



**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**



**Caracterización de la proteína Hsp90 y co-
chaperonas de *Toxoplasma gondii* y su
papel en el desarrollo
del parásito**

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR
DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES EN
EL ÁREA CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Lic. Pablo C. Echeverría

Director: Dr. Sergio Oscar Angel

**LABORATORIO DE PARASITOLOGÍA MOLECULAR
IIB-INTECH
(UNSAM-CONICET)**

2006

Dedicado

A Tamara,
A Alma,
A Honorio

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Sergio O. Angel....sí al negro, pero como yo nunca me acostumbré a llamarlo por el apodo, me dirijo de esta manera formal ahora, muchísimas gracias por el apoyo, respaldo, comprensión, incentivo, entusiasmo, amistad otorgado todos estos 9 años, por haber estado presente en los momentos difíciles, y compartido con alegría y optimismo todos los días en el laboratorio, por ayudarme a crecer, por los viajes, por ser un gran jefe, pero por sobre todas las cosas por ser UN GRAN TIPO! GRACIAS!

A todas las personas con las que compartí mi vida de laboratorio todos estos años, a Valentina mi compañera desde el primer día, por su alegría, por su ayuda, por las charlas. A Laurita, mi pilar anímico dentro del Malbrán, mi amiga, espero por siempre. Tamara tendrá su párrafo aparte, pero como sabrán primero fue mi compañerita, pocos días fueron tan hermosos, como el día que llegaste al labo. A Paola, Mónica (por su ayuda y compañía), Bibiana, a los integrantes del labo de hidatidosis mi segunda casa, a Mara (por sus sabios consejos profesionales y amistad), Ariana, Pato, Ariel, todos excelentes compañeros, a Josefina (la co-inquilina). A María Paula, mi compañerita, con la que tanto luchamos por sacar adelante los cultivos de toxo, y principalmente por su amistad. A la nueva exitosa camada del labo en chascomus, a Natalia por su empuje y ganas por crecer y hacer crecer al labo, por su ayuda, por su buena onda (no es cierto lo de amarga), a Caro con quien puedo compartir todo lo lindo vivido en Montpellier, por la ayuda prestada; a ambas por hacerme siempre sentir que soy parte del labo, a pesar de la distancia. A la gente del INTECH que con tan buena onda siempre me recibe y a las fiestas que allí se suceden.

Al laboratorio de Mónica Costas, Mónica te estaré eternamente agradecido por tu invaluable ayuda, apoyo, consejos, charlas, por prestarme mesada y permitirme compartir todo lo positivo que tiene tu labo GRACIAS!. Cómo dejar de lado en este párrafo al increíble Nacho T. quien me demostró que el labo puede ser un ámbito de infinita diversión y alegría (risas en apnea), por su ayuda, apoyo y compañía; a Georgina, su simpatía puede transformar un día triste gris y lluvioso en una oportunidad perfecta para comprar churros y tomar mates, gracias por la ayuda y compañía; a Fernanda por su laboriosidad a la hora de realizar tareas molestas del labo en las que yo debí haber ayudado mas, pero Fer siempre se adelanta, gracias por ayudar siempre y por la buena compañía. Al labo de cruzi, que decir...gracias por todos los momentos compartidos, nunca me divertí tanto en un labo, A Claudio por ser el mentor de un ámbito de trabajo en donde se conjuga la excelencia y los mejores momentos de diversión imaginables, las obsesiones de Berti (no olvidemos su apoyo profesional), el humor desopilante de Garpar (quería usar la palabra desopilante, igual todos saben que gaspar es un grosso!) y la belleza de lady Marian que aporta paz en tan original lugar. Gracias a ambos labos, los voy a extrañar, por suerte la amistad siempre trascendió las paredes del Lanari así que nos seguiremos viendo, salud!.

Los agradecimientos internacionales incluyen, a Mariana Matrajt nuestra gran colaboradora en este proyecto que desde UPENN (Junto a Omar Harb) y ahora desde Vermont, por tanto apoyo y entusiasmo otorgado. A Montpellier!, a JF Dubremetz quien me enseñó tanto de toxo y prestó toda su colaboración para que nuestros proyectos avanzaran, a Maryse y Hiba quienes me dieron toda la ayuda que necesité

en el labo de Montpellier. A las amistades que afiancé, Marianita gracias por hacerme sentir que no estaba lejos a pesar de la distancia, y a las nuevas amistades Marina, Cristián y Tomasito (no hubiera estado tan bueno sin su ayuda y cariño), a la familia Abadie que me alojó desinteresadamente y tanto me apoyó ne dio en mi segunda estancia (Adelina, Amalia y Alain), y por supuesto también a la prima de Tamara, Quitterie y su novio Jerome.

A los amigos con quienes compartí mi vida fuera del labo todos estos años, especialmente a Patri y Maxi, a Marina y Marcelo, por las interminables noches (de “bon vivant”) de charla amena, inteligente, sin sentido, todos las clases de charla que llenan el alma, gracias por estar siempre. A Lucas, Diego, el Flaco (y su hermosa familia), Rodrigo, el Topo, Ariana a quienes sigo viendo luego de tantos años. A Lau Uchi, a Jime, y como olvidar a Lore Franco y familia (Violetita y Héctor) con quienes pasamos tan lindos momentos. A la familia de Tama, especialmente a Elod y Marta, gracias por el apoyo constante.

A mis amigos que me alojaron y brindaron su compañía, cuando los iba a molestar durante mis viajes al exterior, Mariela gracias por tu ayuda siempre es muy grato verte, a Esteban y Natalia , a Isabel y Paloma quienes me hicieron sentir como en mi propia casa, convidándome mate, porra, llevándome a pasear por la hermosa Barcelona, son geniales!

A Tamara, mi hermoso amor que está conmigo hace 7 años y fue testigo de todo éste crecimiento profesional, apoyándome, incentivándome, ayudándome a ser mejor. Que se puede decir cuando uno está al lado de la mujer más linda del mundo, alguien tan sensible, tan inteligente, tan pujante... sólo agradecer y esperar que estemos juntos muchos años más queriéndonos y construyendo día a día siempre algo mejor. Te amo!

A mi vieja, Alma por el sostén y cariño que me permitieron llegar hasta aquí, por confiar siempre en mí, no dejándome abandonar ante los primeros escollos. Gracias por estar siempre.

A mi viejo Honorio, que no puede verme terminar esta parte de la carrera pero sí me vio comenzarla llenándose de orgullo, siempre sentí su apoyo incondicional en todo lo que me propusiera, siempre estará presente.

Como dejar afuera de esta lista a Brownie, el perro más bueno y compañero que existe.

*Quae medicamenta non sanat, ferrum sanat. Quae
ferrum non sanat, ignis sanat. Quae vero ignis non
sanat, insanabilia reportari oportet.*

(Lo que los medicamentos fallan en curar, el escalpelo puede curarlo. Lo que el escalpelo falla en sanar, el calor lo puede sanar. Si el calor no lo puede curar, debe ser clasificado como incurable.)

-Hipócrates.

PUBLICACIONES durante el período del doctorado.

Resultados presentados en esta tesis:

2005 **Echeverria, PC**, Matrajt M, Harb OS, Zappia MP, Costas MA, Roos DS, Dubremetz JF and Angel SO. *Toxoplasma gondii* Hsp90 is a potential drug target whose expression and subcellular localization are developmentally regulated. *Journal of Molecular Biology* **350**: 723-734. pISSN: 0022-2836. Inglaterra

2006 **Echeverria PC**, de Miguel N, Costas M, Angel SO. Potent antigen-specific immunity to *Toxoplasma gondii* in adjuvant-free vaccination system using Rop2-*Leishmania infantum* Hsp83 fusion protein. *Vaccine*, **en prensa**. pISSN: 0264-410X. Holanda (ver Apéndice).

Patente: Provisional Patent Application, Docket Nr. V0139.70078US00, United States Trademark Office, May 4, 2005. Título: Methods and compositions for treating *Toxoplasma*. Inventors: Mariana Matrajt, Sergio O. Angel, Pablo C. Echeverria. Field of Invention: Use of Hsp90 inhibitors in the treatment of latent *Toxoplasma gondii* infection. Participó la Universidad de Vermont, año 2004-2005.

No presentados en esta tesis:

2001 **Echeverria P**, Dran G, Pereda G, Rico AI, Requena JM, Alonso C, Guarnera E and Angel SO. Analysis of the adjuvant effect of recombinant *Leishmania infantum* Hsp83 protein as a tool for vaccination. *Immunology letters*, **76**:107-110. pISSN: 0165-2478. Holanda.

2004 Martin V, Supanitsky A, **Echeverria PC**, Litwin S, Tanos T, de Roodt AR, Guarnera EA and Angel SO. Recombinant Gra4 or Rop2 combined with alum or gra4 DNA provides partial protection in chronic murine models of toxoplasmosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **11**:704-710. pISSN: 1071-412X. EEUU.

2005 de Miguel N, **Echeverria PC**, Angel SO. Differential Subcellular Localization of Members from *Toxoplasma gondii* Small Heat Shock Protein (sHsp) Family. *Eukaryotic cell* **4**:1990-1997.

2006 Dalmaso MC, **Echeverria PC**, Zappia MP, Hellman U, Dubremetz JF Angel SO. *Toxoplasma gondii* has two lineages of histones 2b (H2B) with different expression

profiles. *Molecular and Biochemical Parasitology* **aceptado con revisión menor.**
pISSN: 0166-6851. Holanda.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pag.
LISTA DE TABLAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
ABREVIATURAS.	xvi
RESUMEN.	1
ABSTRACT.	4
1. INTRODUCCIÓN	6
<u>TOXOPLASMA GONDII</u>	7
Ciclo de vida	7
Morfología y características	10
El taquizoito.	10
El bradizoito.	13
El esporozoito.	14
Interconversión taquizoito-bradizoito	15
Diferenciación bradizoito-taquizoito	15
Diferenciación taquizoito-bradizoito	16
<i>Toxoplasma gondii</i> y regulación génica	17

Toxoplasmosis e importancia de la reactivación toxoplásmica.	17
PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO	19
Regulación de la expresión de las HSPs	19
Renaturalización de proteínas	23
Acoplamiento chaperonas-degradación de proteínas	23
HSPs y desarrollo	24
HSPs en la regulación de la respuesta inmune	25
HSP90	26
Estructura	27
Hsp90 y proteínas clientes	29
CO-CHAPERONAS	34
Dominios TPR y proteínas con dominios TPR	34
HIP.	35
CHIP y Bag-1	35
HOP	36
P23	37
Immunofilinas	37
Hsp90 y terapia	38
OBJETIVOS	40

2. MATERIALES Y MÉTODOS	41
Origen del clon del ADN copia de Hsp90, secuenciado y análisis de secuencia	42
Determinación de la secuencia nucleotídica y aminoacídica de proteínas noveles de <i>T. gondii</i>	43
Predicción de estructura 2 ^{ria} y 3 ^{ria} de las proteínas estudiadas.	43
Diferenciación y manipulación <i>in vitro</i> de los parásitos	46
Ensayos de RT-PCR	48
Análisis por Inmunoblot.	48
Localización por Inmunofluorescencia indirecta (IFI) de la proteína Hsp90	49
Transformación de bradizoitos enquistados en taquizoitos <i>in vitro</i>	50
Efecto de la geldanamicina (GA) en el cambio de estadio y la localización intracelular de Hsp90	51
Inmunoprecipitaciones	52
3. RESULTADOS	53
Análisis de la secuencia de la proteína de <i>T. gondii</i> Hsp90	54
Modelado predictivo de la proteína Hsp90 de <i>T. gondii</i>	55
Expresión de la proteína Hsp90 durante el desarrollo de <i>T. gondii</i>	59
Localización intracelular de la proteína Hsp90 durante el cambio de estadio en parásitos RH Δ UPRT de <i>T. gondii</i>	62
Localización intracelular de Hsp90 en la cepa PK de <i>T. gondii</i>	64
Hsp90 abandona el núcleo durante el cambio de estadio de bradizoito a	

Taquizoito.	65
La GA inhibe el crecimiento de los parásitos.	66
La GA bloquea la conversión de taquizoito a bradizoito	68
La GA bloquea la conversión de bradizoito a taquizoito	71
La base de datos de “ESTs” de <i>T. gondii</i> contiene secuencias de co-chaperonas “putativas” de Hsp90.	75
Identificación de la proteína Hip de <i>T. gondii</i> (TgHip)	77
Estructura primaria de TgHip	78
Predicción de la estructura 2 ^{ria} y 3 ^{ria} de TgHip	81
Identificación de la proteína P23 de <i>T. gondii</i>	83
Análisis estructural de la proteína P23 de <i>T. gondii</i>	83
Las proteínas de <i>T. gondii</i> Hsp90, Hip, P23 y Hsp70 interactúan formando parte de un complejo	86
Las proteínas de <i>T. gondii</i> Hsp90, Hip y P23, colocalizan y tienen una localización subcelular diferencial en el cambio de estadio	87
Identificación de la proteína Hop de <i>T. gondii</i>	90
Estructura primaria de la proteína Hop de <i>T. gondii</i>	90
Predicción de estructuras secundarias y terciarias de TgHop	92
Identificación de la proteína Hsp40 de <i>T. gondii</i>	96
Estructura primaria de la proteína Hsp40 de <i>T. gondii</i>	96
Predicción de la estructura terciaria de TgHsp40	98

4. DISCUSIÓN.	99
Estructura de la proteína TgHsp90100
Regulación de la proteína Hsp90 en el desarrollo de <i>T. gondii</i>101
Inhibición de Hsp90 y desarrollo.103
Hsp90 y co-chaperonas.106
Interacciones entre las chaperonas Hsp90/70 y las co-chaperonas Hip y P23 .	.107
Las proteínas Hip y P23 muestran diferencias en su localización subcelular relacionada al desarrollo108
Modelo.108
Direcciones futuras.110
 5. APÉNDICE111
HSPs en la regulación de la respuesta inmune113
Mecanismo de inmunoestimulación114
HSPs como adyuvantes.116
 BIBLIOGRAFÍA.	 .120

LISTA de TABLAS

Tabla	Pag.
1. Tabla 1.1: Principales HSPs y co-chaperonas implicadas en múltiples funciones de homeostasis celular	22
2. Tabla 3.1: Principales co-chaperonas localizadas en la base de datos de ESTs de <i>T. gondii</i>	76

LISTA de FIGURAS

Figura	Pag.
1. Figura 1.1: Diagrama del ciclo de vida de <i>T. gondii</i>	8
2. Figura 1.2: Taquizoito de <i>T. gondii</i>	12
3. Figura 1.3: Imágenes de taquizoitos.	12
4. Figura 1.4: Quiste tisular de <i>T. gondii</i> en cerebros de ratones	13
4. Figura 1.5: Ooquistes de <i>T. gondii</i>	14
5. Figura 1.6: Activación transcripcional de los genes codificantes para las HSPs.	20
6. Figura 1.7.:Maquinaria molecular de re-plegado de proteínas desnaturalizadas y su acoplamiento con el sistema de degradación proteasomal.	24
7. Figura 1.8: Dominios estructurales de la proteína Hsp90	28
8. Figura 1.9: Ciclo chaperona de la maquinaria Hsp90/Hsp70.	31
9. Figura 2.1: Identificación de proteínas noveles de <i>T. gondii</i>	44
10. Figura 2.2: Metodología utilizada en la predicción de estructura 2 ^{ria} y 3 ^{ria} de proteínas noveles de <i>T. gondii</i>	45
11. Figura 2.3: Modelo <i>in vitro</i> de desarrollo a estadio bradizoito.	47
12. Figura 2.4: Modelo <i>in vitro</i> de desarrollo de bradizoito a taquizoito	50
13. Figura 3.1. Comparación de diferentes miembros de la familia Hsp90	56

Figura	Pag.
14. Figura 3.2. Dominios y motivos encontrados en la proteína Hsp90 de <i>Toxoplasma gondii</i>	58
15. Figura 3.3: Modelado predicho (SwissModel) de la estructura terciaria de TgHsp90.	59
16. Figura 3.4: Análisis de la expresión de la proteína Hsp90 de <i>T. gondii</i>	61
17. Figura 3.5: Localización intracelular de la proteína Hsp90 en parásitos de la cepa RH Δ UPRT.	63
18. Figura 3.6: Localización de la proteína Hsp90 en mutantes bradizoito.	64
19. Figura 3.7: Localización intracelular de la proteína Hsp90 en parásitos de la cepa PK, durante el desarrollo de taquizoito a bradizoito y de bradizoito a taquizoito.	66
20. Figura 3.8. Efecto de GA en el nivel de carga parasitaria del cultivo de células huéspedes durante la conversión de taquizoito a bradizoito.	67
21. Figura 3.9: Efecto de GA sobre la replicación de <i>T. gondii</i> durante la conversión de taquizoito a bradizoito.	68
22. Figura 3.10: Efecto de la GA en la conversión taquizoito-bradizoito	69
23. Figura 3.11: Efecto de GA en la invasión de <i>T. gondii</i>	70
24. Figura 3.12: Efecto reversible de la GA en la conversión taquizoito-bradizoito.	71
25. Figura 3.13: Efectos de GA sobre la invasión de bradizoitos y posterior crecimiento en la conversión de bradizoito a taquizoito.	72
25. Figura 3.14: Efecto de la GA en la conversión de bradizoito-taquizoito	73
26. Figura 3.15: Efecto del pre-tratamiento GA en la conversión de bradizoito-taquizoito durante 72 hs.	75

27. Figura 3.16: Reconocimiento por Inmunoblot de la proteína TgHip endógena y recombinante	78
28. Figura 3.17: Comparación de la estructura 1ria de TgHip con diferentes ortólogos.	79
29. Figura 3.18. Alineamiento de las unidades tetratricopeptido de dominios TPR pertenecientes a TgHip, la Hip de rata y la PP5 humana.	81
30. Figura 3.19: Modelado predicho (SwissModel) de la estructura terciaria de la proteína TgHip	82
31. Figura 3.20: Reconocimiento por Inmunoblot de la proteína TgP23 endógena y recombinante.	84
32. Figura 3.21: Estructura primaria de TgP23	84
33. Figura 3.22: Análisis estructural de TgP23..	85
34. Figura 3.23. Análisis por co-Inmunoprecipitación de la interacción de co-chaperonas con la Hsp90 de <i>T. gondii</i>	87
35. Figura 3.24. Localización intracelular de TgHip y P23 en el desarrollo de <i>T. gondii</i>	89
36. Figura 3.25: Alineamiento comparativo de la secuencia aminoacídica de homólogos de Hop	91
37. Figura 3.26. Alineamiento de las unidades tetratricopeptido de dominios TPR1, TPR2A y TPR2B pertenecientes a TgHop	93
38. Figura 3.27: Modelado predictivo (Swiss-Model) de la estructura terciaria del dominio TPR1 de la proteína TgHop	94
39. Figura 3.28: Modelado predictivo (Swiss-Model) de la estructura terciaria del dominio TPR2A de la proteína TgHop	95

40.	Figura 3.29: Comparación de diferentes proteínas Hsp40.	97
41.	Figura 4.1. Modelo de acción de Hsp90 y co-chaperonas en <i>T.gondii</i> .	109
42.	Figura 5.1. Mecanismo estimulador del sistema inmune por parte de la HSPs.	115
43.	Figura 5.2. Proteínas utilizadas en el análisis de las propiedades inmunoestimuladoras de LiHsp83.	118
44.	Figure 5.3: Análisis respuesta celular	118
45.	Figura 5.4: Desafío con parásitos.	119

ABREVIATURAS

ADN	- ácido desoxirribonucleico
ADNc	- ADN copia
ARN	- ácido ribonucleico
ARNm	-ARN mensajero
APCs	- células presentadoras de antígenos
ARNm	- ARN mensajero
ATP	- adenosina trifosfato
EST	- expressed sequence tag (secuencia parcial de un clón de ADNc)
GA	- geldanamicina
Hip	-“Hsp-interacting protein”
HSE	-“Heat shock element” (elemento de choque térmico)
HSF	-“Heat shock factor” factor de choque térmico.
HSP	-“Heat Shock Protein”
IgG	- Inmunoglobulina G
IgG1	- Inmunoglobulina G 1
IgG2a	- Inmunoglobulina G 2a
IFI	- Inmunofluorecencia indirecta
IL	- Interleuquina
kDa	- kilodalton
LDB	- Lectina de <i>Dolichos biflorous</i>
μg	- microgramo
μl	- microlitro
μM	- micrometro
mg	- miligramo
ml	- mililitro
mM	- milimolar
Ni	- níquel

NLS	- secuencia de localización nuclear
nM	- nanomolar
NTA	- ácido nitroacético
ORF	- marco abierto de lectura
PAGE	- electroforesis en geles de poliacrilamida
PBS	- solución salina de buffer fosfato
PCR	- reacción en cadena de la polimerasa
PM	- peso molecular
pM	- picomolar
SDS	- dodecil sulfato de sodio
sHSP	- “small Heat Shock Protein”
Th1	- células T helper 1
Th2	- células T helper 2

RESUMEN

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado y un patógeno humano de importancia. Dos formas replicativas son la característica principal del ciclo asexual de éste parásito: uno de replicación rápida (el taquizoito) y otro de división lenta (los bradizoitos enquistados). El proceso que permite la interconversión entre taquizoitos y bradizoitos es central para la patogenicidad y duración de la infección. Todavía no están claramente comprendidos los mecanismos que regulan este proceso de diferenciación. La inducción del desarrollo del estadio bradizoito *in vitro* se asocia con varios tipos de estresores, estímulos que son conocidos también como inductores de la expresión de proteínas de choque térmico (HSPs). Las HSPs son un enorme grupo de proteínas que se asocian en forma transiente con intermediarios de plegado de proteínas nacientes o también con proteínas desnaturalizadas, con el objeto de evitar la agregación. *In vivo*, la proteína Hsp90 tiene un rol fundamental en la maduración de componentes de numerosas vías de transducción de señales.

El objetivo de esta tesis fue identificar factores asociados con la diferenciación del parásito. Nuestros estudios se centraron en el análisis del perfil de expresión y la regulación durante el desarrollo de la proteína Hsp90 de *T. gondii* en tres tipos de parásitos, la cepa RH Δ UPRT, la cepa cistogénica ME49 y un clon derivado de esta última, PK todas útiles para estudios de diferenciación *in vitro*. Nuestros resultados muestran que el transcripto y nivel proteico de Hsp90 se ven incrementados ante condiciones de estrés y de diferenciación del parásito a bradizoito. Estudios de microscopía confocal e inmunofluorescencia revelaron que la proteína Hsp90 está presente en el citoplasma de taquizoitos y en el citoplasma y núcleo de bradizoitos maduros, lo cual, sugiere una correlación entre la localización subcelular y los dos estadios asexuales de desarrollo. Para caracterizar el papel de la proteína Hsp90 en la diferenciación a bradizoito, se estudiaron mutantes de *T. gondii* incapaces de desarrollar a bradizoitos. Bajo condiciones de diferenciación a bradizoitos éstos parásitos mostraron un patrón de localización celular equivalente al observado en taquizoitos. Se utilizó una droga capaz de unirse e inhibir la función de Hsp90, la geldanamicina, la cual, bloqueó la conversión de taquizoito a bradizoito y también el camino inverso. Estos resultados sugieren un papel crucial para la proteína Hsp90 durante el cambio de estadio. Se sabe, a partir de estudios realizados sobre la maduración de los receptores de esteroides, que la proteína Hsp90 no actúa sola,

sino, que lo hace en asociación con variadas co-chaperonas (Hip, Hsp40, Hop, P23). Estas proteínas se unen a la proteína Hsp90 y se organizan en sub-complejos discretos, cada uno conteniendo un grupo diferencial de co-chaperonas. En el genoma de *T. gondii* pudimos encontrar varias co-chaperonas pertenecientes a la extensivamente estudiada, “maquinaria” chaperona de las proteínas Hsp90/Hsp70. Se clonaron las proteínas Hip y P23, las cuales, una vez expresadas nos permitieron obtener anticuerpos policlonales que las reconozcan. Por ensayos de co-inmunoprecipitación se pudo determinar que Hip y P23 interactúan con la proteína Hsp90. Ambas co-chaperonas colocalizan intracelularmente con Hsp90 en el estadio taquizoito. En el estadio bradizoito solamente P23 colocaliza con Hsp90, manteniéndose Hip excluida del núcleo. También se clonaron y caracterizaron preliminarmente las co-chaperonas Hop y Hsp40.

Palabras clave:

Toxoplasma

Proteínas de choque térmico

Hsp90

Localización nuclear

Desarrollo

Co-chaperonas

Characterization of *Toxoplasma gondii* Hsp90 and co-chaperones and their involvement during parasite development

Abstract

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite and an important human pathogen. Two replicative forms characterize the asexual cycle of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*: rapidly growing tachyzoites and slowly dividing encysted bradyzoites. This process of tachyzoite–bradyzoite interconversion is central to the pathogenesis and longevity of infection. The mechanisms that regulate the transition between these two stages are not clearly understood. However, stress inducers that also activate heat shock protein expression can trigger formation of bradyzoites *in vitro*. A large and diverse group of proteins, known as chaperones, transiently associate with protein folding intermediates or proteins needing to be refolded after stress, to prevent aggregation, but in many cases the specific functions of individual chaperones are not still clear. *In vivo*, Hsp90 (heat shock protein 90) plays a key role in the maturation of components of signal transduction pathways. In order to identify molecular factors associated with parasite differentiation, in this thesis it was studied the association of the *T. gondii* Hsp90 with the modulation of parasite differentiation and response to stress stimuli using RH Δ UPRT parasites and the cystogenic strain ME49, as well as, a clone derivative of that strain, PK. Our results show that Hsp90 transcript and protein levels increase under stress or bradyzoite differentiation conditions. Moreover, fluorescence microscopy studies revealed that Hsp90 is present in the cytosol of tachyzoites and both in the nucleus and cytosol of mature bradyzoites, suggesting a correlation between its subcellular organization and these two developmental stages. To further characterize the role for Hsp90 in bradyzoite differentiation, *T. gondii* tachyzoite mutants that are defective in differentiation showed the same staining pattern as tachyzoites under differentiation conditions. In addition, geldanamycin, a benzoquinone ansamycin antibiotic capable of binding and disrupting the function of Hsp90, blocked conversion both from the tachyzoite to bradyzoite and the bradyzoite to tachyzoite stage, suggesting an critical role for this protein in the regulation of stage interconversion. These results thus suggest that Hsp90 may play a role in stage switch. It is known from studies on steroid hormone receptor maturation that Hsp90 does not act alone but in association

with several different co-chaperones. These co-chaperones bind to Hsp90 and organize it into discrete subcomplexes, each containing a different set of co-chaperones. In *T. gondii* genome we could find several co-chaperones members of the extensively studied Hsp90/Hsp70 based chaperone machinery. Hip and P23 proteins were cloned, sequenced and expressed in order to obtain specific polyclonal antibodies against them. Furthermore, co-immunoprecipitation assays show that Hip and P23 interact with Hsp90 but not between them, suggesting that Hip belongs to early/intermediate Hsp90 complexes (also interacts with Hsp70), and P23 to mature complexes. Both co-chaperones colocalize with Hsp90 at tachyzoite stage. While, at bradyzoite stage only P23 colocalize with Hsp90, Hip is located mainly out of nucleus. Also we cloned and made preliminary characterization of Hop and Hsp40 co-chaperones.

Keywords:

Toxoplasma

Heat shock proteins

Hsp90

Nuclear localization

Development

Co-chaperones

1. INTRODUCCIÓN

TOXOPLASMA GONDII

Toxoplasma gondii es un protozooario intracelular obligado descrito por primera vez en 1908 por Nicolle y Manceaux en África del Norte y por Splendore en Brasil. La designación de la especie deriva del roedor *Ctenodactylus gondi* de África del Norte, del cual este parásito fue aislado, y el nombre del género viene de la palabra griega *toxon* que significa “arco” refiriéndose a la forma de media luna del organismo.

Toxoplasma pertenece al phylum Apicomplexa, que consiste en parásitos intracelulares que tienen una estructura celular polarizada característica y un arreglo complejo del citoesqueleto y de sus organelas en su extremo apical [1]. Otros miembros de este phylum incluyen los patógenos humanos *Plasmodium* (causante de la malaria) y *Cryptosporidium* así como también los patógenos de animales como *Eimeria* (causante de la coccidiosis en pollos) y *Sarcocystis*.

Ciclo de vida

El *Toxoplasma* tiene capacidad de infectar y replicarse dentro de cualquier célula nucleada de tejidos de todas las especies de mamíferos y aves examinadas [1, 2].

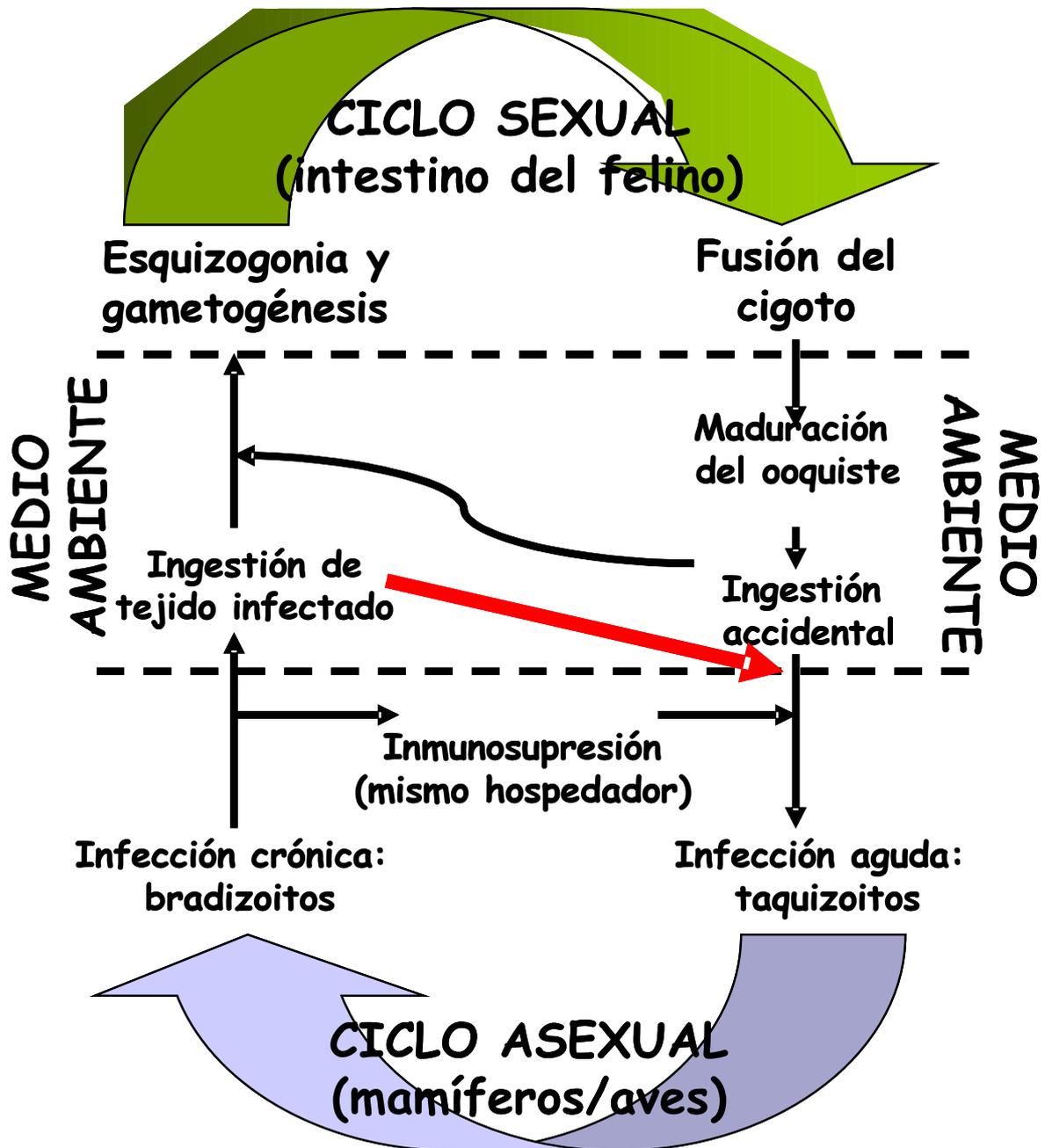


Figura 1.1: Diagrama del ciclo de vida de *T. gondii*. Los componentes sexuales y asexuales del ciclo de vida son potencialmente independientes. En particular, la fase asexual puede teóricamente ciclar entre hospedadores intermediarios *ad infinitum*. No se conoce el grado al cual las porciones sexuales y asexuales del ciclo completo se mantienen una a la otra en la naturaleza.

T. gondii presenta ciclos de multiplicación sexual en el intestino del gato y de otros felinos salvajes (hospedadores definitivos), y un ciclo de multiplicación asexual en mamíferos, incluido el hombre, y aves (hospedadores intermediarios). Durante el curso de su ciclo, este parásito presenta tres estadios: el esporozoito (dentro de ooquistes) característico de la multiplicación sexual, el taquizoito (en vacuolas parasitóforas intracelulares) y el bradizoito (en quistes tisulares intracelulares), ambos característicos de la multiplicación asexual. Estos tres estadios están relacionados en un complejo ciclo de vida (Fig. 1.1).

El ciclo sexual se inicia cuando un miembro de la familia felina ingiere ooquistes del medio ambiente o tejidos infectados con quistes conteniendo bradizoitos (Fig. 1.1). Las enzimas proteolíticas del estómago y del intestino delgado disuelven la pared de los quistes, liberando los esporozoitos o bradizoitos que infectan las células epiteliales del intestino delgado del felino y algunos pasan al estadio de taquizoito. Por otro lado algunos parásitos comienzan a multiplicarse por esquizogonia y luego inician la formación de los gametocitos o elementos sexuales, que evolucionan a microgametocitos (del tipo masculino) y macrogametocitos (del tipo femenino), mientras que otros se diferencian a bradizoitos para luego formar los quistes tisulares. Los microgametocitos sufren una serie de divisiones nucleares [3] y dan lugar a 22 microgametas flageladas, las cuales nadan hacia las macrogametas maduras para fertilizarlas y formar los cigotos. Luego de la fertilización, se forma la pared del ooquiste con cinco capas alrededor del parásito [4]. Las células epiteliales infectadas se rompen y descargan los ooquistes dentro del lumen intestinal los cuales terminan siendo excretados junto con las heces del felino. En este punto, los ooquistes son inmaduros y no son infectivos. Una vez que entran en contacto con la atmósfera, completan la meiosis produciendo, luego de un par de días, la esporulación que conduce a la formación de esporozoitos, convirtiéndose así en altamente infectivos, pudiendo sobrevivir en el ambiente por varios meses y posiblemente hasta años. Cualquier animal de sangre caliente que ingiera esos ooquistes infectivos se convierte en un hospedador para el ciclo asexual.

En el hospedador intermediario y también en el felino, luego de la ingestión de quistes tisulares u ooquistes, se produce la infección de las células epiteliales intestinales (Fig. 1.1). Los bradizoitos o esporozoitos liberados, respectivamente, se diferencian a

taquizoitos (Fig. 1.2). Este estadio se encuentra durante la fase aguda de la toxoplasmosis. Ellos se replican dentro de una vacuola parasitófora intracelular (Fig. 1.3B) con un tiempo de generación de 6 a 8 horas (*in vitro*) durante el cual se acumulan de 64 a 128 parásitos por célula [5], desencadenando la lisis de la célula huésped, aunque *in vitro* se comprobó que en ciertas condiciones el egreso del parásito al medio extracelular podría ocurrir también por el mismo mecanismo que el de entrada a la misma [6]. Los taquizoitos libres pueden infectar virtualmente cualquier célula nucleada que encuentren, y continuar la replicación intracelular dispersándose por todos los tejidos del hospedador. Si no son controlados por el sistema inmune, los taquizoitos son altamente virulentos y causan una toxoplasmosis generalizada cuyos efectos son siempre fatales [7]. Entonces, la inducción de la respuesta inmune mediada por células T y la resistencia al estadio de taquizoito es un paso clave en el ciclo de vida del *T. gondii*, ya que determina la supervivencia del hospedador y la del parásito mismo. Luego de que el animal infectado desarrolla una inmunidad efectiva, los taquizoitos se diferencian a bradizoitos, forma del parásito que presenta una multiplicación lenta que es esencialmente inactiva e inocua. Los bradizoitos sobreviven dentro de quistes tisulares (Fig. 1.4) que están aislados del sistema inmune del hospedador por la pared quística, que está compuesta principalmente por productos derivados del tejido del hospedador. Estos quistes comienzan a aparecer alrededor de los 7 a 10 días luego de la infección y definen el estadio crónico del ciclo asexual. Estos quistes se encuentran principalmente en el sistema nervioso central y tejido muscular, en donde residen durante toda la vida del hospedador [8].

Luego de la ingestión de quistes tisulares en carne cruda o mal cocida proveniente de un hospedador crónicamente infectado, como se mencionó arriba, los bradizoitos liberados infectarán el epitelio intestinal del próximo hospedador susceptible y se diferenciarán al estadio de taquizoito para completar así el ciclo asexual. Los componentes sexual y asexual del ciclo de vida son potencialmente independientes; en particular, la fase asexual puede teóricamente ciclar entre hospedadores intermediarios *ad infinitum*. Lo expuesto en estos párrafos está ampliamente descrito en la bibliografía, y recientemente por Hill y col. [9].

Morfología y características

El taquizoito

El *T. gondii* es un miembro de los Alveolados porque posee un complejo de membrana interna que consiste en vesículas membranosas aplanadas que se ubican justo por debajo de la membrana plasmática [10]. En los Apicomplexa, esta estructura trimembrana es discontinua en el extremo anterior, en el microporo situado lateralmente, y en el poro que se encuentra en el extremo posterior. El taquizoito posee las organelas celulares clásicas: núcleo, mitocondria, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y ribosomas, y además por tener que invadir células y desarrollarse en forma intracelular, posee un número de organelas secretorias reguladas: las micronemas, las roptrias y los gránulos densos (Fig. 1.2 y 1.3). Las roptrias son estructuras secretorias, que consisten cada una en un cuello anterior angosto que se extiende dentro del interior del conoide, y una parte posterior con forma de saco. Las micronemas son estructuras con forma de bastón que aparecen mayoritariamente en el extremo apical del parásito. Los gránulos densos tienen una localización más generalizada dentro de la célula. Cada compartimento tiene su propio complemento de proteínas cuya función es consistente con el momento de su liberación.

El citoesqueleto del *T. gondii* es un complejo de estructuras que han evolucionado aparentemente para proveer una integridad estructural, para dirigir una secreción polarizada y para permitir que el parásito pueda deslizarse a través de las superficies e invadir células hospedadoras [11-13].

El taquizoito tiene una forma de media luna, con un tamaño aproximado de 4 a 8 μm de largo por 2 a 4 μm de ancho [14], y presenta un extremo anterior puntiagudo (conoidal) y un extremo posterior redondeado (Fig.1.3C). Este estadio del parásito posee una tasa de multiplicación rápida dentro de cualquier célula del hospedador intermediario y en el hospedador definitivo en células que no sean epiteliales intestinales. Los taquizoitos se encuentran en la célula hospedadora dentro de una vacuola parasitófora intracelular (Fig. 1.3B), en donde se multiplican asexualmente mediante endodiogenia repetida, una forma especializada de reproducción en la cual dos progenies se forman dentro del parásito materno, consumiéndolo [15]. La célula hospedadora se rompe cuando ya no puede soportar el crecimiento de los taquizoitos, los cuales quedan liberados al medio extracelular e invaden células adyacentes. Esta multiplicación rápida del parásito es característica de la fase aguda de la infección.

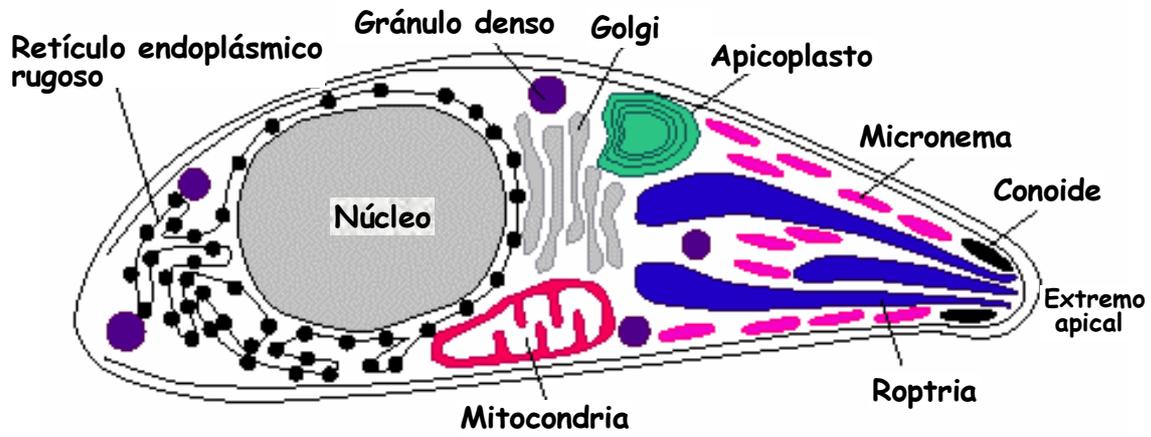


Figura 1.2: Taquizoito de *T. gondii*. Dibujo esquemático mostrando sus principales organelas.

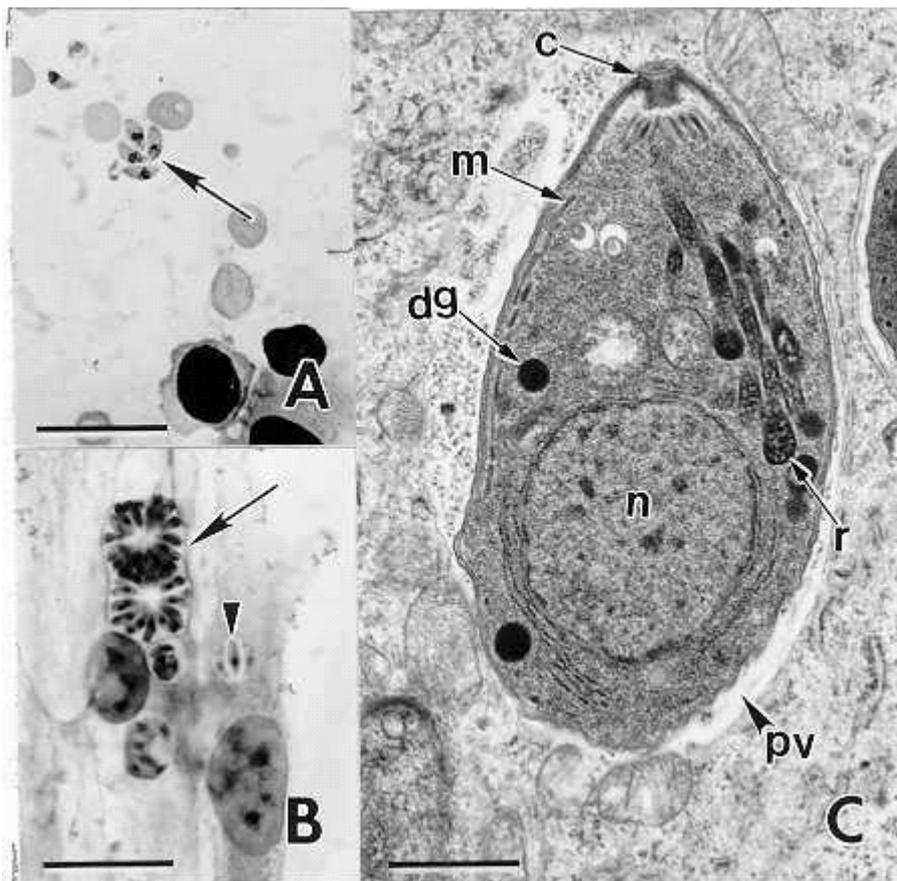


Figura 1.3: Imágenes de taquizoitos. A. Taquizoitos libres (flecha larga). B. Taquizoitos dentro de una vacuola parasitófora intracelular (flecha larga) y se indica un parásito libre (flecha corta). C. Micrografía electrónica de transmisión de un taquizoito de *T. gondii* en un exudado celular peritoneal de un ratón. C, conoide; dg, gránulo denso; m, micronema; n, núcleo; r, roptrias; pv, vacuola parasitófora.

El bradizoito

Es la forma proliferativa lenta del parásito que se multiplica dentro de un quiste tisular. Los quistes tisulares crecen y permanecen en el citoplasma de la célula hospedadora a medida que los bradizoitos se dividen por endodiogenia. Los quistes en general son esféricos y varían en tamaño: los jóvenes pueden medir 5 μm de diámetro y contener solo 2 parásitos, mientras que los más viejos pueden contener cientos de organismos y medir hasta 100 μm (Fig. 1.4) [16, 17]. Se localizan principalmente en tejidos neurales y musculares, incluyendo cerebro, ojos y músculo esquelético y cardíaco [18], pero también pueden localizarse en órganos viscerales. Los quistes tisulares pueden permanecer durante toda la vida del hospedador sin causar una respuesta inflamatoria. La aparición y la persistencia de los quistes son características de la fase crónica de la infección.

La morfología del bradizoito es muy semejante a la del taquizoito aunque es más pequeño: mide aproximadamente 7 por 1.5 μm . El bradizoito tiene el núcleo situado hacia el extremo posterior, contiene gránulos de amilopectina que constituirían una reserva energética [18] y son menos susceptibles a la destrucción por enzimas proteolíticas que los taquizoitos [19].

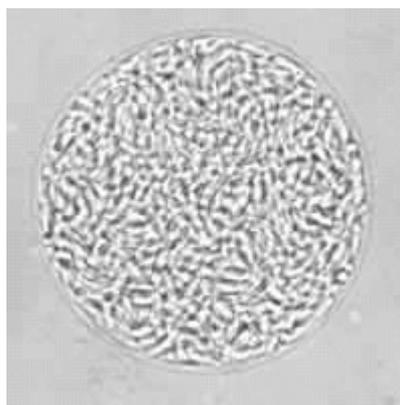


Figura 1.4: Quiste tisular de *T. gondii* en cerebros de ratones. Quiste tisular liberado del cerebro de un ratón. Notar la pared del quiste (flecha) envolviendo cientos de bradizoitos. Impresión sin teñir.

El esporozoito

A nivel estructural, el esporozoito es similar al taquizoito, excepto que hay mayor abundancia de micronemas, roptrias y gránulos de amilopectina. Este estadio es el resultado de la reproducción sexual del parásito que ocurre en las células epiteliales del intestino del gato. Cada ooquiste contiene dos esporoquistes, los cuales a su vez contienen cuatro esporozoitos cada uno (Fig. 1.5) [20].

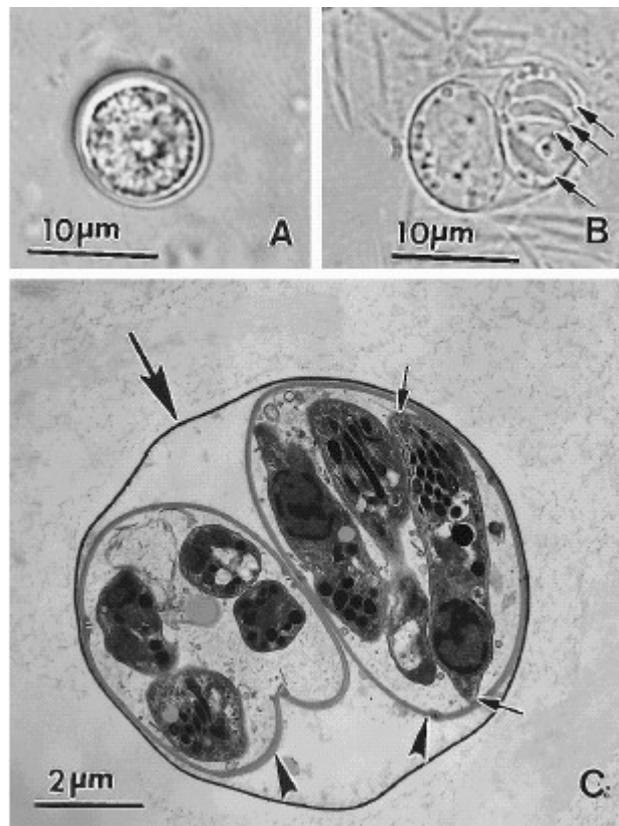


Figura 1.5: Ooquistes de *T. gondii*. A. Ooquiste sin esporular. Notar la masa central (esporonte) que ocupa la mayoría del ooquiste. B. Ooquiste esporulado con dos esporoquistes. Se visualizan cuatro esporozoitos (flechas) en uno de los esporoquistes. C. Micrografía electrónica de transmisión de un quiste esporulado. Notar la fina pared del ooquiste (flecha larga), dos esporoquistes (flechas cortas) y esporozoitos, uno de los cuales está cortado longitudinalmente (flecha pequeña) [1].

Interconversión taquizoito-bradizoito

El taquizoito es la forma proliferativa del parásito, mientras que el bradizoito es la forma de división lenta que aparece y se enquista luego de una fuerte respuesta inmunológica del hospedador. La interconversión entre taquizoito y bradizoito no solo juega un papel pivote en el establecimiento de la infección crónica (taquizoito-bradizoito), sino que también es responsable de la reactivación de la enfermedad (bradizoito-taquizoito).

Diferenciación bradizoito-taquizoito

Gracias a los anticuerpos monoclonales específicos de los estadios parasitarios, se pudo analizar la cinética de conversión de bradizoitos a taquizoitos *in vitro* [21, 22]. La diferenciación de bradizoito en taquizoito pasa por estados intermediarios que co-experimentan antígenos específicos de los dos estadios [21]. *In vivo*, el pasaje de bradizoito a taquizoito se evidencia al bloquear el IFN- γ [23]. En estudios de cultivos celulares infectados los bradizoitos demostraron convertirse espontáneamente a taquizoito, y viceversa, siendo la tasa de conversión dependiente de la cepa. Por ejemplo la cepa de baja virulencia Me49 muestra una tasa de conversión a bradizoito mucho mas alta que la cepa virulenta RH [24]. Dado que la cepa RH muestra una gran capacidad de lisis celular, lo cual podría estar afectando la formación de quistes para esta cepa, se analizó el efecto del añadido de pirimetamina o IFN- γ , ambos inhibidores del *T. gondii*, al medio de cultivo observándose un incremento en el número de quistes [24-26]. Sin embargo, estos análisis demostraron que más que incrementar la tasa de conversión, solo se previno la destrucción de la monocapa de células permitiendo la formación de quistes.

En estudios realizados con líneas de macrófagos murinos se observó que la presencia de IFN γ en el medio incrementaba la expresión de antígenos de bradizoitos correlacionando con la inducción de aparición de óxido nítrico (NO) [25]. Similarmente, cuando los taquizoitos son crecidos en células con la cadena mitocondrial no funcional se incrementa la expresión de antígenos de bradizoito [25, 27].

Diferenciación taquizoito-bradizoito

La transformación espontánea de taquizoitos en bradizoitos se puede observar en cultivos celulares y conduce a la formación de quistes *in vitro*. Varios estudios demostraron este desarrollo, ya sea por su visualización por microscopía electrónica [28-30] o con anticuerpos monoclonales específicos de estadio [21, 22, 26]. La conversión está asociada con cambios morfológicos y moleculares biológicos, incluyendo la expresión de antígenos estadio-específicos y alteraciones en el metabolismo [31, 32]. Los estudios usando anticuerpos monoclonales (mAc) para la expresión de proteínas estadio-específicas durante la conversión *in vitro*, demostraron que la conversión de estadio dentro de una misma vacuola parasitófora es asincrónica y la expresión de proteínas específicas de bradizoito es jerárquica en parásitos que sufrían conversión de estadio [21]. Como un primer avance en el conocimiento de las señales y eventos moleculares que inducen la conversión de taquizoito a bradizoito, Soete y col.[24], observaron “*in vitro*” que la diferenciación de taquizoito a bradizoito se indujo por modificación de las condiciones de cultivo induciendo choque térmico o aplicando condiciones alcalinas, todas condiciones que parecen basarse en una inducción de estrés en el parásito: incrementando el pH de 6.8 a 8.1, cambiando la temperatura de 37°C a 43°C y tratando con arsenito de sodio.

Los inhibidores de la función mitocondrial y los inductores de estrés oxidativo también han demostrado inducir el enquistamiento *in vitro* [24, 25]. Se han identificado varias proteínas de superficie, enzimas y proteínas de choque térmico (HSP) estadio-específicas [33-35].

La caracterización bioquímica de ambos estadios reveló que existen diferencias en el metabolismo de carbohidratos [31, 36]. La presencia de gránulos de amilopectina en bradizoitos pero no en taquizoitos, apoya aún más estas diferencias. Estas diferencias estarían asociadas con el ciclo de ácidos tricarbónicos y el camino de fosforilación oxidativa [37]. También se ha demostrado que los bradizoitos poseen una ATPasa del tipo P que está ausente en taquizoitos [38].

***Toxoplasma gondii* y regulación génica**

La caracterización de genes y proteínas que se expresan en los diferentes estadios es esencial para comprender los mecanismos por los cuales este parásito se ha convertido en un patógeno intracelular altamente exitoso. El análisis de la expresión génica en taquizoitos y bradizoitos ha avanzado en los últimos años a partir del proyecto genoma. Asimismo, mucho se ha avanzado con la finalización de proyectos genomas de varios apicomplexas. De esa manera se pudo comprobar en forma general la existencia de factores de transcripción asociados al complejo transcripcional de pre-inicio [39, 40]. Sin embargo, resulto sorprendente la falta de factores de transcripción específicos en estos parásitos [41, 42]. Resulta paradójico que dado el complejo ciclo de vida de estos organismos, no se encuentren evidencias de factores de transcripción para una regulación fina de la expresión diferencial de genes. Esto podría estar indicando la presencia de factores de transcripción irreconocibles debido a una alta divergencia en su secuencia primaria respecto a los ya conocidos en otras especies. Ejemplo de esto es la proteína PfMyb, relacionada a la familia del grupo triptofano, que demostró estar asociada a diferentes promotores de genes del parásito, y su interferencia por dsRNA produce alta mortalidad del parásito durante la transición de trofozoito a esquizonte [43]. Por otro lado se sugirió, que de la misma manera que ocurre en *Plasmodium* donde control de la regulación de la transcripción tiene lugar también por mecanismos epigenéticos, esto podría ser cierto para el resto de los apicomplexa {Meissner M, Soldati D, 2005}. En relación a este último aspecto, es conocido que en *T. gondii* existen todas las familias de histonas y enzimas intervinientes en el remodelado de la cromatina conocidas en eucariotas superiores [44-46] que permitirían éstos mecanismos.

Toxoplasmosis e importancia de la reactivación toxoplásmica

Un aspecto importante en la patogénesis de la toxoplasmosis es la reactivación de la enfermedad, es decir, la transición de la forma latente de bradizoito a la forma activa de taquizoito. La infección activa adquirida en el individuo ocurre por periodos muy cortos pasando a su forma latente a partir de aproximadamente los 7 días de infección. Este

período activo es generalmente asintomático. Posteriormente el huésped inmunocompetente mantiene el estado latente en forma crónica a lo largo de su vida sin alterar aparentemente su calidad de vida. Diferente es cuando el individuo pasa a un estado de inmunodepresión ya sea causada por una terapia (inmunosupresores, corticoides), hemopatía maligna (leucemia), síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) o por desórdenes linfoproliferativos, que puede resultar en la reactivación de *T. gondii*. La reactivación puede ocurrir en una variedad de tejidos, pero el sistema nervioso central es el sitio de mayor importancia clínica dado que la replicación descontrolada del parásito puede llevar a la encefalitis toxoplásmica (ET). Esto es debido a que los bradizoitos revierten a taquizoitos que rápidamente proliferan en astrocitos y microglia [47, 48] generando focos de necrosis tisular en el sitio inicial del quiste tisular. En ausencia de tratamiento, esta reactivación resulta casi siempre fatal.

Similarmente, la primoinfección (o reactivación de una infección latente) durante el embarazo puede producir la infección congénita del bebé en gestación, produciendo serias complicaciones, como ser abortos espontáneos. Sin embargo, más del 67% de las infecciones fetales son generalmente asintomáticas en el nacimiento pudiendo reactivarse la infección incluso después del año de vida, generalmente produciendo lesiones oculares o involucrando al sistema nervioso en general. Si a los niños con infecciones congénitas sin tratamiento se les hace un seguimiento hasta la adultez, se observa el desarrollo de incapacidades de aprendizaje o visuales a lo largo de su crecimiento [49, 50]. Por lo tanto, si no se los trata, la toxoplasmosis congénita puede resultar una enfermedad severa y hasta fatal [51].

Si bien se han definido claramente los aspectos morfológicos para ambos estadios, se sabe muy poco de los mecanismos y señales que inducen la diferenciación. Para esto es necesario caracterizar los genes y proteínas que se expresan durante el desarrollo y diferencialmente en los distintos estadios. El análisis de la expresión génica en taquizoitos y bradizoitos ha avanzado en los últimos años a partir del proyecto genoma EST [52, 53]. Existen alrededor de 16.000 EST incluyendo 3.000 solo para bradizoitos [54]. Sin embargo, es evidente que se requiere de estudios a nivel de proteína para conocer el papel de estos genes, como también de otros con expresión diferencial.

PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

Las proteínas de choque térmico (Hsps) son una familia de proteínas las cuales son expresadas constitutivamente en altas cantidades hecho que se ve incrementado cuando una célula está sujeta a condiciones de estrés [55] del tipo físicas (temperatura elevada, shock osmótico o de pH, irradiación por rayos UV) o fisiológicas (isquemia-reperfusion, carencia nutritiva, infecciones virales, hemorragias, fiebre elevada). En estas condiciones la expresión de algunos genes se apaga, mientras que la de unos pocos se estimula en un fenómeno denominado respuesta al choque térmico (heat shock response) o al estrés.

Regulación de la expresión de las HSPs

La respuesta de choque térmico, descubierta en 1964 en *Drosophila* exponiendo a moscas a temperaturas subletales [56], esta caracterizada por la trascrición preferencial de un reducido grupo de genes que codifican para proteínas específicas, las Hsp (heat shock proteins, o proteínas de choque térmico), igualmente denominadas proteínas de estrés.

Los genes *hsp* están regulados por una familia de factores de transcripción llamados HSFs. En vertebrados se han descrito 4 factores de transcripción pertenecientes a la familia de la HSFs, de los cuales el factor HSF-1 es el miembro mas predominante [57]. El factor HSF-1 es una molécula compleja que presenta varios dominios: un dominio de activación de la transcripción en la región amino terminal, un dominio de unión al ADN en la región carboxilo terminal, y un dominio de la trimerización que media la polimerización homóloga, revisado en [58, 59]. Bajo condiciones normales, los factores HSF-1 existen inactivos en el citoplasma o en el núcleo como monómeros [59]. Se reportó que esta represión a varios niveles es mantenida por la interacción de factores HSF-1 unidos a complejos multichaperona conteniendo Hsp90 o a chaperonas individuales [60, 61], estando este incapacitado de unirse al ADN en forma estable. La activación de HSF-1 es un proceso que le permite alcanzar un estado competente el cual está caracterizado por una hiperfosforilación en múltiples serinas [62-65]. Ante

condiciones de estrés, el complejo se disocia, las proteínas HSF-1 forman trímeros los cuales translocan al núcleo donde son fosforilados por proteínas de la familia de las proteinquinasa C (PKC).

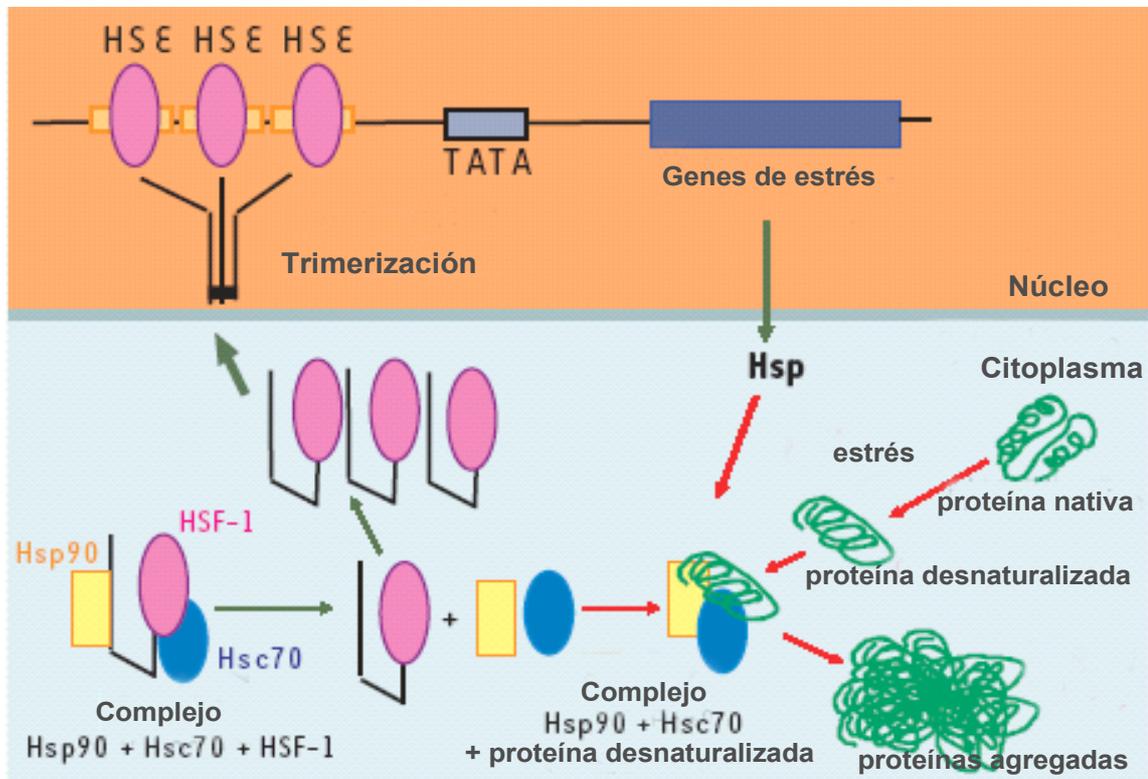


Figura 1.6. Activación transcripcional de los genes codificantes para las HSPs. Las proteínas presentan varios estados de plegamiento y formas nativas y agregadas. Bajo condiciones de choque térmico, la concentración de glóbulos de proteínas agregadas aumenta. Estos glóbulos son reconocidos por las Hsc70 y Hsp90, formando complejos más estables con estos agregados que los que forman con los factores de transcripción HSF-1. Una vez libres estos factores trimerizan y translocan al núcleo e interactúan con los motivos HSE (elemento de choque térmico), ubicados en los promotores de genes que codifican para las Hsps, necesarias para re-plegar las proteínas agregadas, y a su vez, interactúan negativamente con los HSF-1 manteniéndolos inactivos en el citoplasma.

Una vez activados, los factores HSF-1 ganan la capacidad de unirse al ADN en forma específica a su elemento “enhancer” de respuesta a choque térmico (HRE), comprendido por una serie de al menos tres repeticiones invertidas del pentanucleótido nGAAn, activando la transcripción de los genes *hsp* [66] (Figura 1.6). Existe una amplia diversidad de inductores de la respuesta de estrés, justamente agentes que producen la desestabilización del correcto plegamiento de proteínas, la destrucción de estructuras celulares. Una observación interesante en este sentido es el hecho de que la microinyección dentro del citoplasma celular de proteínas desnaturalizadas, induce la

neosíntesis de Hsps [67]. Siendo probable que HSF-1 se active por la presencia de proteínas mal plegadas a las que la proteína Hsp90 junto con su complejo de co-chaperonas se unen dejando liberado a dicho factor [59] (Figura 1.6). En estas condiciones en las que las proteínas se encuentran mal plegadas, comienzan a aparecer en la superficie de las mismas sitios que no se encuentran expuestos en estados nativos y si lo están en estados no nativos, residuos hidrofóbicos o cargados que a su vez, posibilitan la interacción con otros residuos hidrofóbicos o cargados provenientes de otras proteínas mal plegadas formando de esta manera, agregados proteicos. Estos agregados son altamente deletéreos para la célula. Las chaperonas y en especial las HSPs tienen la capacidad de reconocer estos sitios expuestos en las proteínas. Como resultado de la activación en la expresión de las HSPs, éstas se unen a las proteínas desnaturalizadas preservándolas hasta la finalización del estrés, promoviendo por un lado, la rápida degradación de las proteínas dañadas con su posterior eliminación de la célula o permitiendo su re-solubilización e induciendo en esas células una tolerancia al estrés [68, 69]. Esta exposición de residuos hidrofóbicos o cargados no se da solamente durante instancias de estrés, también ocurren fisiológicamente en el transcurso de la síntesis de polipéptidos, ensamble de péptidos o de su transporte a través de membranas, o en los cambios estructurales producidos durante el funcionamiento normal de complejos proteicos. Todo el conocimiento de estas actividades enumeradas proviene de innumerables estudios *in vivo* e *in vitro* que permitieron verificar la existencia de familias de proteínas con actividad chaperona dentro de las cuales las HSPs ocupan un espacio preponderante. Las HSPs están altamente conservadas dentro de los tres dominios filogenéticos (Bacteria, Archea y Eucarya) lo que sugiere un papel vital de éstas y otras chaperonas moleculares. Las proteínas de choque térmico son clasificadas en familias como HSP seguidas de un número que indica su peso molecular aparente en kilodaltons (kDa) determinados por SDS-PAGE. A continuación se detallan algunas características de las HSPs (Tabla 1).

Chaperonas	Referencias	Funciones
Hsp100	[70, 71]	Esenciales para la supervivencia celular bajo condiciones extremas y en la adquisición de termotolerancia, promoviendo la desagregación de las proteínas ante el calor
Hsp90	[72, 73]	Proteína expresada constitutivamente. Se estimula su expresión en condiciones de estrés. Chaperona ATP-dependiente importante en la recuperación de proteínas mal plegadas, y en la maduración, transporte intracelular y actividades regulatorias de los receptores nucleares de hormonas así como también de factores de transcripción y proteínas quinasas involucradas en la transducción de señales y el control de la expresión génica. Cumple estas funciones celulares formando heterocomplejos proteína·Hsp90 en una maquinaria multiproteica junto a la Hsp70. También se reportó su importancia en la restitución del estado competente de proteínas mutadas.
Hsp70	[74]	Su expresión se induce en condiciones de choque térmico, jerárquicamente implicada en el replegado de proteínas (complejo Hsp70-sustrato) luego de un estrés en su forma ATP-dependiente. Interactúa con Hsp90 y es esencial para el ensamblado de los heterocomplejos proteína·Hsp90.
Hsc70	[75]	Proteína de la familia Hsp70, constitutivamente expresada; no siendo estimulada por choque térmico. Es una chaperona ATP-dependiente implicada en el replegado de proteínas en una célula no estresada.
Hsp40	[76]	De expresión constitutiva, pero estimulada en condiciones de estrés. Interacciona con proteínas mal plegadas. Presenta el polipéptido a re-plegar a la Hsc70/Hsp70. Estimula la hidrólisis del ATP asociado a la Hsc70/Hsp70. Componente de los heterocomplejos proteína·Hsp90.
Hsp27	[77]	De expresión constitutiva, pero estimulada en condiciones de estrés. Actividad chaperona ATP-independiente. Forma estructuras oligoméricas con proteínas mal plegadas: inhibe la agregación y permite la presentación de estas proteínas a la Hsp40. Estimula la degradación ubiquitina-dependiente de ciertas proteínas.
Hip	[78]	Co-chaperona estabilizante de la forma ADP de la Hsc70/Hsp70. Componente de los heterocomplejos proteína·Hsp90.
Hop	[79].	Une vía sus dominios TPR independientes las Hsc70/Hsp70 con Hsp90, para la conformación de los heterocomplejos proteína·Hsp90.
P23	[80]	Co-chaperona estabilizante de heterocomplejos proteína·Hsp90, uniéndose a la conformación ATP-dependiente de Hsp90.
CHIP	[81]	Vía su dominio TPR se une a Hsc70, Hsp70 o Hsp90. Su interacción con Hsc70/Hsp70 produce la degradación proteasoma-dependiente de un sustrato

Tabla 1.1: Principales HSPs y co-chaperonas implicadas en múltiples funciones de homeostasis celular.

Renaturalización de proteínas.

En la figura (Figura 1.7) se resumen las diferentes etapas en la renaturalización de proteínas luego de un choque térmico (revisado por [82]). Los polipéptidos desnaturalizados en el curso de un estrés que presentan sitios hidrofóbicos en su superficie son reconocidos por la proteína Hsp40, hecho que a su vez permite la aparición en el complejo de la Hsp70. En esta etapa la Hsp70 engloba a la proteína uniendo ADP. La renaturalización de la proteína sustrato necesita además la incorporación al complejo de co-chaperonas tales como, Hip (por “Hsp70 interacting protein”), Hop (por “heat shock organizing protein”) y la proteína Hsp90. La maquinaria de re-plegamiento de la proteína sustrato necesita para activarse el intercambio del nucleótido ADP asociado a la Hsp70 por ATP. En el caso de proteínas que se translocan a través de la mitocondria, además de la Hsp70 son necesarias para la recomposición al estado nativo, las denominadas chaperoninas Hsp60/Hsp10 (el análogo procariota de GroEL/GroES). Cuando el sistema se satura por la aparición masiva de proteínas para re-plegar, aparece un mecanismo de almacenamiento provisorio de las mismas por parte de unas estructuras oligoméricas formadas por proteínas de choque térmico de bajo peso molecular (por ej. la familia sHSPs/ α -cristalina) que conformarían unos reservorios intermediarios de re-plegamiento [83] que dirigirían a las proteínas sustratos a la maquinaria de re-plegamiento.

Acoplamiento chaperonas-degradación de proteínas

Con la aparición de proteínas mal plegadas luego de un estrés celular, las mismas pueden ser re-plegadas o dirigidas a la vía de degradación, siendo probablemente más rentable y menos peligroso para la célula degradar y sintetizar nuevamente una proteína altamente desnaturalizada, que iniciar un proceso de re-plegado con un costoso gasto de ATP. Vía la proteína CHIP (“carboxy terminus of Hsc70 interacting protein”), se realiza una conexión entre la Hsp70 y el sistema de degradación [84] (Figura 1.7). Mediante el dominio TPR (repeticiones de tetratricopeptidos) de la co-chaperona CHIP, esta puede interactuar con la Hsp70 y Hsp90, además contiene el dominio U-box que contiene la actividad ligasa ϵ 3 de la ubiquitina. CHIP también es una proteína estimulada

por choque térmico. Luego de la ubiquitinización las proteínas son degradadas por un complejo proteico portador de actividades proteolíticas, el proteasoma 26S.

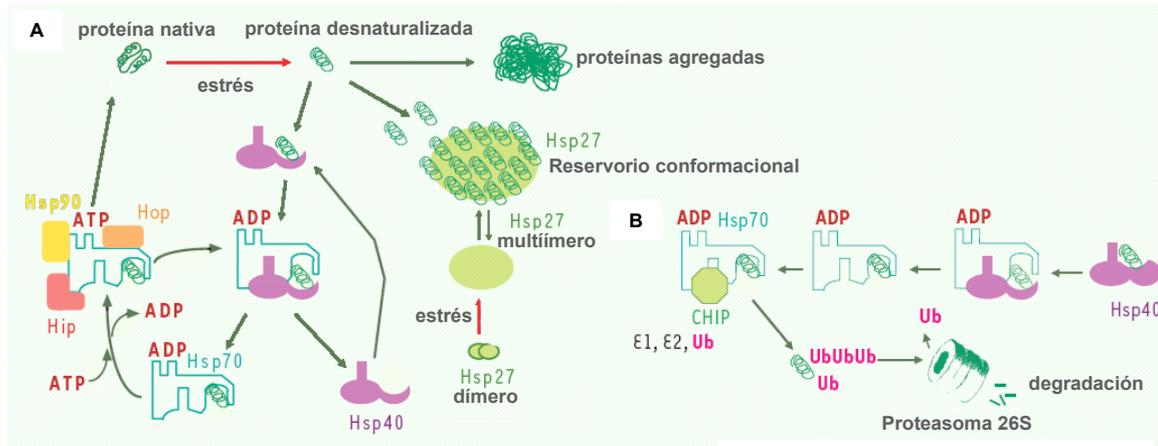


Figura 1.7: Maquinaria molecular de re-plegamiento de proteínas desnaturalizadas y su acoplamiento con el sistema de degradación proteasomal. **A.** Re-plegamiento de proteínas alteradas durante sucesos de estrés celular. Las proteínas agregadas exponen superficies hidrofóbicas las cuáles son reconocidas por la Hsp40, que via su dominio J forma un complejo con la Hsp70 que en su forma unida a ADP, engloba a la proteína. Esta renaturalización necesita de co-chaperonas como Hip y Hop y de la Hsp90, y del reemplazo de ADP por ATP. Hay condiciones en donde el sistema se satura de proteínas a re-plegar, estas se almacenan en un reservorio transitorio formado por las estructuras oligoméricas de sHsps del tipo Hsp27, para luego entrar en los procesos de re-plegamiento. **B.** Acoplamiento de las vías de re-plegamiento y degradación ubiquitina-proteasoma. Bajo condiciones en que las proteínas están seriamente afectadas, son procesadas preferencialmente mediante una vía que involucra a la proteína CHIP, el acoplamiento de ubiquitina y la degradación via el proteasoma 26S.

HSPs y desarrollo

La diferenciación *in vivo* al estadio bradizoito de *T. gondii* es una respuesta relacionada con estrés del parásito en respuesta a condiciones ambientales tales como la respuesta inflamatoria del huésped al estadio taquizoito. La inducción del desarrollo al estadio bradizoito *in vitro* está asociada con cambios en la temperatura, el pH y la exposición a otros estresores factores que también son conocidos como inductores de la activación de las HSPs [24, 58, 85]. Actualmente no queda ninguna duda que las HSPs no están solamente restringidas a la respuesta al estrés, si no que también están reguladas durante el desarrollo, teniendo importantes funciones durante el mismo. En protozoa fue posible establecer una conexión entre HSPs, desarrollo y supervivencia intracelular. Por

ejemplo, la Hsp100 de *Leishmania donovani* muestra un crecimiento rápido durante el desarrollo de amastigotes axénicos [86]. Se asoció a las HSPs de *Leishmania chagasi* con la capacidad de sobrevivir a un estrés oxidativo pudiendo jugar éstas proteínas un papel en la transición de promastigote a amastigote [87]. La proteína Hsp90 de *L. donovani* actúa como un “termómetro celular” en la progresión de este parásito desde el hospedador insecto hacia el mamífero, controlando al mismo tiempo la respuesta al choque térmico y la diferenciación morfológica [88]. Al mismo tiempo se observó que la proteína Hsp90 de *Plasmodium falciparum* es una proteína esencial durante el estadio de crecimiento dentro de los eritrocitos humanos [89]. La Hsp60 de *T. gondii* podría jugar un rol importante en la inducción del metabolismo respiratorio estadio-específica [35]. En el trabajo de Weiss y colaboradores [90] se muestra que la sobre-expresión de la Hsp70 de *T. gondii* es estimulada por las mismas señales que inducen el desarrollo al estadio bradizoito. En este sentido se obtuvieron resultados comparables con quistes “*in vivo*” en un modelo de reactivación toxoplásmica murino usando anti- γ -interferón [23]. Todos estos datos nos sugieren que la Hsp70 podría estar involucrada en ambos procesos el desarrollo de taquizoito a bradizoito y de bradizoito a taquizoito. En el caso de Hsp90 también se estudió sus funciones en el desarrollo en una gran variedad de organismos [91-93]. En *Plasmodium yoelii* [93] se observó una localización nuclear de la proteína Hsp90 dependiente de estadio, esto sugirió que la proteína podría, de esta manera, estar transduciendo señales necesarias para el desarrollo del parásito.

HSPs en la regulación de la respuesta inmune

En los últimos años se ha comenzado a reconocer la importancia y el rol central de las HSPs en la modulación del sistema inmune como respuesta a infecciones y procesos tumorales [94]. En el marco del trabajo realizado para esta tesis doctoral, también se estudiaron las propiedades inmunoestimuladoras de la proteína de *Leishmania Infantum* perteneciente a la familia de la Hsp90, LiHsp83 (ver Apéndice)

HSP90

La proteína de choque térmico (Hsp) 90 es una de las proteínas más abundantes en células no estresadas (1-2% del total de proteínas citosólicas) [72, 95-98]. Dentro de las HSPs Hsp90 tiene una actividad altamente selectiva en células estresadas y no estresadas, donde esta chaperona es responsable de procesos esenciales en el control del crecimiento y diferenciación celular. Si bien es importante en la recuperación de proteínas mal plegadas, actualmente se cree que Hsp90 se une principalmente más a una gama restringida de sustratos, que indiscriminadamente a cualquier proteína mal plegada, especializándose en estabilizar regiones metaestables, tales como bolsillos moleculares donde se unen ligandos, manteniéndolos en una posición “receptora” que a su vez impida el colapso o agregación de estas proteínas sustratos (a veces denominadas proteínas “clientes”) [99]. Su accionar se centra en la maduración, transporte intracelular y actividades regulatorias de los receptores nucleares de hormonas así como también de factores de transcripción y proteínas quinasas involucradas en la transducción de señales y el control de la expresión génica, ciclo celular, apoptosis, cáncer, respuesta al estrés, inmunidad en plantas, desarrollo y hasta evolución [72, 97, 100]. La proteína Hsp90 se demostró esencial en tres especies eucariotas ampliamente usadas como modelos experimentales: *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, y *Drosophila melanogaster* [101-104]. La proteína Hsp90 demostró tener un papel crítico en evitar la entrada a la vía de degradación a proteínas quinasas de cdc2, Mik1 y Swe1 en *Saccharomyces cerevisiae spp.*, siendo importante en la regulación del ciclo celular de la levadura [101]. Mutaciones en los genes de la familia Hsp90 (Hsp82, Hsc82 de *S. Cerevisiae*) afectan completamente el crecimiento de la levadura [105]. Mutaciones puntuales en la proteína Hsp90 de *Drosophila melanogaster* en homocigosis demostraron ser letales [102]. La inhibición de la actividad de la proteína Hsp90 en embriones de zebrafish produce una serie de alteraciones somáticas indicando un requerimiento de Hsp90 para el desarrollo en este organismo [106]. La presencia de mutaciones en el gen que codifica para la proteína Hsp90 de *Caenorhabditis elegans* produce afecciones en la viabilidad larval, desarrollo y fertilidad [107].

En mamíferos, cerca de 100 proteínas “clientes” están reguladas por Hsp90. En la mayoría de los casos estas proteínas sustrato fueron identificadas por experimentos de co-inmunoadsorción, co-existiendo en heterocomplejos citosólicos con Hsp90. Estos

heterocomplejos sustrato-hsp90 se forman en un proceso dependiente de ATP, por acción de una maquinaria chaperona basada en un complejo multiproteína Hsp90/Hsp70, el cual hasta ahora es conocido como ubicuo entre las células de los reinos animal y vegetal [72].

Hsp90 es una chaperona cuya funcionalidad es dependiente de ATP y de su actividad ATPasa. Aún cuando la actividad ATPasa de esta proteína es muy baja en su versión humana, comparada con las de sus correlatos en hongos o bacterias, esta actividad es altamente estimulada por la unión de co-chaperonas y sustratos [108]. Así la unión de Hsp90 a sus sustratos puede ser selectivamente inhibida por antibióticos del grupo de las anasamicinas-benzoquinonas (geldanamicina y sus derivados) y radicicol, las cuales se unen a la proteína interactuando con su bolsillo de unión a ATP con mucha más afinidad que la que tiene por el propio ATP [109]. El tratamiento de las células con este inhibidor, altera la función y/o el recambio de las proteínas que se unen a Hsp90 [110] dirigiéndolas a la degradación proteasomal [111, 112], esto puede ser utilizado como herramienta para el análisis de las funciones de Hsp90 y la identificación de sus proteínas “clientes”.

Estructura

Hsp90 contiene tres dominios altamente conservados: un dominio N-terminal de 25 kDa, un dominio intermedio de 35 kDa y un dominio C-terminal de dimerización de 12 kDa (Figura 1.8). En eucariotas Hsp90, contiene una región cargada entre el dominio N-terminal y el resto de la molécula (Figura 1.8), esta zona es más divergente entre las distintas especies analizadas, variando principalmente en tamaño y composición y si es indispensable para viabilidad en levaduras [113]. Es ampliamente conocida la estructura tri-dimensional del dominio N-terminal [109, 114, 115]. Estos estudios cristalográficos determinaron que el dominio N-terminal contiene el sitio de unión para el ATP, el cual simultáneamente permite la unión de antibióticos del grupo de las ansamicinas-benzoquinonas. Este dominio tiene similitud estructural con otras proteínas como la DNA girasa B, la topoisomerasa dependiente de ATP, y actualmente se puede agrupar a esta proteína, junto con la quinasa de histidinas y la proteína MutL (enzimas

reparadoras de “mismatch” en el ADN), dentro de la novel superfamilia de ATPasas/quinasas GHKL las cuales poseen un tipo de plegado para unir ATP, poco convencional [116]. Todas las mutaciones estudiadas que producen una deficiencia en la unión de ATP o su hidrólisis anulan la función de Hsp90 *in vivo* e *in vitro* [117-119]. Se demostró que la asociación transiente de dos dominios N-terminal, de un homodímero de Hsp90, ocurre en una forma ATP dependiente [96, 120]. Mediante estudios bioquímicos y analogías mecánicas con las proteínas diméricas de la familia GHKL se pudo sugerir que la proteína Hsp90 posee un mecanismo del tipo “abrazadera” dirigida por una actividad ATPasa similar a la encontrada en la DNA girasa y MutL [96, 121] (Figura 1.8).

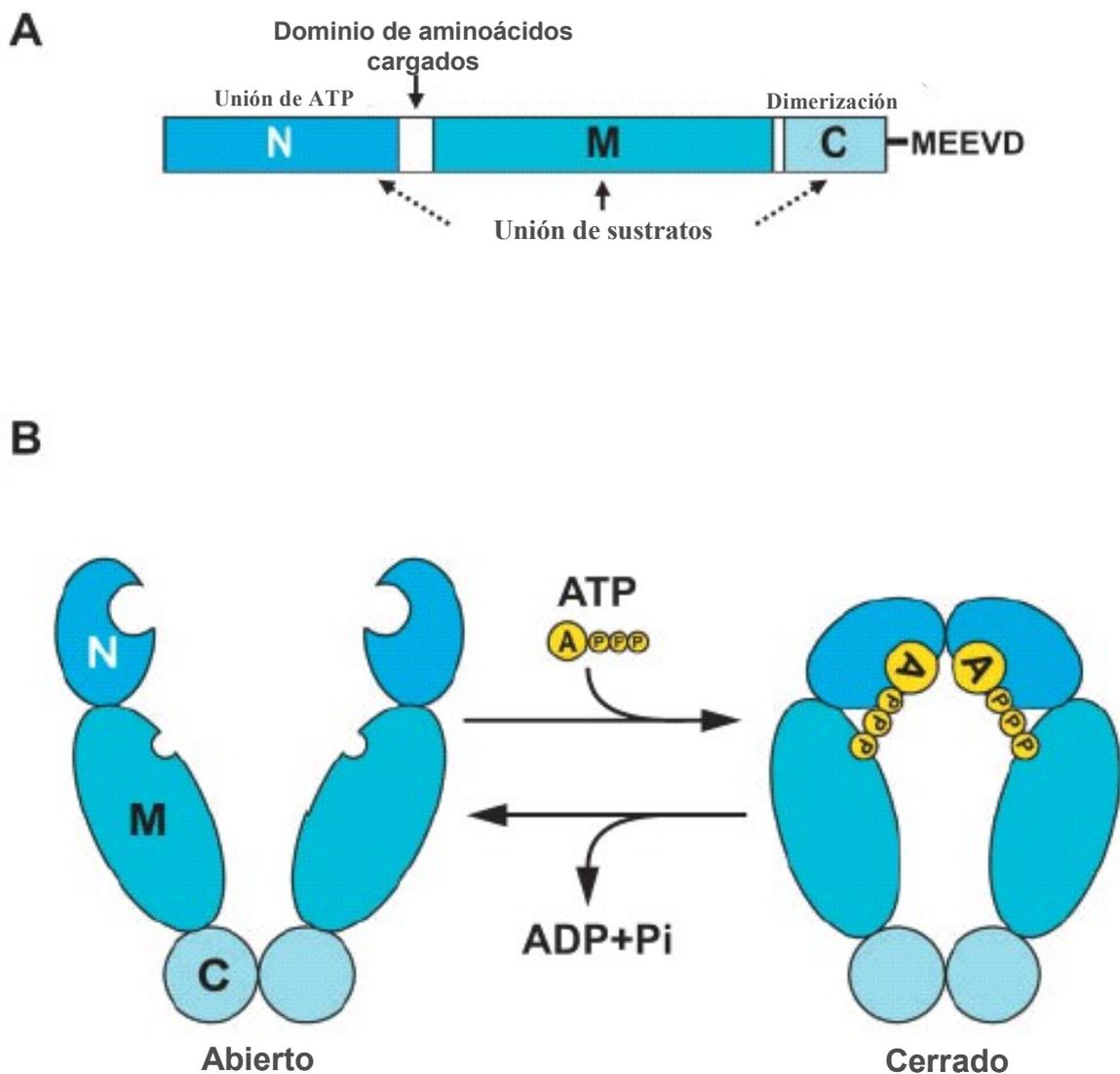


Figura 1.8: Dominios estructurales de la proteína Hsp90. **A.** Disposición de dominios en la Hsp90, N: dominio N-terminal; M: dominio medio; C: dominio C-terminal. **B.** Modelo “abrazadera” dirigido por ATP.

También se pueden encontrar rasgos de importancia en el dominio medio de la proteína, tal como se reportó en levaduras [122]. Teniendo en cuenta que el dominio N-terminal por si solo, no tiene actividad ATPasa [118], mediante estudios estructurales y funcionales, se pudo determinar que el dominio medio de Hsp90 contiene un “loop” catalítico que puede servir de aceptor del fosfato γ del ATP [122] (Figura 1.8B). Así Hsp90 comparte esta característica, de hidrolizar ATP en un dominio adyacente al dominio de unión al nucleótido, con el resto de las proteínas GHKL [116, 122].

Para cada dominio N y C-terminal de Hsp90 se mapeó un sitio de unión a sustratos [123, 124], indicando que la proteína contiene dos sitios chaperona independientes. También se reportó que el dominio medio tiene capacidad de unir sustratos tales como, Akt, la NOS endotelial y p53 [125-127] (Figura 1.8A). Las similitudes estructurales y mecánicas que se encontraron entre Hsp90 y la ADN girasaB sugieren que el dominio medio también estaría involucrado en la unión de proteínas “clientes” [122].

El dominio C-terminal responsable de la homodimerización de Hsp90, es crucial para las actividades *in vivo* de la proteína y para el desarrollo del mecanismo “abrazadera” ATP-dependiente de la misma. La eliminación de este dominio, compromete tanto la viabilidad en levaduras [113, 128], como la capacidad de hidrolizar ATP [96].

En el extremo del dominio C-terminal de Hsp90 citosólica, se encuentra un pentapéptido conservado MEEVD (Figura 1.8A), el cual puede ser reconocido por co-chaperonas que contengan dominios de repeticiones de tetratricopeptidos (proteínas TPR) [129-132]. Al mismo tiempo, los últimos 8 residuos aminoacídicos del extremo C-terminal de la proteína Hsp70 GPTIEEVD, también son capaces de interactuar con los dominios TPR de una manera similar a la que lo hace la proteína Hsp90 [132].

Hsp90 y proteínas clientes

Las hasta ahora conocidas proteínas “clientes” de Hsp90 incluyen, las quinasas de tirosinas transmembrana HER-2/neu, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), MET y el receptor del factor de crecimiento similar de insulina-1 (IGF-1R),

proteínas de señalización metaestables (Akt, Raf-1 e IKK), proteínas de señalización mutadas (p53, Kit, Fit3 y v-src), proteínas de señalización quiméricas (NPM-ALK, Bcr-Abl), receptores de esteroides (receptores de andrógenos, estrógenos, glucocorticoides) y reguladores del ciclo celular (cdk4, cdk6), revisado en [72, 133]. Es interesante que en el caso de IKK, Hsp90 controla a ésta proteína en dos niveles, en la inducibilidad de su actividad enzimática y en su biogénesis [134].

La proteína Hsp90 es regulada por proteínas denominadas co-chaperonas, las cuales participan en una serie ordenada de complejos multi-proteína dinámicos que están conectados con el ciclo ATPasa de Hsp90 [72, 135, 136]. Las proteínas “clientes” de Hsp90 se unen a ella en su estado libre de nucleótido, un estado “abierto” accesible a la captura del ligando cuando los dominios N-terminal se encuentran separados (Figura 1.8B). Así se forman complejos intermediarios que contienen a las co-chaperonas Hsp70, Hsp40, Hip y Hop (heterocomplejos tempranos). Con la unión del ATP, se produce un cambio conformacional que promueve la asociación transiente de los dominios N-terminal de Hsp90 generando el estado “cerrado” el cual rodea a la proteína “cliente” (Figura 1.8B) [120]. Después de la unión del ATP, Hsp90 forma un complejo maduro que contiene a las proteínas P23 y las inmunofilinas (heterocomplejos tardíos) las cuales catalizan la maduración conformacional (estado competente) de las proteínas “clientes” [72] (Figura 1.9).

Si bien existe suficiente evidencia que avala este mecanismo de “abrazadera molecular” acoplada a ATP [96, 121], resulta claro que también es esencial la acción coordinada de las ya nombradas co-chaperonas y la Hsp70 para que se lleve a cabo el ciclo chaperona de Hsp90 dirigido por ATP [72, 95-98]. Uno de los mejores casos estudiados hasta la fecha, es el de la acción de Hsp90 sobre la actividad de los receptores de esteroides. Pareciera ser que Hsp90 conforma complejos con todas las proteínas de señalización a las que modula usando la misma maquinaria multiproteica que regula la función de los receptores de esteroides [137], modulando tanto a la quinasa de tirosinas Fes como al “heat shock transcription factor Hsf1”. Así el estudio del ensamblado de receptor de esteroides-Hsp90 en lisados de reticulocitos llevo a reconocer un sistema mínimo de 5 proteínas intervinientes: Hsp90, Hsp70, Hop, P23 y Hsp40, las cuales trabajan en conjunto para producir los heterocomplejos con actividad de unión de esteroides [72].

En un inicio los receptores de esteroides se unen a la Hsp70 (Hsc70), Hip y la Hsp40 en una reacción dependiente de ATP para formar un complejo inicial receptor·Hsp70·Hip·Hsp40, Hip actúa estabilizando el estado ADP de la proteína Hsp70 en el complejo, y previniendo entonces la liberación de la proteína cliente, antagonizando con Bag-1 [138]. A continuación el receptor es transferido a la forma “abierta”, libre de nucleótido de la Hsp90, esta etapa es inducida por la co-chaperona Hop con su dominio TPR (Figura 1.9, complejo intermedio).

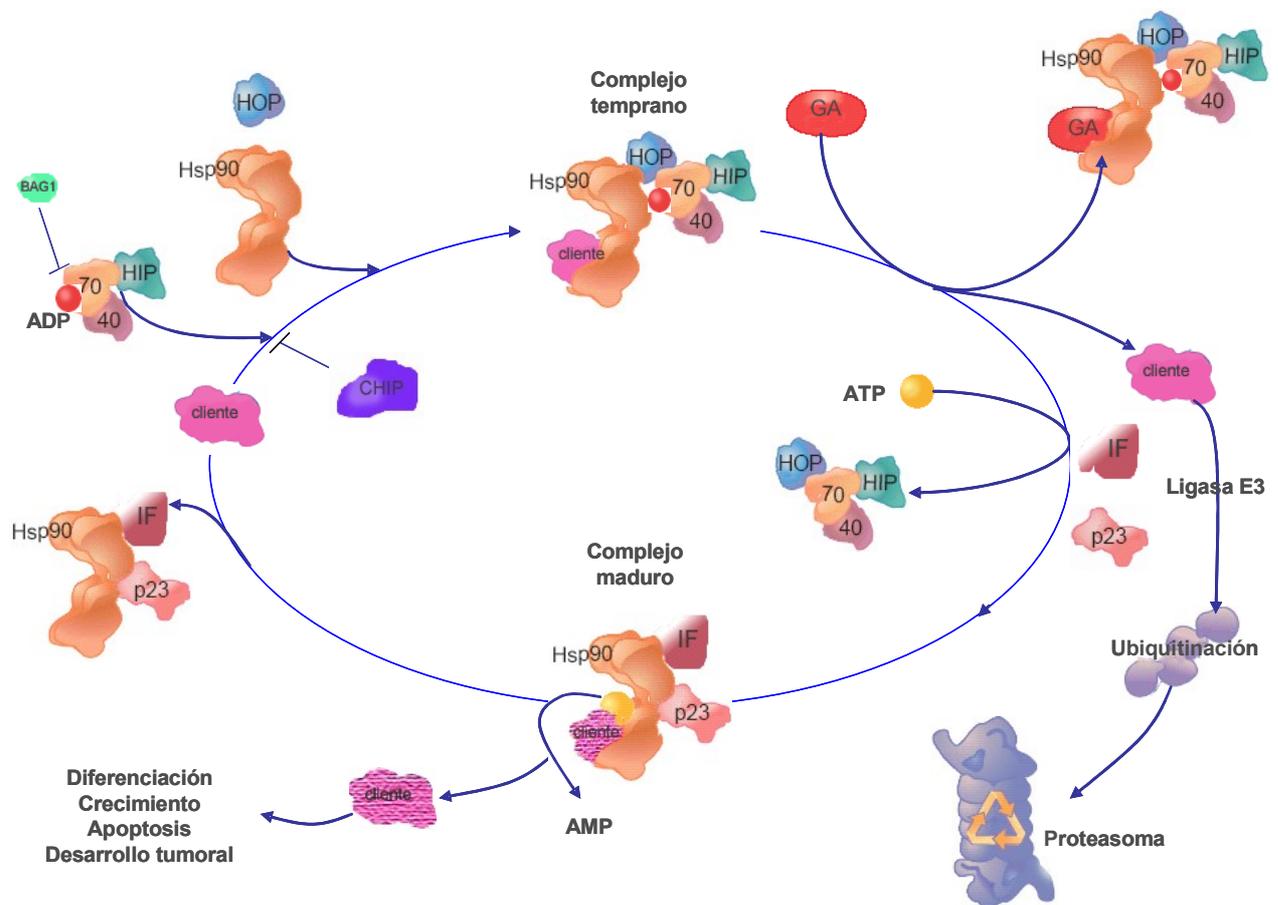


Figura 1.9. Ciclo chaperona de la maquinaria Hsp90/Hsp70. El ciclo chaperona de esta maquinaria, es un proceso dinámico en cuál las proteínas clientes se unen a la Hsp90 en un complejo temprano el cuál contiene las co-chaperonas Hsp70, Hsp40, Hip y Hop. Co-chaperonas como Bag-1 y CHIP impiden la entrada de las proteínas clientes en este ciclo ya sea, estimulando la liberación del ADP unido a la Hsp70 (esencial para la unión de péptidos) o promoviendo la ubiquitinación y posterior degradación de estos sustratos, respectivamente. Luego de la unión y posterior hidrólisis de ATP, la Hsp90 forma complejos maduros conteniendo las proteínas P23 e inmunofilinas (IF), los cuales catalizan la maduración conformacional de las proteínas clientes de la Hsp90. La geldanamicina (GA), inhibidor específico de la función de la Hsp90 uniéndose al bolsillo N-terminal de unión de ATP de la Hsp90 e impidiendo la unión e hidrólisis de ATP, estanca a la Hsp90 dentro de complejos tempranos. La proteína cliente es subsecuentemente ubiquitinada (posiblemente por la ubiquitina ligasa E3) y dirigida al proteasoma para su degradación

Hop puede unir simultáneamente a las proteínas Hsp90 y Hsp70 mediante distintos dominio TPR que contiene (este mecanismo será detallado mas adelante) [132] y a modo de plataforma mediar la asociación de esta dos chaperonas moleculares. Además de unirse al péptido C-terminal MEEVD de Hsp90, Hop también es capaz de interactuar físicamente con el dominio N-terminal de Hsp90, lo cual resulta en la inhibición de la actividad ATPasa de Hsp90. Se cree que esta inhibición se produce previniendo la asociación de los dominios N-terminales del dímero requerida para la hidrólisis del ATP, y no impidiendo la unión de los nucleótidos [121, 131].

Es interesante que luego del accionar de Hop, importante en la transferencia de la proteína “cliente” desde Hsp70 a Hsp90, aparecen en escena las otras dos clases de co-chaperonas P23 y las proteínas TPR denominadas inmunofilinas (por ej. FKBP51, FKBP52 y Cyp40) las cuales entran en el complejo en lugar de Hop (Figura 1.9, complejo maduro). P23 interactúa con Hsp90 cuando está unida a ATP [139, 140] vía el dominio N-terminal de Hsp90 [141], y probablemente estabiliza el estado cerrado de Hsp90 (Figura 1.8B) prolongando la unión de la proteína cliente, por depresión de la actividad ATPasa. El reclutamiento de P23 requiere la asociación de los dominios N-terminal del dímero Hsp90 [114, 140], esto es contrarrestado por Hop que previene esta asociación [99, 142]. Es de destacar que en este contexto la inmunofilina FKBP52, la cual presenta una actividad peptidilprolil isomerasa, potencia la maduración del receptor de glucocorticoides [72, 143]. Así se observa que P23 y las inmunofilinas actúan juntas en el complejo Hsp90 [95, 99, 144]. Teniendo en cuenta que las inmunofilinas forman parte de los heterocomplejos de Hsp90 en forma simultanea con la proteína P23 [95, 99, 144] (Figura 1.9), y que Hop es desplazada de Hsp90 por las inmunofilinas debido a que compiten por el mismo sitio de unión (mediante el dominio TPR que poseen) en el extremo C-terminal de Hsp90 [131], se sugiere que actuarían como transformadoras de complejos intermediarios a complejos maduros [95, 99] (Figura 1.9). Mientras que las inmunofilinas tienen un muy bajo efecto estimulador sobre la actividad ATPasa de Hsp90 [145, 146], la co-chaperona Aha1 es capaz de estimular esta actividad [146, 147], y ambas co-chaperonas pueden actuar en forma sinérgica [146]. Finalmente, luego de la hidrólisis del ATP, las proteínas “clientes” y las co-chaperonas se disocian de Hsp90, quedando habilitada así para iniciar un nuevo ciclo (Figura 1.9).

Las proteínas quinasas, pertenecen a una extensa clase de proteínas “clientes” de Hsp90, las cuáles requieren la estabilización otorgada por la misma previa la recepción de la señal apropiada. Durante este período, las proteínas son mantenidas en un estado inactivo, el cual es propenso a la desnaturalización, de una manera similar a la observada para los receptores de esteroides [95, 97]. Por otro lado, a diferencia de lo que ocurre con los receptores de esteroides, dónde es Hop quien recluta a proteínas “clientes” unidas a Hsp70, en el caso de las proteínas quinasas esta acción es llevada a cabo por otra co-chaperona la proteína Cdc37 [72, 95-98]. Cdc37 es capaz de unirse simultáneamente a Hsp90 y a las proteínas “clientes” [148-150]. Esta co-chaperona se une a las proteínas “clientes” vía su dominio N-terminal [148, 149], por otro lado al no contener ningún tipo de dominio TPR, compite con Hop por un sitio de unión en Hsp90, obviamente por otra vía [151]. Fue necesario conocer la estructura cristalográfica del núcleo del complejo Hsp90–Cdc37 [152], para conocer que, a diferencia de la interacción de Hop con el dominio C-terminal de Hsp90, es el dominio C-terminal de Cdc37 el que se une al estado abierto del dominio N-terminal de Hsp90, lo cual aparentemente previene las alteraciones conformacionales críticas para la actividad ATPasa de la misma [151]. Ambas co-chaperonas actuarían como “cargadoras” de proteínas “clientes” en los complejos Hsp90, manteniendo separados los dos dominios N-terminales (“abrazadera” abierta), facilitando de esta manera, la carga. Así fue como recientemente se sugirió que ambas proteínas no son incompatibles, mas bien actúan en forma cooperativa en la carga de los distintos tipos de proteína clientes en el sistema de Hsp90 [98, 144, 153].

Luego de su formación los complejos maduros de Hsp90 difieren, según sea el tipo de proteína “cliente” unida. Los complejos quinasas·Hsp90 selectivamente unen Cdc37, tal es el ejemplo de src, cdk4 y raf [154-156], mientras que los complejos de factores de transcripción·Hsp90 unen principalmente inmunofilinas con dominios TPR [157]. Esta selección se da porque las proteínas quinasas se unen mediante su dominio catalítico con Cdc37 [148, 155] y a su vez, se observó que los complejos receptores de esteroides·Hsp90 unen inmunofilinas TPR que directamente se unen al mismo tiempo con los mismos factores de transcripción del complejo [158, 159].

Finalmente es de destacar que la maduración del receptor de glucocorticoides (GR) es también dependiente de la acetilación de la proteína Hsp90, regulada por la

proteína deacetilasa (HDAC6), de tal modo que la proteína Hsp90 acetilada esta impedida de formar el heterocomplejo-Hsp90 [160, 161].

CO-CHAPERONAS

Dominios TPR y proteínas con dominios TPR

Se demostró que las proteínas contenedoras de dominios con repeticiones de tetratricopéptidos (TPR) están involucradas en procesos reguladores del ciclo celular, control de la transcripción, importación de proteínas y transducción de señales [162]. Los dominios TPR contienen entre 1 a 16 repeticiones en tandem de 34 residuos aminoacídicos. Se sugirió que el tamaño usual, de un dominio, es de tres repeticiones de TPRs, debido a que es el número normalmente encontrado entre las proteínas TPR para obtener un dominio funcional, de esa manera, cuando se encuentran más repeticiones habría mas dominios funcionales. Las proteínas TPR mejor estudiadas y caracterizadas hasta el momento, son aquellas involucradas en la maduración de los heterocomplejos Hsp90. Así fue como se pudo determinar la estructura cristalográfica de varias proteínas TPR asociadas al sistema Hsp90. Esta lista incluye a la protein-fosfatasa 5 (PP5) [163], Hop [132] y las inmunofilinas Cyp40 [164], FKBP51 [165] y FKBP52 [166]. Estas proteínas poseen entre uno y tres dominios TPR. Los estudios estructurales permitieron, primero para PP5 [163] y luego para las demás, demostrar que estos dominios adquieren una estructura helicoidal canónica. En esta estructura canónica cada repetición de 34 residuos forma un par de α -hélices de tamaño similar con una vuelta comprimida entre cada hélice. Estas repeticiones se apilan entre ellas en un arreglo paralelo produciendo una súper hélice con giro a la derecha, en la cual se forma una superficie cóncava como parte del extremo N-terminal de las hélices de cada par (hélices 1, 3 y 5). Esta superficie se extiende por una séptima hélice C-terminal en el caso de PP5. La estructura cristalográfica de Hop mostró que esta superficie cóncava del dominio TPR conforma el sitio de unión fisiológico al pentapéptido MEEVD del extremo C-terminal de Hsp90 [132]. Este péptido interactúa extensivamente con los residuos de las hélices 1, 3 y 5, el grupo carboxilato del residuo aspartato terminal del péptido forma puentes salinos con el residuos conservados de lisinas en las hélices 1 y 5 del dominio.

HIP

Hip es una proteína homo-oligomérica que coopera con Hsp70 en el plegado de proteínas estabilizando el estado de unión a ADP de esta chaperona. Hip se une al dominio ATPasa de la Hsp70, cuando ésta pasa al estado de unión a ADP por acción de proteínas de la familia de la Hsp40 [78]. Posee un dominio TPR que permite la unión a la Hsp70, el cual además está flanqueado por una α -hélice cargada. El extremo N-terminal contiene el dominio requerido para la oligomerización de Hip. En su forma monomérica Hip mantiene la habilidad de unión a la Hsp70, por lo cual la homo-oligomerización no es necesaria para la interacción con esta chaperona [167].

Como ya fue mencionado, Hip está considerado como una componente funcional en los estados intermediarios en el accionar de los heterocomplejos de la maquinaria de la Hsp70/90. Es interesante destacar que *S. cerevisiae* aparentemente no tiene un gen homólogo a Hip. Dado que el modelo de maduración del receptor de esteroides que pudo recrearse en *S. Cerevisiae* resultó ser funcional [168], podría argumentarse que Hip no sería absolutamente necesaria, o que en este organismo su función es reemplazada por otra proteína. Las mutaciones en el dominio DP (por repeticiones de aspartato-prolina) en la región C-terminal de la proteína Hip, no impidieron el ensamblado de Hip a Hsp70 y la interacción al receptor de progesterona, pero la mutación inhibió el ensamblado del receptor a Hsp90 [169]. Empleando el modelo de levaduras (que tampoco poseen la proteína Bag-1, antagonista funcional de Hip) se observó que Hip aumenta la función del receptor de GR, pero no el de mineralocorticoides y de estrógenos, indicando una función independiente de Bag-1 para Hip [170]. Mas aún, se observó que el aumento de la actividad GR por la proteína Hip no requería de su unión a la proteína Hsp70, indicando también una actividad independiente de Hsp70 para esta co-chaperona.

CHIP y Bag-1

Aparte de estos reguladores positivos de la actividad de la Hsp70, ya mencionados, existen dos reguladores negativos CHIP y Bag-1. CHIP, es también una proteína TPR

que inhibe la actividad ATPasa de la Hsp70 [171] impidiendo la formación de un complejo estable entre la Hsp70 y el sustrato a re-plegar. Bag-1, fue denominada originalmente como proteína asociada a Bcl [172], se expresa en varias isoformas, originadas a partir de varios inicios de transcripción, pudiendo todas inhibir la actividad recuperadora de proteínas de la Hsp70 *in vitro* [167, 173] e *in vivo* [174]. También se identificaron varias proteínas del tipo Bag-1 [175]. Todas estas proteínas comparten una región conservada de 40–50 aminoácidos (dominio “BAG”) y compiten con Hip por la unión al dominio ATPasa de la Hsp70 *in vitro* [167, 173, 175, 176].

HOP

La co-chaperona de ratón inducible por estrés 1 (mSTI1) es homóloga a la ya mencionada proteína humana Hop (por “heat-shock protein 70 (Hsp70) /heat-shock protein 90 (Hsp90) organizing protein”) y de la proteína inducible por estrés de levaduras 1 (STI1) [79]. Hop actúa como una proteína adaptadora, mediando la asociación de la Hsp70 y Hsp90 vía dominios TPR independientes [132, 177]. Hop tiene 3 dominios TPR, uno de ellos, TPR1, se une a la región C-terminal (EEVD) de Hsp70, aparentemente en combinación con TPR2B [170, 178]. El dominio TPR2A se une al péptido C-terminal (MEEVD) de la proteína Hsp90, [132]. A su vez, la proteína Hop presenta 2 dominios llamados DP1 y DP2 (repeticiones de aspartato-prolina), se observó que la delección de DP2 anula la función de Hop [178]. Aparentemente el dominio DP en la región C-terminal de la proteína Hip serviría para unirse a la co-chaperona Hop o para alterar la conformación de la proteína Hsp70 asociada al receptor, para facilitar la interacción de esta con la proteína Hop [129]. Se observó que mSTI1 asociada con la Hsc70 y Hsp90, se localiza mayormente en el citoplasma [179, 180]. Recientemente, se observó que, si bien, la proteína mSTI1 es exclusivamente citoplasmática en la mayoría de las células bajo condiciones normales, se podía encontrar en el núcleo de una subpoblación de células y en la totalidad de las células luego de la inhibición de la importación nuclear o el arresto de la división celular [181].

P23

P23 es una co-chaperona participante en los heterocomplejos proteína·Hsp90. Fue descrita, en un principio, como componente del complejo del receptor de progesterona maduro [80]. P23 se puede unir directamente a Hsp90, aún en ausencia de sustrato [80], siendo esta interacción dependiente de ATP [182]. Teniendo en cuenta que P23 estabiliza el estado de unión a nucleótido de Hsp90 y que retarda la hidrólisis de ATP [145, 183, 184], se considera que esto serviría para estabilizar los complejos proteína·Hsp90 [177]. Además de estar involucrada en la maduración de receptores de esteroides, P23 también tiene importancia en el correcto plegado sustratos de Hsp90 como lo son la transcriptasa reversa y la enzima telomerasa [185, 186]. *In vitro*, se pudo determinar que P23 posee actividad del tipo chaperona, uniéndose a proteínas parcialmente plegadas impidiendo, de esta manera, la agregación y manutención del estado competente de dichas proteínas [187, 188]. Entre estas actividades independientes de Hsp90, se pudo observar que P23 juega un rol importante en la síntesis de prostaglandina E2 (PGE2) [189]. También se observó que P23 es blanco de caspasas que son activadas en apoptosis [190]. La proteína P23 es clivada por las caspasas, teniendo la forma truncada baja actividad anti-agregante, declinando en la actividad de síntesis de PGE2 y probablemente aboliendo la actividad chaperona de Hsp90. Un primer intento de “knock out” en homocigosis de P23 en ratones demostró ser letal al nacimiento, permitiendo cierto desarrollo del embrión [191].

Inmunofilinas

La isomerización trans/cis de uniones péptido-prolina es un paso limitante en el plegamiento de proteínas [192-194]. Las enzimas catalizadoras de este paso se denominan peptidil-prolil-cis/trans isomerasas (PPIasas). Hasta el momento se caracterizaron tres subfamilias de este tipo de enzima: FKBP, ciclofilinas y parvulinas [195]. Las FKBP y las ciclofilinas, son inhibidas por drogas inmunosupresivas [194, 195] y por esto son denominadas inmunofilinas. Se encontraron en complejos con Hsp90 a las PIasas de peso molecular de 40-54 kDa, las denominadas PPIasas (FKBP51, FKBP52, Cyp40 y los homólogos en levaduras Cpr6 y Cpr7). Las ciclofilinas (Cyps) se

unen a ciclosporina A [196, 197], mientras que las proteínas FKBP se unen a macrólidos como FK506 [198].

Una vez que una proteína, factor de transcripción o receptor, es activado en la membrana plasmática o el citoplasma y habilitado para transmitir una “señal” en el núcleo celular, se hace necesaria la presencia de mecanismos que permitan este transporte. Los receptores de esteroides mostraron ser estupendos modelos para estudiar este tipo de movimiento intracelular. Los heterocomplejos·Hsp90 que unieron receptores de hormonas esteroideas se unen a una o varias inmunofilinas (FKBP52, FKBP51, o CyP-40) o bien a la proteína homóloga a inmunofilinas PP5, a través del dominio TPR que estas contienen [72]. Estos receptores de esteroides continuamente se mueven del citoplasma a núcleo y viceversa, a través del sistema de microtúbulos, siendo la unión de los mismos al heterocomplejo·Hsp90 y a la inmunofilina la que permite este tráfico [157]. El papel de las inmunofilinas es la de conectar a la proteína cliente unida al heterocomplejo·Hsp90 con la dineína citoplásmica, el complejo proteico responsable del movimiento retrogrado hacia el núcleo, [157]. Las inmunofilinas se unen directamente con la cadena intermedia del complejo dineína a través de su dominio PPIasa [199]. La proteína fosfatasa PP5 fue recuperada del heterocomplejo·Hsp90 asociado a GR tanto en el núcleo como en el citoplasma [200, 201], y posteriormente se observó que se une a Hsp90 por sus dominios TPR, compitiendo con las otras inmunofilinas [201].

Hsp90 y terapia

En el caso de células tumorales se encontraron complejos super-chaperona donde Hsp90 interactúa con proteínas “clientes” oncogénicas involucradas en transducción de señales, regulación del ciclo celular y apoptosis [142]. Así fue como despertó un gran interés la proteína Hsp90 como blanco de drogas, debido a su capacidad de unir específicamente y ser inhibida por el antibiótico natural de la clase de benzoquinonas ansamicinas, la geldanamicina (GA) [109, 202]. La inhibición de Hsp90, como ya fue indicado, conlleva a la degradación de múltiples proteínas claves que dependen de la interacción con Hsp90 para mantener su conformación, estabilidad y función. Ejemplos de estas proteínas son, v-src, c-Raf-1, c-erbB2, met, CDK4, p53, Bcr-Abl, y los receptores de esteroides [110, 203-205]. La GA mostró tener una potente

actividad anti-tumoral *in vitro* pero es altamente hepatotóxica para su uso clínico [206]. El derivado de geldanamicina 17-allilaminogeldanamicina (17-AAG) es mucho menos tóxico y también se une a Hsp90 [207] y demostró poseer una potente actividad anti-tumoral en modelos pre-clínicos [206, 208], de manera que recientemente se comenzó a estudiar su eficacia en protocolos de ensayos clínicos [209], habiendo superado la fase I de ensayo clínico, y actualmente comenzando la fase II [210, 211]. Se comprobó que la proteína Hsp90 de células tumorales poseía mayor afinidad a GA que aquellos derivados de células y tejidos normales [212, 213]. Este incremento de afinidad se debe a que Hsp90 en las células tumorales esta principalmente en forma de complejos, mientras que en células normales esta está desacomplejada y en estado latente. Según el reporte del último congreso internacional de Hsp90, el tratamiento de tumores en ratón con 17-AAG aumento la destrucción de células tumorales [191]. No obstante la droga 17-AAG es poco soluble y no se puede dar en forma oral, razón por la cual otras benzoquinonas están siendo estudiadas [191, 214]. Si bien las investigaciones están focalizadas en la búsqueda de las drogas antitumorales con afinidad a Hsp90, el efecto de la GA en el bloqueo de procesos infectivos también fue explorado. La GA demostró bloquear el crecimiento de *P. falciparum* en eritrocitos [89, 215]. A su vez se demostró que la GA actúa en forma sinérgica con la ciclosporina A (CysA), que actúa sobre las ciclosporinas y calcineurinas, para inhibir el crecimiento del parásito en eritrocitos [216]. Se advirtió que esta inhibición era mediada por el complejo de CysA con Cyp19A y Cyp19B del parásito. En este trabajo se observó también que la GA bloqueó la unión de PfPP5 con la proteína Hsp90, aunque ese efecto no era producido por CysA. En *T. cruzi*, el tratamiento de epimastigotes con GA impide su diferenciación, arrojándolo a la fase G1 del ciclo celular [92].

En *T. gondii* también se caracterizó una inmunofilina con dominio TPR, la cual se denominó TgFCBP57, ya que tiene un dominio FKBP (FK506-binding protein) y otro Cyp40 (ciclofilina) de 57-kDa [217]. Cada uno de los dominios, en presencia de su respectivo inhibidor (CysA y FK506 respectivamente), fueron capaces de inhibir la actividad fosfatasa de las calcineurinas purificadas de *T. gondii*. Dichas drogas también inhibieron la replicación de taquizoitos de *T. gondii in vitro*, al igual que un experimento de “knock down” por dsRNA correspondiente a FCBP57. También se observó que la

inhibición de Hsp90 por parte de la GA produce un decrecimiento de la invasión y la replicación intracelular de taquizoitos de *T. gondii* [218].

***T. gondii* es un parásito intracelular obligado y patógeno humano de importancia. El desarrollo asexual es un aspecto vital en el ciclo de vida del parásito, el cual, habilita su transmisión y evasión de la respuesta inmune del huésped. Muy poco se conoce de los factores y procesos que regulan su desarrollo. Tal conocimiento podría proveer una mayor comprensión de la patogénesis para el futuro desarrollo de novedosas estrategias terapéuticas. La chaperona molecular Hsp90 es responsable de la estabilización y maduración de numerosas proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular, transducción de señales y transcripción, convirtiéndose en un factor clave para el control del crecimiento, desarrollo y supervivencia de la célula.**

Los objetivos de esta tesis doctoral fueron los siguientes:

- **Analizar la modulación de la expresión, localización subcelular e importancia de la proteína Hsp90 de *T. gondii* durante el desarrollo del parásito.**
- **Identificar las distintas co-chaperonas que intervienen junto a la Hsp90 en la regulación de variadas funciones celulares del parásito.**
- **Determinar el efecto de inhibidores de la Hsp90 en el desarrollo de *T. gondii*.**

2. Materiales y Métodos

Origen del clon del ADN copia de Hsp90, secuenciado y análisis de secuencia.

Se identificaron ADNc copia con alta homología a la proteína Hsp90, en la base de datos del proyecto “expressed sequence tag” (EST) de *T. gondii* (<http://genome.wustl.edu/est/index.php?toxoplasma=1>). El ADNc descrito en este trabajo es el clon TgESTzyd42c07.y1 de *T. gondii*. Los plásmidos pBluescript fueron extraídos del vector lambda ZAP mediante el uso del sistema ExAssist (Stratagene). El ADN plasmídico fue secuenciado mediante el uso del sistema Perkin Elmer ABI 377 y del BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer, USA). La secuencia de Hsp90 de *T. gondii* esta a disposición en la base de datos GenBank™ con el siguiente numero de acceso AY344115.

Todas las búsquedas en base de datos, el análisis de comparación de secuencias y el análisis de los dominios putativos se realizaron utilizando los programas Blastn, Blastx, Blast 2 y Blast domain (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast) y www.ToxoDB.org. El programa BCM search launcher programs (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu>) se utilizó para obtener los marcos de lectura abierto (ORF) putativos. El programa PSORT II (<http://psort.nibb.ac.jp/>) se utilizó para encontrar dominios posibles. Para comparar esta proteína con otras Hsp90 conocidas se realizó un alineamiento de la secuencia aminoacídica deducida de la proteína Hsp90 de *T. gondii* y de otras Hsp90 utilizando un programa del tipo clustal (MAFFT), en el mismo sitio se pueden construir árboles filogenéticos del tipo N-J (<http://protevo.eb.tuebingen.mpg.de/toolkit/index.php?>). También se realizó un modelado predictivo de TgHsp90, buscando previamente estructuras de otras Hsp90 ya analizadas por el uso del “SWISS-MODEL Blast” (http://swissmodel.expasy.org/SM_Blast.html) que sirvan de modelos en los cuales se basan los programas presentes en “SwissModel First Approach” (http://swissmodel.expasy.org/SM_FIRST.html), para producir un modelado predictivo de la proteína TgHsp90.

Determinación de la secuencia nucleotídica y aminoacídica de proteínas novedales de *T. gondii*.

Se identificaron las secuencias codificantes para proteínas similares a las ya descritas pertenecientes a la maquinaria Hsp90/Hsp70 (Hip, P23, Hop y Hsp40) en el genoma de *T. gondii*. La metodología utilizada se resume en la Figura 2.2. Cabe aclarar que las proteínas predichas obtenidas, pueden tener variantes representadas en el genoma de toxoplasma. Basándose en análisis de homología con ortólogos de la proteína buscada (por alineamientos del tipo clustal), detección de dominios y motivos putativos, y predicción de estructura 2^{ria} y 3^{ria}, se puede decidir entre todas las variantes cuál tiene mayor potencialidad de ser la proteína buscada. Una vez determinadas las secuencias codificantes se procedió al diseño de cebadores que permiten la amplificación de la secuencia de interés por PCR (usando como molde una biblioteca de ADNc de *T. gondii*), y a su vez, agregan sitios reconocidos por enzimas de restricción, convenientes para su posterior subclonado. A continuación, se clonaron los fragmentos amplificados en pGEM T easy vector (Promega) o vector TOPO (Invitrogen). Luego de la confirmación de la secuencia buscada por secuenciación, se procedió al subclonado en vectores de expresión como pQE o pRSET, para la expresión de las proteínas deseadas y posterior producción de anticuerpos.

Predicción de estructura 2^{ria} y 3^{ria} de las proteínas estudiadas

En los casos en que la proteínas de *T. gondii* estudiadas tenían correlatos en proteínas extensivamente analizadas en humanos, mamíferos, levaduras y bacterias, con secuencias, estructuras 2^{rias} y 3^{rias} características, se procedió a la aplicación de métodos predictivos como se explica en el esquema de la Figura 3.3 a modo de determinar niveles de homología entre proteínas.

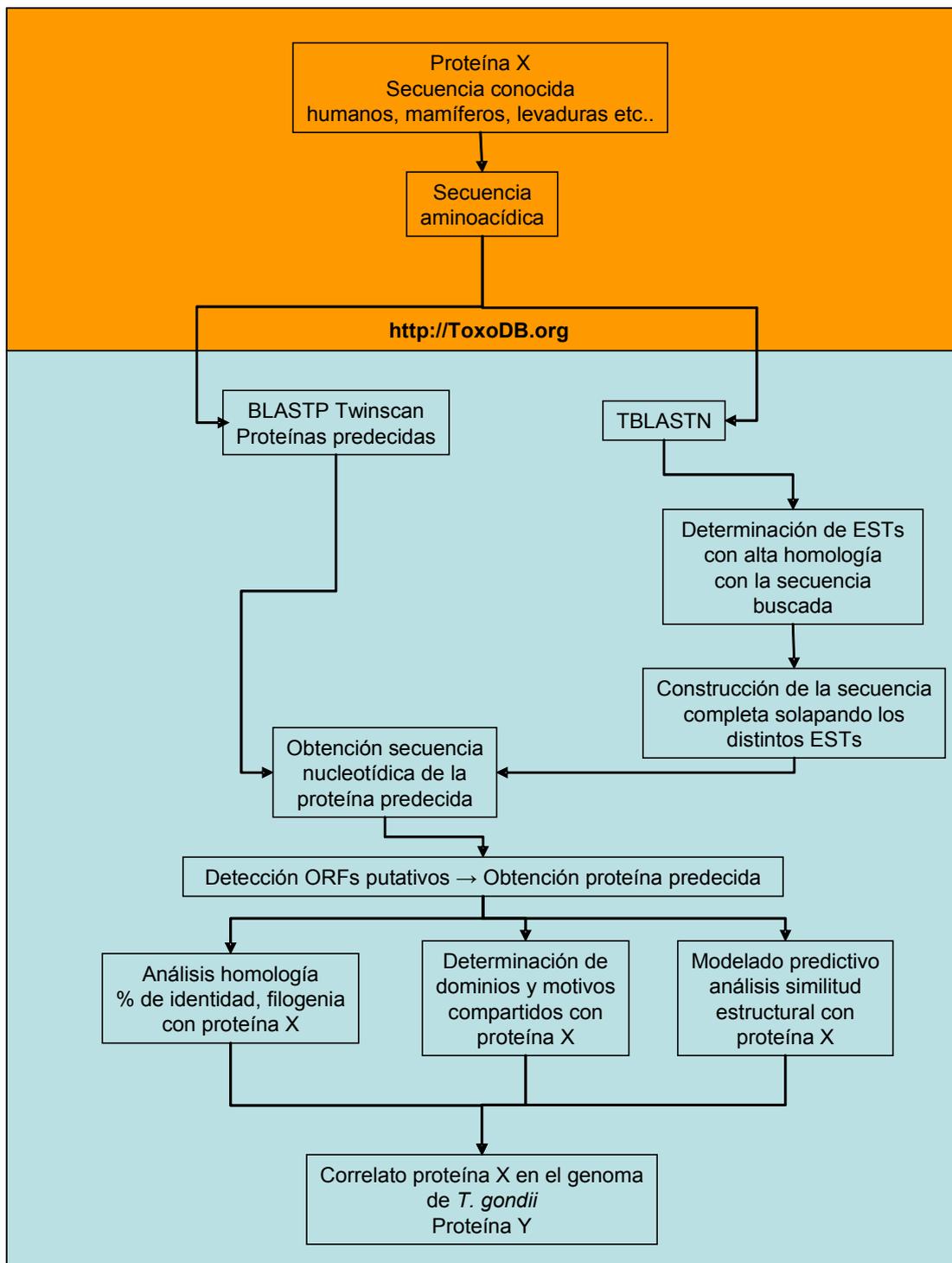


Figura 2.1: Identificación de proteínas noveles de *T. gondii*. El esquema muestra que a partir de una secuencia aminoacídica conocida, se pueden obtener en la base de datos del proyecto genoma de *T. gondii*, secuencias nucleotídicas (a partir de la base de datos de ESTs) y/o aminoacídicas (a partir de la base de datos de proteínas predecidas “Twinscan”, o de la base de ORF>50aa traducidas de ESTs). A estas secuencias obtenidas se les puede confirmar su similitud con proteínas conocidas analiza diversos factores como la identidad, filogenia y predicción de dominios y motivos presentes, y estructuras secundarias y terciarias. BLASTP: BLAST de secuencia aminoacídica de proteína conocida vs. secuencia aminoacídica predecida de *T. gondii*. TBLASTN: BLAST de secuencia aminoacídica de proteína conocida vs. secuencia traducida de ADN, presente en la base de datos ESTs de *T. gondii*.

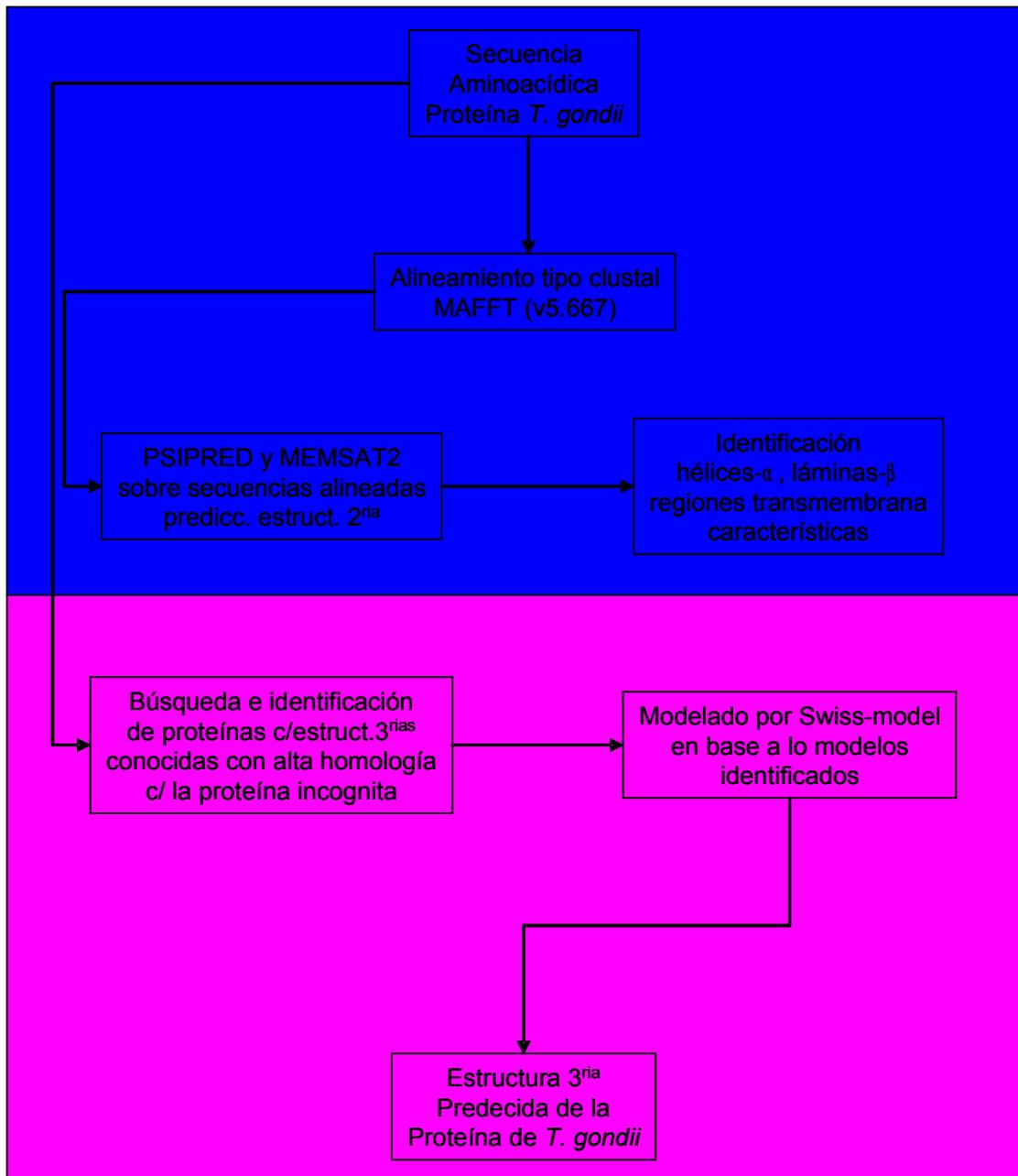


Figura 2.2: Metodología utilizada en la predicción de estructura 2^{ria} y 3^{ria} de proteínas noveles de *T. gondii*. El esquema muestra que a partir del hallazgo de la secuencia aminoacídica de proteínas de *T. gondii*, se pueden determinar niveles de homología con proteínas ya conocidas. Por alineamiento de la secuencia 1^{ria} con secuencias provenientes de variados organismos mediante uso de programas del tipo clustal se reconocen las secuencias y dominios conservados, con el mismo alineamiento y el uso de programas PSIPRED y MEMSAT2 (ambos tipos de alineamientos son accesibles en <http://protevo.eb.tuebingen.mpg.de/toolkit>) se detectan estructuras 2^{rias} conservadas. En el sitio “SWISS-MODEL Blast” (http://swissmodel.expasy.org/SM_Blast.html) se pueden determinar los modelos de estructuras 3^{rias} de proteínas ya analizadas, que serán útiles para construir un modelo predictivo de la proteína novel mediante “SwissModel First Approach” (http://swissmodel.expasy.org/SM_FIRST.html). Los modelados obtenidos se deben confirmar usando otros métodos de modelado predictivo.

Diferenciación y manipulación *in vitro* de los parásitos

Los parásitos mutantes RH *UPRT* pueden ser utilizados para realizar experimentos de diferenciación de taquizoito a bradizoito *in vitro* en condiciones de cultivo a bajas presiones de CO₂, condición que produce un hambreado de pirimidinas [219]. La casi anulación del CO₂ se logra infectando con un bajo inóculo (parasito/célula huésped tasa <1:10) a fibroblastos humanos (human foreskin fibroblast (HFF)) en monocapa crecidas y mantenidas en medio mínimo esencial (Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) con 10% de suero fetal bovino SFB (Gibco) sin NaHCO₃ pero con el agregado de 25 mM HEPES. Los cultivos se equilibraron a pH 7 e incubaron a 37 °C con una presión ambiente de CO₂ (0,03%). En otros experimentos la droga inhibidora de la proteína Hsp90 denominada geldanamycin (GA) se usó a la concentración de 100nM o como control se agregó DMSO en el mismo medio de cultivo y bajo las mismas condiciones. A los 4 días, se puede observar en las vacuolas varias señales de conversión a quiste: la replicación de los parásitos disminuye y la aparición de la pared quística se hace evidente [219]. Se controló la inducción a bradizoito bajo este método mediante la detección de la pared quística utilizando la lectina de *Dolichos biflorus* [220] (Fig. 2.3).

También se empleó la cepa PK, un clon aislado de la cepa cistogénica de *T. gondii* Me49 [221]. Para que los taquizoitos diferencien a bradizoitos *in vitro*, se utilizó el método de inducción por pH alcalino [24]. De esta manera sobre una monocapa confluyente de fibroblastos humanos (HFF) se inocularon aproximadamente 2×10^5 taquizoitos PK en cada pocillo de una placa de 24-“wells” o 10×10^6 en una placa de cultivo de 8 cm diámetro los cuales fueron crecidos bajo condiciones normales de crecimiento (taquizoitos) durante 4 h a un pH 7,2, con una presión de 5% CO₂ de esta manera se permite la invasión y el crecimiento inicial. Después se remueve el medio y se lo reemplaza por medio de inducción (RPMI/ HEPES, pH 8.1, 5% suero fetal bovino) y se ubica el cultivo en estufa a 37°C (con CO₂ 0,03% ambiente). En otros experimentos se agregó, GA 100 nM o DMSO, como control, al mismo medio de cultivo y bajo las mismas condiciones. Cada dos días se reemplaza el medio de cultivo por medio fresco. A los 2 días de cultivo bajo estas condiciones se observan signos de conversión a bradizoito: las vacuolas se redondean mostrando parásitos empaquetados,

en comparación con las rosetas aplanadas que se pueden observar en el estadio taquizoito; también la división celular se reduce. En este caso para comprobar la inducción a bradizoito se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos contra la superficie de taquizoitos SAG1 o específicos para bradizoitos como lo son los anticuerpos monoclonales que reconocen la proteína P34 o P21 [85], también se usó la detección de la pared quística utilizando la lectina de *Dolichos biflorus* (LDB) [220] (Fig.2.3). En ambos modelos para la purificación de bradizoitos se procedió a la remoción del medio de cultivo, se lavaron las células una vez con PBS, luego se raspan las células y se las pasa 5 veces por una aguja de 27-gauge, y a continuación por una de 30-gauge para liberar a los parásitos de la célula huésped. Luego se centrifuga a los parásitos a 1800 r.p.m. durante 10 min a temperatura ambiente para luego resuspenderlos en PBS estéril y contarlos en una cámara de Neubauer. Los taquizoitos se obtienen creciéndolos en las condiciones normales de cultivo y se los procesa en forma similar salvo que para liberarlos solo se utiliza la aguja de 27-gauge. Ambos estadios se purifican pasándolos por un filtro de 3 μm - de tamaño de poro (Nucleopore) con el fin de eliminar los restos de material de la célula huésped.

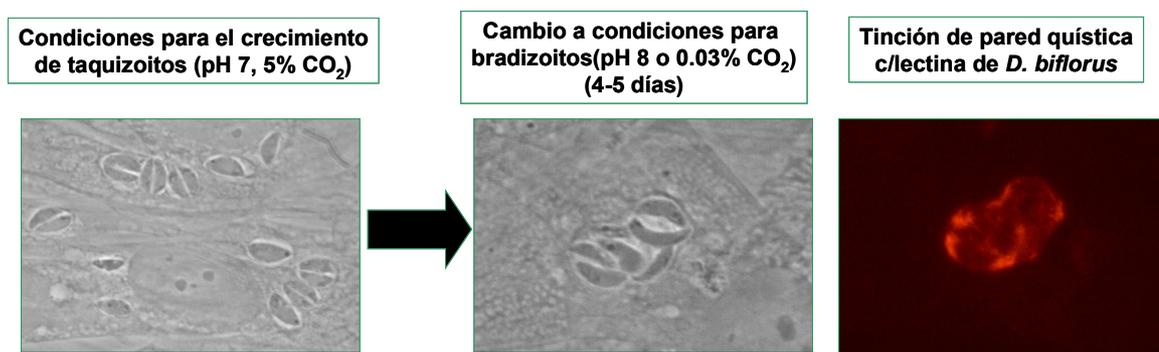


Figura 2.3: Modelo *in vitro* de desarrollo a estadio bradizoito. Este modelo se basa en someter a las condiciones de cultivo a una deficiencia de CO₂ (cepa RH Δ UPRT-) o en estrés alcalino (cepa Me49). El resultado positivo de esta inducción se puede determinar por la detección de la pared quística de la vacuola parasitófora de bradizoitos, mediante la unión específica a esta de la lectina de *D. biflorus* acoplada a rodamina.

Ensayos de RT-PCR

Se transcribió en forma reversa un μg de ARN total purificado tanto taquizoitos cultivados a 37°C , taquizoitos estresados durante 2 hs a 42°C como de bradizoitos diferenciados en un buffer que contenía 1 mM del cebador reverso correspondiente, 2 mM de dNTP y 25 U de AMV reverse transcriptase (Promega). Luego la mezcla de reacción es inactivada a 70°C por 15 min. La reacción de PCR se realizó utilizando diluciones seriadas al décimo de estos ADNc copias producidos en el paso anterior usando en este caso 2,5 U de Taq DNA polymerase (Promega) en 50 μl de reacción donde también se agregó 10 mM Tris-HCl (pH 9), 50 mM KCl, 0,1% Tritón X-100, 1,5 mM MgCl_2 , 200 mM de dNTP y 100 pM de cada cebador. Las condiciones de ciclado térmico fueron las siguientes: (1) desnaturalización a 94°C por 1 min; (2) “annealing” a $55\text{--}65^\circ\text{C}$ (dependiendo de cada par de cebadores); (3) elongación a 72°C por 2 min, realizando 35 ciclos de estos tres pasos; (4) y al final un paso adicional de extensión se realiza a 72°C por 10 min. Para asegurarse que se utilizaron cantidades equivalentes de ADNc en el estudio comparado, como control se utilizaron además cebadores derivados de el gen codificante para la proteína α -tubulina de *T. gondii* [222], 5'-CGACGGTGGGGTCCAAAT-3' y 5'-GAGCTCTTCTGCCTGGAA-3'. El par de cebadores específicos para amplificar el fragmento de la *T. gondii* Hsp90 [223] fueron 5'-TTGGTCACTTCCGAGTAC-3' y 5'-ATCTTCCTCGGCGCGGCAA-3'. Los productos de PCR separados por electroforesis en geles de agarosa, luego teñidos con bromuro de etidio, estos geles fueron digitalizados y se cuantificaron las bandas usando el programa de computación (Scion image for windows) para realizar un análisis semicuantitativo de los ensayos de RT-PCR. Los datos se expresaron como la densidad relativa media del amplicón del gen de Hsp90 respecto del amplicón del gen control α -tubulina para cada dilución.

Análisis por Inmunoblot

Se analizaron mediante la técnica de “Western blot” los extractos proteicos de parásitos crecidos bajo condiciones de taquizoito, bradizoito o, condiciones de estrés.

Como control se analizaron también extractos proteicos de las células huésped (HFF). Todos los extractos se separaron corriéndolos por electroforesis en geles (SDS)-poliacrilamida (SDS-PAGE) [223]. En cada caso para obtener los extractos se utilizaron igual número de parásitos, los cuales fueron sembrados en geles tipo SDS-PAGE 10%, sometidos a electroforesis, y transferidos a membranas de nitrocelulosa [223]. Los sitios de pegado no específico fueron bloqueados incubando las membranas en leche descremada 5% en PBS con 0,05% Tween-20 (PBS-T) incubando luego las membranas (1 h, a temperatura ambiente) con el anticuerpo policlonal de conejo anti-*T. gondii* Hsp90 diluido 1:500 (o anti-TgHip de conejo diluido 1:500, o los anticuerpos de ratón anti-TgHip y Tg-P23 diluidos 1:250, en otros experimentos). Luego se lavaron las membranas con PBS-T en forma previa a la incubación con el anticuerpo secundario (horseradish peroxidase–conjugated anti-rabbit o anti-mousse), diluido 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology). Las bandas inmunoreactivas se detectaron con el método de quimioluminiscencia (ECL+Plus System, Amersham Biosciences). Se analizaron los resultados por densitometría. La tinción por rojo ponceau del filtro utilizado y un duplicado de azul de coomasie confirma el sembrado equivalente de cada condición.

Localización por Inmunofluorescencia indirecta (IFI) de la proteína Hsp90

Se inocularon taquizoitos en monocapa de HFF y se los creció bajo condiciones taquizoitos durante 24 h o se los indujo a cambio de estadio modificando a esas condiciones de crecimiento por 4 días. Se lavaron las células dos veces con PBS luego se las fijó y permeabilizó con 4% formaldehído y 0,1% Tritón X-100 en PBS por 10 min. Luego de los lavados con PBS, se bloqueó a las células con albúmina sérica bovina 1% y luego se las incubó con la dilución conveniente del el anticuerpo primario por 1 h, usando en estos casos el anticuerpo de conejo anti-*T. gondii* Hsp90, o los anticuerpos de ratón anti-P30 (α -SAG1), o anti-P34 [85] o anti-TgHip, o anti-TgP23. A continuación las células se lavaron tres veces con PBS, y luego se las incubó con el correspondiente anticuerpo secundario (1:200): el anti-ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (anti-conejo en figuras 3.5 y 3.6) (color verde), o

isotiocianato de rodamina (TRITC) anti-conejo (color rojo) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) y/o la lectina de *D. biflorus* (LDB) (TRITC). Luego se lavaron los cubreobjetos tres veces y se montaron en medio de montaje con DAPI (Molecular Probes). Los preparados fueron observados usando un microscopio invertido Zeiss Axiovert 35 equipado con una lámpara de 100 W Hg-vapor y usando un sets de filtros de epifluorescencia. El teñido con DAPI revela la localización del núcleo (color azul) y la lectina *D. biflorus* la presencia de la pared quística. Los colores verde, rojo y azul fueron registrados separadamente y luego mezclados usando el programa Adobe Photoshop.

Transformación de bradizoitos enquistados en taquizoitos *in vitro*

En la Figura 2.4 se esquematiza la metodología utilizada para el estudio de la transformación de bradizoito a taquizoito. Se aislaron quistes de cerebro de ratón previamente infectado intraperitonealmente cuatro semanas antes con taquizoitos de la cepa PK. Los quistes se purifican por centrifugación isopícnica en un gradiente de Dextran, luego los bradizoitos son liberados por digestión con tripsina. En el caso de los experimentos con GA, los bradizoitos liberados se los incubaba en medio de cultivo conteniendo GA 500 nM o DMSO por 2 h, luego se centrifugan a los parásitos y se reemplaza el medio. Así 100.000 bradizoitos se inoculan en cubreobjetos de 12 mm cubiertos de una monocapa confluyente de HFF.

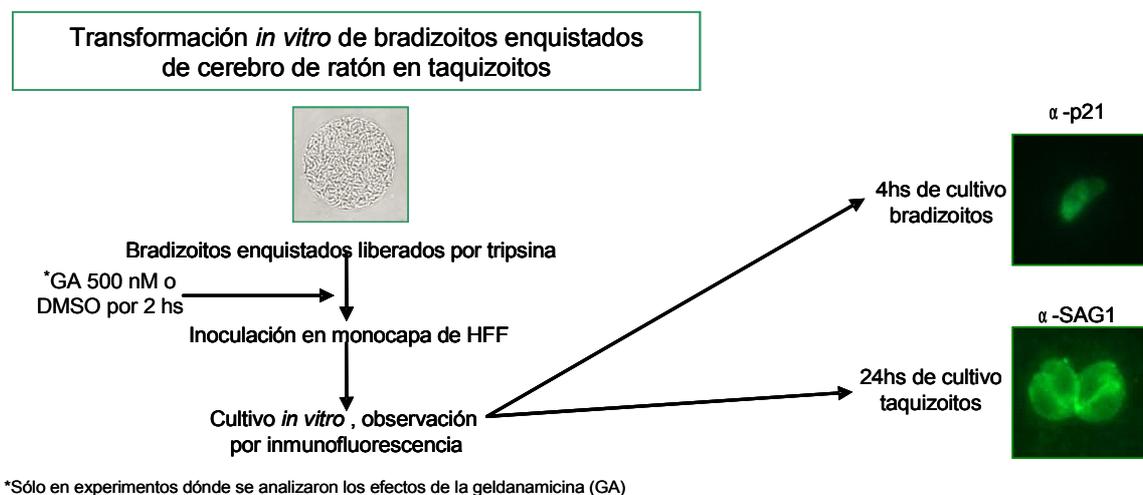


Figura 2.4: Modelo *in vitro* de desarrollo de bradizoito a taquizoito. Este esquema muestra la metodología *in vitro* utilizada para la transformación de bradizoitos provenientes de quistes cerebrales de ratones previamente infectados con parásitos de la cepa Me49. El resultado positivo de esta inducción se puede determinar por la detección de los marcadores específicos para cada estadio.

Se sigue la localización intracelular de Hsp90 por inmunofluorescencia a las 4 y 24 h después de la infección usando un anticuerpo anti-Hsp90 diluido (1:100). Todo se controla usando los anticuerpos específicos contra superficie de taquizoito SAG1 o de bradizoito P21.

Efecto de la geldanamicina (GA) en el cambio de estadio y la localización intracelular de Hsp90

La GA (InvivoGen) se disolvió en dimetil sulfoxido (DMSO) a una concentración de 1000 mg/ml. Luego la droga se diluye en medio de cultivo normal a las concentraciones requeridas previo a su uso. Se estudiaron varias concentraciones arrancando desde 1nM a 5 μ M con el objetivo de encontrar la concentración con mayor efecto sobre los parásitos, pero con menor efecto deletéreo para las células huésped. En los casos control se agregó DMSO en forma equivalente. Para conocer el efecto de GA en el nivel de las células infectadas por taquizoitos de *T. gondii* durante la conversión de taquizoito a bradizoito, se crecieron parásitos en condiciones de diferenciación a bradizoito durante 4 días en presencia de 100 nM GA o DMSO. Se analizaron por IFI usando el anticuerpo anti-Hsp90 de *T. gondii*. Se contaron el número de células que presentaban parásitos en 100 células totales analizadas al azar. Esto fue repetido tres veces y en tres experimentos independientes. Para los estudios de replicación de los parásitos se cuenta, el número de parásitos por vacuola parasitófora o quiste (VP-Quiste) determinando esto en al menos 100 VP-Quiste por tratamiento (GA o DMSO) en tres experimentos replica. Para medir el efecto de la GA en el cambio de estadio, se agrega GA a experimentos de inducción a bradizoito (como se describe arriba). Para cuantificar los parámetros mencionados se analizan las muestras por IFI contando parásitos positivos para P34 o LDB en ambos casos GA y DMSO.

Inmunoprecipitaciones

Las inmunoprecipitaciones se realizaron sobre las proteínas TgHsp90, TgHip y TgP23 endógenas en volúmenes de 2 ml de lisado celular. La lisis se realizó incubando 10×10^9 taquizoitos RH frescos durante 2 hs a 4°C, con NP40 0,5%, Tris 50 mM (pH 8,3), NaCl 150 mM, EDTA 4 mM y suplemento de PMSF 1 mM y cocktail de inhibidores de proteasas. Las inmunoprecipitaciones se incubaron a 4°C durante 2 hs en el mismo buffer de lisis y con el anticuerpo correspondiente de la proteína a precipitar. Los complejos inmunes se recuperaron por unión con proteína-A/G Sefarosa (Sigma, St. Louis, USA). Los inmunocomplejos se eluyeron con buffer Laemmli SDS 2X, luego de dos lavados con buffer de lisis suplementado con PMSF e inhibidores de proteasas y un 1 lavado con buffer PBS 1X (KH_2PO_4 4 mM, Na_2HPO_4 16 mM, NaCl 0.12 M, pH 7,4). Por inmunoblot, se detectaron las proteínas inmunoprecipitadas independientemente, y a su vez, las proteínas acompañantes de estos inmunocomplejos contra las que poseíamos anticuerpos preparados en conejo y ratón (TgHsp90, Hip, P23), y comerciales como fue el caso de la detección de la proteína Hsp70 con el anticuerpo de ratón (Stressgen) producido contra la proteína humana. En cada caso se controló la precipitación inespecífica incubando las muestras con sueros preinmunes, o con proteína-A/G Sefarosa en ausencia de anticuerpo.

3. RESULTADOS

Análisis de la secuencia de la proteína de *T. gondii* Hsp90

Teniendo en cuenta la reelevancia reportada para el desarrollo asexual de *T. gondii* de las proteínas Hsp60 [35] y Hsp70 [90], se procedió al rastreo de la secuencia codificante de otra chaperona de interés como la Hsp90, en el genoma del parásito. Se identificó un clon de *T. gondii* el TgESTzyd42c07.y1 cDNA, con alta homología con secuencias pertenecientes a la familia de las Hsp90, el cual fue secuenciado. La secuencia de este clon muestra que el ARNm de Hsp90 de *T. gondii* consta de 2933, cuyo ORF codifica para una proteína deducida de 708 aminoácidos con una masa teórica de 81.9 kDa. En la figura 3.1A se puede observar el alineamiento de las secuencias aminoacídicas deducidas de la proteína Hsp90 de *T. gondii* (TgHsp90) y de otras Hsp90 realizado usando un programa del tipo clustal (MAFFT). Se puede observar un alto grado de homología con la secuencia de otros parásitos apicomplexa como *Eimeria tenella* (81.07%) y *P. falciparum* (74.44%), aunque también este alto porcentaje es observado en Hsp90 de plantas como *Oryza sativa* (70.38%) y *Arabidopsis thaliana* (69.81%). Las variantes de Hsp90 humanas alfa y beta muestran un 67.51% de homología con la proteína Hsp90 de *T. gondii*. Analizando las mismas secuencias con la construcción de un árbol filogenético N-J sin raíz, se observó que TgHsp90, como era de esperar, es más cercana a las Hsp90 de otros apicomplexa (Fig. 3.1B).

Realizando búsquedas dentro de la base de datos del PROSITE [224], se encontraron varios motivos proteicos, altamente conservados, característicos de proteínas pertenecientes a la familia de las Hsp90. La proteína TgHsp90 contiene, al igual que las demás proteínas mostradas en la figura 3.1A, la “marca” característica de las proteínas pertenecientes a esta familia el decapeptido “YSNKEIFLRE” [225]. En las secuencias encuadradas en la figura 3.1A se puede observar el dominio ATPasa el cual está relacionado con la superfamilia de ATPasas homodiméricas, que comprenden además de la proteína Hsp90, ADN girasas y proteínas quinasas de histidina. Este dominio es también el sitio de unión para la GA [109] (Fig. 3.1A y 3.3B), la ubicación de este dominio en TgHsp90 está esquematizada también en la figura 3.2. Dentro de este dominio también se pueden encontrar el motivo GxxGxG, el cual es esencial para

la unión de ATP [114] (Fig. 3.1A). También se pudo observar que esta proteína contiene varios rasgos característicos de las proteínas Hsp90 entre las que se puede incluir el dominio rico en aminoácidos cargados (ricos en glutamina y lisina) (figura 3.1A y esquema figura 3.2). La secuencia también muestra que existe en el dominio C-terminal un motivo de unión a repeticiones de tetratricopeptidos (TRP) (secuencia peptídica MEEVD, en fig. 3.1A y esquematizado en fig. 3.2) este dominio permite la formación de complejos multichaperona y la regulación de la función de las proteínas Hsp90 y Hsp70 [97]. También mediante el uso de programas disponibles en la página web de PSORT (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/psort2.html>) se encontraron señales de localización intranuclear, una señal clásica (NLS), y dos NLS bipartitas. Por análisis de secuencia se puede observar que existe una zona de alta homología con el dominio de dimerización de Hsp90 humana [226] la cuál permitiría a la Hsp90 formar dímeros (Figura 3.2).

Modelado predictivo de la proteína Hsp90 de *T. gondii*.

Establecido el alto nivel de homología de esta proteína con el resto de las Hsp90, se procedió a establecer el nivel de similitud estructural con proteínas Hsp90 cuyas estructuras terciarias estuvieran establecidas. Comparando la secuencia aminoacídica de TgHsp90 con la de estas proteínas ya estudiadas, mediante el “SwissModel-blast”, se obtuvieron candidatos como modelos para ser utilizados en el modelado predictivo de TgHsp90: a la estructura del dominio N-terminal de Hsp90 de *S. cerevisiae* [115] (Código de identificación “Brookhaven Protein Data Base” (PDB): 1AH6); a la estructura del dominio N-terminal de Hsp90 de *S. cerevisiae* unida a GA [109] (Cod. ident. PDB: 1YER, 1YET, 1YES); a la estructura del dominio medio de Hsp90 de *S. cerevisiae* [122] (Cod. ident. PDB: 1HK7) y el dominio C-terminal de la HtpG *Escherichia coli* (homólogo a Hsp90) [227] (Cod. ident. PDB: 1Y4S y 1Y4U.). Con estos modelos y el uso de “SwissModel First Approach” se pudo construir la estructura 3^{ta} predicha de TgHsp90, mediante el uso del programa DeepView/Swiss-PDB viewer. En la figura 3.3A se puede observar, el alto grado de similitud estructural del dominio N-terminal de la proteína TgHsp90 con su contraparte en *S. cerevisiae*.

A

```

TgHsp90.  MA-DT-----ETFAFNADIQQLMSLIINTFYSNKEIFLRRELISNASDALDKIRYEAITDPEKLGKAERLFIRIVPNKQNTLTIEDDGIGMTKAEVNNLGTIARSGTKAFME
EtHsp90   ME-NK-----ETFAFNADIQQLMSLIINTFYSNKEIFLRRELISNASDALDKIRYEAITEPEKLTKEPELFIRLIPDKANNTLTIENSGIGMTKADLVNLLGTIARSGTKAFME
PfHsp90   MS--T-----ETFAFNADIRQLMSLIINTFYSNKEIFLRRELISNASDALDKIRYESITDQKLSAEPEFFIRIIPDKTNNNTLTIEDSGIGMTKNDLNNLGTIARSGTKAFME
AtHsp90   MA-DA-----ETFAFQAEINQLLSLIINTFYSNKEIFLRRELISNSSDALDKIRFESLTDKSKLDGQPELFIHIIPDKTNNNTLTIIDSGIGMTKADLVNLLGTIARSGTKAFME
OsHsp90   MASET-----ETFAFQAEINQLLSLIINTFYSNKEIFLRRELISNSSDALDKIRFESLTDKSKLDAQPELFIHIVPDKASNTLSIIDSGIGMTKSDLVNLLGTIARSGTKAFME
HuHsp90alpha MPEETQTQDQPMEEEEVETFAFQAEIAQLMSLIINTFYSNKEIFLRRELISNSSDALDKIRYESLTDPSKLDGKELHINLIPNKQDRTLTIVDTGIGMTKADLNNLGTIAKSGTKAFME
HuHsp90beta MPEEVH----HGEEEVETFAFQAEIAQLMSLIINTFYSNKEIFLRRELISNASDALDKIRYESLTDPSKLDGKELKIDIPNPQERTTLTIVDTGIGMTKADLNNLGTIAKSGTKAFME
*          *****:* * * * ***** *****:*****:.*: . * . . : * :*: . .**:: : ***** :*:*****:**** **

TgHsp90.  ALQAGDISMIQQFGVGFFYSAYLVADKVTVSRHNDDEMYVWESSAGGSFTVSKAEGQFENIVRGTRIIILHMKEDQTEYLEDRRLKDLVKKHSEFISFPIELAVEKSVDKITESEDE--
EtHsp90   ALQAGDISMIQQFGVGFFYSAYLVADSVTVVSKHNDDEQYVWESAAGGSFTVQK-DDKYEPLGRGTRIIILHLKEDQGEYLEERRLKDLVKKHSEFISFPIELAVEKTHEREVTESEDE--
PfHsp90   AIQAGDISMIQQFGVGFFYSAYLVADHVVIISKNNDDEQYVWESAAGGSFTVTK-DETNEKLRGRTKIIILHLKEDQLEYLEEKRIKDLVKKHSEFISFPIKLYCEQRNEKEISASEEEEG
AtHsp90   ALAAGADVSMIQQFGVGFFYSAYLVADKVVVTTKHNNDDEQYVWESQAGGSFTVTR-DTSGEALGRGTKMVLYLKEDQMEYIEERRLKDLVKKHSEFISYPISLWIEKTIKEISDDEEE--
OsHsp90   ALAAGADVSMIQQFGVGFFYSAYLVAEVVVTTKHNNDDEQYVWESQAGGSFTVTR-DTSGEQLGRGTKITLYLKEDQLEYLEERRLKDLIKKHSEFISYPISLWTEKTEKEISDDEDE--
HuHsp90alpha ALQAGADISMIQQFGVGFFYSAYLVAEKVTVITKHNNDDEQYAWESSAGGSFTVRT--DTGEPMGRGTKVILHLKEDQTEYLEERRIKEIVKKSQFIGYPITLFVEKERDKEVSDDEAE--
HuHsp90beta ALQAGADISMIQQFGVGFFYSAYLVAEKVVVITKHNNDDEQYAWESSAGGSFTVRA--DHGEPGRGTKVILHLKEDQTEYLEERRVKEVVKKSQFIGYPITLLEKEREKEISDDEAE--
*: * . . :*****: * * . :*: * . * * ***** * : * * : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

TgHsp90.  -----EKPAEDAEEKKEGEEEEEK-----EGEAKKKKTKKVKVVEVVEYQLNKQKPLWMRKPEDVTWEEYCAFYKSLTNDWEDPLAV
EtHsp90   -----EKKKADEKAEKKEGEEKKEGEEKKEGE-----EKKKEKTGKTKKVQEVVREWEQLNKQKPLWMRKPEEVTEEEYASFYKSLNDWEEHLAV
PfHsp90   EGEGEREGEEEEEKKTGEDKNADESKEENEDEKEDNEEDDNTDHPKVEDVTEELNAEKKKKEKRKKIHTVEHEWEELNKQKPLWMRKPEEVNTEEYASFYKSLTNDWEDHLAV
AtHsp90   -----EKKD-EEGKVEEVD-----EKEKEEKKKKKIKEVSHWDLVKNQKPIWMRKPEEINKEEYAAFYKSLNDWEEHLAV
OsHsp90   -----EKKDAEEGKVEDVD-----EKEEKEKKKKKIKEVSHWDLVKNQKPIWMRKPEEITKEEYAAFYKSLTNDWEEHLAV
HuHsp90alpha -----EKEDKEEKEKEEKESEDKPEIEDVGSDEE-----EKKDGGKKKKKIKEKYIDQEELNKTTPIWTRNPDDITNEEYGEFYKSLTNDWEDHLAV
HuHsp90beta -----EKGKEKEEDKDKDEKPKIEDVGSDEED-----DSGDKKKTKKIKEKYIDQEELNKTTPIWTRNPDDITQEEYGEFYKSLTNDWEDHLAV
* . * . . : . . . : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

TgHsp90.  KHFSVEGQLEFKALLFVPRAPFDLFETRKKRNNVRLYVRRVFMDDCEDLIPWLNLFVGVVDSDELPLNISRESLQQNKILKVIKKNLVKKCLEMFQEELEKKEDYTKFYEQFSKNLK
EtHsp90   KHFSVEGQLEFKALLFVPRAPFDLFETRKKRNNIKLYVRRVFMDDCEDIIPWLNLFVGVVDSDELPLNISRESLQQNKILKVIKKNLVKKCLEMFABIEEKKENYAKFYEQFSKNLK
PfHsp90   KHFSVEGQLEFKALLFVPRAPFDMFENRKKRNNIKLYVRRVFMDDCEEIIPWLNLFVGVVDSDELPLNISRESLQQNKILKVIKKNLVKKCLEMFAELAEENKDYKFFYEQFSKNLK
AtHsp90   KHFSVEGQLEFKAILFVPRAPFDLFDTRKKPNNIKLYVRRVFMDCNEDIPEYLGFGVGVVDSDELPLNISRETLQQNKILKVIKKNLVKKCLELFFEIAENKEDYKFFYEQFSKNLK
OsHsp90   KHFSVEGQLEFKAVLFVPRAPFDLFDTRKKLNNIKLYVRRVFMDCNEELIPEWLSFVGVVDSDELPLNISREMLQQNKILKVIKKNLVKKCLELFFEIAENKEDYKFFYEQFSKNLK
HuHsp90alpha KHFSVEGQLEFRALLFVPRAPFDLFENRKKKNNIKLYVRRVFMDCNEELIPEYLNFIIRGVVDSDELPLNISREMLQQSKILKVIKKNLVKKCLELFTLAEADKENYKFFYEQFSKNLK
HuHsp90beta KHFSVEGQLEFRALLFVPRAPFDLFENKKKNNIKLYVRRVFMDCNELIPEYLNFIIRGVVDSDELPLNISREMLQQSKILKVIKKNLVKKCLELFTLAEADKENYKFFYEQFSKNLK
*****:* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

TgHsp90   LGIHEDTSNRNKIAELLRFHTSKSGDDVSLKEYVDRMKESQKDIYYITGESRQSVASSPFLEALRKKGYEVIYMTDPIDEYAVQQLKEFDGKKLRCCTKKGLELEDDEEKKKFFELKA
EtHsp90   LGIHEDSANRAKIAELLRFHSSKSGEDMVSFKEYVDRMKEGQKDIYYITGESRQTVANSPFLEKLTKKGYEVLYMTDPIDEYAVQQLKEFDNHKLRCCTKGLELIDSEEEKKKFFELKA
PfHsp90   LGIHEDNANRTKITELLRFQTSKSGDEMIGLKEYVDRMKENQKDIYYITGESINAVSNSPFLEALTKKGYEVIYMTDPIDEYAVQQLKDFDGKKLKCCTKGLELIDSEEAKKDFETLKA
AtHsp90   LGIHEDSNRTKIAELLRYHSTKSGDELTSLKDYVTRMKEGQNDIYYITGESKAVENSPFLEKLRKKGYEVLYMVDPIDEYAVQQLKEFEGKKLVSATKEGLKDEDEDEKKKKEELKE
OsHsp90   LGIHEDSTNRNKIAELLRYHSTKSGDELTSLKDYVTRMKEGQNDIYYITGESKAVENSPFLEKLRKKGYEVLYMVDPIDEYAVQQLKEFEGKKLVSATKEGLKDESEDEKKKRKEELKE
HuHsp90alpha LGIHEDSNRKKLSELLRYYTSASGDEMVSLKDYCTRMENQKHIIYYITGETKDQVANSFAVERLRKHGLEVIYMIEPIDEYCVQQLKEFEGKTLVSVTKEGLELPEDEEKKKQQEKKT
```

RESULTADOS

HuHsp90beta

LGIHEDSTNRRRLSELLRYHTSQSGDEMTSLSEYVSRMKETQKSIYYITGESKEQVANSFAFVERVRKRGFEVVYMTPEIDEYCVQQLKEFDGKSLVSVTKGLELPEDEEEKKKMEESKA
*****. ** :::**:**: :: **::: .:::* **** *: *:**:**: . * .*.*: * :*: * **:* :.***.: ***:*::.* . **:**: : *: ** * *

```

TgHsp90.      EFEPLCKLMKEVLHDKVEQVVVSNRITDSPCVLVTSEYGWSANMERIMKAQALRDNSTTYMVSCKTMEINPTNPIMEELKKKSNADKSDKTVKDLIWLLFDLFTALLTSGFSLDEPTQFAA
EtHsp90      EFEPLKLIKEVLHDKVDKVVLSNRITDSPCVLVTTEFGWSANMERIMKAQALRDNSTSYMVSCKTMEVNGHHSIMIEIKNKAADVSKSDKTVKDLIWLLYDFTALLTSGFSLDEPTQFAA
PfHsp90      EYEGLCVKIKDVLHEKVEKVVVQGRITDSPCVLVTSEFGWSANMERITKAQALRDNSTSYMVLSKIMEINARHPIISALKQKADADKSDKTVKDLIWLLFDLFTALLTSGFALEEPTTFSK
AtHsp90      KFEGLCVKIKDVLGDKVEKIVSDRVVDSPCCLVTGEYGWTANMERIMKAQALRDNSSMGYMSCKTMEINPENSIMDELKRADADKNDKSVKDLVLLLFETALLTSGFSLDEPNTFGS
OsHsp90      KFEGLCVKIKDVLGDKVEKVVVSDRVVDSPCCLVTGEYGWTANMERIMKAQALRDNSSMAGYMSCKTMEINPENAIMDELKRADADKNDKSVKDLVLLLFETALLTSGFSLDDPNTFGS
HuHsp90alfa  KFENLCKIMKDILEKKVEKVVVSNRLVTSPPCIVTSTYGWTANMERIMKAQALRDNSTMGYMAAKKHLEINPDHSI IETLRQKAEADKNDKSVKDLVILLYETALLSSGFSLEDPQTHAN
HuHsp90beta  KFENLCKLMKEILDKKVEKVTISNRLVSSPCCIVTSTYGWTANMERIMKAQALRDNSTMGYMAAKKHLEINPDHP I VETLRQKAEADKNDKAVKDLVLLLFETALLSSGFSLEDPQTHSN
:: * * *::*::* .**:* :.:* . *** :** :**:*:***** *****.* ** :** :*: * :.:* :::: .**.*:***** :*:**:*:*****:***: * ..

TgHsp90.      RIHRMIKLGSLIDEDDEELRAE-----DLPPLEEVGAVEETSKMEEVD
EtHsp90      RIHRMIKLGSLID-DDEEAKDD-----DLPPLEEVGADEASKMEEVD
PfHsp90      RIHRMIKLGSLID---EEENNDI-----DLPPLEETVDATD--SKMEEVD
AtHsp90      RIHRMLKLGSLID-DDDVVEADA-----DMPPLE--DDADAEGSKMEEVD
OsHsp90      RIHRMLKLGSLID-EDETAEADT-----DMPPLE--DDAGE--SKMEEVD
HuHsp90alfa  RIYRMIKLGID-EDDPTADDTSAAVTEEMPPLEGDDDT----SRMEEVD
HuHsp90beta  RIYRMIKLGID-EDEVAEEPNAAVPDEI PPLEGDEDA----SRMEEVD
**:**:***.* * : : : :**** .: *:*:****
    
```

B

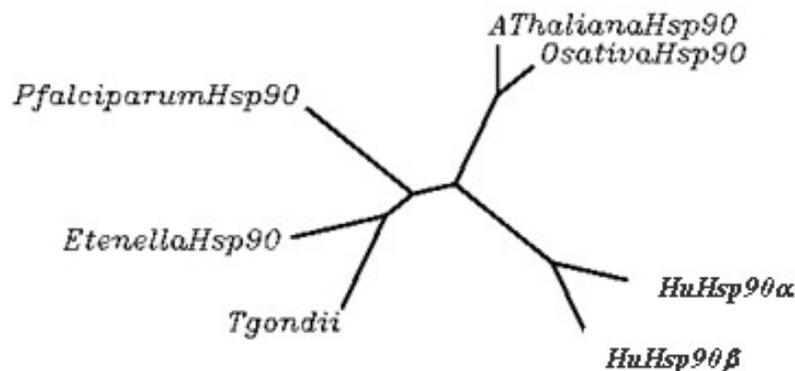


Figura 3.1. Comparación de diferentes miembros de la familia Hsp90. A Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las Hsp90 de *Toxoplasma gondii*, *Eimeria tenella*, *Plasmodium falciparum* y *Homo sapiens* usando un programa del tipo clustal formateado por el uso de MAFFT (v5.667). Los aminoácidos idénticos se marcan con *, y la similitud parcial se marca con puntos, los “gaps” se indican con guiones los cuales se introducen para maximizar el alineamiento. En rojo se indica la secuencia aminoacídica típica de la familia Hsp90, en verde la región cargada rica en aminoácidos glutamato y lisina, encuadrado se encuentra el dominio ATPasa, dentro de este dominio se pueden apreciar el motivo GxxGxG (en violeta) y los residuos resaltados en gris ambos importantes en la unión de ATP. Con flechas se indican los residuos involucrados en la formación de puentes hidrogeno con la GA. En azul se muestra el péptido C-terminal reconocido por dominios TPR. B árbol N-J filogenético comparando los miembros de la familia de la Hsp90 analizados por clustal.

RESULTADOS

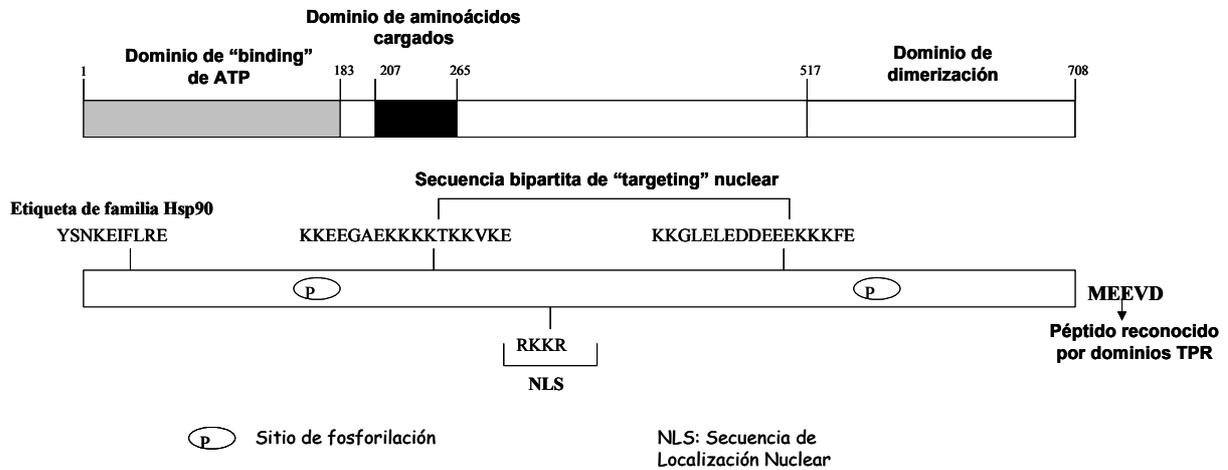
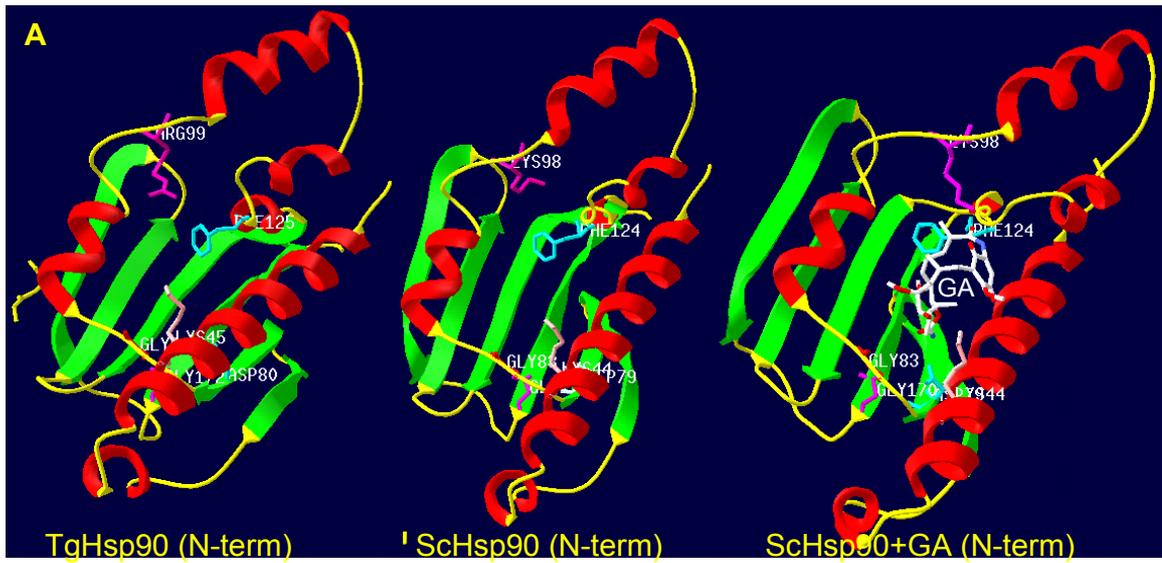


Figura 3.2. Dominios y motivos encontrados en la HSP90 de *Toxoplasma gondii*. Se representan en este esquema los dominios y motivos putativos encontrados a través del análisis de la secuencia aminoacídica usando los programas PROSITE y PSORT. Los números indican las posiciones de los aminoácidos que forman parte del dominio. También se indican las señales putativas NLS y sitios de fosforilación potenciales.

Interesantemente el mismo "bolsillo molecular" dentro del dominio ATPasa de la ScHsp90 donde se aloja la GA cuando se une a esta proteína, estaría presente en la estructura de TgHsp90 (Fig. 3.3A). Es más, según lo reportado en el estudio estructural del dominio N-terminal de Hsp90 unida a GA [109], los residuos claves para el establecimiento de puentes hidrógeno entre éstos y la GA, también se encuentran en TgHsp90, se observan indicados en el alineamiento de la figura 3.1A, resaltados dentro de la estructura de la figura 3.3A, remarcándose la alta identidad existente de estos residuos comparados con los de ScHsp90 (Fig. 3.3B). La totalidad del dominio N-terminal modelado, que en el caso de ScHsp90 puede unir GA, posee una identidad del 68% con la misma región de TgHsp90.

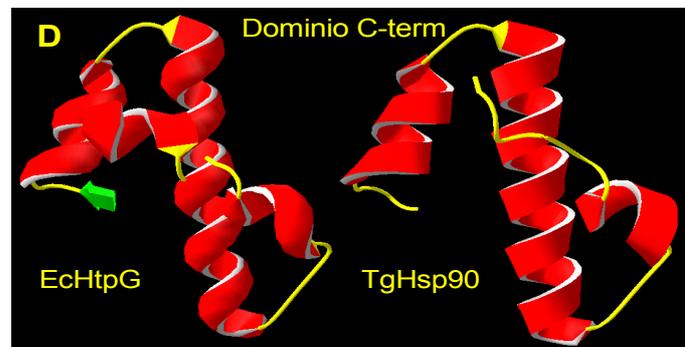
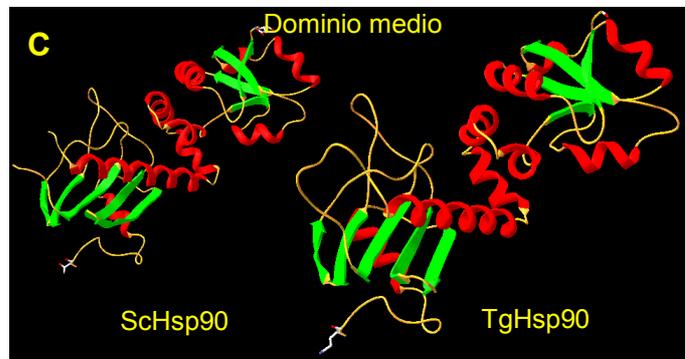
Este alto grado de homología estructural también fue observado para los restantes dos dominios de Hsp90, el medio y el C-terminal (Fig. 3.3C y D, respectivamente).



B

TgHsp90	26	NKEIFLRELISNASDALDKIRYEAITDPEKLGKAERLFIRIVPNKQNNLTIEDDGI	GMTKAE	LVNNLGTIAR	SGTKAFMEA
ScHsp90	25	NKEIFLRELISNASDALDKIRYKSLSDPKQLETEPDLFIRITPKPEQKVLEIRDSGI	GMTKAE	LINNLTIAK	SGTKAFMEA
		*****	*****	*****	*****
TgHsp90	108	LQAGGDISMIGQFGVGFYSAYLVADKVTVSRHNDDEMYVWESSAGGSFTVSKAEGQFENIVR	GT	TRILHMKED	
ScHsp90	107	LSAGADVSMIGQFGVGFYSFLVADRVOVISKSNDDQYIWESNAGGSFTVTLDEVN-ERIGR	GT	ILRLFLKDD	
		* ** *_*****	**	*****	* ** *_*****

Figura 3.3: Modelado predicho (SwissModel) de la estructura terciaria de TgHsp90. **A.** Modelado del dominio N-terminal de TgHsp90 usando como modelo, el dominio N-terminal de Hsp90 de levaduras. Se observan los residuos compartidos importantes para la unión de la GA dentro del dominio ATPasa de la proteína, se puede observar a la derecha la estructura determinada de Hsp90 uniendo GA (nro. de acceso 1A4H). **B.** Alineamiento de la secuencia aminoacídica de TgHsp90 modelada comparada con la de ScHsp90 (68% de identidad), resaltados en amarillo se observan los residuos conservados importantes en la unión con GA. **C.** Modelado predicho del dominio medio de TgHsp90 usando modelo de base, el dominio medio de la ScHsp90. **D.** Modelado predicho del dominio C-terminal de TgHsp90 usando como modelo, el dominio C-term. de HtpG (Hsp90 de bacterias). Imágenes generadas usando el programa DeepView/Swiss PDB viewer.



Expresión de la proteína Hsp90 durante el desarrollo de *T. gondii*

Para determinar la existencia de una regulación de la expresión de TgHsp90 relacionada al desarrollo o al estrés, se analizaron los niveles de expresión de la proteína Hsp90 del parásito durante el estrés por calor y durante la interconversión taquizoito-bradizoito, utilizándose las cepas RH $\Delta UPRT$ y PK. A estos parásitos se los sometió a condiciones normales de cultivo (taquizoito), de estrés por calor (2 h, 42°C) o hambreado de CO₂ (inducción desarrollo a bradizoito). Se monitoreo el desarrollo de los bradizoitos por fluorescencia mediante el empleo de la lectina *D. biflorus* (LDB) acoplada a rodamina. Se analizó también la producción de ARN mensajero específico para la proteína Hsp90 en estos tres grupos de parásitos (para ambas cepas), mediante un análisis semicuantitativo por RT-PCR usando diluciones seriadas al décimo de los ADN copias de los tres grupos (Fig. 3.4A). Se utilizó al gen de la α -tubulina para controlar que se analizan las mismas cantidades de ARN mensajero de partida. Los resultados muestran una inducción del 24-51% (RH $\Delta UPRT$ y PK, respectivamente) para los niveles de ARNm de Hsp90 en los taquizoitos estresados en comparación con los sin estresar (Fig. 3.4B). Por otro lado bajo condiciones de inducción a bradizoito se observó una estímulo del 80-99 % (RH $\Delta UPRT$ y PK, respectivamente) en el nivel de ARNm de Hsp90 comparado con los de taquizoitos normales (Fig. 3.4B). Por lo tanto existe un incremento en los niveles de ARNm de TgHsp90 cuando los taquizoitos son estresados por calor y cuando se induce su diferenciación a bradizoito

Para corroborar si los cambios en los niveles de ARN se correspondían con cambios en los niveles de proteína de Hsp90 se realizaron ensayos de “Western blot” utilizando un anticuerpo anti-conejo específico contra la región C-terminal de la proteína TgHsp90 [223]. En la Figura 3.4C se puede observar que la producción de Hsp90 se incrementó luego de exponer a los parásitos taquizoitos RH $\Delta UPRT$ durante 2 horas de estrés térmico (42°C) siempre en comparación con los crecidos bajo condiciones normales (37°C). También se pudo observar esta inducción cuando se crecieron a los parásitos durante 4 días bajo condiciones de cultivo de bradizoito. Por densitometría se determinó que hubo una inducción de 6 y 5 veces en los niveles de expresión de Hsp90 en taquizoitos estresados y bradizoitos respectivamente en la cepa RH $\Delta UPRT$ y en la cepa PK. Estos resultados sugieren que existe una rápida inducción y producción de

Hsp90 durante el estrés (dentro de las 2 hs) y durante el periodo de formación del bradizoito.

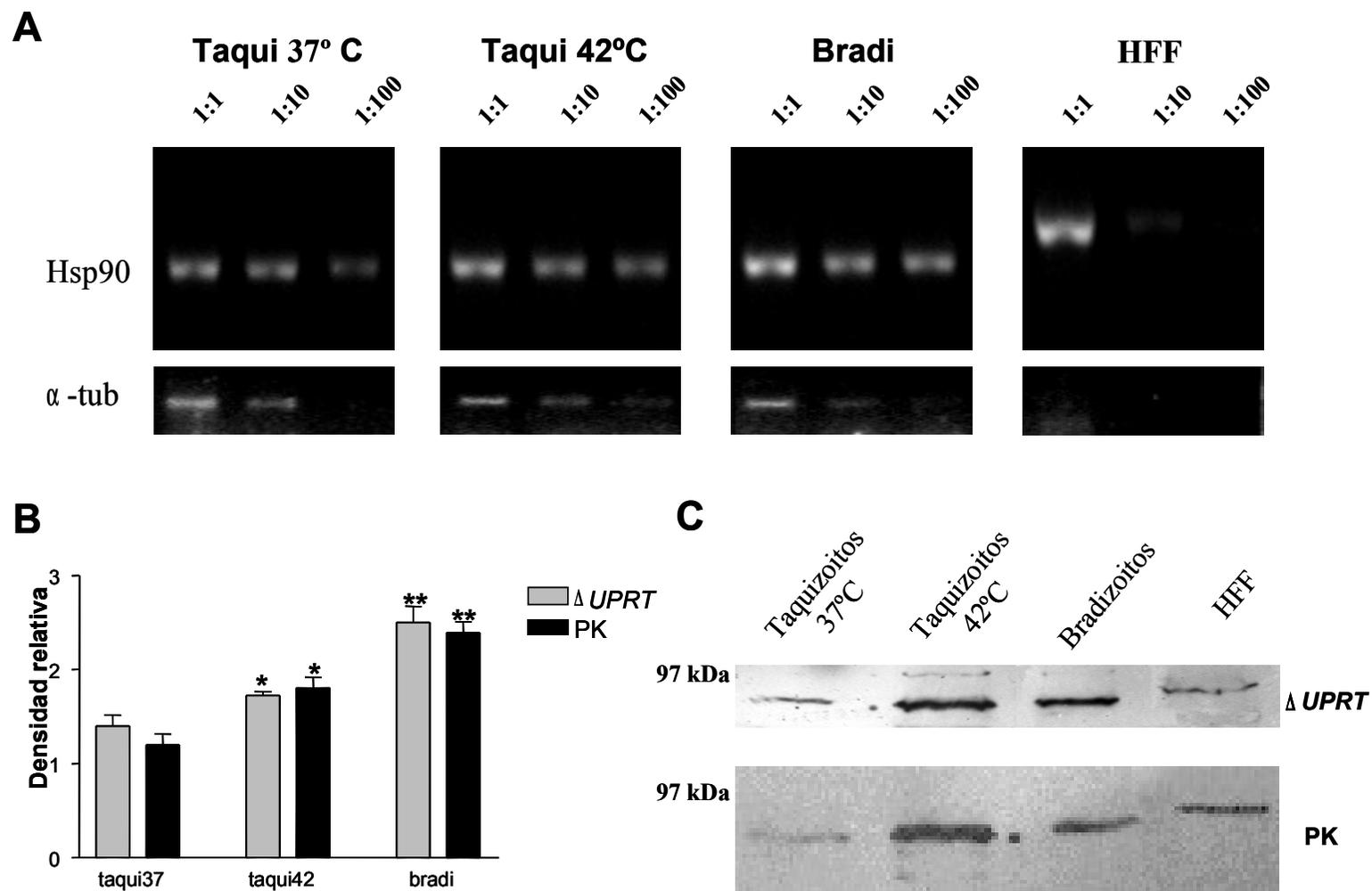


Figura 3.4: Análisis de la expresión de la proteína Hsp90 de *T. gondii*. El análisis se realizó en parásitos crecidos bajo condiciones de taquizoito (Taqui), estrés (42°C) o de bradizoito (Bradi). **A.** Ejemplo de un análisis del RT-PCR Semi-cuantitativa realizada para cada cepa estudiada, con diluciones seriadas al décimo de muestras de ADNc por duplicado de taquizoitos, taquizoitos estresados, bradizoitos y HFF sin infectar (control). Los primers del gen “housekeeping” α -tubulina se usaron como control. El estudio se realizó en la fase lineal de la curva de amplificación **B.** Cuantificación por densitometría de las bandas de amplificación, realizada para cada cepa. Los datos son expresados como la densidad relativa media del amplicón Hsp90 respecto a la de la α -tubulina para cada dilución y cada duplicado. Se determinó la significancia de los datos mediante el Student’s t-test ($n=6$): * y **, indican significativamente mas alto ($P<0,05$ y $P<0,01$, respectivamente) que el grupo Taqui 37°C. **C.** Análisis por Inmunoblot de la expresión de la proteína Hsp90 usando anticuerpo de conejo anti-Hsp90 de *T. gondii*. También se analizaron extractos proteicos de HFF sin infectar. La banda de “reactividad cruzada” observada en las HFFs, que migra mas lento que la Hsp90 de *T. gondii*, puede ser la Hsp90 “putativa” de las HFF. Las figuras son representativas de tres experimentos independientes con resultados similares para ambas cepas RH Δ UPRT y PK.

Localización intracelular de la proteína Hsp90 durante el cambio de estadio en parásitos RH Δ UPRT de *T. gondii*.

Se procedió al análisis por IFI para determinar la localización intracelular de la proteína Hsp90 del parásito, empleando el anticuerpo anti-Hsp90 de *T. gondii* (pseudo color verde en la Figuras 3.5 y 3.6). Se compararon ambos estadios del ciclo asexual de *T. gondii*: taquizoitos y bradizoitos. Los resultados muestran que la proteína Hsp90, está presente en el citoplasma en el estadio taquizoito siendo además excluida del núcleo (Fig. 3.5 A, paneles G e I). De manera interesante en el estadio bradizoito se observó que la proteína TgHsp90 si bien continua siendo citoplasmática también es incorporada al núcleo (colocalización con DAPI) (Fig. 3.5 A, paneles B y D). Se pudieron confirmar estos resultados por microscopia confocal, en donde se observó la exclusión de TgHsp90 de el núcleo en todas las secciones de los taquizoitos analizados (Fig. 3.5 B, paneles K-N) y la presencia en citoplasma y núcleo de todas las secciones de los bradizoitos analizados (Fig. 3.5 B, paneles B-E).

Con el objetivo de determinar que los cambios en la localización subcelular no son simplemente una respuesta al estrés o el hambreado de CO₂, sino que están directamente relacionados con la formación del bradizoito *per se*, se analizó la localización de la proteína Hsp90 en un mutante incapaz de diferenciarse al estadio bradizoito, el cual muestra un falla global en la inducción de genes bradizoito y en varios aspectos de la diferenciación [228]. En la Figura 3.6 se puede observar el patrón de localización de Hsp90 en los parásitos “salvajes” (panel B) y en el mutante para la diferenciación a bradizoito B7 [228] (panel C) crecidos en condiciones de diferenciación a bradizoito durante 4 días. El mutante exhibe un patrón de localización de Hsp90 equivalente al que exhibe una taquizoito “salvaje”, lo cual sugiere que existe una fuerte correlación entre la localización subcelular de Hsp90 y los dos estadios del desarrollo asexual de *T. gondii*.

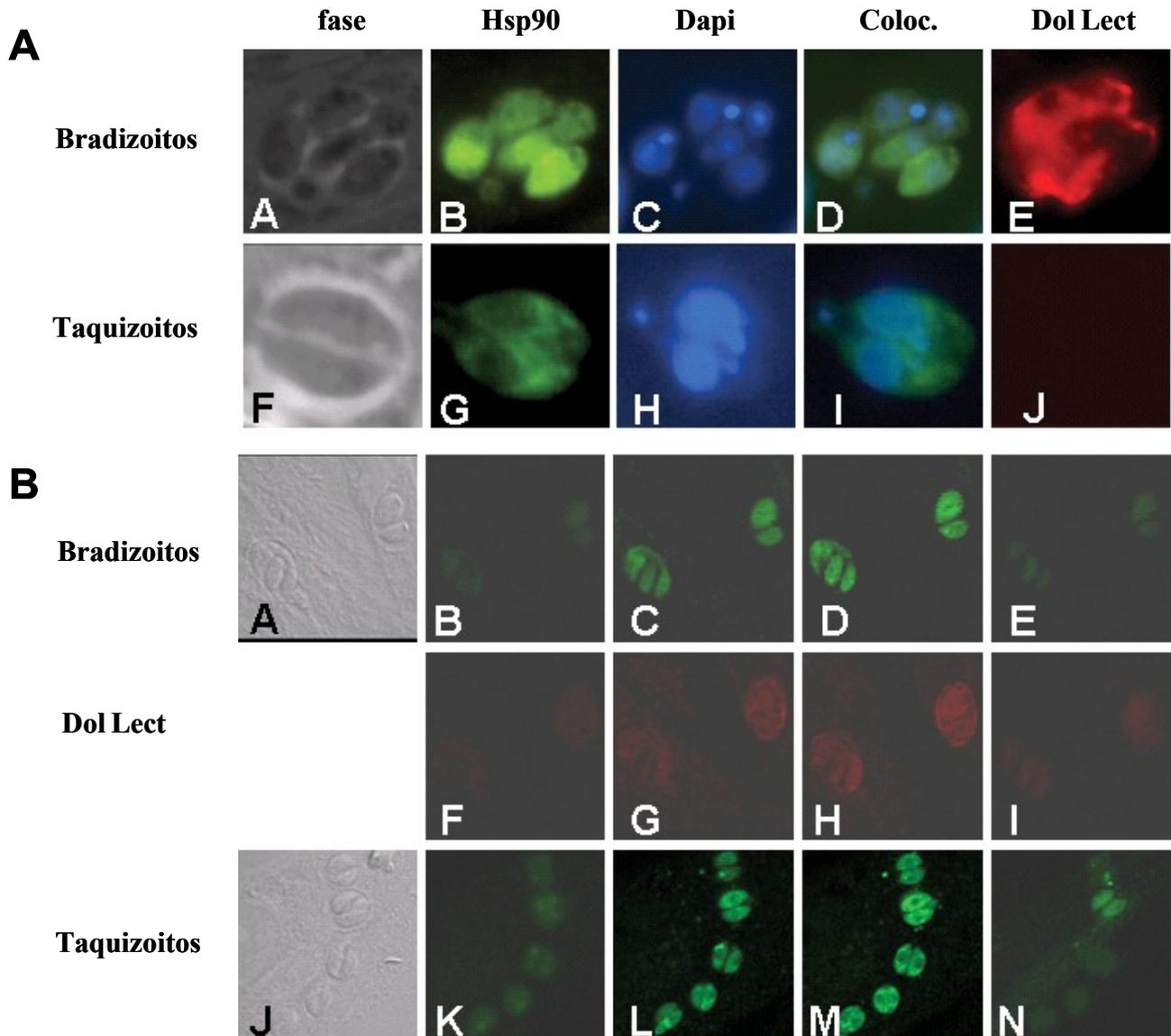


Figura 3.5: Localización intracelular de la proteína Hsp90 en parásitos de la cepa RH $\Delta UPRT$. Los parásitos crecidos bajo condiciones de tachizoitos o de diferenciación a bradizoitos se sometieron a un análisis por IFI usando el anticuerpo anti-*T. gondii* Hsp90, la lectina de *D. biflorus* (Dol lect) marcada con TRICT y DAPI, y contraste de fase. A. Microscopía convencional. B. Microscopía confocal.

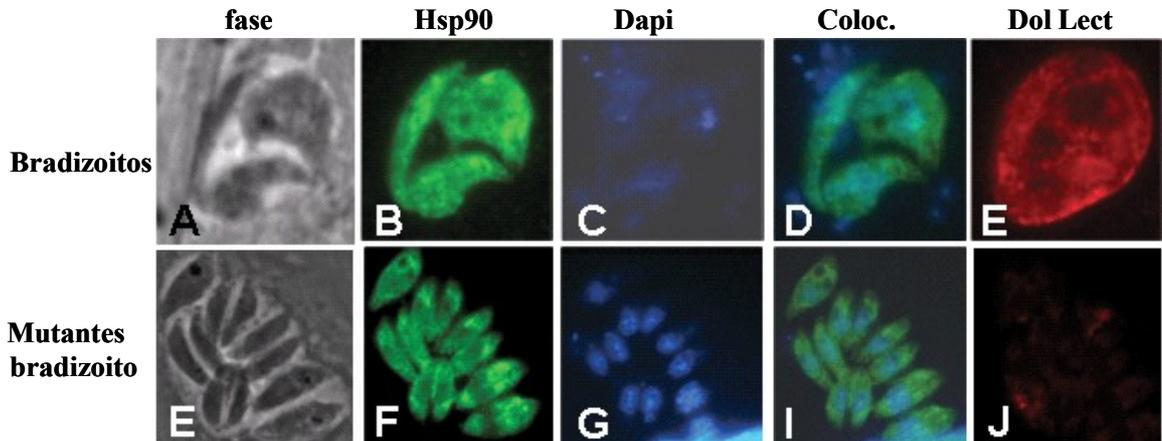


Figura 3.6: Localización de la proteína Hsp90 en mutantes bradizoito. Análisis por IFI de la localización intracelular de la proteína Hsp90 en bradizoitos “salvajes” y en mutantes para la diferenciación a bradizoito.

Localización intracelular de Hsp90 en la cepa PK de *T. gondii*

A modo de extensión y confirmación de los resultados obtenidos *in vitro* con la cepa RH $\Delta UPRT$, se realizaron experimentos similares en la cepa PK. Se utilizó un método adicional para el desarrollo *in vitro* al estadio bradizoito, el estrés alcalino [24]. Para controlar los estadios observados se usó un anticuerpo específico para el estadio taquizoito el anticuerpo anti-SAG1, o el anticuerpo anti-P34, específico para reconocer bradizoitos (pseudo color verde en las figura 3.7). La localización intracelular de Hsp90 (pseudo color rojo) en taquizoitos PK (SAG1 positivos; Fig. 3.7A, panel H) muestra de nuevo una exclusión del núcleo y un patrón de localización citoplasmático (Fig. 3.7A, panel G), por otro lado en el estadio bradizoito se puede observar a la proteína Hsp90 (p34 positivos; Fig. 3.7A, panel C) que se ubica tanto en el citoplasma (Fig. 3.7A, panel B) como en el núcleo (colocalización con DAPI; Fig. 3.7A, panel E). Estos datos sugieren que el patrón de localización intracelular en ambas cepas fue similar y comparable. Sin embargo la cepa PK muestra algunos parásitos con una localización de Hsp90 similar a la observada en el estadio taquizoito dentro de la población de parásitos inducidos a bradizoito (datos no mostrados). Esto podría deberse a una menor eficiencia de la cepa PK para convertir a bradizoito *in vitro*, en

comparación con la cepa RH $\Delta UPRT$, lo cual implicaría la existencia de subpoblaciones de taquizoito y/o bradizoitos en estados tempranos como fue descrito por Soete y col. [24].

Hsp90 abandona el núcleo durante el cambio de estadio de bradizoito a taquizoito.

Se procedió también al análisis de la localización intracelular de la proteína Hsp90 en el cambio de estadio de bradizoito a taquizoito. En la Figura 3.7B se puede observar que 4 h luego de la inoculación con bradizoitos frescos liberados de quistes de cerebro de ratones infectados experimentalmente, la localización de Hsp90 se mantiene en el núcleo y en el citoplasma de estos parásitos intracelulares (paneles B-D). Es importante destacar que estos parásitos todavía presentan la proteína específica de bradizoito maduro la proteína P21 (Fig. 3.7B, panel E), pero no la proteína específica de taquizoito SAG1 (panel G), por lo cual se puede asegurar que, los parásitos observados, son bradizoitos. Luego de 24 h post-infección algunos parásitos comienzan a mostrar la presencia de la proteína Hsp90 en el citoplasma y claramente fuera del núcleo (Fig. 3.7B, paneles I-K). Estos parásitos son P21 negativos y SAG1 positivos (Fig. 3.7B, paneles N y L, respectivamente) y ya muestran una primera ronda de replicación (Fig. 3.7B, panel H y M). Algunos parásitos luego de las 24 h post-infección en el mismo cultivo, todavía seguían siendo únicos dentro de la vacuola (sin replicación) y además siendo P21 positivos, SAG1 negativos y con Hsp90 colocalizando con DAPI dentro del núcleo (datos no mostrados).

Teniendo en cuenta los últimos datos presentados se puede sugerir que la localización subcelular de Hsp90 tiene lugar de una manera dependiente de estadio.

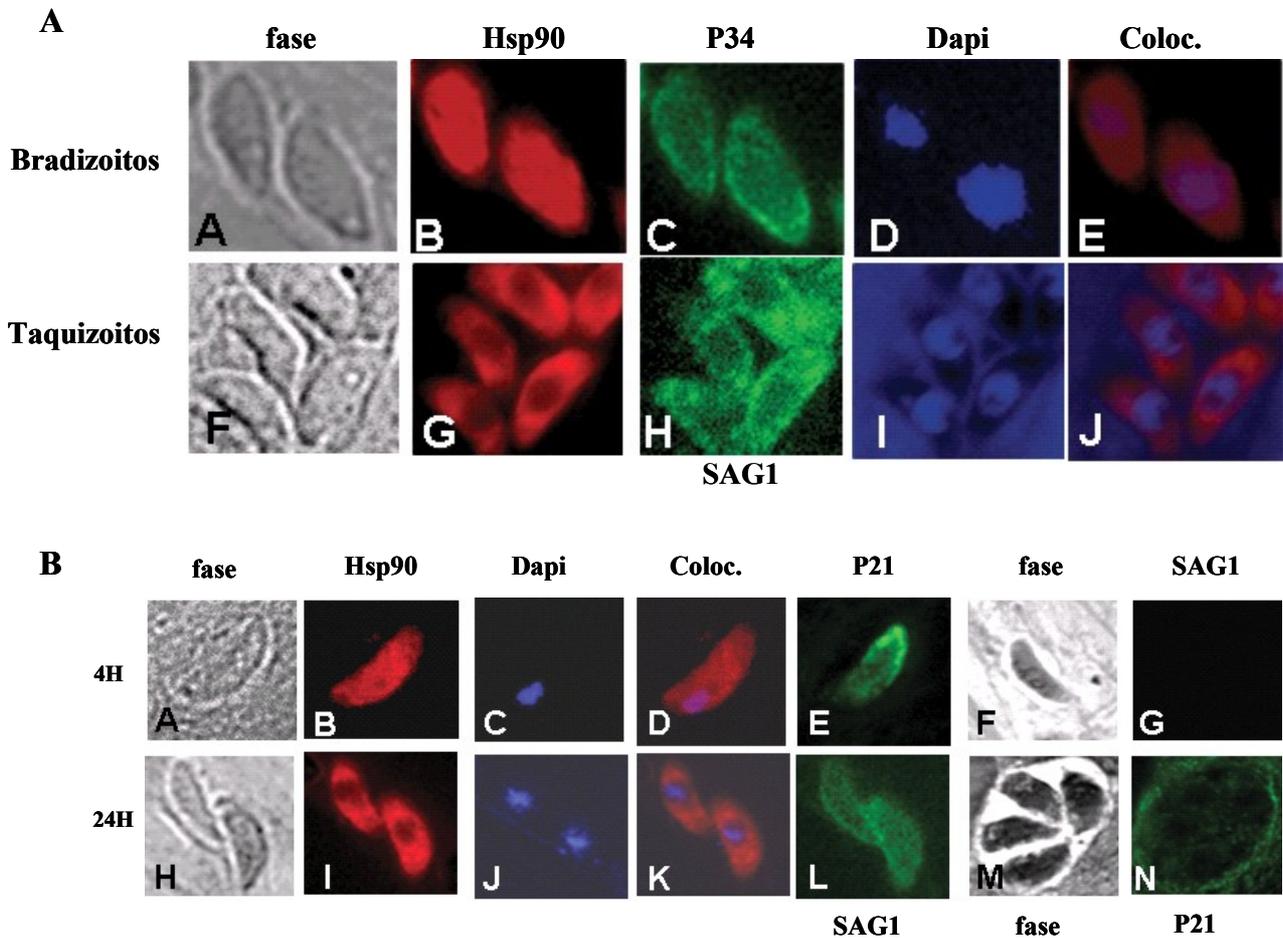


Figura 3.7: Localización intracelular de la proteína Hsp90 en parásitos de la cepa PK, durante el desarrollo de taquizoito a bradizoito y de bradizoito a taquizoito. A. Parásitos crecidos en condiciones de diferenciación a bradizoito durante 4 días (estrés alcalino). Para controlar el pasaje a bradizoito se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos del estadio taquizoito (anti-SAG1), o del estadio bradizoito (anti-p34). B. Se inocularon en monocapas confluentes de células HFF, bradizoitos provenientes de quistes de cerebro de ratón, y se los incubó en condiciones de diferenciación a taquizoito. Las IFIs se realizaron a las 4 horas post-inoculación (todavía bradizoitos) y a las 24 horas (taquizoitos). Para la observación de bradizoitos maduros se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-p21.

La GA inhibe el crecimiento de los parásitos

A partir del análisis de la secuencia aminoacídica y modelado del dominio N-terminal de la proteína Hsp90 de *T. gondii* (Figs. 3.1A y 3.3A-B), se observó que además de poseer los residuos necesarios para establecer los puentes hidrógenos esenciales en la unión con la geldanamicina en su estructura terciaria predicha, ésta

proteína también posee el espacio molecular donde la GA se aloja, dentro del dominio ATPasa. Ahn y col (2003) [218] describieron previamente un efecto inhibitorio parcial de la GA en la capacidad de invasión de taquizoitos. Con estos antecedentes, y basándonos en nuestros resultados de localización diferencial de TgHsp90 en los distintos estadios del desarrollo asexual del parásito, nos propusimos investigar el efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el desarrollo de *T. gondii* empleando la droga GA. Para ello se trataron monocapas de células HFF, infectadas con taquizoitos de las cepas RH $\Delta UPRT$ y PK durante la inducción a bradizoito por 4 días, con GA (100 nM). Se observaron varios efectos. Uno de ellos se refiere al nivel de crecimiento luego de 4 días de inducción a bradizoito, para lo cual, se cuantificó el número de parásitos totales cada 100 células huésped al final del experimento. Fue posible observar una reducción significativa ($P < 0,05$) en el crecimiento de los parásitos (Fig. 3.8), comparado con los cultivos control, tratados con DMSO. Se confirmó este resultado, al analizar la capacidad de replicar del parásito intracelularmente (luego de 4 días de inducción a bradizoito), cuantificando el número de parásitos por vacuola de célula infectada. También en este caso, se pudo observar una significativa reducción en la replicación de los parásitos en los cultivos tratados con GA en comparación a los controles solo tratados con DMSO (Fig. 3.9) en ambos casos usando parásitos de las cepas PK o RH $\Delta UPRT$, indicando un efecto inhibitorio de GA sobre *T. gondii*.

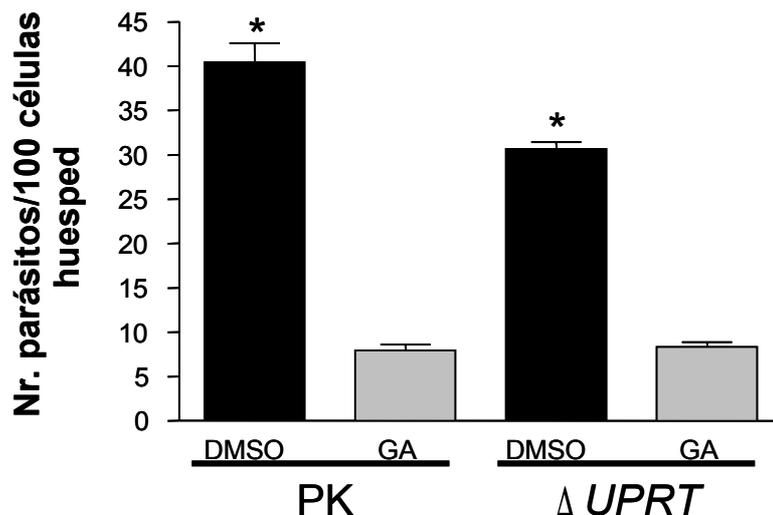


Figura 3.8. Efecto de GA en el nivel de carga parasitaria del cultivo de células huéspedes durante la conversión de taquizoito a bradizoito. Se crecieron parásitos en condiciones de diferenciación a bradizoito durante 4 días en presencia de 100 nM GA o DMSO. Se analizaron por IFI usando el anticuerpo anti-Hsp90 de *T. gondii*. se contaron los parásitos fluorescentes, como el número de parásitos por cada 100 células huésped analizadas al azar. Esto fue repetido tres veces y en tres experimentos independientes. La significancia entre grupos de cada cepa se determinó usando el test t de Student mediante el programa Prism3 (Graphpad): * $P < 0,05$.

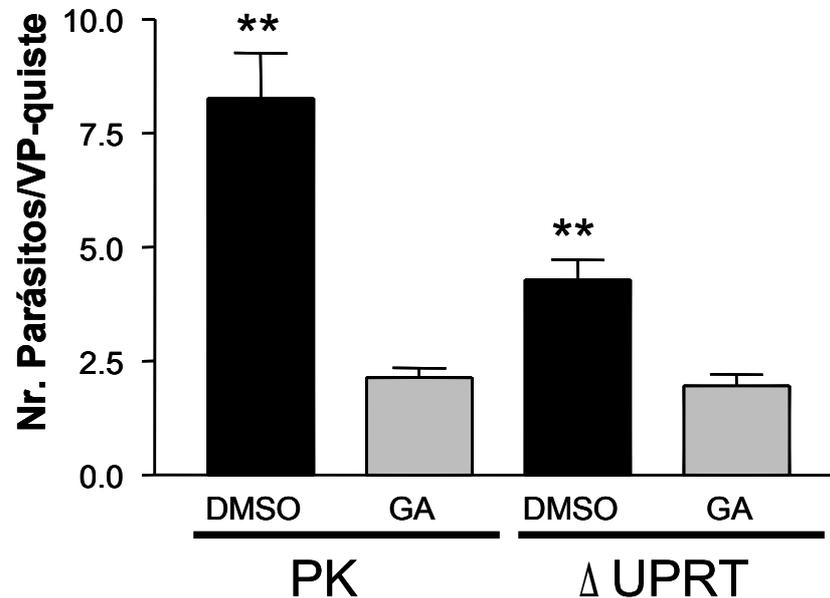


Figura 3.9: Efecto de GA sobre la replicación de *T. gondii* durante la conversión de taquizoito a bradizoito. Se crecieron parásitos en condiciones de diferenciación a bradizoito durante 4 días en presencia de 100 nM GA o DMSO. Se analizaron por IFI usando el anticuerpo anti-Hsp90 de *T. gondii*, se contaron los parásitos fluorescentes, como el número de parásitos por vacuola parasitófora (VP) o quiste. Se contaron un total de 100 VP-quistes. Esto fue repetido tres veces y en tres experimentos independientes. La significancia se determinó usando el test t de Student mediante el programa Prism3 (Graphpad): * P<0.05; ** P<0.01.

La GA bloquea la conversión de taquizoito a bradizoito.

Continuando con el análisis de los efectos de GA sobre el desarrollo de taquizoito a bradizoito, se determinó la influencia de la droga sobre la diferenciación a bradizoito y sobre la localización intracelular de TgHsp90. Los parásitos crecidos bajo condiciones de inducción a bradizoito y tratados con GA o DMSO fueron analizados por IFI usando anticuerpos anti-p34 (marcador bradizoito) y anti-hsp90 (marcador de parásito). A modo de esquematizar el análisis la población fue dividida en 4 categorías: parásitos P34 negativos (P34-) (no desarrollados) y con Hsp90 solo con localización citoplasmática (Hsp90c) o citoplasmática y nuclear (Hsp90c,n), parásitos P34+ (desarrollados a estadio bradizoito) y con Hsp90c o Hsp90c,n (Fig.3.10A y B).

El tratamiento con GA produjo una drástica reducción en la producción de bradizoitos: cerca de un 75% de las vacuolas parasitóforas muestran un fenotipo del tipo “taquizoito” (P34-,Hsp90c) en el cultivo tratado con GA, en comparación con los no tratados (DMSO) que eran completamente bradizoitos desarrollados (P34+,Hsp90c,n), tal como se puede observar en la primera y última barra de la cepa RH $\Delta UPRT$ de la figura 3.10A. Se obtuvieron resultados similares utilizando la cepa PK (Figura 3.10B). Sin embargo, es interesante tener en cuenta que en este ultimo caso se observa, cuando se analiza el control DMSO (condiciones normales de desarrollo), un número más grande de parásitos con una localización extranuclear de Hsp90 durante el desarrollo a bradizoito (P34+,Hsp90c) en comparación con la cepa RH $\Delta UPRT$.

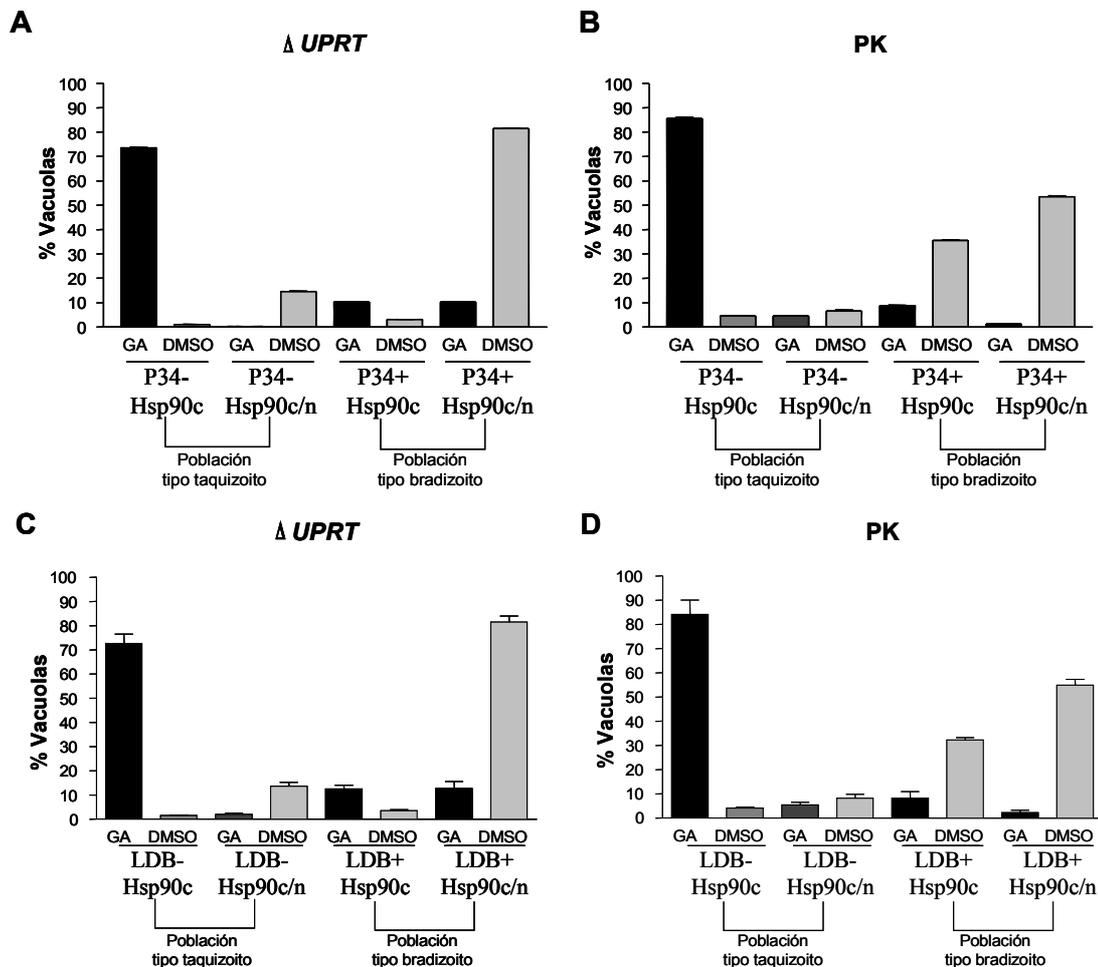


Figura 3.10: Efecto de la GA en la conversión taquizoito-bradizoito. Se crecieron parásitos de ambas cepas en condiciones de diferenciación a bradizoito durante 4 días en presencia de 100nM de GA o DMSO (control). La localización de la Hsp90 citoplasmática (c) y nuclear (n) fue analizada por IFI usando el anticuerpo de conejo anti-Hsp90 de *T. gondii*. Por IFI usando el anticuerpo anti-P34 (A y B), o la lectina de *Dolichos biflorus*, LDB (C y D), como marcadores específicos de bradizoito se identificaron los parásitos (P34+) y (P34-) o (LDB+) y (LDB-). Se graficó el % de vacuolas para cada grupo definiendo a las vacuolas positivas como el número de VP o quistes que muestran parásitos internos marcados con un anticuerpo específico en el citoplasma o en el núcleo. Todos los parásitos dentro de las vacuolas lucieron similares. El % de vacuolas: P34+/Hsp90c; P34+/Hsp90c,n; P34-/Hsp90c y P34-/Hsp90c,n (para C y D, corresponde LDB); o sea, el número de vacuolas positivas cada 100 VP-quistes se contó al azar, en 3 experimentos independientes.

Esto sugiere la existencia de una población mixta de taquizoitos y bradizoitos de la cepa PK, luego de pasados 4 días de inducción. Ambas cepas (RH $\Delta UPRT$ y PK) exhiben rasgos característicos en el desarrollo a bradizoito.

Todos éstos resultados se confirmaron cuando se utilizó, además de los anticuerpos anteriormente nombrados, a la lectina de *D. biflorus* (LDB) como marcador de bradizoitos en lugar de P34 (Figura 3.10C y D),

Con el objeto de determinar si posibles efectos tóxicos irreversibles de la GA sobre los parásitos o células HFF serían los responsables del bloqueo del desarrollo, se incubaron taquizoitos extracelulares frescos de la cepa RH $\Delta UPRT$ con 500nM de GA durante 2 hs, luego se eliminó la droga por lavado, se inoculó a los parásitos en una monocapa de células huésped y por último se los incubó en condiciones de inducción a bradizoito. Se observó una significativa reducción ($P < 0.05$) en el nivel de invasión (Fig. 3.11), pero los parásitos que invadieron exitosamente las células se pudieron replicar y desarrollar al estadio bradizoito de la misma manera que lo hace una parásito sin tratar (Fig. 3.12A).

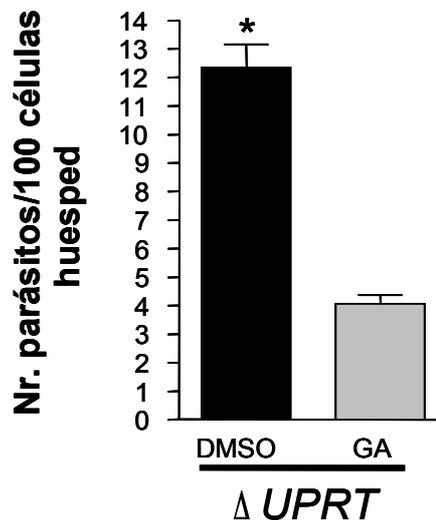


Figura 3.11: Efecto de GA en la invasión de *T. gondii*. Se infectó una monocapa de células HFF con taquizoitos de la cepa $\Delta UPRT$, previamente tratados con 500 nM GA o DMSO durante 2 hs y posterior lavado. 4 hs post-infección, se analizaron las muestras por IFI usando el anticuerpo anti-Hsp90 de *T. gondii*, contándose los parásitos fluorescentes, como el número de parásitos por cada 100 células huésped. Esto fue repetido tres veces y en tres experimentos independientes. La significancia entre grupos se determinó usando el test t de Student mediante el programa Prism3 (Graphpad): * $P < 0.05$.

Se realizó el mismo experimento pero esta vez pre-tratando a las células HFF con 500nm de GA por dos horas y luego lavando la droga. En este caso no hubo ninguna reducción en la invasión (datos no mostrados) y el desarrollo a bradizoito fue totalmente normal (Fig. 3.12B). Todo esto sugiere que la GA tiene un efecto reversible en el largo término luego del tratamiento en los taquizoitos y/o células huésped (por ej. 4 días).

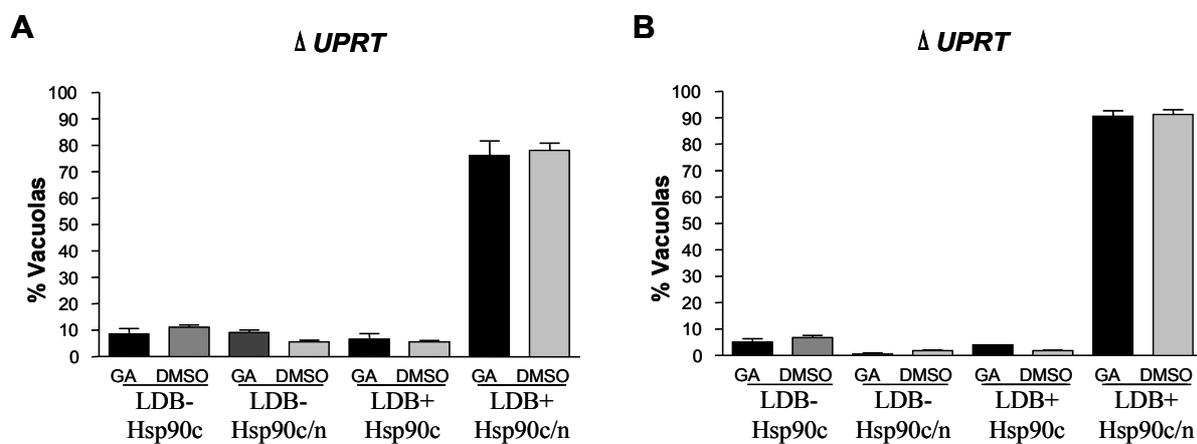


Figura 3.12: Efecto reversible de la GA en la conversión taquizoito-bradizoito. **A.** Se crecieron parásitos RH $\Delta UPRT$, previamente incubados con 500nM de GA o DMSO durante 2 hs y posterior lavado, en condiciones de diferenciación a bradizoito durante 4 días. **B.** Se infectaron células HFF, previamente incubados con 500nM de GA o DMSO durante 2 hs y posterior lavado, con parásitos RH $\Delta UPRT$, y luego se los creció en condiciones de diferenciación a bradizoito durante 4 días. En ambos experimentos, la localización de la Hsp90 citoplasmática (c) y nuclear (n) fue analizada por IFI usando el anticuerpo de conejo anti-Hsp90 de *T. gondii*. Por fluorescencia usando la lectina de *Dolichos biflorus* (LDB, marcador específico de bradizoito) conjugada con fluoresceína, se identificaron los parásitos (LDB+) y (LDB-). Se graficó el % de vacuolas para cada grupo definiendo a las vacuolas positivas como el número de VP o quistes que muestran parásitos internos marcados con un anticuerpo específico en el citoplasma o en el núcleo. Todos los parásitos dentro de las vacuolas lucieron similares. El número de vacuolas: LDB+/Hsp90c; LDB+/Hsp90c,n; LDB-/Hsp90c y LDB-/Hsp90c,n; cada 100 PV-quistes se contó al azar, en 3 experimentos independientes.

La GA bloquea la conversión de bradizoito a taquizoito.

Se analizó el efecto de la GA en la transición de bradizoito a taquizoito, en un modelo *in vitro* de reactivación toxoplásmica. Se estudió la acción de la GA sobre bradizoitos obtenidos del cerebro de ratones infectados con parásitos de la cepa PK. Para esto se incubaron a los bradizoitos por 2 horas con GA. Luego del lavado para eliminar la GA remanente se inoculó la preparación de parásitos en una monocapa de

HFF y se analizaron los preparados a las 4 y 24 horas post-infección. A las 4hs se cuantifican los bradizoitos presentes que lograron invadir exitosamente, y a las 24 hs el nivel de crecimiento del mismo cultivo. Los bradizoitos tratados mostraron una reducción de aproximadamente el 60% en la invasión y luego de pasadas las 24 hs de cultivo se observa una disminución en el número de total parásitos que alcanza la inducción, comparado con los parásitos control solamente tratados con DMSO (Fig. 3.13).

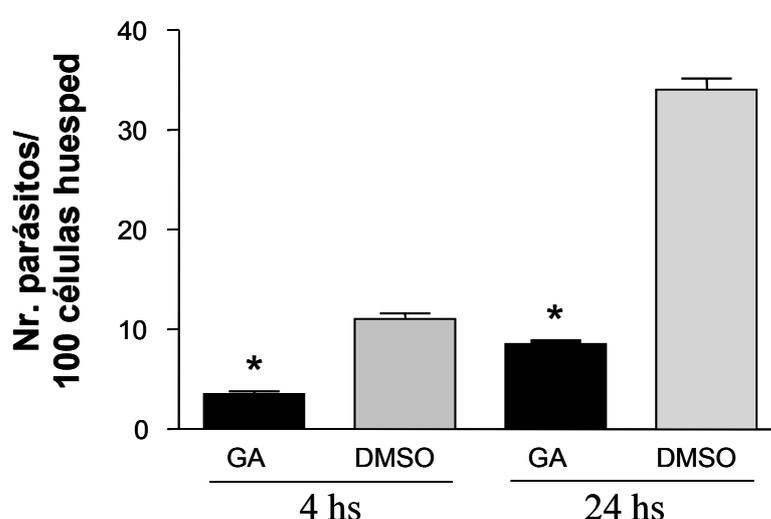


Figura 3.13: Efectos de GA sobre la invasión de bradizoitos y posterior crecimiento en la conversión de bradizoito a taquizoito. Bradizoitos de la cepa ME49 provenientes de quistes de cerebro de ratones infectados, se incubaron con 500nm de GA o DMSO durante 2 horas y previo lavado fueron inoculados en una monocapa de células HFF, y crecidos en condiciones taquizoito. Las muestras se analizaron por IFI usando el anticuerpo anti-Hsp90 de *T. gondii*, contándose los parásitos fluorescentes, como el número de parásitos por cada 100 células huésped. Esto fue repetido tres veces y en tres experimentos independientes. La significancia entre grupos de cada cepa se determinó usando el test t de Student mediante el programa Prism3 (Graphpad): * P<0.05.

Se analizaron por IFI a las células HFF infectadas usando anticuerpos anti-P21 (marcador de bradizoito maduro), -SAG1 (taquizoito) y -Hsp90 (parásito). A las 4 h post-infección casi todos los parásitos observados (mas del 95%) fueron bradizoitos (P21+, SAG1-) (Fig. 3.14A, barras GA y DMSO). Mientras que a las 24 h los parásitos tratados con GA se quedan bloqueados no pudiendo desarrollar al estadio taquizoito (el 96% se mantiene P21-, SAG1+), por el contrario los parásitos control tratados solamente con DMSO, pudieron convertirse a taquizoitos a las 24 hs, siendo el 25% P21 positivo y el 75% SAG1 positivo (Fig. 3.14A).

La figura 3.14B muestra la localización subcelular de Hsp90 en presencia y ausencia de GA. Como era de esperar, luego de 24 hs un 89.5% de los parásitos tratados con DMSO se desarrollaron al estadio taquizoito en concordancia con el patrón de localización de la proteína Hsp90 (Hsp90c), luego de 24 horas.

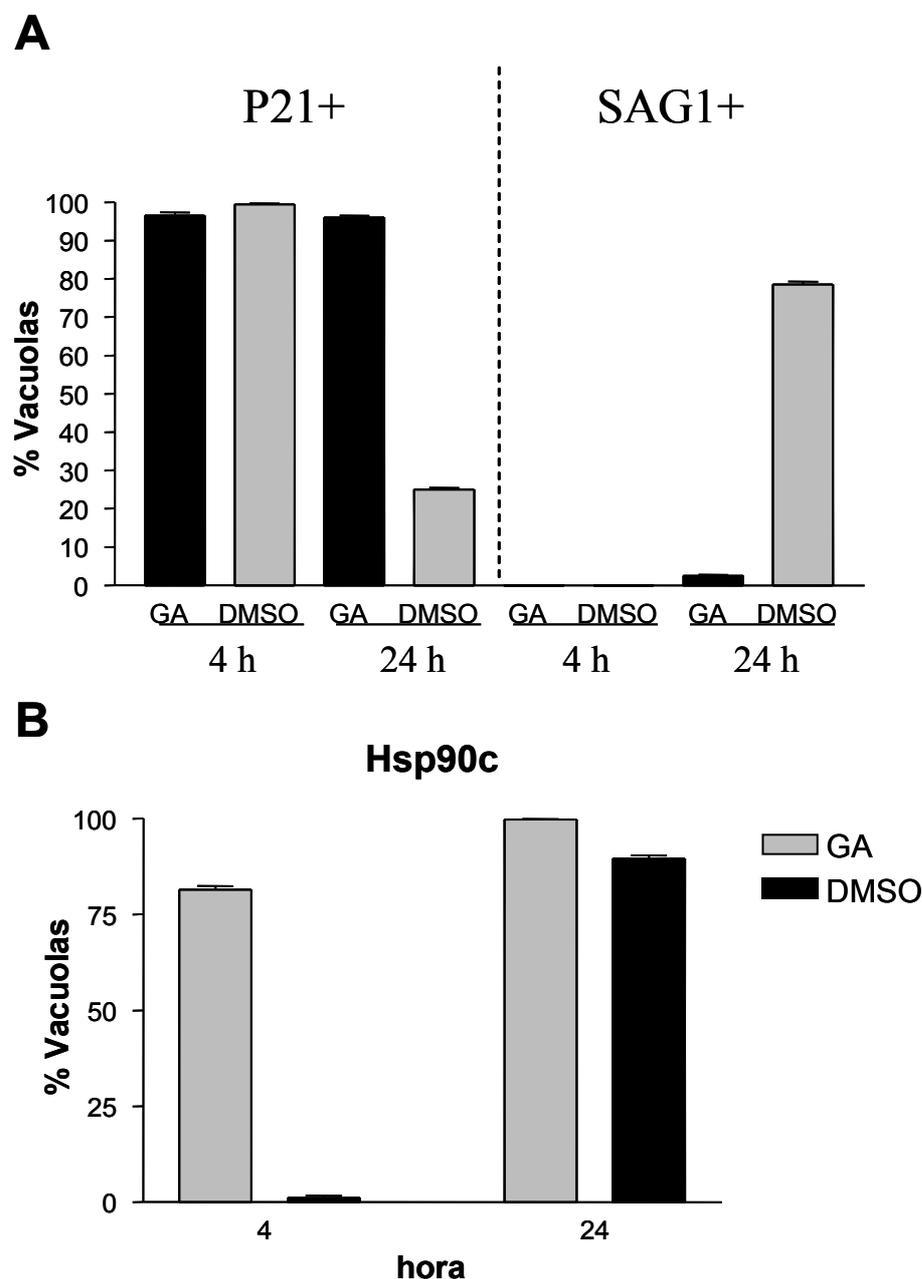


Figura 3.14. Efecto de la GA en la conversión de bradizoito-taquizoito. Bradizoidos de la cepa ME49 provenientes de quistes de cerebro de ratones infectados, se incubaron con 500nm de GA o DMSO durante 2 hs y fueron inoculados en una monocapa de células HFF, y crecidos en condiciones taquizoito. Mediante ensayos de fluorescencia se identificaron los bradizoidos maduros usando el anticuerpo monoclonal anti-P21y los taquizoidos mediante el anticuerpo anti conejo anti-SAG1. Todos los parásitos lucieron similares dentro de las vacuolas. Se graficó el % de vacuolas para cada grupo definiendo a las vacuolas positivas como el número de VP o quistes que muestran parásitos internos marcados con un anticuerpo específico según se indique **A**. El número de vacuolas positivas cada 100 VP-quistes se contó al azar en 3 experimentos independientes. **B**. Se midió el efecto de la GA en la localización subcelular de la Hsp90. Se cuantificaron las vacuolas positivas mostrando la Hsp90 citoplasmática en los parásitos tratados con GA o DMSO. Se contaron al azar un total de 100VP-quistes en tres experimentos independientes.

Sorprendentemente, 4 horas post-inoculación se pudo observar que un 81.5% de parásitos tratados con GA, mostraban un patrón de localización de la proteína Hsp90 del tipo taquizoito (Hsp90c). Luego de 24 post-infección cerca del 100% de los parásitos tratados con GA muestran una localización citoplasmática exclusiva de Hsp90 (Hsp90c, Fig. 3.14B).

A diferencia de los parásitos controles, los tratados con GA no fueron capaces de comenzar la primera etapa de replicación como se observa en la figura 3.15C, donde los cultivos tratados con GA muestran en su gran mayoría vacuolas con un solo parásito, por el contrario en los cultivos controles casi la totalidad de las vacuolas portan dos parásitos (Fig. 3.15B).

Como la replicación y la invasión se vieron afectados, se continuó el estudio por mas tiempo, analizando un curso temporal de hasta 72 horas (Fig. 3.15). Al final del experimento los parásitos tratados con GA o DMSO finalmente terminaban convertidos en taquizoitos, indicando que el efecto de la GA era transiente. Más aún, estos mismos parásitos que lisaron la monocapa de células HFF fueron capaces de re-invasión una nueva monocapa. En la figura 3.15 se puede observar el efecto de la GA en la dinámica de la conversión del estadio bradizoito al taquizoito. Los bradizoitos control muestran una caída del marcador de bradizoito P21 casi inmediatamente comenzado el experimento de conversión siendo casi total a las 24 hs, inversamente proporcional es la aparición del marcador SAG1 (marcador del estadio taquizoito), el cual es casi máximo a las 24 hs, llegando al tope a las 48 hs (Fig. 3.15B). Por el contrario los parásitos pre-tratados con GA, mostraron un corrimiento en el punto de desaparición del marcador P21 y aparición de SAG1 hacia las 48 hs, aunque a las 72 hs el desarrollo hacia taquizoito fue total (Fig. 3.15A). En este experimento se analizó también la dinámica de replicación de los parásitos en su tránsito desde el estadio bradizoito al taquizoito (Fig. 3.15C y D). Como fue mencionado el pre-tratamiento con GA, produce una anulación de la replicación en las primeras 24 horas del experimento para recién comenzar a las 48 hs (Fig. 3.15C). Esto significó un corrimiento en el comienzo de los primeros ciclos de replicación al comparar con lo observado en los parásitos control, los cuales comienzan a las 24 horas a mostrar vacuolas con dos parásitos, signo de la primer ronda de replicación (Fig. 3.15C). Todo esto indica que el tratamiento con GA produce un efecto de retardo en el desarrollo y en el comienzo de

la división celular, y además este efecto es reversible ya que a las 72 hs ambos grupos muestran taquizoitos completamente desarrollados y con vacuolas con 6 o más parásitos.

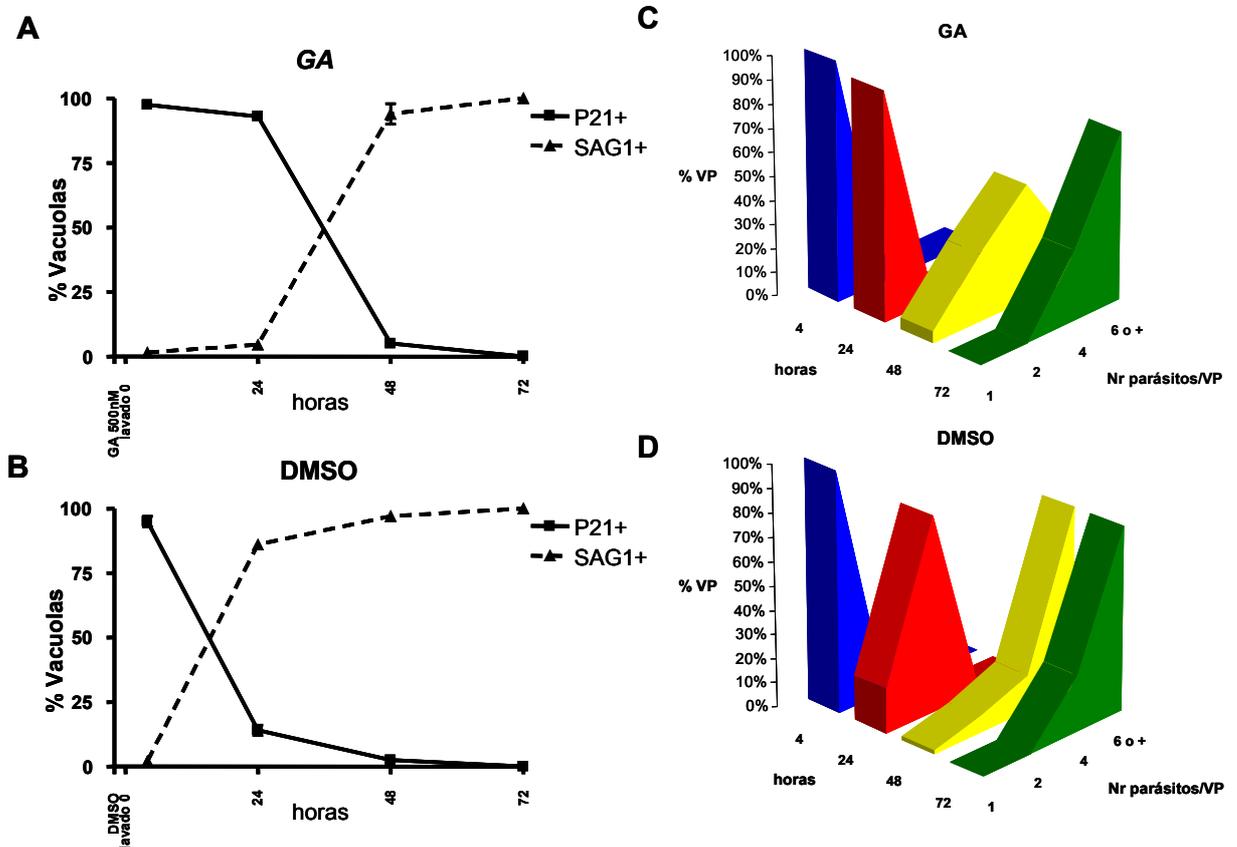


Figura 3.15. Efecto del pre-tratamiento GA en la conversión de bradizoito-taquizoito durante 72 hs. Bradizoitos de la cepa ME49 provenientes de quistes de cerebro de ratones infectados, se incubaron con 500nm de GA (A y C) o DMSO (B y D) durante 2 horas y fueron inoculados en una monocapa de células HFF, y crecidos en condiciones taquizoito. Mediante ensayos de fluorescencia se identificaron los bradizoitos maduros usando el anticuerpo monoclonal anti-P21y los taquizoitos mediante el anticuerpo anti conejo anti-SAG1. Todos los parásitos lucieron similares dentro de las vacuolas. Se graficó el % de vacuolas para cada grupo definiendo a las vacuolas positivas como el número de VP o quistes que muestran parásitos internos marcados con un anticuerpo específico según se indique. **A y B**, el número de vacuolas positivas cada 100 PV-quistes se contó al azar en 3 experimentos independientes. **C y D**, se cuantificó el porcentaje vacuolas con 1, 2, 4 y 6 o más parásitos por IFI usando el anticuerpo anti-Hsp90 de *T. gondii* durante el experimento. Se contaron al azar un total de 100VP-quistes en tres experimentos independientes.

La base de datos de “ESTs” de *T. gondii* contiene secuencias de co-chaperonas “putativas” de Hsp90

Con el objetivo de comprender algunos aspectos de las funciones y mecanismos ejercidos por Hsp90 de *T. gondii*, se procedió, en la base de datos del proyecto genoma de *Toxoplasma* (www.ToxoDB.org), a la búsqueda exhaustiva de la ampliamente estudiada “maquinaria” chaperona basada en las Hsp90/Hsp70 [72]. Como fue mencionado esta maquinaria incluye varias proteínas como, Hsp40, Hip, P23, Hop e inmunofilinas. Todas estas proteínas pudieron ser detectadas en la base de datos del genoma de *T. gondii* (Tabla 2) y su secuencia aminoacídica determinada. La Hsp70 de *T. gondii* fue previamente descrita por Weiss y col. [90]. Por otro lado se pudieron localizar las proteínas, Hsp40, CHIP, Hip, Hop, P23 y dos inmunofilinas, las cuales (con la excepción de Hsp40) estaban catalogadas como secuencias desconocidas, pero por su alta homología con las mismas proteínas previamente descritas en varios organismos, se las pudo designar como proteínas putativas (Tabla 3.1).

Chaperonas	Dominios	Código de acceso en toxodb.org o referencia
Hsp70		[90]
Hsp40	DnaJ	TgTwinScan_3127
CHIP	TPR (uno)	TgTwinScan_3132
Hip	TPR (uno) Sti1	TgESTzyg58c11.y1+TgEST_95058409 TgTwinScan_5892
Hop	TPR(tres)	TgTwinScan_2872
P23	P23	TgEST_100119695+TgEST_95051660 TgTwinScan_2332
Inmunofilina1	TPR (uno truncado)	TgTwinScan_3437
Inmunofilina2	TPR (uno)	TgTwinScan_4751

Tabla 3.1: Principales co-chaperonas localizadas en la base de datos de ESTs de *T. gondii*. (Dominios obtenidos por “CD-search” [229] (www.ncbi.org))

Dentro de este grupo hallado, varias proteínas poseen dominios TPR, tal es el caso de CHIP, Hip, Hop y dos variantes de inmunofilinas.

Con el fin de identificar y caracterizar los componentes que pudieran estar teniendo funciones importantes junto con la proteína Hsp90 en complejos en *T. gondii*, se procedió al clonado, secuenciación, predicción y análisis de estructura 2^{ria} y 3^{ria}, expresión y producción de anticuerpos policlonales específicos de las cochaperonas, Hip como marcador de heterocomplejos de Hsp90 tempranos, y P23 como marcador de heterocomplejos de Hsp90 maduros. Las proteínas Hop y Hsp40, fueron clonadas, secuenciadas y caracterizadas preliminarmente, en cuanto a su estructura.

Identificación de la proteína Hip de *T. gondii* (TgHip)

A partir de las secuencias aminoacídicas de las proteínas Hip de *Ratus norvegicus* (nro. de acceso GenBank P50503) y de *Plasmodium berghei* (nro. de acceso GenBank XP_678103.1), se rastreó la existencia de esta proteína en el genoma de toxoplasma. Accediendo al genoma y bases de datos de ESTs de toxoplasma, en el sitio www.ToxoDB.org, realizando TBLASTN (BLAST de secuencias aminoacídicas conocidas versus secuencias de ESTs traducidas) y explorando la base de datos de proteínas predichas de *T. gondii* TwinScan, se obtuvieron una par de secuencias de ESTs (TgESTzyg58c11.y1+TgEST_95058409) y una secuencia aminoacídica predicha (TgTwinScan_5892). Con estas secuencias halladas pudo reconstruir la secuencia de una Hip putativa, a la cual se procedió a clonar a partir de amplificar la secuencia buscada por PCR usando como molde una biblioteca de ADNc de *T. gondii*. La secuencia de este clon consta de 1278 bases, cuyo ORF codifica para una proteína deducida de 425 aminoácidos con una masa teórica de 45,1 kDa. En la figura 3.16 (calle 1) se puede observar el producto (rTgHip) expresado en un vector de expresión que adiciona seis histidinas en el extremo N-terminal (por lo cual puede ser reconocido por un anticuerpo anti-histidinas), con este producto se produjeron anticuerpos en conejo y ratón que reconocen la proteína endógena (calles 2 y 3 respectivamente). Con los anticuerpos anti-TgHip producidos en conejo y ratón, se

observa, el reconocimiento de la banda esperada (~45 kDa) para ésta proteína. En el caso del anticuerpo producido en conejo, se observa la detección una doble banda en la región de 45-kDa y otra de mayor peso molecular, lo cual podría ser atribuido a un reconocimiento inespecífico de otra proteína, por ejemplo alguna con la cual comparta dominios TPR o del tipo Sti1 [78]. En el extracto de células huéspedes (HFF) no se reconoce ninguna banda reactiva que pueda ser confundida con la endógena del parásito (Fig. 3.16, última calle), por reactividad cruzada.

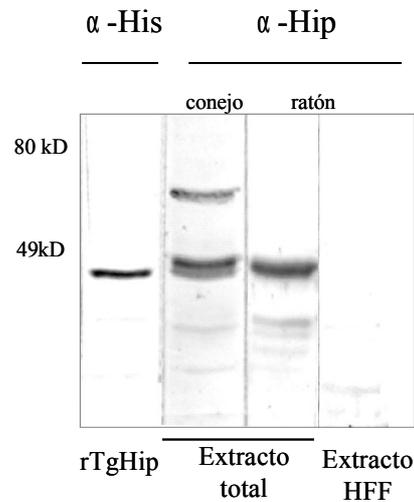


Figura 3.16: Reconocimiento por Inmunoblot de la proteína TgHip endógena y recombinante. Proteína recombinante expresada en *E. coli* reconocida con anticuerpo anti-histidinas (Calle1). TgHip endógena (calles 2 y 3) reconocidas a partir de extractos proteicos totales de taquizoitos de *T. gondii*, reveladas con anticuerpo preparado en conejo (calle 2) o con anticuerpo preparado en ratón (calle 3). El extracto total de fibroblastos humanos (HFF) fue testeado con anticuerpo anti TgHip preparado en ratón (calle 4). Los pesos moleculares se muestran a la izquierda

Estructura primaria de Hip

En la figura 3.17A se muestra el alineamiento de las secuencias aminoacídicas deducidas de la proteína Hip de *T. gondii* y de otras especies incluyendo la humana, utilizando un programa del tipo clustal (MAFFT). Si bien se observan grandes regiones con poca homología con las versiones humana y de rata, por un lado esto no ocurre con las secuencias de la proteínas Hip pertenecientes a *Plasmodium spp.*, y por otro, es interesante notar la presencia y conservación de dominios y secuencias características de la proteínas Hip. La proteína TgHip solo muestra un par de repeticiones del tetrapéptido GGMP (indicadas en marrón en Fig. 3.17A), este motivo

esta representado en varias repeticiones en las proteínas Hip pertenecientes a *Plasmodium spp.* analizadas (Fig. 3.17A). Estas repeticiones pueden ser halladas en zonas cercanas a la región de unión a péptido de varias Hsp70 [230], y podría ser responsable de interacciones proteína-proteína [231].

Como se observa en la figura 3.17A y se esquematiza en la fig. 3.17B, el extremo C-terminal de TgHip, al igual que el de las versiones humana y de rata, poseen relación estructural con el extremo C-terminal de las proteínas humana y de levaduras Sti1 (homólogo de la proteína Hop), rasgo que surge de la búsqueda en estas proteínas de dominios característicos por medio del uso de herramientas disponibles en el sitio “CD-search” [229] (www.ncbi.org), dentro de este dominio se puede hallar un par de motivos DP (repeticiones de aspartato-prolina, secuencias: DPEL y DPEV) importantes en la unión con Hsp70 [129] y el ensamblado del receptor de progesterona a Hsp90 [169]. Las regiones, ya descritas para RnHip, involucradas en la oligomerización de la proteína y en la unión a la Hsp70 [230], tienen alta homología con las mismas regiones alineadas de Hip (Fig. 3.17A y B)

TgHip contiene un dominio TPR perfectamente conservado (recuadro superior Fig. 3.17A), el cual consiste en tres repeticiones de tetratricopetido (indicadas, cada repetición de 34 aminoácidos, con colores distintos dentro del recuadro superior fig. 3.17A). Las repeticiones TPR tienen como características principales ser secuencias degeneradas, dispuestas en repeticiones en tandem, generalmente tres. Todas las repeticiones TPR poseen patrones conservados de similitud de aminoácidos en términos de tamaño, hidrofobicidad y espacio que permiten la conformación estructural de 2 α -hélices antiparalelas por repetición [163, 232]. En la misma cara de cada hélice, seis residuos aminoacídicos son críticos (posiciones 4, 8 y 11 en hélice A y 20, 24 y 27 en la hélice B), también es importante la conservación de los residuos 1 y 17 [163, 232]. Éstos residuos deben ser aminoácidos hidrofóbicos chicos, ya que o bien son vecinos entre hélices (residuos 8 y 20) o están en la interfase de tres hélices (residuo 27, en la interfase de hélices A, B y A'). El residuo 32 de cada repetición es generalmente una prolina o aminoácido hidrofóbico grande. En la figura 3.18 se puede observar la perfecta conservación, en la secuencia de cada repetición TPR de Hip, de todas estas características anteriormente nombradas, al alinearla y compararla con secuencias de repeticiones TPR ampliamente estudiadas como lo son la RnHip [78] y la PP5 [163], así como también la secuencia consenso para repeticiones TPR determinada por Dobson y col [233] (resaltadas en gris en figura 3.18).



Figura 3.18. Alineamiento de las unidades tetratricopeptido de dominios TPR pertenecientes a TgHip, la Hip de rata y la PP5 humana. Resaltado en gris se observa el consenso en la estructura primaria de los dominios TPR “b”= aminoácido hidrofóbico, “l”=aminoácido hidrofílico, y los aminoácidos que cumplen con este consenso dentro de la secuencia. Las barras negras ubican la posición exacta de las hélices- α (representadas esquemáticamente en la parte superior) determinadas por predicción de estructura secundaria. En rojo se muestran los aminoácidos conservados en secuencia y/o estructura presentes en dominios TPR típicos, son residuos hidrofóbicos chicos (res. 8, 20 y 27, son vecinos entre hélices). Con flechas azules se indican las posiciones claves en esta estructura (hélice A: res. 4, 8 y 11; hélice B: 20, 24 y 27) en cuanto al tipo de aminoácido presente. En azul se muestra el residuo 32 que normalmente es un residuo hidrofóbico grande como prolina.

Predicción de la estructura 2^{ria} y 3^{ria} de Hip

La predicción de la estructura secundaria (usando herramientas disponibles en <http://protevo.eb.tuebingen.mpg.de/toolkit>) presente en el dominio TPR de Hip, muestra la potencialidad de la formación de la hélices A y B en sus tres repeticiones (aminoácidos subrayados con barras negras en figura 3.18).

Para demostrar que el dominio TPR de Hip puede potencialmente satisfacer todos los requerimientos estructurales para este tipo de dominios, se procedió al análisis predictivo de la estructura terciaria del mismo. Comparando la secuencia aminoacídica de Hip con la de proteínas TPR con estructura previamente estudiada, mediante el “SwissModel-blast”, se obtuvo como principal candidato a modelo a ser utilizado en el modelado predictivo de TgHip a la estructura del dominio TPR de la fosfoproteína humana PP5 [163] (código de identificación “Protein Data Base” (PDB)

1A17). Con éste modelo y el uso de “SwissModel First Approach” se pudo construir la estructura 3^{ra} predicha del dominio TPR de TgHip, mediante el uso del programa DeepView/Swiss-PDB viewer.

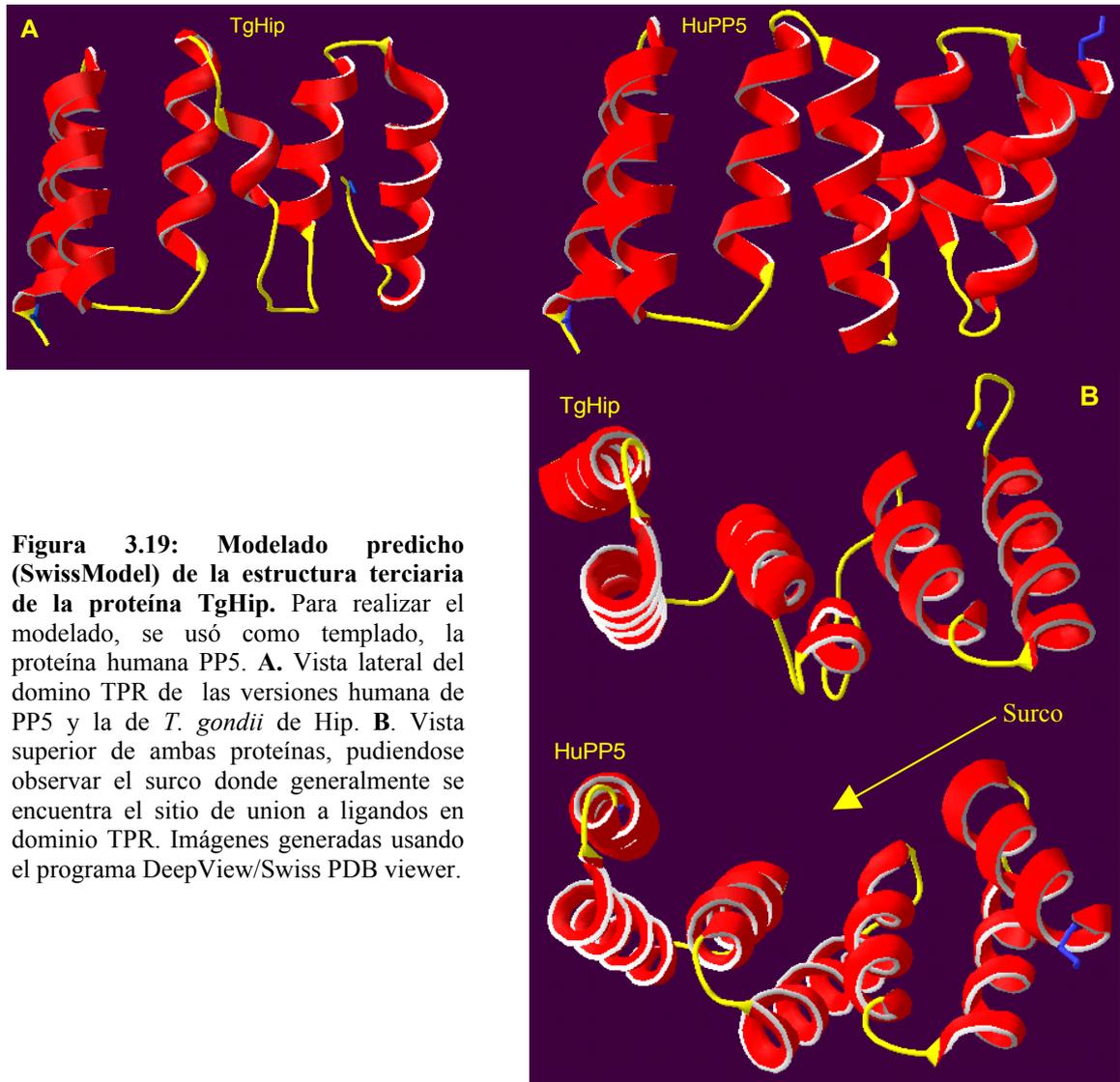


Figura 3.19: Modelado predicho (SwissModel) de la estructura terciaria de la proteína TgHip. Para realizar el modelado, se usó como templado, la proteína humana PP5. **A.** Vista lateral del dominio TPR de las versiones humana de PP5 y la de *T. gondii* de Hip. **B.** Vista superior de ambas proteínas, pudiéndose observar el surco donde generalmente se encuentra el sitio de unión a ligandos en dominio TPR. Imágenes generadas usando el programa DeepView/Swiss PDB viewer.

En la figura 3.19 (vista lateral) se puede observar, el alto grado de similitud estructural del dominio TPR de TgHip con el de PP5, y en la vista superior se puede reconocer el surco que conforman las α -hélices, el cual fue propuesto como sitio de unión de proteínas blanco [163].

Identificación de la proteína P23 de *T. gondii*

A partir de la secuencia aminoacídica de la proteína P23 humana (nro. de acceso GenBank AAA18537.1), se indagó la existencia de esta proteína en el genoma de *T. gondii*. Accediendo al genoma y bases de datos de ESTs de toxoplasma, en el sitio www.ToxoDB.org, realizando TBLASTN y explorando la base de datos de proteínas predecidas de *T. gondii* TwinScan, se obtuvieron secuencias nucleotídicas con las que se realizaron posteriores BLASTN, que finalmente permitieron obtener una par de secuencias de ESTs (TgEST_100119695 y TgEST_95051660) y una secuencia aminoacídica predicha (TgTwinScan_2332). Con estas secuencias se pudo reconstruir la secuencia de una potencial proteína P23 de *T. gondii* (TgP23). La región de ADN codificante para ésta proteína se clonó por amplificación génica empleando como molde una biblioteca de ADNc de *T. gondii*. La secuencia de este clon incluye 682 bases, cuyo ORF codifica para una proteína deducida de 220 aminoácidos con una masa teórica de 24,3 kDa. En la figura 3.20 (calle 1) se puede observar el producto (rTgP23) expresado en un vector de expresión bacteriano que adiciona seis histidinas en el extremo N-terminal (pudiendo ser reconocido por un anticuerpo anti-histidinas). Con este producto se produjo un anticuerpo en ratón que reconoce la proteína endógena (calle 3) de *T. gondii* con la masa molecular esperada (~25 kDa). En el extracto de células huéspedes (HFF) no se reconoce ninguna banda reactiva que pueda ser confundida con la endógena del parásito por reactividad cruzada (Fig. 3.20, calle 2).

Análisis estructural de la proteína P23 de *T. gondii*

Entre los homólogos de la proteína P23 conocidos, se observa una alta similitud en los primeros 100 aminoácidos, pero por otro lado una considerable divergencia en la región C-terminal [234]. Esta región conservada comprende el dominio P23, el cual pudo ser identificado en TgP23 y en otras proteínas homólogas (Fig. 3.21) mediante el uso de herramientas disponibles en el sitio “CD-search” [229] (www.ncbi.org).

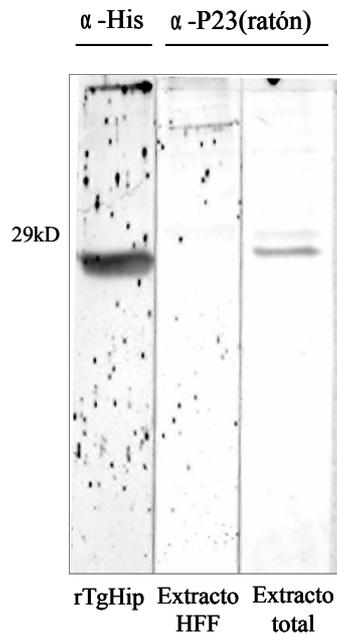


Figura 3.20: Reconocimiento por Inmunoblot de la proteína TgP23 endógena y recombinante. Proteína recombinante expresada en *E. coli* reconocida con anticuerpo anti-histidinas (Calle1). El extracto total de fibroblastos humanos (HFF) fue testeado con un anticuerpo anti TgP23 preparado en ratón (calle 2). TgP23 endógena (calle 3) reconocida a partir de extractos proteicos totales de taquizoitos de *T. gondii*. Los pesos moleculares se muestran a la izquierda.

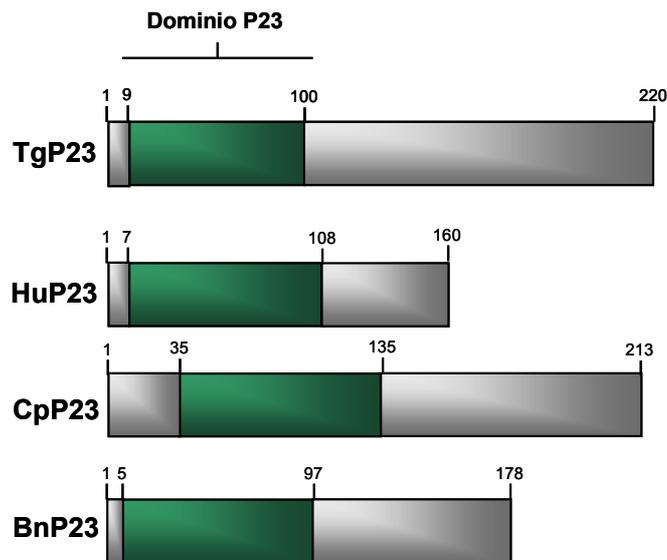


Figura 3.21: Estructura primaria de TgP23. La proteína TgP23 comparte el dominio estructural P23 (determinado por “CD-search”, www.ncbi.org) con las variantes de P23 humana, de *Cristosporidium* y de *Brassica* (se indica en bloques verdes). La región C-terminal es altamente divergente entre las proteínas pertenecientes al grupo.

En la figura 3.22B, comparando con la estructura de la P23 humana, se observa que el dominio P23 de la proteína de toxoplasma modelada, respeta esta estructura de “sándwich” de ocho láminas- β , conservando también los residuos propuestos [234] como intervinientes en la unión a Hsp90, los cuales se indican en ambas proteínas.

Las proteínas de *T. gondii* Hsp90, Hip, P23 y Hsp70 interactúan formando parte de un complejo.

El siguiente paso fue el de comprobar que Hip y P23 estuvieran formando complejos con la Hsp90 y Hsp70 en *T. gondii*. Para ello se emplearon anticuerpos policlonales específicos contra estas co-chaperonas, tomando a TgHip como marcador de heterocomplejos tempranos, y a TgP23 como marcador de heterocomplejos maduros. Los ensayos de co-inmunoprecipitación revelaron que en condiciones normales de crecimiento de taquizoitos existe una interacción mutua entre las proteínas TgHsp90, TgHip, TgP23 y TgHsp70 (Figura 3.23). Dado que la proteína Hip es parte de heterocomplejos tempranos [72], no resultó sorprendente observar que TgHip interactúe con las proteínas TgHsp90 y TgHsp70 pero no con TgP23.

Si bien, la proteína P23 esta considerada como estabilizadora de complejos Hsp90-sustrato al ser miembro de heterocomplejos maduros [177], también se reportó su interacción con la Hsp70 [80]. En la figura 3.23 se observa que TgP23 interactúo solamente con la proteína TgHsp90 pero no con las proteínas TgHip ni con TgHsp70, lo que indicaría una diferencia con lo determinado en otros sistemas. Con éste método de análisis de interacciones proteicas se probaron (con excepción de la Hsp70) inmunoprecipitaciones recíprocas entre TgHsp90, Hip y P23. Además se controlaron los efectos inespecíficos de este tipo de experimentos, testeando sueros preinmunes para cada anticuerpo utilizado y realizando los mismos experimentos sin el uso de los anticuerpos inmunoprecipitantes, para descartar la precipitaciones inespecíficas por parte de la proteína A-sefarosa (datos no mostrados).

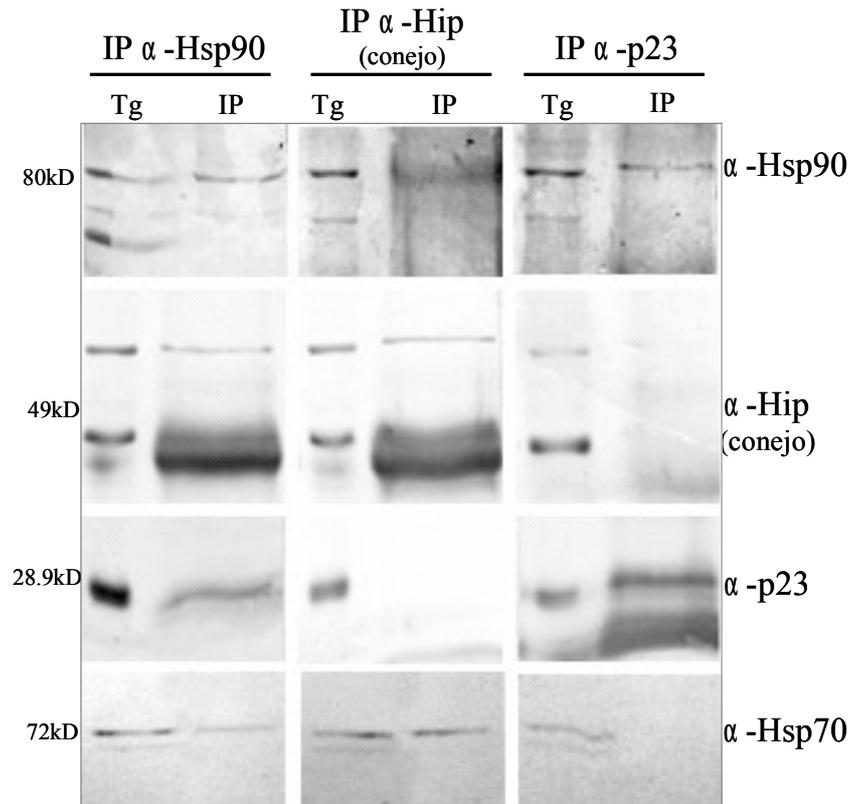


Figura 3.23. Análisis por co-Imunoprecipitación de la interacción de co-chaperonas con la Hsp90 de *T. gondii*. Se utilizaron anticuerpos policlonales anti-Hsp90, -Hip y -P23, para realizar las inmunoprecipitaciones, y los mismos anticuerpos y el monoclonal de ratón anti-Hsp70 humana, para revelar los inmunoblots. Las figuras son representativas de tres experimentos independientes con resultados similares. En la parte superior de la figura se indican los anticuerpos con los cuales se realizaron las inmunoprecipitaciones y en la parte derecha se indican los anticuerpos con los cuales se reveló cada fila de inmunoblots. Los pesos moleculares se muestran a la izquierda. Tg: extracto total de *T. gondii*.

Las proteínas de *T. gondii* Hsp90, Hip y P23, colocalizan y tienen una localización subcelular diferencial en el cambio de estadio.

A partir de las interacciones observadas entre TgHsp90 y las co-chaperonas estudiadas, se procedió al análisis por IFI para determinar la localización intracelular y la posible colocalización de las mismas, usando los anticuerpos policlonales anti-TgHip producido en ratón (pseudo color verde en la Figura 3.24B), anti-TgP23 producido en ratón (pseudo color verde en la Figura 3.24A) y anti-TgHsp90 producido en conejo (pseudo color rojo en Figura 3.24A y B). Claramente se puede observar que existe en ambos estadios una colocalización entre TgHsp90 y TgP23, ocupando exclusivamente el citoplasma de taquizoitos y el núcleo y citoplasma de

bradizoitos. Es decir, la co-chaperona TgP23 acompaña a TgHsp90 en la translocación hacia el núcleo en el cambio de estadio.

El caso de TgHip es distinto, si bien, en el estadio taquizoito (paneles superiores de Fig. 3.24B), ambas proteínas colocalizan ubicándose exclusivamente en el citoplasma. En el estadio bradizoito, aunque la tinción de TgHip sea mas dispersa que en taquizoitos, la colocalización con TgHsp90 sólo se evidencia en el citoplasma (panel inferior, Fig. 3.24B). Observando en detalle el panel correspondiente a la colocalización de DAPI con TgHip, se puede definir la presencia del pseudo color azul en la zona nuclear, sin mezcla con el pseudo color verde correspondiente a TgHip, indicando que TgHip se encontraría excluido del núcleo de bradizoitos. Examinando también el panel donde se analiza la colocalización de TgHsp90 con TgHip, se pueden observar regiones preferentemente verdes, otras amarillas y una región nuclear ocupada por el pseudo color rojo. Todo esto indicaría que en el desarrollo a bradizoito TgHip no acompañaría a TgHsp90 en su translocación al núcleo. En este experimento, TgHsp90 confirmó nuevamente las localizaciones intracelulares previamente observadas.

RESULTADOS

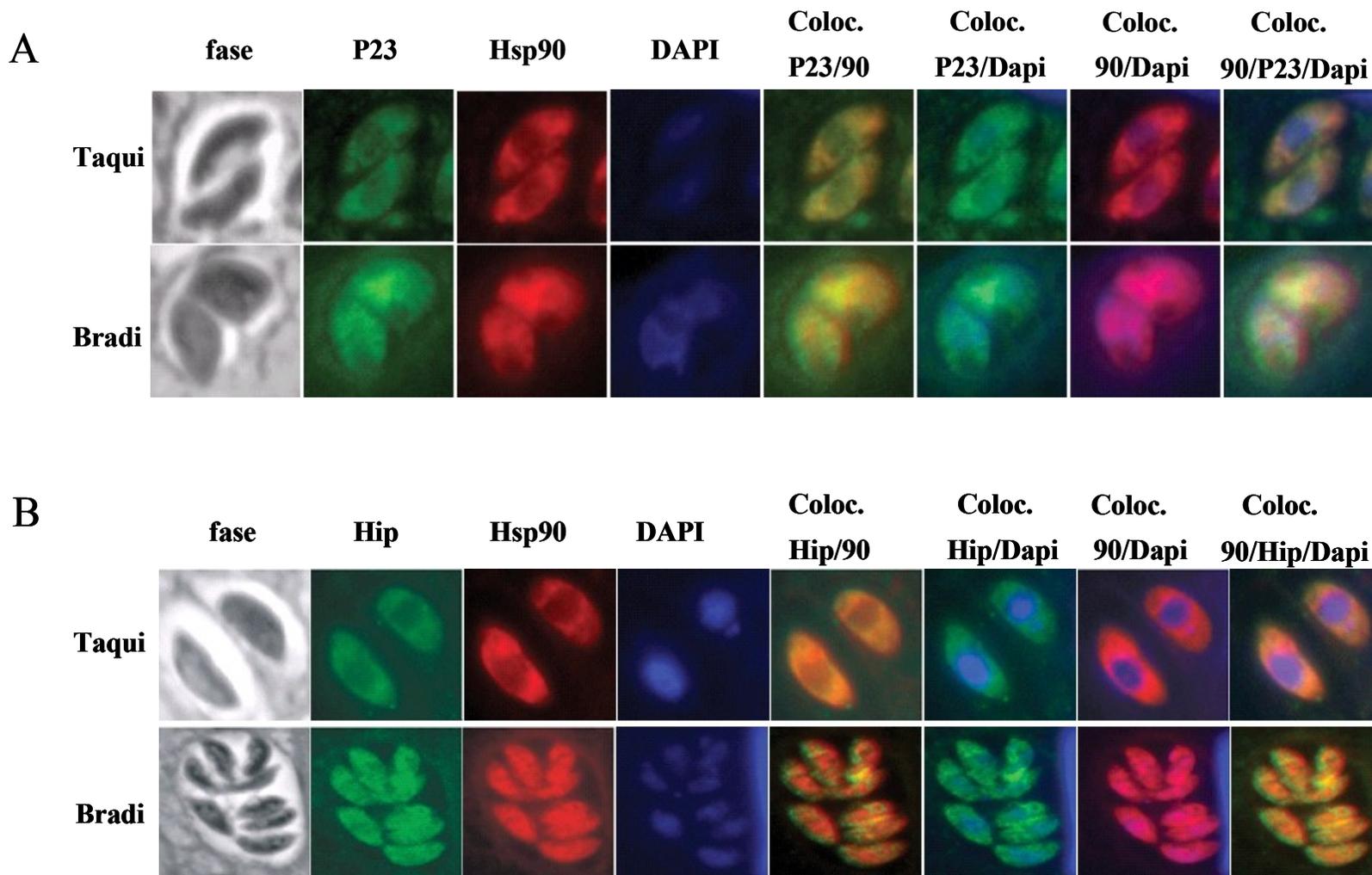


Figura 3.24. Localización intracelular de TgHip y P23 en el desarrollo de *T. gondii*. Co-Localización intracelular de las proteínas TgP23 (A) y TgHip (B) con TgHsp90 en parásitos de la cepa PK. Los parásitos crecidos bajo condiciones taquizoitos o de diferenciación a bradizoitos se sometieron a un análisis por IFI usando el anticuerpo anti-TgHsp90, -TgP23, -TgHip, DAPI, y contraste de fase.

Identificación de la proteína Hop de *T. gondii*

A partir de la secuencia aminoacídica de la proteína Hop (Hsp70/Hsp90-organizing protein) de *Rattus norvegicus* (nro. de acceso GenBank NP_620266.1), se indagó la existencia de esta proteína en el genoma de *T. gondii*. Accediendo al genoma y bases de datos de ESTs de *Toxoplasma*, en el sitio www.ToxoDB.org, explorando la base de datos de proteínas predichas de *T. gondii* TwinScan, se obtuvo una secuencia aminoacídica predicha (TgTwinScan_2872). También se obtuvieron los ESTs que permitieron reconstruir la secuencia de una potencial proteína Hop de *T. gondii* (TgHop). El marco abierto de lectura de TgHop se clonó por amplificación génica usando como molde una biblioteca de ADNc de *T. gondii*. La secuencia nucleotídica de este clon incluye 1719 bases, cuyo marco abierto de lectura codificaría para una proteína deducida de 572 aminoácidos con una masa teórica de 64 kDa.

Estructura primaria de la proteína Hop de *T. gondii*

Todos los homólogos de Hop contienen múltiples dominios TPR [79], para determinar si TgHop comparte este rasgo, se usó el “CD-search” [229] (www.ncbi.org) para identificar dominios putativos. Se hallaron 3 dominios TPR que se pueden observar encuadrados en la figura 3.25, denominados TPR1, TPR2A y TPR2B. Analizando ortólogos de TgHop de diverso origen, se encontró un alto nivel de homología dentro de los dominios TPR (Fig. 3.25). Dentro de los dominios TPR1 y TPR2B se detectan un pentapéptido (VLYSN) y un sexapéptido (YSNRAA), respectivamente, perfectamente conservado, éste último involucrado en la unión con Hsp90 [129]. En la región C-terminal se encuentran los motivos DP (repeticiones de aspartato-prolina) las cuales, son importantes en la unión con Hsp70 [129], éstos aminoácidos están resaltados en amarillo en la figura 3.25. Los residuos de la versión humana de la proteína Hop involucrados en la interacción con motivos EEVD de las proteínas Hsp90 y Hsp70 [132] se pueden observar resaltados en el alineamiento de la figura 3.25 en verde y rojo, los cuáles están altamente conservados en los TPR de TgHop.

RESULTADOS

Estos residuos en la versión humana son responsables mediante interacciones electroestáticas (residuos en rojo fig. 3.25) o uniones hidrofóbicas y de van Der Waals (residuos en verde fig. 3.25) de la especificidad de la unión de Hop con Hsp90 y Hsp70 [132], y a su vez están altamente conservado en los TPR de TgHop. Analizando la estructura primaria de los potenciales dominios TPR de TgHop, se alinearon todas las repeticiones TPR de TgHop (Figura 3.26), en primer lugar se puede notar el alto nivel de conservación de la secuencia consenso para dominios TPR [233] (resaltados en gris los aminoácidos que cumplen con este consenso dentro de la secuencia). También se observa la alta conservación de todos los requisitos, ya mencionados, que son esenciales para la existencia de un dominio TPR, por ejemplo los residuos hidrofóbicos chicos (res. 8, 20 y 27, vecinos entre hélices). También se encuentran las posiciones claves en esta estructura (hélice A: res. 4, 8 y 11; hélice B: 20, 24 y 27 y el res. 32 que normalmente es un residuo hidrofóbico grande como prolina) en cuanto al tipo de aminoácido presente. Resaltados en amarillo, en la figura 3.26, se señalan los residuos altamente conservados en las unidades tetratricopéptido de los dominios TPR de la proteínas Hop, involucrados en la unión con motivos “EEVD” de las proteínas Hsp90/70 [132]. Estos se encuentran también en el dominio TPR2B, aunque este dominio no tiene ligando conocido. En esta figura se agruparon en el alineamiento las repeticiones de cada dominio, de manera, de poder observar que estos residuos (resaltados en amarillo) se encuentran altamente conservados y ubicados en la misma posición dentro de la repetición TPR

Predicción de estructuras secundarias y terciarias de TgHop

La predicción de la estructura secundaria (usando herramientas disponibles en <http://protevo.eb.tuebingen.mpg.de/toolkit>) presente en los dominios TPR de TgHop, muestra la potencialidad de la formación de las hélices A y B en todas las repeticiones de los tres dominios TPR (aminoácidos subrayados con barras negras en figura 3.26).

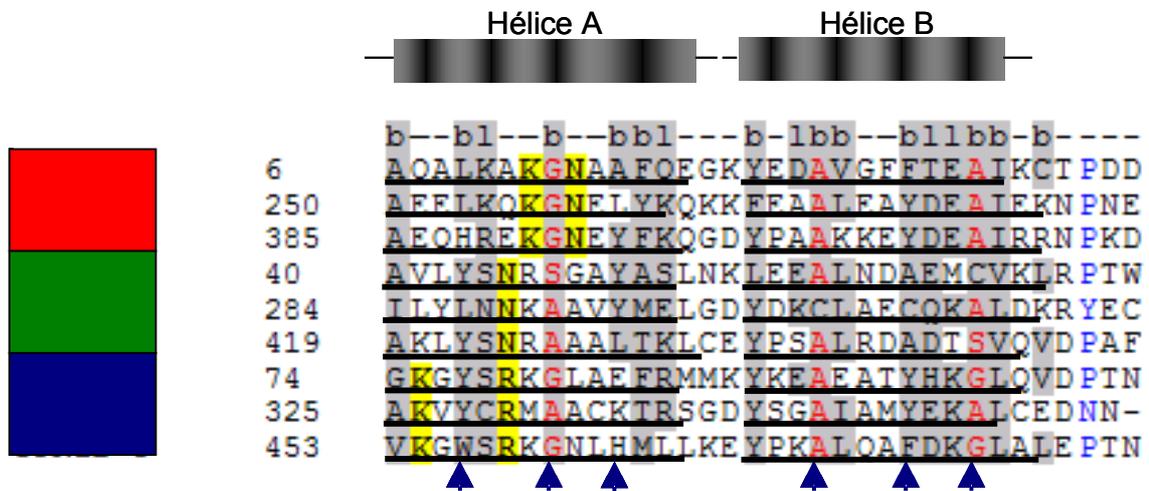


Figura 3.26. Alineamiento de las unidades tetrapéptido de dominios TPR1, TPR2A y TPR2B pertenecientes a TgHop. Resaltados en gris se observa el consenso en la estructura primaria de los dominios TPR “b”= aminoácido hidrofóbico, “l”=aminoácido hidrofílico, y los aminoácidos que cumplen con este consenso dentro de la secuencia. Las barras negras ubican la posición exacta de las hélices- α (representadas esquemáticamente, en la parte superior) determinadas por predicción de estructura secundaria. En rojo se muestran los aminoácidos conservados en dominios TPR típicos. Con flechas azules se indican las posiciones claves en esta estructura (hélice A: res. 4, 8 y 11; hélice B: 20, 24 y 27) en cuanto al tipo de aminoácido presente. En azul se muestra el residuo 32 que normalmente es un residuo hidrofóbico grande como prolina. Resaltados en amarillo se señalan los residuos altamente conservados en las unidades tetrapéptido de los dominios TPR de la proteínas Hop, involucrados en la unión con péptidos “EEVD” de proteínas Hsp90/70, se encuentran también

Para un análisis más detallado de los dominios TPR de TgHop, se procedió al análisis predictivo de la estructura terciaria del mismo. Mediante el “SwissModel-blast”, se obtuvieron distintos candidatos “modelos” para ser utilizados en el modelado predictivo de los tres dominios TPR de TgHop: para el dominio TPR1, se usó la variante humana de este dominio (código PDB 1ELW) [132], para el dominio TPR2B también se usó la variante humana de este dominio (código PDB 1ELR) [132]. Con éstos modelos y el uso de “SwissModel First Approach” se pudo construir la estructura 3^{ra} predicha de los dominios TPR1 y TPR2A de TgHop, mediante el uso del programa DeepView/Swiss-PDB viewer. En las figuras 3.27 y 3.28 se puede observar alto nivel de homología estructural obtenido en el modelado de los TPR de TgHop comparados con sus contrapartes de la proteína humana. Como ya fue mencionado en la introducción las hélices antiparalelas de cada dominio TPR conforman una superficie cóncava como parte del extremo N-terminal de las hélices

de cada par (hélices 1, 3 y 5), este “surco” es el propuesto como sitio de unión del motivo EEVD de la Hsp70 en el TPR1, o del motivo MEVD de Hsp90 en el TPR2A [132]. En las figuras 3.27B y 3.28B se observa la vista superior de los TPR1 Y TPR2B, respectivamente, indicándose específicamente los residuos aminoacídicos involucrados en la unión con las proteínas Hsp90 y Hsp70 ubicados en las hélices 1, 3 y 5 mirando hacia la cavidad cóncava, casi la totalidad de estos residuos están conservados en TgHop y la predicción estructural también muestra una correcta ubicación espacial de los mismos.

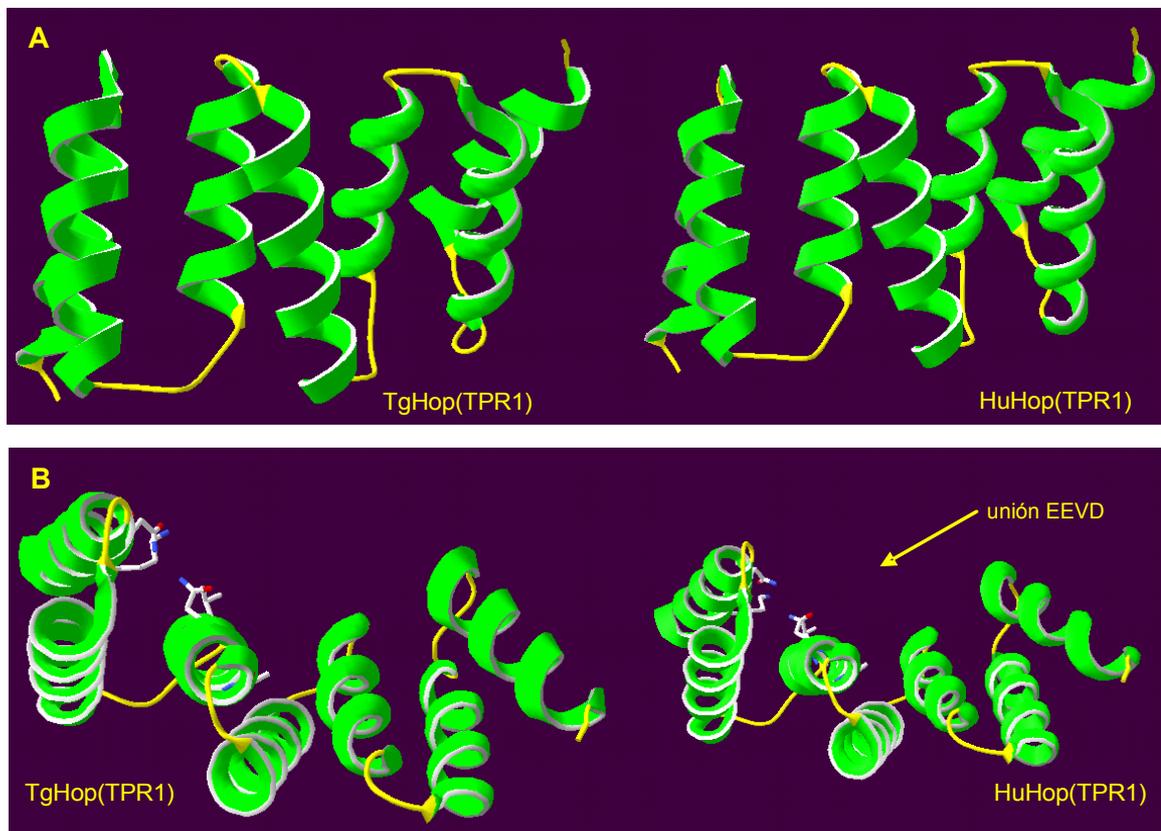


Figura 3.27: Modelado predictivo (Swiss-Model) de la estructura terciaria del dominio TPR1 de la proteína TgHop. Para el modelado se utilizó como modelo, el dominio TPR1 de la proteína humana Hop. **A.** Vista lateral de ambas proteínas. **B.** Vista superior de ambas proteínas, pudiéndose observar el surco donde se encuentra el sitio de unión al motivo EEVD de la proteína Hsp70 y los residuos conservados involucrados en la unión. Imágenes generadas usando el programa DeepView/Swiss PDB viewer.

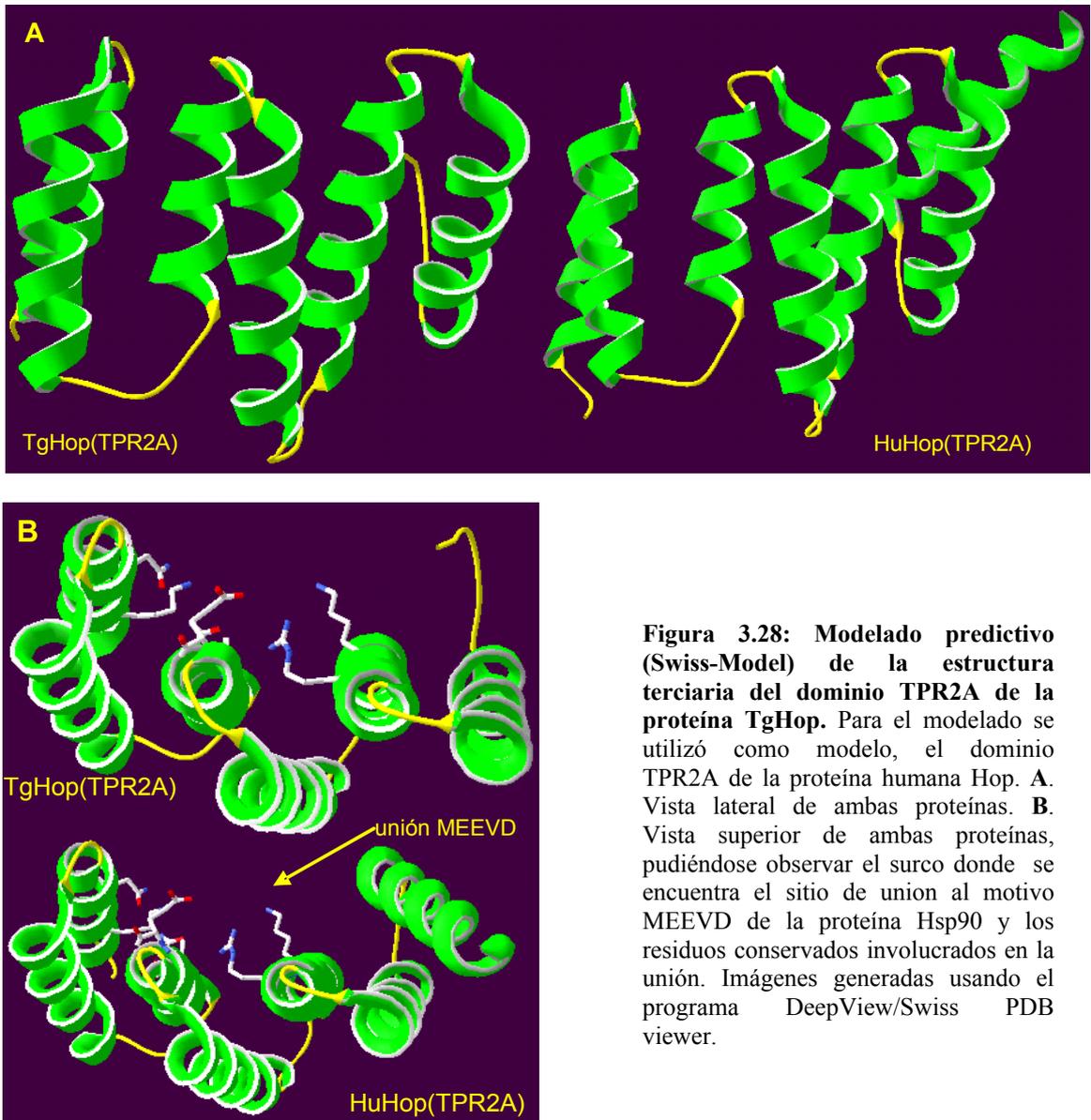


Figura 3.28: Modelado predictivo (Swiss-Model) de la estructura terciaria del dominio TPR2A de la proteína TgHop. Para el modelado se utilizó como modelo, el dominio TPR2A de la proteína humana Hop. **A.** Vista lateral de ambas proteínas. **B.** Vista superior de ambas proteínas, pudiéndose observar el surco donde se encuentra el sitio de unión al motivo MEEVD de la proteína Hsp90 y los residuos conservados involucrados en la unión. Imágenes generadas usando el programa DeepView/Swiss PDB viewer.

Identificación de la proteína Hsp40 de *T. gondii*

A partir de la secuencia aminoacídica de la proteína Hsp40 humana (nro. de acceso GenBank BAA12819.1), se pudo hallar, en el sitio www.ToxoDB.org, explorando la base de datos de proteínas predecidas de *T. gondii* TwinScan, la secuencia aminoacídica predicha (TgTwinScan_3127), la cual ya estaba asignada como una Hsp40 putativa. Se clonó la secuencia codificante, amplificando la secuencia por la técnica de PCR, usando como molde una biblioteca de ADNc de *T. gondii*. La secuencia nucleotídica de este clon incluye 987 bases, cuyo marco abierto de lectura codifica para una proteína deducida de 329 aminoácidos con una masa teórica de 36 kDa.

Estructura primaria de la proteína Hsp40 de *T. gondii*

Para identificar dominios putativos en la estructura primaria de la proteína Hsp40 de *T. gondii* (TgHsp40), se procedió al uso de las herramientas disponibles en el sitio “CD-search” [229] (www.ncbi.org). De esta manera se identificó la presencia de dominios J, denominados así por su homología con la proteína DnaJ (Hsp40 bacterial) [235], un dominio J N-terminal, reportado previamente como estimulador de la actividad ATPasa de la Hsp70 [236], y otro C-terminal de función desconocida, pero presente en todas las variantes conocidas de la Hsp40. El alineamiento de la TgHsp40 con distintos ortólogos, muestra un mayor nivel de homología en estas regiones DnaJ (Fig.3.29). Un dominio típico de las Hsp40 del tipo I (DnaJ bacterial, Ydj1 de levaduras y la variante humana Hdj2), es el péptido CXXCXGXG, el cual conforma estructuralmente un dominio dedos de zinc. Este se encuentra ausente en TgHsp40, por lo que a esta variante se la podría encuadrar dentro de las Hsp40 del tipo II como lo son la Hsp40 de *S. cerevisiae* Sis1 y la variante humana Hdj1.

Predicción de la estructura terciaria de TgHsp40

Como modelo para la realización del modelado predictivo, se pudo acceder únicamente a la versión de levaduras de la Hsp40 (Ydj1), cuya estructura ya fue determinada [237] (código PDB: 1NLT). Como fue mencionado, esta proteína de levaduras es una Hsp40 del tipo I, y la ausencia de dominios dedos de zinc en la estructura primaria de la proteína TgHsp40 indica que esta proteína sería una Hsp40 de tipo II. Si bien el modelado de TgHsp40 fue realizado, la estructura mostró tener muy baja homología con Ydj1.

De esta manera pudimos detectar en *T. gondii*, el sistema mínimo de 5 proteínas: Hsp90, Hsp70 (previamente reportada [90]), Hop, P23 y Hsp40, caracterizadas previamente como intervinientes en numerosas funciones homeostasis celular, y principalmente estudiadas en el ensamblado de receptores de esteroides [72]. Trabajos futuros detallarán en mayor profundidad la relevancia de este grupo de proteínas en el parásito.

4. Discusión

La interconversión entre taquizoitos y bradizoitos es el paso clave que puede determinar la patogenicidad sobre un organismo infectado con *T. gondii*, al mismo tiempo los mecanismos moleculares que conllevan a esta interconversión son casi desconocidos, por lo tanto se hace evidente la importancia del conocimiento de este tipo de eventos.

En este trabajo se clonó, secuenció y caracterizó la estructura primaria de la proteína Hsp90 de *T. gondii*. Asimismo se pudo comprobar que la expresión de la proteína Hsp90 se incrementaba en bradizoitos y ante condiciones de estrés (calor). En base a nuestros resultados y a lo observado con las proteínas Hsp60 [35] y Hsp70 [90] de *T. gondii*, se confirma un nexo entre las HSPs estrés y diferenciación a bradizoito. Un hallazgo novedoso es el hecho de que la localización intracelular de TgHsp90 esta regulada durante el desarrollo del parásito *T. gondii*. También que esta funcionalidad podría ser esencial para el cambio de estadio, al menos para el pasaje de bradizoito a taquizoito el único caso donde fue posible usar GA sin afectar la funcionalidad de Hsp90 de las células huésped. Si bien la delección del gen *hsp90*, podría ser letal para el parásito, sería importante poder arribar a la anulación total de su función para confirmar el papel esencial de esta proteína en el desarrollo.

Como complemento de este estudio se identificaron en el genoma del parásito las co-chaperonas claves en la acción de la ampliamente estudiada maquinaria chaperona de las proteínas Hsp90/70 [72]. Se clonaron, secuenciaron y caracterizaron preliminarmente las proteínas TgHip, TgP23, TgHop y TgHsp40. Por co-Inmunoprecipitaciones se pudo establecer la posibilidad, que la proteína TgHsp90 forme heterocomplejos con TgHsp70, TgHip y TgP23, y que a su vez en estos complejos no co-existan las proteínas TgHip con TgP23. También se observó que la localización intracelular de TgP23 como TgHsp90 está regulada en el cambio de estadio de taquizoito a bradizoito, marcándose una relación entre estas proteínas y el desarrollo.

Estructura de la proteína TgHsp90

El análisis de la estructura primaria de la versión de la proteína Hsp90 de *T. gondii*, reveló, por el altísimo grado de similitud de secuencia observado, que esta proteína posee los dominios y motivos principales que caracterizan a las proteínas pertenecientes a la familia de Hsp90. Así se puede observar la presencia del decapeptido YSNKEIFLRE,

considerado como una “firma” para esta familia. La secuencia aminoacídica del dominio N-terminal de Hsp90, expone la región de unión a ATP con el dominio ATPasa el cual aloja también el sitio de unión de GA. Sugestivamente la predicción de la estructura terciaria de este dominio, basándose en el homólogo de levaduras, con la cual la proteína Hsp90 de *T. gondii* comparte un 68% de identidad, señaló la posibilidad de la existencia de un bolsillo molecular, al igual que fue caracterizado para Hsp90 de levaduras [109], en donde se asienta la GA.

Nuestro análisis advirtió en la secuencia de Hsp90 de *T. gondii*, la existencia de varias señales de localización nuclear, una clásica y otra bipartita. Aún no es conocido si son funcionales. En otros casos reportados, se observó que en condiciones normales de crecimiento se puede lograr una importación efectiva de Hsp90 al núcleo con el agregado de una señal NLS extra [238]. Teniendo en cuenta que no se encontraron NLSs en las secuencias de Hsp90s de otras especies, se sugirió que ésta proteína podría translocar al núcleo mediante la asociación con múltiples proteínas poseedoras de NLSs [157]. En el caso particular de *Toxoplasma* la transferencia de Hsp90 al núcleo solamente en el desarrollo a bradizoito puede ser causado por la exposición de alguna de las señales NLS que estando enmascarada bajo condiciones normales de crecimiento, las cuáles pueden ser expuestas dependiendo de la interacción con otras co-chaperonas o algún tipo de proteína regulatoria.

Regulación de la proteína Hsp90 en el desarrollo de *T. gondii*

En estudios previos se había sugerido un papel crucial para las HSPs en el desarrollo a bradizoito, demostrándose que la inhibición simultánea de las proteínas Hsp90, Hsp70 y Hsp27 mediante el uso de quercetina coincidía con la reducción en el número de bradizoitos inducidos por pH alcalino [90]. En este estudio pudimos dilucidar específicamente la importancia de la proteína Hsp90 en desarrollo asexual del parásito. La sobreexpresión de Hsp90 fue observada en dos modelos de inducción a bradizoito, el basado en el estrés alcalino y el basado en el hambreado de CO₂. En el caso de la cepa RH Δ UPRT de *T. gondii* inducidos por hambreado de CO₂, se observó un incremento en la expresión bajo ambas condiciones, estrés por calor e inducción a bradizoito. Este

incremento en la expresión de la proteína Hsp90 durante el pasaje a bradizoito se observó tanto a nivel de ARNm como de proteína, aunque con claras diferencias en los niveles de inducción. Estas diferencias pueden deberse al uso de técnicas semicuantitativas o a una estabilidad diferencial de los ARN mensajeros durante el desarrollo. En otros organismos también la proteína Hsp90 demostró tener expresión diferencial durante el desarrollo, desde plantas como *B. napus* [91], apicomplexas como *P. yoeli* y *P. falciparum* [89, 93], insectos como *Lucilia sericata* [239], y tripanosomatídeos como *Leishmania donovani* [240]. Todo esto indica una relación ubicua entre Hsp90 y desarrollo. En muchos de estos casos mencionados, no sólo esta regulada la expresión de Hsp90, sino también, su localización subcelular dependiente del desarrollo [91, 93].

En el caso de *T. gondii* también se observó una localización diferencial regulada por el desarrollo. La localización intracelular de la proteína Hsp90 fue claramente determinada en el citoplasma de taquizoitos y, en ambos, citoplasma y núcleo de bradizoitos. Éste fenómeno fue observado para ambas cepas ensayadas. A su vez la cepa mutante B7 de *T. gondii* [228], la cuál está imposibilitada de desarrollarse a bradizoito, interesantemente demostró que el impedimento en el cambio de estadio estaba acompañado, también por una incapacidad por parte de la proteína Hsp90 de translocar al núcleo, luego de someter a estos parásitos a estímulos que normalmente inducen el desarrollo al estadio bradizoito. Éste hallazgo implica una confirmación adicional, que la presencia de la proteína Hsp90 en el núcleo esta relacionada a una serie de eventos y señales que desembocan en la conversión a bradizoito, y no es simplemente una consecuencia de las condiciones de estrés inducidas.

Si bien, se conoce que la mayoría de las proteínas que interactúan con la proteína Hsp90 lo hacen en el citoplasma, se han encontrado ejemplos en los cuales Hsp90 se encuentra en el núcleo, interaccionando con otras proteínas entre las que se puede nombrar a las histonas y proteínas ribosomales [238, 241-245].

Es interesante notar que en algunos parásitos de la cepa PK expresando marcadores de bradizoito, la proteína Hsp90 estaba presente solo en el citoplasma durante el cambio de estadio *in vitro*, lo cual podría ser explicado por la heterogeneidad que tiene la población de la cepa PK durante el cambio de estadio [24]. También podría estar mostrando que la localización nuclear de Hsp90 es un evento que estaría más asociado con el estadio bradizoito maduro, aseveración basada en el hecho que existe una muy alta correlación

entre la localización nuclear de Hsp90 y la presencia del marcador de bradizoito maduro P21 (Fig. 3.14). Más aún, todos los bradizoitos liberados de quistes de cerebros (bradizoitos maduros) muestran una localización nuclear de Hsp90. Curiosamente, los bradizoitos obtenidos de quistes cerebrales y tratados con GA, aún cuando seguían siendo bradizoitos, mostraron una localización extranuclear de la proteína. Esto podría estar indicando que una señal de pasaje a taquizoito, recibida por el parásito, podría ser la responsable de limitar la presencia de Hsp90 en el núcleo, pero que también podría ser necesaria una forma funcional de Hsp90 en el citoplasma para completar el pasaje a taquizoito. Del análisis de la localización subcelular de la proteína Hsp90 se desprende, que hay una relación entre la ausencia de la proteína del núcleo y la imposibilidad de desarrollarse a taquizoitos, y entre la translocación de la proteína al núcleo y el desarrollo a bradizoito. Es decir, la importancia de la localización intracelular de Hsp90, sería más crucial en determinadas etapas del desarrollo.

Inhibición de Hsp90 y desarrollo

Las drogas más utilizadas contra *T. gondii* son la pirimetamina y las sulfamidas, las cuales, administradas de manera combinada, resultan efectivas para la eliminación de los taquizoitos. Sin embargo, estas drogas no son capaces de actuar sobre los bradizoitos presentes en los quistes. Por otra parte, la combinación de estas drogas es mal tolerada tanto en embarazadas como en individuos inmunocomprometidos con toxoplasmosis cerebral, por lo cual en ocasiones se deben utilizar otras drogas de menor eficacia. Más aún, en algunos pacientes portadores del HIV, estos tratamientos pueden acelerar la pérdida de linfocitos [246]. Por lo tanto, es necesario contar con nuevas drogas tanto contra el taquizoito como contra el bradizoito.

Recientemente se despertó un gran interés en la proteína Hsp90 como blanco de terapias, debido su capacidad de unir específicamente agentes antineoplásicos de la clase de benzoquinonas ansamicinas, como por ejemplo la geldanamicina [109, 202]. La interacción de estas drogas con la proteína Hsp90 tiene efectos negativos sobre numerosas proteínas “clientes” que requieren una unión a Hsp90 para su adecuada función, como ser v-src, c-Raf-1, c-erbB2, met, CDK4, p53, Bcr-Abl, y los receptores de esteroides [110, 203-205]. Una observación sumamente interesante, surgida de la comparación del análisis

de heterocomplejos·Hsp90 de células normales versus células tumorales es que en éstas últimas los heterocomplejos están cargados de oncoproteínas y proteínas mutadas que otorgarían a la proteína Hsp90 de éstas células una mayor afinidad por GA que la observada en proteínas Hsp90 derivadas de células y tejidos normales, donde normalmente esta desacomplejada [212, 213]. Sería interesante conocer si existe también esta diferencia de afinidad por GA entre una Hsp90 de células normales y una Hsp90 de parásitos en etapas de diferenciación. Son conocidos también los estudios realizados con drogas con afinidad a Hsp90, en la búsqueda del bloqueo de procesos infectivos de parásitos diversos como *P. falciparum* [89, 215], *Trypanosoma cruzi* [92] y el nematodo causante de filiarisis *Brugia phangi* [247], entre otros. También se estudiaron los efectos de la inhibición de Hsp90 en los procesos de invasión de *P. falciparum* y *T. gondii* [89, 215, 218].

En el presente estudio se observó que el uso de la GA tiene un efecto pleiotrópico contra el *T. gondii*. Fue determinado el efecto sobre la invasión de taquizoitos (Fig. 3.11) y bradizoitos (Fig. 3.13), probablemente afectando las Hsp90 extracelulares como sugirió Ahn y col. (2003) [218]; también afecta la replicación y el desarrollo. En el pasaje de taquizoito a bradizoito se produjeron varios e importantes cambios en comparación con los parásitos no tratados. La GA bloqueó el desarrollo a bradizoito y disminuyó la replicación celular. Fue sugerido que son los taquizoitos y no los bradizoitos los que se dividen o pueden dividirse a baja velocidad [248, 249], por lo tanto la inhibición puede estar produciéndose en la replicación de taquizoitos, como fue observado previamente [218]. Varios trabajos han demostrado que la inhibición del ciclo celular de taquizoitos promueve la diferenciación a bradizoito (comunicación personal Conde de Felipe, M) [248, 250]. Por lo tanto, si bien la proteína Hsp90 al ser inhibida podría estar afectando el ciclo celular del parásito, ya que es conocida su importancia en la regulación del mismo en mamíferos (revisado en [133]), o más aún, afectando múltiples procesos celulares, es claro que tiene un accionar directo sobre la localización intracelular de Hsp90 y por consiguiente en el desarrollo.

Para independizar los resultados obtenidos con GA en el caso de la interrupción del desarrollo de *T. gondii*, de posibles efectos deletéreos de la droga sobre el parásito o las células huésped, que en última instancia sean los responsables de éste arresto, se llevaron a cabo controles de reversibilidad de los efectos de la droga, y viabilidad de parásitos y

células huésped. Así se comprobó que la GA en las concentraciones utilizadas, actuaba en forma reversible. Pretratando a parásitos con la droga, y luego eliminándola del medio de cultivo, en experimentos de desarrollo a bradizoito, se obtuvo simplemente una disminución en la invasión (Fig. 3.11), pero un correcto cambio de estadio luego de 4 días de cultivo, al igual que los casos control y que el pretratamiento de células huéspedes con GA (Figura 3.12). Los experimentos de cambio de estadio de bradizoito a taquizoito, se realizaban pretratando a los bradizoitos con GA y luego eliminando la droga. En estos casos también se obtuvo una reducción en los niveles de invasión y en la carga parasitaria del cultivo luego de 24 hs (Fig. 3.13), pero si el experimento se continuaba durante 72 hs, al final del experimento todos los parásitos (pretratados con GA y control) habían comenzado la replicación y desarrollado a taquizoito, con la diferencia que los pretratados con GA mostraron un retraso en el desarrollo, el cuál, fue inducido por la droga (Fig. 3.15).

Teniendo en cuenta que en el experimento del efecto de GA sobre la conversión taquizoito a bradizoito se está afectando a la célula huésped, no se puede asegurar que Hsp90 tenga un papel esencial en la conversión a bradizoito. Es diferente el caso del análisis de la reconversión a taquizoito desde el estadio bradizoito. En este caso solamente los parásitos fueron afectados por la GA. Por lo tanto el hecho de que la droga GA haya afectado por completo el desarrollo desde taquizoito a bradizoito nos dice que la proteína es importante en este fenómeno. Teniendo en cuenta que la mayoría de las patologías peligrosas producidas por *T. gondii* en pacientes VIH positivos y en pacientes con infección congénita son debidas a la reactivación de la infección (pasaje de bradizoito a taquizoito) este hallazgo puede ser importante para el tratamiento de estas patologías.

Esta claro que en los casos de inhibición de la replicación y la diferenciación del parásito por la presencia de GA, se está afectando la función de la proteína Hsp90. Las funciones reportadas de Hsp90, muestran generalmente a esta proteína asociada a heterocomplejos [72]. Estos heterocomplejos-Hsp90 son los responsables de mantener en estado competente a factores de transcripción, proteínas quinasas, proteínas receptoras y proteínas de señalización.

Hsp90 y co-chaperonas

El análisis de las bases de datos del proyecto genoma de *Toxoplasma* permitió acceder a la secuencia nucleotídica y aminoacídica de varias co-chaperonas “putativas” del parásito. Así parte de este trabajo se centro en lograr el clonado y expresión de dos co-chaperonas marcadoras de dos tipos de heterocomplejos de la maquinaria Hsp90/Hsp70 (descrita por [72]), los complejos tempranos (protagonizados por la proteína Hip) y los complejos maduros (protagonizados por la proteína P23).

El análisis de la estructura 1^{ria} de TgHip, reveló un alto nivel de homología con varias proteínas Hip conocidas, poseyendo los dos dominios más característicos de estas proteínas el dominio TPR y el dominio Sti1 (Fig. 3.17). La proteína Hip de *T. gondii* contiene un bajo número de repeticiones del tetrapéptido GGMP, en su lugar contiene varias repeticiones imperfectas, todos rasgos que ocurren de manera equivalente en las versiones de rata y humana de Hip (Fig. 3.17A). Por el contrario las versiones de *Plasmodium spp.* analizadas muestran un alto número de repeticiones de éste motivo. Este motivo también se encuentra también en chaperonas como Hsp70 [230], y podría ser responsable de interacciones proteína-proteína. Fue sugerido que el alto número de repeticiones GGMP sería un rasgo de eucariotas inferiores [231], en este caso TgHip sería una excepción, significado que debería ser estudiado en trabajos futuros.

La proteína P23 de *T. gondii* expone una importante homología con el altamente conservado dominio P23 ubicado en la región N-terminal de todas las proteínas P23 caracterizadas [234] (Fig. 3.21). Este dominio posee una estructura secundaria característica determinada por 8 láminas- β . La predicción de la estructura 2^{ria} en la versión de *T. gondii* confirmó dicha estructura, la cual está perfectamente alineada con todas las versiones de P23 analizadas en la figura 3.22A. La predicción de la estructura terciaria también mostró la potencial conservación de la estructura de glóbulo compacto (sándwich β), en una organización comprimida de dos hojas opuestas (figura 3.22B).

Éste importante nivel de homología fue hallado también en las proteínas Hop y Hsp40 de *T. gondii*. Interesantemente la predicción de la estructura terciaria de los dominios TPR1 y TPR2A en la versión de toxoplasma de Hop permitió detectar la presencia de estructura y residuos aminoacídicos importantes para la función de Hop (Figuras 3.25, 3.27-28), la cuál es, coordinar la presencia de Hsp70 y Hsp90 en complejos,

al unirse a ellas [132]. Si se agrupan las primeras repeticiones TPR de cada dominio TPR, y luego las segundas y luego las terceras, y se las alinea (Fig. 3.26) se puede observar la exacta equivalente ubicación de estos residuos necesarios para la unión a Hsp70/90 dentro de la repetición, al igual que ocurre en el resto de los dominios TPR de Hop estudiados. Todos estos rasgos ubican a la proteína Hop de *T. gondii* como potencialmente funcional en el marco de heterocomplejos·Hsp90/70.

Interacciones entre las chaperonas Hsp90/70 y las co-chaperonas Hip y P23

Mediante ensayos de co-inmunoprecipitación, y con la posibilidad de usar el anticuerpo monoclonal anti Hsp70 humana (que revela una proteína de 72 kDa, la Hsp70 de *T. gondii* [90]) se pudo identificar una serie de interacciones *in vivo*, correspondientes a un potencial heterocomplejo en *T. gondii*. Se presume la presencia de TgHip en complejos tempranos, al determinar que esta proteína co-inmunoprecipitaba con TgHsp90, con TgHsp70, pero no con TgP23. Asimismo, TgP23 co-inmunoprecipitó solamente con TgHsp90, pero no con TgHip o TgHsp70, sugiriendo que forma parte de complejos maduros (Figura 3.23). Fue reportado que P23 no sólo interactúa con Hsp90 sino que también lo hace con la Hsp70 [80]. En *T. gondii* además de no detectarse interacción entre TgHip y TgP23, parece no existir interacción entre TgP23 y la TgHsp70. Tanto Hip como P23 no son proteínas tan abundantes como lo es Hsp90. Si en la inmunoprecipitación de cualquiera de estas dos proteínas, no se detecta una proteína ensayada, esto no significa necesariamente ausencia de interacción.

Las proteínas Hip y P23 muestran diferencias en su localización subcelular relacionada al desarrollo

Los ensayos de inmunofluorescencia, mostraron que P23 colocaliza intracelularmente con Hsp90 en ambos estadios, esto quiere decir que es citoplasmática en el estadio taquizoito y citoplasmática-nuclear en el estadio bradizoito (Figura 3.24A).

Hip acompaña en su localización intracelular a la proteína TgHsp90 en el estadio taquizoito ubicándose en el citoplasma. Por el contrario, en el cambio de estadio a bradizoito, Hip parece no translocar al núcleo. De los ensayos de co-inmunoprecipitación

se desprendía la presunción, de que la proteína TgHip era miembro de complejos con TgHsp90 y con TgHsp70, pero no con TgP23 indicando que formaba parte de complejos tempranos. Del análisis de las IFIs se puede concluir que TgHip no comparte, al menos, una relación espacial en el núcleo de bradizoitos con TgHsp90 ni tampoco con TgP23, o sea, no acompaña los complejos que puedan estar translocando o formándose en el núcleo.

Modelo

Los últimos resultados analizados permitieron construir un modelo, basado en la maquinaria chaperona Hsp90/Hsp70 ampliamente descrita [72] (Figura 4.1). En este modelo se hipotetiza la presencia de posibles heterocomplejos Hsp90-proteína cliente en *T. gondii*. Se ubican en el esquema las proteínas Hsp90, Hip, Hsp70 y P23, así como otras cuya presencia en el parásito resta confirmar pero de las que al menos se conoce su secuencia, dominios putativos, y se tiene información que las convierte en putativas co-chaperonas de *T. gondii*. En este esquema se intenta hipotetizar, la ubicación espacio temporal de estas proteínas. Así, podemos observar que TgHip formaría parte de heterocomplejos tempranos estableciéndose una explicación de porque esta co-chaperona no acompañaría a TgHsp90 en su translocación al núcleo de bradizoitos. En el caso de TgP23 que perteneciendo a heterocomplejos donde ni TgHip ni TgHsp70 forman parte (complejos maduros), transloca al núcleo de bradizoitos, donde junto a Hsp90 también podría estar cumpliendo alguna función durante el cambio de estadio. La proteína Hsp70 de *T. gondii* formaría parte de complejos tempranos, interactuando con TgHip y TgHsp90, pero no con TgP23. Sería interesante analizar si proteínas del parásito como TgHop y TgHsp70 presentan cambios en su localización subcelular durante el pasaje a bradizoito, como fue observado para TgHsp90 y TgP23. Fue reportado que Hop es importada y exportada del núcleo dinámicamente dependiendo del status del ciclo celular y de las quinasa intervinientes en este ciclo [181].

El nexo necesario, según lo descrito para otros sistemas, para que este complejo pueda transportar señales al núcleo es que las inmunofilinas puedan interactuar con la dineína y esta mediante su unión a microtúbulos, permitir el movimiento desde el citoplasma al núcleo [72, 157, 251]. Se encontró en *Toxoplasma* una inmunofilina putativa

(Tabla 2.1) que posee un dominio TPR y un dominio PPIasa que le permitiría esta interacción con el motor de dineína [157].

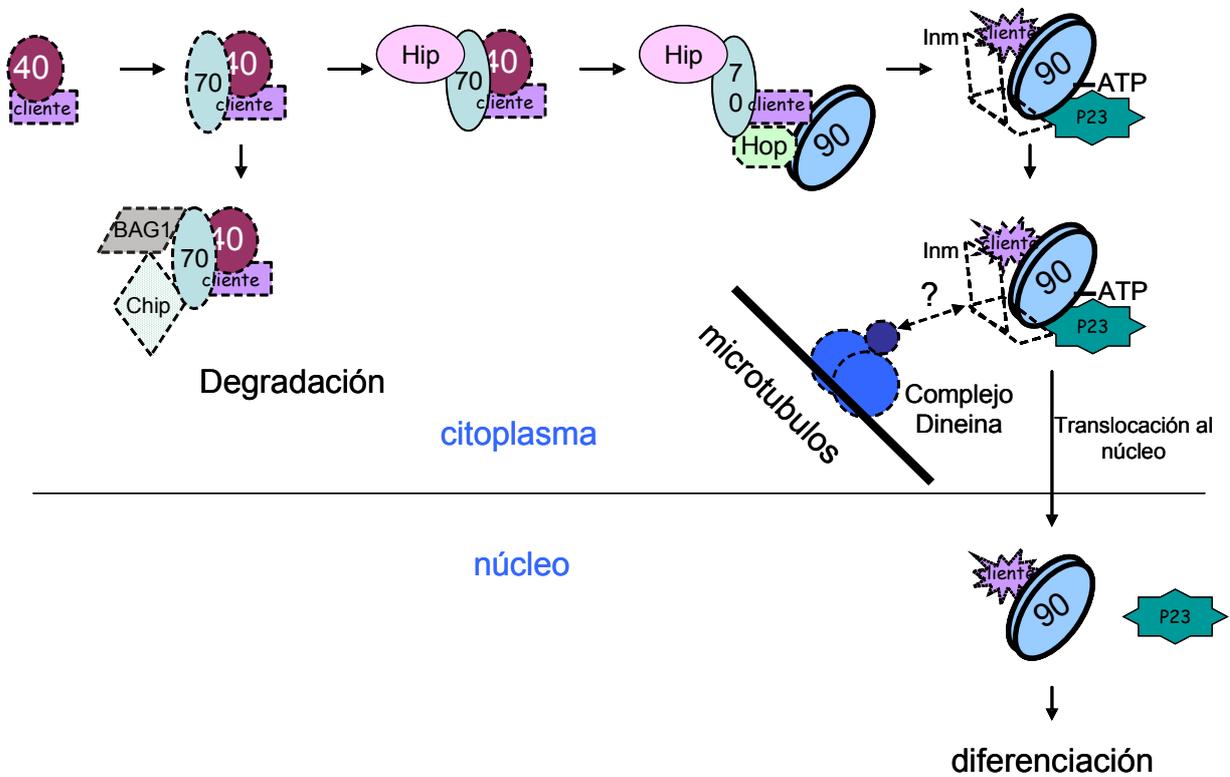


Figura 4.1. Modelo de acción de Hsp90 y co-chaperonas en *T.gondii*. Esquema hipotético del ciclo chaperona de la maquinaria Hsp90/Hsp70 de *T.gondii*, co-chaperonas, proteínas cliente y su acoplamiento con la degradación proteasomal. Las proteínas esquematizada con contornos punteados, son las proteínas putativas cuyas secuencia fue hallada y dominios característicos analizados, a modo de poder asignarles su función. Las proteínas con contorno continuo representan las proteínas caracterizadas en este estudio.

Direcciones futuras

Los blancos especializados de acción “chaperona” de Hsp90 eucariótica (proteínas clientes) parecen compartir ciertas características: son frecuentemente lábiles, tienen complejos procesos de plegamiento, o necesitan estar mantenidas en un estado conformacional “competente” que permita la inserción de algún cofactor, la unión de algún ligando o su propia modificación covalente. Por tanto, el tener altos niveles de Hsp90 citoplasmática y su presencia o no en el núcleo de bradizoitos de *T. gondii* puede estar

implicado en la transducción de señales, activación y o la inactivación de factores de transcripción, que de alguna manera permita el establecimiento del estadio bradizoito en respuesta al estrés al que el parásito está siendo sometido. Por lo tanto, es claro que por las funciones conocidas de Hsp90, junto con Hip y P23 (y otras proteínas aún desconocidas), estén permitiendo arribar en un estado competente a alguna/alguna proteína señal al núcleo, durante el desarrollo de *T. gondii*. Futuros trabajos deben contestar esta pregunta, observar si esta señal existe, y la naturaleza de su regulación en respuesta a la sobreexpresión o localización o no nuclear de Hsp90.

En éste sentido, es esperable entonces que con la identificación de proteínas clientes de Hsp90 del parásito se pueda empezar a dilucidar las vías de señalización y/o proteínas esenciales para los procesos de diferenciación del *T. gondii*, al menos en sus estadios asexuales. Los experimentos de co-Inmunoprecipitación con anti-TgHsp90 y anti-TgP23 mostraron un patrón de bandas coincidentes y diferenciales las cuales actualmente están siendo sometidas a estudios de identificación por espectrometría de masa (datos no mostrados). La supresión de la interacción entre Hsp90 y proteínas clientes se está convirtiendo en un enfoque atractivo en terapias antitumorales [252]. El conocimiento global de los procesos regulados por Hsp90, permitirá plantear desafíos a largo plazo, que tengan por objeto el desarrollo de drogas que puedan, por ejemplo, suprimir selectivamente determinadas interacciones con Hsp90 en determinados nodos de vías de transducción de señales, y así controlar diversos procesos tumorales e infecciosos.

5. APÉNDICE

APÉNDICE

HSPs Y SISTEMA INMUNE

En el marco del trabajo realizado para esta tesis doctoral, también se estudiaron las propiedades inmunoestimuladoras de la proteína de *Leishmania Infantum*, perteneciente a la familia de la Hsp90, LiHsp83.

HSPs en la regulación de la respuesta inmune

En los últimos años se ha comenzado a reconocer la importancia y el rol central de las HSPs en la modulación del sistema inmune como respuesta a infecciones y procesos tumorales [94]. Matzinger y Fuchs [253] han postulado una interesante Teoría basada en la “inmunidad por peligro” que involucra a las HSPs. La muerte de una célula por apoptosis no produce señales de estrés. Si en cambio una célula es destruida por algún agente infeccioso o muere por causa de necrosis o isquemia, sobrelleva en estos casos un proceso de respuesta al estrés, en el cuál se liberan complejos péptidos-HSPs o HSPs no acoplejadas, entre otras proteínas, luego de la lisis celular. Estas HSPs serían las responsables de comunicarle al sistema inmune que la célula murió debido a estas condiciones de “estrés”, ya sea por señales a través de receptores como también en su rol de acarreadoras de péptidos. Esto último permite a las células efectoras del sistema inmune reconocer a los péptidos liberados por la célula estresada, y activarse contra estos péptidos nuevos o extraños acarreados por las HSP. El modelo está basado en que los linfocitos T inactivos requieren para activarse el reconocimiento del antígeno y señales coestimuladoras (ej. presentación del ligando B7) por parte de las células presentadoras de antígenos (APCs), debido a que las células T que sólo reciban la estimulación antigénica sin las señales coestimuladoras se ven sujetas a apoptosis. En experimentos *in vitro* el agregado de un lisado de tumor conteniendo HSP70 incrementaba la estimulación de la fagocitosis por parte de células dendríticas inmaduras y además la expresión de HSP70 en tumores del tipo B16 resulta en la acumulación de linfocitos T, macrófagos y células dendríticas en el microambiente del tumor [254]. Continuando con esta línea se determinó que ante la exposición de HSP70 a monocitos humanos se estimula la producción de citoquinas proinflamatorias [255]. Tomando todos estos últimos datos se postuló que las HSP encontradas en el ambiente extracelular actúan no solo como

chaperonas si no también como citoquinas, definiéndolas entonces como chaperoquinas [256], con la habilidad de activar los mecanismos productores de citoquinas proinflamatorias de las APCs. Se ha mostrado también que la HSP70 de tumor altamente purificadas (sin péptidos) se adhiere con alta afinidad a la membrana plasmática de monocitos humanos así como también HSP70 con péptidos con igual fuerza [255]. Es más se demostró que no es necesaria la presencia de péptidos, para producir la activación espontánea en células del sistema inmune innato de la producción de citoquinas proinflamatorias dependientes de NFκB [255]. De esta manera se teorizó [256] que durante las primeras horas de la respuesta inmune, las células de la respuesta inmune innata reconocen tanto a las HSP70 sin péptidos como a las que sí los acarrean como una “señal de peligro”. Así este efecto inespecífico ayuda a reducir la carga tumoral hasta que la respuesta inmune adaptativa este preparada para hacerse cargo de la situación, donde la presencia de los péptidos puede resultar en un aumento de la respuesta inmune y activación del accionar de Cts. y LT helpers [255].

Mecanismo de inmunoestimulación

Se observó que las HSPs gp96, Hsp90, Hsp70 y calreticulina interactúan con los macrófagos y las células dendríticas a través de un receptor común, el CD91 [257] (Figura 5.1). La interacción de los péptidos acomplejados con HSP con CD91 conlleva a la internalización de los complejos en compartimentos endosomales no-acídicos, que luego continúa con la transferencia del péptido o del complejo entero al citosol [258-260]. Así los péptidos son dirigidos a la vía de degradación proteasomal y transportados al retículo endoplásmico (RE) por medio de transportadores asociados a la proteína procesadora de antígenos (TAP) [260]. A continuación los péptidos son cargados en el complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I) y presentados por las APCs a células T CD8⁺. Alternativamente el péptido puede ser cargado en el MHC-I directamente desde el endosoma [261]. Una pequeña proporción de los péptidos son cargados mediante endosomas ácidos en la vía de presentación MHC-II, llevando también a la activación de células T CD4⁺.

La interacción HSP-APC como se indicó produce otros efectos péptido-independientes como la secreción de citoquinas inflamatorias: factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleuquina-1 β (IL-1 β), interleuquina-12 (IL-12) y el factor estimulador colonizante de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), por macrófagos [262] y la producción de óxido nítrico a partir de la inducción de la óxido nítrico sintetasa (iNOS) por parte de macrófagos y células dendríticas [263]. Esta interacción HSP-APC además de estimular la expresión de moléculas presentadoras de antígenos y co-estimuladoras (B7), produce la translocación del factor nuclear- κ B (NF- κ B) dentro del núcleo de macrófagos y células dendríticas lo cual se cree es la causa principal por la cual se estimula la secreción de las citoquinas nombradas [264] (Figura 5.1).

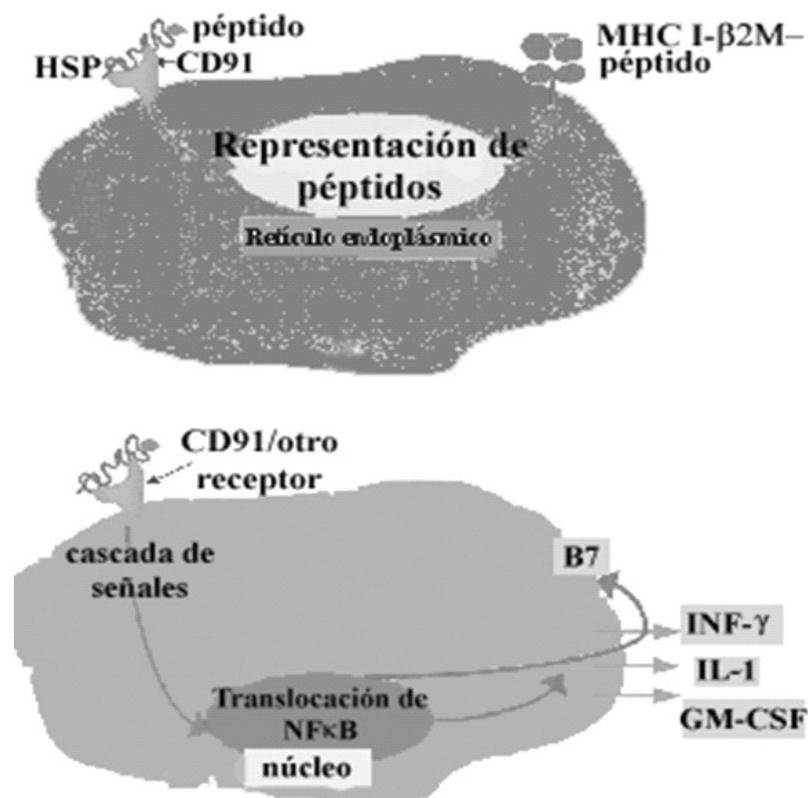


Figura 5.1. Mecanismo estimulador del sistema inmune por parte de la HSPs. Las HSPs (complejos o no, con péptidos, estimulan el sistema inmune como consecuencia de la interacción HSP-APC (célula presentadora de antígeno).

La inducción de altas cantidades de HSPs de los organismos patógenos es vital para la supervivencia de éstos. Paradójicamente, las células huésped acceden a altas

cantidades de las HSPs de los patógenos, que son procesadas y presentadas en el contexto de los complejos de histocompatibilidad MHC I y II.

Existen numerosas evidencias de HSPs de patógenos que han demostrado ser potentes inmunógenos, conteniendo varios epítomos de células B y T en una sola molécula, capaces de desencadenar en humanos y roedores una fuerte y específica respuesta inmune. La Hsp83 de *L. braziliensis* demostró contener potentes epítomos de células T, los cuales estimulan la proliferación y producción de IL-12, INF- γ , y TNF- α y en forma diferencial IL-10 o IL-4, según la región de la proteína utilizada, por parte de células periféricas mononucleares (PBMC) en individuos infectados con *L. braziliensis* [265]. La alta frecuencia con la cual se han encontrado linfocitos T CD4⁺ de humanos dirigidos contra la HSP70 y 60 de *M. tuberculosis* sugieren que estas HSPs son el objetivo más jerárquico de la respuesta celular en humanos que presentan infecciones micobacterianas [266].

Tal como se observó para las HSPs propias, como consecuencia del alto grado de conservación, las HSPs de los patógenos podrían ser responsables de la activación de células del sistema inmune a través de sistemas de señales de receptores. Las proteínas HSP60 y HSP65 de clamidias parecen activar a los fagocitos mononucleares a través del receptor CD14 [267]. La HSP65 de *Mycobacterium bovis* también es capaz de activar directamente la adhesividad de las células endoteliales a los monocitos y granulocitos, lo que constituye un paso previo para el reclutado de células inflamatorias al sitio de infección [268]. Sorprendentemente formas recombinantes de las HSP70 y 83 de *L. infantum* mostraron estimular *in vitro* la proliferación de células del tipo T y B aisladas del bazo de ratones naive [269]. En otros estudios se observó que la fusión de Hsp70 micobacteriana con un antígeno reportero podía estimular una respuesta CTL específica contra ese antígeno [270]. Mas aún, se observó que esta estimulación de CTLs por parte de las HSPs se podía realizar en ausencia de linfocitos T CD4⁺ [270, 271] sugiriéndose que esta estrategia puede ser utilizada en enfermedades en donde los LT CD4⁺ son deficientes (enfermedades relacionadas con HIV).

HSPs como adyuvantes.

Los adyuvantes son una parte crucial en la construcción de una vacuna, particularmente en aquellas diseñadas para producir una respuesta celular T [272]. Hasta ahora no han sido aprobadas para uso en humanos ningún adyuvante potente con dichas características. Así entonces se impusieron a las HSPs como candidatos de adyuvantes inductores de respuesta celular T. Sin embargo hay limitaciones, por ejemplo algunos péptidos que son potencialmente inmunogénicos no se acomplejan eficientemente a las HSPs. Esto se solucionó con la siguiente estrategia: un sistema libre de adyuvante con Hsp70 de *M.tuberculosis* usándola como proteína de fusión con la proteína HIV-p24 (antígeno reportero o informador) para inmunizar ratones, obteniéndose un estímulo incrementado de la respuesta inmune humoral y celular contra la p24 [273]. En la misma línea se estudio si la LiHsp70 fusionada a una proteína reportera (MBP), se comportaba de la misma manera. Se observó entonces que ratones inmunizados con la proteína recombinante LiHsp70 fusionada con este antígeno producía una respuesta inmune humoral y celular contra la MBP un orden mas alto de magnitud que cuando lo hacían con el antígeno solo [274]. En esta caso la inmunización con LiHsp70-MBP indujo preferencialmente una respuesta inmune celular del tipo Th1 en vista del patrón de citoquinas e IgG observadas. Los resultados de Rico et al. [269] y de nuestro laboratorio [275] demostraron que también se estimuló una fuerte respuesta inmune humoral y celular, principalmente Th1, contra MBP (antígeno reportero) en el sistema MBP-LiHsp83, proteína de *L. Infantum* perteneciente a la familia de las Hsp90. Nuestros resultados demostraron además que esa respuesta inmune generada es de larga duración e incluye la producción de IFN- γ [275].

En caso de infección con *T. gondii* una respuesta inmune efectiva es mediada por células T CD4+ y CD8+, y esta asociada con la producción de IFN- γ [276-279]. Por este motivo *T. gondii* se posicionó como un interesante modelo en el que pudiéramos analizar, en nuestro laboratorio, el valor inmunoprotectivo y adyuvante de la proteína LiHsp83. Así ,con el objetivo de determinar la utilidad de la proteína LiHsp83 como “carrier” de antígenos de *T. gondii*, construimos una proteína de fusión conteniendo al antígeno rRop2 y a la proteína LiHsp83 (Rop2~83) (Figura 5.2). En el estudio se utilizaron diferentes cepas de ratón las cuales fueron inmunizadas con la proteína de

fusión, Rop2 sola y una mezcla de la proteínas Rop2 con la LiHsp83 (Figura 5.2), procediéndose luego al análisis de la respuesta inmune producida.

En este trabajo pudimos observar que los esplenocitos de ratones inmunizados con la construcción de fusión y estimulados específicamente con la proteína Rop2, mostraban una producción de IFN- γ significativamente mas alta que el resto de los grupos (Figura 5.3), mientras que solo los esplenocitos provenientes de ratones inmunizados con Rop2 o la mezcla de la Hsp y Rop2 producían niveles detectables de IL-4 (Figura 5.3). Es decir,

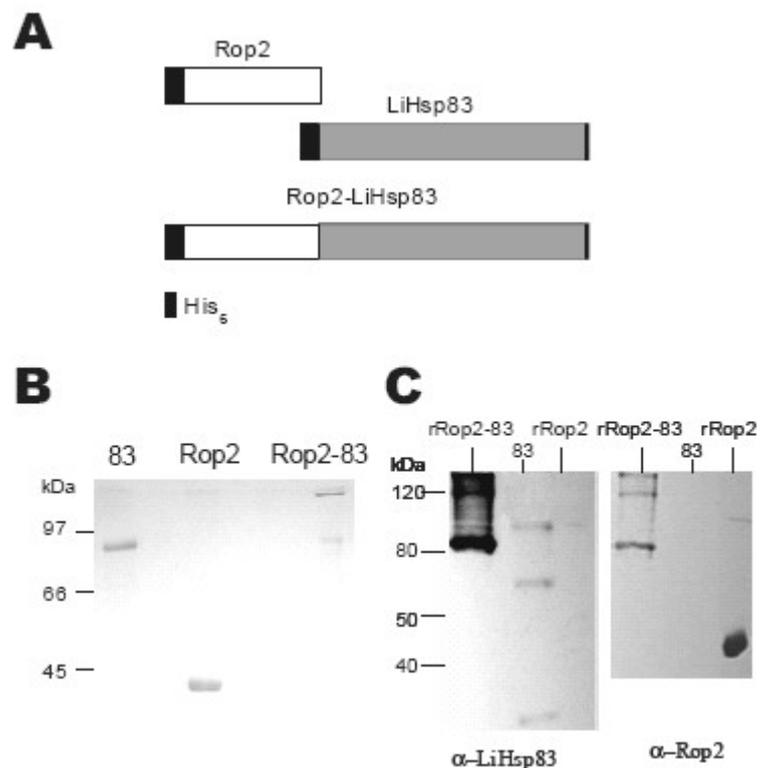


Figura 5.2. Proteínas utilizadas en el análisis de la propiedades inmestimulatorias de LiHsp83. A. Esquema de las proteínas utilizadas. B. Proteínas utilizadas resueltas por gel de acrilamida SDS-PAGE 10% y teñido con Coomassie Blue. C. Proteínas utilizadas visualizadas por Western blot, revelando con anticuerpo anti-LiHsp83 y con anticuerpo anti-Rop2.

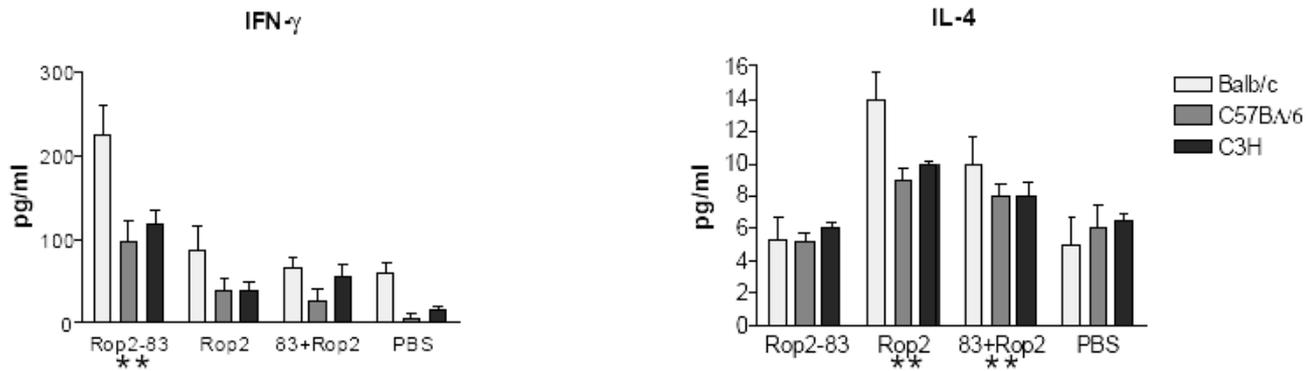


Figure 5.3: Análisis respuesta celular. Análisis de la producción *in vitro* de IFN- γ y de IL4 por parte de esplenocitos de ratones de las cepas indicadas inmunizados con las proteínas recombinantes y PBS (control), estimulados con con 10 μ g de Rop2.

La inmunización con la proteína de fusión produjo una respuesta preponderantemente Th1 con una alta producción de IFN- γ , y baja de IL4 en comparación con las demás inmunizaciones.

También se analizó el nivel de protección contra la infección oral de quistes de cerebro de *T. gondii*, procediendo al desafío de ratones de las cepas C57BL/6 y C3H inmunizados con las proteínas recombinantes o con PBS (Figura 5.4). Estos ratones infectados oralmente con 20 quistes de la cepa de *T. gondii* Me49 dos semanas después del último refuerzo de inmunización (ensayo no letal), teniendo a todos los ratones del experimento vivos al final del experimento. Se evaluó la carga de quistes en cerebro un mes después de la infección, midiendo el número medio de quistes por cerebro (contando 4 muestras de 25- μ l por cada cerebro). En todos los casos se observó que los ratones inmunizados obtuvieron un significativo nivel de protección ($P < 0,01$) siempre comparados con el grupo PBS. En el grupo de ratones inmunizados con la proteína fusión 83~Rop2 se observó un nivel significativo de protección incluso comparando con los grupos Rop2 y 83+Rop2.

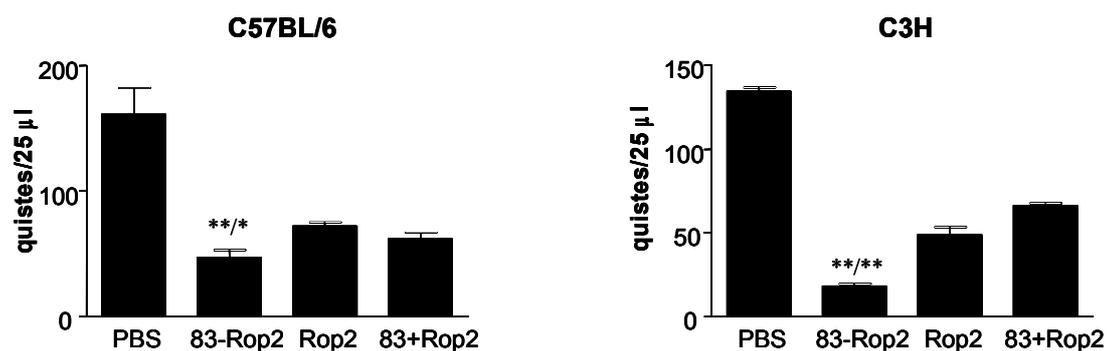


Figura 5.4: Desafío con parásitos. Ensayo de protección del desafío oral de los ratones de las cepas C57BL/6 y C3H. Los ratones fueron inmunizados con PBS (control) o con la proteínas recombinantes indicadas.

Por lo tanto en este sistema estudiado se pudo concluir que la proteína LiHsp83 perteneciente a la familia de la proteína Hsp90, es un buen candidato para actuar como “carrier” de antígenos de interés con el fin de desarrollar una vacuna en un sistema libre de adyuvante.

6. Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

1. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA: **Structures of Toxoplasma gondii tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts.** *Clin Microbiol Rev* 1998, **11**(2):267-299.
2. Wong SY, Remington JS: **Biology of Toxoplasma gondii.** *Aids* 1993, **7**(3):299-316.
3. Dubey JP, Swan GV, Frenkel JK: **A simplified method for isolation of Toxoplasma gondii from the feces of cats.** *J Parasitol* 1972, **58**(5):1005-1006.
4. Ferguson DJ, Hutchison WM, Siim JC: **The ultrastructural development of the macrogamete and formation of the oocyst wall of Toxoplasma gondii.** *Acta Pathol Microbiol Scand [B]* 1975, **83**(5):491-505.
5. Radke JR, White MW: **A cell cycle model for the tachyzoite of Toxoplasma gondii using the Herpes simplex virus thymidine kinase.** *Mol Biochem Parasitol* 1998, **94**(2):237-247.
6. Hoff EF, Carruthers VB: **Is Toxoplasma egress the first step in invasion?** *Trends Parasitol* 2002, **18**(6):251-255.
7. Frenkel JK: **Adoptive immunity to intracellular infection.** *J Immunol* 1967, **98**(6):1309-1319.
8. Weiss LM, Kim K: **The development and biology of bradyzoites of Toxoplasma gondii.** *Front Biosci* 2000, **5**:D391-405.
9. Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP: **Biology and epidemiology of Toxoplasma gondii in man and animals.** *Anim Health Res Rev* 2005, **6**(1):41-61.
10. Lindsay DS, Dubey JP, Butler JM, Blagburn BL: **Mechanical transmission of Toxoplasma gondii oocysts by dogs.** *Vet Parasitol* 1997, **73**(1-2):27-33.
11. Frixione E, Mondragon R, Meza I: **Kinematic analysis of Toxoplasma gondii motility.** *Cell Motil Cytoskeleton* 1996, **34**(2):152-163.
12. Morrisette NS, Murray JM, Roos DS: **Subpellicular microtubules associate with an intramembranous particle lattice in the protozoan parasite Toxoplasma gondii.** *J Cell Sci* 1997, **110** (Pt 1):35-42.
13. Nichols BA, Chiappino ML: **Cytoskeleton of Toxoplasma gondii.** *J Protozool* 1987, **34**(2):217-226.
14. Smith JE: **A ubiquitous intracellular parasite: the cellular biology of Toxoplasma gondii.** *Int J Parasitol* 1995, **25**(11):1301-1309.
15. Sheffield HG, Melton ML: **The fine structure and reproduction of Toxoplasma gondii.** *J Parasitol* 1968, **54**(2):209-226.
16. Dubey JP, Hoover EA, Walls KW: **Effect of age and sex on the acquisition of immunity to toxoplasmosis in cats.** *J Protozool* 1977, **24**(1):184-186.
17. Dubey JP, Fenner WR: **Clinical segmental myelitis associated with an unidentified Toxoplasma-like parasite in a cat.** *J Vet Diagn Invest* 1993, **5**(3):472-480.
18. Dubey JP: **Long-term persistence of Toxoplasma gondii in tissues of pigs inoculated with T gondii oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork.** *Am J Vet Res* 1988, **49**(6):910-913.
19. Jacobs L, Remington JS, Melton ML: **A survey of meat samples from swine, cattle, and sheep for the presence of encysted Toxoplasma.** *J Parasitol* 1960, **46**:23-28.
20. Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK: **Toxoplasma gondii life cycle in cats.** *J Am Vet Med Assoc* 1970, **157**(11):1767-1770.
21. Soete M, Fortier B, Camus D, Dubremetz JF: **Toxoplasma gondii: kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion in vitro.** *Exp Parasitol* 1993, **76**(3):259-264.
22. Bohne W, Heesemann J, Gross U: **Induction of bradyzoite-specific Toxoplasma gondii antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages.** *Infect Immun* 1993, **61**(3):1141-1145.
23. Silva NM, Gazzinelli RT, Silva DA, Ferro EA, Kasper LH, Mineo JR: **Expression of Toxoplasma gondii-specific heat shock protein 70 during In vivo conversion of bradyzoites to tachyzoites.** *Infect Immun* 1998, **66**(8):3959-3963.

24. Soete M, Camus D, Dubremetz JF: **Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii* in vitro.** *Exp Parasitol* 1994, **78**(4):361-370.
25. Bohne W, Heesemann J, Gross U: **Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion.** *Infect Immun* 1994, **62**(5):1761-1767.
26. Weiss LM, Laplace D, Takvorian PM, Tanowitz HB, Cali A, Wittner M: **A cell culture system for study of the development of *Toxoplasma gondii* bradyzoites.** *J Eukaryot Microbiol* 1995, **42**(2):150-157.
27. Tomavo S, Boothroyd JC: **Interconnection between organellar functions, development and drug resistance in the protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*.** *Int J Parasitol* 1995, **25**(11):1293-1299.
28. Jones TC, Bienz KA, Erb P: **In vitro cultivation of *Toxoplasma gondii* cysts in astrocytes in the presence of gamma interferon.** *Infect Immun* 1986, **51**(1):147-156.
29. Lindsay DS, Mitschler RR, Toivio-Kinnucan MA, Upton SJ, Dubey JP, Blagburn BL: **Association of host cell mitochondria with developing *Toxoplasma gondii* tissue cysts.** *Am J Vet Res* 1993, **54**(10):1663-1667.
30. McHugh TD, Gbewonyo A, Johnson JD, Holliman RE, Butcher PD: **Development of an in vitro model of *Toxoplasma gondii* cyst formation.** *FEMS Microbiol Lett* 1993, **114**(3):325-332.
31. Ferguson DJ, Hutchison WM: **An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice.** *Parasitol Res* 1987, **73**(6):483-491.
32. Denton H, Roberts CW, Alexander J, Thong KW, Coombs GH: **Enzymes of energy metabolism in the bradyzoites and tachyzoites of *Toxoplasma gondii*.** *FEMS Microbiol Lett* 1996, **137**(1):103-108.
33. Bohne W, Gross U, Ferguson DJ, Heesemann J: **Cloning and characterization of a bradyzoite-specifically expressed gene (*hsp30/bag1*) of *Toxoplasma gondii*, related to genes encoding small heat-shock proteins of plants.** *Mol Microbiol* 1995, **16**(6):1221-1230.
34. Parmley SF, Weiss LM, Yang S: **Cloning of a bradyzoite-specific gene of *Toxoplasma gondii* encoding a cytoplasmic antigen.** *Mol Biochem Parasitol* 1995, **73**(1-2):253-257.
35. Toursel C, Dzierszynski F, Bernigaud A, Mortuaire M, Tomavo S: **Molecular cloning, organellar targeting and developmental expression of mitochondrial chaperone HSP60 in *Toxoplasma gondii*.** *Mol Biochem Parasitol* 2000, **111**(2):319-332.
36. Tomavo S: **The differential expression of multiple isoenzyme forms during stage conversion of *Toxoplasma gondii*: an adaptive developmental strategy.** *Int J Parasitol* 2001, **31**(10):1023-1031.
37. Ferguson DJ, Hutchison WM: **The host-parasite relationship of *Toxoplasma gondii* in the brains of chronically infected mice.** *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1987, **411**(1):39-43.
38. Holpert M, Luder CG, Gross U, Bohne W: **Bradyzoite-specific expression of a P-type ATPase in *Toxoplasma gondii*.** *Mol Biochem Parasitol* 2001, **112**(2):293-296.
39. Callebaut I, Prat K, Meurice E, Mornon JP, Tomavo S: **Prediction of the general transcription factors associated with RNA polymerase II in *Plasmodium falciparum*: conserved features and differences relative to other eukaryotes.** *BMC Genomics* 2005, **6**:100.
40. Meissner M, Krejany E, Gilson PR, de Koning-Ward TF, Soldati D, Crabb BS: **Tetracycline analogue-regulated transgene expression in *Plasmodium falciparum* blood stages using *Toxoplasma gondii* transactivators.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(8):2980-2985.
41. Aravind L, Iyer LM, Wellems TE, Miller LH: ***Plasmodium* biology: genomic gleanings.** *Cell* 2003, **115**(7):771-785.
42. Templeton TJ, Lancto CA, Vigdorovich V, Liu C, London NR, Hadsall KZ, Abrahamsen MS: **The *Cryptosporidium* oocyst wall protein is a member of a multigene family and has a homolog in *Toxoplasma*.** *Infect Immun* 2004, **72**(2):980-987.

43. Gissot M, Briquet S, Refour P, Boschet C, Vaquero C: **PfMyb1, a Plasmodium falciparum transcription factor, is required for intra-erythrocytic growth and controls key genes for cell cycle regulation.** *J Mol Biol* 2005, **346**(1):29-42.
44. Sullivan WJ, Jr., Monroy MA, Bohne W, Nallani KC, Chrivia J, Yaciuk P, Smith CK, 2nd, Queener SF: **Molecular cloning and characterization of an SRCAP chromatin remodeling homologue in Toxoplasma gondii.** *Parasitol Res* 2003, **90**(1):1-8.
45. Hettmann C, Soldati D: **Cloning and analysis of a Toxoplasma gondii histone acetyltransferase: a novel chromatin remodelling factor in Apicomplexan parasites.** *Nucleic Acids Res* 1999, **27**(22):4344-4352.
46. Sullivan WJ, Jr., Smith CK, 2nd: **Cloning and characterization of a novel histone acetyltransferase homologue from the protozoan parasite Toxoplasma gondii reveals a distinct GCN5 family member.** *Gene* 2000, **242**(1-2):193-200.
47. Fagard R, Van Tan H, Creuzet C, Pelloux H: **Differential development of Toxoplasma gondii in neural cells.** *Parasitol Today* 1999, **15**(12):504-507.
48. Luder CG, Giraldo-Velasquez M, Sendtner M, Gross U: **Toxoplasma gondii in primary rat CNS cells: differential contribution of neurons, astrocytes, and microglial cells for the intracerebral development and stage differentiation.** *Exp Parasitol* 1999, **93**(1):23-32.
49. Carter AO, Frank JW: **Congenital toxoplasmosis: epidemiologic features and control.** *Cmaj* 1986, **135**(6):618-623.
50. Wilson CB, Remington JS, Stagno S, Reynolds DW: **Development of adverse sequelae in children born with subclinical congenital Toxoplasma infection.** *Pediatrics* 1980, **66**(5):767-774.
51. Desmonts G, Couvreur J: **Toxoplasmosis in pregnancy and its transmission to the fetus.** *Bull N Y Acad Med* 1974, **50**(2):146-159.
52. Ajioka JW: **Toxoplasma gondii: ESTs and gene discovery.** *Int J Parasitol* 1998, **28**(7):1025-1031.
53. Ajioka JW, Boothroyd JC, Brunk BP, Hehl A, Hillier L, Manger ID, Marra M, Overton GC, Roos DS, Wan KL *et al*: **Gene discovery by EST sequencing in Toxoplasma gondii reveals sequences restricted to the Apicomplexa.** *Genome Res* 1998, **8**(1):18-28.
54. Wan KL, Carruthers VB, Sibley LD, Ajioka JW: **Molecular characterisation of an expressed sequence tag locus of Toxoplasma gondii encoding the micronemal protein MIC2.** *Mol Biochem Parasitol* 1997, **84**(2):203-214.
55. Gething MJ, Sambrook J: **Protein folding in the cell.** *Nature* 1992, **355**(6355):33-45.
56. Ritossa FM: **Experimental Activation of Specific Loci in Polytene Chromosomes of Drosophila.** *Exp Cell Res* 1964, **35**:601-607.
57. Tanabe M, Nakai A, Kawazoe Y, Nagata K: **Different thresholds in the responses of two heat shock transcription factors, HSF1 and HSF3.** *J Biol Chem* 1997, **272**(24):15389-15395.
58. Morimoto R, Tissieres, A. and Georgopoulos, C.: **The biology of heat shock proteins and molecular chaperones.** *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY* 1994.
59. Shi Y, Mosser DD, Morimoto RI: **Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors.** *Genes Dev* 1998, **12**(5):654-666.
60. Voellmy R: **On mechanisms that control heat shock transcription factor activity in metazoan cells.** *Cell Stress Chaperones* 2004, **9**(2):122-133.
61. Zou J, Guo Y, Guettouche T, Smith DF, Voellmy R: **Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1.** *Cell* 1998, **94**(4):471-480.
62. Hensold JO, Hunt CR, Calderwood SK, Housman DE, Kingston RE: **DNA binding of heat shock factor to the heat shock element is insufficient for transcriptional activation in murine erythroleukemia cells.** *Mol Cell Biol* 1990, **10**(4):1600-1608.
63. Jurivich DA, Sistonen L, Kroes RA, Morimoto RI: **Effect of sodium salicylate on the human heat shock response.** *Science* 1992, **255**(5049):1243-1245.

64. Cotto JJ, Kline M, Morimoto RI: **Activation of heat shock factor 1 DNA binding precedes stress-induced serine phosphorylation. Evidence for a multistep pathway of regulation.** *J Biol Chem* 1996, **271**(7):3355-3358.
65. Kline MP, Morimoto RI: **Repression of the heat shock factor 1 transcriptional activation domain is modulated by constitutive phosphorylation.** *Mol Cell Biol* 1997, **17**(4):2107-2115.
66. Schiller P, Amin J, Ananthan J, Brown ME, Scott WA, Voellmy R: **Cis-acting elements involved in the regulated expression of a human HSP70 gene.** *J Mol Biol* 1988, **203**(1):97-105.
67. Ananthan J, Goldberg AL, Voellmy R: **Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes.** *Science* 1986, **232**(4749):522-524.
68. Sharp FR, Massa SM, Swanson RA: **Heat-shock protein protection.** *Trends Neurosci* 1999, **22**(3):97-99.
69. Morimoto RI, Kline MP, Bimston DN, Cotto JJ: **The heat-shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones.** *Essays Biochem* 1997, **32**:17-29.
70. Welch WJ: **Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease.** *Physiol Rev* 1992, **72**(4):1063-1081.
71. Parsell DA, Sanchez Y, Stitzel JD, Lindquist S: **Hsp104 is a highly conserved protein with two essential nucleotide-binding sites.** *Nature* 1991, **353**(6341):270-273.
72. Pratt WB, Toft DO: **Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery.** *Exp Biol Med (Maywood)* 2003, **228**(2):111-133.
73. Lindquist S: **The heat-shock response.** *Annu Rev Biochem* 1986, **55**:1151-1191.
74. Mayer MP, Bukau B: **Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism.** *Cell Mol Life Sci* 2005, **62**(6):670-684.
75. Hohfeld J: **Regulation of the heat shock conjugate Hsc70 in the mammalian cell: the characterization of the anti-apoptotic protein BAG-1 provides novel insights.** *Biol Chem* 1998, **379**(3):269-274.
76. Johnson JL, Craig EA: **An essential role for the substrate-binding region of Hsp40s in *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Cell Biol* 2001, **152**(4):851-856.
77. Rogalla T, Ehrnsperger M, Preville X, Kotlyarov A, Lutsch G, Ducasse C, Paul C, Wieske M, Arrigo AP, Buchner J *et al*: **Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation.** *J Biol Chem* 1999, **274**(27):18947-18956.
78. Hohfeld J, Minami Y, Hartl FU: **Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle.** *Cell* 1995, **83**(4):589-598.
79. Blatch GL, Lassle M, Zetter BR, Kundra V: **Isolation of a mouse cDNA encoding mSTI1, a stress-inducible protein containing the TPR motif.** *Gene* 1997, **194**(2):277-282.
80. Johnson JL, Beito TG, Krco CJ, Toft DO: **Characterization of a novel 23-kilodalton protein of inactive progesterone receptor complexes.** *Mol Cell Biol* 1994, **14**(3):1956-1963.
81. Connell P, Ballinger CA, Jiang J, Wu Y, Thompson LJ, Hohfeld J, Patterson C: **The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins.** *Nat Cell Biol* 2001, **3**(1):93-96.
82. Arrigo AP: **[Heat shock proteins as molecular chaperones].** *Med Sci (Paris)* 2005, **21**(6-7):619-625.
83. Ehrnsperger M, Lilie H, Gaestel M, Buchner J: **The dynamics of Hsp25 quaternary structure. Structure and function of different oligomeric species.** *J Biol Chem* 1999, **274**(21):14867-14874.
84. McDonough H, Patterson C: **CHIP: a link between the chaperone and proteasome systems.** *Cell Stress Chaperones* 2003, **8**(4):303-308.
85. Tomavo S, Fortier B, Soete M, Ansel C, Camus D, Dubremetz JF: **Characterization of bradyzoite-specific antigens of *Toxoplasma gondii*.** In: *Infect Immun.* vol. 59; 1991: 3750-3753.

86. Krobitch S, Brandau S, Hoyer C, Schmetz C, Hubel A, Clos J: **Leishmania donovani heat shock protein 100. Characterization and function in amastigote stage differentiation.** *J Biol Chem* 1998, **273**(11):6488-6494.
87. Wilson ME, Andersen KA, Britigan BE: **Response of Leishmania chagasi promastigotes to oxidant stress.** *Infect Immun* 1994, **62**(11):5133-5141.
88. Wiesgigl M, Clos J: **Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in Leishmania donovani.** *Mol Biol Cell* 2001, **12**(11):3307-3316.
89. Banumathy G, Singh V, Pavithra SR, Tatu U: **Heat shock protein 90 function is essential for Plasmodium falciparum growth in human erythrocytes.** *J Biol Chem* 2003, **278**(20):18336-18345.
90. Weiss LM, Ma YF, Takvorian PM, Tanowitz HB, Wittner M: **Bradyzoite development in Toxoplasma gondii and the hsp70 stress response.** *Infect Immun* 1998, **66**(7):3295-3302.
91. Segui-Simarro JM, Testillano PS, Risueno MC: **Hsp70 and Hsp90 change their expression and subcellular localization after microspore embryogenesis induction in Brassica napus L.** *J Struct Biol* 2003, **142**(3):379-391.
92. Graefe SE, Wiesgigl M, Gaworski I, Macdonald A, Clos J: **Inhibition of HSP90 in Trypanosoma cruzi induces a stress response but no stage differentiation.** *Eukaryot Cell* 2002, **1**(6):936-943.
93. Zhang M, Hisaeda H, Tsuboi T, Torii M, Sakai T, Nakano Y, Ishikawa H, Maekawa Y, Good RA, Himeno K: **Stage-specific expression of heat shock protein 90 in murine malaria parasite Plasmodium yoelii.** *Exp Parasitol* 1999, **93**(2):61-65.
94. Feder ME, Hofmann GE: **Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology.** *Annu Rev Physiol* 1999, **61**:243-282.
95. Buchner J: **Hsp90 & Co. - a holding for folding.** *Trends Biochem Sci* 1999, **24**(4):136-141.
96. Prodromou C, Panaretou B, Chohan S, Siligardi G, O'Brien R, Ladbury JE, Roe SM, Piper PW, Pearl LH: **The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular 'clamp' via transient dimerization of the N-terminal domains.** *Embo J* 2000, **19**(16):4383-4392.
97. Young JC, Moarefi I, Hartl FU: **Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool.** *J Cell Biol* 2001, **154**(2):267-273.
98. Picard D: **Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation.** *Cell Mol Life Sci* 2002, **59**(10):1640-1648.
99. Wegele H, Muller L, Buchner J: **Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding.** *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2004, **151**:1-44.
100. Mayer MP, Bukau B: **Molecular chaperones: the busy life of Hsp90.** *Curr Biol* 1999, **9**(9):R322-325.
101. Goes FS, Martin J: **Hsp90 chaperone complexes are required for the activity and stability of yeast protein kinases Mik1, Wee1 and Swe1.** *Eur J Biochem* 2001, **268**(8):2281-2289.
102. Yue L, Karr TL, Nathan DF, Swift H, Srinivasan S, Lindquist S: **Genetic analysis of viable Hsp90 alleles reveals a critical role in Drosophila spermatogenesis.** *Genetics* 1999, **151**(3):1065-1079.
103. Nathan DF, Vos MH, Lindquist S: **In vivo functions of the Saccharomyces cerevisiae Hsp90 chaperone.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**(24):12949-12956.
104. Cutforth T, Rubin GM: **Mutations in Hsp83 and cdc37 impair signaling by the sevenless receptor tyrosine kinase in Drosophila.** *Cell* 1994, **77**(7):1027-1036.
105. Borkovich KA, Farrelly FW, Finkelstein DB, Taulien J, Lindquist S: **hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures.** *Mol Cell Biol* 1989, **9**(9):3919-3930.
106. Lele Z, Hartson SD, Martin CC, Whitesell L, Matts RL, Krone PH: **Disruption of zebrafish somite development by pharmacologic inhibition of Hsp90.** *Dev Biol* 1999, **210**(1):56-70.
107. David CL, Smith HE, Raynes DA, Pulcini EJ, Whitesell L: **Expression of a unique drug-resistant Hsp90 ortholog by the nematode Caenorhabditis elegans.** *Cell Stress Chaperones* 2003, **8**(1):93-104.
108. Prodromou C, Pearl LH: **Structure and functional relationships of Hsp90.** *Curr Cancer Drug Targets* 2003, **3**(5):301-323.

109. Stebbins CE, Russo AA, Schneider C, Rosen N, Hartl FU, Pavletich NP: **Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent.** *Cell* 1997, **89**(2):239-250.
110. Whitesell L, Mimnaugh EG, De Costa B, Myers CE, Neckers LM: **Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**(18):8324-8328.
111. Miller P, DiOrio C, Moyer M, Schnur RC, Bruskin A, Cullen W, Moyer JD: **Depletion of the erbB-2 gene product p185 by benzoquinoid ansamycins.** *Cancer Res* 1994, **54**(10):2724-2730.
112. Mimnaugh EG, Chavany C, Neckers L: **Polyubiquitination and proteasomal degradation of the p185c-erbB-2 receptor protein-tyrosine kinase induced by geldanamycin.** *J Biol Chem* 1996, **271**(37):22796-22801.
113. Louvion JF, Warth R, Picard D: **Two eukaryote-specific regions of Hsp82 are dispensable for its viability and signal transduction functions in yeast.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**(24):13937-13942.
114. Prodromou C, Roe SM, Piper PW, Pearl LH: **A molecular clamp in the crystal structure of the N-terminal domain of the yeast Hsp90 chaperone.** *Nat Struct Biol* 1997, **4**(6):477-482.
115. Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH: **Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone.** *Cell* 1997, **90**(1):65-75.
116. Dutta R, Inouye M: **GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily.** *Trends Biochem Sci* 2000, **25**(1):24-28.
117. Panaretou B, Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH: **ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo.** *Embo J* 1998, **17**(16):4829-4836.
118. Obermann WM, Sondermann H, Russo AA, Pavletich NP, Hartl FU: **In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis.** *J Cell Biol* 1998, **143**(4):901-910.
119. Grenert JP, Johnson BD, Toft DO: **The importance of ATP binding and hydrolysis by hsp90 in formation and function of protein heterocomplexes.** *J Biol Chem* 1999, **274**(25):17525-17533.
120. Maruya M, Sameshima M, Nemoto T, Yahara I: **Monomer arrangement in HSP90 dimer as determined by decoration with N and C-terminal region specific antibodies.** *J Mol Biol* 1999, **285**(3):903-907.
121. Richter K, Muschler P, Hainzl O, Reinstein J, Buchner J: **Sti1 is a non-competitive inhibitor of the Hsp90 ATPase. Binding prevents the N-terminal dimerization reaction during the atpase cycle.** *J Biol Chem* 2003, **278**(12):10328-10333.
122. Meyer P, Prodromou C, Hu B, Vaughan C, Roe SM, Panaretou B, Piper PW, Pearl LH: **Structural and functional analysis of the middle segment of hsp90: implications for ATP hydrolysis and client protein and cochaperone interactions.** *Mol Cell* 2003, **11**(3):647-658.
123. Young JC, Schneider C, Hartl FU: **In vitro evidence that hsp90 contains two independent chaperone sites.** *FEBS Lett* 1997, **418**(1-2):139-143.
124. Minami M, Nakamura M, Emori Y, Minami Y: **Both the N- and C-terminal chaperone sites of Hsp90 participate in protein refolding.** *Eur J Biochem* 2001, **268**(8):2520-2524.
125. Sato S, Fujita N, Tsuruo T: **Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**(20):10832-10837.
126. Fontana J, Fulton D, Chen Y, Fairchild TA, McCabe TJ, Fujita N, Tsuruo T, Sessa WC: **Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release.** *Circ Res* 2002, **90**(8):866-873.
127. Muller L, Schaupp A, Walerych D, Wegele H, Buchner J: **Hsp90 regulates the activity of wild type p53 under physiological and elevated temperatures.** *J Biol Chem* 2004, **279**(47):48846-48854.

128. Minami Y, Minami M: **Hsc70/Hsp40 chaperone system mediates the Hsp90-dependent refolding of firefly luciferase.** *Genes Cells* 1999, **4**(12):721-729.
129. Chen S, Smith DF: **Hop as an adaptor in the heat shock protein 70 (Hsp70) and hsp90 chaperone machinery.** *J Biol Chem* 1998, **273**(52):35194-35200.
130. Young JC, Obermann WM, Hartl FU: **Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to the C-terminal 12-kDa domain of hsp90.** *J Biol Chem* 1998, **273**(29):18007-18010.
131. Prodromou C, Siligardi G, O'Brien R, Woolfson DN, Regan L, Panaretou B, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH: **Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones.** *Embo J* 1999, **18**(3):754-762.
132. Scheufler C, Brinker A, Bourenkov G, Pegoraro S, Moroder L, Bartunik H, Hartl FU, Moarefi I: **Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine.** *Cell* 2000, **101**(2):199-210.
133. Kamal A, Boehm MF, Burrows FJ: **Therapeutic and diagnostic implications of Hsp90 activation.** *Trends Mol Med* 2004, **10**(6):283-290.
134. Broemer M, Krappmann D, Scheiderei C: **Requirement of Hsp90 activity for IkappaB kinase (IKK) biosynthesis and for constitutive and inducible IKK and NF-kappaB activation.** *Oncogene* 2004, **23**(31):5378-5386.
135. Smith DF, Schowalter DB, Kost SL, Toft DO: **Reconstitution of progesterone receptor with heat shock proteins.** *Mol Endocrinol* 1990, **4**(11):1704-1711.
136. Kosano H, Stensgard B, Charlesworth MC, McMahon N, Toft D: **The assembly of progesterone receptor-hsp90 complexes using purified proteins.** *J Biol Chem* 1998, **273**(49):32973-32979.
137. Nair SC, Toran EJ, Rimerman RA, Hjermsstad S, Smithgall TE, Smith DF: **A pathway of multi-chaperone interactions common to diverse regulatory proteins: estrogen receptor, Fes tyrosine kinase, heat shock transcription factor Hsf1, and the aryl hydrocarbon receptor.** *Cell Stress Chaperones* 1996, **1**(4):237-250.
138. Takayama S, Reed JC: **Molecular chaperone targeting and regulation by BAG family proteins.** *Nat Cell Biol* 2001, **3**(10):E237-241.
139. Sullivan W, Stensgard B, Caucutt G, Bartha B, McMahon N, Alnemri ES, Litwack G, Toft D: **Nucleotides and two functional states of hsp90.** *J Biol Chem* 1997, **272**(12):8007-8012.
140. Fang Y, Fliss AE, Rao J, Caplan AJ: **SBA1 encodes a yeast hsp90 cochaperone that is homologous to vertebrate p23 proteins.** *Mol Cell Biol* 1998, **18**(7):3727-3734.
141. Chadli A, Bouhouche I, Sullivan W, Stensgard B, McMahon N, Catelli MG, Toft DO: **Dimerization and N-terminal domain proximity underlie the function of the molecular chaperone heat shock protein 90.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**(23):12524-12529.
142. Pearl LH, Prodromou C: **Structure and in vivo function of Hsp90.** *Curr Opin Struct Biol* 2000, **10**(1):46-51.
143. Riggs DL, Roberts PJ, Chirillo SC, Cheung-Flynn J, Prapapanich V, Ratajczak T, Gaber R, Picard D, Smith DF: **The Hsp90-binding peptidylprolyl isomerase FKBP52 potentiates glucocorticoid signaling in vivo.** *Embo J* 2003, **22**(5):1158-1167.
144. Young JC, Agashe VR, Siegers K, Hartl FU: **Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004, **5**(10):781-791.
145. McLaughlin SH, Smith HW, Jackson SE: **Stimulation of the weak ATPase activity of human hsp90 by a client protein.** *J Mol Biol* 2002, **315**(4):787-798.
146. Panaretou B, Siligardi G, Meyer P, Maloney A, Sullivan JK, Singh S, Millson SH, Clarke PA, Naaby-Hansen S, Stein R *et al*: **Activation of the ATPase activity of hsp90 by the stress-regulated cochaperone aha1.** *Mol Cell* 2002, **10**(6):1307-1318.
147. Lotz GP, Lin H, Harst A, Obermann WM: **Aha1 binds to the middle domain of Hsp90, contributes to client protein activation, and stimulates the ATPase activity of the molecular chaperone.** *J Biol Chem* 2003, **278**(19):17228-17235.
148. Silverstein AM, Grammatikakis N, Cochran BH, Chinkers M, Pratt WB: **p50(cdc37) binds directly to the catalytic domain of Raf as well as to a site on hsp90 that is topologically adjacent to the tetratricopeptide repeat binding site.** *J Biol Chem* 1998, **273**(32):20090-20095.

149. Grammatikakis N, Lin JH, Grammatikakis A, Tschlis PN, Cochran BH: **p50(cdc37) acting in concert with Hsp90 is required for Raf-1 function.** *Mol Cell Biol* 1999, **19**(3):1661-1672.
150. Shao J, Irwin A, Hartson SD, Matts RL: **Functional dissection of cdc37: characterization of domain structure and amino acid residues critical for protein kinase binding.** *Biochemistry* 2003, **42**(43):12577-12588.
151. Siligardi G, Panaretou B, Meyer P, Singh S, Woolfson DN, Piper PW, Pearl LH, Prodromou C: **Regulation of Hsp90 ATPase activity by the co-chaperone Cdc37/p50cdc37.** *J Biol Chem* 2002, **277**(23):20151-20159.
152. Roe SM, Ali MM, Meyer P, Vaughan CK, Panaretou B, Piper PW, Prodromou C, Pearl LH: **The Mechanism of Hsp90 regulation by the protein kinase-specific cochaperone p50(cdc37).** *Cell* 2004, **116**(1):87-98.
153. Lee P, Shabbir A, Cardozo C, Caplan AJ: **Sti1 and Cdc37 can stabilize Hsp90 in chaperone complexes with a protein kinase.** *Mol Biol Cell* 2004, **15**(4):1785-1792.
154. Brugge JS: **Interaction of the Rous sarcoma virus protein pp60src with the cellular proteins pp50 and pp90.** *Curr Top Microbiol Immunol* 1986, **123**:1-22.
155. Stepanova L, Leng X, Parker SB, Harper JW: **Mammalian p50Cdc37 is a protein kinase-targeting subunit of Hsp90 that binds and stabilizes Cdk4.** *Genes Dev* 1996, **10**(12):1491-1502.
156. Stancato LF, Chow YH, Hutchison KA, Perdew GH, Jove R, Pratt WB: **Raf exists in a native heterocomplex with hsp90 and p50 that can be reconstituted in a cell-free system.** *J Biol Chem* 1993, **268**(29):21711-21716.
157. Pratt WB, Galigniana MD, Harrell JM, DeFranco DB: **Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signalling protein movement.** *Cell Signal* 2004, **16**(8):857-872.
158. Carver LA, Bradfield CA: **Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo.** *J Biol Chem* 1997, **272**(17):11452-11456.
159. Silverstein AM, Galigniana MD, Kanelakis KC, Radanyi C, Renoir JM, Pratt WB: **Different regions of the immunophilin FKBP52 determine its association with the glucocorticoid receptor, hsp90, and cytoplasmic dynein.** *J Biol Chem* 1999, **274**(52):36980-36986.
160. Kovacs JJ, Murphy PJ, Gaillard S, Zhao X, Wu JT, Nicchitta CV, Yoshida M, Toft DO, Pratt WB, Yao TP: **HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor.** *Mol Cell* 2005, **18**(5):601-607.
161. Aoyagi S, Archer TK: **Modulating molecular chaperone Hsp90 functions through reversible acetylation.** *Trends Cell Biol* 2005, **15**(11):565-567.
162. D'Andrea LD, Regan L: **TPR proteins: the versatile helix.** *Trends Biochem Sci* 2003, **28**(12):655-662.
163. Das AK, Cohen PW, Barford D: **The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions.** *Embo J* 1998, **17**(5):1192-1199.
164. Taylor P, Dornan J, Carrello A, Minchin RF, Ratajczak T, Walkinshaw MD: **Two structures of cyclophilin 40: folding and fidelity in the TPR domains.** *Structure (Camb)* 2001, **9**(5):431-438.
165. Sinars CR, Cheung-Flynn J, Rimerman RA, Scammell JG, Smith DF, Clardy J: **Structure of the large FK506-binding protein FKBP51, an Hsp90-binding protein and a component of steroid receptor complexes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(3):868-873.
166. Wu B, Li P, Liu Y, Lou Z, Ding Y, Shu C, Ye S, Bartlam M, Shen B, Rao Z: **3D structure of human FK506-binding protein 52: implications for the assembly of the glucocorticoid receptor/Hsp90/immunophilin heterocomplex.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(22):8348-8353.
167. Irmer H, Hohfeld J: **Characterization of functional domains of the eukaryotic co-chaperone Hip.** *J Biol Chem* 1997, **272**(4):2230-2235.
168. Schena M, Yamamoto KR: **Mammalian glucocorticoid receptor derivatives enhance transcription in yeast.** *Science* 1988, **241**(4868):965-967.
169. Prapapanich V, Chen S, Smith DF: **Mutation of Hip's carboxy-terminal region inhibits a transitional stage of progesterone receptor assembly.** *Mol Cell Biol* 1998, **18**(2):944-952.

170. Carrigan PE, Nelson GM, Roberts PJ, Stoffer J, Riggs DL, Smith DF: **Multiple domains of the co-chaperone Hop are important for Hsp70 binding.** *J Biol Chem* 2004, **279**(16):16185-16193.
171. Ballinger CA, Connell P, Wu Y, Hu Z, Thompson LJ, Yin LY, Patterson C: **Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions.** *Mol Cell Biol* 1999, **19**(6):4535-4545.
172. Takayama S, Sato T, Krajewski S, Kochel K, Irie S, Millan JA, Reed JC: **Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity.** *Cell* 1995, **80**(2):279-284.
173. Takayama S, Bimston DN, Matsuzawa S, Freeman BC, Aime-Sempe C, Xie Z, Morimoto RI, Reed JC: **BAG-1 modulates the chaperone activity of Hsp70/Hsc70.** *Embo J* 1997, **16**(16):4887-4896.
174. Nollen EA, Brunsting JF, Song J, Kampinga HH, Morimoto RI: **Bag1 functions in vivo as a negative regulator of Hsp70 chaperone activity.** *Mol Cell Biol* 2000, **20**(3):1083-1088.
175. Takayama S, Xie Z, Reed JC: **An evolutionarily conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators.** *J Biol Chem* 1999, **274**(2):781-786.
176. Zeiner M, Gebauer M, Gehring U: **Mammalian protein RAP46: an interaction partner and modulator of 70 kDa heat shock proteins.** *Embo J* 1997, **16**(18):5483-5490.
177. Pratt WB, Toft DO: **Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones.** *Endocr Rev* 1997, **18**(3):306-360.
178. Flom G, Weekes J, Williams JJ, Johnson JL: **Effect of mutation of the TPR and DP2 domains of Sti1 on Hsp90 signaling and interaction in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Genetics* 2005.
179. Lassle M, Blatch GL, Kundra V, Takatori T, Zetter BR: **Stress-inducible, murine protein mSTI1. Characterization of binding domains for heat shock proteins and in vitro phosphorylation by different kinases.** *J Biol Chem* 1997, **272**(3):1876-1884.
180. van der Spuy J, Cheetham ME, Dirr HW, Blatch GL: **The cochaperone murine stress-inducible protein 1: overexpression, purification, and characterization.** *Protein Expr Purif* 2001, **21**(3):462-469.
181. Longshaw VM, Chapple JP, Balda MS, Cheetham ME, Blatch GL: **Nuclear translocation of the Hsp70/Hsp90 organizing protein mSTI1 is regulated by cell cycle kinases.** *J Cell Sci* 2004, **117**(Pt 5):701-710.
182. Johnson JL, Toft DO: **Binding of p23 and hsp90 during assembly with the progesterone receptor.** *Mol Endocrinol* 1995, **9**(6):670-678.
183. Richter K, Walter S, Buchner J: **The Co-chaperone Sba1 connects the ATPase reaction of Hsp90 to the progression of the chaperone cycle.** *J Mol Biol* 2004, **342**(5):1403-1413.
184. Sullivan WP, Owen BA, Toft DO: **The influence of ATP and p23 on the conformation of hsp90.** *J Biol Chem* 2002, **277**(48):45942-45948.
185. Hu J, Toft DO, Seeger C: **Hepadnavirus assembly and reverse transcription require a multi-component chaperone complex which is incorporated into nucleocapsids.** *Embo J* 1997, **16**(1):59-68.
186. Holt SE, Aisner DL, Baur J, Tesmer VM, Dy M, Ouellette M, Trager JB, Morin GB, Toft DO, Shay JW *et al*: **Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes.** *Genes Dev* 1999, **13**(7):817-826.
187. Bose S, Weikl T, Bugl H, Buchner J: **Chaperone function of Hsp90-associated proteins.** *Science* 1996, **274**(5293):1715-1717.
188. Freeman BC, Morimoto RI: **The human cytosolic molecular chaperones hsp90, hsp70 (hsc70) and hdj-1 have distinct roles in recognition of a non-native protein and protein refolding.** *Embo J* 1996, **15**(12):2969-2979.
189. Tanioka T, Nakatani Y, Semmyo N, Murakami M, Kudo I: **Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis.** *J Biol Chem* 2000, **275**(42):32775-32782.
190. Mollerup J, Berchtold MW: **The co-chaperone p23 is degraded by caspases and the proteasome during apoptosis.** *FEBS Lett* 2005, **579**(19):4187-4192.

191. Jackson SE, Queitsch C, Toft D: **Hsp90: from structure to phenotype.** *Nat Struct Mol Biol* 2004, **11**(12):1152-1155.
192. Brandts JF, Halvorson HR, Brennan M: **Consideration of the Possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues.** *Biochemistry* 1975, **14**(22):4953-4963.
193. Kim PS, Baldwin RL: **Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding.** *Annu Rev Biochem* 1982, **51**:459-489.
194. Schmid FX, Mayr LM, Mucke M, Schonbrunner ER: **Prolyl isomerases: role in protein folding.** *Adv Protein Chem* 1993, **44**:25-66.
195. Gotherl SF, Marahiel MA: **Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts.** *Cell Mol Life Sci* 1999, **55**(3):423-436.
196. Jin L, Harrison SC: **Crystal structure of human calcineurin complexed with cyclosporin A and human cyclophilin.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(21):13522-13526.
197. Huai Q, Kim HY, Liu Y, Zhao Y, Mondragon A, Liu JO, Ke H: **Crystal structure of calcineurin-cyclophilin-cyclosporin shows common but distinct recognition of immunophilin-drug complexes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(19):12037-12042.
198. Kissinger CR, Parge HE, Knighton DR, Lewis CT, Pelletier LA, Tempczyk A, Kalish VJ, Tucker KD, Showalter RE, Moomaw EW *et al*: **Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex.** *Nature* 1995, **378**(6557):641-644.
199. Galigniana MD, Harrell JM, Murphy PJ, Chinkers M, Radanyi C, Renoir JM, Zhang M, Pratt WB: **Binding of hsp90-associated immunophilins to cytoplasmic dynein: direct binding and in vivo evidence that the peptidylprolyl isomerase domain is a dynein interaction domain.** *Biochemistry* 2002, **41**(46):13602-13610.
200. Chen MS, Silverstein AM, Pratt WB, Chinkers M: **The tetratricopeptide repeat domain of protein phosphatase 5 mediates binding to glucocorticoid receptor heterocomplexes and acts as a dominant negative mutant.** *J Biol Chem* 1996, **271**(50):32315-32320.
201. Silverstein AM, Galigniana MD, Chen MS, Owens-Grillo JK, Chinkers M, Pratt WB: **Protein phosphatase 5 is a major component of glucocorticoid receptor.hsp90 complexes with properties of an FK506-binding immunophilin.** *J Biol Chem* 1997, **272**(26):16224-16230.
202. Neckers L, Schulte TW, Mimnaugh E: **Geldanamycin as a potential anti-cancer agent: its molecular target and biochemical activity.** *Invest New Drugs* 1999, **17**(4):361-373.
203. Hartmann RR, Rimoldi D, Lejeune FJ, Carrel S: **Cell differentiation and cell-cycle alterations by tyrosine kinase inhibitors in human melanoma cells.** *Melanoma Res* 1997, **7 Suppl 2**:S27-33.
204. Schulte TW, Blagosklonny MV, Ingui C, Neckers L: **Disruption of the Raf-1-Hsp90 molecular complex results in destabilization of Raf-1 and loss of Raf-1-Ras association.** *J Biol Chem* 1995, **270**(41):24585-24588.
205. Blagosklonny MV, Toretsky J, Neckers L: **Geldanamycin selectively destabilizes and conformationally alters mutated p53.** *Oncogene* 1995, **11**(5):933-939.
206. Supko JG, Hickman RL, Grever MR, Malspeis L: **Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent.** *Cancer Chemother Pharmacol* 1995, **36**(4):305-315.
207. Schulte TW, Neckers LM: **The benzoquinone ansamycin 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin binds to HSP90 and shares important biologic activities with geldanamycin.** *Cancer Chemother Pharmacol* 1998, **42**(4):273-279.
208. Solit DB, Zheng FF, Drobnyak M, Munster PN, Higgins B, Verbel D, Heller G, Tong W, Cordon-Cardo C, Agus DB *et al*: **17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin induces the degradation of androgen receptor and HER-2/neu and inhibits the growth of prostate cancer xenografts.** *Clin Cancer Res* 2002, **8**(5):986-993.
209. Sausville EA, Tomaszewski JE, Ivy P: **Clinical development of 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin.** *Curr Cancer Drug Targets* 2003, **3**(5):377-383.
210. Vilenchik M, Solit D, Basso A, Huezio H, Lucas B, He H, Rosen N, Spampinato C, Modrich P, Chiosis G: **Targeting wide-range oncogenic transformation via PU24FCL, a specific inhibitor of tumor Hsp90.** *Chem Biol* 2004, **11**(6):787-797.
211. Neckers L, Neckers K: **Heat-shock protein 90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutics - an update.** *Expert Opin Emerg Drugs* 2005, **10**(1):137-149.

212. Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, Zhang L, Boehm MF, Fritz LC, Burrows FJ: **A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors.** *Nature* 2003, **425**(6956):407-410.
213. Whitesell L, Lindquist SL: **HSP90 and the chaperoning of cancer.** *Nat Rev Cancer* 2005, **5**(10):761-772.
214. Le Brazidec JY, Kamal A, Busch D, Thao L, Zhang L, Timony G, Grecko R, Trent K, Lough R, Salazar T *et al*: **Synthesis and biological evaluation of a new class of geldanamycin derivatives as potent inhibitors of Hsp90.** *J Med Chem* 2004, **47**(15):3865-3873.
215. Kumar R, Musiyenko A, Barik S: **The heat shock protein 90 of Plasmodium falciparum and antimalarial activity of its inhibitor, geldanamycin.** *Malar J* 2003, **2**(1):30.
216. Kumar R, Adams B, Musiyenko A, Shulyayeva O, Barik S: **The FK506-binding protein of the malaria parasite, Plasmodium falciparum, is a FK506-sensitive chaperone with FK506-independent calcineurin-inhibitory activity.** *Mol Biochem Parasitol* 2005, **141**(2):163-173.
217. Adams B, Musiyenko A, Kumar R, Barik S: **A novel class of dual-family immunophilins.** *J Biol Chem* 2005, **280**(26):24308-24314.
218. Ahn HJ, Kim S, Nam HW: **Molecular cloning of the 82-kDa heat shock protein (HSP90) of Toxoplasma gondii associated with the entry into and growth in host cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **311**(3):654-659.
219. Bohne W, Roos DS (eds.): **Stage-specific expression of a selectable marker in Toxoplasma gondii permits selective inhibition of either tachyzoites or bradyzoites;** 1997.
220. Boothroyd JC, Black M, Bonnefoy S, Hehl A, Knoll LJ, Manger ID, Ortega-Barria E, Tomavo S: **Genetic and biochemical analysis of development in Toxoplasma gondii.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1997, **352**(1359):1347-1354.
221. Kasper LH, Ware PL: **Recognition and characterization of stage-specific oocyst/sporozoite antigens of Toxoplasma gondii by human antisera.** In: *J Clin Invest.* vol. 75; 1985: 1570-1577.
222. Nagel SD, Boothroyd JC: **The alpha- and beta-tubulins of Toxoplasma gondii are encoded by single copy genes containing multiple introns.** *Mol Biochem Parasitol* 1988, **29**(2-3):261-273.
223. Rojas PA, Martin V, Nigro M, Echeverria PC, Guarnera EA, Pszenny V, Angel SO: **Expression of a cDNA encoding a Toxoplasma gondii protein belonging to the heat-shock 90 family and analysis of its antigenicity.** *FEMS Microbiol Lett* 2000, **190**(2):209-213.
224. Falquet L, Pagni M, Bucher P, Hulo N, Sigrist CJ, Hofmann K, Bairoch A: **The PROSITE database, its status in 2002.** *Nucleic Acids Res* 2002, **30**(1):235-238.
225. Lindquist S, Craig EA: **The heat-shock proteins.** *Annu Rev Genet* 1988, **22**:631-677.
226. Nemoto T, Ohara-Nemoto Y, Ota M, Takagi T, Yokoyama K: **Mechanism of dimer formation of the 90-kDa heat-shock protein.** In: *Eur J Biochem.* vol. 233; 1995: 1-8.
227. Harris SF, Shiau AK, Agard DA: **The crystal structure of the carboxy-terminal dimerization domain of htpG, the Escherichia coli Hsp90, reveals a potential substrate binding site.** *Structure (Camb)* 2004, **12**(6):1087-1097.
228. Matrajt M, Donald RG, Singh U, Roos DS: **Identification and characterization of differentiation mutants in the protozoan parasite Toxoplasma gondii.** *Mol Microbiol* 2002, **44**(3):735-747.
229. Marchler-Bauer A, Bryant SH: **CD-Search: protein domain annotations on the fly.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**(Web Server issue):W327-331.
230. Boorstein WR, Ziegelhoffer T, Craig EA: **Molecular evolution of the HSP70 multigene family.** *J Mol Evol* 1994, **38**(1):1-17.
231. Wisner MF, Jennings GJ, Uparanukraw P, van Belkum A, van Doorn LJ, Kumar N: **Further characterization of a 58 kDa Plasmodium berghei phosphoprotein as a cochaperone.** *Mol Biochem Parasitol* 1996, **83**(1):25-33.
232. Blatch GL, Lassle M: **The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions.** *Bioessays* 1999, **21**(11):932-939.

233. Dobson S, Kar B, Kumar R, Adams B, Barik S: **A novel tetratricopeptide repeat (TPR) containing PP5 serine/threonine protein phosphatase in the malaria parasite, Plasmodium falciparum.** *BMC Microbiol* 2001, **1**(1):31.
234. Weaver AJ, Sullivan WP, Felts SJ, Owen BA, Toft DO: **Crystal structure and activity of human p23, a heat shock protein 90 co-chaperone.** *J Biol Chem* 2000, **275**(30):23045-23052.
235. Cyr DM, Langer T, Douglas MG: **DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70.** *Trends Biochem Sci* 1994, **19**(4):176-181.
236. Kelley WL: **The J-domain family and the recruitment of chaperone power.** *Trends Biochem Sci* 1998, **23**(6):222-227.
237. Li J, Qian X, Sha B: **The crystal structure of the yeast Hsp40 Ydj1 complexed with its peptide substrate.** *Structure* 2003, **11**(12):1475-1483.
238. Kang KI, Devin J, Cadepond F, Jibard N, Guiochon-Mantel A, Baulieu EE, Catelli MG: **In vivo functional protein-protein interaction: nuclear targeted hsp90 shifts cytoplasmic steroid receptor mutants into the nucleus.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**(1):340-344.
239. Tachibana S, Numata H: **Effects of temperature and photoperiod on the termination of larval diapause in Lucilia sericata (Diptera: Calliphoridae).** *Zoolog Sci* 2004, **21**(2):197-202.
240. Wiesgigl M, Clos J: **The heat shock protein 90 of Leishmania donovani.** *Med Microbiol Immunol (Berl)* 2001, **190**(1-2):27-31.
241. Schnaider T, Oikarinen J, Ishiwatari-Hayasaka H, Yahara I, Csermely P: **Interactions of Hsp90 with histones and related peptides.** *Life Sci* 1999, **65**(22):2417-2426.
242. Langer T, Rosmus S, Fasold H: **Intracellular localization of the 90 kDA heat shock protein (HSP90alpha) determined by expression of a EGFP-HSP90alpha-fusion protein in unstressed and heat stressed 3T3 cells.** *Cell Biol Int* 2003, **27**(1):47-52.
243. Schlatter H, Langer T, Rosmus S, Onneken ML, Fasold H: **A novel function for the 90 kDA heat-shock protein (Hsp90): facilitating nuclear export of 60 S ribosomal subunits.** *Biochem J* 2002, **362**(Pt 3):675-684.
244. Kazlauskas A, Sundstrom S, Poellinger L, Pongratz I: **The hsp90 chaperone complex regulates intracellular localization of the dioxin receptor.** *Mol Cell Biol* 2001, **21**(7):2594-2607.
245. Langer T, Schlatter H, Fasold H: **Evidence that the novobiocin-sensitive ATP-binding site of the heat shock protein 90 (hsp90) is necessary for its autophosphorylation.** *Cell Biol Int* 2002, **26**(7):653-657.
246. Veenstra J, Veugelers PJ, Keet IP, van der Ven AJ, Miedema F, Lange JM, Coutinho RA: **Rapid disease progression in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals with adverse reactions to trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis.** *Clin Infect Dis* 1997, **24**(5):936-941.
247. Devaney E, O'Neill K, Harnett W, Whitesell L, Kinnaird JH: **Hsp90 is essential in the filarial nematode Brugia pahangi.** *Int J Parasitol* 2005, **35**(6):627-636.
248. Radke JR, Guerini MN, Jerome M, White MW: **A change in the premitotic period of the cell cycle is associated with bradyzoite differentiation in Toxoplasma gondii.** *Mol Biochem Parasitol* 2003, **131**(2):119-127.
249. Dzierszynski F, Nishi M, Ouko L, Roos DS: **Dynamics of Toxoplasma gondii differentiation.** *Eukaryot Cell* 2004, **3**(4):992-1003.
250. Brumlik MJ, Wei S, Finstad K, Nesbit J, Hyman LE, Lacey M, Burow ME, Curiel TJ: **Identification of a novel mitogen-activated protein kinase in Toxoplasma gondii.** *Int J Parasitol* 2004, **34**(11):1245-1254.
251. Galigniana MD, Harrell JM, O'Hagen HM, Ljungman M, Pratt WB: **Hsp90-binding immunophilins link p53 to dynein during p53 transport to the nucleus.** *J Biol Chem* 2004, **279**(21):22483-22489.
252. Maloney A, Workman P: **HSP90 as a new therapeutic target for cancer therapy: the story unfolds.** *Expert Opin Biol Ther* 2002, **2**(1):3-24.
253. Fuchs EJ, Matzinger P: **Is cancer dangerous to the immune system?** *Semin Immunol* 1996, **8**(5):271-280.

254. Todryk S, Melcher AA, Hardwick N, Linardakis E, Bateman A, Colombo MP, Stoppacciaro A, Vile RG: **Heat shock protein 70 induced during tumor cell killing induces Th1 cytokines and targets immature dendritic cell precursors to enhance antigen uptake.** *J Immunol* 1999, **163**(3):1398-1408.
255. Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, Koo GC, Calderwood SK: **HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine.** *Nat Med* 2000, **6**(4):435-442.
256. Asea A, Kabingu E, Stevenson MA, Calderwood SK: **HSP70 peptidbearing and peptide-negative preparations act as chaperokines.** *Cell Stress Chaperones* 2000, **5**(5):425-431.
257. Binder RJ, Han DK, Srivastava PK: **CD91: a receptor for heat shock protein gp96.** *Nat Immunol* 2000, **1**(2):151-155.
258. Suto R, Srivastava PK: **A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides.** *Science* 1995, **269**(5230):1585-1588.
259. Singh-Jasuja H, Scherer HU, Hilf N, Arnold-Schild D, Rammensee HG, Toes RE, Schild H: **The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor.** *Eur J Immunol* 2000, **30**(8):2211-2215.
260. Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, Srivastava PK: **CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin.** *Immunity* 2001, **14**(3):303-313.
261. Castellano F, Montcourrier P, Chavrier P: **Membrane recruitment of Rac1 triggers phagocytosis.** *J Cell Sci* 2000, **113** (Pt 17):2955-2961.
262. Basu S, Srivastava PK: **Fever-like temperature induces maturation of dendritic cells through induction of hsp90.** *Int Immunol* 2003, **15**(9):1053-1061.
263. Panjwani NN, Popova L, Srivastava PK: **Heat shock proteins gp96 and hsp70 activate the release of nitric oxide by APCs.** *J Immunol* 2002, **168**(6):2997-3003.
264. Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK: **Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway.** *Int Immunol* 2000, **12**(11):1539-1546.
265. Skeiky YA, Benson DR, Guderian JA, Whittle JA, Bacelar O, Carvalho EM, Reed SG: **Immune responses of leishmaniasis patients to heat shock proteins of Leishmania species and humans.** *Infect Immun* 1995, **63**(10):4105-4114.
266. Srivastava PK, Udono H: **Heat shock protein-peptide complexes in cancer immunotherapy.** *Curr Opin Immunol* 1994, **6**(5):728-732.
267. Kol A, Lichtman AH, Finberg RW, Libby P, Kurt-Jones EA: **Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells.** *J Immunol* 2000, **164**(1):13-17.
268. Verdegaal ME, Zegveld ST, van Furth R: **Heat shock protein 65 induces CD62e, CD106, and CD54 on cultured human endothelial cells and increases their adhesiveness for monocytes and granulocytes.** *J Immunol* 1996, **157**(1):369-376.
269. Rico AI, Angel SO, Alonso C, Requena JM: **Immunostimulatory properties of the Leishmania infantum heat shock proteins HSP70 and HSP83.** *Mol Immunol* 1999, **36**(17):1131-1139.
270. Huang Q, Richmond JF, Suzue K, Eisen HN, Young RA: **In vivo cytotoxic T lymphocyte elicitation by mycobacterial heat shock protein 70 fusion proteins maps to a discrete domain and is CD4(+) T cell independent.** *J Exp Med* 2000, **191**(2):403-408.
271. Moroi Y, Mayhew M, Trcka J, Hoe MH, Takechi Y, Hartl FU, Rothman JE, Houghton AN: **Induction of cellular immunity by immunization with novel hybrid peptides complexed to heat shock protein 70.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**(7):3485-3490.
272. Dyall R, Vasovic LV, Molano A, Nikolic-Zugic J: **CD4-independent in vivo priming of murine CTL by optimal MHC class I-restricted peptides derived from intracellular pathogens.** *Int Immunol* 1995, **7**(8):1205-1212.
273. Suzue K, Young RA: **Adjuvant-free hsp70 fusion protein system elicits humoral and cellular immune responses to HIV-1 p24.** *J Immunol* 1996, **156**(2):873-879.
274. Rico AI, Del Real G, Soto M, Quijada L, Martinez AC, Alonso C, Requena JM: **Characterization of the immunostimulatory properties of Leishmania infantum HSP70**

- by fusion to the *Escherichia coli* maltose-binding protein in normal and nu/nu BALB/c mice. *Infect Immun* 1998, **66**(1):347-352.
275. Echeverria P, Dran G, Pereda G, Rico AI, Requena JM, Alonso C, Guarnera E, Angel SO: **Analysis of the adjuvant effect of recombinant *Leishmania infantum* Hsp83 protein as a tool for vaccination.** *Immunol Lett* 2001, **76**(2):107-110.
276. Gazzinelli RT, Hakim FT, Hieny S, Shearer GM, Sher A: **Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine.** *J Immunol* 1991, **146**(1):286-292.
277. Gazzinelli RT, Hayashi S, Wysocka M, Carrera L, Kuhn R, Muller W, Roberge F, Trinchieri G, Sher A: **Role of IL-12 in the initiation of cell mediated immunity by *Toxoplasma gondii* and its regulation by IL-10 and nitric oxide.** *J Eukaryot Microbiol* 1994, **41**(5):9S.
278. Khan IA, Ely KH, Kasper LH: **Antigen-specific CD8+ T cell clone protects against acute *Toxoplasma gondii* infection in mice.** *J Immunol* 1994, **152**(4):1856-1860.
279. Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, Remington JS: **Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*.** *Science* 1988, **240**(4851):516-518.