril (PT). (C) Histograma de la relación entre la síntesis *de novo* de CAT y la cantidad total de proteína inmunoprecipitada (*De novo*/PT); los datos se han normalizado con respecto al valor obtenido para la temperatura de 26°C, al que se dió arbitrariamente un valor de 1.

4.2.1.3. Perfiles polisómicos de los ARNm *CAT*

Con el objetivo de buscar una explicación a los resultados obtenidos sobre la expresión de la proteína *CAT* durante el choque térmico (Figs. 13 y 14), decidimos analizar los perfiles polisómicos de los ARNm *CAT* en las líneas *CAT*-I y *CAT*-II. Para ello, se realizó un tratamiento de 2 h a las temperaturas de 26 y 39°C en promastigotes pertenecientes a ambas líneas, tras el cual se obtuvieron los extractos citoplasmáticos que fueron separados a través de un gradiente lineal de sacarosa. De las fracciones obtenidas se extrajo el ARN que se resolvió en un gel de agarosa desnaturalizante y se transfirió a membranas de nailon para su hibridación con distintas sondas.

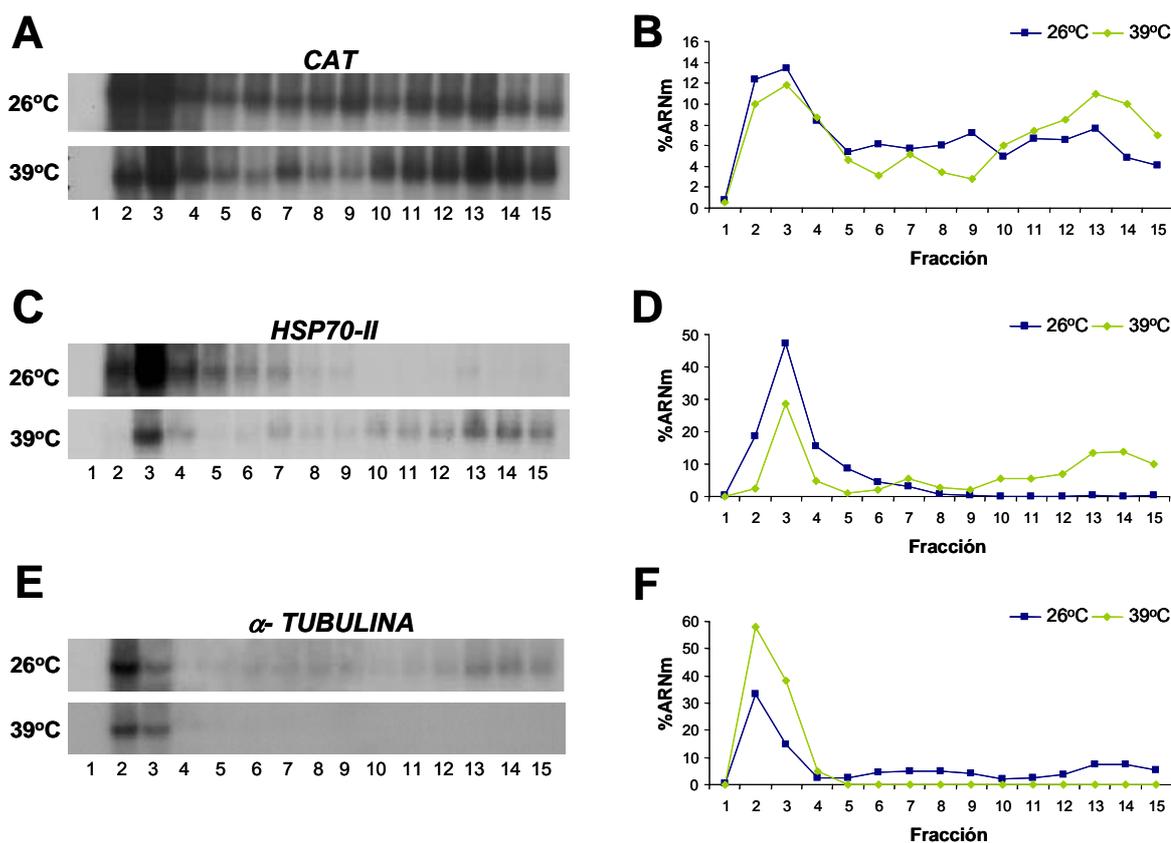


Figura 15. Análisis de los perfiles polisómicos de *CAT* en la línea *CAT*-I. Los extractos citoplasmáticos obtenidos a partir de promastigotes de la línea *CAT*-I crecidos a 26 y 39°C durante 2 h se separaron en un gradiente lineal de sacarosa. Posteriormente, el gradiente se dividió en 15 fracciones, en las que se purificó el ARN, que se resolvió en geles de agarosa desnaturalizantes y se transfirió a membranas de nailon. Los filtros se hibridaron con sondas de ADN correspondientes a la región codificante del gen *CAT* (panel A), la 3'UTR del gen *HSP70-II* (panel C) y la región codificante del gen de la α -tubulina (panel E). En los paneles B, D y F se representa el análisis densitométrico realizado sobre las autorradiografías A, C y E, respectivamente. Se representa el porcentaje de señal en cada una de las 15 fracciones con respecto a la señal total de hibridación (%ARNm).

Los resultados obtenidos para la línea *CAT*-I se recogen en la figura 15. Los ARNm *CAT*-I se encuentran asociados a las fracciones polisómicas, en cantidades cuantitativamente comparables, tanto a 26°C como a 39°C, indicando que estos mensajeros estarían siendo traducidos a ambas temperaturas en niveles comparables (Fig. 15A-B). Sin embargo, a pesar de que no existe una diferencia cuantitativa en los perfiles polisómicos a ambas temperaturas, los estudios de síntesis de proteínas indicaron que la síntesis de la proteína *CAT* a 39°C es

sustancialmente menor que la producida a 26°C (Fig. 13B-C). No obstante, si existe una diferencia cualitativa entre ambos perfiles: a 39°C los transcritos *CAT-I* se localizan principalmente en las fracciones más densas, mientras que a 26°C se distribuyen de forma más uniforme a lo largo del gradiente (Fig. 15A). Teniendo en cuenta esto, podría postularse la existencia de un descenso en la tasa de terminación de la traducción de estos transcritos a 39°C, que tendría como resultado un aumento en el número de ribosomas unidos al correspondiente mensajero (Arava y col., 2005). Como control del experimento los filtros fueron hibridados con una sonda de ADN correspondiente a la región 3'UTR-II del gen *HSP70-II*, mostrando de nuevo que estos mensajeros se localizan en las fracciones libres de ribosomas a 26°C, desplazándose hacia las fracciones polisómicas a 39°C (Fig. 15C-D). Por otro lado, la hibridación con una sonda de la α -tubulina mostró que la unión a los ribosomas de sus mensajeros, que ocurre a 26°C, se reduce claramente a 39°C (Fig. 15E-F).

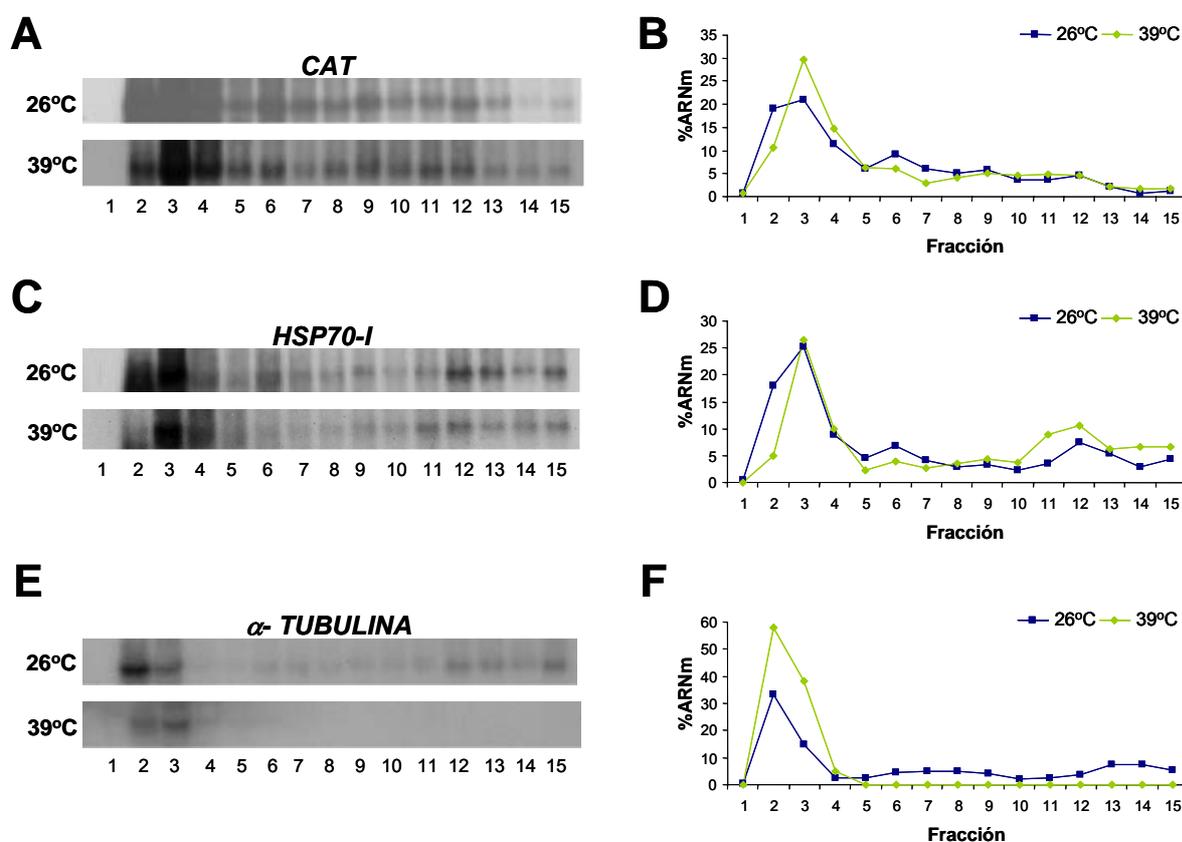


Figura 16. Análisis de los perfiles polisómicos de *CAT* en la línea *CAT-II*. Los extractos citoplasmáticos obtenidos a partir de promastigotes de la línea *CAT-II* crecidos a 26 y 39°C durante 2 h se separaron en un gradiente lineal de sacarosa. Posteriormente se tomaron 15 fracciones del gradiente en las que se purificó el ARN, que se resolvió en geles de agarosa desnaturizantes y se transfirió a membranas de nailon. Los filtros se hibridaron con sondas de ADN correspondientes a la región codificante del gen *CAT* (panel A), la 3'UTR de los genes *HSP70-I* (panel C) y la región codificante del gen de la α -tubulina (panel E). En los paneles B, D y F se representa el análisis densitométrico realizado sobre las autorradiografías A, C y E, respectivamente. Se representa el porcentaje de señal en cada una de las 15 fracciones con respecto a la señal total de hibridación (%ARNm).

Los perfiles obtenidos en el caso de la línea *CAT-II* se recogen en la figura 16. Los mensajeros *CAT-II* se encuentran unidos a polisomas a 26 y 39°C (Fig. 16A-B), en consonancia con los niveles de proteína sintetizados a ambas temperaturas en esta línea (Fig. 14B-C). Sin embargo, esta distribución de los mensajeros no reproduce la regulación

encontrada para los transcritos *HSP70-II* (Fig. 10E, Fig. 15C), lo cual nos llevó a pensar que la sustitución de la región codificante de los genes *HSP70* por la correspondiente al gen *CAT* pudiera tener un claro efecto sobre la regulación de los mensajeros. Así, la presencia de la secuencia *CAT* en estas construcciones, o alternativamente la falta de la región codificante de los genes *HSP70* podría ser la responsable de la unión de los ARNm *CAT-II* a polisomas a 26°C en la línea CAT-II. Como control del experimento se hibridaron los filtros con una sonda correspondiente a la región 3'UTR-I de los genes *HSP70-I*; los resultados obtenidos se ajustaron a lo esperado, observándose una asociación de los mensajeros *HSP70-I* a polisomas a 26 y 39°C (Fig. 16C-D). La hibridación con una sonda de la α -tubulina mostró de nuevo el claro efecto del choque térmico sobre la distribución polisómica de estos mensajeros (Fig. 16E-F).

4.2.2. Influencia de la región codificante *HSP70*: construcciones plasmídicas pHAHSP70

La falta de control traduccional de los mensajeros *CAT* en la línea CAT-II, nos llevó a analizar el posible papel de la región codificante *HSP70* en la regulación del gen *HSP70-II*. Para ello se realizaron construcciones plasmídicas en las que se clonó la región codificante de los genes *HSP70* fusionada en su extremo 5' con la secuencia codificante del epítipo HA (ver apartado 3.4.2). De esta forma, la proteína HSP70 expresada estará etiquetada con el epítipo HA en su extremo amino terminal. A ambos lados del gen quimérico *HAHSP70* se clonaron la región 5'UTR y 3'UTR del gen *HSP70-II* de *L. infantum*. La denominación de los clones generados, pHAHSP70-IIs y pHAHSP70-IIas, hace referencia al clonaje del gen quimérico *HAHSP70* en sentido (pHAHSP70-IIs) o antisentido (pHAHSP70-IIas) con respecto al gen de resistencia *NEO* (Fig. 4). Ambos plásmidos se introdujeron de forma estable en promastigotes de *L. infantum*, y los transfectantes fueron seleccionados en placa generándose líneas clonales. Cuando se estableció el cultivo de los parásitos transfectados en medio líquido, se observó que los promastigotes de la línea HAHSP70-IIas presentaban un crecimiento más lento que los de la línea HAHSP70-IIs (datos no mostrados).

4.2.2.1. Regulación de los mensajeros *HAHSP70-II*

Una vez generadas las líneas de transfectantes HAHSP70-IIs y HAHSP70-IIas, el primer análisis que realizamos sobre ellas fue el estudio de la expresión de los transcritos *HAHSP70-II* durante el choque térmico. Se tomaron promastigotes de ambas líneas, junto con promastigotes de la línea *L. infantum* BCN como control del experimento, y se crecieron durante 2 h a 26 y 37°C; tras el tratamiento se extrajo el ARN, y éste se resolvió en un gel de agarosa en condiciones desnaturizantes para ser transferido a una membrana de nailon.

La expresión de los transcritos *HAHSP70-II* se analizó mediante hibridación con un oligonucleótido marcado que es complementario a la secuencia codificante del epítipo HA en los mensajeros (oligonucleótido HA-as) (Fig. 17). Los resultados muestran la expresión de un transcrito del tamaño adecuado (3,1 kb) en ambas líneas. La claramente mayor señal de hibridación con las muestras de la línea HAHSP70-IIas indica que los niveles de los mensajeros *HAHSP70-II* son mucho mayores en la línea HAHSP70-IIas que en la línea HAHSP70-IIs. Los análisis densitométricos realizados sobre la autorradiografía revelaron que la expresión del transcrito *HAHSP70-II* se mantiene a 39°C, en las dos líneas analizadas, con respecto a los niveles detectados a 26°C. Por tanto, podemos concluir que los genes *HAHSP70-IIs* y *HAHSP70-IIas* se procesan de forma correcta para dar lugar a mensajeros del tamaño esperado, que se expresan de forma constitutiva durante el choque térmico.

La utilización como sonda de un oligonucleótido con la secuencia codificante del epítipo HA (oligonucleótido HAHSP70) puso de manifiesto la presencia de transcritos antisentido en la línea HAHSP70-IIas, pero no en la línea HAHSP70-IIs (Fig. 17). Como control se hibridó el filtro con una sonda de ADN de la región 3'UTR-II; en este caso, se detecta una banda mayoritaria en la que se englobarían los transcritos *HSP70-II* endógenos y los transcritos *HAHSP70-II*, ya que la diferencia de tamaño entre ambos no permite su separación en este tipo de gel. Como era esperable, la banda detectada se expresa de forma constitutiva. Por último, hibridamos los filtros con una sonda frente al gen *NEO* (Fig. 17). Los resultados obtenidos indican que en la línea HAHSP70-IIas la expresión de los transcritos *NEO* es mucho mayor que en la línea HAHSP70-IIs. La elevada expresión del gen *NEO* en la línea HAHSP70-IIas podría explicarse con la presencia de un mayor número de copias del plásmido transfectado en esta línea con respecto a la línea HAHSP70-IIs. Además, la gran expresión del gen *HAHSP70-II*, junto con la presencia de transcritos *HAHSP70-II* antisentido, podrían ser causas del crecimiento más lento de los promastigotes de la línea HAHSP70-IIas.

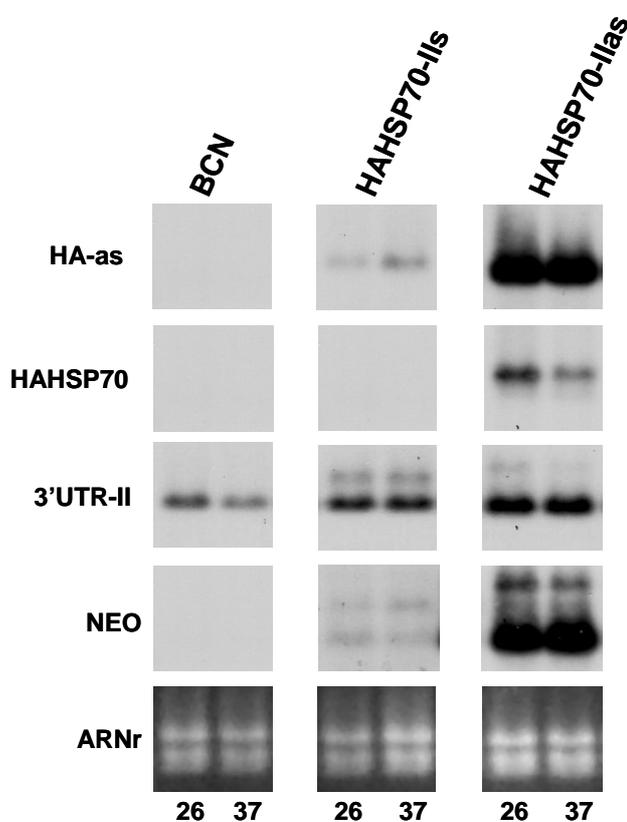


Figura 17. Expresión de las construcciones *HAHSP70-II* en promastigotes de *Leishmania*. Promastigotes de *L. infantum* de las líneas BCN, HAHSP70-IIs y HAHSP70-IIas fueron mantenidos durante 2 h a las temperaturas indicadas (26 y 37°C). Se extrajo ARN después de cada tratamiento, que se analizó por *Northern blot*. Los filtros se hibridaron con las siguientes sondas: oligonucleótido HA-as, oligonucleótido HAHSP70, región 3'UTR del gen *HSP70-II* y región codificante del gen *NEO*. En la parte inferior se muestran los gels de agarosa teñidos con bromuro de etidio como control de la cantidad de ARN cargada en cada carril.

4.2.2.2. Expresión de la proteína HAHSP70 durante el choque térmico

A continuación, decidimos analizar la expresión de la proteína HAHSP70 en las líneas HAHSP70-IIs y HAHSP70-IIas a nivel de proteína total, con la hipótesis de que con estas construcciones podríamos ver su expresión aumentada a temperaturas de choque térmico.

Tomamos cultivos de parásitos de ambas líneas y los crecimos a 37°C dentro del intervalo de tiempo de 1 a 5 h, incluyendo como control un cultivo mantenido a la temperatura óptima de crecimiento de los promastigotes (26°C). Tras el tratamiento, extractos de proteínas totales se separaron en geles de poliacrilamida y se transfirieron a membranas para ser incubadas con diferentes anticuerpos (Fig. 18). El nivel de expresión de la proteína HAHSP70 se obtuvo al incubar las membranas con un anticuerpo frente al epítipo HA: tanto en la línea HAHSP70-II_s (Fig. 18B), como en la línea HAHSP70-II_{as} (Fig. 18C) se observa la expresión de la proteína HAHSP70 cuyo peso molecular teórico es de 72247,49 Da. Estos experimentos mostraron que en la línea HAHSP70-II_s los niveles de expresión de la proteína HAHSP70 son inferiores a los producidos por la línea HAHSP70-II_{as}. Este resultado está en consonancia con los análisis de *Northern blot*, en los que se encontraron diferencias claras con respecto a los niveles de mensajeros *HAHSP70-II* entre ambas líneas (Fig. 17). Por otro lado, estos experimentos también mostraron que en ambas líneas se detecta la expresión de la proteína a 26°C. Los análisis densitométricos realizados sobre las membranas, indican que en la línea HAHSP70-II_s la proteína HAHSP70 se acumula ligeramente (1,5 a 2 veces) durante el tratamiento a 37°C, lo que sugiere que la síntesis de la proteína aumenta en respuesta al choque térmico. En cambio, en la línea HAHSP70-II_{as} no se produce una acumulación de la proteína con el tratamiento a 37°C. Cuando los filtros se incubaron con un anticuerpo monoclonal frente a la proteína HSP70, se encontró que la proteína HSP70 endógena no experimenta cambios durante el choque térmico. Este resultado es esperable dado que, como se ha indicado anteriormente, la ausencia de cambios en la cantidad total de proteína HSP70 durante el choque térmico se debe a que es una proteína muy abundante en las condiciones normales de crecimiento del parásito (Brandau y col., 1995).

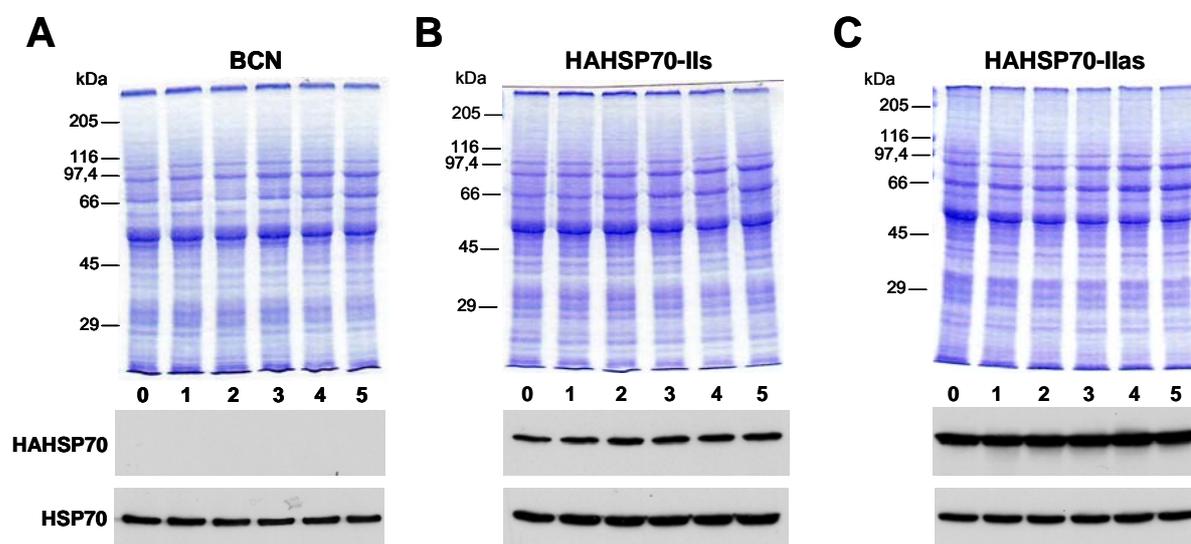


Figura 18. Expresión de la proteína HAHSP70. Promastigotes de *L. infantum* de las líneas BCN (A), HAHSP70-II_s (B) y HAHSP70-II_{as} (C) fueron mantenidos a 37°C durante intervalos de tiempo de 1 a 5 h. Tras el tratamiento se extrajeron las proteínas totales de cada cultivo que fueron resueltas en geles de poliacrilamida, mostrándose en la parte superior de cada panel la tinción de los mismos con azul de Coomassie. En la parte inferior se recogen los resultados de los ensayos de *Western blot*, en geles gemelos a los mostrados, tras la incubación de las membranas con el anticuerpo HA (HAHSP70) y con un anticuerpo monoclonal frente a la HSP70 (HSP70). En el caso de las incubaciones con el anticuerpo HA se muestran las autorradiografías obtenidas tras la exposición de las membranas durante el mismo tiempo para cada una de las líneas de *Leishmania* analizadas.

Posteriormente, realizamos ensayos para determinar de forma cuantitativa la cantidad de proteína HAHSP70 sintetizada *de novo* durante el choque térmico. Se crecieron promastigotes de las líneas HAHSP70-II_s y HAHSP70-II_{as} a 26, 37 y 39°C durante 1 h en la que se marcó la síntesis *de novo* de proteínas. A partir de los extractos proteicos correspondientes a cada tratamiento, se inmunoprecipitó la proteína HAHSP70 empleando para ello un anticuerpo frente al epítipo HA. El patrón global de proteínas sintetizadas durante el tratamiento muestra un aumento en la intensidad de las bandas correspondientes a las proteínas HSP83 y HSP70, observándose un descenso marcado de la síntesis global de proteínas a 39°C (Fig. 19A). Los ensayos de inmunoprecipitación indican que la proteína HAHSP70 se traduce activamente a 37°C en la línea HAHSP70-II_s, mostrando un aumento en sus niveles de 3 veces con respecto a los niveles detectados a 26°C; a 39°C, la síntesis ocurre en niveles similares a los observados a 26°C (Fig. 19B-C). Por el contrario, en la línea HAHSP70-II_{as} no se produce un aumento tan claro en la síntesis de la proteína HAHSP70 en respuesta a la temperatura, siendo los niveles de proteína de nueva síntesis a 37 y 39°C muy similares a los producidos a 26°C (Fig. 19C).

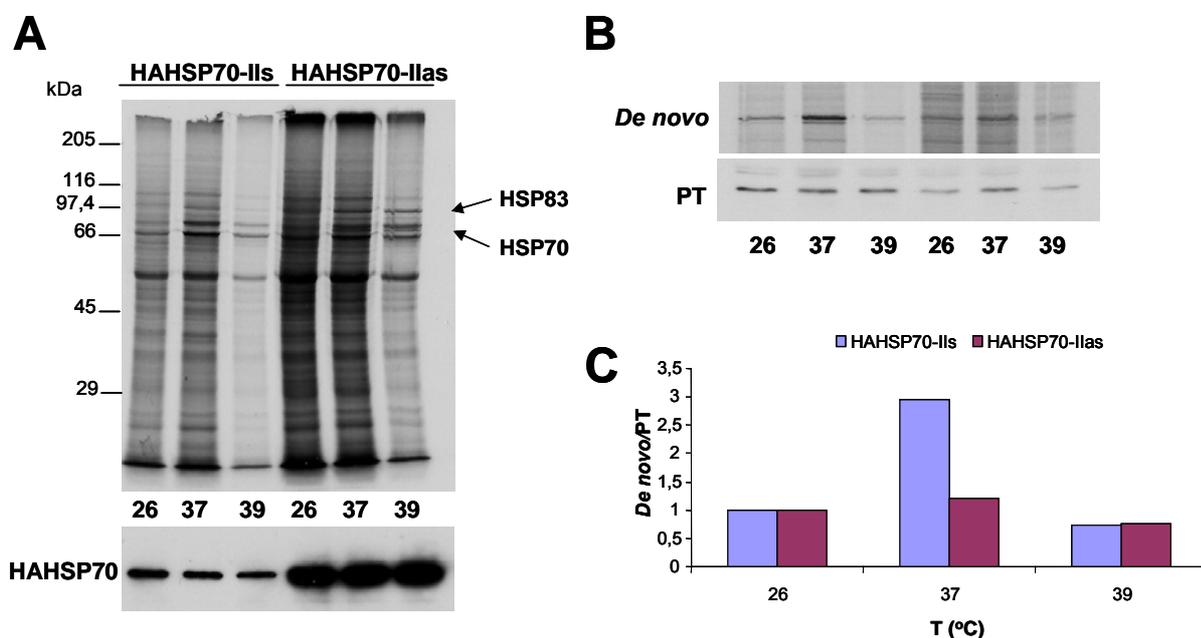


Figura 19. Síntesis *de novo* de la proteína HAHSP70 durante el choque térmico. (A) Exposición autorradiográfica del gel de poliacrilamida en el que se separaron proteínas totales de promastigotes de las líneas HAHSP70-II_s y HAHSP70-II_{as} incubados a 26, 37 y 39°C durante 1 h, en los que se marcaron las proteínas de nueva síntesis mediante la adición de ³⁵S-metionina y ³⁵S-cisteína. En la parte inferior se muestra el *Western blot* realizado para determinar la cantidad de proteína HAHSP70 presente en las muestras. (B) Inmunoprecipitación de la proteína HAHSP70 a partir de los extractos proteicos de promastigotes incubados a las temperaturas indicadas. En el panel superior se muestra la proteína HAHSP70 de nueva síntesis (*De novo*), y en la parte inferior el resultado del *Western blot* que muestra la cantidad de HAHSP70 inmunoprecipitada en cada caso (PT). (C) Histograma de la relación entre la síntesis *de novo* y la cantidad total de proteína HAHSP70 (*De novo*/PT); los datos se han normalizado con respecto al dato obtenido para los parásitos incubados a 26°C, al que arbitrariamente se le asignó el valor de 1.

Estos resultados indican que la construcción HAHSP70-II_s es la que mejor recupera la regulación traduccional que habíamos descrito para los genes *HSP70-II*. Como complemento a estos estudios decidimos analizar los perfiles polisómicos de los ARNm *HAHSP70-II*.

4.2.2.3. Análisis de los perfiles polisómicos de los ARNm *HAHSP70-II*

Los perfiles polisómicos de los transcritos *HAHSP70-II* fueron analizados en cultivos de promastigotes de las líneas *HAHSP70-II*s y *HAHSP70-II*as que se mantuvieron durante 2 h a las temperaturas de 26, 37 y 39°C.

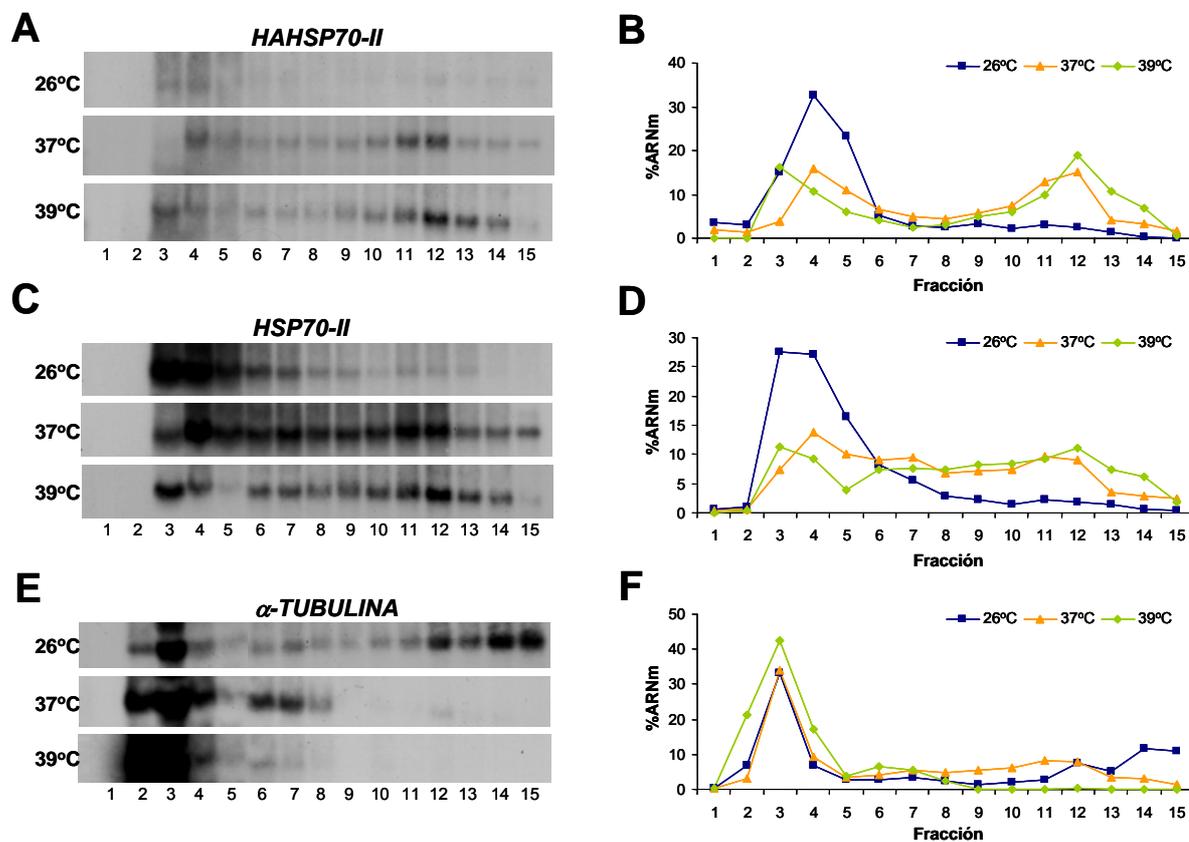


Figura 20. Perfiles polisómicos de los transcritos *HAHSP70-II* en la línea *HAHSP70-II*s. Los extractos citoplasmáticos obtenidos a partir de promastigotes de la línea *HAHSP70-II*s crecidos a 26, 37 y 39°C durante 2 h se separaron en un gradiente lineal de sacarosa. Posteriormente se tomaron 15 fracciones del gradiente desde la parte superior del mismo en las que se purificó el ARN, que se resolvió en geles de agarosa desnaturalizantes y se transfirió a membranas de nailon. Los filtros se hibridaron con las siguientes sondas: oligonucleótido HA-as (panel A), región 3'UTR del gen *HSP70-II* (panel C) y región codificante de la α -tubulina (panel E). En los paneles B, D y F se representa el análisis densitométrico realizado sobre las autorradiografías A, C y E, respectivamente. Se representa el porcentaje de señal de cada una de las 15 fracciones con respecto a la señal total de hibridación (%ARNm).

Los resultados obtenidos para la línea *HAHSP70-II*s se muestran en la figura 20. Se observa que a 26°C, la mayoría de los transcritos *HAHSP70-II* se localizan en las fracciones libres de ribosomas, aunque existe una muy pequeña parte que se asocia a las fracciones polisómicas (Fig. 20A-B), lo que explicaría la presencia de la proteína *HAHSP70* a 26°C. Sin embargo, cuando los promastigotes son sometidos a temperaturas de choque térmico (37 y 39°C) se produce un cambio drástico en el perfil polisómico de los mensajeros, que de forma mayoritaria se localizan en las fracciones más densas del gradiente. Este resultado está de acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de síntesis *de novo* de la proteína *HAHSP70* durante el choque térmico (Fig. 19), indicando que el gen quimérico *HAHSP70-II*s regula su expresión a nivel traduccional cuando los parásitos se someten a temperaturas de choque térmico. Como control, los filtros fueron hibridados con una sonda frente a la región

3'UTR-II (Fig. 20C-D). Esta sonda hibrida con los ARNm *HAHSP70-II* y con los ARNm *HSP70-II*, que aparecen como una única banda debido a la escasa diferencia de sus tamaños. El patrón obtenido en este caso es muy similar al observado tras la hibridación con el oligonucleótido HA-as marcado (Fig. 20A-B). Por último, se analizó el perfil de los mensajeros de la α -tubulina como control al experimento (Fig. 20E-F). Éstos se encuentran unidos a polisomas a 26°C, mientras que a 37 y 39°C se localizan principalmente en las fracciones libres de ribosomas.

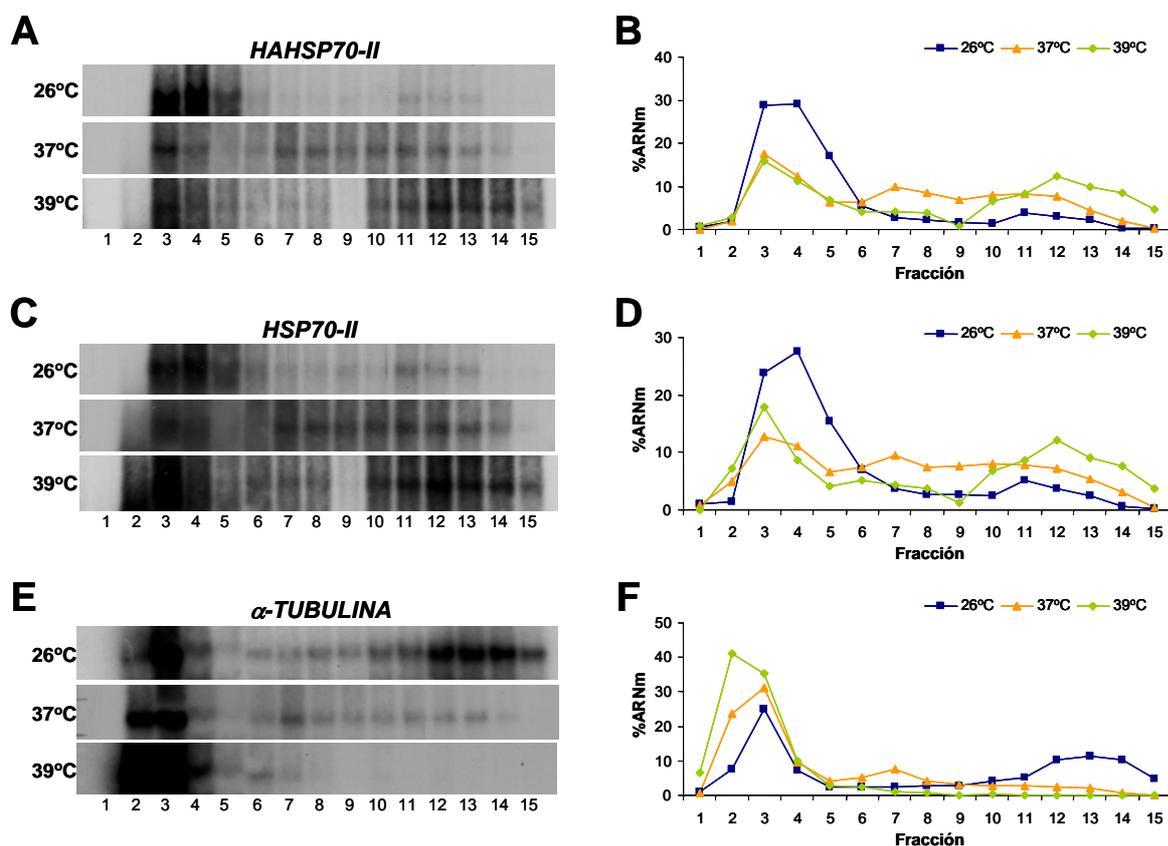


Figura 21. Perfiles polisómicos de los transcritos *HAHSP70-II* en la línea *HAHSP70-II*as. Los extractos citoplasmáticos obtenidos a partir de promastigotes de la línea *HAHSP70-II*as crecidos a 26, 37 y 39°C durante 2 h se separaron en un gradiente lineal de sacarosa. Posteriormente se tomaron 15 fracciones del gradiente desde la parte superior del mismo en las que se purificó el ARN, que se resolvió en geles de agarosa desnaturalizantes y se transfirió a membranas de nailon. Los filtros se hibridaron con las siguientes sondas: oligonucleótido HA-as (panel A), región 3'UTR del gen *HSP70-II* (panel C) y región codificante de la α -tubulina (panel E). En los paneles B, D y F se representa el análisis densitométrico realizado con las autoradiografías A, C y E, respectivamente. Se representa el porcentaje de señal de cada una de las 15 fracciones con respecto a la señal total de hibridación (%ARNm).

En la figura 21 se recogen los resultados obtenidos tras el análisis realizado en la línea *HAHSP70-II*as. Los perfiles de la distribución de los transcritos *HAHSP70-II* (Fig. 21A-B) son muy similares a los de los mismos mensajeros en la línea *HAHSP70-II*s (Fig. 20A-B). Por tanto, estos resultados no permiten dar una explicación al hecho de que la síntesis *de novo* de la proteína *HAHSP70* en los parásitos transfectados con el gen *HAHSP70-II* en antisentido con respecto al gen *NEO*, línea *HAHSP70-II*as, no aumenta durante el choque térmico (Fig. 19). Las hibridaciones de los filtros con las sondas 3'UTR-II (Fig. 21C-D) y región codificante de la α -tubulina (Fig. 21E-F) dieron los perfiles esperados en ambos casos. En la

línea HAHSP70-IIas, la abundancia de los transcritos *HAHSP70-II* y la presencia de transcritos antisentido (Fig. 17) podrían ser la causa de la falta de regulación a nivel de la traducción de la proteína HAHSP70 durante el choque térmico.

4.3. Obtención de una línea de *L. infantum* deficiente para el gen *HSP70-II*

Los resultados obtenidos hasta el momento indicaban que los genes *HSP70-II* de *L. infantum* se regulan a nivel de la traducción durante el choque térmico: a 26°C los transcritos *HSP70-II* no se unen a las fracciones polisómicas, indicando que a esta temperatura no se traducen, sin embargo, en parásitos mantenidos a 37 y 39°C los mensajeros aparecen claramente asociados a ribosomas (Fig. 10), a pesar de que los niveles estacionarios de mensajeros no experimentan variaciones (Fig. 7). Con el fin de profundizar en la regulación de los genes *HSP70* de *L. infantum* y analizar la importancia del gen *HSP70-II* decidimos crear una línea de *L. infantum* deficiente para este gen. La región codificante de los alelos *HSP70-II* fue reemplazada de forma secuencial por la región codificante de los genes de resistencia a los antibióticos neomicina e higromicina mediante recombinación homóloga (Fig. 22A). Para ello, se emplearon construcciones plasmídicas en las que se clonaron ambos marcadores de resistencia flanqueados por las regiones reguladoras adyacentes a la región codificante del gen *HSP70-II* (ver apartado 3.4.3 y 3.4.4), obteniéndose los clones **pNeo-II** (Fig. 5) y **pHyg-II** (Fig. 6). 2 µg de cada uno de los plásmidos, linealizados con la enzima de restricción *Bgl*III, fueron empleados para transfectar, de forma secuencial, promastigotes de *L. infantum*. Los recombinantes fueron seleccionados en placa, obteniéndose finalmente la línea clonal $\Delta hsp70-II::NEO/\Delta hsp70-II::HYG$ (= $\Delta hsp70-II$).

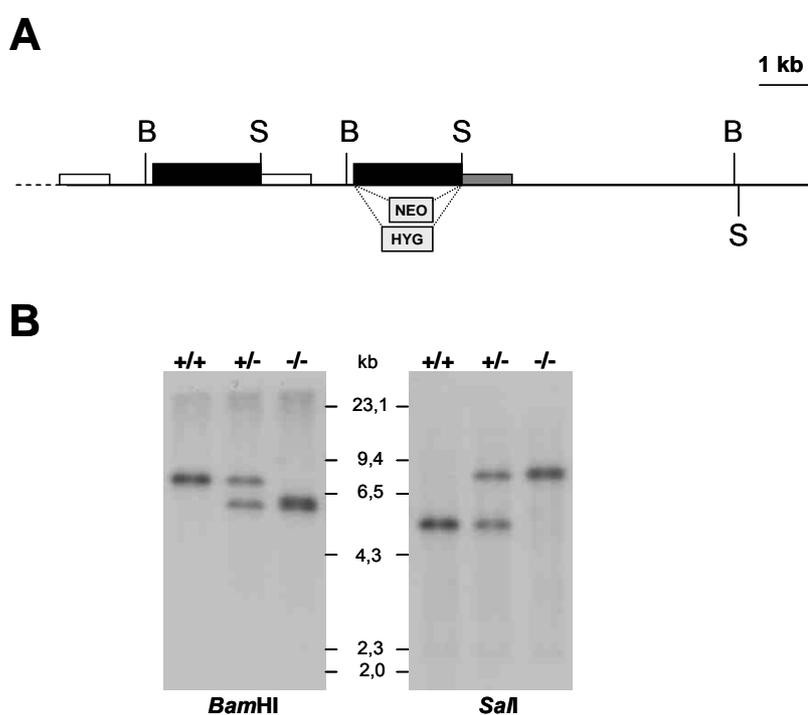


Figura 22. Delección por reemplazamiento génico del gen *HSP70-II* de *L. infantum*. (A) Representación esquemática del final del locus *HSP70* de *L. infantum* en el que se indica la posición de las dianas *Bam*HI (B) y *Sal*I (S), así como los genes de resistencia a neomicina (NEO) e higromicina (HYG) empleados para el reemplazamiento génico de los dos alelos *HSP70-II*. (B) Análisis mediante *Southern blot* del reemplazamiento génico. ADN genómico (1 µg) de promastigotes de las líneas BCN (+/+), línea heterocigota obtenida tras la integración del gen *NEO* (+/-) y línea $\Delta hsp70-II$ (-/-), fue digerido con las endonucleasas de restricción *Bam*HI y *Sal*I. Como sonda se empleó la región 3'UTR del gen *HSP70-II* de *L. infantum*.

La correcta integración de los genes de resistencia a antibióticos se comprobó mediante ensayos de *Southern blot*. Se extrajo ADN genómico de las líneas de *L. infantum* BCN, $\Delta hsp70-II::NEO/HSP70-II$ (línea heterocigota para el gen *HSP70-II*) y $\Delta hsp70-II$, que fue digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sal*I. Los fragmentos obtenidos fueron resueltos en geles de agarosa y transferidos a una membrana de nailon que se hibridó con una sonda de ADN correspondiente a la región 3'UTR del gen *HSP70-II* de *L. infantum* (Fig. 22B). En el carril correspondiente a la línea BCN se detecta una banda *Bam*HI de 7,7 kb donde se encuentran los dos alelos *HSP70-II*; en la línea heterocigota para el gen *HSP70-II* además de la banda de 7,7 kb del alelo *HSP70-II* se detecta otra de menor tamaño (6,32 kb) que corresponde al alelo reemplazado por el gen *NEO* (alelo *NEO*). Finalmente, en la línea deficiente para el gen *HSP70-II*, aparece además de la banda de 6,32 kb del alelo *NEO*, una segunda banda de 6,5 kb perteneciente al alelo *HYG*, indicando que ha ocurrido la correcta integración de ambos genes de resistencia en la línea $\Delta hsp70-II$. En el caso de las digestiones con la enzima de restricción *Sal*I los tamaños de banda obtenidos también se ajustan a lo esperado, ya que el reemplazamiento de los genes *HSP70-II* conlleva la pérdida de la diana *Sal*I situada en el extremo de su región codificante, por lo que la banda de 5,45 kb de la línea BCN se convierte en dos bandas de 8 y 8,2 kb en la línea deficiente para el gen *HSP70-II* (Fig. 22B).

4.3.1. Regulación de los genes *NEO* e *HYG* durante el choque térmico en la línea $\Delta hsp70-II$

4.3.1.1. Expresión de los ARNm *NEO* e *HYG*

Como parte de la caracterización molecular de la línea $\Delta hsp70-II$ de *Leishmania* nos planteamos analizar la correcta expresión de los genes *NEO* e *HYG* colocados en el contexto de las señales reguladoras del gen *HSP70-II*. Para ello, se extrajo ARN de promastigotes de las líneas BCN y $\Delta hsp70-II$ mantenidos durante 2 h a las temperaturas de 26, 37 y 39°C; el ARN fue resuelto en geles de agarosa desnaturalizantes y transferido a membranas de nailon que se hibridaron con diferentes sondas de ADN (Fig. 23). La hibridación de los filtros con sondas frente a las regiones codificantes de los genes de resistencia a neomicina e higromicina, mostraron que los genes *NEO* e *HYG* dan lugar a mensajeros de 2 y 2,2 kb, respectivamente, como corresponde al correcto procesamiento de los mismos. Sin embargo, mientras que los mensajeros *NEO* se expresan de forma constitutiva en todas las temperaturas ensayadas, como corresponde a aquellos que portan la región 3'UTR-II, los transcritos *HYG* no recuperan este comportamiento; los niveles de éstos descienden tras el tratamiento de los parásitos a 37°C, para volver a aumentar a 39°C. Este patrón de expresión resulta sorprendente, ya que la presencia de la región 3'UTR-II en estos mensajeros debería hacer que los niveles de los transcritos no se vieran afectados por el choque térmico. A continuación, los filtros se hibridaron con una sonda de ADN frente a la región 3'UTR-II (Fig. 23) y se comprobó que la banda de 3,1 kb de expresión constitutiva correspondiente a los mensajeros *HSP70-II* que aparece en el caso de la línea BCN, no se detecta en la línea $\Delta hsp70-II$, corroborando la pérdida en esta línea de ambos genes *HSP70-II*. En esta línea, la sonda 3'UTR-II hibrida con una banda que englobaría a los transcritos *NEO* e *HYG* de expresión constitutiva. Finalmente, y como control, se empleó una sonda frente a la región 3'UTR-I de los genes *HSP70-I* de *L. infantum*: tanto en la línea BCN como en la línea $\Delta hsp70-II$ se detecta un transcrito de 3,1 kb cuyos niveles aumentan durante el choque térmico (Fig. 23).

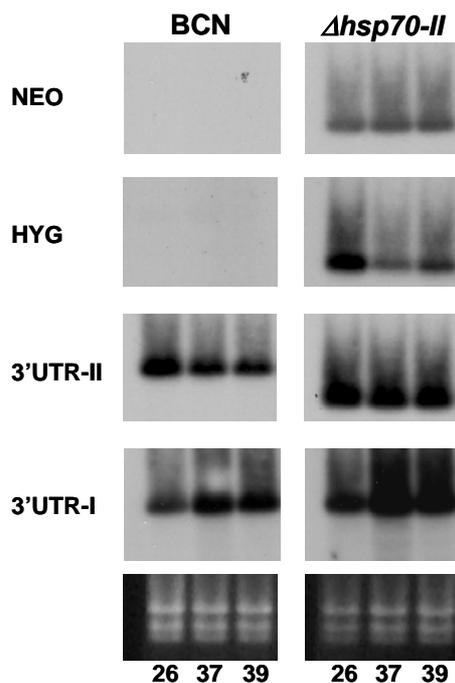


Figura 23. Análisis de la expresión de los ARNm *NEO* e *HYG* en la línea $\Delta hsp70-II$. Promastigotes de *L. infantum* de las líneas BCN y $\Delta hsp70-II$ fueron mantenidos durante 2 h a las temperaturas indicadas (26, 37 y 39°C). Se extrajo ARN de cada tratamiento y se realizó un Northern blot que se hibridó con diferentes sondas: región codificante del gen *NEO* (panel *NEO*), región codificante del gen *HYG* (panel *HYG*), región 3'UTR del gen *HSP70-II* (panel 3'UTR-II) y región 3'UTR de los genes *HSP70-I* (panel 3'UTR-I). En la parte inferior se muestran los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio como control de la cantidad de ARN cargada en cada carril.

4.3.1.2. Expresión de la proteína HSP70 durante el choque térmico en la línea $\Delta hsp70-II$

Tras comprobar la correcta integración de los genes *NEO* e *HYG* en el locus *HSP70* (Fig. 22), y que ambos son procesados correctamente dando lugar a mensajeros del tamaño adecuado (Fig. 23), nos planteamos analizar la expresión de la proteína HSP70 en la línea $\Delta hsp70-II$. Teniendo en cuenta que los transcritos *HSP70-II* no se traducen a 26°C, pero si se traducen de forma activa a 37 y 39°C, esperábamos encontrar un descenso en los niveles de proteína HSP70 de nueva síntesis durante el choque térmico en los promastigotes de la línea $\Delta hsp70-II$ con respecto a la línea BCN. Se tomaron cultivos de promastigotes de las líneas BCN y $\Delta hsp70-II$ que se mantuvieron durante 1 h a 26, 37, 39 y 41°C, periodo en el que se marcó la síntesis *de novo* de proteínas mediante la adición de metionina y cisteína marcadas en los cultivos. A continuación, se prepararon extractos proteicos de cada uno de los tratamientos y se inmunoprecipitó la proteína HSP70 (Fig. 24). Como era de esperar, la cantidad total de proteína HSP70 es muy similar en ambas líneas de *Leishmania* (Fig. 24A). No obstante, de forma interesante, en la línea $\Delta hsp70-II$ la síntesis *de novo* de la proteína HSP70 durante el choque térmico es menor que en la línea parental BCN (Fig. 24B). Mediante análisis densitométrico de las autorradiografías (Fig. 24B) se determinó que la síntesis de HSP70 es alrededor de 2 veces menor en los parásitos deficientes para el gen *HSP70-II* que en los controles a 37°C (Fig. 24C). Esta diferencia es aún más marcada a 39°C: los promastigotes de la línea BCN sintetizan 5 veces más de proteína HSP70 que los de la línea $\Delta hsp70-II$. Los niveles de proteína producidos en la línea $\Delta hsp70-II$ procederían de la traducción de los mensajeros *HSP70-I*, que se traducen tanto a la temperatura de crecimiento

habitual de los promastigotes (26°C), como a 37 y 39°C. Estos resultados nos llevaron a plantear la hipótesis de que los transcritos *HSP70-II* se traducen activamente cuando los parásitos experimentan temperaturas de choque térmico severo, sugiriendo que éstos han sido evolutivamente seleccionados para garantizar un aporte extra de proteína HSP70 en condiciones de estrés.

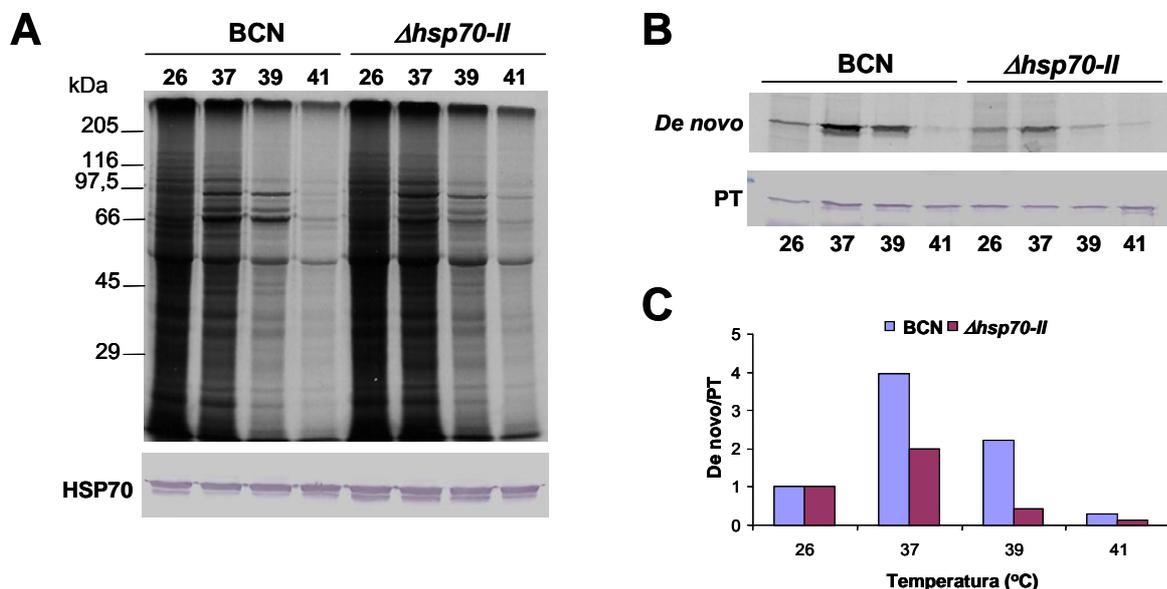


Figura 24. Expresión de la proteína HSP70 durante el choque térmico en la línea $\Delta hsp70-II$. (A) Exposición autorradiográfica del gel de poliacrilamida en el que se separaron proteínas totales de promastigotes de las líneas BCN y $\Delta hsp70-II$ incubados a 26, 37, 39 y 41°C durante 1 h, tiempo en el que se marcaron las proteínas de nueva síntesis. En la parte inferior se muestra la cantidad de proteína HSP70 presente en cada muestra, que fue determinada por *Western blot*. (B) Inmunoprecipitación de la proteína HSP70 a partir de los extractos proteicos de promastigotes incubados a las temperaturas indicadas. En el panel superior se muestra la proteína HSP70 de nueva síntesis (*De novo*), y en la parte inferior el resultado del *Western blot* con la cantidad de HSP70 total cargada en cada carril (PT). (C) Histograma de la relación entre la síntesis *de novo* y la cantidad total de proteína HSP70 (*De novo*/PT); los datos se normalizaron con respecto al valor obtenido en las muestras de promastigotes incubados a 26°C, al que se asignó un valor de 1.

Habíamos determinado que en promastigotes de *L. infantum* (cepa BCN) sometidos a un choque térmico de 37°C se induce la síntesis de la proteína HSP70, que alcanza su máximo durante la primera hora, con un aumento en sus niveles de síntesis *de novo* de 4-5 veces con respecto a los niveles de síntesis a 26°C (Fig. 8). En este sentido, quisimos analizar cómo la delección del gen *HSP70-II* en la línea $\Delta hsp70-II$ podría afectar a esta cinética de síntesis (Fig. 25). Así, promastigotes de la línea $\Delta hsp70-II$ fueron incubados a 37°C durante diferentes periodos de tiempo, de 1 a 8 h, empleando como control parásitos mantenidos a 26°C; durante la última hora de tratamiento se marcaron las proteínas de nueva síntesis y se inmunoprecipitó la proteína HSP70 de los extractos proteicos obtenidos a partir de cada uno de los cultivos (Fig. 25). La figura 25A corresponde a la autorradiografía de las proteínas totales que resultaron marcadas en cada punto del ensayo, observándose que la incubación a 37°C tampoco tiene efecto sobre la síntesis global de proteínas en la línea $\Delta hsp70-II$. Asimismo, tampoco se observan cambios en la cantidad total de proteína HSP70 a lo largo del ensayo (Fig. 25A, panel HSP70). Sin embargo, los ensayos de inmunoprecipitación indican que en los promastigotes deficientes para el gen *HSP70-II* el momento de máxima síntesis de la proteína HSP70 a 37°C se retrasa hasta la tercera hora de tratamiento (Fig. 25B), con un

aumento de 4 veces con respecto a la cantidad producida a 26°C (Fig. 25C). Además los niveles basales no son recuperados hasta las 7-8 h, mientras que en la cepa BCN estos se recuperan tras 3-4 h de incubación a 37°C (Fig. 8C). Este resultado puede estar poniendo de manifiesto la existencia de un mecanismo de compensación por el que los genes *HSP70-I* se traducirían durante más tiempo para producir más HSP70 y compensar así la ausencia de los genes *HSP70-II*.

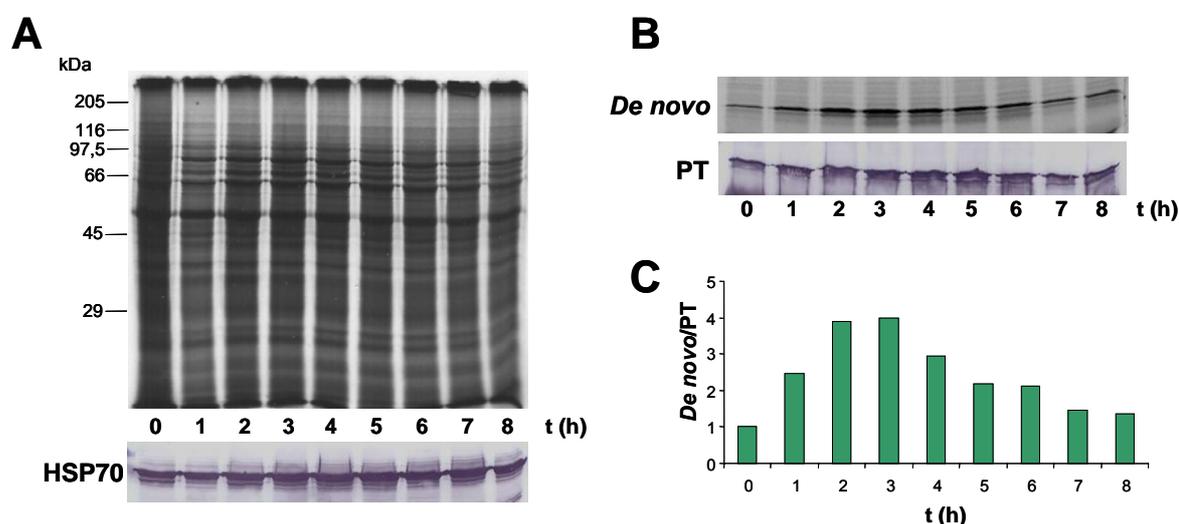


Figura 25. Cinética de síntesis de HSP70 en la línea $\Delta hsp70-II$ a 37°C. (A) Los promastigotes fueron mantenidos a 37°C durante un periodo de 1 a 8 h, marcándose la síntesis de proteínas durante la última hora de tratamiento. Las proteínas marcadas se separaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10%, mostrándose en la figura la exposición autorradiográfica del mismo. En la parte inferior de la radiografía se muestra la cantidad total de HSP70 detectada por *Western blot*. (B) Inmunoprecipitación de la proteína HSP70 a partir de extractos de parásitos en los que se marcó la síntesis *de novo* de proteínas. En la parte superior aparece la exposición autorradiográfica donde se refleja la proteína HSP70 de nueva síntesis (*De novo*), y en la parte inferior se muestra el resultado del *Western blot* utilizado para determinar la cantidad de proteína inmunoprecipitada en cada caso (PT). (C) Histograma que representa la relación entre la síntesis *de novo* de HSP70 y la cantidad total de proteína para cada uno de los tiempos de tratamiento (*De novo/PT*); los datos se han normalizado con respecto al valor determinado en el tiempo cero (parásitos incubados a 26°C), al que se asignó un valor de 1.

4.3.1.2.1. Análisis de la expresión de la proteína HSP70 mediante electroforesis bidimensional

El análisis de los patrones de expresión de proteínas mediante electroforesis bidimensional permite identificar las diferentes isoformas de una misma proteína que pueden regularse de forma distinta ante determinadas condiciones. Tras estudiar la expresión de la proteína HSP70 durante el choque térmico en promastigotes de la línea $\Delta hsp70-II$, decidimos emplear la técnica de la EF-2D con el fin de determinar posibles diferencias en el número de isoformas de la proteína HSP70 y en su patrón de expresión a diferentes temperaturas en las líneas BCN y $\Delta hsp70-II$. Se tomaron cultivos de promastigotes de ambas líneas que fueron mantenidos a las temperaturas de 26 y 37°C durante 1 h en la que se marcó la síntesis *de novo* de proteínas. Tras el tratamiento, se obtuvo un extracto de proteínas totales que fueron resueltas en la primera dimensión por isoelectroenfoque en el rango 4-7 de pH y en la segunda dimensión de acuerdo a su peso molecular. Las proteínas marcadas fueron reveladas tras exposición autorradiográfica de los gels, previamente sometidos a un tratamiento de fluorografía (Fig. 26). Tanto en la línea BCN como en la línea $\Delta hsp70-II$ se observan dos

isoformas mayoritarias de la proteína HSP70, cuya identidad fue confirmada mediante ensayos de *Western blot* (datos no mostrados). Una de las dos isoformas HSP70, la más básica, es la que experimenta un mayor aumento en su síntesis durante el tratamiento por choque térmico (Fig. 26). El aumento en la síntesis *de novo* de la proteína HSP70 resultó ser comparable al obtenido en los ensayos de inmunoprecipitación (Fig. 24), con un incremento menor en promastigotes deficientes para el gen *HSP70-II* en comparación con los promastigotes de la cepa BCN. Sin embargo, en estos ensayos no se detectaron diferencias cualitativas en la línea deficiente con respecto a la línea parental BCN, lo que nos permite concluir que la expresión del gen *HSP70-II* no está asociada a la síntesis de una isoforma HSP70 particular.

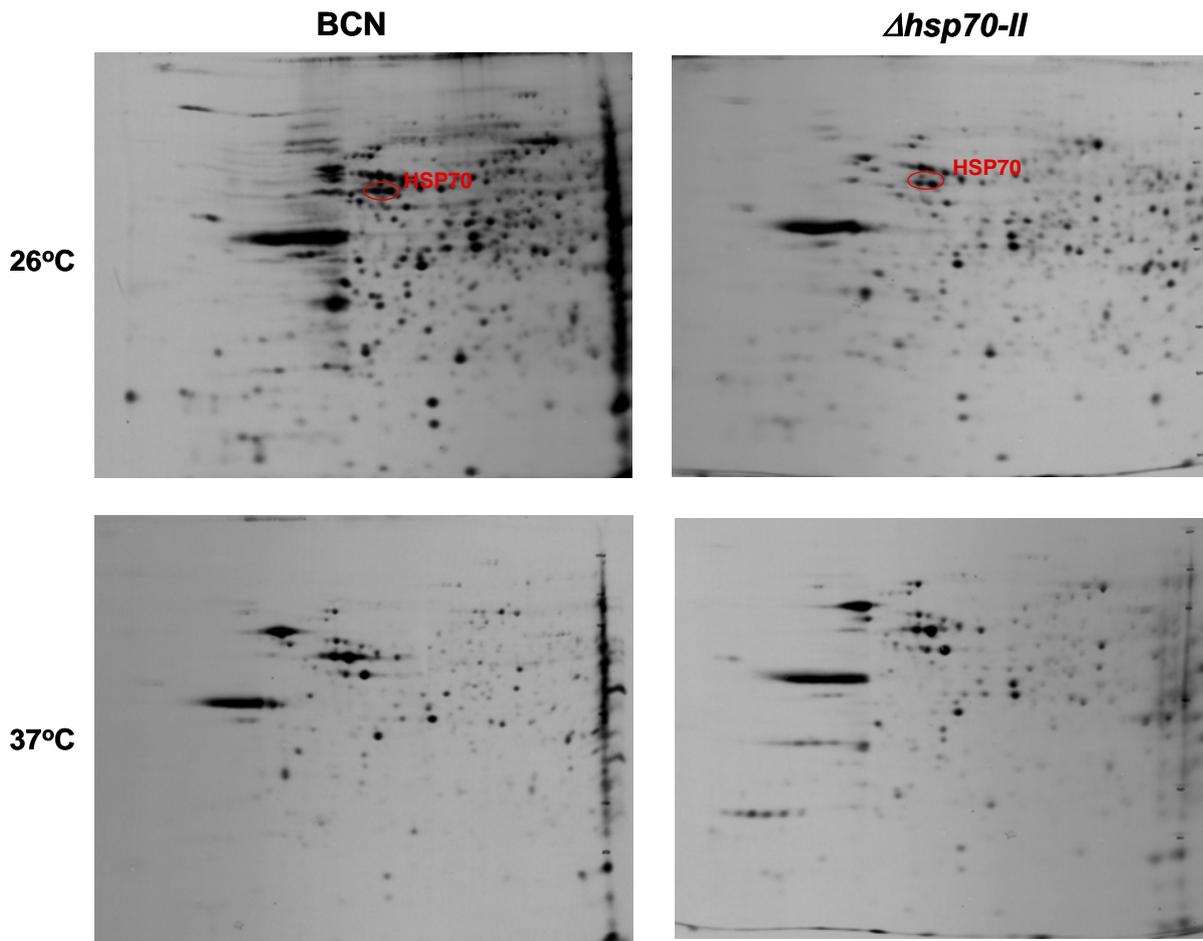


Figura 26. Análisis mediante electroforesis bidimensional de la expresión de la proteína HSP70 en la línea $\Delta hsp70-II$. Se tomaron promastigotes de las líneas BCN y $\Delta hsp70-II$ mantenidos a 26 y 37°C durante 1 h, en la que se marcó la síntesis *de novo* de proteínas. Tras el tratamiento se obtuvieron extractos proteicos de cada una de las muestras y se resolvieron (70 μ g) de acuerdo a su punto isoeléctrico (rango 4-7) y a su peso molecular. Los gels fueron revelados mediante fluorografía, mostrándose en la figura la exposición autorradiográfica de los mismos.

4.3.1.3. Análisis de los perfiles polisómicos de los ARNm *NEO* e *HYG* durante el choque térmico

La creación de la línea $\Delta hsp70-II$, por otra parte, supuso la disponibilidad de una nueva herramienta para analizar la posible implicación de la región codificante *HSP70* en el

silenciamiento de los transcritos *HSP70-II* a 26°C. Con este objetivo decidimos analizar los perfiles polisómicos de los transcritos *NEO* e *HYG* en la línea $\Delta hsp70-II$ a 26 y 39°C (Fig. 27). Resultó interesante observar que los perfiles polisómicos de los transcritos *NEO* e *HYG* tienen un comportamiento muy similar a los encontrados para los transcritos *HSP70-II* en la cepa BCN (Fig. 10E). Así, a 26°C la mayor parte de los mensajeros se localizan en las fracciones libres de ribosomas; por el contrario, cuando los promastigotes son crecidos a 39°C el perfil polisómico de estos mensajeros cambia claramente, encontrándose la mayoría de los ARNm *NEO* e *HYG* asociados a polisomas (Fig. 27A-D). Cuando los mismos filtros fueron hibridados con una sonda específica para los genes de la tubulina se comprobó que su asociación a ribosomas se ve fuertemente disminuida durante el choque térmico (Fig. 27E-F). Los resultados obtenidos indican que los genes *NEO* e *HYG*, en el contexto cromosómico de los genes *HSP70-II*, muestran la regulación de éstos, indicando que las regiones UTR serían suficientes para conferir dicha regulación, y que la región codificante *HSP70* no es necesaria.

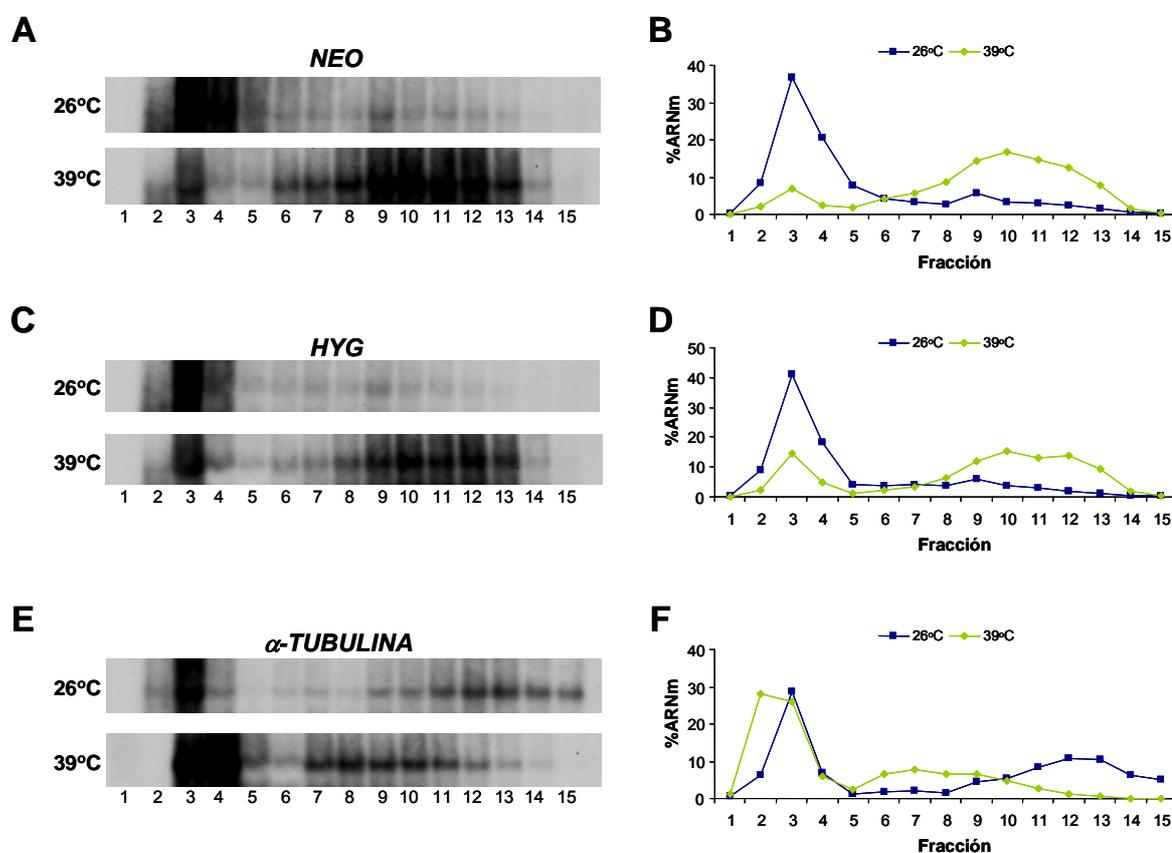


Figura 27. Perfiles polisómicos de los ARNm *NEO* e *HYG*. Los extractos citoplasmáticos obtenidos a partir de promastigotes de la línea $\Delta hsp70-II$, crecidos a 26 y 39°C durante 2 h, se separaron en un gradiente lineal de sacarosa. Posteriormente se tomaron 15 fracciones del gradiente desde la parte superior del mismo, y se purificó el ARN, que se resolvió en geles de agarosa desnaturalizantes y se transfirió a membranas de nailon. Los filtros se hibridaron con diferentes sondas de ADN: región codificante del gen *NEO* (panel A), región codificante del gen *HYG* (panel C) y región codificante de la α -tubulina (panel E). En los paneles B, D y F se representa el análisis densitométrico realizado sobre las autorradiografías A, C y E, respectivamente. Se representa el porcentaje de señal de cada una de las 15 fracciones con respecto a la señal global de hibridación (%ARNm).

Para finalizar los experimentos de análisis de la regulación de los genes *NEO* e *HYG* en la línea *Δhsp70-II* deberíamos estudiar la síntesis *de novo* de las proteínas NEO e HYG cuando los promastigotes son sometidos a temperaturas de choque térmico, esperando encontrar una traducción preferencial de estas proteínas en condiciones de estrés. Sin embargo, este estudio no se pudo realizar debido a la no disponibilidad de anticuerpos específicos que nos permitieran realizar los experimentos de inmunoprecipitación.

4.3.2. Caracterización fenotípica de la línea *Δhsp70-II*

Tras haber obtenido una línea de *L. infantum* deficiente para el gen *HSP70-II*, y estudiar la regulación durante el choque térmico de los genes *NEO* e *HYG* empleados para el reemplazamiento de los alelos *HSP70-II*, decidimos caracterizar el fenotipo de dicha línea con el fin de establecer diferencias con respecto a la línea BCN y deducir la importancia del gen *HSP70-II* en diferentes procesos biológicos del parásito.

4.3.2.1. Crecimiento de los promastigotes *Δhsp70-II* en cultivo

Como aspecto inmediato, nos planteamos establecer la curva de crecimiento en cultivo de los parásitos deficientes para el gen *HSP70-II*, comparándola con la mostrada por los parásitos parentales de la línea BCN. Para ello, iniciamos cultivos de las líneas BCN y *Δhsp70-II* a una densidad celular inicial de 1×10^6 promastigotes/ml, mantuyéndose a 26°C durante 14 días y realizando contajes de los mismos cada 24 h (Fig. 28). Las curvas de crecimiento obtenidas indican que durante la fase logarítmica, los promastigotes de la línea *Δhsp70-II* crecen de forma más lenta que los de la línea BCN, si bien las diferencias no son muy marcadas. Es en la fase estacionaria donde se encuentran las diferencias más acusadas entre ambas líneas: la densidad celular máxima alcanzada por los parásitos deficientes para el gen *HSP70-II* ($13,4 \times 10^6$ células/ml) es significativamente inferior a la alcanzada por los parásitos control (26×10^6 células/ml). Además, a partir del séptimo día de crecimiento en cultivo se observa un descenso paulatino en el número de parásitos presentes en los cultivos de la línea *Δhsp70-II*, mientras que en los cultivos de la línea BCN ese número aumenta ligeramente o se mantiene constante hasta el día 14.

Para comprobar que los defectos de crecimiento de los promastigotes de la línea *Δhsp70-II* durante la fase estacionaria se deben a la ausencia del gen *HSP70-II* y no a un efecto producido por la presión selectiva de los antibióticos neomicina e higromicina, se repitió el ensayo anterior con cultivos de la línea *Δhsp70-II* a los que no se añadieron los antibióticos de selección. Los resultados obtenidos fueron equivalentes a los mostrados en la figura 28 (datos no mostrados). Estos resultados indicarían que los parásitos de la línea *Δhsp70-II* poseen un defecto de crecimiento muy acusado en la fase estacionaria, lo que sugiere un papel relevante del gen *HSP70-II* durante esta fase de crecimiento.

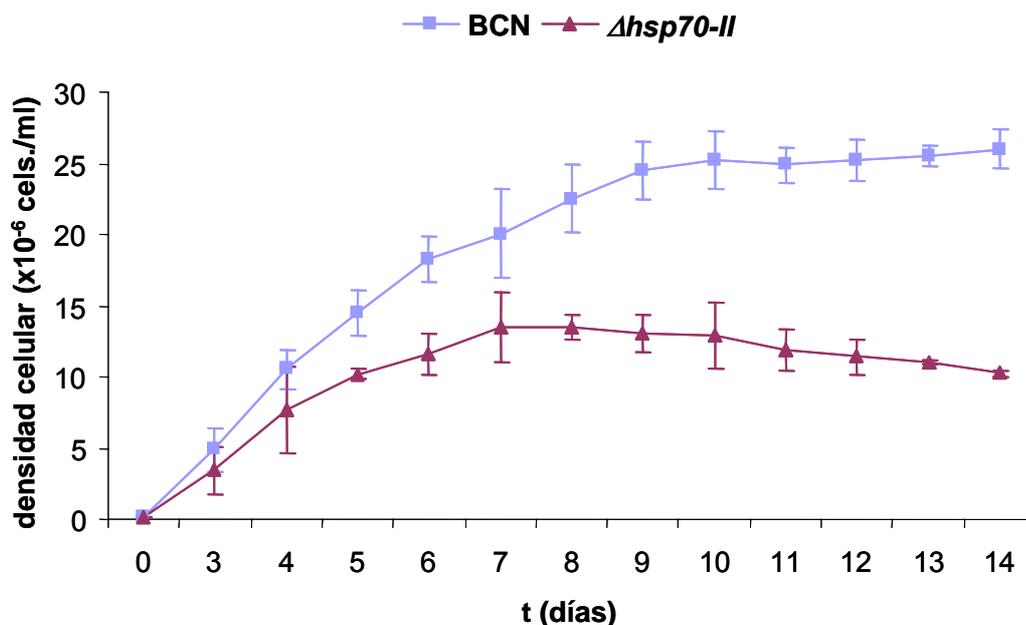


Figura 28. Curva de crecimiento de la línea $\Delta hsp70-II$. Se sembraron promastigotes de las líneas BCN y $\Delta hsp70-II$ en medio RPMI a una densidad celular inicial de 1×10^6 células/ml, y se determinó el número de células en los días indicados. En cada una de las curvas se representan los valores medios y las desviaciones estándar de cinco experimentos independientes.

Con el fin de seguir indagando sobre los defectos de crecimiento en cultivo de los promastigotes deficientes para el gen *HSP70-II*, decidimos estudiar las cinéticas de replicación de los parásitos. Se tomaron cultivos de promastigotes marcados con el fluoróforo CFSE de las líneas BCN y $\Delta hsp70-II$ a una densidad celular inicial de 1×10^6 células/ml, y se mantuvieron a 26°C durante 7 días. El CFSE es un fluoróforo que difunde pasivamente en el interior de las células donde adquiere su estado activo mediante la ruptura de sus grupos acetato por la esterases intracelulares; los grupos succinimidil-ester creados reaccionan con las aminas intracelulares formando conjugados fluorescentes que quedan fijados. Estos productos quedan retenidos en las células durante su desarrollo y son transferidos a las células hijas durante su división, por lo que el CFSE ha sido usado ampliamente en estudios de proliferación celular. En los días 0 (día de inicio del ensayo), 1, 2, 3, 4 y 7 se tomaron alícuotas de cada uno de los cultivos y se midió la intensidad de fluorescencia emitida por el CFSE unido a los parásitos mediante citometría de flujo (Fig. 29). Este estudio mostró que los parásitos de la línea BCN se replican de forma muy homogénea, ya que aparecen picos muy definidos en cada uno de los días analizados. Durante los primeros días de cultivo se producen un mayor número de divisiones, que van disminuyendo conforme avanza el tiempo de crecimiento en cultivo, hasta llegar al día 7, donde los parásitos ya han alcanzado la fase estacionaria. Por el contrario, en los promastigotes de la línea $\Delta hsp70-II$ la señal de fluorescencia genera picos con una base muy ancha, lo que sugiere un comportamiento heterogéneo de la población de parásitos: una parte de la población se divide de forma similar (incluso más rápida) a como lo hacen los promastigotes control, mientras que otra parte lo hace de forma más lenta o no lo hace.

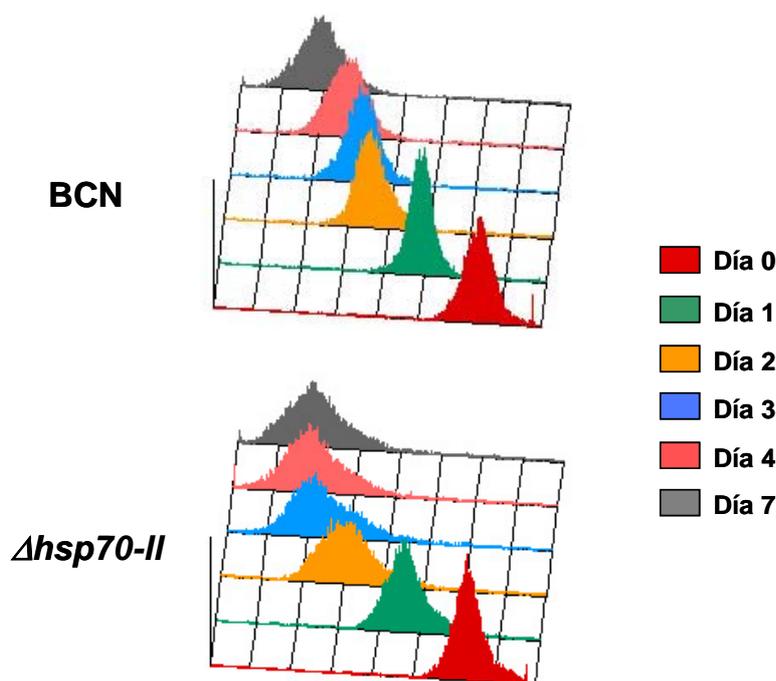


Figura 29. Cinética de división celular de promastigotes deficientes para el gen *HSP70-II*. Se sembraron promastigotes de las líneas BCN y $\Delta hsp70-II$ marcados con el fluoróforo CFSE en medio RPMI a una densidad celular de 1×10^6 células/ml. Se determinó la intensidad de fluorescencia en los cultivos en cada uno de los días indicados mediante citometría de flujo.

4.3.2.2. Análisis del ciclo celular

Algunas proteínas de choque térmico han sido implicadas en los procesos de división celular; así por ejemplo, la inhibición de la proteína HSP83 en *Leishmania* provoca la parada de la división celular en G2 (Wiesgigl y Clos, 2001). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de las curvas de crecimiento, decidimos analizar la distribución en fases del ciclo celular de los parásitos $\Delta hsp70-II$ a lo largo de la curva de crecimiento, con el fin de determinar si la falta del gen *HSP70-II* tiene algún efecto en la distribución de fases del ciclo celular. Para ello, se lanzaron cultivos de las líneas BCN y $\Delta hsp70-II$ a una densidad celular inicial de 1×10^6 promastigotes/ml, y se analizó la distribución de fases del ciclo celular cada 24 h a partir del cuarto día de crecimiento mediante citometría de flujo (Fig. 30). Los porcentajes de células en cada una de las fases del ciclo celular indican que en la línea $\Delta hsp70-II$ existe un mayor número de promastigotes en la fase G2/M en comparación con los parásitos de la línea BCN. Esta mayor acumulación en la fase G2/M se acentúa según se prolonga la fase estacionaria del cultivo. Estos resultados, junto a los obtenidos sobre el crecimiento en cultivo de los parásitos (Fig. 28), sugieren que los promastigotes deficientes para el gen *HSP70-II*, aún siendo capaces de duplicar su material genético, tienen dificultad para completar la división de sus citoplasmas, quedando muchas células paradas en la fase G2/M del ciclo celular.

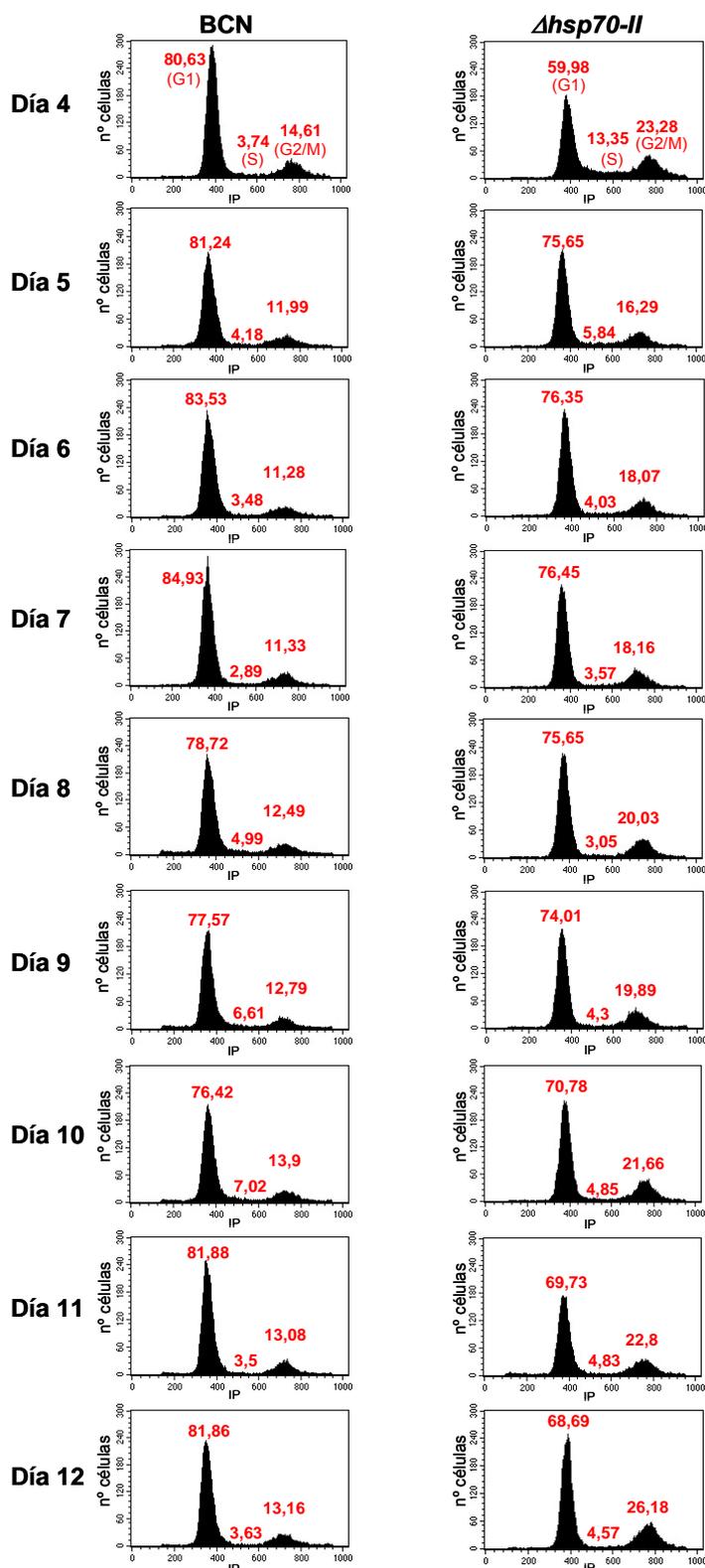


Figura 30. Análisis de ciclo celular en la línea $\Delta hsp70-II$. Promastigotes de las líneas BCN y $\Delta hsp70-II$ fueron sembrados en medio RPMI a una densidad celular inicial de 1×10^6 células/ml. En los días indicados se tomaron alícuotas de los cultivos y se realizó una tinción de las células con yoduro de propidio. El contenido de ADN en cada una de las células se determinó mediante citometría de flujo. En las gráficas se representa la intensidad de fluorescencia del yoduro de propidio (IP, proporcional al contenido en ADN de las células) frente al número de eventos registrados durante el análisis, que corresponde al número de células. En cada histograma se recogen los datos del análisis de 20000 eventos/muestra, indicándose además el porcentaje de células existente en cada fase del ciclo celular, obtenido tras el análisis de las muestras con el software Cell QuestTM.

Durante los estudios precedentes, los cultivos fueron examinados con ayuda de un microscopio de inmersión, observándose una gran heterogeneidad de formas morfológicas en el cultivo de la línea *Δhsp70-II*. Para documentar este hecho, tomamos alícuotas de los cultivos en los mismos días en que se analizó su ciclo celular, y se realizaron preparaciones para su tinción y análisis por microscopía. En las figuras 31 y 32 se muestran imágenes representativas de este estudio. Los cultivos correspondientes a la línea BCN muestran poblaciones muy homogéneas en cuanto a su morfología, con parásitos que presentan la forma típica de los promastigotes estacionarios: alargados y con flagelos de gran longitud (Fig. 31). Por el contrario, la línea *Δhsp70-II* presenta poblaciones muy heterogéneas con formas tanto alargadas, como redondeadas, y con flagelos de mayor o menor longitud (Fig. 32). Además, en estas preparaciones se observa una proporción elevada de parásitos con una dotación doble de su material genético (núcleo y kinetoplasto), e incluso con dos flagelos, que no han completado la separación de sus citoplasmas; esta observación está en consonancia con los resultados encontrados tras análisis del ciclo celular por citometría de flujo, que pusieron de manifiesto una acumulación de parásitos en la fase G2/M en los cultivos de la línea *Δhsp70-II* (Fig. 30).

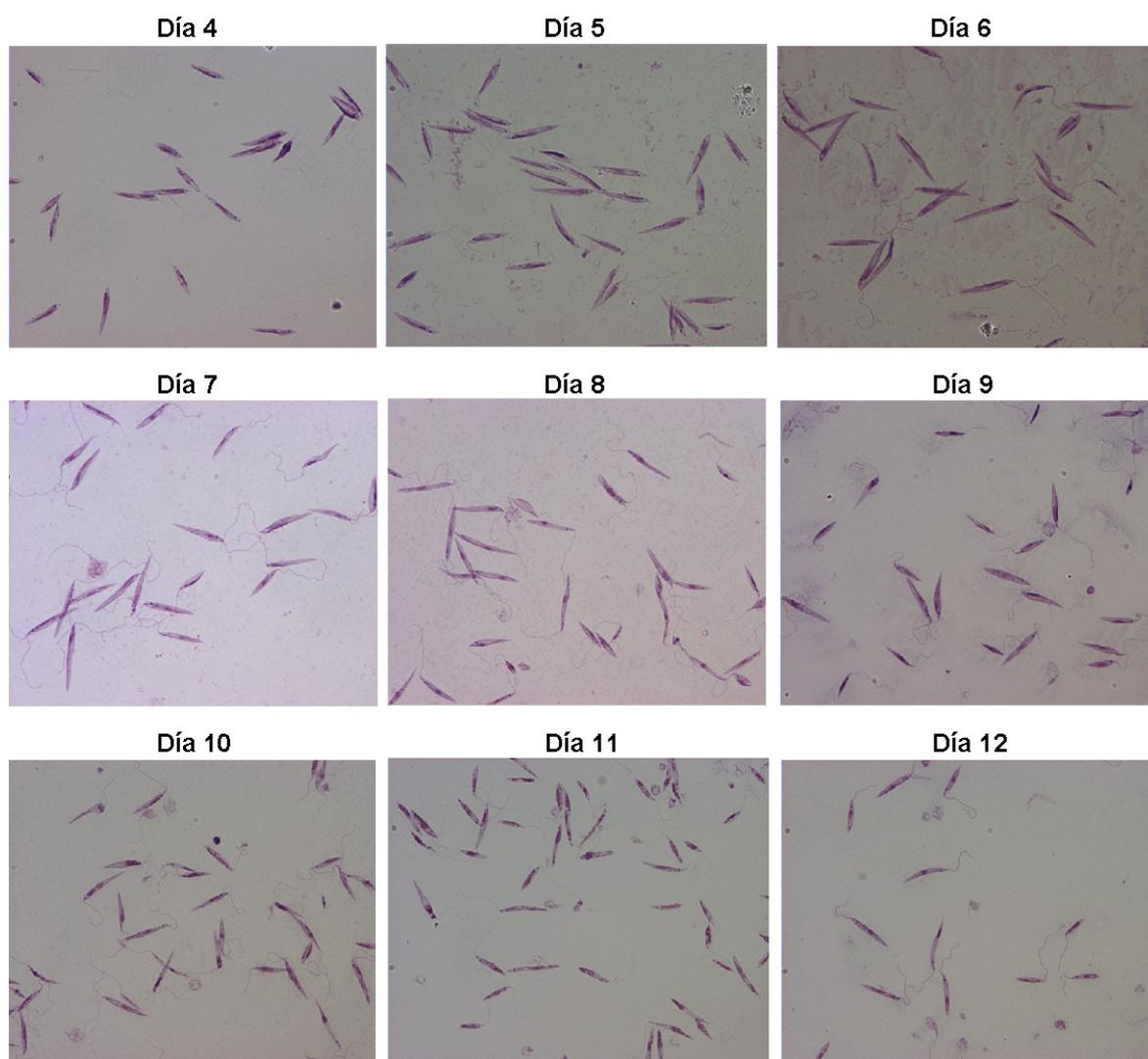


Figura 31. Morfología de los promastigotes de la línea BCN. Se tomó una alícuota de los cultivos de la línea BCN empleados para el análisis del ciclo celular en los días indicados y se realizaron extensiones en portas que fueron teñidas con Giemsa para su observación mediante microscopía. Las imágenes fueron tomadas con una cámara ccd de color acoplada a un microscopio óptico (objetivo 63×).

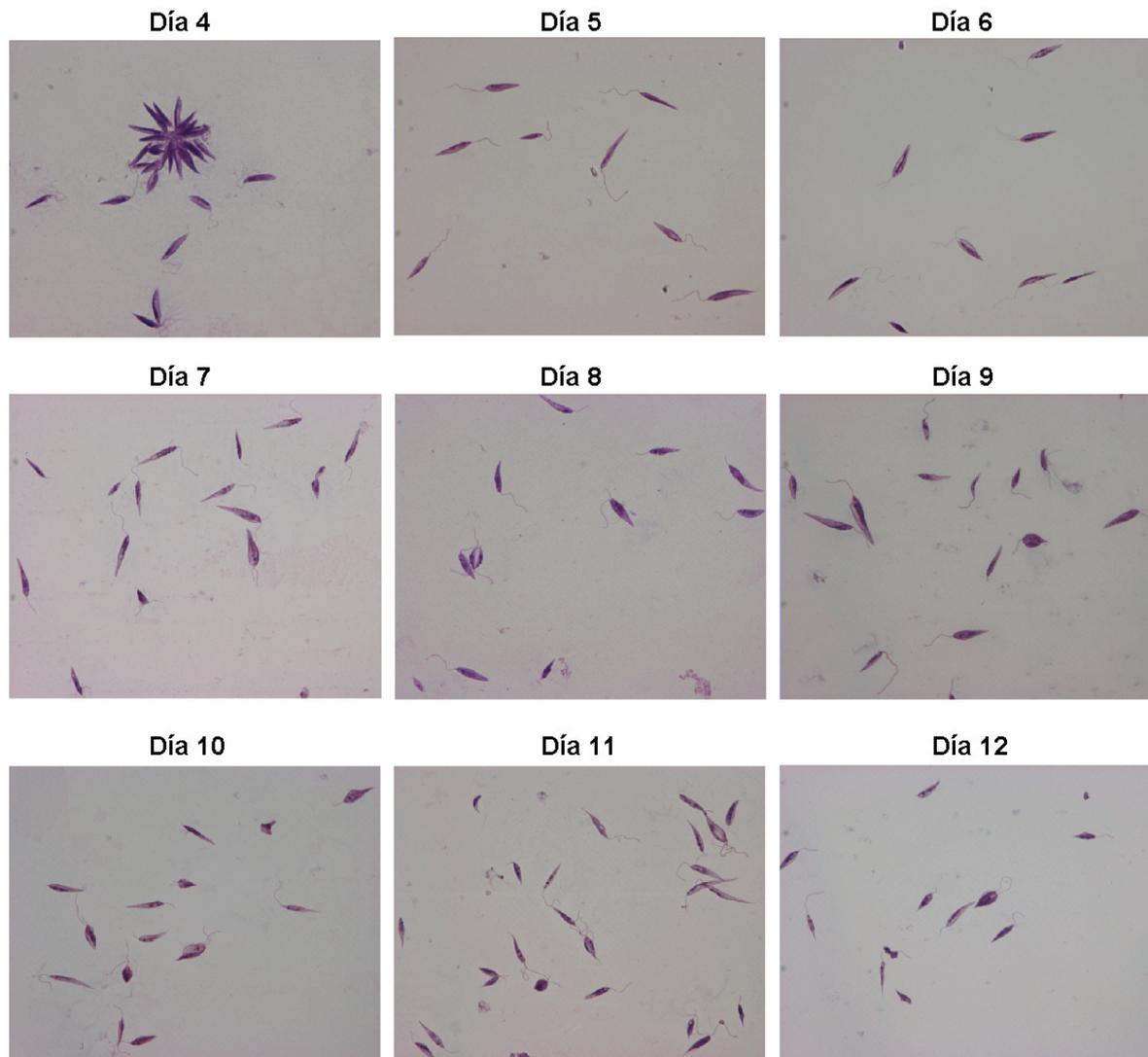


Figura 32. Morfología de los promastigotes de la línea $\Delta hsp70-II$. Se tomó una alícuota de los cultivos de la línea $\Delta hsp70-II$ empleados para el análisis del ciclo celular en los días indicados y se realizaron extensiones en portas que fueron teñidos con Giemsa para su observación mediante microscopía. Las imágenes fueron tomadas con una cámara ccd de color acoplada a un microscopio óptico (objetivo 63 \times).

4.3.2.3. Capacidad infectiva de la línea $\Delta hsp70-II$

Para continuar con la caracterización de la línea $\Delta hsp70-II$ decidimos estudiar si la falta del gen $HSP70-II$ tendría algún efecto en la capacidad infectiva de los promastigotes, para lo cual realizamos ensayos tanto *in vitro*, como *in vivo*. Es un hecho establecido que los parásitos en cultivo experimentan una pérdida de infectividad según se prolonga su crecimiento axénico. Por ello, una vez establecida la línea $\Delta hsp70-II$, lo primero que hicimos fue infectar ratones de la cepa BALB/c con 1×10^7 promastigotes estacionarios de esta línea, con el fin de recuperar la capacidad infectiva perdida durante la manipulación de los mismos en cultivo. Tras 28 días de infección se sacrificaron los animales y se recuperaron parásitos del bazo, que fueron empleados en los ensayos que se detallan a continuación. Estos resultados, además, nos permitieron afirmar que los parásitos deficientes en el gen $HSP70-II$ son capaces de multiplicarse *in vivo*. No obstante, consideramos interesante cuantificar su capacidad infectiva con respecto a la cepa parental no mutada.

4.3.2.3.1. Ensayos de infección *in vitro*

Para la realización de los ensayos de infección *in vitro* se emplearon promonocitos de la línea celular U937, que fueron infectados con promastigotes en fase estacionaria de las líneas BCN y $\Delta hsp70-II$ en una relación 1:5 (monocito:parásito). En primer lugar decidimos analizar la capacidad de interacción del parásito con su célula hospedadora. Para ello, promastigotes marcados con el fluoróforo CFSE fueron incubados con monocitos U937 y tras 24 h se analizó la fluorescencia asociada a la población de monocitos mediante citometría de flujo (Fig. 33).

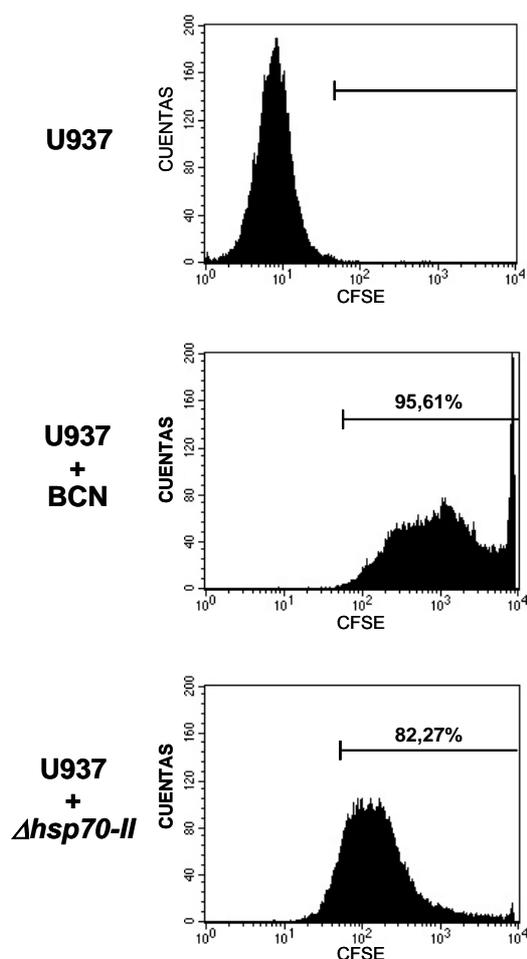


Figura 33. Análisis de la interacción parásito-monocito. Se infectaron monocitos de la línea U937 con promastigotes estacionarios de las líneas BCN y $\Delta hsp70-II$ marcados con el fluoróforo CFSE en una relación 1:5 (monocito:parásito). Tras 24 h de infección, se recolectaron las células y se midió la intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo, empleando como control del ensayo un cultivo de monocitos sin infectar. En las gráficas se representa la intensidad de fluorescencia del CFSE frente al número de eventos registrados (cuentas), que es equivalente al número de células. En cada histograma se recogen los datos obtenidos del análisis de 20000 eventos/muestra. La región delimitada en los histogramas, teniendo en cuenta el control de células sin infectar, se corresponde con la población de células en la que se ha producido interacción entre los monocitos y los promastigotes, y se indica el porcentaje de células delimitadas en dicha región.

Los resultados obtenidos indican que los promastigotes de la línea BCN son capaces de interactuar con el 95,6% de los monocitos, mientras que este porcentaje se reduce al 82,27% en el caso de la línea $\Delta hsp70-II$. Estas diferencias en los datos de porcentaje de

células U937 fluorescentes, como tales, indicarían que la falta del gen *HSP70-II* no afecta de forma muy significativa a la capacidad del promastigote para interactuar con las células huésped. Sin embargo, las gráficas obtenidas (Fig. 33) si reflejan diferencias notables en cuanto a la intensidad de fluorescencia asociada a las poblaciones de monocitos, que es un reflejo del número de parásitos que estarían interactuando con cada una de las células. En el caso de los monocitos infectados con promastigotes de la línea BCN, el mayor desplazamiento de la curva hacia la derecha indica que existe un mayor número de parásitos que están interactuando con cada monocito, mientras que los ensayos correspondientes a la línea *Δhsp70-II* indican que un menor número de promastigotes está interactuando con cada monocito, ya que la curva obtenida se sitúa más hacia la izquierda.

De forma paralela a los ensayos anteriores se determinó el grado de infección de las células mediante estudios de microscopía tras 1, 2 y 6 días de infección. Se realizaron preparaciones para microscopía a cada uno de los tiempos de infección que fueron teñidas con Giemsa y se realizaron contajes con el fin de calcular el porcentaje de células infectadas, así como el número medio de amastigotes por cada una de las células infectadas (Fig. 34). Los porcentajes de infección obtenidos con cada una de las líneas de *Leishmania* empleadas son muy similares, tan sólo se observan diferencias significativas ($p=0,022$) en el día 2, ya que tras 6 días de infección los porcentajes vuelven a igualarse (Fig. 34A). El número de amastigotes por célula infectada es, asimismo, muy similar tras 24 h de infección entre la línea BCN y la línea *Δhsp70-II*. Sin embargo, en los días 2 y 6, ya si existen diferencias muy significativas ($p=0,0001$ y $p=4,12e^{-5}$ respectivamente) entre ambas líneas de *Leishmania* (Fig. 34B). Así, tras 6 días de infección los monocitos infectados con la línea BCN contienen como promedio el doble de amastigotes que aquellos que fueron infectados con los promastigotes deficientes para el gen *HSP70-II*. Este resultado, junto con los obtenidos de los ensayos de interacción (Fig. 33), indicarían que la delección del gen *HSP70-II* no produce efectos drásticos sobre la capacidad de interacción, penetración y diferenciación de los promastigotes en la célula hospedadora, aunque una vez en el interior de la misma su capacidad proliferativa se ve fuertemente disminuida en comparación con los parásitos de la línea BCN. Anteriormente se ha descrito que los promastigotes de la línea *Δhsp70-II* sufren una parada en la fase G2/M durante su crecimiento en cultivo (Fig. 30), por lo que también es posible que ocurran alteraciones similares en el ciclo celular de los amastigotes en el interior de las células, y que explicarían las diferencias observadas en cuanto al grado de multiplicación dentro de los monocitos U937. Además, el defecto de la capacidad proliferativa de los amastigotes deficientes podría explicar los resultados obtenidos en cuanto a los porcentajes de infección (Fig. 34A). En el día 2 existen diferencias significativas entre las líneas BCN y *Δhsp70-II* tanto en los porcentajes de infección, como en el número medio de amastigotes por célula infectada (Fig. 34A-B), sin embargo, en el día 6 los porcentajes de infección son muy similares, a pesar de que existen diferencias aún más notables en el número de amastigotes por célula infectada. Pensamos que la mayor capacidad proliferativa de los parásitos de la línea BCN en el interior de las células conduciría, a partir del día 2, a provocar su lisis, por lo que en el día 6 se observa un descenso en el número de células infectadas, igualándose en este momento a los porcentajes de células infectadas observados en los ensayos con la línea *Δhsp70-II*.

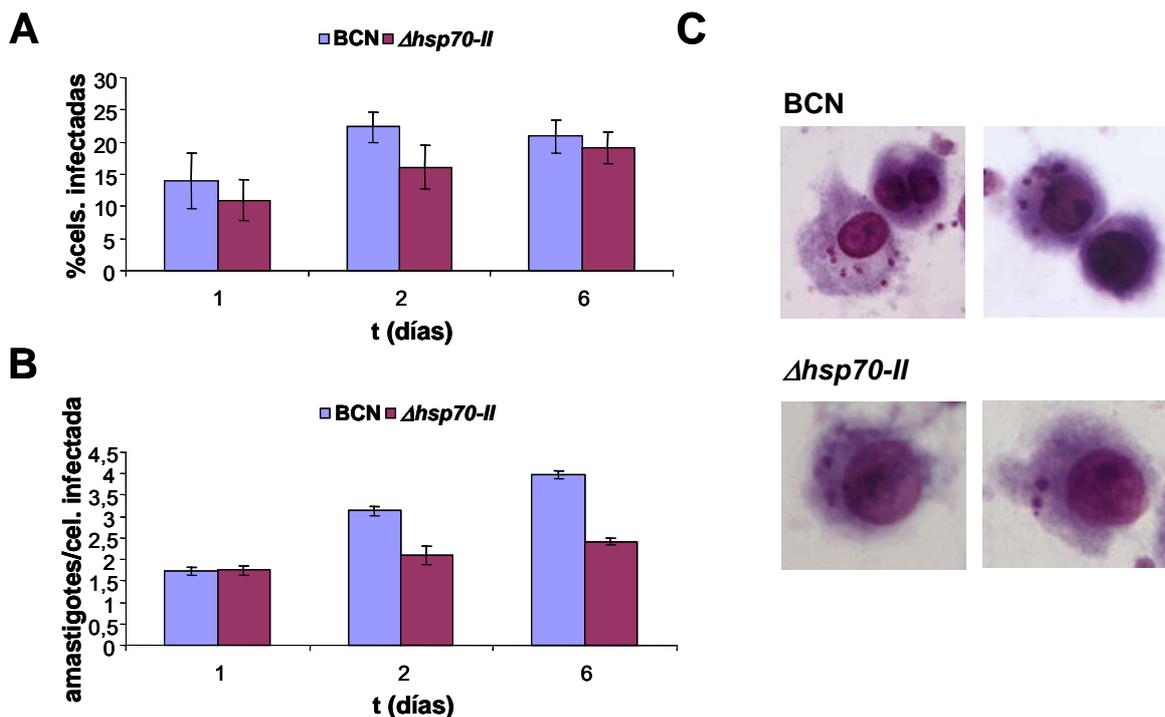


Figura 34. Infección de monocitos con promastigotes de la línea $\Delta hsp70-II$. Se infectaron monocitos de la línea U937 con promastigotes estacionarios (1:5) de las líneas BCN y $\Delta hsp70-II$, y se realizaron preparaciones para microscopía tras 1,2 y 6 días de infección. Se representa tanto el porcentaje de células infectadas (A), como el número medio de amastigotes por célula infectada (B) calculados tras la observación al microscopio de un total de 400 células nucleadas presentes en campos sucesivos. En el panel C se muestran imágenes representativas de las preparaciones tomadas con una cámara ccd acoplada al microscopio (objetivo 63 \times).

4.3.2.3.2. Ensayos de infección *in vivo*

Los ensayos de infección *in vivo* se realizaron con ratones de la cepa BALB/c. Se trabajó con dos grupos de 6 animales cada uno, que fueron infectados por vía intravenosa con 1×10^6 promastigotes estacionarios de las líneas BCN y $\Delta hsp70-II$. Tras 28 días, los animales fueron sacrificados y se estimó la carga parasitaria tanto en bazo como en hígado mediante ensayos de dilución límite (Fig. 35). Solamente en 2 de los 6 animales infectados con promastigotes de la línea $\Delta hsp70-II$ se detectaron parásitos en bazo si bien, en estos casos la carga parasitaria resultó ser muy inferior a la de los bazos de los ratones infectados con la línea BCN (Fig. 35). En ninguno de los ratones pertenecientes al grupo $\Delta hsp70-II$ se detectaron parásitos en el hígado. En todos los ratones del grupo control (BCN) fueron detectados parásitos en bazo e hígado, con cargas parasitarias muy similares.

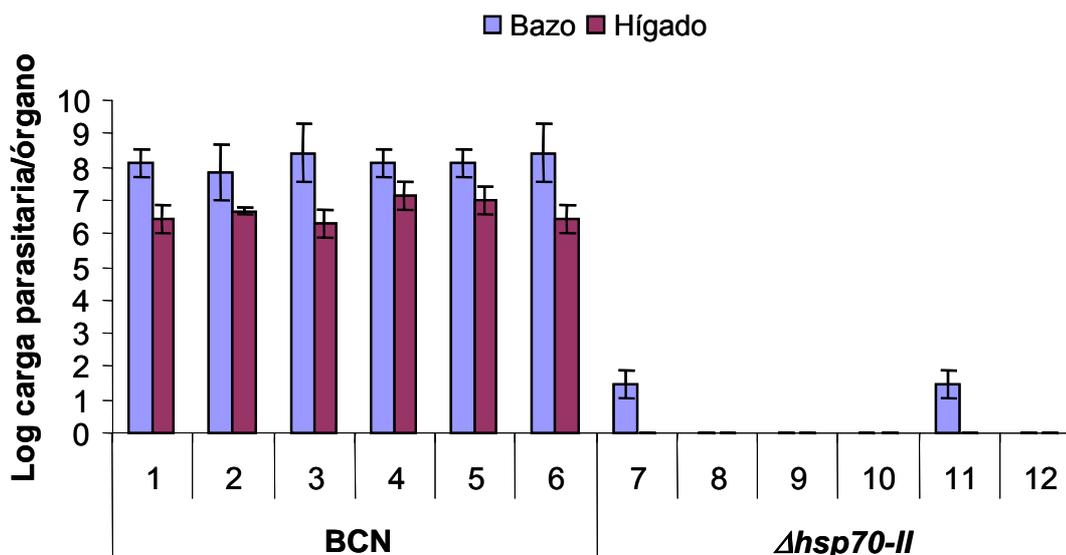


Figura 35. Medida de la carga parasitaria en bazo e hígado. Se infectaron grupos de 6 ratones con 1×10^6 promastigotes estacionarios de las líneas BCN y $\Delta hsp70-II$ que se sacrificaron tras 28 días de infección y se estimó la carga parasitaria en bazo e hígado mediante ensayos de dilución límite. Se representa el logaritmo de la carga parasitaria total en cada órgano para cada uno de los animales infectados.

Cuando analizamos la reactividad de los sueros de los animales tomados en el momento del sacrificio, diluidos 1/200, frente a proteínas totales de *L. infantum* mediante ensayos de ELISA, observamos que tan solo existe una pequeña respuesta en los animales 7 y 11 del grupo $\Delta hsp70-II$, mientras que en todos los ratones del grupo BCN se obtuvieron valores de reactividad elevados (Fig. 36). Cabe destacar que los ratones 7 y 11 son los mismos en los que se detectó un pequeño grado de parasitemia en el bazo (Fig. 35).

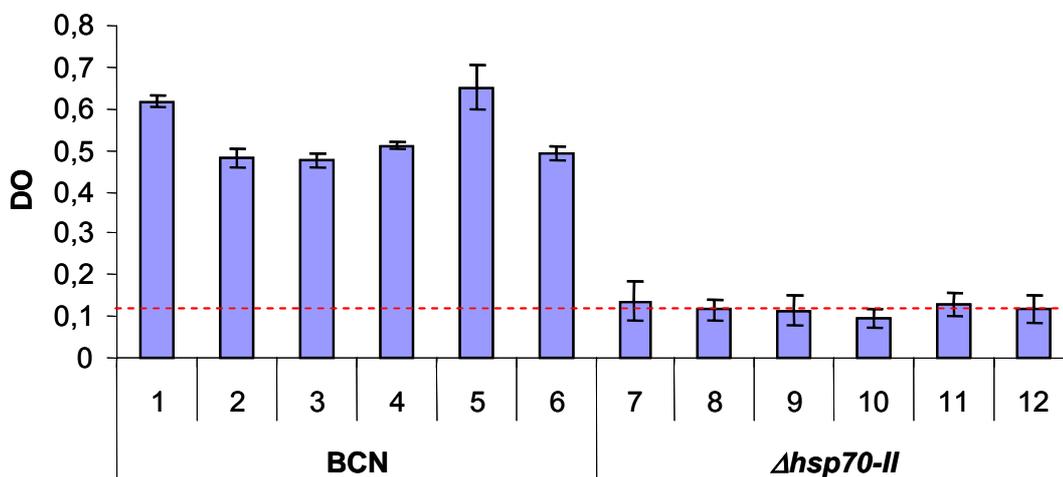


Figura 36. Análisis de la respuesta IgG frente a proteínas totales de *Leishmania* en los ratones infectados. Se representan los valores de DO a 450 nm de los sueros de los animales infectados con parásitos de las líneas BCN y $\Delta hsp70-II$ tomados en el momento del sacrificio. Los sueros se ensayaron a la dilución 1/200. La línea discontinua representa el valor medio de DO obtenido con los sueros pre-infección.

Los ensayos de infección *in vivo* indican que la expresión del gen *HSP70-II* de *L. infantum* tiene un papel fundamental durante la infección.

4.4. Caracterización del locus *HSP70* en distintas especies de *Leishmania*

La importancia que el gen *HSP70-II* parece tener en diversos aspectos de la biología de *L. infantum*, nos llevó a analizar si este gen y la organización del locus *HSP70* estaban conservados en las diversas especies de *Leishmania*. Como se ha descrito anteriormente, en *L. infantum* existen dos tipos de genes *HSP70* diferenciados por su región 3'UTR que se regulan de forma diferente durante el choque térmico (Fig. 7). Los transcritos *HSP70-I* se acumulan en respuesta al aumento de temperatura, traduciendo tanto a 26°C como a temperaturas de choque térmico (37 y 39°C), mientras que los mensajeros *HSP70-II* solamente se traducen a temperaturas de choque térmico, a pesar de su expresión constitutiva. Teniendo en cuenta estas diferencias entre los genes *HSP70* nos planteamos analizar la organización del locus *HSP70* y su expresión en distintas especies de *Leishmania*. Las especies elegidas para el estudio fueron: *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. major*, *L. mexicana* y *L. tropica*.

4.4.1. Organización genómica del locus *HSP70* en *Leishmania*

Con el fin de caracterizar la organización genómica de los genes *HSP70* en distintas especies pertenecientes al género *Leishmania*, se extrajo el ADN total de promastigotes de *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. infantum*, *L. major*, *L. mexicana* y *L. tropica*, y se digirió con varias enzimas de restricción. Los fragmentos separados por electroforesis en geles de agarosa fueron transferidos a una membrana e hibridados con sondas de ADN correspondientes a la región 3'UTR-I, 3'UTR-II y región codificante de los genes *HSP70* de *L. infantum*.

Los resultados obtenidos muestran que la organización genómica del locus *HSP70* en *L. major* y *L. tropica* es muy similar a la descrita para *L. infantum* (Fig. 37). La generación de bandas de un mismo tamaño provenientes de digestiones con diferentes enzimas de restricción indica que en estas especies las repeticiones génicas se disponen también en tándem directo. La banda de hibridación de 3,8 kb en los carriles con ADN genómico digerido con *Bam*HI y *Sal*II se corresponde con la unidad de repetición del locus. El hecho de que dicha unidad sea detectada en los filtros hibridados con la sonda de la región 3'UTR-I y de la región codificante, indica que en *L. major* y *L. tropica* la mayoría de los genes *HSP70* presentes en el locus son del tipo *HSP70-I* (Fig. 37B-C), al igual que ocurre en *L. infantum* (Fig. 37A). La sonda 3'UTR-II no reconoce la banda de 3,8 kb correspondiente a la unidad de repetición, pero si una banda de 5,7 kb, indicando la existencia en el locus de los genes del tipo *HSP70-II*, que presentarían una sola copia situada en el extremo 3' del mismo. El estudio densitométrico realizado sobre los filtros hibridados con la sonda de la región codificante de los genes *HSP70* de *L. infantum*, en concreto sobre la intensidad de las bandas en los carriles correspondientes a las digestiones *Bam*HI y *Sal*II nos permitió deducir el número de copias de los genes *HSP70-I*. Considerando que la banda de mayor tamaño en cada una de las digestiones se corresponde con el primero de los genes *HSP70-I* del locus, los resultados indican que en *L. major* existen 5 genes *HSP70-I* (Fig. 37B), mientras que en *L. tropica* existirían 6 copias del mismo (Fig. 37C). El mismo análisis realizado sobre los filtros correspondientes a la especie *L. infantum* corroboró la existencia en ella de 5 genes *HSP70-I* (Fig. 37A) (Quijada y col., 1997a). La representación esquemática de la organización de los genes *HSP70* en estas especies se muestra en la figura 37D.

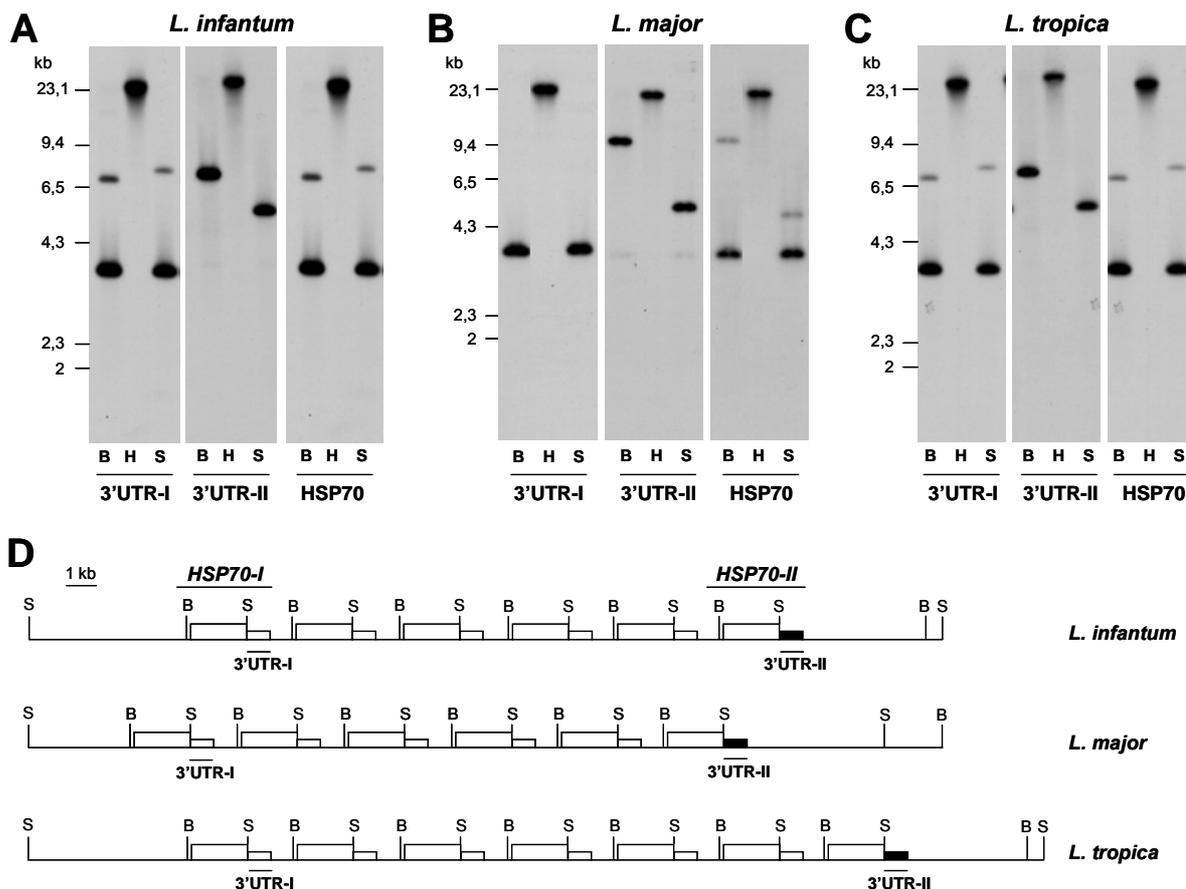


Figura 37. Organización genómica del locus *HSP70* en *L. infantum*, *L. major* y *L. tropica*. Se realizaron ensayos de *Southern blot* sobre ADN obtenido de promastigotes de *L. infantum* (A), *L. major* (B) y *L. tropica* (C). El ADN genómico de cada una de las especies fue digerido con las enzimas de restricción: B, *Bam*HI; H, *Hind*III; S, *Sal*I. Las membranas fueron hibridadas de forma secuencial con sondas de ADN correspondientes a la región 3'UTR de los genes *HSP70-I* (3'UTR-I), 3'UTR del gen *HSP70-II* (3'UTR-II) y región codificante de los genes *HSP70* de *L. infantum* (*HSP70*). (D) Representación esquemática del locus *HSP70* en *L. infantum*, *L. major* y *L. tropica* deducido a partir de los datos obtenidos en los ensayos de *Southern blot*.

L. amazonensis y *L. mexicana* presentan una organización genómica para el locus *HSP70* idéntica, aunque diferente a la descrita anteriormente para *L. major* y *L. tropica* (Fig. 38). La diferencia más importante entre estos dos grupos de especies de *Leishmania* se observa tras la digestión con la enzima *Bam*HI, ya que esta enzima no corta en el locus *HSP70* en *L. amazonensis* y *L. mexicana*. No obstante, los resultados obtenidos evidencian la existencia de varios genes *HSP70* dispuestos en tándem, con una unidad de repetición génica de 3,4 kb puesta de manifiesto por la digestión *Sal*I del ADN genómico. Esta banda de 3,4 kb se detecta tanto con la sonda 3'UTR-I, como con la sonda de la región codificante, indicando que en estas especies la mayoría de los genes *HSP70* corresponderían a los genes *HSP70-I* descritos en *L. infantum*. La sonda 3'UTR-II hibridó con una banda de 6 kb cuando el ADN se digirió con *Sal*I, y con una banda de 4,4 kb en el caso de la digestión con *Bam*HI, indicando la existencia de un solo gen *HSP70-II* en *L. amazonensis* y *L. mexicana*. Además el patrón de bandas obtenido con esta sonda indica que existe una diana *Bam*HI en la región 3'UTR-II del gen pero no en el resto del locus. El análisis densitométrico reveló la existencia de 6-7 copias de los genes *HSP70-I* en ambas especies (Fig. 38A-B). Estos datos coinciden con los obtenidos por Bock y Langer (1993), quienes describieron la presencia de 7 genes

HSP70 dispuestos en tándem en *L. amazonensis*. La organización de los genes *HSP70* en *L. amazonensis* y *L. mexicana* aparece esquematizada en la figura 38C.

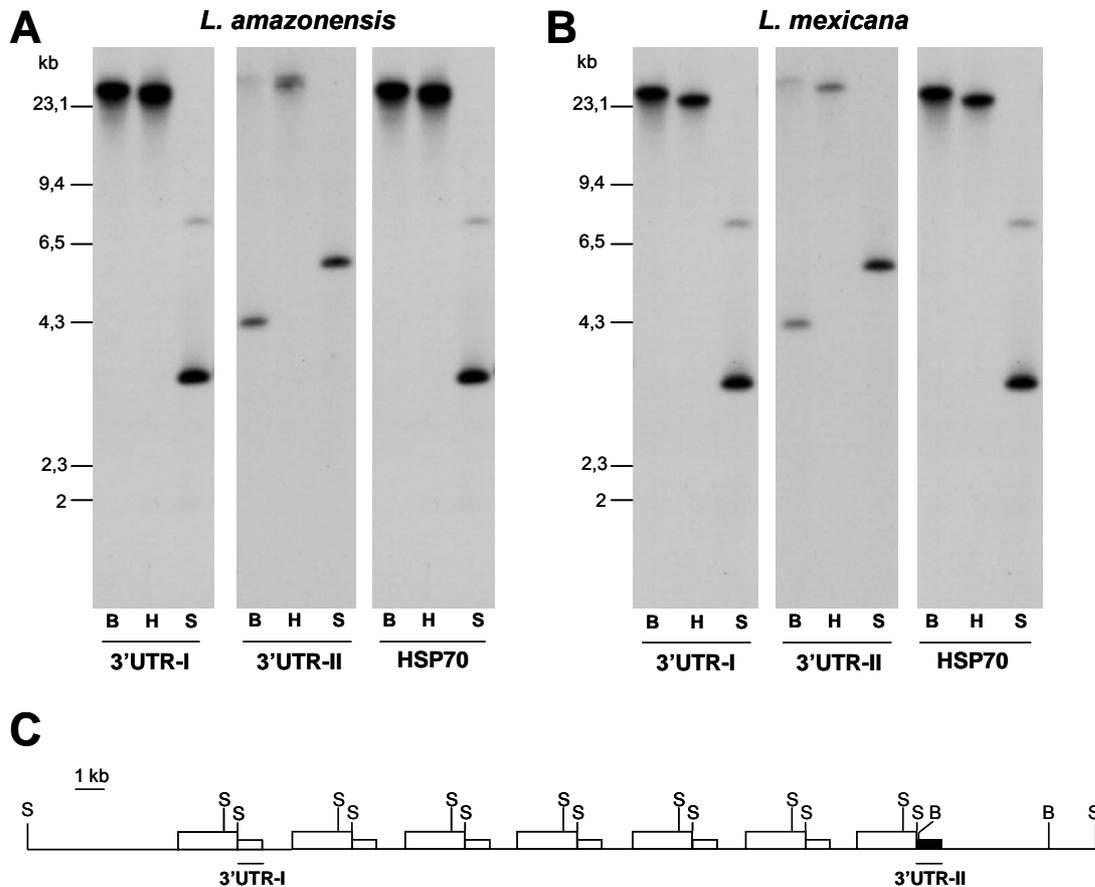


Figura 38. Organización genómica del locus *HSP70* en *L. amazonensis* y *L. mexicana*. Se realizaron ensayos de *Southern blot* sobre ADN obtenido de promastigotes de *L. amazonensis* (A) y *L. mexicana* (B). El ADN genómico de ambas especies fue digerido con las enzimas de restricción: B, *Bam*HI; H, *Hind*III; S, *Sal*I. Las membranas fueron hibridadas de forma secuencial con sondas de ADN correspondientes a la región 3'UTR de los genes *HSP70-I* (3'UTR-I), 3'UTR del gen *HSP70-II* (3'UTR-II) y región codificante de los genes *HSP70* de *L. infantum* (*HSP70*). (D) Representación esquemática del locus *HSP70* en *L. amazonensis* y *L. mexicana* deducido a partir de los datos obtenidos en los ensayos de *Southern blot*.

En *L. braziliensis* se encontró la organización del locus *HSP70* más divergente de las descritas hasta el momento (Fig. 39). En esta especie la sonda 3'UTR-II no reconoció ninguna banda, lo que sugiere la ausencia de genes *HSP70-II*. Por el contrario, la hibridación con la sonda 3'UTR-I y con la sonda correspondiente a la región codificante dió como resultado el mismo patrón de bandas, indicando que la mayoría de los genes *HSP70* en *L. braziliensis* se corresponden con los genes *HSP70-I* de *L. infantum*. Los análisis realizados mediante ensayos de *Southern blot* en *L. braziliensis* no son suficientes para determinar el número de genes *HSP70-I* presentes en el genoma del parásito, así como tampoco permiten descartar la existencia de otros genes *HSP70* no portadores de la región 3'UTR-I.

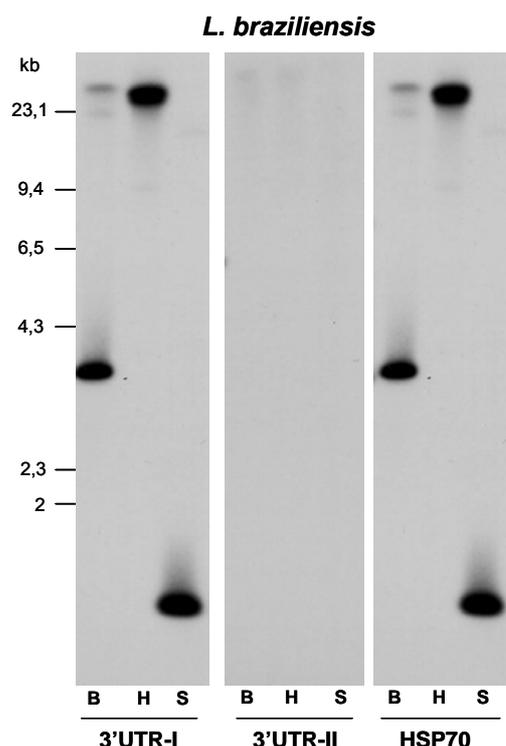


Figura 39. Organización genómica del locus *HSP70* en *L. braziliensis*. Se realizaron ensayos de *Southern blot* sobre ADN obtenido de promastigotes de *L. braziliensis*. El ADN genómico extraído fue digerido con las enzimas de restricción: B, *Bam*HI; H, *Hind*III; S, *Sal*I. Las membranas fueron hibridadas de forma secuencial con sondas de ADN correspondientes a la región 3'UTR de los genes *HSP70-I* (3'UTR-I), 3'UTR del gen *HSP70-II* (3'UTR-II) y región codificante de los genes *HSP70* de *L. infantum* (*HSP70*).

4.4.2. Expresión de los transcritos *HSP70* durante el choque térmico

Una vez comprobada la existencia de genes homólogos a los genes *HSP70-I* y *HSP70-II* en todas las especies estudiadas, salvo en *L. braziliensis* donde sólo estarían presentes los genes *HSP70-I*, nos planteamos analizar la expresión de los mismos durante el tratamiento por choque térmico. Los resultados obtenidos en los ensayos de *Southern blot* indican que en las seis especies analizadas de *Leishmania* se distinguen tres tipos diferentes de organización genómica del locus *HSP70* (Figs. 37, 38 y 39), lo que nos llevó a elegir una especie representativa de cada grupo con el fin de analizar la expresión de los transcritos durante el choque térmico.

Para llevar a cabo estos estudios se extrajo el ARN total de promastigotes de las especies *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. major* crecidas durante 2 h a las temperaturas de 26 y 37°C. El ARN se resolvió en un gel de agarosa desnaturizante y se transfirió a una membrana que fue hibridada con sondas de ADN correspondientes a las regiones 3'UTR-I, 3'UTR-II y codificante de los genes *HSP70* de *L. infantum* (Fig. 40). En *L. amazonensis* y *L. major* los transcritos *HSP70-I* se acumulan cuando los promastigotes son sometidos a temperaturas de choque térmico (37°C), mostrando un aumento en sus niveles de 2-3 veces con respecto a los niveles detectados a 26°C (Fig. 40A-B, panel 3'UTR-I). Por el contrario, en *L. braziliensis* los resultados indican que los mensajeros *HSP70-I* no ven afectada su expresión durante el choque térmico, detectándose niveles similares de los mismos a 26 y 37°C (Fig. 40C, panel 3'UTR-I). La hibridación del filtro con la sonda de ADN frente a la

región 3'UTR-II reveló la expresión constitutiva de los genes *HSP70* portadores de esta región tanto en *L. amazonensis*, como en *L. major* (Fig. 40A-B, panel 3'UTR-II). En *L. braziliensis* como cabía esperar no se detectó la expresión de ningún transcrito portador de la región 3'UTR-II (Fig. 40C, panel 3'UTR-II). Cuando la membrana fue hibridada con una sonda de ADN frente a la región codificante de los genes *HSP70* de *L. infantum*, la acumulación de los transcritos *HSP70-I* dejó de ser evidente indicando que en estas especies los mensajeros *HSP70-II* deben ser más abundantes que los *HSP70-I* al igual que ocurre en *L. infantum*. Los resultados obtenidos con *L. major* coinciden con los mostrados en un trabajo previo donde se analizaba la expresión de los genes *HSP70* en *L. major* (Lee y col., 1988). En el caso de *L. braziliensis* la hibridación con la sonda de la región codificante *HSP70* mostró dos bandas de hibridación de tamaño muy semejante, aunque en ambos casos se observó una expresión similar a 26 y 37°C (Fig. 40C, panel HSP70). La menor de las bandas se corresponde en tamaño con la obtenida tras la hibridación con la sonda 3'UTR-I, mientras que la mayor se explicaría por la existencia en *L. braziliensis* de otros genes *HSP70*, cuya región 3'UTR tendría baja o nula homología de secuencia con las regiones 3'UTR (3'UTR-I y 3'UTR-II) de los genes *HSP70* de *L. infantum*.

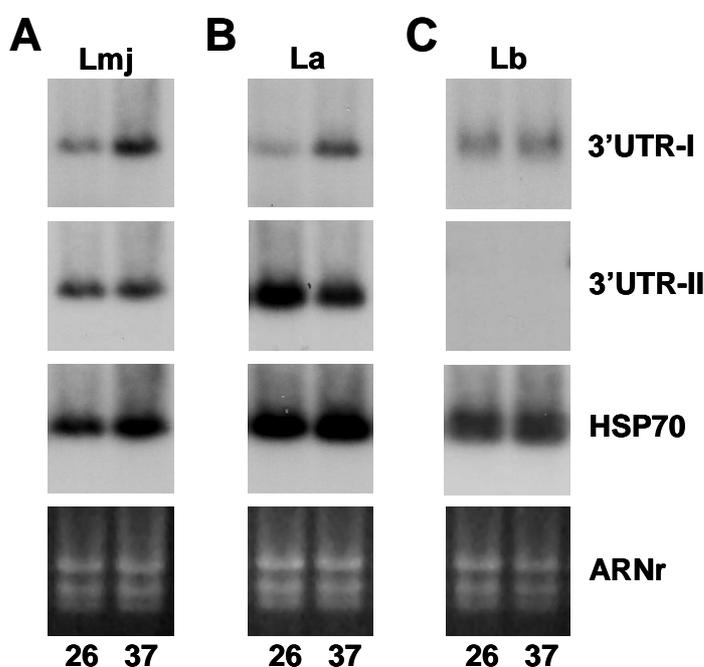


Figura 40. Análisis de la expresión de los genes *HSP70* en *L. major* (A), *L. amazonensis* (B) y *L. braziliensis* (C). Los promastigotes de cada una de las especies fueron mantenidos a 26 y 37°C durante 2 h. Se extrajo ARN tras cada tratamiento y se realizó un *Northern blot* que se hibridó con diferentes sondas: región 3'UTR de los genes *HSP70-I* (3'UTR-I), región 3'UTR del gen *HSP70-II* (3'UTR-II) y región codificante de los genes *HSP70* de *L. infantum* (*HSP70*). En cada caso, en la parte inferior se muestra el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio como control de la cantidad cargada en cada carril.

4.4.3. Expresión de la proteína HSP70 durante el choque térmico

La proteína HSP70 representa en *Leishmania* un 2,1% de la proteína total celular, lo que la convierte en una de las proteínas más abundantes en estos parásitos (Brandau y col., 1995). Esta abundancia explica que no se detecten cambios en los niveles totales de esta proteína durante el choque térmico. Sin embargo, mediante ensayos combinados de marcaje metabólico e inmunoprecipitación se ha determinado un aumento de hasta 7 veces en su

síntesis cuando los promastigotes de *L. donovani* son incubados a 37°C (Brandau y col., 1995). De forma similar, nosotros hemos determinado que en *L. infantum* el aumento en la síntesis de HSP70 durante el choque térmico es de 4-5 veces (Fig. 8). Para completar el estudio de la organización y expresión de los genes *HSP70* en distintas especies de *Leishmania*, nos planteamos analizar la expresión de la proteína en promastigotes de cada una de las especies durante el choque térmico. Para ello, se realizó un tratamiento de 1 h a 26 y 37°C en parásitos de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. major* en los que se marcó la síntesis *de novo* de proteínas. De los extractos proteicos se inmunoprecipitó la proteína HSP70 utilizando para ello un anticuerpo policlonal generado frente a la proteína HSP70 de *L. infantum*. En *L. amazonensis* se observó un efecto drástico de la temperatura sobre la síntesis global de proteínas, con un descenso del 41%, indicando que en esta especie 37°C constituye una temperatura de choque térmico severo (Fig. 41A). Este hecho pone de manifiesto la variabilidad existente en el rango de temperaturas al que cada especie es capaz de resistir; este rango se ha relacionado con la capacidad de cada especie para establecer la infección en diferentes partes del hospedador mamífero (Zilberstein y Shapira, 1994). En *L. braziliensis* y *L. major* la temperatura no produjo un efecto significativo sobre la síntesis de proteínas, indicando que en estas especies, a pesar de ser también causantes de infecciones cutáneas, la traducción de proteínas es más resistente al aumento de temperatura que en *L. amazonensis*. El análisis cuantitativo realizado a partir de los ensayos de inmunoprecipitación reveló que en *L. braziliensis* y *L. major* se produce un aumento de 2 veces en los niveles de proteína HSP70 sintetizada *de novo* a 37°C relativo a los niveles producidos a 26°C (Fig. 41B-C). En *L. amazonensis* no se detecta aumento en la síntesis de la proteína durante el choque térmico. No obstante, si tenemos en cuenta el descenso drástico en la síntesis de proteínas observado en esta especie a 37°C, podemos concluir que la traducción de la proteína HSP70 es resistente al bloqueo global de la síntesis proteica.

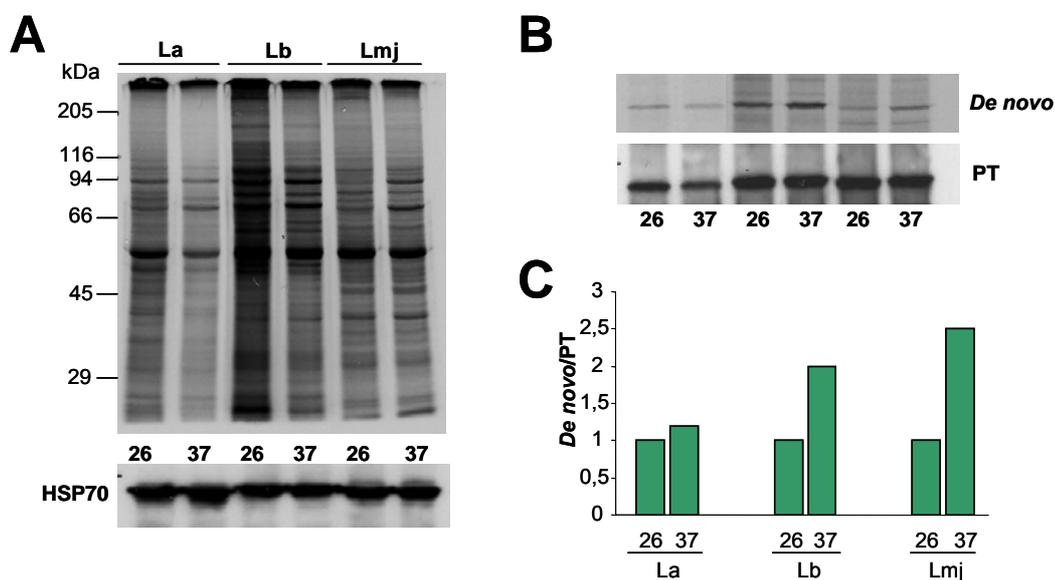


Figura 41. Análisis de la síntesis *de novo* de la proteína HSP70 en algunas especies de *Leishmania*. (A) Se tomaron cultivos de promastigotes de *L. amazonensis* (La), *L. braziliensis* (Lb) y *L. major* (Lmj) en los que se midió la síntesis *de novo* de proteínas durante 1 h a las temperaturas de 26 y 37°C; las proteínas fueron analizadas en geles de poliacrilamida, mostrándose en la figura la exposición autorradiográfica de los mismos. En el panel inferior se muestra el análisis mediante *Western blot* de la cantidad total de HSP70 presente en cada una de las muestras. (B) Inmunoprecipitación de la proteína HSP70 a partir de los extractos proteicos de promastigotes incubados a las temperaturas indicadas. En el panel superior se muestra la proteína HSP70 de nueva síntesis (*De novo*), y en la parte inferior el resultado del *Western blot* utilizado para determinar la cantidad de HSP70 inmunoprecipitada en cada caso (PT). (C) Histograma de la relación entre la síntesis *de novo* de HSP70 y la cantidad total de proteína (*De novo*/PT); los datos se han normalizado con respecto al valor obtenido en los promastigotes crecidos a 26°C, al que se dió arbitrariamente un valor de 1.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. Regulación de los genes *HSP70* de *L. infantum* durante el choque térmico

La respuesta al choque térmico constituye uno de los mecanismos moleculares más conservados a lo largo de la evolución que culmina con un aumento en la síntesis de las proteínas de choque térmico o HSPs, cuya función principal es la de actuar como chaperonas moleculares (Lindquist, 1986). En la mayoría de eucariotas el aumento en la expresión de las HSPs durante el choque térmico es el resultado de la activación transcripcional de los genes que codifican para dichas proteínas (Morimoto y col., 1992).

La transmisión de los parásitos del género *Leishmania* desde el insecto vector poiquilotermo (26°C) al hospedador mamífero homeotermo (35-37°C) implica un aumento drástico de temperatura que desencadena la respuesta al choque térmico en estos organismos (Shapira y col., 1988). La adaptación de los parásitos al aumento de temperatura constituye, en consecuencia, un requisito importante del ciclo de vida de *Leishmania* y, de hecho, ha sido descrito como uno de los factores desencadenantes del proceso de diferenciación promastigote-amastigote (Clos y Krobitch, 1999). Los genes que codifican para las proteínas de choque térmico han sido ampliamente estudiados en *Leishmania*, tanto por su importancia durante el proceso de diferenciación del parásito, como por constituir un modelo ideal para el estudio de los mecanismos de regulación de la expresión génica en estos organismos.

En este trabajo nos planteamos profundizar en el conocimiento de la regulación de los genes *HSP70* en *L. infantum*, y el punto de partida fueron dos características conocidas de la organización y expresión de estos genes. Por un lado, nuestro grupo había establecido que el locus *HSP70* de *L. infantum* contiene 6 copias génicas que pueden ser clasificadas en dos tipos de genes en función de su región 3'UTR (Fig. 7) (Quijada y col., 1997a). A pesar de la ausencia de regulación transcripcional, solamente los niveles de mensajeros *HSP70-I* se incrementan en respuesta al aumento de temperatura (Fig. 7) (Quijada y col., 1997a). Este incremento de los ARNm *HSP70-I* se debe a un mecanismo dependiente de la síntesis activa de proteínas que conduce a un aumento de su estabilidad, habiéndose identificado el elemento regulador entre las posiciones nucleotídicas 699 y 816 de la región 3'UTR-I (Quijada y col., 2000). Por otro lado, había sido reportado que el choque térmico es un factor desencadenante de la traducción activa de algunas proteínas de choque térmico en *Leishmania*. Así, en *L. donovani* se había determinado un aumento de hasta 6 veces en los niveles de HSP70 en promastigotes mantenidos a 37°C (Brandau y col., 1995), mientras que en *L. infantum* la síntesis de la proteína HSP83 aumenta 4 veces durante el tratamiento a 37°C (Larreta y col., 2004). Los resultados mostrados en este trabajo con *L. infantum* indican que la proteína HSP70 se traduce activamente cuando los parásitos son expuestos a temperaturas de choque térmico, con un aumento máximo en sus niveles de 5 veces tras 1 h de tratamiento a 37°C con respecto a los niveles sintetizados a 26°C (Figs. 8 y 9)

El aumento de unas dos veces en los niveles de los transcritos *HSP70-I* a 37°C (Fig.7) sin embargo, no sería suficiente para explicar el aumento de hasta cinco veces de los niveles de síntesis *de novo* de la proteína HSP70 durante el choque térmico (Fig. 8), sugiriendo la implicación de mecanismos de regulación traduccional en la expresión de la proteína HSP70. Así, la expresión de los genes *HSP70* en *L. infantum* podría servir de modelo para analizar mecanismos de regulación traduccional en este protozoo parásito. El hecho de que los transcritos *HSP70-I* fueran los únicos que se acumulan a 37°C, nos hizo pensar que éstos serían los traducidos preferencialmente durante el choque térmico. Para determinar este

supuesto, decidimos analizar el perfil polisómico de los dos tipos de transcritos *HSP70* (*HSP70-I* y *HSP70-II*) en condiciones normales de crecimiento, y cómo los tratamientos de choque térmico podrían afectar a dichos perfiles. Sorprendentemente, el análisis de los perfiles polisómicos de los dos tipos de transcritos *HSP70* reveló que los ARNm *HSP70-II* no se encuentran unidos a ribosomas funcionales en promastigotes mantenidos a 26°C, aunque este patrón de distribución polisómica cambia drásticamente cuando los parásitos son incubados a temperaturas de choque térmico (Fig. 10E-F). Por el contrario, los ARNm *HSP70-I* aparecen asociados a polisomas tanto a 26 como a 37 y 39°C (Fig. 10C-D). Estos resultados indican que ambos tipos de transcritos *HSP70* contribuyen a la síntesis *de novo* de la proteína HSP70 en respuesta al aumento de temperatura, si bien los mecanismos que operan en cada uno de ellos parecen diferentes. Así, mientras que los transcritos *HSP70-I* se traducirían a todas las temperaturas, los ARNm *HSP70-II* permanecerían silenciados en promastigotes mantenidos a 26°C, y solamente se activarían en respuesta a situaciones de estrés como es el caso del choque térmico, durante el cual se traducirían activamente. Una cuestión que surge en este punto es sobre la contribución de la traducción de cada tipo de transcrito a la síntesis de HSP70 que se produce durante el choque térmico. Una posible respuesta la encontramos en el estudio de la síntesis *de novo* de HSP70 en la línea deficiente *Δhsp70-II*. En esta línea se determinó un aumento de tan solo 2 veces en los niveles de proteína sintetizada durante el tratamiento a 37°C (Fig. 24), que sería atribuido a la traducción de los transcritos *HSP70-I*. Resulta interesante resaltar que la síntesis de HSP70 achacable a la traducción de los ARNm *HSP70-I* a 37°C sería equivalente al aumento en los niveles de sus mensajeros observado a dicha temperatura (Fig. 7). Considerando este hecho, podemos pensar que la tasa de traducción de los transcritos *HSP70-I* está determinada por los niveles relativos de estos mensajeros a 26 y 37°C. Por el contrario, el hecho de que los ARNm *HSP70-II* solamente se localicen en las fracciones polisómicas a temperaturas de choque térmico (Fig. 10E-F), sugiere que el gen *HSP70-II* sería el encargado de garantizar un aporte extra de la proteína en condiciones de estrés térmico que garantice la supervivencia del parásito.

El tratamiento de los promastigotes de *Leishmania* a 37°C conlleva, como ha quedado ampliamente ilustrado en este trabajo, la activación de la respuesta al choque térmico. Sin embargo, 37°C es una temperatura permisiva para el parásito, pues es la temperatura fisiológica de su hospedador mamífero; este hecho explica que la incubación a esta temperatura no afecte sustancialmente a la síntesis global de proteínas con respecto al patrón global observado a 26°C (Fig. 8A y Fig. 9A). Por el contrario, durante la incubación de los promastigotes a 39°C se produce un descenso acusado en la síntesis de proteínas totales (Fig. 9A), indicando que esta temperatura representa un choque térmico severo para el parásito. La respuesta desencadenada por el parásito ante esta situación de choque térmico severo implica también un aumento (alrededor de 2 veces) en los niveles de proteína HSP70 de nueva síntesis a 39°C (Fig. 9B-C). Los resultados que obtuvimos con las diferentes construcciones plasmídicas indican que la síntesis a 39°C de la proteína HSP70 estaría asociada a la traducción preferencial de los transcritos *HSP70-II*. En primer lugar, el análisis de la expresión de la proteína CAT a 39°C puso de manifiesto que mientras en la línea CAT-I apenas se detecta proteína de nueva síntesis a esa temperatura (Fig. 13B-C), en la línea CAT-II los niveles de proteína CAT sintetizada *de novo* durante el tratamiento de choque térmico severo son equiparables a los detectados a 26°C (Fig. 14B-C). Como la única diferencia entre las construcciones que portan ambas líneas radica en la región 3'UTR, cabe concluir que la traducción de los transcritos *CAT* a 39°C en la línea CAT-II es dependiente de la región 3'UTR II. En segundo lugar, cuando se analizó la síntesis *de novo* de la proteína HSP70 en la línea *Δhsp70-II* se observó que la síntesis de la proteína era mínima a 39°C, mientras que en la línea parental BCN los niveles aumentaban alrededor de 2 veces (Fig. 24B-C). Por tanto, se observa nuevamente la existencia de un mecanismo de regulación traduccional ligado a la

expresión del gen *HSP70-II*, cuya función sería la de asegurar el aporte de proteína HSP70 en condiciones de estrés térmico.

La diferencia entre los genes *HSP70-I* y *HSP70-II* en *Leishmania* parece circunscribirse a la región 3'UTR. En consecuencia, sería plausible pensar que fuera la región 3'UTR del gen *HSP70-II* donde se localizaran todos los elementos reguladores implicados en controlar la traducción de los transcritos *HSP70-II*. En *Leishmania*, ya son varios los trabajos en los que se describe la implicación de secuencias localizadas en las regiones 3'UTR en la regulación de la expresión génica. Este tipo de elementos reguladores se han implicado tanto en el control de la estabilidad de los transcritos (Larreta y col., 2004) (Mishra y col., 2003) (Purdy y col., 2005) (Quijada y col., 2000) (Wu y col., 2000), como en el control de la traducción de los mismos (Larreta y col., 2004) (McNicoll y col., 2005) (Zilka y col., 2001). Así, realizamos construcciones plasmídicas basadas en el gen reportero *CAT* flanqueado por las regiones UTR de los genes *HSP70* (pXcat-I y pXcat-II) (Fig. 3), con la finalidad de determinar la implicación de estas regiones en el control traduccional. Sin embargo, los resultados fueron desconcertantes, en ninguna de las líneas de promastigotes transfectadas con estos plásmidos se detectó una traducción preferencial de la proteína CAT cuando los parásitos fueron sometidos a temperaturas de choque térmico (Figs. 13 y 14). Además, cuando se analizó el perfil polisómico de los transcritos *CAT*, los ARNm *CAT-II* mostraron un comportamiento inesperado: en contra del perfil observado para los transcritos *HSP70-II* a 26°C, los transcritos *CAT-II* se encuentran asociados a ribosomas a esta temperatura (Fig. 16A-B). Este dato, sin embargo, está de acuerdo y explica la existencia de una síntesis activa de la proteína CAT a 26°C (Fig. 14). Estos resultados admiten dos posibles explicaciones: i) la región codificante del gen *CAT* contiene en su secuencia algún elemento dominante que dirige la unión de los transcritos a ribosomas a 26°C; ii) la región codificante de los genes *HSP70* es también necesaria para el silenciamiento traduccional de los mensajeros *HSP70-II* a 26°C. En relación con la primera posibilidad, se ha descrito en *L. tarentolae* que la eficiencia traduccional asociada al triplete anterior al codón de iniciación de un mensajero es afectada por la secuencia codificante del gen reportero empleado (Lukes y col., 2006). En cuanto a la segunda posibilidad, ha sido descrita la implicación de regiones codificantes en la regulación de algunos genes de tripanosomátidos (Schurch y col., 1997) (Weston y col., 1999). Los ensayos realizados con las construcciones plasmídicas pHAHSP70-II (Fig. 4), que incorporan además de las regiones UTR la región codificante *HSP70*, pueden considerarse como un apoyo a la segunda hipótesis; es decir, la región codificante *HSP70* es necesaria para la adecuada regulación traduccional de los transcritos *HSP70-II* durante el choque térmico. El ARNm quimérico *HAHSP70-II* prácticamente no se asocia a ribosomas funcionales a 26°C, mientras que a 37 y 39°C su perfil polisómico indica que estos transcritos están siendo traducidos de forma activa (Fig. 20A-B). Además, y en consonancia con los perfiles obtenidos, la proteína HAHSP70 se traduce de forma preferencial a 37°C, aumentando sus niveles de síntesis en unas 3 veces con respecto a los niveles detectados a 26°C (Fig. 19B-C).

Aunque los datos obtenidos con la construcción pHAHSP70-II sugerían una implicación de la región codificante del gen *HSP70* en la regulación traduccional de los transcritos *HSP70-II*, el estudio de la línea mutante $\Delta hsp70-II$ ha puesto de manifiesto que el papel de la región codificante puede ser secundario. En la línea $\Delta hsp70-II$, las regiones codificantes de las dos copias del gen *HSP70-II* fueron sustituidas por las regiones codificantes de los genes *NEO* e *HYG*. Como resultado, esta línea posee genes quiméricos constituidos por las regiones codificantes de los genes de resistencia, manteniendo las regiones reguladoras, y el mismo contexto cromosomal de los genes *HSP70-II*. Cuando analizamos la distribución polisomal de los transcritos quiméricos *NEO* e *HYG*, constatamos que esta variaba de forma dependiente de temperatura con un comportamiento similar al de

los transcritos *HSP70-II* en la línea parental de *L. infantum* (Fig. 27). En conclusión, estos experimentos sugieren que los elementos responsables de la regulación traduccional del gen *HSP70-II* van a estar localizados en la región 3'UTR. Por otro lado, estos estudios han puesto de manifiesto que las secuencias incorporadas por los genes reporteros pueden afectar el comportamiento de la expresión de las construcciones finales, y que los resultados derivados de su empleo deben ser tomados con cierta cautela.

A modo de resumen, en la figura 42 se ilustra el modelo de regulación de los genes *HSP70* de *L. infantum*, basado en los datos de la literatura y en los resultados recogidos en este trabajo. De acuerdo con este modelo, una parte de los ARNm derivados de los genes *HSP70-I* de promastigotes de *L. infantum* mantenidos a 26°C (Fig. 42, panel superior), se asocian a los ribosomas para ser traducidos y producir la proteína HSP70, mientras que otra parte van a ser degradados por la acción de una nucleasa específica (Quijada y col., 1997a). El choque térmico, experimentado por los promastigotes cuando son incubados a la temperatura de 37°C, provoca la inactivación de la nucleasa específica con la consiguiente acumulación de los mensajeros *HSP70-I*; esta acumulación supone que a 37°C existe un mayor número de ARNm *HSP70-I* disponibles para asociarse con la maquinaria de traducción de la célula, aumentando los niveles de proteína HSP70 sintetizada durante el choque térmico de forma directa al aumento en los niveles de los mensajeros *HSP70-I*. Por el contrario, los ARNm *HSP70-II* a 26°C, siendo más abundantes que los mensajeros *HSP70-I* (Quijada y col., 1997a), se encuentran traduccionalmente silenciados (Fig. 42, panel inferior). Posiblemente, este silenciamiento es producido por un represor traduccional que se uniría a la región 3'UTR-II con el fin de impedir su asociación con los ribosomas. En cambio, durante el choque térmico los ARNm *HSP70-II*, liberados del represor traduccional, se unen al aparato traduccional con el objetivo de aportar una cantidad extra de proteína HSP70 que garantice la supervivencia del parásito.

Según los modelos propuestos, la regulación traduccional desempeñaría un papel fundamental en la regulación de la expresión de la proteína HSP70 durante el choque térmico. Este nivel de regulación constituye un mecanismo rápido de respuesta a diferentes estímulos y condiciones ambientales (Mazumder y col., 2003), que en tripanosomátidos adquiere una mayor importancia debido a la ausencia de control transcripcional (Campbell y col., 2003). Los mecanismos de regulación traduccional han sido implicados en la regulación de algunos genes de *Leishmania*, como es el caso de los genes de la amastina de *L. infantum* (McNicoll y col., 2005), o los genes *HSP83* de *L. amazonensis* y *L. infantum* (Larreta y col., 2004) (Zilka y col., 2001).

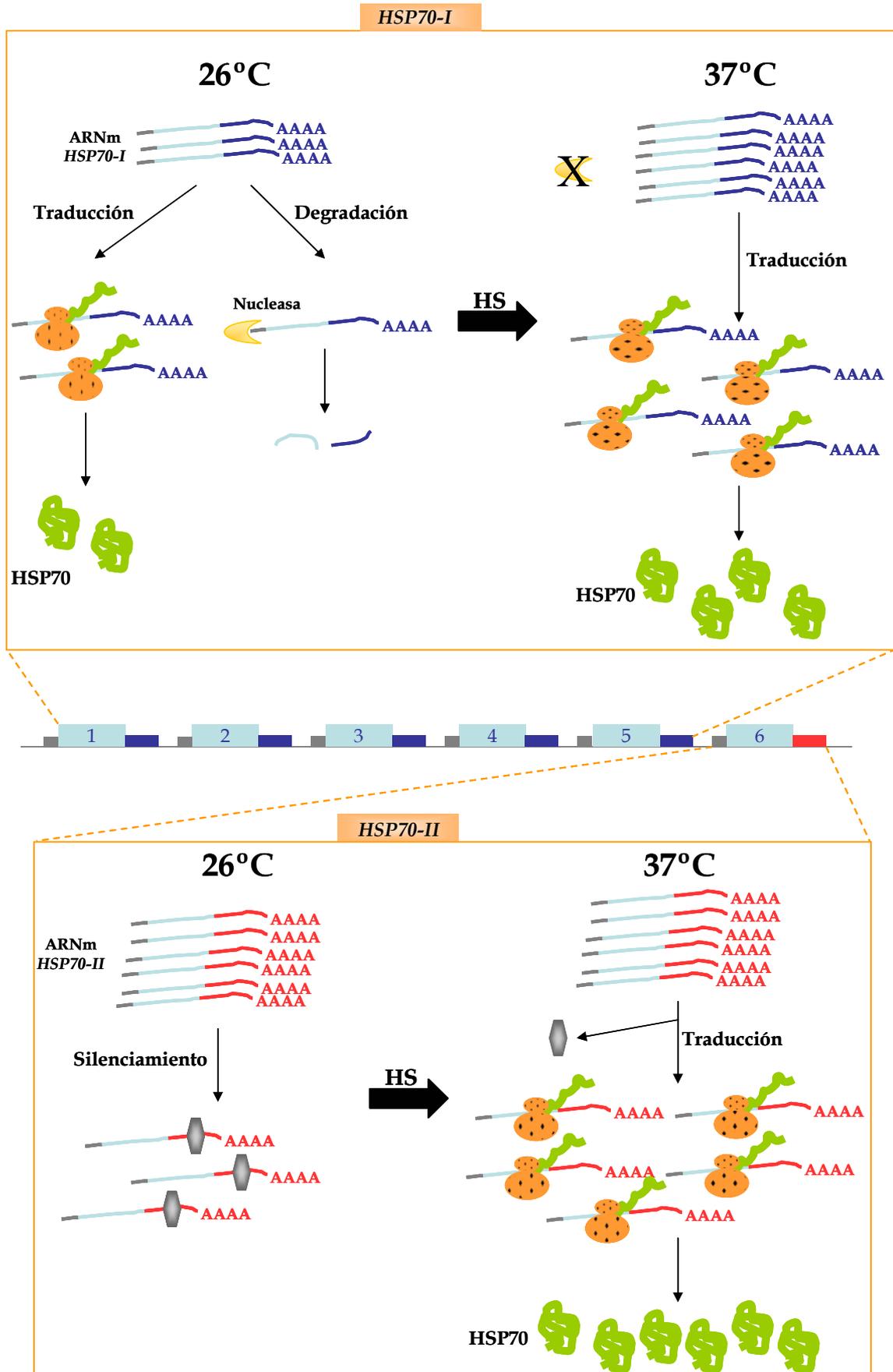


Figura 42. Modelo de regulación de los genes *HSP70* de *L. infantum*.

Globalmente, los resultados obtenidos con las diferentes construcciones plasmídicas indican que en las regiones 3'UTR de los genes *HSP70* se localizarían los elementos de secuencia responsables de la regulación de los mismos. La delimitación de los elementos en *cis* responsables de esta regulación constituye una de las principales dificultades en tripanosomátidos, ya que en la mayoría de trabajos donde se describen estos estudios se han implicado grandes regiones con una enorme complejidad de interacciones (Boucher y col., 2002) (Furger y col., 1997) (Mishra y col., 2003) (Myung y col., 2002) (Quijada y col., 2000) (Zilka y col., 2001). En *L. infantum*, por ejemplo, se ha determinado la implicación de diferentes elementos de secuencia de la región 3'UTR de los genes homólogos de la amastina de *T. cruzi* en la regulación de estos genes durante el proceso de diferenciación promastigote-amastigote a diferentes niveles: control de la estabilidad de los transcritos y regulación traduccional (McNicoll y col., 2005). Esta complejidad de secuencias implicadas en la regulación de un mismo gen podría estar también presente en el gen *HSP70-II* de *L. infantum*, con la existencia en su región 3'UTR de diferentes elementos que controlarían por un lado su silenciamiento a 26°C, y por otro lado su elevada eficiencia de traducción a temperaturas de choque térmico. El estudio de la conservación de esta región en distintas especies de *Leishmania* podría indicar posibles bloques de secuencia donde se localizarían los elementos reguladores.

Los cambios en la localización subcelular de los ARNm constituye otro mecanismo de regulación de la expresión génica en el que resulta difícil definir las secuencias señal implicadas, ya que a menudo están compuestas por varios motivos (Kloc y col., 2002) (Van de Bor y Davis, 2004). La razón de esta complejidad es debida al hecho de que los factores que interpretan y ejecutan estas señales son diferentes durante la vida de un determinado ARNm, lo que permite la selección de numerosos destinos dentro de la célula. La localización celular del ARN es un mecanismo ampliamente extendido que parece operar tanto en organismos unicelulares como en diferentes tejidos vegetales y animales, así como durante el desarrollo embrionario en una gran variedad de animales (Kloc y col., 2002). Incluso existen numerosas evidencias que relacionan los procesos de localización del ARNm con los mecanismos de regulación traduccional (Kloc y col., 2002). Teniendo en cuenta estas consideraciones, pensamos interesante analizar la posibilidad de que la regulación del gen *HSP70-II* de *L. infantum* pudiera estar mediada por un mecanismo basado en cambios en la localización subcelular de sus transcritos.

5.2. El gen *HSP70-II* de *L. infantum* y su importancia en diferentes procesos biológicos del parásito

En este trabajo hemos demostrado la importancia del gen *HSP70-II* de *L. infantum* en la expresión de la proteína HSP70 durante el choque térmico: este gen regula su expresión a nivel traduccional, posiblemente para garantizar un aporte extra de la proteína en situaciones en las que los promastigotes son sometidos a condiciones de estrés como es el caso del aumento de temperatura. La obtención de una línea de *Leishmania* deficiente para este gen nos proporcionó una valiosa herramienta con la que determinar la implicación del gen *HSP70-II* de *L. infantum* en diversos aspectos relacionados con la biología del parásito. La creación de líneas deficientes en *Leishmania* presenta dos dificultades fundamentales. En primer lugar, *Leishmania* es un organismo esencialmente diploide con un gran número de genes que presentan varias copias, lo que supone un serio obstáculo a la hora de obtener un mutante nulo. En segundo lugar, el genoma de *Leishmania* posee una elevada plasticidad que le permite evitar la delección de genes esenciales alterando el número de copias de éstos, bien mediante mecanismos de amplificación génica, o bien mediante cambios en la ploidía. Así por ejemplo, en *L. major* los intentos de generar una línea deficiente para el gen *CRK1* dan lugar a la aparición de mutantes triploides o tetraploides (Mottram y col., 1996); de forma similar, los intentos de delección del gen de copia única *LmjF01.0750* presente en el cromosoma 1 de *L. major* conducen a la aparición de parásitos mutantes triploides para este cromosoma (Martinez-Calvillo y col., 2005). En el caso del gen *HSP70-II*, los estudios realizados hasta el momento habían mostrado que su expresión a nivel de proteína es prácticamente inexistente cuando los promastigotes son incubados a la temperatura normal de crecimiento, lo que sugería que podría no ser un gen esencial a 26°C; esto fue demostrado tras la obtención de la línea deficiente *Δhsp70-II* (Fig. 22). En la literatura existen numerosos trabajos en los que se han caracterizado otras líneas de *Leishmania* deficientes para diversos genes, que han aportado una valiosa información con la que se ha podido ir conociendo la función de los mismos, como es el caso del gen *HSP100* de *L. major* (Hubel y col., 1997).

La familia HSP70 comprende un conjunto de proteínas de expresión inducible y constitutiva muy abundantes en las células, que se expresan en una amplia variedad de condiciones fisiológicas (Lindquist y Craig, 1988). Su expresión resulta esencial para el correcto crecimiento de las células tanto a elevadas temperaturas como a la temperatura habitual de crecimiento (Lindquist, 1986). Su característica más importante radica en el hecho de que su presencia ha sido relacionada en numerosos organismos con el desarrollo de mecanismos de termotolerancia que garantizan la supervivencia en condiciones de estrés térmico gracias a su actividad como chaperona molecular (Hendrick y Hartl, 1993). Por este motivo, la expresión de la proteína constituye un proceso altamente regulado por las células, habiéndose descrito que su presencia se requiere en cantidades muy precisas en cada momento para asegurar el correcto funcionamiento de la célula. En *Drosophila*, por ejemplo, se ha demostrado que la inducción de su expresión en condiciones en que no se requiere su presencia acelera la muerte celular (Feder y col., 1992), mientras que en *M. tuberculosis* la sobreexpresión de la proteína reduce claramente la supervivencia de la bacteria durante la fase crónica de la infección (Stewart y col., 2001). Por otro lado, la creación de una línea de *D. melanogaster* en la que se mantienen los genes *HSC70* (de expresión constitutiva), pero se han delecionado los 6 genes *HSP70* (de expresión inducible) da lugar a moscas que son perfectamente viables y fértiles (Gong y Golic, 2004), aunque la pérdida de los genes *HSP70* reduce la resistencia de las moscas a temperaturas de choque térmico severo (Gong y Golic, 2006), indicando que la expresión de estos genes es importante en condiciones de choque térmico. Finalmente, en *S. cerevisiae* la creación de diferentes líneas celulares mutantes para

los distintos genes que codifican para la proteína HSP70 inducible (*SSA1-4*), pusieron de manifiesto que la ausencia de estos genes afecta al crecimiento de las células cuando son incubadas a 35°C, y que la delección de los genes *SSA1*, *SSA2* y *SSA4* da lugar a células inviables (Werner-Washburne y col., 1987).

En este trabajo se ha determinado que los promastigotes deficientes para el gen *HSP70-II* de *L. infantum* presentan un crecimiento más lento en cultivo que la cepa parental BCN, junto con un claro descenso en la viabilidad de los mismos cuando se alcanza la fase estacionaria (Figs. 28 y 29). La densidad celular máxima alcanzada por los promastigotes de la línea Δ *hsp70-II* resultó ser la mitad de la alcanzada por los parásitos de la cepa BCN (Fig. 28), indicando que la falta del gen *HSP70-II* provoca una pérdida de viabilidad durante la fase estacionaria de crecimiento. Durante el crecimiento en cultivo de los promastigotes de *Leishmania* se reproduce de forma artificial el proceso de la metaciclogénesis por el cual las formas procíclicas altamente replicativas presentes durante la fase logarítmica dan lugar a los promastigotes metacíclicos no replicativos característicos de la fase estacionaria (Sacks y Perkins, 1984). La pérdida de viabilidad durante la fase estacionaria de los promastigotes Δ *hsp70-II* podría estar indicando un papel del gen *HSP70-II* en la metaciclogénesis, por lo que sería de gran interés el determinar si los promastigotes deficientes en el gen *HSP70-II* expresan marcadores característicos de los promastigotes metacíclicos (Saraiva y col., 2005). Alteraciones similares en la tasa de crecimiento de los parásitos han sido observadas en otras líneas de *Leishmania* mutantes. En *L. mexicana*, por ejemplo, la delección del gen *GDP-MP*, que codifica para una pirofosforilasa, provoca un retardo en el crecimiento de los promastigotes deficientes con respecto a la línea parental; además, a partir del noveno día de cultivo se produce un descenso del 50% en el número de parásitos presentes en el cultivo (Stewart y col., 2005). Por otro lado, los promastigotes de *L. major* deficientes para el gen *DAT*, que codifica para la enzima dihidroxiacetona fosfato acetiltransferasa, crecen un 45-50% menos que la cepa salvaje, presentando un descenso drástico en el número de células una vez han alcanzado la fase estacionaria de crecimiento (Zufferey y Ben Mamoun, 2006).

El aumento del porcentaje de formas en la fase G2/M del ciclo celular que se observa en la línea mutante Δ *hsp70-II* (Fig. 30), podría ser una explicación a los defectos en la tasa de crecimiento de estos parásitos, al tiempo que implica al gen *HSP70-II* en la progresión del ciclo celular. La implicación de otras proteínas de *Leishmania* en ciclo celular, como la proteína quinasa CRK3 de *L. mexicana* (Hassan y col., 2001) o la proteína homóloga a la centrina de *L. donovani* (Selvapandiyam y col., 2004), ha sido descrita mediante el empleo de líneas deficientes. También existen trabajos en los que se describe la importancia de las proteínas de choque térmico en el ciclo celular. En concreto, se ha visto, en *L. donovani*, que la inactivación de la proteína HSP90, mediante el uso de inhibidores específicos, provoca una parada de las células en fase G2/M (Wiesgigl y Clos, 2001). En este sentido, existen numerosas evidencias que apoyan una conexión entre las chaperonas moleculares y los componentes del citoesqueleto (Liang y MacRae, 1997). En el caso de la proteína HSP70 se ha demostrado su asociación al centrosoma en diferentes especies, si bien no se ha podido determinar su papel. Por otro lado, en *S. cerevisiae* existen estudios que demuestran que la pérdida de actividad de la proteína SSA1 (proteína homóloga a la HSP70) produce alteraciones en la distribución nuclear durante la división celular y la formación de microtúbulos aberrantes durante la fase M (Oka y col., 1998). En este sentido, teniendo en cuenta nuestros datos experimentales que indican que es necesaria la expresión del gen *HSP70-II* para una progresión adecuada a través de la fase G2/M del ciclo, se podría sugerir una implicación de la proteína HSP70 en los procesos de formación de microtúbulos y citocinesis también en *Leishmania*.

Los defectos detectados en los promastigotes *Δhsp70-II* son una demostración de que el gen *HSP70-II* debe expresarse en determinados momentos durante el crecimiento de los parásitos a 26°C. En nuestros ensayos de distribución polisómica, el nivel de ARNm *HSP70-II* asociados a ribosomas funcionales a la temperatura de crecimiento normal es prácticamente indetectable. La explicación a este hecho habría que encontrarla en que la expresión del gen *HSP70-II* se restrinja a momentos puntuales del ciclo celular, y ésta, en consecuencia, pase desapercibida en los cultivos asincrónicos que hemos empleado. Así, resultaría de gran interés conseguir cultivos sincronizados de promastigotes o detenerlos en distintas fases del ciclo celular, mediante el uso de inhibidores específicos, para determinar el nivel de expresión del gen *HSP70-II* en distintos puntos del ciclo.

Por otra parte, la elevada expresión del gen *HSP70-II* durante el tratamiento de choque térmico de los promastigotes (Fig. 10E-F) puede tomarse como una implicación de este gen en el proceso de diferenciación hacia la forma amastigote y, en consecuencia, en la virulencia o capacidad de infección del parásito. La creación de líneas de *Leishmania* deficientes constituye una de las herramientas más empleadas para determinar el papel de diferentes genes en la virulencia del parásito (Kelly y col., 2003) (Papadopoulou y col., 2002) (Selvapandiyan y col., 2004) (Spath y col., 2003) (Stewart y col., 2005) (Vergnes y col., 2005). Nuestros estudios de infección *in vitro* de células U937 con la línea *Δhsp70-II* indican que los promastigotes deficientes no han perdido la capacidad para interactuar con su célula hospedadora ni para diferenciarse como amastigotes en el interior de su célula huésped, pues no encontramos grandes diferencias en relación con los parásitos de la cepa parental (Figs. 33 y 34). Sin embargo, la falta del gen *HSP70-II* sí afecta a la capacidad replicativa de los amastigotes dentro de las células (Fig. 34). A pesar de que no se han realizado análisis de ciclo celular en los amastigotes deficientes para el gen *HSP70-II*, el defecto observado en la capacidad replicativa de estos parásitos en el interior de las células es una evidencia más de la importancia del gen *HSP70-II* de *L. infantum* en la progresión del ciclo celular y de la división celular. La importancia de otros genes de *Leishmania* en la capacidad de división de los amastigotes intracelulares también ha sido reportada. Así, en *L. infantum* el reemplazamiento de uno de los alelos *SIR2*, que codifica para una proteína con actividad deacetilasa, no afecta a la capacidad invasora de estos parásitos, aunque sí a su proliferación en el interior de los macrófagos (Vergnes y col., 2005). En otros casos, la ausencia de un determinado gen afecta no solo a la capacidad de interacción con la célula hospedadora sino también a su supervivencia en el interior de la misma (Besteiro y col., 2004) (Stewart y col., 2005).

Sin embargo, el defecto más evidente asociado a la falta del gen *HSP70-II* es la tremenda pérdida de infectividad *in vivo*. En los estudios de infección en el modelo animal BALB/c (Fig. 35), encontramos que solamente dos de los seis ratones infectados con los promastigotes estacionarios deficientes para el gen *HSP70-II* presentaban cargas parasitarias detectables en bazo. Este resultado demuestra que el gen *HSP70-II* es determinante para el establecimiento de la infección en el modelo ratón. Además, basándonos en los resultados anteriores, el descenso drástico en la capacidad infectiva de los parásitos de la línea *Δhsp70-II* podría ser debido a dos factores. Por un lado, la menor capacidad infectiva puede deberse a fallos en el proceso de metaciclologénesis; las curvas de crecimiento indican que durante la fase estacionaria se produce un descenso en la viabilidad de los promastigotes (Fig. 28), y es en este momento cuando se produce la metaciclologénesis. La metaciclologénesis es un proceso que pre-adapta al parásito para su transmisión al hospedador y le confiere resistencia a la lisis por complemento (Handman, 1999). Por otro lado, los defectos en la capacidad proliferativa de los amastigotes *Δhsp70-II* (Fig. 34) en el interior de las células, limitaría la propagación de la infección en el ratón. En resumen, la caracterización de la línea *Δhsp70-II* ha puesto de

manifiesto la implicación del gen *HSP70-II* de *L. infantum* en diferentes procesos que tienen que ver con la biología del parásito, como son la división celular y la virulencia.

5.3. Organización del locus *HSP70* en *Leishmania*

Tras estudiar los mecanismos de regulación que determinan la expresión de los genes *HSP70* de *L. infantum* durante el choque térmico y profundizar en el estudio de la función e importancia de los genes *HSP70-II*, consideramos que era un momento adecuado para conocer el grado de conservación de estos mecanismos entre las especies del género *Leishmania*. Nuestro trabajo se inició con la caracterización del locus *HSP70* en diferentes especies de *Leishmania*, determinándose la organización de los genes *HSP70* en el genoma de las especies *L. major*, *L. tropica*, *L. amazonensis*, *L. mexicana* y *L. braziliensis* (Figs. 37, 38 y 39). Los resultados obtenidos indican que existe una tremenda conservación en la organización del locus *HSP70* en las diferentes especies analizadas, con la excepción de *L. braziliensis*. En la mayoría de las especies de *Leishmania* se ha determinado la presencia en el locus *HSP70* de dos tipos de genes *HSP70*, homólogos a los descritos para *L. infantum*. Así, el locus está constituido por 5-6 copias de los genes *HSP70-I*, y una copia del gen *HSP70-II* localizada en el extremo 3' del locus (Figs. 37 y 38). A pesar del elevado grado de conservación, polimorfismos en las dianas de restricción permiten diferenciar claramente las especies de *Leishmania* del Viejo y del Nuevo Mundo. Así, el locus *HSP70* en las especies del Viejo Mundo, *L. infantum*, *L. major* y *L. tropica*, presenta la misma estructura, quedando las unidades de repetición génica del mismo definidas por la posición de las dianas para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sal*I (Fig. 37). Por el contrario, en las especies de *Leishmania* del Nuevo Mundo, *L. amazonensis* y *L. mexicana*, solamente existe una diana *Bam*HI en el locus *HSP70*, localizada en la región 3'UTR-II; la diana *Sal*I situada al final de la región codificante se encuentra conservada, aunque en estas especies existe una diana *Sal*I adicional localizada en la región codificante (Fig. 38). En el caso de *L. braziliensis*, nuestros datos y los publicados previamente (Zurita y col., 2003) no son suficientes para determinar la organización genómica de los genes *HSP70*. Serían necesarios estudios adicionales con clones genómicos para definir su disposición. Sin embargo, nuestros estudios de *Southern blot* demuestran que en esta especie no existen los genes *HSP70-II* (Fig. 39), lo que diferencia claramente la estructura del locus *HSP70* de *L. braziliensis* del resto de especies de *Leishmania* analizadas.

Por tanto, y de acuerdo a la organización genómica de los genes *HSP70*, las especies de *Leishmania* analizadas en este trabajo pueden ser divididas en tres grupos diferentes. En el primero de los grupos se englobaría a las especies del subgénero *Leishmania* del Viejo Mundo *L. infantum*, *L. major* y *L. tropica*. El segundo incluiría a *L. amazonensis* y *L. mexicana*, representantes de las especies del subgénero *Leishmania* del Nuevo Mundo. Por último, tendríamos la especie *L. braziliensis* perteneciente al subgénero *Viannia*, donde se encontraría la organización más divergente del locus *HSP70*. Para completar este último grupo, sería necesario estudiar la organización de los genes *HSP70* en otras especies del subgénero *Viannia*, con el fin de determinar si la organización observada en *L. braziliensis* se encuentra conservada en otras especies del mismo subgénero. A pesar de esto, la agrupación de las distintas especies de *Leishmania* analizadas en base a la organización de los genes *HSP70* es muy similar a la encontrada tras analizar en diferentes aislados de *Leishmania* la organización de los genes del mini-exón (Fernandes y col., 1994), la secuencia de los genes que codifican para la ADN y ARN polimerasas (Croan y col., 1997), y el cariotipo cromosómico (Britto y col., 1998). En todos estos estudios, el complejo *L. (V) braziliensis* representa a las especies de *Leishmania* que divergieron de forma más temprana en la evolución dentro del género

Leishmania. Este hecho está en concordancia con las teorías actuales acerca del origen y evolución del género *Leishmania* (Momen y Cupolillo, 2000).

Dada la reciente publicación de la secuencia completa del genoma de *L. major* (Ivens y col., 2005), y la disponibilidad de toda la información en el sitio de Internet GeneDB (<http://www.genedb.org/>, (Aslett y col., 2005)) era obligado realizar un estudio bioinformático del locus *HSP70* sobre las secuencias publicadas del proyecto genoma de *L. major*. Los resultados obtenidos indican que el locus *HSP70* en *L. major* se encuentra localizado en el cromosoma 28, e incluye dos genes *HSP70*. La organización genómica es coincidente con la que hemos determinado en este trabajo mediante ensayos de *Southern blot* (Fig. 37B), en cuanto que existen los dos tipos de genes *HSP70*, *HSP70-I* y *HSP70-II*, y que tienen la misma disposición. Los genes *HSP70-I* y *HSP70-II* de *L. major* se corresponden a los genes con nombre sistemático LmjF28.2780 y LmjF28.2770, respectivamente. Sin embargo, existe una diferencia manifiesta entre nuestros resultados y los datos anotados del genoma de *L. major*, y es en relación con el número de copias de los genes *HSP70-I*. Nuestros estudios indican la presencia de 5 genes *HSP70-I* en el locus *HSP70* de *L. major* (Fig. 37B y D), lo que además está en consonancia con otro trabajo publicado previamente en el que se describía la existencia de cuatro genes *HSP70* organizados en tándem (Lee y col., 1988). El análisis de secuencia de estos genes reveló que presentaban una región 3'UTR homóloga a la de los genes *HSP70-I* de *L. infantum* (Quijada y col., 1997a). Esta discrepancia acerca del número de genes *HSP70-I* podría deberse a una subestimación del número de copias como consecuencia del colapso provocado por la presencia de múltiples copias de un mismo gen organizadas en tándem durante el ensamblaje de las secuencias, siendo éste un problema frecuentemente asociado a regiones del genoma donde se encuentran genes repetidos en tándem (El-Sayed y col., 2005). Es muy probable por tanto que en el futuro se reporten discrepancias similares a ésta durante el estudio de otros genes organizados en tándem. En efecto, en una publicación reciente, al estudiarse la organización genómica de los genes que codifican para las enzimas fosfodiesterasas de *L. major*, se ha puesto de manifiesto una discrepancia en cuanto al número de copias con la encontrada en el banco de datos GeneDB (Johner y col., 2006).

Cuando se analizó la expresión de los genes *HSP70* en las distintas especies del parásito, también se encontraron diferencias entre aquellas pertenecientes al subgénero *Leishmania* y *L. braziliensis* (Fig. 40), poniendo en evidencia la existencia de diferentes mecanismos de regulación entre las especies de *Leishmania*. Así, nuestros datos muestran que los transcritos *HSP70-I* de *L. major* y *L. amazonensis* aumentan sus niveles en respuesta al aumento de temperatura (Fig. 40A-B, panel 3'UTR-I), a diferencia de lo que ocurre en *L. braziliensis*, donde los niveles de los ARNm *HSP70-I* se mantienen constantes a 26 y 37°C (Fig. 40C, panel 3'UTR-I). El carácter inducible de los genes *HSP70-I* había sido descrito anteriormente en *L. major* (Lee y col., 1988), y en *L. infantum* (Quijada y col., 1997a). Puesto que en *Leishmania* la regulación de la expresión de los genes *HSP70* ocurre a nivel postranscripcional, nuestros resultados sugieren que en *L. braziliensis* no existe un mecanismo de estabilización de los transcritos *HSP70-I* dependiente de la temperatura, análogo al descrito para otras especies del género *Leishmania* (Quijada y col., 1997a). En cuanto a los genes *HSP70-II*, el análisis de su expresión reveló que tanto en *L. major* (Fig. 40A, panel 3'UTR-II), como en *L. amazonensis* (Fig. 40B, panel 3'UTR-II) no se producen variaciones en los niveles de sus mensajeros durante el tratamiento de choque térmico. En *L. braziliensis*, a pesar de la ausencia de genes *HSP70-II* los ensayos de *Northern blot* pusieron de manifiesto la existencia de dos bandas de tamaño similar cuando los filtros fueron hibridados con una sonda frente a la región codificante de los genes *HSP70* de *L. infantum*. Una de las bandas detectadas corresponde al mensajero *HSP70-I*, mientras que la segunda

apuntaría a la existencia en esta especie de otro tipo de genes *HSP70*, con una región 3'UTR divergente a las regiones 3'UTR-I y 3'UTR-II de *L. infantum*.

A pesar de la ausencia de los genes *HSP70-II* y de la expresión constitutiva de los genes *HSP70-I* durante el choque térmico en *L. braziliensis* (Fig. 40), cuando se analizó la expresión de la proteína HSP70 durante el tratamiento de los promastigotes a distintas temperaturas, se observó que los transcritos *HSP70* de *L. braziliensis* son capaces de traducirse de forma preferencial durante el choque térmico, de un modo similar al encontrado en otras especies de *Leishmania* (Fig. 41). En resumen, consideramos que sería interesante seguir estudiando la organización de los genes *HSP70* en *L. braziliensis*, así como los mecanismos que regulan su expresión durante el choque térmico. En este objetivo va a ser de gran utilidad la información derivada del proyecto de secuenciación del genoma de esta especie que se está llevando a cabo en la actualidad (Laurentino y col., 2004).

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. La proteína HSP70 de *L. infantum* se traduce activamente durante el tratamiento de los promastigotes a temperaturas de choque térmico, con un aumento en sus niveles de 4-5 veces, máximo que se detecta tras 1 h de tratamiento a 37°C, con respecto a los niveles detectados a 26°C. A 39°C el incremento en la síntesis *de novo* de la proteína es de unas 2 veces.
2. A la temperatura de crecimiento habitual de los promastigotes (26°C) solamente los transcritos *HSP70-I* se encuentran asociados con el aparato traduccional del parásito. Los ARNm *HSP70-II* permanecen traduccionalmente inactivos, o silenciados, a 26°C.
3. Tanto los mensajeros *HSP70-I* como los *HSP70-II* se traducen activamente en promastigotes sometidos a condiciones de choque térmico, contribuyendo al aumento en la síntesis de la proteína HSP70. Así, los transcritos *HSP70-II* se almacenan en la célula con la finalidad de ser traducidos en momentos en los que se necesita un aporte extra de proteína HSP70.
4. Los elementos reguladores responsables del control traduccional de los genes *HSP70* se localizan en las regiones 3'UTR de los mismos. Además, la región 3'UTR-II es capaz de sostener la traducción del ARNm que la porta en condiciones de choque térmico severo.
5. El gen *HSP70-II* de *L. infantum* está implicado en numerosos procesos celulares y, su falta, es causa de diversas anomalías en promastigotes. En los cultivos se observa una gran heterogeneidad de formas y un retraso global en el crecimiento, con un descenso en su viabilidad durante la fase estacionaria. Asimismo, se observa un incremento de formas en la fase G2/M del ciclo celular.
6. La falta del gen *HSP70-II* de *L. infantum* tiene un efecto significativo sobre la capacidad infectiva del parásito, lo que se ha puesto de manifiesto en ensayos *in vitro* y, sobre todo, en ensayos de infección en ratón.
7. El locus *HSP70* se encuentra muy conservado en el género *Leishmania*, donde se ha demostrado la existencia de genes del tipo *HSP70-I* y *HSP70-II* en todas las especies estudiadas, con la excepción de *L. braziliensis* donde solamente se ha podido probar la existencia de genes *HSP70-I*. El polimorfismo asociado a la posición de las dianas *Bam*HI en el locus *HSP70*, permite distinguir entre las especies del subgénero *Leishmania* localizadas en el Nuevo y el Viejo Mundo.
8. En todas las especies de *Leishmania* analizadas los transcritos *HSP70-I* experimentan una acumulación en respuesta al aumento de temperatura, salvo en *L. braziliensis* donde sus niveles se mantienen constantes independientemente de la temperatura. Esto apunta a diferencias en los mecanismos de regulación, pues, a pesar de las diferencias encontradas en la acumulación de los ARNm *HSP70-I*, en todas las especies de *Leishmania* estudiadas la proteína HSP70 se traduce de forma más activa durante el choque térmico.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agabian, N.** (1990). Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell* 61, 1157-1160.
- Alexander, J., Satoskar, A. R. y Russell, D. G.** (1999). *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci* 112 Pt 18, 2993-3002.
- Alvar, J., Cañavate, C., Gutierrez-Solar, B., Jimenez, M., Laguna, F., Lopez-Velez, R., Molina, R. y Moreno, J.** (1997). *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev* 10, 298-319.
- Alvar, J., Croft, S. y Olliaro, P.** (2006). Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Adv Parasitol* 61, 223-274.
- Aly, R., Argaman, M., Halman, S. y Shapira, M.** (1994). A regulatory role for the 5' and 3' untranslated regions in differential expression of hsp83 in *Leishmania*. *Nucleic Acids Res* 22, 2922-2929.
- Angel, S. O., Requena, J. M., Soto, M., Criado, D. y Alonso, C.** (1996). During canine leishmaniasis a protein belonging to the 83-kDa heat- shock protein family elicits a strong humoral response. *Acta Trop* 62, 45-56.
- Arava, Y., Boas, F. E., Brown, P. O. y Herschlag, D.** (2005). Dissecting eukaryotic translation and its control by ribosome density mapping. *Nucleic Acids Res* 33, 2421-2432.
- Argaman, M., Aly, R. y Shapira, M.** (1994). Expression of heat shock protein 83 in *Leishmania* is regulated post-transcriptionally. *Mol Biochem Parasitol* 64, 95-110.
- Ashford, R. W.** (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 30, 1269-1281.
- Aslett, M., Mooney, P., Adlem, E., Berriman, M., Berry, A., Hertz-Fowler, C., Ivens, A. C., Kerhornou, A., Parkhill, J., Peacock, C. S., Wood, V., Rajandream, M. A., Barrell, B. y Tivey, A.** (2005). Integration of tools and resources for display and analysis of genomic data for protozoan parasites. *Int J Parasitol* 35, 481-493.
- Bates, E. J., Knuepfer, E. y Smith, D. F.** (2000). Poly(A)-binding protein I of *Leishmania*: functional analysis and localisation in trypanosomatid parasites. *Nucleic Acids Res* 28, 1211-1220.
- Bates, P. A. y Rogers, M. E.** (2004). New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr Mol Med* 4, 601-609.
- Beetham, J. K., Myung, K. S., McCoy, J. J., Wilson, M. E. y Donelson, J. E.** (1997). Glycoprotein 46 mRNA abundance is post-transcriptionally regulated during development of *Leishmania chagasi* promastigotes to an infectious form. *J Biol Chem* 272, 17360-17366.
- Bellatin, J. A., Murray, A. S., Zhao, M. y McMaster, W. R.** (2002). *Leishmania mexicana*: identification of genes that are preferentially expressed in amastigotes. *Exp Parasitol* 100, 44-53.

- Besteiro, S., Coombs, G. H. y Mottram, J. C.** (2004). A potential role for ICP, a Leishmanial inhibitor of cysteine peptidases, in the interaction between host and parasite. *Mol Microbiol* 54, 1224-1236.
- Beverley, S. M.** (1991). Gene amplification in *Leishmania*. *Annu Rev Microbiol* 45, 417-444.
- Bock, J. H. y Langer, P. J.** (1993). Sequence and genomic organization of the hsp70 genes of *Leishmania amazonensis*. *Mol Biochem Parasitol* 62, 187-197.
- Boucher, N., Wu, Y., Dumas, C., Dube, M., Sereno, D., Breton, M. y Papadopoulou, B.** (2002). A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element. *J Biol Chem* 277, 19511-19520.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brandau, S., Dresel, A. y Clos, J.** (1995). High constitutive levels of heat-shock proteins in human-pathogenic parasites of the genus *Leishmania*. *Biochem J* 310 (Pt 1), 225-232.
- Brittingham, A. y Mosser, D. M.** (1996). Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. *Parasitol Today* 12, 444-447.
- Britto, C., Ravel, C., Bastien, P., Blaineau, C., Pages, M., Dedet, J. P. y Wincker, P.** (1998). Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. *Gene* 222, 107-117.
- Brooks, D. R., Denise, H., Westrop, G. D., Coombs, G. H. y Mottram, J. C.** (2001). The stage-regulated expression of *Leishmania mexicana* CPB cysteine proteases is mediated by an intercistronic sequence element. *J Biol Chem* 276, 47061-47069.
- Burchmore, R. J. y Landfear, S. M.** (1998). Differential regulation of multiple glucose transporter genes in *Leishmania mexicana*. *J Biol Chem* 273, 29118-29126.
- Campbell, D. A., Thomas, S. y Sturm, N. R.** (2003). Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes Infect* 5, 1231-1240.
- Clayton, C. E.** (2002). Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *Embo J* 21, 1881-1888.
- Clos, J. y Krobitch, S.** (1999). Heat Shock as a regular feature of the life cycle of *Leishmania* parasites. *Amer Zool* 39, 848-856.
- Clos, J., Klaholz, L., Kroemer, M., Krobitch, S. y Lindquist, S.** (2001). Heat shock protein 100 and the amastigote stage-specific A2 proteins of *Leishmania donovani*. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 190, 47-50.
- Croan, D. G., Morrison, D. A. y Ellis, J. T.** (1997). Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. *Mol Biochem Parasitol* 89, 149-159.

Csermely, P., Schnaider, T., Soti, C., Prohaszka, Z. y Nardai, G. (1998). The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther* 79, 129-168.

Cunningham, A. C. (2002). Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol* 72, 132-141.

Curotto de Lafaille, M. A. y Wirth, D. F. (1992). Creation of Null/+ mutants of the alpha-tubulin gene in *Leishmania enriettii* by gene cluster deletion. *J Biol Chem* 267, 23839-23846.

Charest, H. y Matlashewski, G. (1994). Developmental gene expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage-specific gene. *Mol Cell Biol* 14, 2975-2984.

Charest, H., Zhang, W. W. y Matlashewski, G. (1996). The developmental expression of *Leishmania donovani* A2 amastigote-specific genes is post-transcriptionally mediated and involves elements located in the 3'-untranslated region. *J Biol Chem* 271, 17081-17090.

Descoteaux, A., Avila, H. A., Zhang, K., Turco, S. J. y Beverley, S. M. (2002). *Leishmania* LPG3 encodes a GRP94 homolog required for phosphoglycan synthesis implicated in parasite virulence but not viability. *Embo J* 21, 4458-4469.

Donelson, J. E., Gardner, M. J. y El-Sayed, N. M. (1999). More surprises from *Kinetoplastida*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2579-2581.

Easton, D. P., Kaneko, Y. y Subject, J. R. (2000). The hsp110 and Grp1 70 stress proteins: newly recognized relatives of the Hsp70s. *Cell Stress Chaperones* 5, 276-290.

El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Blandin, G., Berriman, M., Crabtree, J., Aggarwal, G., Caler, E., Renault, H., Worthey, E. A., Hertz-Fowler, C., Ghedin, E., Peacock, C., Bartholomeu, D. C., Haas, B. J., Tran, A. N., Wortman, J. R., Alsmark, U. C., Angiuoli, S., Anupama, A., Badger, J., Bringaud, F., Cadag, E., Carlton, J. M., Cerqueira, G. C., Creasy, T., Delcher, A. L., Djikeng, A., Embley, T. M., Hauser, C., Ivens, A. C., Kummerfeld, S. K., Pereira-Leal, J. B., Nilsson, D., Peterson, J., Salzberg, S. L., Shallom, J., Silva, J. C., Sundaram, J., Westenberger, S., White, O., Melville, S. E., Donelson, J. E., Andersson, B., Stuart, K. D. y Hall, N. (2005). Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* 309, 404-409.

Feder, J. H., Rossi, J. M., Solomon, J., Solomon, N. y Lindquist, S. (1992). The consequences of expressing hsp70 in *Drosophila* cells at normal temperatures. *Genes Dev* 6, 1402-1413.

Fernandes, A. P., Nelson, K. y Beverley, S. M. (1993). Evolution of nuclear ribosomal RNAs in kinetoplastid protozoa: perspectives on the age and origins of parasitism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11608-11612.

Fernandes, O., Murthy, V. K., Kurath, U., Degrave, W. M. y Campbell, D. A. (1994). Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. *Mol Biochem Parasitol* 66, 261-271.

- Fink, A. L.** (1999). Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev* 79, 425-449.
- Furger, A., Schurch, N., Kurath, U. y Roditi, I.** (1997). Elements in the 3' untranslated region of procyclin mRNA regulate expression in insect forms of *Trypanosoma brucei* by modulating RNA stability and translation. *Mol Cell Biol* 17, 4372-4380.
- Garlapati, S., Dahan, E. y Shapira, M.** (1999). Effect of acidic pH on heat shock gene expression in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 100, 95-101.
- Gerloff-Elias, A., Barua, D., Molich, A. y Spijkerman, E.** (2006). Temperature- and pH-dependent accumulation of heat-shock proteins in the acidophilic green alga *Chlamydomonas acidophila*. *FEMS Microbiol Ecol* 56, 345-354.
- Gong, W. J. y Golic, K. G.** (2004). Genomic deletions of the *Drosophila melanogaster* Hsp70 genes. *Genetics* 168, 1467-1476.
- Gong, W. J. y Golic, K. G.** (2006). Loss of Hsp70 in *Drosophila* is pleiotropic, with effects on thermotolerance, recovery from heat shock and neurodegeneration. *Genetics* 172, 275-286.
- Gonzalez-Aseguinolaza, G., Almazan, F., Rodriguez, J. F., Marquet, A. y Larraga, V.** (1997). Cloning of the gp63 surface protease of *Leishmania infantum*. Differential post-translational modifications correlated with different infective forms. *Biochim Biophys Acta* 1361, 92-102.
- Graham, S. V.** (1995). Mechanisms of Stage-regulated Gene Expression in *Kinetoplastida*. *Parasitology today* 11, 217-223.
- Handman, E. y Goding, J. W.** (1985). The *Leishmania* receptor for macrophages is a lipid-containing glycoconjugate. *Embo J* 4, 329-336.
- Handman, E.** (1999). Cell biology of *Leishmania*. *Adv Parasitol* 44, 1-39.
- Hartl, F. U.** (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571-579.
- Hartl, F. U. y Hayer-Hartl, M.** (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295, 1852-1858.
- Haslbeck, M., Franzmann, T., Weinfurtner, D. y Buchner, J.** (2005). Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nat Struct Mol Biol* 12, 842-846.
- Hassan, P., Fergusson, D., Grant, K. M. y Mottram, J. C.** (2001). The CRK3 protein kinase is essential for cell cycle progression of *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* 113, 189-198.
- Hendrick, J. P. y Hartl, F. U.** (1993). Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu Rev Biochem* 62, 349-384.
- Herwaldt, B. L.** (1999). Leishmaniasis. *Lancet* 354, 1191-1199.

Huang, J. y Van der Ploeg, L. H. (1991). Requirement of a polypyrimidine tract for trans-splicing in trypanosomes: discriminating the PARP promoter from the immediately adjacent 3' splice acceptor site. *Embo J* 10, 3877-3885.

Hubel, A., Brandau, S., Dresel, A. y Clos, J. (1995). A member of the ClpB family of stress proteins is expressed during heat shock in *Leishmania* spp. *Mol Biochem Parasitol* 70, 107-118.

Hubel, A. y Clos, J. (1996). The genomic organization of the HSP83 gene locus is conserved in three *Leishmania* species. *Exp Parasitol* 82, 225-228.

Hubel, A., Krobitch, S., Horauf, A. y Clos, J. (1997). *Leishmania major* Hsp100 is required chiefly in the mammalian stage of the parasite. *Mol Cell Biol* 17, 5987-5995.

Inoue, H., Nojima, H. y Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.

Ivens, A. C., Lewis, S. M., Bagherzadeh, A., Zhang, L., Chan, H. M. y Smith, D. F. (1998). A physical map of the *Leishmania major* Friedlin genome. *Genome Res* 8, 135-145.

Ivens, A. C., Peacock, C. S., Worthey, E. A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M. A., Adlem, E., Aert, R., Anupama, A., Apostolou, Z., Attipoe, P., Bason, N., Bauser, C., Beck, A., Beverley, S. M., Bianchetti, G., Borzym, K., Bothe, G., Bruschi, C. V., Collins, M., Cadag, E., Ciarloni, L., Clayton, C., Coulson, R. M., Cronin, A., Cruz, A. K., Davies, R. M., De Gaudenzi, J., Dobson, D. E., Duesterhoeft, A., Fazelina, G., Fosker, N., Frasch, A. C., Fraser, A., Fuchs, M., Gabel, C., Goble, A., Goffeau, A., Harris, D., Hertz-Fowler, C., Hilbert, H., Horn, D., Huang, Y., Klages, S., Knights, A., Kube, M., Larke, N., Litvin, L., Lord, A., Louie, T., Marra, M., Masuy, D., Matthews, K., Michaeli, S., Mottram, J. C., Muller-Auer, S., Munden, H., Nelson, S., Norbertczak, H., Oliver, K., O'Neil, S., Pentony, M., Pohl, T. M., Price, C., Purnelle, B., Quail, M. A., Rabinowitsch, E., Reinhardt, R., Rieger, M., Rinta, J., Robben, J., Robertson, L., Ruiz, J. C., Rutter, S., Saunders, D., Schafer, M., Schein, J., Schwartz, D. C., Seeger, K., Seyler, A., Sharp, S., Shin, H., Sivam, D., Squares, R., Squares, S., Tosato, V., Vogt, C., Volckaert, G., Wambutt, R., Warren, T., Wedler, H., Woodward, J., Zhou, S., Zimmermann, W., Smith, D. F., Blackwell, J. M., Stuart, K. D., Barrell, B. y Myler, P. J. (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309, 436-442.

Jensen, A. T., Curtis, J., Montgomery, J., Handman, E. y Theander, T. G. (2001). Molecular and immunological characterisation of the glucose regulated protein 78 of *Leishmania donovani*(1). *Biochim Biophys Acta* 1549, 73-87.

Johner, A., Kunz, S., Linder, M., Shakur, Y. y Seebeck, T. (2006). Cyclic nucleotide specific phosphodiesterases of *Leishmania major*. *BMC Microbiol* 6, 25.

Johnson, P. J., Kooter, J. M. y Borst, P. (1987). Inactivation of transcription by UV irradiation of *T. brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene. *Cell* 51, 273-281.

- Joshi, M. B., Rogers, M. E., Shakarian, A. M., Yamage, M., Al-Harathi, S. A., Bates, P. A. y Dwyer, D. M.** (2005). Molecular characterization, expression, and in vivo analysis of LmexCht1: the chitinase of the human pathogen, *Leishmania mexicana*. *J Biol Chem* 280, 3847-3861.
- Kapotas, N. y Bellofatto, V.** (1993). Differential response to RNA trans-splicing signals within the phosphoglycerate kinase gene cluster in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res* 21, 4067-4072.
- Kar, S., Soong, L., Colmenares, M., Goldsmith-Pestana, K. y McMahan-Pratt, D.** (2000). The immunologically protective P-4 antigen of *Leishmania* amastigotes. A developmentally regulated single strand-specific nuclease associated with the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 275, 37789-37797.
- Kelly, B. L., Nelson, T. N. y McMaster, W. R.** (2001). Stage-specific expression in *Leishmania* conferred by 3' untranslated regions of L. major leishmanolysin genes (GP63). *Mol Biochem Parasitol* 116, 101-104.
- Kelly, B. L., Stetson, D. B. y Locksley, R. M.** (2003). *Leishmania major* LACK antigen is required for efficient vertebrate parasitization. *J Exp Med* 198, 1689-1698.
- Klemenz, R., Hultmark, D. y Gehring, W. J.** (1985). Selective translation of heat shock mRNA in *Drosophila melanogaster* depends on sequence information in the leader. *Embo J* 4, 2053-2060.
- Kloc, M., Zearfoss, N. R. y Etkin, L. D.** (2002). Mechanisms of subcellular mRNA localization. *Cell* 108, 533-544.
- Krobitsch, S., Brandau, S., Hoyer, C., Schmetz, C., Hubel, A. y Clos, J.** (1998). *Leishmania donovani* heat shock protein 100. Characterization and function in amastigote stage differentiation. *J Biol Chem* 273, 6488-6494.
- Krobitsch, S. y Clos, J.** (1999). A novel role for 100 kD heat shock proteins in the parasite *Leishmania donovani*. *Cell Stress Chaperones* 4, 191-198.
- La Terza, A., Papa, G., Miceli, C. y Luporini, P.** (2001). Divergence between two Antarctic species of the ciliate *Euplotes*, *E. focardii* and *E. nobilii*, in the expression of heat-shock protein 70 genes. *Mol Ecol* 10, 1061-1067.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lamontagne, J. y Papadopoulou, B.** (1999). Developmental regulation of spliced leader RNA gene in *Leishmania donovani* amastigotes is mediated by specific polyadenylation. *J Biol Chem* 274, 6602-6609.
- Larreta, R., Soto, M., Alonso, C. y Requena, J. M.** (2000). *Leishmania infantum*: gene cloning of the GRP94 homologue, its expression as recombinant protein, and analysis of antigenicity. *Exp Parasitol* 96, 108-115.

- Larreta, R., Soto, M., Quijada, L., Folgueira, C., Abanades, D. R., Alonso, C. y Requena, J. M.** (2004). The expression of HSP83 genes in *Leishmania infantum* is affected by temperature and by stage-differentiation and is regulated at the levels of mRNA stability and translation. *BMC Mol Biol* 5, 3.
- Laskey, R. A., Honda, B. M., Mills, A. D. y Finch, J. T.** (1978). Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* 275, 416-420.
- Laurentino, E. C., Ruiz, J. C., Fazelinia, G., Myler, P. J., Degrave, W., Alves-Ferreira, M., Ribeiro, J. M. y Cruz, A. K.** (2004). A survey of *Leishmania braziliensis* genome by shotgun sequencing. *Mol Biochem Parasitol* 137, 81-86.
- Lawrence, F. y Robert-Gero, M.** (1985). Induction of heat shock and stress proteins in promastigotes of three *Leishmania* species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4414-4417.
- LeBowitz, J. H., Coburn, C. M. y Beverley, S. M.** (1991). Simultaneous transient expression assays of the trypanosomatid parasite *Leishmania* using beta-galactosidase and beta-glucuronidase as reporter enzymes. *Gene* 103, 119-123.
- LeBowitz, J. H., Smith, H. Q., Rusche, L. y Beverley, S. M.** (1993). Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes Dev* 7, 996-1007.
- Lee, M. G., Atkinson, B. L., Giannini, S. H. y Van der Ploeg, L. H.** (1988). Structure and expression of the hsp 70 gene family of *Leishmania major*. *Nucleic Acids Res* 16, 9567-9585.
- Lee, S., Sowa, M. E., Choi, J. M. y Tsai, F. T.** (2004). The ClpB/Hsp104 molecular chaperone-a protein disaggregating machine. *J Struct Biol* 146, 99-105.
- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J. M. y Boedtke, H.** (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16, 4743-4751.
- Liang, P. y MacRae, T. H.** (1997). Molecular chaperones and the cytoskeleton. *J Cell Sci* 110 (Pt 13), 1431-1440.
- Lindquist, S.** (1986). The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 55, 1151-1191.
- Lindquist, S. y Craig, E. A.** (1988). The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22, 631-677.
- Liu, K., Zinker, S., Arguello, C. y Salgado, L. M.** (2000). Isolation and analysis of a new developmentally regulated gene from amastigotes of *Leishmania mexicana mexicana*. *Parasitol Res* 86, 140-150.
- Lukes, J., Paris, Z., Regmi, S., Breitling, R., Mureev, S., Kushnir, S., Pyatkov, K., Jirku, M. y Alexandrov, K. A.** (2006). Translational initiation in *Leishmania tarentolae* and *Phytomonas serpens* (*Kinetoplastida*) is strongly influenced by pre-ATG triplet and its 5' sequence context. *Mol Biochem Parasitol* 148, 125-132.

- MacFarlane, J., Blaxter, M. L., Bishop, R. P., Miles, M. A. y Kelly, J. M.** (1990). Identification and characterisation of a *Leishmania donovani* antigen belonging to the 70-kDa heat-shock protein family. *Eur J Biochem* 190, 377-384.
- 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., Stern, L. S., Wang, Z., Ullu, E. y Tschudi, C.** (2000). A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. *Rna* 6, 163-169.
- Martinez-Calvillo, S., Yan, S., Nguyen, D., Fox, M., Stuart, K. y Myler, P. J.** (2003). Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol Cell* 11, 1291-1299.
- Martinez-Calvillo, S., Nguyen, D., Stuart, K. y Myler, P. J.** (2004). Transcription initiation and termination on *Leishmania major* chromosome 3. *Eukaryot Cell* 3, 506-517.
- Martinez-Calvillo, S., Stuart, K. y Myler, P. J.** (2005). Ploidy changes associated with disruption of two adjacent genes on *Leishmania major* chromosome 1. *Int J Parasitol* 35, 419-429.
- Maslov, D. A. y Simpson, L.** (1995). Evolution of parasitism in kinetoplastid protozoa. *Parasitol Today* 11, 30-32.
- Mayer, M. P. y Bukau, B.** (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62, 670-684.
- Mazumder, B., Seshadri, V. y Fox, P. L.** (2003). Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. *Trends Biochem Sci* 28, 91-98.
- McNicoll, F., Muller, M., Cloutier, S., Boilard, N., Rochette, A., Dube, M. y Papadopoulou, B.** (2005). Distinct 3'-untranslated region elements regulate stage-specific mRNA accumulation and translation in *Leishmania*. *J Biol Chem* 280, 35238-35246.
- Mikulits, W., Pradet-Balade, B., Habermann, B., Beug, H., Garcia-Sanz, J. A. y Mullner, E. W.** (2000). Isolation of translationally controlled mRNAs by differential screening. *Faseb J* 14, 1641-1652.
- Mishra, K. K., Holzer, T. R., Moore, L. L. y LeBowitz, J. H.** (2003). A negative regulatory element controls mRNA abundance of the *Leishmania mexicana* Paraflagellar rod gene PFR2. *Eukaryot Cell* 2, 1009-1017.
- Momen, H. y Cupolillo, E.** (2000). Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95, 583-588.
- Montalvetti, A., Pena-Diaz, J., Hurtado, R., Ruiz-Perez, L. M. y Gonzalez-Pacanowska, D.** (2000). Characterization and regulation of *Leishmania major* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *Biochem J* 349, 27-34.
- Moore, L. L., Santrich, C. y LeBowitz, J. H.** (1996). Stage-specific expression of the *Leishmania mexicana* paraflagellar rod protein PFR-2. *Mol Biochem Parasitol* 80, 125-135.

- Moreira, D., Lopez-Garcia, P. y Vickerman, K.** (2004). An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class *Kinetoplastea*. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 1861-1875.
- Moreno, J. y Alvar, J.** (2002). Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol* 18, 399-405.
- Morimoto, R. I., Sarge, K. D. y Abravaya, K.** (1992). Transcriptional regulation of heat shock genes. A paradigm for inducible genomic responses. *J Biol Chem* 267, 21987-21990.
- Mosser, D. M., Springer, T. A. y Diamond, M. S.** (1992). *Leishmania* promastigotes require opsonic complement to bind to the human leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Cell Biol* 116, 511-520.
- Mottram, J. C., McCready, B. P., Brown, K. G. y Grant, K. M.** (1996). Gene disruptions indicate an essential function for the LmmCRK1 cdc2-related kinase of *Leishmania mexicana*. *Mol Microbiol* 22, 573-583.
- Mottram, J. C., Frame, M. J., Brooks, D. R., Tetley, L., Hutchison, J. E., Souza, A. E. y Coombs, G. H.** (1997). The multiple cpb cysteine proteinase genes of *Leishmania mexicana* encode isoenzymes that differ in their stage regulation and substrate preferences. *J Biol Chem* 272, 14285-14293.
- Muhich, M. L., Hsu, M. P. y Boothroyd, J. C.** (1989). Heat-shock disruption of trans-splicing in trypanosomes: effect on Hsp70, Hsp85 and tubulin mRNA synthesis. *Gene* 82, 169-175.
- Mullner, E. y García Sanz, J.** (1997). Polysome gradients. *Immunology Methods Manual*, 458-462.
- Mundodi, V., Somanna, A., Farrell, P. J. y Gedamu, L.** (2002). Genomic organization and functional expression of differentially regulated cysteine protease genes of *Leishmania donovani* complex. *Gene* 282, 257-265.
- Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R. y Saravia, N. G.** (2005). Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366, 1561-1577.
- Myler, P. J., Audleman, L., deVos, T., Hixson, G., Kiser, P., Lemley, C., Magness, C., Rickel, E., Sisk, E., Sunkin, S., Swartzell, S., Westlake, T., Bastien, P., Fu, G., Ivens, A. y Stuart, K.** (1999). *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2902-2906.
- Myler, P. J., Beverley, S. M., Cruz, A. K., Dobson, D. E., Ivens, A. C., McDonagh, P. D., Madhubala, R., Martinez-Calvillo, S., Ruiz, J. C., Saxena, A., Sisk, E., Sunkin, S. M., Worthey, E., Yan, S. y Stuart, K. D.** (2001). The *Leishmania* genome project: new insights into gene organization and function. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 190, 9-12.
- Myung, K. S., Beetham, J. K., Wilson, M. E. y Donelson, J. E.** (2002). Comparison of the post-transcriptional regulation of the mRNAs for the surface proteins PSA (GP46) and MSP (GP63) of *Leishmania chagasi*. *J Biol Chem* 277, 16489-16497.

Oka, M., Nakai, M., Endo, T., Lim, C. R., Kimata, Y. y Kohno, K. (1998). Loss of Hsp70-Hsp40 chaperone activity causes abnormal nuclear distribution and aberrant microtubule formation in M-phase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273, 29727-29737.

Papadopoulou, B., Roy, G., Breton, M., Kundig, C., Dumas, C., Fillion, I., Singh, A. K., Olivier, M. y Ouellette, M. (2002). Reduced infectivity of a *Leishmania donovani* bioprotein transporter genetic mutant and its use as an attenuated strain for vaccination. *Infect Immun* 70, 62-68.

Parsell, D. A. y Lindquist, S. (1993). The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* 27, 437-496.

Parsons, M. y Ruben, L. (2000). Pathways involved in environmental sensing in trypanosomatids. *Parasitol Today* 16, 56-62.

Perez-Alvarez, M. J., Larreta, R., Alonso, C. y Requena, J. M. (2001). Characterisation of a monoclonal antibody recognising specifically the HSP70 from *Leishmania*. *Parasitol Res* 87, 907-910.

Pradet-Balade, B., Boulme, F., Mullner, E. W. y Garcia-Sanz, J. A. (2001). Reliability of mRNA profiling: verification for samples with different complexities. *Biotechniques* 30, 1352-1357.

Pratt, W. B. y Toft, D. O. (2003). Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med (Maywood)* 228, 111-133.

Puentes, S. M., Da Silva, R. P., Sacks, D. L., Hammer, C. H. y Joiner, K. A. (1990). Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *J Immunol* 145, 4311-4316.

Purdy, J. E., Donelson, J. E. y Wilson, M. E. (2005). Regulation of genes encoding the major surface protease of *Leishmania chagasi* via mRNA stability. *Mol Biochem Parasitol* 142, 88-97.

Quijada, L., Requena, J. M., Soto, M. y Alonso, C. (1996). During canine visceral leishmaniasis the anti-Hsp70 antibodies are specifically elicited by the parasite protein. *Parasitology* 112 (Pt 3), 277-284.

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

Quijada, L., Moreira, D., Soto, M., Alonso, C. y Requena, J. M. (1997b). Efficient 5'-end labeling of oligonucleotides containing self-complementary sequences. *Biotechniques* 23, 658-660.

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

- Quijada, L., Soto, M., Alonso, C. y Requena, J. M.** (2003). High-efficiency plating method for *Leishmania infantum*. *Mol Biochem Parasitol* *130*, 139-141.
- Requena, J. M., Lopez, M. C., Jimenez-Ruiz, A., de la Torre, J. C. y Alonso, C.** (1988). A head-to-tail tandem organization of hsp70 genes in *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Res* *16*, 1393-1406.
- Requena, J. M., Iborra, S., Carrion, J., Alonso, C. y Soto, M.** (2004). Recent advances in vaccines for leishmaniasis. *Expert Opin Biol Ther* *4*, 1505-1517.
- Rey-Ladino, J. A., Joshi, P. B., Singh, B., Gupta, R. y Reiner, N. E.** (1997). *Leishmania major*: molecular cloning, sequencing, and expression of the heat shock protein 60 gene reveals unique carboxy terminal peptide sequences. *Exp Parasitol* *85*, 249-263.
- Rico, A. I., Angel, S. O., Alonso, C. y Requena, J. M.** (1999). Immunostimulatory properties of the *Leishmania infantum* heat shock proteins HSP70 and HSP83. *Mol Immunol* *36*, 1131-1139.
- Rigby, P. W., Dieckmann, M., Rhodes, C. y Berg, P.** (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* *113*, 237-251.
- Ritossa, F.** (1996). Discovery of the heat shock response. *Cell Stress Chaperones* *1*, 97-98.
- Rittig, M. G. y Bogdan, C.** (2000). *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitol Today* *16*, 292-297.
- Robinson, K. A. y 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.
- Russell, D. G. y Wilhelm, H.** (1986). The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. *J Immunol* *136*, 2613-2620.
- Sacks, D. L. y Perkins, P. V.** (1984). Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science* *223*, 1417-1419.
- Sacks, D. L.** (1989). Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol* *69*, 100-103.
- Saito, R. M., Elgort, M. G. y Campbell, D. A.** (1994). A conserved upstream element is essential for transcription of the *Leishmania tarentolae* mini-exon gene. *Embo J* *13*, 5460-5469.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

- Saraiva, E. M., Pinto-da-Silva, L. H., Wanderley, J. L., Bonomo, A. C., Barcinski, M. A. y Moreira, M. E.** (2005). Flow cytometric assessment of *Leishmania* spp metacyclic differentiation: validation by morphological features and specific markers. *Exp Parasitol* 110, 39-47.
- Schlein, Y.** (1993). *Leishmania* and sandflies: interaction in the life cycle and transmission. *Parasitol Today* 9, 225-258.
- Schluter, A., Wiesgigl, M., Hoyer, C., Fleischer, S., Klaholz, L., Schmetz, C. y Clos, J.** (2000). Expression and subcellular localization of cpn60 protein family members in *Leishmania donovani*. *Biochim Biophys Acta* 1491, 65-74.
- Schurch, N., Furger, A., Kurath, U. y Roditi, I.** (1997). Contributions of the procyclin 3' untranslated region and coding region to the regulation of expression in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 89, 109-121.
- Searle, S., McCrossan, M. V. y Smith, D. F.** (1993). Expression of a mitochondrial stress protein in the protozoan parasite *Leishmania major*. *J Cell Sci* 104 (Pt 4), 1091-1100.
- Selvapandiyan, A., Debrabant, A., Duncan, R., Muller, J., Salotra, P., Sreenivas, G., Salisbury, J. L. y Nakhasi, H. L.** (2004). Centrin gene disruption impairs stage-specific basal body duplication and cell cycle progression in *Leishmania*. *J Biol Chem* 279, 25703-25710.
- Shapira, M., McEwen, J. G. y Jaffe, C. L.** (1988). Temperature effects on molecular processes which lead to stage differentiation in *Leishmania*. *Embo J* 7, 2895-2901.
- Shi, Y., Mosser, D. D. y Morimoto, R. I.** (1998). Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev* 12, 654-666.
- Soares, C. M., de Carvalho, E. F., Urmenyi, T. P., Carvalho, J. F., de Castro, F. T. y Rondinelli, E.** (1989). Alpha- and beta-tubulin mRNAs of *Trypanosoma cruzi* originate from a single multicistronic transcript. *FEBS Lett* 250, 497-502.
- Sopwith, W. F., Debrabant, A., Yamage, M., Dwyer, D. M. y Bates, P. A.** (2002). Developmentally regulated expression of a cell surface class I nuclease in *Leishmania mexicana*. *Int J Parasitol* 32, 449-459.
- Sorger, P. K.** (1991). Heat shock factor and the heat shock response. *Cell* 65, 363-366.
- Soto, M., Requena, J. M. y Alonso, C.** (1993a). Isolation, characterization and analysis of the expression of the *Leishmania* ribosomal PO protein genes. *Mol Biochem Parasitol* 61, 265-274.
- Soto, M., Requena, J. M., Garcia, M., Gomez, L. C., Navarrete, I. y Alonso, C.** (1993b). Genomic organization and expression of two independent gene arrays coding for two antigenic acidic ribosomal proteins of *Leishmania*. *J Biol Chem* 268, 21835-21843.

- Soto, M., Quijada, L., Larreta, R., Iborra, S., Alonso, C. y Requena, J. M.** (2003). *Leishmania infantum* possesses a complex family of histone H2A genes: structural characterization and analysis of expression. *Parasitology* 127, 95-105.
- Soto, M., Iborra, S., Quijada, L., Folgueira, C., Alonso, C. y Requena, J. M.** (2004). Cell-cycle-dependent translation of histone mRNAs is the key control point for regulation of histone biosynthesis in *Leishmania infantum*. *Biochem J* 379, 617-625.
- Southern, E. M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98, 503-517.
- Spath, G. F., Lye, L. F., Segawa, H., Sacks, D. L., Turco, S. J. y Beverley, S. M.** (2003). Persistence without pathology in phosphoglycan-deficient *Leishmania major*. *Science* 301, 1241-1243.
- Stewart, G. R., Snewin, V. A., Walzl, G., Hussell, T., Tormay, P., O'Gaora, P., Goyal, M., Betts, J., Brown, I. N. y Young, D. B.** (2001). Overexpression of heat-shock proteins reduces survival of *Mycobacterium tuberculosis* in the chronic phase of infection. *Nat Med* 7, 732-737.
- Stewart, J., Curtis, J., Spurck, T. P., Ilg, T., Garami, A., Baldwin, T., Courret, N., McFadden, G. I., Davis, A. y Handman, E.** (2005). Characterisation of a *Leishmania mexicana* knockout lacking guanosine diphosphate-mannose pyrophosphorylase. *Int J Parasitol* 35, 861-873.
- Stiles, J. K., Hicock, P. I., Shah, P. H. y Meade, J. C.** (1999). Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol* 93, 781-807.
- Tissieres, A., Mitchell, H. K. y Tracy, U. M.** (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* 84, 389-398.
- Van de Bor, V. y Davis, I.** (2004). mRNA localisation gets more complex. *Curr Opin Cell Biol* 16, 300-307.
- van den Hoff, M. J., Moorman, A. F. y Lamers, W. H.** (1992). Electroporation in 'intracellular' buffer increases cell survival. *Nucleic Acids Res* 20, 2902.
- Vergnes, B., Sereno, D., Tavares, J., Cordeiro-da-Silva, A., Vanhille, L., Madjidian-Sereno, N., Depoix, D., Monte-Alegre, A. y Ouaisi, A.** (2005). Targeted disruption of cytosolic SIR2 deacetylase discloses its essential role in *Leishmania* survival and proliferation. *Gene* 363, 85-96.
- Victoir, K., Dujardin, J. C., de Doncker, S., Barker, D. C., Arevalo, J., Hamers, R. y Le Ray, D.** (1995). Plasticity of gp63 gene organization in *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) peruviana*. *Parasitology* 111 (Pt 3), 265-273.
- Victoir, K. y Dujardin, J. C.** (2002). How to succeed in parasitic life without sex? Asking *Leishmania*. *Trends Parasitol* 18, 81-85.

Voellmy, R. (2004). On mechanisms that control heat shock transcription factor activity in metazoan cells. *Cell Stress Chaperones* 9, 122-133.

Walker, J., Vasquez, J. J., Gomez, M. A., Drummel-Smith, J., Burchmore, R., Girard, I. y Ouellette, M. (2006). Identification of developmentally-regulated proteins in *Leishmania panamensis* by proteome profiling of promastigotes and axenic amastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 147, 64-73.

Werner-Washburne, M., Stone, D. E. y Craig, E. A. (1987). Complex interactions among members of an essential subfamily of hsp70 genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 7, 2568-2577.

Weston, D., La Flamme, A. C. y Van Voorhis, W. C. (1999). Expression of *Trypanosoma cruzi* surface antigen FL-160 is controlled by elements in the 3' untranslated, the 3' intergenic, and the coding regions. *Mol Biochem Parasitol* 102, 53-66.

Whitesell, L. y Lindquist, S. L. (2005). HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer* 5, 761-772.

Wiesgigl, M. y Clos, J. (2001). Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*. *Mol Biol Cell* 12, 3307-3316.

Wincker, P., Ravel, C., Blaineau, C., Pages, M., Jauffret, Y., Dedet, J. P. y Bastien, P. (1996). The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Acids Res* 24, 1688-1694.

Wolday, D., Berhe, N., Akuffo, H. y Britton, S. (1999). *Leishmania*-HIV interaction: immunopathogenic mechanisms. *Parasitol Today* 15, 182-187.

Wu, Y., El Fakhry, Y., Sereno, D., Tamar, S. y Papadopoulou, B. (2000). A new developmentally regulated gene family in *Leishmania* amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins. *Mol Biochem Parasitol* 110, 345-357.

Yao, C., Donelson, J. E. y Wilson, M. E. (2003). The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol Biochem Parasitol* 132, 1-16.

Young, J. C., Moarefi, I. y Hartl, F. U. (2001). Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J Cell Biol* 154, 267-273.

Young, J. C., Agashe, V. R., Siegers, K. y Hartl, F. U. (2004). Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 781-791.

Zamora-Veyl, F. B., Kroemer, M., Zander, D. y Clos, J. (2005). Stage-specific expression of the mitochondrial co-chaperonin of *Leishmania donovani*, CPN10. *Kinetoplastid Biol Dis* 4, 3.

Zhang, W. W. y Matlashewski, G. (2001). Characterization of the A2-A2rel gene cluster in *Leishmania donovani*: involvement of A2 in visceralization during infection. *Mol Microbiol* 39, 935-948.

Zhang, W. W., Mendez, S., Ghosh, A., Myler, P., Ivens, A., Clos, J., Sacks, D. L. y Matlashewski, G. (2003). Comparison of the A2 gene locus in *Leishmania donovani* and *Leishmania major* and its control over cutaneous infection. *J Biol Chem* 278, 35508-35515.

Zilberstein, D. y Shapira, M. (1994). The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol* 48, 449-470.

Zilka, A., Garlapati, S., Dahan, E., Yaolsky, V. y Shapira, M. (2001). Developmental regulation of heat shock protein 83 in *Leishmania*. 3' processing and mRNA stability control transcript abundance, and translation is directed by a determinant in the 3'-untranslated region. *J Biol Chem* 276, 47922-47929.

Zufferey, R. y Ben Mamoun, C. (2006). *Leishmania major* expresses a single dihydroxyacetone phosphate acyltransferase localized in the glycosome, important for rapid growth and survival at high cell density and essential for virulence. *J Biol Chem* 281, 7952-7959.

Zurita, A. I., Rodriguez, J., Pinero, J. E., Pacheco, R., Carmelo, E., del Castillo, A. y Valladares, B. (2003). Cloning and characterization of the *Leishmania (Viannia) braziliensis* Hsp70 gene. Diagnostic use of the C-terminal fragment rLb70(513-663). *J Parasitol* 89, 372-378.

8. ANEXO

8. ANEXO: Artículos publicados con resultados de esta Tesis Doctoral

- **Folgueira, C.**, Quijada, L., Soto, M., Abanades, D.R., Alonso, C. Y Requena, J.M. (2005) The translational efficiencies of the two *Leishmania infantum* *HSP70* mRNAs, differing in their 3'-untranslated regions, are affected by shifts in the temperature of growth through different mechanisms. *J Biol Chem* 280, 35172-35183.
- **Folgueira, C.**, Cañavate, C., Chicharro, C. y Requena, J.M. (2006) Genomic organization and expression of the *HSP70* locus in New and Old World *Leishmania* species. *Parasitology* 134: *In press*.

