



03081 11
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONAL Y DE POSGRADO
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

**“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE
LA PIRUVATO FOSFATO DICINASA
RECOMBINANTE DE
Entamoeba histolytica”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
**DOCTORA EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA BÁSICA**
P R E S E N T A :
M. EN I.B.B.
EMMA CECILIA SAAVEDRA LIRA

MEXICO D.F. 1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAGINACION VARIA

COMPLETA LA INFORMACION

DEDICATORIA

A mis padres, con mucho amor, por darme ese apoyo incondicional que solamente ellos saben darlo, por su entusiasmo porque siga en este camino, sé que siempre contaré con ustedes.

A mis hermanos, por su cariño y comprensión hacia su hermana menor.

A mis amigos - "Lo que deslumbra vive un solo instante; lo que es bueno de veras, permanece intacto para la posteridad". Fausto. Goethe.

A Salvador, por hacerme sonreír de nuevo.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se realizó en el Departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, bajo la dirección del Dr. Ruy Pérez Montfort y la Dra. Leticia Ramírez Silva.

Agradezco al Dr. Pérez Montfort el haberme permitido desarrollar mi proyecto de maestría y doctorado en su laboratorio y permitirme colaborar en otros proyectos.

Al comité revisor de esta tesis, por el tiempo dedicado en ella y por las valiosas sugerencias que me hicieron para su mejoramiento. Al Dr. Benjamín Ortiz, por haberme proporcionado y ayudado a sintetizar algunos de los bifosfonatos. Al Dr. Juan Pedro Lacleite por su ayuda en todos los trámites relacionados con este campo.

Agradezco a la Biol. Nallely Cabrera por su asesoría técnica.

Muchas Gracias a Lety, por ayudarme en la parte de cinética.

Mil gracias a muchas personas que siento cerca de mí en muchos aspectos y que siempre aprendo de ellas: Nagely, Lorena, Octavio, Rosalinda, Gloria, Ma. Elena, Lino, Toño, Laurita, Lai y muchas más, aquellas que hemos caminado juntos en algún momento por esta vida. A Fabián, porque en el poco tiempo que nos hemos conocido me ha enseñado nuevas formas de ver las cosas.

A las autoridades académicas del IFC y a la DGAPA-UNAM por haberme otorgado una beca para la realización de mis estudios.

RESUMEN

El parásito *Entamoeba histolytica* es un organismo cuya fuente principal de energía en forma de ATP proviene de la glucólisis. Este organismo tiene la singularidad de que varias de las enzimas involucradas en la glucólisis utilizan pirofosfato (PPi) como donador de grupos fosfato a varios intermediarios glucolíticos. Posee una fosfofructocinasa dependiente de PPi además de otra enzima que utiliza PPi y que sintetiza ATP; la piruvato fosfato dicinasa (PFDK) que sustituye a la piruvato cinasa ausente en el trofozoito. La PFDK transfiere reversiblemente el grupo fosfato del fosfoenolpiruvato (PEP) y un grupo fosfato del PPi al AMP, dando lugar a los fosfatos β y γ del ATP, respectivamente. La PFDK amibiana (EhPFDK) fue descrita por Reeves en 1968 y debido a su importancia en la generación de energía del parásito, clonamos y secuenciamos el gene que la codifica (*Gene*.142:249-251, 1994).

Este trabajo de investigación se enfocó hacia la caracterización funcional de la EhPFDK, por lo que la proteína se sobreexpresó en *E. coli*, se estableció un esquema de purificación y se determinaron sus propiedades cinéticas y estructurales. Así mismo, se inició el estudio del perfil de inhibición con análogos del PPi.

A partir de dos clones aisladas de una biblioteca genómica que contenían secuencias del gene de la EhPFDK, se reconstruyó el marco de lectura abierto por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El fragmento amplificado se clonó en el vector de expresión pET23b que permite la expresión de la proteína con un segmento de polihistidinas en el extremo carboxilo-terminal. Con este plásmido se transformó *E. coli* y la expresión de la proteína se indujo en cultivo por la adición de isopropil tio galactósido (IPTG). La enzima se purificó por cromatografía de afinidad usando Ni^{2+} para unir las histidinas del carboxilo terminal. Con esta estrategia se obtuvieron muestras con una pureza de aprox. 98% y actividades específicas entre 10-13 $\mu\text{moles}/(\text{min}\times\text{mg})$ (un valor mayor que el que obtuvo Reeves en 1968 de 0.084 $\mu\text{moles}/(\text{min}\times\text{mg})$) y de 4-5 mg de proteína de un cultivo de 250 ml. Las constantes de Michaelis para el PEP, AMP y PPi fueron 21, < 5 y 100 μM , respectivamente, que están en el mismo orden que el descrito para otras PFDKs. Se determinó un pH óptimo de 6 y

el comportamiento de la proteína en cromatografía de filtración molecular sugiere que la enzima tiene una estructura tetramérica, similar a las enzimas de maíz y *Giardia lamblia* y diferente a la enzima de *Bacteroides symbiosus*, que es un dímero. La EhPPDK requiere Mg^{2+} para su actividad y no requiere catión monovalente, un hecho diferente al que se ha descrito para otras PPDKs y la piruvato cinasa, las cuales requieren cationes monovalentes para su actividad.

Ya que la EhPPDK es una enzima que depende de PPI para su actividad y es particular de parásitos protoctistas, se ensayó el efecto de 10 análogos del PPI que se caracterizan por tener un enlace fósforo-carbono-fósforo (P-C-P) no hidrolizable y un grupo sustituyente variable unido al carbono. Encontramos que el análogo CGP48084 es el compuesto más potente, con una K_i de $67 \mu M$. Se ha determinado que este compuesto también tiene un efecto inhibitorio del crecimiento de trofozoitos en cultivo. Sería interesante evaluar otros compuestos que varían en los grupos químicos unidos al carbono central de la molécula.

El estudio de la PPDK de organismos parásitos es de particular interés porque la enzima no tiene contraparte en el hospedero humano y tiene un mecanismo catalítico diferente al de la piruvato cinasa. Esta caracterización inicial de las propiedades de la EhPPDK puede ser la base para iniciar estudios con fines terapéuticos.

ABSTRACT

The parasite *Entamoeba histolytica* is an organism whose main energetic source comes from glycolysis. It has the singularity that several of its glycolytic enzymes use pyrophosphate (PPi) as an alternative phosphate donor to glycolytic intermediates. It has a PPi-dependent phosphofructokinase and another PPi-dependent enzyme, pyruvate phosphate dikinase (PPDK) which replaces the pyruvate kinase present in other organisms. PPDK reversibly transfers the phosphate group from phosphoenolpyruvate (PEP) and one phosphate group from PPi to AMP giving rise to the β and γ phosphates from the ATP, respectively. The enzyme was first described by Reeves in 1968. Recently we cloned and sequenced the gene that codes for the enzyme (EhPPDK) (*Gene*.142:249-251, 1994).

Because of its role in the generation of energy (ATP) for the parasite, this work describes the functional characterization of EhPPDK. We overexpressed the gene in *E. coli*, purified the enzyme and determined its kinetic and structural properties. We also initiated the study of the inhibitory profile with pyrophosphate analogs.

Previously, we isolated two genomic clones containing sequences of the EhPPDK gene. The complete reading frame was reconstructed by the polymerase chain reaction (PCR) technique and was sequenced completely to ascertain that no mutations had been introduced during amplification reaction. The amplified fragment was cloned into the pET23b expression vector, which allowed the expression of the enzyme fused to a carboxy-terminal sequence of polyhistidine and this plasmid was used to transform competent cells from the *E. coli* strain BL21DE3pLysS. The expression was induced by adding isopropyl β thio galactoside (IPTG) to a final concentration of 0.4 mM to a cell culture grown to an O.D._{600nm} of 1. The enzyme was purified by metal affinity chromatography using Ni²⁺ to bind the terminal poly-histidine of recombinant EhPPDK. With this strategy we obtained samples with a purity of approx. 98%, specific activities between 10-13 μ moles/(min \times mg) (higher than that obtained by Reeves 0.084 μ moles/(min \times mg)) and 4-5 mg of protein from a 250ml culture. The Michaelis constants

of EhPPDK for PEP, AMP and PPi were determined: 21, <5 and 100 μM respectively. These values are in the same range described for PFDKs from other sources. We also studied the activity profile at different pH and determined an optimum pH of 6. By molecular filtration in Sephacryl columns we found that the enzyme has a tetrameric arrangement, similar to PFDK from maize and *Giardia lamblia*, but different from bacterial PFDK which is a dimer. EhPPDK requires Mg^{2+} for activity besides to that bound to the nucleotide, and it has a K_{app} of 2.1 mM. It has been described that PFDK from bacteria and maize requires monovalent cations for activity while pyruvate kinase has a strict requirement for K^+ , however, we did not find requirement for these cations in EhPPDK.

Since EhPPDK is a PPi-dependent enzyme, we tested the effect of 10 different bisphosphonates, which are non-hydrolyzable PPi analogs. They differ in the number of carbon atoms bound to the phosphorus-carbon-phosphorus (P-C-P) bond. We found that compound CGP 48084 is a potent inhibitor of PFDK activity. The K_i obtained from plots of $(K_m/V_{\text{max}})_{\text{app}}$ against inhibitor concentration was 67 μM , less than the K_m for PPi. This compound is also able to inhibit asexual growth in culture by 50% at a concentration of 38 μM . It would be interesting to evaluate other analogs that differ in other properties of the chemical substituents to improve the inhibitory effect.

The study of PFDK of parasitic organisms is of particular interest because the enzyme has no counterpart in the human host and has a different catalytic mechanism than pyruvate kinase. This initial characterization of the properties of recombinant EhPPDK could be a starting point for new therapeutic research.

ABREVIATURAS

Acetil-CoA	Acetil-Coenzima A
ADP	Difosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
Arg	Arginina
ATP	Trifosfato de adenosina
ATP-PFK I	Fosfofructocinasa I dependiente de ATP
DNA	Acido desoxirribonucleico
rDNA	DNA que codifica para el RNA ribosomal
EhPFDK	Piruvato fosfato dicitinasa de <i>Entamoeba histolytica</i>
FAD	Dinucleótido de flavina y adenina
FMN	Mononucleótido de flavina
His	Histidina
kDa	kiloDaltonnes
K_m	Constante de Michaelis
K_i	Constante de inhibición
NADP	Fosfato del dinucleótido de nicotinamida y adenina
NADPH	Fosfato del dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida)
PEP	Fosfoenolpiruvato
Pi	Fosfato inorgánico
PPi	Pirofosfato
PPi-PFK	Fosfofructocinasa dependiente de pirofosfato
PFDK	Piruvato Fosfato Dicitinasa
Pir	Piruvato
RNA	Acido Ribonucleico
mRNA	RNA mensajero

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Amibiasis: perspectiva general	1
I.2 Características generales de <i>Entamoeba histolytica</i>	1
I.3 El metabolismo energético en <i>E. histolytica</i>	4
I.4 Metabolismo de la glucosa y enzimas dependientes de pirofosfato.....	7
1.5 Propiedades de la Piruvato Fosfato Dicinaasa	
1.5.1 Antecedentes.....	11
1.5.2 Propiedades	
Mecanismo de reacción.....	13
Propiedades estructurales.....	14
Propiedades bioquímicas.....	17
I.6 Tratamiento Actual de la Amibiasis.....	18
I.7 El uso de bifosfonatos para inhibir enzimas dependientes de pirofosfato.....	18
II. OBJETIVOS	21
III. METODOLOGÍA	22
IV. RESULTADOS	25
V. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES	28
PERSPECTIVAS	34
REFERENCIAS	35
APÉNDICE	41

I INTRODUCCIÓN

I.1 Amibiasis. Perspectiva General

La amibiasis es la enfermedad humana causada por el parásito protoctista *Entamoeba histolytica*. Este organismo puede vivir como comensal en el lumen del intestino grueso, sin embargo, en el estado patológico puede invadir la mucosa intestinal produciendo disentería y en estadios más avanzados de la enfermedad invade órganos distantes como el hígado, causando abceso hepático, una de las principales causas de muerte por amibiasis (Ravdin, 1988; Martínez-Palomo, 1982).

Esta enfermedad afecta principalmente a poblaciones subalimentadas que viven en condiciones sanitarias precarias y que carecen de una adecuada instrucción en higiene, por lo que es un padecimiento que se ha asociado a la pobreza e ignorancia (Sepúlveda, 1982; Walsh, 1988). En México, se encuentra entre las diez causas principales de muerte, por lo que en nuestro país un gran número de investigaciones en parasitología se han enfocado a su estudio.

Un aspecto importante es conocer los factores que le confieren patogenicidad a este organismo así como determinar las relaciones que se establecen en la interacción hospedero humano-parásito. Asimismo es de suma relevancia conocer la biología celular del parásito, en sus aspectos funcionales y estructurales para llegar a un mejor entendimiento de la enfermedad.

I.2 Características generales de *Entamoeba histolytica*

E. histolytica es un organismo unicelular que presenta dos estadios: el trofozoito, que es la fase móvil e invasiva, y una forma inmóvil, transmisora de la enfermedad que es el quiste. Se han realizado pocos estudios con el quiste ya

que no existe un modelo experimental para su obtención; la mayor parte de la información se refiere a la fase de trofozoito.

Se han escrito diversas revisiones sobre la bioquímica y morfología funcional de *E. histolytica* (McLaughlin y Aley, 1985; Weinbach, 1988; Saavedra-Lira y Pérez-Montfort, 1996, Apéndice) además de otras en las que se trata el metabolismo de parásitos que carecen de mitocondrias (Weinbach, 1981; Müller, 1988; Müller, 1992; Mertens, 1993).

La amiba ha sido considerada como un modelo de una célula eucariótica "primitiva" (Meza, 1992; Bakker-Grunwald y Wöstmann, 1993). La característica más evidente observada en estudios de microscopía electrónica es la ausencia de estructuras subcelulares típicamente eucariontes como son organelos membranosos, llámense mitocondrias, aparato de Golgi o peroxisomas (Martínez-Palomo, 1982). Aparte del núcleo, las estructuras más conspicuas son las vesículas. La tabla I resume algunas características relevantes de este parásito que lo hacen interesante como modelo de estudio.

TABLA I

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *Entamoeba histolytica*.**Morfología**

- Ausencia de mitocondrias y peroxisomas
- Aparato de Golgi subdesarrollado
- Numerosas vacuolas y vesículas

Compartimentalización funcional

- Falta de diferenciación entre vacuolas digestivas y vesículas secretoras constitutivas
- Comunicación estocástica y no restringida entre membrana plasmática y vacuolas digestivas
- Enzimas digestivas unidas a la membrana
- Bomba de protones de tipo vacuolar en la membrana plasmática

Metabolismo y proteínas

- Falta de regulación alostérica en la glucólisis
- Cinzas dependientes de pirofosfato
- Piruvato:ferredoxina oxidoreductasa / ferredoxina citoplásmica
- Ausencia del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, proteínas hémicas y vía de las pentosas
- Ausencia de vía biosintética del glutatión
- Actina altamente divergente
- Sistema de ubiquitina subdesarrollado
- Ubiquitina altamente divergente

Organización del DNA y RNA

- Ausencia de intrones en la mayoría de los genes secuenciados
- Cromatina estructurada en forma poco usual y ausencia de histonas convencionales
- rDNA en plásmidos extracromosómicos circulares.
- Extremos 5' no traducidos en los mRNAs extremadamente cortos.

* tomado de Bakker-Grunwald y Westmann, 1993.

1.3 Metabolismo energético.

Como se puede observar en la tabla I, a nivel funcional la ameba también se aparta de las características de una célula eucariótica típica ya que carece de un ciclo de Krebs funcional y una cadena de transporte de electrones típica, por lo que la mayor parte del ATP que se produce en la célula proviene de la degradación de la glucosa a piruvato por la vía de Embden-Meyerhof.

Existen dos diferencias significativas que distinguen a este parásito de su hospedero: la falta de una lactato deshidrogenasa (el lactato no es un producto final de la glucólisis, los productos finales son etanol, acetato y CO_2) y el uso del pirofosfato inorgánico (PPI) como donador alternativo de grupos fosfato a intermediarios en la vía de degradación de la glucosa (Reeves, 1976). En el parásito la concentración de PPI intracelular se encuentra alrededor de 0.2 mM, la cual está por arriba de la K_m de las enzimas dependientes de PPI, por lo que este compuesto tiene relevancia fisiológica (Reeves, 1976; Wood, 1977). La tabla II muestra las enzimas dependientes de PPI. La Figura 1 muestra el catabolismo de la glucosa en *E. histolytica* y se indican las enzimas dependientes de PPI.

TABLA II

Reacciones dependientes de nucleótido y correspondientes reacciones dependientes de piruvato en *E. histolytica**.

Reacciones clásicas dependientes de NTP	Reacciones dependientes de PPI.
ATP + Fru-6-P → Fru-1,6-P ₂ + ADP <i>Fosfofructocinasa I dependiente de ATP</i>	PPi + Fru-6-P ↔ Fru-1,6-P ₂ + Pi <i>Fosfofructocinasa dependiente de PPI</i>
PEP + ADP → piruvato + ATP <i>Piruvato cinasa</i>	PEP + AMP + PPi ↔ piruvato + ATP + Pi <i>Piruvato fosfato dicinasa</i>
PEP + GDP + CO ₂ ↔ oxaloacetato + GTP <i>PEP carboxicinas</i>	PEP + Pi + CO ₂ ↔ oxaloacetato + PPi <i>PEP carboxitransfosforilasa</i>
Acetil-P + ADP ↔ acetato + ATP <i>Acetato cinasa</i>	Acetil-P + Pi → acetato + PPi <i>PPi- acetato cinasa</i>

* tomado de Mertens, 1993

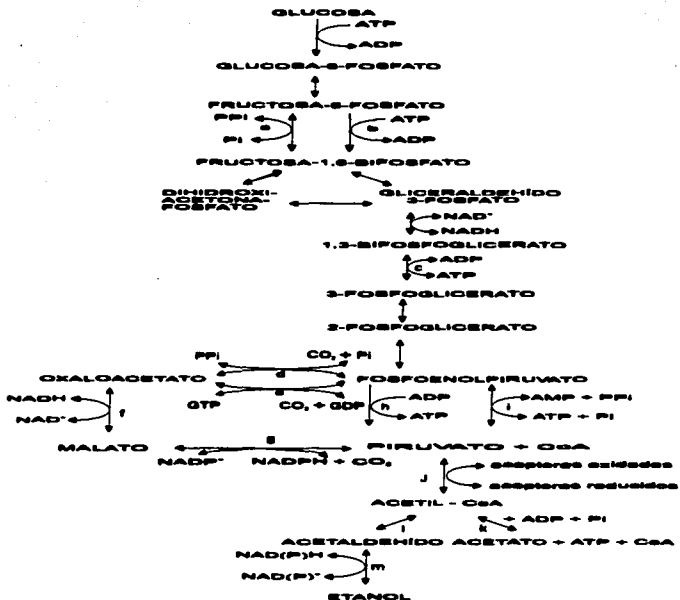


Fig. 1 Metabolismo de los carbohidratos en *Entamoeba histolytica* (tomado de Saavedra-Lira y Pérez-Montfort, 1996 Apéndice)

a) fosfofructocinasa dependiente de P_i ; b) fosfofructocinasa dependiente de ATP^* ; c) cinasa del fosfoglicerato; d) PEP carboxitransfosforilasa; e) PEP carboxicinas*; f) malato deshidrogenasa; g) malato deshidrogenasa (descarboxilante); h) piruvato acetocinasa*; i) piruvato fosfato cinasa; j) piruvato:ferredoxina oxidoreductasa; k) acetato tiocinasa; l) acetaldehído deshidrogenasa; m) alcohol deshidrogenasa.

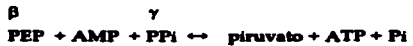
*Enzimas que catalizan reacciones dependientes de nucleótido ausentes en ameba.

1.4 Metabolismo de la glucosa y enzimas dependientes de pirofosfato

Los productos principales de la degradación de la glucosa en la ameba son etanol, acetato y CO_2 ; dependiendo del grado de aerobiosis: los tres son producidos en aerobiosis, con una relación etanol/acetato de uno a tres, mientras que en anaerobiosis únicamente se forman etanol y CO_2 (Montalvo *et al*, 1971; Weinbach y Diamond, 1974).

La entrada de glucosa a la célula se lleva a cabo a través de un mecanismo de transporte específico (Serrano y Reeves, 1974) y aparentemente este es el paso limitante en la utilización de glucosa, ya que no se han descrito mecanismos reguladores de la glucólisis. En la mayoría de las células la formación de fructosa 1-6 bifosfato está catalizada por una fosofrufructocinasa dependiente de ATP (ATP-PFK I) en una reacción irreversible que es un punto de regulación alostérica de la glucólisis. Sin embargo, en parásitos como *E. histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, *Tritrichomonas foetus*, *Giardia lamblia*, *Toxoplasma gondii* y *Nargleria fowleri*, además de otros protoctistas no parásitos, este paso es catalizado por una fosofrufructocinasa dependiente de pirofosfato (PPi-PFK) en una reacción reversible, que aparentemente no tiene una función reguladora en la ameba (Reeves *et al*, 1974; Reeves *et al*, 1976; Mertens, 1993).

Otro punto de regulación glucolítica se encuentra en la transformación del fosfoenolpiruvato (PEP) a piruvato, con síntesis de una molécula de ATP. Esta reacción es catalizada por la enzima piruvato cinasa en la mayoría de las células. En 1968, Hatch y Slack en plantas y Reeves en *E. histolytica*, reportaron la purificación de una enzima que denominaron piruvato fosfato dicinasa (PPDK) que cataliza una reacción similar a la piruvato cinasa, es decir la conversión de PEP a piruvato en amebas y la reacción inversa en plantas. La reacción es la siguiente (Reeves *et al*, 1968):



La enzima transfiere el grupo fosfato del PEP y un grupo fosfato del PPI al AMP, dando lugar a los fosfatos β y γ del ATP, respectivamente.

Se determinó que esta reacción es completamente reversible, la enzima tiene una estricta dependencia de PPI en lugar de ATP como donador de grupos fosfato y prefiere el AMP, en lugar del ADF, como sustrato a fosforilar. Posteriormente se mencionarán las propiedades catalíticas y estructurales de la PFDK, que es el motivo de este trabajo de investigación.

Existe una ruta alternativa para la formación de piruvato a partir de PEP a través de la acción de otra enzima dependiente de PPI: una PPI-PEP carboxitransfosforilasa (Tabla I, Figura 1) la cual fija una molécula de CO_2 y produce una molécula de PPI y oxaloacetato. Este último es reducido a malato por una malato deshidrogenasa, con la oxidación de una molécula de NADH. El malato es posteriormente descarboxilado y oxidado por una enzima málica, con la reducción de una molécula de NADP^+ (Fig. 1). Esta ruta alternativa se ha postulado como un mecanismo por el cual la amiba regenera el NAD^+ reducido glucolíticamente en condiciones aeróbicas, a través de una transhidrogenación del NADH al NADPH (McLaughlin y Aley, 1985).

Metabolismo del piruvato

E. histolytica carece del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, por lo que el piruvato juega en este punto un papel muy importante en la formación de los productos finales del metabolismo de los carbohidratos.

La descarboxilación oxidativa de piruvato a acetil-CoA es catalizada por un piruvato: ferredoxina oxidorreductasa, la cual fue purificada y caracterizada (Takeuchi *et al*, 1975; Reeves *et al*, 1977). Esta enzima es sensible a oxígeno y utiliza como aceptores de electrones la proteína Fe-S ferredoxina, FMN, FAD ó riboflavina, pero no NAD^+ ó NADP^+ . La reacción es reversible, por lo que también se le ha denominado a este complejo piruvato sintetasa (Fig. 1) (Reeves *et al*, 1977). Se ha postulado que los genes de ameba que codifican para esta enzima y para la alcohol deshidrogenasa (enzimas involucradas en la fermentación) probablemente derivan de genes bacterianos que se transfirieron al genoma amibiano a lo largo de la evolución (Rosenthal *et al*, 1997).

Un aspecto interesante es que el grupo de los derivados del 5-nitroimidazol actúan como aceptores alternativos de las reacciones mediadas por la ferredoxina. Este tipo de compuestos incluye al metronidazol, el cual se utiliza ampliamente en infecciones producidas por protoctistas o bacterias y poseen actividad citotóxica cuando se reduce su grupo nitró. En protoctistas anaeróbicos, la ferredoxina reducida por la reacción de la piruvato:ferredoxina oxidorreductasa es el donador de electrones a ése grupo reactivo de los nitroimidazoles, lo que los hace reactivos en su actividad como antiparasítico (Müller, 1986).

El acetil-CoA puede dar lugar a acetato por una acetato tlocinasa más o menos específica para nucleótidos de adenina (Reeves *et al*, 1977) con la síntesis de una molécula de ATP, que puede proveer de energía adicional a la producción en la glucólisis (Fig. 1). Además, *E. histolytica* contiene una acetato cinasa dependiente de PPI (la cuarta enzima con esta peculiaridad) para la cual no se ha determinado exactamente su función (Reeves y Guthrie, 1975).

Alternativamente, el acetil-CoA se transforma a etanol a través de su conversión a un tiohemiacetal unido a la enzima acetaldehído

dehidrogenasa, el cual es reducido a etanol por una alcohol dehidrogenasa dependiente de NADH (Lo y Reeves, 1978; Lo y Chang, 1982).

Aparentemente, el NADH reducido glucolíticamente puede ser reoxidado en las reacciones asociadas a la formación de etanol, y así, la trahidrogenación del NADH al NADPH en la formación de piruvato a partir de PEP puede parecer fútil. Sin embargo en aerobiosis, donde se forma acetato, la reoxidación del NADH puede verse disminuida, por lo que dicha ruta puede ser un medio adicional para regenerar NAD^+ y formar NADPH. Este último puede donar sus equivalentes reductores a una flavina, por medio de una NADP^+ -flavina oxidorreductasa (Lo y Reeves, 1980).

Weinbach (1988) propuso un esquema del flujo de electrones desde sustratos reducidos al $\text{NAD}^+(\text{P}^+)$, a flavinas, posteriormente a una proteína hierro-azufre similar a la ferredoxina, seguida por ubiquinona y después a un aceptor desconocido que posee un potencial electro negativo similar al del citocromo c. El aceptor de electrones final es oxígeno molecular, el cual es reducido a agua. Hay que hacer notar que la función de esta ruta "aeróbica" en la generación de energía de este parásito no es muy clara. A pesar de que se ha detectado ubiquinona en *E. histolytica* (un organismo carente de mitocondrias) los niveles de este componente de la cadena respiratoria son 5 a 50 veces menores que los detectados en otros protoctistas típicamente aeróbicos (Ellis, 1994; Ellis *et al*, 1994).

1.5 Propiedades de la Piruvato Fosfato Dikinasa

1.5.1 Antecedentes

La PFDK se describió por primera vez en 1968 en organismos tan distantes filogenéticamente como son el maíz y *E. histolytica* (Hatch y Slack, 1968; Reeves, 1968).

Hatch y Slack propusieron la ruta para la fijación de CO_2 en plantas de climas calurocos que sirve para concentrar el CO_2 atmosférico al sitio de la Rubisco, suprimiendo de esta manera su actividad de oxigenasa y evitando así la fotorespiración, haciendo a este tipo de plantas más eficientes. En esta vía el CO_2 es hidratado en el citoplasma de una célula mesófila por la acción de una anhidrasa carbónica. Posteriormente este es condensado a una molécula de PEP para producir oxaloacetato que se transporta al cloroplasto en donde es reducido a malato. El malato es transportado al cloroplasto de una célula túncico-vascular y ahí es descarboxilado por una enzima málica para formar piruvato y CO_2 . Para completar el ciclo, el piruvato es transportado de regreso al cloroplasto de la célula mesófila y ahí es fosforilado por la PFDK para regenerar el PEP que se utiliza en las primeras reacciones (Hatch y Slack, 1968; Ku et al, 1996). Es interesante notar que la ruta alternativa para la formación de PEP en amibas es similar a esta ruta (Fig. 1). La PFDK de plantas ha sido ampliamente estudiada desde un punto de vista biotecnológico y genético con el propósito de hacer más productivas especies de plantas de interés económico (Rosche y Westhoff, 1990; Matsuoka, 1990; Matsuoka, 1995; Ku et al, 1996).

Reeves en el mismo año (1968) publicó la purificación parcial de la PFDK de *E. histolytica*. No se ha detectado actividad de piruvato cinasa en trofozoitos de amiba y entonces la PFDK sustituye esa función; sin

embargo, a diferencia de la piruvato cinasa que utiliza al ADP como aceptor del grupo fosfato del PEP, la PFDK cataliza una doble fosforilación del AMP: el fosfato en la posición β del ATP que se sintetiza proviene del PEP y el fosfato y proviene de una molécula de PPI (Reeves *et al*, 1968). Se han descrito PFDKs en *Bacteroides symbiosus*, de la cual existe bastante información sobre el mecanismo de reacción así como de sus propiedades catalíticas y estructurales (Reeves, 1971; Wang *et al*, 1988; Pocalyko *et al*, 1990; Herzberg *et al*, 1996). También se ha reportado la purificación y caracterización de la PFDK de *Giardia lamblia* (Hrdý *et al*, 1993) y se ha reportado la clonación y secuenciación del gene que la codifica (Nevalainen *et al*, 1996; Bruderer *et al*, 1996).

Nosotros reportamos la clonación y secuenciación del gene que codifica para la enzima de *E. histolytica* (Saavedra-Lira y Pérez-Montfort, 1994; páginas siguientes). El análisis de la secuencia de aminoácidos demostró un porcentaje de similitud de alrededor del 50% con las PFDKs de maíz, *B. symbiosus* y *Flaveria trinervis*. También se detectaron regiones altamente conservadas que actualmente se sabe que están involucradas en la unión de sustratos.

GENE 07839

Cloning and sequence determination of the gene coding for the pyruvate phosphate dikinase of *Entamoeba histolytica**

(Carbohydrate metabolism; protozoan; parasite)

Emma Saavedra-Lira and Ruy Pérez-Montfort

Departamento de Microbiología, Instituto de Fisiología Celular, UNAM 04510 México D.F., México

Received by F. Bolívar: 19 November 1993; Revised/Accepted: 5 December/6 December 1993; Received at publishers: 24 January 1994

ABSTRACT

We isolated three overlapping clones from a DNA genomic library of *Entamoeba histolytica* strain HM1:IMSS, whose translated nucleotide (nt) sequence shows similarities of 51, 48 and 47% with the amino acid (aa) sequences reported for the pyruvate phosphate dikinases from *Bacteroides symbiosus*, maize and *Flaveria trinervia*, respectively. The reading frame determined codes for a protein of 886 aa.

INTRODUCTION

Carbohydrate metabolism of *Entamoeba histolytica* shares some peculiarities with that of other parasitic protozoa. In these organisms, key enzymes of the glycolytic pathway like phosphofructokinase or pyruvate kinase, are replaced by enzymes that use inorganic pyrophosphate (PP_i) instead of adenosine 5'-triphosphate (ATP), as a donor of phosphate groups (Mertens, 1993). Pyruvate kinase activity has not been found in *E. histolytica*, but Reeves (1968) reported the purification of an enzyme that catalyses the formation of ATP from phosphoenolpyruvate (PEP), with a mechanism of double phosphorylation strictly dependent on PP_i and adenosine

5'-monophosphate (AMP). In this case the phosphate group from PEP and one phosphate group from PP_i are transferred to the β and γ positions of AMP, respectively. This enzyme was named pyruvate phosphate dikinase (PPDK).

In a previous work we have reported the identification of a clone from a library of DNA complementary to RNA (cDNA) of *E. histolytica* strain HM1:IMSS, whose sequence corresponds to approx. 20% of the gene encoding PPDK (Saavedra-Lira et al., 1992).

EXPERIMENTAL AND DISCUSSION

(a) Sequencing

To determine the complete sequence of the gene, we screened a genomic library of *E. histolytica* strain HM1:IMSS constructed in λ ZAP (Short et al., 1988) using this cDNA clone as a probe. With this strategy we isolated three overlapping clones whose 3033-nt sequence (Fig. 1) contains an open reading frame for a protein of 886 aa, with a calculated M_r of 97 899.

(b) Protein homologies

The corresponding aa sequence was compared with the SwissProt (release 25) and NBRF/PIR (release 30) data

Correspondence to: Dr. R. Pérez-Montfort, Departamento de Microbiología, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apdo. Postal 70242, 04510 México D.F., México. Tel. (52-51) 622-5637; Fax (52-51) 622-5630; e-mail: rmontfor@fisicun1.instito.unam.mx

*On request, the authors will supply detailed experimental evidence for the conclusions reached in this Short Communication.

Abbreviations: aa, amino acids; AMP, adenosine 5'-monophosphate; ATP, adenosine 5'-triphosphate; bp, base pairs; cDNA, DNA complementary to RNA; *E. Entamoeba*; kb, kilobase(s) or 1000 bp; nt, nucleotide(s); PEP, phosphoenolpyruvate; PPDK, pyruvate phosphate dikinase; PPDK_i, gene encoding PPDK; PP_i, inorganic pyrophosphate; SSC, 0.15 M NaCl 0.015 M Na₂ citrate pH 7.6.

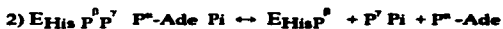
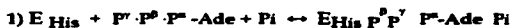
1.5.2. Propiedades de la PFDK

Mecanismo de reacción

Se han reportado las propiedades de varias PFDKs (South y Reeves, 1975; Benziman, 1975; Milner *et al.*, 1975; Hatch y Slack, 1975; Edwards *et al.*, 1985).

Como se ha mencionado anteriormente, la PFDK cataliza la síntesis de ATP a partir de AMP, PEP y PPI. La reacción está favorecida en esta dirección a pH 7.0 y es en este sentido como funciona en parásitos y bacterias. En plantas, la reacción funciona hacia la síntesis de PEP y está favorecida por la presencia de altas concentraciones de pirofosfatasa y adenilato cinasas en plantas (Edwards *et al.*, 1985).

La reacción tiene lugar en tres pasos químicos e involucra la formación de un intermediario enzima-PPI y otro enzima-P. El grupo aceptor de los grupos fosfato es una histidina (His) que se presenta en el sitio activo de la enzima. El esquema de la reacción es el siguiente (Evans y Wood, 1968; Wang *et al.*, 1988; Carroll *et al.*, 1990; Thrall *et al.*, 1993):



Por estudios cinéticos se sabe que la reacción puede dividirse en dos reacciones parciales: el paso 1 y 2 comprende lo que se denomina la reacción parcial del nucleótido mientras que el paso 3 comprende la reacción parcial con el piruvato (Wang *et al.*, 1988; Thrall y Dunaway-Mariano, 1994). Cada una de las reacciones parciales pueden llevarse a cabo independientemente de que se realice

la otra y este hecho está relacionado con la estructura tridimensional de la proteína.

Propiedades estructurales

El mecanismo de reacción caracterizado por la identificación de dos reacciones parciales con el nucleótido y con el piruvato (pir)/PEP llevó a la postulación desde muy temprano de que la enzima estaba arreglada en dominios estructurales y funcionales independientes, cada uno responsable de llevar a cabo las reacciones parciales. Esta proposición fue apoyada recientemente por estudios de protólisis (Carroll *et al*, 1994) y por estudios con mutantes en las que se eliminó cada uno de los dominios estructurales por separado. En este caso las proteínas pudieron catalizar las reacciones correspondientes en el dominio que se conservaba (Xu *et al*, 1995b).

La PPDK de *B. symbiosus* se cristalizó y la estructura tridimensional se resolvió a una resolución de 2.3 Å (Herzberg *et al*, 1996) (Fig 2). La estructura demostró que cada subunidad del dímero consiste de 3 dominios estructurales, en el que el dominio en donde se encuentra la histidina catalítica está flanqueado por el dominio de unión del nucleótido en el extremo amino terminal y el dominio de unión del pir/PEP en el extremo carboxilo terminal. Este arreglo tiene la particularidad de que los sitios de unión de los sustratos se encuentran separados por 45 Å de distancia. El acoplamiento de sitios activos tan distantes se facilita por el dominio intermedio de la fosfohistidina que tiene dos uniones flexibles. Esto le permite estar en dos estados conformacionales diferentes, cada uno representado por este dominio unido a cada uno de los dominios de unión de sustratos. La interfase del dímero está formada exclusivamente por el dominio del pir/PEP y la estructura impide la posibilidad de transferir fosfatos entre monómeros.

El dominio de unión del nucleótido se divide en tres subdominios: el primero y tercero básicamente con estructuras $\alpha+\beta$ que tienen un plegamiento similar a los dominios de unión de nucleótidos de otras enzimas que unen nucleótidos. El subdominio intermedio consta de una vaina de 4 α -hélices. Por otra parte, el dominio del pir/PEP presenta una estructura de barril α/β , muy similar al de la piruvato cinasa, a pesar de que la similitud a nivel de la secuencia de aminoácidos no es significativa (Herzberg *et al.*, 1996).

Estos autores proponen que la reacción de la enzima puede ser controlada cinéticamente: el dominio de la histidina catalítica puede estar "moviéndose" constantemente de un dominio a otro y el resultado dependerá de la disponibilidad de los sustratos en dichos dominios (Herzberg *et al.*, 1996).

La estructura tridimensional también ha ayudado a la identificación de residuos importantes para la unión del pir/PEP. Se ha identificado una Cys en la posición 831 esencial para llevar a cabo la reacción con el piruvato (Xu *et al.*, 1995a). También se ha identificado que la arginina (Arg) 561 tiene una función importante para la unión del fosfato en la reacción del pir/PEP. Este residuo está presente en una región rica en glicina que puede formar una asa para la unión del fosfato (Yankie *et al.*, 1995).



Fig. 2 Estructura tridimensional del monómero de la PPDK de *Bacteroides symbiosus*. (Tomado de Herzberg *et al.*, 1996).
Se destacan los dominios estructurales en diferentes colores: azul, dominio de unión del nucleótido; rojo, dominio de la fosfohistidina; amarillo, histidina catalítica; verde, dominio de unión del pir/PEP; gris, péptidos de unión.

Propiedades bioquímicas

Algunas de las propiedades físicas y moleculares de la PPK de maíz fueron reportadas por Edwards *et al* (1985). Se ha descrito que la PPK de maíz es relativamente lábil: se inactiva en ausencia de compuestos tiol, ausencia de magnesio y a temperaturas por debajo de 10° C. Esta enzima tiene una estructura tetramérica y cada subunidad tiene un peso molecular de 94 kDa.

A diferencia de la enzima de maíz, la de *B. symbiosus* es un homodímero cuyas subunidades tienen una masa molecular de 94 kDa estimada por geles de poliacrilamida-SDS y también es lábil al frío (South y Reeves, 1975).

La característica de labilidad al frío ha sido explorada recientemente (Ohta *et al*, 1996). Se describió que la PPK del género *Flaveria brownii* es tolerante a bajas temperaturas. Los autores construyeron proteínas quiméricas con enzimas sensibles al frío o intermedias. Por experimentos de mutagénesis dirigida identificaron tres aminoácidos en el extremo carboxilo terminal de la proteína que aparentemente están involucrados en la asociación de las diferentes subunidades.

La enzima de *G. lamblia* ha sido purificada y caracterizada (Hrdý *et al*, 1993). Posee una estructura tetramérica con una masa molecular de 372 kDa.

El pH óptimo de la actividad de varias PPKs se encuentra alrededor de 6 en la dirección de síntesis de ATP, mientras que en la dirección contraria se encuentra alrededor de 7.2-8.0 (Edwards *et al*, 1985).

Para las PPKs que se mencionaron anteriormente se ha reportado que requieren de un catión monovalente (NH₄⁺ o K⁺) para su actividad en ambas direcciones (Edwards *et al*, 1985; South y Reeves, 1975; Hrdý *et al*, 1993).

1. 6 Tratamiento actual de la amibiasis

La elección de un fármaco para iniciar un tratamiento de amibiasis depende de la localización de la infección. Los agentes antiamibianos se han dividido en tres grupos (Saavedra-Lira y Pérez-Montfort, 1996. Apéndice):

- 1) Agentes lumenales, que se caracterizan por su baja absorción en el intestino, se aplican en infecciones intestinales (Clotioquinol o Enterovioformo, Furamida, Eritromicina)
- 2) Agentes sistémicos (tales como la Emetina que es aislada de la ipecacuana) se distribuye en varios órganos y se concentra principalmente en el hígado. Este fármaco tiene severos efectos adversos en el sistema cardiovascular.
- 3) Agentes mixtos, son derivados del nitroimidazol (Faagyn, Tiberál y Metronidazol). Estos compuestos tienen actividad citotóxica cuando se reduce su grupo nítro para formar radicales libres. Como se mencionó anteriormente, la ferredoxina reducida por la acción de la piruvato:ferredoxina oxidoreductasa puede actuar como un donador de electrones al grupo reactivo de los nitroimidazoles. El oxígeno es un fuerte competidor del metronidazol, por lo que no hay activación del compuesto en su presencia y por lo tanto el fármaco es más activo contra protoctistas anaerobios y bacterias tales como *Trichomonas*, *Giardia* y *Bacteroides* (Müller, 1986).

1.7 El uso de bifosfonatos para inhibir enzimas dependientes de pirofosfato

En años recientes, las enzimas involucradas en el metabolismo de los parásitos han atraído la atención para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de enfermedades parasitarias. Generalmente estas enzimas están involucradas en vías metabólicas que son peculiares del parásito en cuestión. Algunos ejemplos de enzimas cuya estructura

tridimensional es conocida y que son blanco para el diseño racional de fármacos son la hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa de tripanosomátidos (Ullman y Carter, 1995); la dihidrofolato reductasa-timidilato sintetasa de *Leishmania* (McKie, 1994) y la tripanotión reductasa de *Trypanosoma* (Douglas, 1994). También enzimas de la vía glucolítica como la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y la triosa fosfato isomerasa de tripanosomátidos han sido estudiadas con este enfoque (Verlinde *et al*, 1994; Gómez-Puyou *et al*, 1995).

De los estudios pioneros realizados por Reeves sobre el metabolismo energético de *E. histolytica* se ha reconocido que la ameba utiliza activamente el PPI en el metabolismo de los carbohidratos (Reeves, 1976). El hospedero humano no posee esta peculiaridad, por lo que se ha propuesto que las enzimas dependientes de PPI de parásitos pueden ser blancos interesantes para investigaciones terapéuticas.

Con este enfoque se han iniciado estudios sobre la inhibición de la fosfofructocinasa dependiente de PPI (PPI-PFK) de *E. histolytica* (Jiménez *et al*, 1992; Bruchhaus *et al*, 1996). En este último trabajo, los autores probaron el efecto de diversos bifosfonatos, compuestos con un enlace fosfato-carbono-fosfato (P-C-P) no hidrolizable y encontraron que estos derivados son inhibidores competitivos con respecto al PPI; los más potentes (CGP48064, risedronato y zoledronato) tienen una K_i de alrededor de 50 μM con respecto a la enzima parcialmente purificada. El risedronato a una concentración de 10 μM mostró un efecto sobre el crecimiento de trofozoítos en cultivo (Bruchhaus *et al*, 1996).

Se han realizado otros estudios interesantes sobre la PPI-PFK de *Toxoplasma gondii* y su inhibición con bifosfonatos en el que prueban el efecto de los grupos químicos presentes en el derivado, que aumentan la capacidad de inhibición, tanto de la enzima como de la replicación del parásito en fibroblastos en cultivo (Peng *et al*, 1995). Este grupo encontró

que la presencia de un grupo carbonilo o imino entre los dos grupos fosfato está asociado con un efecto inhibitor mayor, por lo que este compuesto es un buen prototipo para el diseño de inhibidores más potentes de la enzima.

En amiba la otra enzima glucolítica dependiente de PPI es la PPDK que también puede ser estudiada desde un punto de vista terapéutico dada su importancia en la generación de energía para el parásito.

Nosotros reportamos la clonación y secuenciación del gene que codifica para la PPDK de *E. histolytica* (Saavedra-Lira y Pérez-Montfort 1994) por lo que el propósito de este proyecto de investigación es estudiar las características funcionales de la enzima (purificada por primera vez) así como conocer el perfil de inhibición con análogos del PPI.

II. OBJETIVOS

Este trabajo de investigación está enfocado hacia la caracterización bioquímica de la PFDK de *Entamoeba histolytica*, una enzima glucolítica que tiene una función clave en la generación de energía del parásito.

Con este objetivo, el trabajo experimental se dirigió en primer término hacia la sobreexpresión de la proteína en un sistema bacteriano y el establecimiento de un esquema para su purificación. Con la proteína purificada se procedió a estudiar algunas de las propiedades básicas de la PFDK amibiana: determinación de sus constantes cinéticas, el uso de cofactores y propiedades estructurales.

Ya que la enzima no tiene contraparte en el hospedero humano y es interesante como blanco para futuras investigaciones terapéuticas, iniciamos el estudio del perfil de inhibición con análogos del PPI (bifosfonatos).

III METODOLOGÍA

La parte correspondiente a materiales y métodos se incluye en el artículo de investigación (capítulo de resultados).

III.1 Metodología adicional

Determinación de las constantes de Michaelis

Las condiciones del ensayo enzimático para la determinación de la K_m para los diferentes sustratos fueron: 50 mM imidazol pH 6.3, 20 mM NH_4Cl , 4.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM PEP, 1 mM AMP, 1.25 mM PPI, 0.2 mM NADH, 13 μg de lactato deshidrogenasa y de 600 a 700 ng de PFDK. Para el ensayo de cada uno de los sustratos, se mantuvieron constantes las concentraciones mencionadas de los otros dos sustratos y el sustrato al que se determina la K_m se usó a concentraciones variables: PEP (10, 15, 20, 25, 30, 40, 60, 70, 80, 160, 240, 320 μM); PPI (10, 15, 20, 25, 30, 40, 60, 70, 80, 160, 240, 320, 500 y 1000 μM); AMP (5, 10, 15, 20, 25, 30, 100 y 1000 μM). En el caso del PEP y PPI, el ensayo se realizó en un volumen de 3 ml, mientras que para el AMP se utilizó un volumen de 4 ml. La reacción se inició con la adición de la enzima (600-700 ng).

Determinación del efecto del magnesio en la actividad

El efecto del magnesio se determinó en las condiciones de ensayo descritas para la determinación de la K_m . Las concentraciones de magnesio que se ensayaron variaron desde 0 a 10 mM. A altas concentraciones de Mg^{2+} (arriba de una concentración de 6 mM) se observó un efecto inhibitorio de aprox. 30%.

Efecto inhibidor de otros análogos del pirofosfato

Se probó el efecto de 10 análogos del PPI que difieren en la longitud y grupos químicos unidos al carbono central del ácido fosfónico (Fig 3).

El ensayo de inhibición de estos análogos del PPI sobre la actividad de la PFDK se realizó utilizando el ensayo enzimático descrito en materiales y métodos del artículo. Dado que las cantidades de estos análogos fueron limitantes, se utilizó una concentración fija de PPI (500 μM) con una concentración fija del inhibidor (1mM) y se procedió a determinar el porcentaje de inhibición a esa concentración. En el caso del compuesto CGP48084, la K_i se determinó en experimentos de competencia en el que se varió la concentración de PPI de 20-500 μM con diferentes concentraciones de inhibidor (50, 75 y 100 μM). La K_i se determinó con gráficos de $(K_m/V_{max})_{app}$ contra concentración de inhibidor.

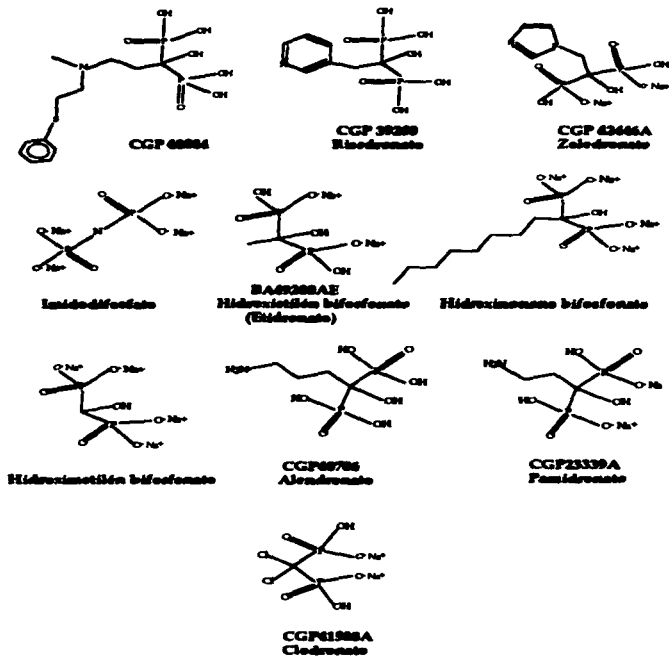


Fig. 3 Análogos del PPI.

IV. RESULTADOS

Los resultados y discusión de la sobre expresión y caracterización de la EhPPDK están descritas en el artículo de investigación (páginas siguientes) así como resultados sobre la inhibición con tres bifosfonatos.

Resultados no mostrados en el artículo de investigación.

A continuación se muestran los regráficos de dobles recíprocas para determinar la K_m para el PEP y el PPI.

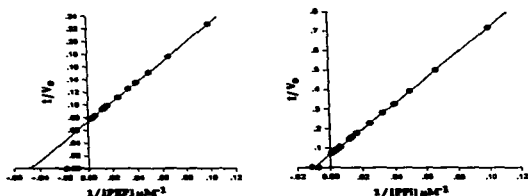


Fig. 4 Regráficos de dobles recíprocas para la determinación de los valores de K_m para el PEP y el PPI. Promedio de los valores calculados de dos experimentos independientes

Los valores de K_m para el PEP y el PPI que se obtuvieron fueron 21 y 100 μM , respectivamente, y se reportan y discuten en el artículo de investigación.

En el caso del AMP sólo se pudo reconocer que la K_m era menor de 5 μM , ya que el tipo de ensayo y el intervalo para esta K_m estuvo fuera de nuestro control experimental.

Resultados adicionales sobre la inhibición de la EhPPDK con bífosfonatos

La tabla III presenta los porcentajes de inhibición con los 10 análogos del PPI a una concentración de 1 mM.

Tabla III. Inhibición de la EhPPDK con diferentes bífosfonatos. Se ensayó el efecto de 10 bífosfonatos a una concentración de 1 mM. Se reporta el porcentaje de inhibición de la actividad total (Promedio de 3 experimentos).

Inhibidor	% de inhibición
CGP 48084	100
Risedronato (CGP39200)	33
Zoledronato (CGP42446A)	27
Imidodifosfato	23
Hidroxi-etilén bífosfonato (Etidronato)	13
Hidroxi-nonano bífosfonato	9
Hidroxi-metilén bífosfonato	7
Alendronato (CGP 40706)	0
Pamidronato (CGP23339A)	0
Clodronato (CGP41588A)	0

Los resultados que se muestran en la tabla III indican que el análogo más potente es el compuesto CGP48084, por lo que se procedió a determinar su constante de inhibición en el ensayo de inhibición descrito en materiales y métodos. En la figura 5 se muestra el gráfico de dobles recíprocas en el que se observa que este compuesto es un inhibidor mixto con respecto al PPI ya que modifica la K_m y la V_{max} . En el inserto se muestra el gráfico de $(K_m/V_{max})_{app}$ contra concentración de inhibidor para determinar el valor de K_i en el intersección con el eje de las x, el cual se calculó en 67 μ M. Este valor es mucho menor que el que se obtuvo con los análogos hidroxi-etilén (etidronato), hidroxi-nonano e hidroxi-metilén bífosfonato que se reportaron en el artículo

(1.3, 4.3 y 11 mM respectivamente). Es interesante notar que este compuesto también presentó un valor de K_i de 50 μM cuando se probó su efecto con la PPI-PPK de amiba (Bruchhaus *et al*, 1996).

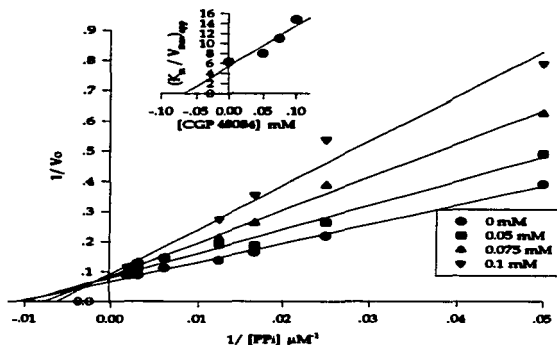


Fig. 5 Inhibición de la EhPPDK con el análogo CGP48084 (Promedio de 3 experimentos independientes). Se probó el efecto inhibitor del análogo a diferentes concentraciones (recuadro) en presencia de diferentes concentraciones de PPI. Gráfica de dobles recíprocas que muestra la inhibición mixta. Inserto: gráfico de $(K_m/V_{max})_{app}$ contra concentración de inhibidor para determinar la K_i (intersección con el eje de las x).



Editorial Secretariat, 275 Washington Street, Newton, MA 02159

Telephone +1 (617) 552-2544; Telex +1 (617) 552-2544; Internet bba.elsevier@edmgrs.com

Editor-in-Chief
P.C. van der Vliet

Executive Editors

J. Arnush
M. Futselaar
T. Kudo
A. G. Lee
V. Lindqvist
G. H. Luehrer
P. R. Rich
J. R. Flordan
D. E. Vance
H. van den Bosch
M. Wikström

Associate Executive Editor
D. J. Weisman

Honorary Managing Editor
E. C. Slater

Dr. Ruy Perez-Montfort
Inst. de Fisiologia Celular
UNAM
A.P. 70242
04510 Mexico
Mexico

Ref No :+RFP B0004348

Boston, 4 August 1997

Title : Expression and characterization of recombinant pyruvate phosphatase dikinase from *Entamoeba histolytica*

Dear Dr. Perez-Montfort:

We are pleased to inform you that the above mentioned paper has been accepted for publication in *Biochimica et Biophysica Acta*. The typescript has been forwarded to the Publisher in Amsterdam and will be included in the section devoted to Proteins and Enzymology.

All further inquiries regarding this manuscript must be addressed directly to the BBA Issue Manager, who oversees production aspects of the publication process (i.e., proofs, issue scheduling, etc.) after acceptance. Please quote the reference number given above and direct questions to:

Issue Manager, BBA
Elsevier Science B.V.
Postbus 2759
1000 CT Amsterdam
The Netherlands
tel: +31 (20) 485-3425
fax: +31 (20) 485-2775
email: s.lendi@elsevier.nl

Yours sincerely,

Cori Beychok
Cori Beychok
Editorial Secretariat

Full Title: Expression and characterization of recombinant pyruvate phosphate dikinase from Entamoeba histolytica.

Emma SAAVEDRA-LIRA, Leticia RAMIREZ-SILVA and Ruy PEREZ-MONTFORT

Instituto de Fisiología Celular, U.N.A.M., 04510 México D.F., México

Corresponding author: Ruy Perez-Montfort, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apartado Postal 70242, 04510 México D.F., México. Tel: +52(5)6225657, Fax: +52(5)6225630 e-mail:rmontfor@ifcsunl.fisiol.unam.mx

SUMMARY

The parasite *Entamoeba histolytica* is an organism whose main energetic source comes from glycolysis. It has the singularity that several of its glycolytic enzymes use pyrophosphate as an alternative phosphate donor. Thus, pyruvate phosphate dikinase (PPDK), an inorganic pyrophosphate (PPi)-dependent enzyme, substitutes pyruvate kinase present in humans. We previously cloned and sequenced the gene that codifies for PPDK in *E. histolytica*. We now report its expression in a bacterial system and its purification to 98% homogeneity. We determined its K_m for phosphoenolpyruvate, AMP and PPi (21, <5 and 100 μ M, respectively). Unlike PPDK from maize and bacteria and pyruvate kinase from other cells, EhPPDK is dependent on divalent cations but does not require monovalent cations for activity. The enzyme has an optimum pH of 6.0, it is labile to low temperatures and has a tetrameric structure. Since EhPPDK is a PPi-dependent enzyme we also tested the effect of some pyrophosphate analogs as inhibitors of activity. Studies on the function and structure of this enzyme may be important for therapeutic research in several parasitic diseases, since it has no counterpart in humans.

Key words: pyruvate phosphate dikinase, *Entamoeba histolytica*, expression, purification, characterization

Abbreviations: EhPPDK, pyruvate phosphate dikinase from *Entamoeba histolytica*; PCR, polymerase chain reaction; PPI, inorganic pyrophosphate; PFDK, pyruvate phosphate dikinase; PEP, phosphoenolpyruvate.

INTRODUCTION

Entamoeba histolytica, the agent causing human amebiasis, has several morphologic and functional properties that make it a model for primitive eukaryotic cells [1]. It lacks the enzymes of the tricarboxylic acid cycle and oxidative phosphorylation. Thus, the main source of metabolic energy derives from glucose transformation through the Embden-Meyerhof pathway and the conversion of pyruvate to ethanol, acetate and CO₂ [2,3]. *E. histolytica* and other protist parasites have the characteristic that several enzymes of the glycolytic pathway use inorganic pyrophosphate (PPi) as donor of phosphate groups to glycolytic intermediates [4]. *E. histolytica* has a PPi-dependent phosphofructokinase [5] and another PPi-dependent enzyme, pyruvate phosphate dikinase (PPDK) which replaces the pyruvate kinase of other organisms [6,7]. PPDK reversibly transfers the phosphate group from phosphoenolpyruvate (PEP) and one phosphate group from PPi to the β and γ positions in AMP, respectively, producing one of the two ATP molecules made in glycolysis. This enzyme was described simultaneously in plants [8] and *E. histolytica* (EhPPDK) [6]. There were few studies on EhPPDK until we identified a clone in an amebic cDNA library which contained approximately 20% of the gene [9]. Subsequently we cloned and sequenced the complete gene [10]. The derived

amino acid sequence and the regions related to the motifs that bind substrates are highly conserved in the primary sequence. The kinetics of PFDK from *Bacteroides symbiosus* has been extensively studied [11] and its crystal structure has also been described [12]. PFDK and the gene for this enzyme have also been described in *Giardia lamblia* [13, 14, 15].

We are interested in the functional characterization of EhPFDK because of its role in the generation of energy (ATP) for the parasite. Thus, we overexpressed the gene in *Escherichia coli*, purified the enzyme and determined its kinetic and structural properties. We also initiated the study of the inhibitory profile with pyrophosphate analogs. Since the metabolism of the parasite differs in some aspects from its equivalent in the human host, knowledge of the function of PFi-dependent enzymes is particularly interesting, because it may be relevant for future therapeutic studies.

MATERIALS AND METHODS

Construction of the uninterrupted EhPFDK gene.

We isolated two genomic clones containing sequences of the EhPFDK gene in opposite directions from a common EcoRI site

[10]. The complete reading frame was reconstructed by the polymerase chain reaction (PCR) with Vent polymerase (Biolabs). Briefly, both codifying fragments were amplified separately from the common EcoRI site in a first reaction, creating a complementary region between the two clones. The oligonucleotides PPK7fw 5'tacaagactttGAATTCactattgaaag3' and PPK18rew 5'ctttcaatagtGAATCaaagtcttcta3' and the external oligonucleotides PPKfw 5'gagctcggatccgctagcctagcctgcaaaagagta3' and PPKrew 5'ctcgaggctcgagcctagcattttctcttgg3', were used. In a second reaction we mixed the amplified fragments and only the external oligonucleotides, that have restriction sites for NheI, were used. With this strategy we amplified a fragment of 2.7 kb containing the codifying sequence of EhPPDK. The product was sequenced completely to ascertain that no mutations had been introduced during the amplification reaction.

Expression of EhPPDK.

Expression was performed in the bacterial system pET (Novagen), which is under control of promoters recognized by T7 RNA polymerase [16]. The amplified fragment was cloned as a NheI fragment in the pET23b expression vector, which allowed the expression of the enzyme fused to a carboxyterminal sequence of polyHis. Cells from the *E. coli*

strain BL21DE3pLysS made competent with CaCl₂ were transformed with the vector and transformants overexpressing EhPPDK were selected.

For the expression assay a bacterial colony was inoculated in LB [17] medium containing 100 µg/ml ampicillin and incubated at 37 °C with shaking. The culture was grown until it had an O.D._{600nm} of 1, at this time, 0.4 mM IPTG was added and the incubation continued for 14 hours. Expression of the protein was monitored by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate [18] using bacterial lysates taken at different time intervals after induction.

Purification of EhPPDK.

A 1 ml Hi-Trap column (Pharmacia) previously coupled with Ni²⁺ was used. The column was prepared by washing it with 2 volumes of 0.1 M NiSO₄, 5 volumes of water and 10 volumes of buffer A (5 mM imidazole, 50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9).

Cells overexpressing EhPPDK from a culture of 250 ml were centrifuged 5 min at 5000 × g and resuspended in buffer A. Cells were broken in an ice bath by sonication in one minute intervals until a clear extract was obtained. This was centrifuged at 39000 × g for 20 min to eliminate cellular debris. The supernatant was applied to the affinity column

and washed with 15 column volumes of buffer A. This was followed by a wash with 2 column volumes of buffer A containing 60 mM imidazole, pH 8.1. The protein was eluted with 2 column volumes of buffer A containing 100 mM imidazole, pH 8.2. Since we observed that the enzyme is inactivated by temperatures below 10 °C, it was stored in the elution buffer at 22 °C. In these conditions, activity was stable for at least 2 weeks. Protein concentration was determined according to Lowry [19].

Enzyme assay.

Activity was determined in the direction of ATP and pyruvate synthesis and was measured by trapping pyruvate with lactate dehydrogenase and following the oxidation of NADH spectrophotometrically at 340 nm and 25 °C. The assay reported for the bacterial enzyme was used initially [20], but it was modified for optimization of the activity of the amebic enzyme; the reaction mixture contained 50 mM imidazole, pH 6.3, 20 mM NH₄Cl, 4.5 mM MgCl₂, 0.2 mM PEP, 0.2 mM AMP, 1.25 mM PPi, 0.2 mM NADH (all as sodium salts from Sigma) and 13 µg lactate dehydrogenase in 1 ml volume reaction. The reaction was started by the addition of EhPPDK. The K_m values for PEP and PPi were determined in a 3 ml reaction volume and the assay for AMP was performed in a 4 ml reaction volume. The K_m for all three substrates was

determined by double reciprocal plots of $1/V_0$ against $1/[PPi]$.

Effect of cations on the activity.

To determine the effect of monovalent cations on the activity of the enzyme the substrates tricyclohexylammonium-PEP, pyrophosphoric acid, adenylic acid and NADH (this last as disodium salt) at pH 7 were used for the enzymatic assay. The ionic strength was maintained constant at 100 mM with tetramethylammonium salt. To test the effect of Na^+ on the activity of the enzyme the $NaCl$ in the elution buffer was separated from PPDK by filtration in fine Sephadex G-25, but the enzyme lost 60% of its activity in this step. This loss of activity was due to the process of filtration and not to the absence of salt. Thus, we used EhPPDK without further treatment. The reaction mixture always had at least 500 μM of residual Na^+ from the elution buffer and the NADH, a concentration that had no effect on the activity of the enzyme.

Inhibition studies with PFi-analogs.

The PFi derivatives were the tetrasodium salts of 1-hydroxyethylidene bisphosphonic acid; 1-hydroxymethylidene

bisphosphonic acid and 1-hydroxynonane bisphosphonic acid. All the derivatives were kindly synthesized by Dr. Benjamin Ortiz (Instituto de Quimica, UNAM) according to Baeyer (21). Inhibition of EhPPDK was measured using the enzymatic assay described above in competition experiments using different concentrations of inhibitor with different concentrations of PPI in a volume of 3 ml. The type of inhibition produced by different analogs was determined using double reciprocal plots of $1/V_0$ against $1/[PPI]$. The value of K_i was calculated from the intersection with X axis in Dixon plots of K_m/V_{max} against the concentration of inhibitor.

Optimum pH.

The buffers for the determination of optimum pH were 50 mM Tris-acetic acid (pH 5-6), imidazole-HCl (pH 6-7), Tris-HCl (pH 7-8.5), Mes-Tris and Pipes-Tris (pH 6.3).

Determination of the oligomeric structure of EhPPDK.

Purified EhPPDK was analyzed by molecular filtration columns (0.7 x 20 cm) of Sephacryl S-300, S-400 and S-500 in buffer A containing 100 mM imidazole. Molecular mass standards were ferritin (445 kDa), β -amylase (200 kDa) and bovine serum albumin (66 kDa).

RESULTS AND DISCUSSION

Reconstruction of the gene and expression of EhPPDK.

A fragment of 2.7 kb containing the complete open reading frame codifying for EhPPDK was amplified. Cloning this fragment into the expression vector pET23b permitted the expression of the protein in *E. coli* strain BL21DE3pLysS. After three hours of induction, bacterial lysates from different clones that carry plasmid pET23b-EhPPDK showed a faint expression of the protein in SDS-PAGE. A greater accumulation of the protein (98 kDa) was observed 14 hours after induction, bacteria without plasmid did not show this protein band (data not shown).

Purification of EhPPDK.

The enzyme was purified by metal affinity chromatography using Ni^{2+} to bind the terminal polyHis of recombinant EhPPDK. Samples with a purity of approximately 98 % were usually obtained. Figure 1 shows an analysis by SDS-PAGE of the different fractions obtained in the affinity chromatography of EhPPDK and Table I summarizes the purification of the protein. Most of the enzyme bound to the column (Fig. 1, lane 3). Approximately 16% of the total activity was lost in this step in the form of enzyme not trapped in the column. In the washing step with 60 mM

imidazole, 4% of the total activity of EhPPDK was lost, but the eluate had a very low specific activity (2 μ moles pyruvate/min mg). Practically all contaminants are eluted in this step (Fig. 1, lane 4). The rest of EhPPDK activity is recovered in the elution step (Table I) and the purified enzyme shows one band in SDS-PAGE analysis (Fig. 1, lane 5). Typical purifications yielded 4 to 5 mg of pure protein starting from 250 ml bacterial culture. The purification factor oscillated around 9 with a yield of 72%. The specific activity was 10-13 μ mole pyruvate/min mg. This value is higher than the one reported by Reeves for the same enzyme partially purified from trophozoites (0.84 μ moles pyruvate/min mg) [6]. The activity we obtained is closer to that reported for PPDk from *B. symbiosus* (10-24 μ moles/min mg) [22].

Kinetic characterization of EhPPDK.

The Michaelis constants of EhPPDK for PEP, AMP and PPi were determined (Table II). The assay was performed in imidazole-HCl pH 6.3 containing 4.5 mM Mg^{2+} . The K_m for PEP was 21 μ M which is lower than the value obtained by Reeves (70 μ M) [6] and those reported for *B. symbiosus* and maize (60 and 140 μ M, respectively) [20, 23], and similar to that of *G. lamblia* (24 μ M) [13]. The K_m value for AMP could not be

measured exactly with our assay, but our results showed that the K_m was lower than 5 μ M. The values reported for the other enzymes were in the same range (*G. lamblia*, *B. symbiosus* and maize, 5, 3.4, 10 and μ M, respectively) [13, 20, 23]. The K_m for PPI is 100 μ M. The values for PPI reported by Reeves for *E. histolytica* and those reported for *B. symbiosus*, maize, and *G. lamblia* were 100, 100, 40 and 29 μ M, respectively [6, 13, 20, 23]. It is interesting that EhPPDK and PFDK of *G. lamblia* are more similar in these kinetic properties than amoeba versus maize and bacteria.

Optimum pH.

The activity profile of EhPPDK at different pH using buffers containing Tris-acetic acid (pH 5-6), imidazole-HCl (pH 6-7), Tris-HCl (pH 7-8.5) was determined (Fig. 2). The optimum pH is 6 for activity in the direction of ATP synthesis, which is in the same range as the enzymes of maize and bacteria (pH 6.4-7) [23]. When the enzyme was incubated for 30 min at pH 6.0, in Tris-acetic acid buffer, some activity was lost. Thus pH 6.3 was chosen for subsequent assays. To explore if there was an effect of the assay buffer on activity, Mes-Tris and Pipes-Tris (pH 6.3) were also tried. The same activity was observed in the three buffers.

Effect of divalent cations on activity.

The effect of divalent cations has been explored in PPDks from other sources. It is known that the enzymes from *Giardia lamblia*, *B. symbiosus* and maize require Mg^{2+} for their activity in addition to that bound to the nucleotide [13, 20, 23]. Mg^{2+} is necessary for EhPPDK activity with an optimal concentration of 4.5 mM (Fig. 3A). There was a decrease in activity of approximately 10% at higher concentrations. The K_{app} of the enzyme for Mg^{2+} is 2.1 mM. The effect of Mn^{2+} could only be tested at very low concentrations (0-0.45 mM). This was due to precipitation of the phosphates present in the reaction mixture at higher Mn^{2+} concentrations. In this range there was a two-fold reduction of activity when compared with Mg^{2+} (data not shown). This effect of Mn^{2+} is similar to that observed for pyruvate kinase [24]. It is known that Mg^{2+} and Mn^{2+} can occupy the same site in the enzyme [24].

Effect of monovalent cations on activity.

The enzymes from *G. lamblia*, *B. symbiosus* and maize require NH_4^+ or K^+ for the reactions in both directions [13, 20, 23, 25]. At constant ionic strength conditions, EhPPDK showed a slight activation with monovalent cations for the ATP

synthesis reaction; its activity was minimally affected in the absence of NH_4^+ , K^+ or Na^+ in the reaction media (Fig. 3B). We observed a small activation with K^+ but it is minimal when compared with the activation of pyruvate kinase by monovalent cations [26, 27]. The lack of activation of EhPPDK by K^+ had already been noted by Reeves [6].

Oligomeric structure of EhPPDK.

The purified EhPPDK was analyzed by molecular filtration in Sephacryl S-300, S-400 and S-500 columns. In all cases the enzyme had the same elution volume as ferritin (445 kDa) which suggests a tetrameric arrangement (data not shown). Both the maize and *G. lamblia* enzymes have the same structure (13, 23) which differs from that of *B. symbiosus* which is a dimer (12).

Inhibition studies with bisphosphonates.

Since PPi-dependent enzymes are proteins unique to some parasites and have no counterparts in the human host, bisphosphonates (which are non-hydrolyzable PPi analogs) have been used to inhibit the glycolytic enzyme PPi-phosphofructokinase from *E. histolytica* [28, 29] and *Toxoplasma gondii* [30]. We tested the effect of three

bisphosphonates to inhibit purified EhPPDK. The inhibitors were tetrasodium 1-hydroxyethylidene bisphosphonate (analog I); tetrasodium 1-hydroxymethylidene bisphosphonate (analog II) and tetrasodium 1-hydroxynonane bisphosphonate (analog III). They differ in the number of carbon atoms bound to the phosphorus-carbon-phosphorus (P-C-P) bond. Analog I showed mixed inhibition for EhPPDK in double reciprocal plots (Fig. 4). The other two analogs also showed this kind of inhibition (data not shown). The K_i values determined by Dixon plots of K_m/V_{max} against concentration of inhibitor for each bisphosphonate are shown in Table III. Analog I has the lowest K_i value while compounds II and III are very weak inhibitors. The ability of these inhibitors to block the lytic capacity of *E. histolytica* on CHO cells in culture has been determined [28]. The most effective inhibitor was analog III. Bruchhaus et al. [29] used analog I (etidronate) and other PPI-derivatives to inhibit PPI-phosphofructokinase from *E. histolytica*. This bisphosphonate showed a very weak effect on the enzyme and on the inhibition of growth of amebas in culture [29].

CONCLUSION

This work describes some of the fundamental biochemical properties of EhPPDK. This enzyme is responsible for one of

the two ATP molecules produced by glycolysis and thus is important for energy production in *E.histolytica*. EhPPDK has similar catalytic properties to PPDks described from other sources in its K_m for different substrates, in reaction velocities, in the requirement of divalent cations for activity, and its oligomeric structure. It differs from other PPDks and pyruvate kinase in its lack of requirement for a monovalent cation for activity (e.g. K^+ or Tl^+ for pyruvate kinase) [26, 27]. It is noteworthy that pyruvate kinase has this absolute requirement for K^+ [26]. The crystal structure of bacterial PPDk shows in the phosphoenolpyruvate binding domain (which has a very similar secondary structure to the phosphoenolpyruvate binding site from pyruvate kinase) an Arg at position 617. This charged residue is in an equivalent position to K^+ in pyruvate kinase, which lacks an Arg pair in this site [12]. This residue is also present in EhPPDK and PPDks from maize, *Flaveria trinervis* and *G. lamblia*. It would be interesting to test the role of this residue on enzymatic activity using site directed mutagenesis.

The bisphosphonates tested as inhibitors on EhPPDK had a moderate effect. Thus, it would be interesting to evaluate other compounds that differ in other properties of the chemical substituents such as those used by Peng et al. [30] to inhibit the PPI-phosphofructokinase of *T. gondii*. They

observed that those PPI analogs in which the carbon of the P-C-P group is substituted with a carbonyl group are more effective against the purified enzyme and against parasites in culture.

The study of PPK of parasitic organisms is of particular interest because the enzyme has no counterpart in the human host and has a different catalytic mechanism than pyruvate kinase. This initial characterization of the basic properties of recombinant EhPPK, could be a starting point for new therapeutic approaches. The recent report of the three dimensional structure of the dimeric enzyme from bacteria [12] has opened new possibilities for detailed structure-function studies and may aid the rational design of drugs that affect some parasites, but are harmless for humans.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr. Benjamin Ortiz (Instituto de Quimica, UNAM) for providing the bisphosphonates, Jesús Oria, Laura Ongay and Nallely Cabrera for technical assistance and Dr. Armando Gómez-Puyou for helpful suggestions and careful revision of the manuscript. This work was supported by grant No. IN202693 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, U.N.A.M.

REFERENCES

- 1 Bakker-Grunwald, T. and Wöstmann, C. (1993) *Parasitol. Today* 9, 27-31.
- 2 McLaughlin, J. and Aley, S. (1985) *J. Protozool.* 32, 221-240.
- 3 Saavedra-Lira, E. and Pérez-Montfort, R. (1996) *Arch. Med. Res* 27, 257-264.
- 4 Mertens, E. (1993) *Parasitol. Today* 9, 122-126.
- 5 Reeves, R.E., South, D.J., Blytt, H.J., and Warren, L.G. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 7737-7741.
- 6 Reeves, R.E. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 3202-3204.
- 7 Reeves, R.E., Menzies, R.A. and Hsu, D.S. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 5486-5491.
- 8 Hatch, H.D. and Slack, C.R. (1968) *Biochem. J.* 106, 141-146.
- 9 Saavedra-Lira, E., Robinson, O. and Pérez-Montfort, R. (1992) *Arch. Med. Res.* 23, 39-40.
- 10 Saavedra-Lira, E. and Pérez-Montfort, R. (1994) *Gene* 142, 249-251.
- 11 Thrall, S.H. and Dunaway-Mariano, D. (1994) *Biochemistry* 33, 1103-1107.
- 12 Herzberg, O., Chen, C.C.H., Kapadia, G., Mcquire, M., Carroll, L.J., Noh, S.J. and Dunaway-Mariano, D. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 2652-2657.

- 13 Hrdý, I., Mertens, E. and Nohýnková, E. (1993) *Exp. Parasitol.* 76, 438-441.
- 14 Nevalainen, L., Hrdý, I. and Müller, M. (1996) *Mol. Biochem. Parasitol.* 77, 217-223.
- 15 Bruderer, T., Wehrli, C. and Köhler, P. (1996) *Mol. Biochem Parasitol.* 77, 225-233.
- 16 Studier, W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. and Dubendorff, J.W. (1990) *Meth. Enzymol.* 185, 60-89.
- 17 Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* pp.68, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 18 Ames, G.F.-L. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 634-644.
- 19 Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- 20 South, D.J. and Reeves, R.E. (1975) *Meth. Enzymol.* 42, 187-192.
- 21 Baeyer, H. and Hofmann, K.A. (1973) *Chem. Ber.* 30, 1987-1989.
- 22 Wang, H.C., Ciskanik, L., Dunaway-Mariano, D., Saal, W., and Villafranca, J.J. (1988) *Biochemistry* 27, 625-633.
- 23 Edwards, G.E., Nakamoto, H., Burnell, J.N. and Hatch, M.D. (1985) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36, 255-286.
- 24 Mildvan, A.S. and Cohn, M. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 238-246.

- 25 Milner, Y., Michaels, G. and Wood H.G. (1975) *Meth. Enzymol.* 42, 199-212.
- 26 Kachmar, J.F. and Boyer, P.D. (1953) *J. Biol. Chem.* 200, 669-683.
- 27 Kayne, F.J. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* 143, 232-239.
- 28 Jiménez C.E., Cuevas, R.E., Jiménez C.J.M. and Ortiz, B. (1992) *Rev. Lati-amer. Microbiol.* 34, 272-280.
- 29 Bruchhaus, I., Jacobs, T., Denart, M. and Tannich, E. (1996) *Biochem. J.* 316, 57-63.
- 30 Peng, Z.-Y., Mansour, J.M., Araujo, F., Ju, J.Y., McKenna, Ch.E. and Mansour, T.E. (1995) *Biochem. Pharmacol.* 49, 105-113.

Legends for Figures

Figure 1. SDS-PAGE showing the purification of EhPPDK by Ni²⁺ affinity chromatography. 1) Crude extract, 2) supernatant of extract, 3) wash with 5 mM imidazole, 4) wash with 60 mM imidazole, 5) purified EhPPDK (elution with 100 mM imidazole). Lanes 1-3: 30 µg; lane 4: 20 µg; lane 5: 5 µg.

Figure 2. Effect of pH on the activity of EhPPDK. Purified EhPPDK was incubated over a range of pH values. The buffers were all at 50 mM concentration. Tris-acetic acid (pH 5-6, pK 4.76), imidazole-HCl (pH 6-7, pK 6.75), Tris-HCl (pH 7-8, pK 7.8). Circles: The enzyme was preincubated 30 min at the indicated pH. In this case the reaction was started with the addition of lactate dehydrogenase and PEP.

Figure 3. Effect of divalent and monovalent cations on the activity of EhPPDK.

A) Activity measured at different concentrations of MgCl₂ in the enzymatic assay described in Materials and Methods. B) Activity measured with different concentrations of monovalent cations at constant ionic strength. ■ K⁺, ● NH₄⁺, ▲ Na⁺.

Figure 4. Inhibition of EhPDK by bisphosphonates.
Double reciprocal plots of tetrasodium 1-hydroxyethylidene bisphosphonate (analog I) as an inhibitor of PPI. Six different concentrations of PPI were tested against five different concentrations of inhibitor (● 0 mM, ■ 1 mM, ▲ 3 mM, ▼ 6 mM, ◆ 10 mM). The plot shows a mixed inhibition effect on the activity. Inset. Dixon plots for analogs I, II and III.

Table I. Purification of recombinant *Entamoeba histolytica* Pyruvate Phosphate Dikinase.

Protein concentration was determined according to Lowry [19]

Step	Total Protein (mg)	Total Activity (μ moles pyr/min)	Specific Activity (μ moles pyr/min mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	98	147	1.5	-	-
Supernatant	87	113	1.3	100	1
Hi-Trap column elution (imidazole 100 mM)	4.6	81	12	72	9

Table II. Comparison of K_m for three substrates of pyruvate phosphate dikinase from different sources.

Source	PEP (μ M)	AMP (μ M)	PPi (μ M)	Reference
EhPPDK	21	<5	100	This work
EhPPDK	70	ND*	100	6
<i>G. lamblia</i>	24	5	29	13
<i>B. symbiosus</i>	60	3.4	100	20
maize	140	10	40	23

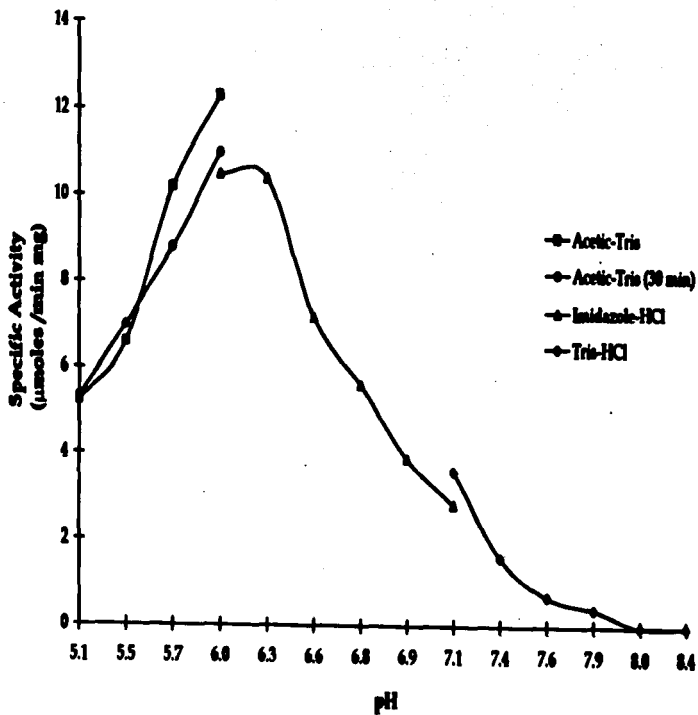
* ND not determined

Table III. Inhibition of EhPFOK by PPI analogs.

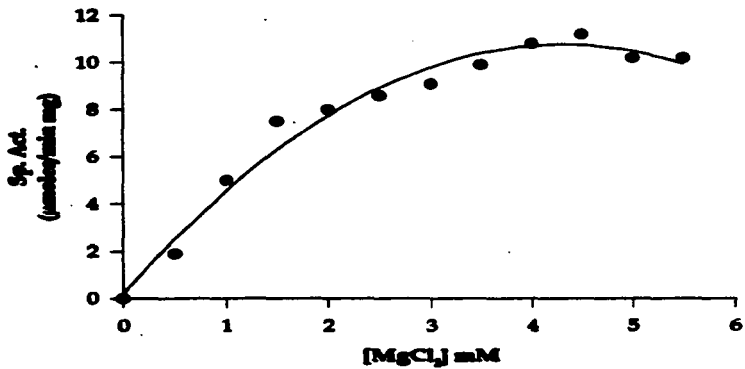
Different concentrations of PPI in a range of 20-500 μM were tested with the indicated concentrations of inhibitor under conditions described in Material and Methods.

Analog	Range of tested concentrations (mM)	K _i (mM)
I) tetrasodium 1-hydroxyethylidene bisphosphonate	0, 1, 3, 6, 10	1.3
II) tetrasodium 1-hydroxymethylidene bisphosphonate	0, 10, 15, 20	11
III) tetrasodium 1-hydroxynonane bisphosphonate	0, 3, 5, 6, 7	4.3

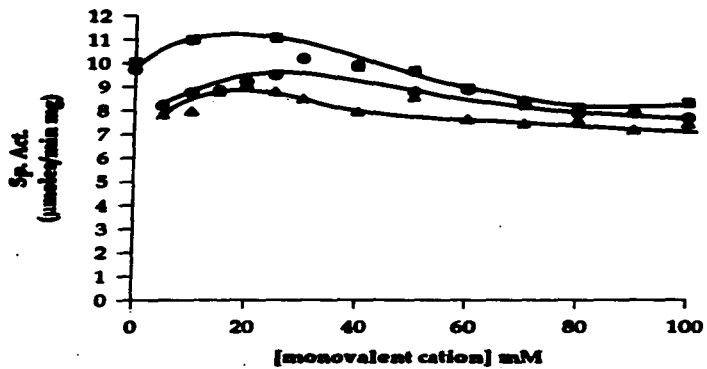


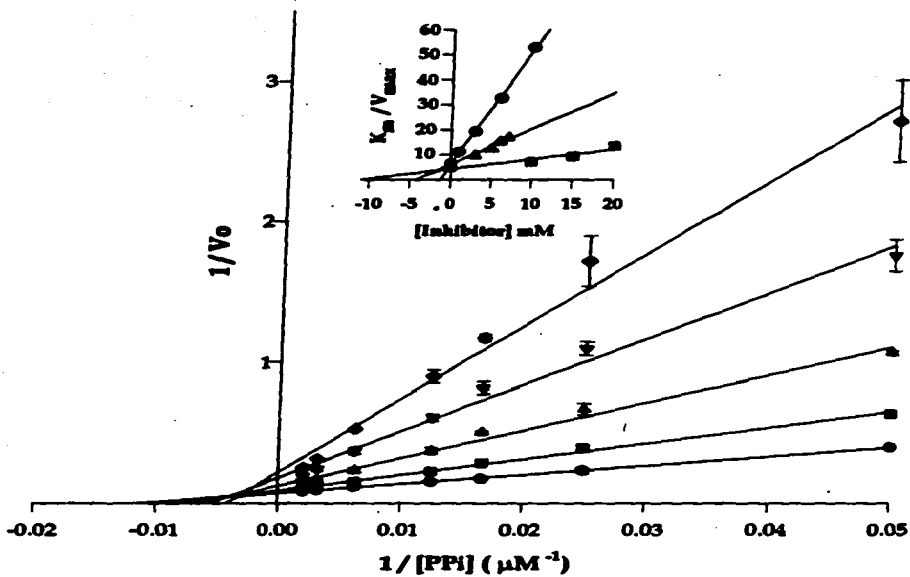


A



B





V. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

Caracterización bioquímica de la EhPPDK

Previamente nosotros clonamos y secuenciamos el gene que codifica para la piruvato fosfato dicinasa de *Entamoeba histolytica* (Saavedra-Lira y Pérez Montfort, 1994) una proteína que fué purificada parcialmente por Reeves en 1968 y de la cual hubo muy pocos trabajos descritos que la caracterizaran. Ya que esta enzima es importante en la generación de energía del parásito en forma de ATP, este trabajo de investigación se enfocó hacia la determinación de algunas de las propiedades bioquímicas de la EhPPDK recombinante. Con este objetivo sobreexpresamos la proteína en un sistema bacteriano y establecimos un esquema de purificación que permitió contar con enzima purificada a homogeneidad (98% de pureza).

La EhPPDK posee características similares a otras PFDKs que se han descrito para maíz, *B. symbiosus*, *F. trinitensis* y *G. lamblia*. Nosotros obtuvimos una enzima con actividad específica (10-13 $\mu\text{moles}/(\text{min}\times\text{mg})$) en un intervalo similar en el que se encuentran otras PFDKs (10-24 $\mu\text{moles}/(\text{min}\times\text{mg})$). La PFDK de ameba que purificó parcialmente Reeves (1968), probablemente estaba en malas condiciones ya que, en un ensayo enzimático similar al que nosotros utilizamos, la proteína tuvo una actividad específica de 0.84 $\mu\text{moles}/\text{min mg}$. Dos décadas anteriores, en los primeros estudios de las PFDKs de otras bacterias, se obtenían muestras con actividades específicas en estos intervalos tan bajos, sin embargo, los métodos de purificación actuales incluyen pasos de purificación en el que se utiliza HPLC, lo que ha permitido obtener muestras con un grado de pureza mayor (Pocalyko *et al*, 1990).

La EhPPDK es similar a la mayoría de las PFDKs en su sensibilidad al frío (se inactiva a temperaturas por debajo de 10 grados). Se ha reportado que la enzima de maíz requiere iones Mg^{2+} para la formación del tetrámero (Hatch y

Slack, 1968). Aparentemente, la inactivación por bajas temperaturas se debe a la disociación de las subunidades, ya sea en dímeros o monómeros. El grupo de Burnell (Ohta *et al*, 1996) identificó en una PFDK de *Fiservia brownii* tolerante al frío, tres aminoácidos en el extremo carboxilo-terminal que pueden tener una función directa o indirecta con la asociación de las subunidades y que su mutación causa que la proteína sea inestable ahora a bajas temperaturas. Dos de estos residuos están presentes en la secuencia de maíz, que tiene una susceptibilidad al frío intermedia entre una tolerante y una susceptible.

En cuanto a la estructura oligomérica, la EhPPDK se asemeja a las estructuras tetraméricas de plantas y *G. lembii* y difiere de la enzima de *B. symbiosus* que es un dímero. Si se obtiene la estructura tridimensional de la enzima amibiana sería interesante conocer el arreglo de cada una de las subunidades, ya que como se destacó en la estructura cristalina de la de bacteria, el arreglo del dímero impide la transferencia de fosfatos entre subunidades (Herzberg *et al*, 1996).

También determinamos que la enzima tiene un pH óptimo de actividad de 6.0 en la dirección de síntesis de ATP. Este valor es similar al que se ha descrito para otras PFDKs. Asimismo, los valores de K_m que obtuvimos para el PEP, AMP y PFi son muy parecidos a los reportados previamente para estas enzimas (Edwards *et al*, 1985).

Una diferencia notable que encontramos con respecto a otras PFDKs y la piruvato cinasa, es que la EhPPDK no requiere catión monovalente para su actividad. Estos experimentos se realizaron poniendo énfasis en eliminar la mayor concentración de sales en el ensayo, quedando una concentración final de 500 μ M de Na^+ (en ausencia absoluta de cualquier sal, la adición de esta concentración de sal remanente no tuvo ningún efecto sobre la actividad) además se mantuvo la fuerza iónica en 100mM con tetrametilamonio. Se ha reportado, para las enzimas de *B. symbiosus* y maíz que requieren amonio o potasio para su actividad (Edwards *et al*, 1985; Mehl *et al*, 1994). Además, para

La enzima de *G. lamblia*, se observó una dependencia absoluta de NH_4^+ o K^+ (Hrdý *et al*, 1993). La piruvato cinasa también tiene un estricto requerimiento de estos cationes, que pueden ser sustituidos por talio (Kachmar y Boyer, 1953; Kayne, 1971). Se sabe que el catión monovalente se requiere para la enolización del PEP durante la reacción enzimática (Mehl *et al*, 1994). De acuerdo con la estructura cristalina de la enzima de bacteria, en el dominio de unión del pir/PEP, en la posición que ocupa el K^+ en la piruvato cinasa, existe la Arg 617 que podría estar funcionando de manera similar al K^+ y por lo tanto la función de los cationes monovalentes en la actividad de la PFDK bacteriana podría ser de una manera diferente que el de la piruvato cinasa (Herzberg *et al*, 1996). Estudios con mutagénesis dirigida de este residuo podrían poner a prueba esta hipótesis. Cabe explorar más a fondo porqué la EhPFDK no tiene este requerimiento.

Con respecto a los cationes divalentes, las PFDKs necesitan Mg^{2+} para su actividad, estabilidad y asociación entre subunidades (Ohta *et al*, 1996). La EhPFDK también requiere catión divalente para su actividad (con una concentración óptima de 4.5 mM y una K_{app} de 2.1 mM). Intentamos realizar ensayos con otros cationes divalentes como Mn^{2+} y Zn^{2+} , sin embargo, dada la presencia de fosfatos en la mezcla de reacción, estos formaban precipitados a muy bajas concentraciones. Únicamente determinamos que con Mn^{2+} hasta 450 μM se obtenían valores de V_{max} aproximadamente a la mitad de las obtenidas con Mg^{2+} y esto es un efecto similar al descrito para la piruvato cinasa (Mildvan y Cohn, 1965). No se ha explorado en más detalle este fenómeno. También sería interesante realizar estudios con la EhPFDK para determinar si el magnesio tiene un efecto sobre la estabilidad de la enzima.

Inhibición con análogos del piruvato

Existe una gran información sobre el metabolismo de diversos parásitos que infectan al ser humano. Es común en diversas enfermedades que en las formas que se replican dentro del ser humano, la vía metabólica que provee de la mayor parte del ATP dentro de la célula es la glucólisis. Por ejemplo, *Trypanosoma brucei* en la fase que se presenta en el mosquito presenta un tipo de metabolismo básicamente aerobio, de hecho en esta fase el parásito desarrolla mitocondrias aptas para la realización de la fosforilación oxidativa; sin embargo, cuando se transforma en la fase infectiva de las células humanas, las mitocondrias están poco desarrolladas y el metabolismo es principalmente glucolítico (Clayton y Michels, 1996). Este es un ejemplo típico de cómo los parásitos se adaptan a medios ambientes que son ricos en nutrientes.

Desde los estudios pioneros realizados por Reeves en la década de los 70s sobre el metabolismo de la ameba, se reconoció que el mayor aporte de energía proviene de la glucólisis. Con el subsiguiente estudio de las enzimas glucolíticas de ameba y de varios parásitos protozoarios se describió que algunas de ellas utilizan el PPI como donador de fosfatos (Wood, 1977; Weinbach, 1981; Mertens, 1993). Esta característica no la comparte con el humano, por lo que para varias parasitosis se ha postulado que la inhibición de estas enzimas puede afectar el metabolismo de los parásitos y eventualmente disminuir la infección. Recientemente se han descrito trabajos sobre la purificación de enzimas metabólicas que son peculiares para varios parásitos. En este sentido se ha clonado y secuenciado el gene y caracterizado la PPI-fosfofructocinasa de ameba (Reeves *et al.*, 1974; Reeves *et al.*, 1976; Huang *et al.*, 1995; Bruchhaus *et al.*, 1996) además de que se ha modelado su estructura tridimensional (Byington *et al.*, 1997). También se han estudiado las PPI-PFK de *Toxoplasma* (Peng *et al.*, 1995) y *Naegleria* (Mertens *et al.*, 1993).

Sobre la PPI-PFK de *Toxoplasma* se realizaron experimentos muy interesantes sobre su inhibición con análogos del PPI (análogos del ácido fosfónico) (Peng *et al.*, 1995). Estos autores probaron el efecto de 23 derivados del ácido fosfónico que difieren en sus grupos químicos. El compuesto más potente fué el carbonildifosfonato tetrasódico. Comparación entre las estructuras de varios inhibidores y sus efectos sobre la enzima indican que un grupo carbonilo o imino entre los dos grupos fosfato está asociado con un mayor poder de inhibición. Sin embargo, este compuesto presentó un efecto restringido al medir la capacidad de inhibición de la replicación del parásito en fibroblastos humanos en cultivo y esto probablemente se debió a que es una molécula cargada, lo que podría impedir la accesibilidad al citoplasma de la célula. Sin embargo dentro de este grupo de compuestos, ellos identificaron otro análogo que es permeable y que tiene efectos en cultivo, por lo que los derivados del ácido carbonildifosfónico serían candidatos interesantes para su manipulación química.

Con respecto a la PPI-PFK de amiba, recientemente se reportaron estudios sobre su inhibición con bifosfonatos (Jiménez *et al.*, 1992; Bruchhaus *et al.*, 1996; Byington *et al.*, 1997). En total, en ambos trabajos se probó el efecto de los 10 análogos que nosotros probamos con la EhPPDK (Fig. 3). De manera similar a los resultados de inhibición de la PPI-PFK, la EhPPDK es más sensible al compuesto CGP48084 (Fig. 5). La K_i de 67 μM que se determinó para este compuesto es menor a la K_m por PPI (100 μM).

Es interesante notar que este compuesto también presentó un valor de K_i aceptable (50 μM) cuando se probó su efecto con la PPI-PFK de amiba (Bruchhaus *et al.*, 1996). Este análogo junto con el risedronato y el zoledronato presentaron un efecto inhibidor sobre el crecimiento de trofozoítos en cultivo a una concentración de 50 μM . De acuerdo con las estructuras de los 10 análogos utilizados (Fig 3), aparentemente existe una correlación entre la presencia de un grupo voluminoso en la cadena unida al carbono del enlace P-C-P para que se

incremente el efecto inhibitor de estos compuestos. Con una aproximación similar al realizado por Peng para la PPI-PFK de *T. gondii*, se podrían modificar consecutivamente estas cadenas laterales para obtener un compuesto con mejores propiedades inhibitoras para la EhPPDK.

En las últimas dos décadas ha habido un gran interés por el desarrollo de fármacos derivados del etidronato que son utilizados para el tratamiento de la osteoporosis primaria o en enfermedades en las que hay reabsorción de hueso (Licata, 1997). Entre los nuevos fármacos que se han probado y que tienen un efecto inhibitor de la reabsorción de hueso se encuentran el etidronato, clodronato, pamidronato, alendronato, risedronato y tiludronato. En particular, el risedronato es uno de los más potentes en este sentido y como se ha mencionado anteriormente también es un inhibitor de las enzimas dependientes de PPI de parásitos.

El mayor conocimiento del funcionamiento de las enzimas dependientes de PPI de estos parásitos ha permitido la identificación y postulación de compuestos modelo o "lead" para el diseño racional de fármacos cuya modificación química puede llevar al desarrollo de un nuevo compuesto que afecte selectivamente a estas enzimas y que sea relativamente inocuo para el ser humano.

PERSPECTIVAS

En general, la PFDK es una enzima peculiar desde el punto de vista enzimático y estructural, por su arreglo tridimensional en dominios estructurales y funcionales y el dominio del "brazo flexible" cuyo movimiento implica grandes cambios conformacionales. Esta característica no se conoce de otras proteínas por lo que sería interesante estudiar que es lo que determina el movimiento de estos dominios.

Con la aplicación de la cristalografía se puede determinar la estructura tridimensional de la PFDK de amiba que mostraría cómo es el arreglo de las subunidades en el tetrámero, además de numerosa información acerca de los sitios de unión de sustratos y cofactores. Desde el punto de vista terapéutico, se podría tratar de cristalizar la proteína con inhibidores o estudiar a través de métodos computacionales, las posibles interacciones de la enzima con los análogos del pirofosfato, como una primera aproximación para el diseño racional de fármacos.

Este trabajo abre la posibilidad de estudiar la PFDK desde un punto de vista terapéutico ya que junto con la PPI-PFK constituye un grupo de enzimas específicas de varios parásitos que están involucradas en la producción de ATP para la sobrevivencia de la célula.

REFERENCIAS

- Bakker-Grunwald, T. y C. Wöstmann. 1993. *Entamoeba histolytica* as a model for the primitive eukaryotic cell. *Parasitol. today*, 9 (1):27-31.
- Benziman, M. 1975. Pyruvate, orthophosphate dikinase from *Acetobacter xylinum*. *Meth.Enzymol.* 42:192-199.
- Bruchhaus, I., T. Jacobs, M. Denart y E. Tannich. 1996. Pyrophosphate-dependent phosphofruktokinase of *Entamoeba histolytica*: molecular cloning, recombinant expression and inhibition by pyrophosphate analogues. *Biochem. J.* 316: 57-63.
- Bruderer, T., C. Wehrli y P. Köhler. 1996. Cloning and characterization of the gene encoding pyruvate phosphate dikinase from *Giardia duodenalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 77:225-233.
- Byington, C., R.L. Dunbrack Jr., F.E. Cohen y N. Agabian. 1997. Molecular modelling of phosphofruktokinase from *Entamoeba histolytica* for the prediction of new antiparasitic agents. *Arch. Med. Res.* 28: 586-588.
- Carroll, L.J., D. Dunaway-Mariano, C.M. Smith y R. Chollet. 1990. Determination of the catalytic pathway of C₄-leaf pyruvate, orthophosphate dikinase from maize. *FEBS letters.* 274 (1,2): 178-180.
- Carroll, L.J., Y. Xu, S.H. Thrall, B.M. Martin y D. Dunaway-Mariano. 1994. Substrate binding domains in pyruvate phosphate dikinase. *Biochemistry.* 33(5):1134-1142.
- Clayton, C.E. y P. Michels. 1996. Metabolic compartmentation in african trypanosomes. *Parasitol. Today*, 12(12):465-471
- Douglas, K.T. 1994. Rational drug design in parasitology. *Parasitol. today*, 10 (10): 389-392.
- Edwards, G.E., H. Nakamoto, J.N. Bunnell y M.D. Hatch. 1985. Pyruvate, Pi dikinase and NADP⁺-malate dehydrogenase in C₄ photosynthesis: properties and mechanism of light/dark regulation. *Ann.Rev.Plant Physiol.* 36: 255-286.
- Ellis, J.E., K.D.R. Setchell y E.S. Kaneshiro. 1994. Detection of ubiquinone in parasitic and free-living protozoa, including species devoid of mitochondria. *Mol. Biochem. Parasitol.* 63: 213-224.
- Ellis, J.E. 1994. Coenzyme Q homologs in parasitic protozoa as targets for chemotherapeutic attack. *Parasitol. today* 10 (8): 296-301.

- Evans, H.J. y H.G. Wood. 1968. The mechanism of the pyruvate phosphate dikinase reaction. *PNAS, USA*. 61: 1448-1453.
- Gómez-Puyou, A., E. Saavedra-Lira, I. Becker, R.A. Zubillaga, A. Rojo-Domínguez y R. Pérez-Montfort. 1995. Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action- studies with triosephosphate isomerase. *Chemistry & Biology*. 2: 847-855.
- Hatch, M.D. y C.R. Slack. 1966. A new enzyme for the interconversion of pyruvate and phosphopyruvate and its role in the C_4 dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. *Biochem.J*. 106: 141-146.
- Hatch, M.D. y C.R. Slack. 1975. Pyruvate, Pi dikinase from leaves. *Meth.Enzymol*. 42:212-219.
- Herzberg, O., C.C.H. Chen, G. Kapadia, M. McGuire, L.J. Carroll, S.J. Noh y D. Dunaway-Mariano. Swiveling-domain mechanism for enzymatic phosphotransfer between remote reaction sites. 1996. *PNAS, USA*. 93: 2652-2657.
- Hrdý, I., E. Mertens y E. Nohýnková. 1993. *Giardia intestinalis*: detection and characterization of a pyruvate phosphate dikinase. *Exp. Parasitol*. 76: 436-441.
- Huang, M., R.A. Albach, K.P. Chang, R.L. Tripathi y R.G. Kemp. 1995. Cloning and sequencing a putative pyrophosphate-dependent phosphofructokinase gene from *Entamoeba histolytica*. *Biochim. Biophys. Acta*. 1260:215-217
- Jiménez, C.E., E. Cuevas, J.M. Jiménez y B. Ortiz. 1992. Disminución *in vitro* del efecto citotóxico de *E. histolytica* por inhibición de su fosfofructocinasa. *Rev. Lat-Amer. Microbiol*. 34: 275-280.
- Kachmar, J.F. y P.D. Boyer. 1953. Kinetic analysis of enzyme reactions. II. the potassium activation and calcium inhibition of pyruvic phosphoferase. *J.Biol.Chem*. 200: 669-683.
- Kayne, F.J. 1971. Thallium (I) Activation of pyruvate kinase. *Arch.Biochem.Biophys*. 143:232-239.
- Ku, M.S.B., Y. Kano-Murakami y M. Matsuoka. 1996. Evolution and expression of C_4 photosynthesis genes. *Plant Physiol*. 111:949-957
- Licata, A.A. 1997. Bisphosphonate therapy. *Am.J.Med.Sci*. 313(1): 17-22
- Lo, H.S. y R.E. Reeves. 1978. Pyruvate to ethanol pathway in *Entamoeba histolytica*. *Biochem.J*. 171:225-230.
- Lo, H.S. y R.E. Reeves. 1980. Purification and properties of NADPH:flavin oxidoreductase from *Entamoeba histolytica*. *Mol.Biochem.Parasitol*. 2:23-30.

- Lo, H.S. y Ch. Chang. 1982. Purification and properties of NADP-linked alcohol dehydrogenase from *Entamoeba histolytica*. *J. Parasitol.* 68(3):372-377.
- Martínez-Palomo, A. 1982. *The biology of Entamoeba histolytica*. Wiley, Inglaterra.
- Matsuoka, M. 1990. Structure, genetic mapping and expression of the gene for pyruvate, orthophosphate dikinase from maize. *J.Biol.Chem.* 265(28):16772-16777.
- Matsuoka, M. 1995. The gene for pyruvate, orthophosphate dikinase in C₄ plants: structure, regulation and evolution. *Plant Cell.Physiol.* 36(6): 937-943.
- McKie, J.H. 1994. Homology modelling of the dihydrofolate reductase-thymidilate synthase bifunctional enzyme of *Leishmania major*, a potential target for rational drug design in leishmaniasis. *Drug Des. Discov.* 11(4):269.
- McLaughlin, J. y S. Aley. 1985. The biochemistry and functional morphology of the *Entamoeba*. *J. Protozol.* 32(2):221-240.
- Mehl A., Y. Xu y D. Dunaway-Mariano. 1994. Energetics of pyruvate phosphate dikinase catalysis. *Biochemistry.* 33(5): 1093-1102.
- Mertens, E. 1993. ATP versus pyrophosphate: glycolysis revisited in parasitic protists. *Parasitol. today.* 9(4):122-126.
- Mertens, E., J. de Jonckheere y E. van Schaftingen. 1993. Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase from the amoeba *Naegleria fowleri*, an AMP-sensitive enzyme. *Biochem. J.* 292: 797-803.
- Meza, I. 1992. *Entamoeba histolytica*: phylogenetic considerations. A review. *Arch.Med.Res.* 23(2):1-5.
- Mildvan, A.S. y M. Cohn. 1965. Kinetic and magnetic resonance studies of the pyruvate kinase reaction. I. Divalent metal complexes of pyruvate kinase. *J.Biol.Chem* 240(1): 238-246.
- Montalvo, F.E., R.E. Reeves y L.G. Warren. 1971. Aerobic and anaerobic metabolism in *Entamoeba histolytica*. *Exp. Parasitol.* 30:249-256.
- Milner, Y., G. Michaels y H.G. Wood. 1975. Pyruvate, orthophosphate dikinase of *Bacteroides symbiosus* and *Propionibacterium shermanii*. *Meth.Enzymol.* 42:199-211.
- Milner, Y. y H.G. Wood. 1976. *J.Biol.Chem.* 251:7920-
- Müller, M. 1986. Reductive activation of nitroimidazoles in anaerobic microorganisms. *Biochem.Pharmacol.* 35(1):37-41.

- Müller, M. 1988. Energy metabolism of protozoa without mitochondria. *Ann.Rev.Microbiol.* 42: 465-488.
- Müller, M. 1992. Energy metabolism of ancestral eukaryotes: a hypothesis based on the biochemistry of amitochondriate parasitic protists. *BioSystems.* 28:33-40.
- Nevalainen, L., I. Hrdý y M. Müller. 1996. Sequence of a *Giardia lamblia* gene coding for the glycolytic enzyme, pyruvate phosphate dikinase. *Mol.Biochem.Parasitol.* 77:217-223.
- Ohta, S., S. Usami, J. Ueki, T. Kumashiro, T. Koenari y J.N. Burnell. 1996. Identification of the amino acid residues responsible for cold tolerance in *Flavaria brownii* pyruvate, orthophosphate dikinase. *FEBS Letters.* 398:152-156.
- Peng, Z.Y., J.M. Mansour, F. Araujo, J.Y. Ju, C.E. McKenna y T.E. Mansour. 1995. Some phosphonic acid analogs as inhibitors of pyrophosphate-dependent phosphofructokinase, a novel target in *Toxoplasma gondii*. *Biochem. Pharmacol.* 49(1):105-113.
- Pocalyko, D.J., L.J. Carroll, B.M. Martin, P.C. Babbitt y D. Dunaway-Mariano. 1990. Analysis of sequence homologies in plant and bacterial pyruvate phosphate dikinase, enzyme 1 of the bacterial phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system and other PEP-utilizing enzymes. Identification of potential catalytic and regulatory motifs. *Biochemistry.* 29(48):10757-10765.
- Ravdin, J.I. 1988. Pathogenesis of amebiasis: an overview. En: Ravdin, J.I. (ed). *Amebiasis. Human infection by Entamoeba histolytica*. John Wiley, Nueva York, pp 166-176.
- Reeves, R.E. 1968. A new enzyme with the glycolytic function of pyruvate kinase. *J.Biol.Chem.* 243(11):3202-3204.
- Reeves, R.E., R.A. Menzies y D.S. Hsu. 1968. The pyruvate-phosphate dikinase reaction. The fate of phosphate and the equilibrium. *J.Biol.Chem.* 243(20):5486-5491.
- Reeves, R.E. 1971. Pyruvate, phosphate dikinase from *Bacteroides symbiosus*. *Biochem.J.* 125: 531-539.
- Reeves, R.E., D.J. South, H.J. Blytt y L.G. Warren. 1974. Pyrophosphate: D-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase. A new enzyme with the glycolytic function of 6-phosphofructokinase. *J.Biol.Chem.* 249(24):7737-7741.
- Reeves, R.E. y J.D. Guthrie. 1975. Acetate kinase (pyrophosphate). A fourth pyrophosphate-dependent kinase from *Entamoeba histolytica*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 66(4):1389-1395.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Reeves, R.E., R. Serrano y D.J. South. 1976. 6-phosphofructokinase (pyrophosphate). *J.Biol.Chem.* 251(10): 2958-2962.
- Reeves, R.E. 1976. How useful is the energy in inorganic pyrophosphate?. *TIBS* 1:53-55.
- Reeves, R.E., L.G. Warren, B.Suskind y H.S. Lo. 1977. An energy-conserving pyruvate to acetate pathway in *Entamoeba histolytica*. *J.Biol.Chem.* 252(2):726-731.
- Roche, E. y P. Westhoff. 1990. Primary structure of pyruvate, orthophosphate dikinase in the dicotyledonous C₄ plant *Ficaria verna*. *FEBS letters.* 273(1,2):116-121.
- Rosenthal, B., Z. Mai, D. Caplivski, S. Ghosh, H. de la Vega, T. Graf y J. Samuelson. 1997. Evidence for the bacterial origin of genes encoding fermentation enzymes of the mitochondriate protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J. Bacteriol.* 179(11):3736-3745.
- Saavedra-Lira, E. y R. Pérez-Montfort. 1994. Cloning and sequence determination of the gene coding for the pyruvate phosphate dikinase of *Entamoeba histolytica*. *Gene.* 142:249-251.
- Saavedra-Lira, E. y R. Pérez-Montfort. 1996. Energy production in *Entamoeba histolytica*: New perspectives in rational drug design. *Arch.Med.Res.*27(3):257-264.
- Sepúlveda, B. 1982. Amebiasis: Host-pathogen biology. *Rev.Infect.Dis.* 4(6):1247-1253.
- Serrano, R. y R.E. Reeves. 1974. Glucose transport in *Entamoeba histolytica*. *Biochem.J.* 144:43-48.
- South, D.J. y R.E. Reeves. 1975. Pyruvate, orthophosphate dikinase from *Bacteroides symbiosus*. *Meth.Enzymol.* 42: 187-191.
- Takeuchi, T., E.C. Weinbach y L.S. Diamond. 1975. Pyruvate oxidase (CoA acetylating) in *Entamoeba histolytica*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*65: 591-596.
- Thrall, S.H., A.F. Mehl, L.J. Carroll y D. Dunaway-Mariano. 1993. Characterization of the covalent intermediates formed during pyruvate phosphate dikinase catalysis. *Biochemistry.* 32(7):1803-1809.
- Thrall, S.H. y D. Dunaway-Mariano. 1994. Kinetic evidence for separate catalysis by pyruvate phosphate dikinase. *Biochemistry.* 33(5): 1103-1107.
- Ullman, B. y D. Carter. 1995. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase as a therapeutic target in protozoal infections. *Infect.Agents Dis.*4(1):29
- Verlinde, C.L.M.J., E.A. Merrit, F.van den Akker, H. Kim, I. Feil, L.F. Delboni, S.C. Mande, S. Sarfaty, P.H. Petra y W.G.J. Hol. 1994. Protein crystallography and infectious diseases. *Prot.Sci.*3:1670-1686.

- Waleh, J. 1988. Prevalence of *Entamoeba histolytica* infection. En: Ravdin, J.I. (ed). *Amebiasis. Human infection by Entamoeba histolytica*. Wiley, Nueva York. pp 93-105
- Wang, H.C., L. Ciskanik, D. Dunaway-Mariano, W. von der Saal y J.J. Villafranca. 1988. Investigations of the partial reactions catalyzed by pyruvate phosphate dikinase. *Biochemistry*. 27(2):625-633.
- Weinbach, E.C. y L.S. Diamond. 1974. *Entamoeba histolytica*: I. Aerobic metabolism. *Exp. Parasitol.* 38:232-243.
- Weinbach, E.C. 1981. Biochemistry of enteric parasitic protozoa. *TIBS*. 6:254-257.
- Weinbach, E.C. 1988. Metabolism of *Entamoeba histolytica*. En: Ravdin, J.I. (ed). *Amebiasis. Human infection by Entamoeba histolytica*. Wiley, Nueva York.
- Wood, H.G. 1977. Some reactions in which inorganic pyrophosphate replaces ATP and serves as a source of energy. *Fed. Proceed.* 36(9):2197-2205.
- Xu, Y., L. Yankie, L. Shen, Y.S. Jung, P.S. Mariano y D. Dunaway-Mariano. 1995a. Location of the catalytic site for phosphoenolpyruvate formation within the primary structure of *Clostridium symbiosum* pyruvate phosphate dikinase. I. Identification of an essential cysteine by chemical modification with 1-¹⁴C bromopyruvate and site directed mutagenesis. *Biochemistry*. 34: 2181-2187.
- Xu, Y., M. McGuire y D. Dunaway-Mariano. 1995b. Separate site catalysis by pyruvate phosphate dikinase as revealed by deletion mutants. *Biochemistry*. 34:2195-2202.
- Yankie, L., Y. Xu y D. Dunaway-Mariano. 1995. Location of the catalytic site for phosphoenolpyruvate formation within the primary structure of *Clostridium symbiosum* pyruvate phosphate dikinase. 2. Site directed mutagenesis of an essential arginine contained within and apparent P-loop. *Biochemistry*. 34:2188-2194.

APÉNDICE

Review Article**Energy Production in *Entamoeba histolytica*: New Perspectives in Rational Drug Design¹**

EMMA SAAVEDRA-LIRA and RUY PEREZ-MONTFORT

Departamento de Microbiología, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

Received for publication October 3, 1995; accepted February 14, 1996 (95/124).

Abstract

The amoebicidal action of metronidazole is activated when the enzyme pyruvate:ferredoxin oxidoreductase transfers reducing equivalents to the nitro group of the drug. The enzyme is present in *Entamoeba histolytica* and other anaerobic parasites like *Giardia* and *Trichomonas* that lack mitochondria. The selectivity of the drug can be ascribed to the absence of the reductase in the human host. *E. histolytica* possesses other enzymes involved in glucose catabolism that are interesting for the rational design of new drugs. It has glycolytic enzymes that are important for the production of energy like phosphofructokinase, pyruvate

phosphate dikinase, phosphoenolpyruvate carboxytransferase, pyruvate carboxylase, and acetate thiokinase, which use pyrophosphate as a phosphate donor and have no human counterparts. The first part of this article describes the reactions by which *E. histolytica* obtains energy from glucose degradation, and includes recent advances in the cloning of genes for the various participating enzymes. The second part shows an alternative view for the study of target enzymes that are unique to the parasite, and indicates their importance in therapeutic research. (*Arch Med Res* 1996; 27:257)

KEY WORDS: *Entamoeba histolytica*; Glycolysis; Pyrophosphate; Enzyme; Drug development.**Introduction**

In research oriented to find drugs for the treatment of parasitic diseases, one is confronted with the dilemma of choosing the aspect of the parasite or the disease on which the therapeutic studies should be focused. What usually comes to mind is an outstanding trait of the parasite that preferably has no common features with the host. In *Entamoeba histolytica*, the agent that causes human amebiasis, there are several biochemical reactions that are quite different from their equivalents in the

human host. These characteristics may be interesting as starting points for new therapeutic approaches.

This protist parasite has been considered as a model of a primitive eukaryote since it lacks some structures that are considered "typically" eukaryotic (1-4). These amebas do not have peroxisomes or an evident Golgi apparatus. Their most striking characteristic is the absence of mitochondria, the organelles involved in energy production in most eukaryotic cells. Besides the nucleus, the most prominent structural feature is the presence of numerous vesicles whose functions remain unclear. On the metabolic level, amebas also diverge from characteristic eukaryotic cells. They lack a functional Krebs cycle and a typical electron transport chain, and several enzymes involved in the catabolism of glucose depend on pyrophosphate. Table 1 summarizes some of the features that make this parasite a very interesting organism from a biological point of view.

Correspondence to:

E. Saavedra-Lira, Depto. de Microbiología, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apdo. Postal 70242, 04510 México, D.F. Tel: (525) 622-5637.

¹Research on pyruvate phosphate dikinase is currently supported by a grant from DGAPA-UNAM (IN202693).

Table 1
General Features of *Entamoeba histolytica*

Morphology
• Absence of mitochondria and peroxisomes
• Undeveloped Golgi apparatus
• Numerous vacuoles and vesicles
Metabolism and Proteins
• Absence of cytochromes, tricarboxylic acid cycle and pentose phosphate shunt
• Cytoplasmic pyruvate:ferredoxin oxidoreductase/ferredoxin
• Pyrophosphate dependent kinases
• Lack of allosteric regulation in glycolysis
• Absence of the biosynthetic pathway of glutathione
• Highly divergent actin
• Highly divergent ubiquitin
• Undeveloped ubiquitin system
• Membrane bound digestive enzymes
• Vacuolar type proton pump in the plasma membrane
DNA and RNA Organization
• Absence of introns in most of the sequenced genes
• Extremely short untranslated 5' ends of mRNAs

During the 1970s the research groups led by Reeves and by Weinbach, among others, contributed a great amount of knowledge about the physiology of *E. histolytica*. These groups generated most of the information about the biochemistry and the functional morphology of *E. histolytica* (5,6) and on the metabolism of parasites that lack mitochondria (7-10).

In the following paragraphs we will review the pathways by which *E. histolytica* degrades glucose and obtains energy in the form of ATP, highlighting those properties that are unique to the parasite, and that in our opinion may be useful for therapeutic research.

Energy Metabolism in *E. histolytica*

E. histolytica degrades glucose to pyruvate by the classical glycolytic pathway. Two significant differences distinguish the metabolism of the parasite from that of its host. The first is that it lacks lactate dehydrogenase, thus, lactate is not a final product of glycolysis. The second is that it uses inorganic pyrophosphate (PPi) as a substitute for ATP in some glycolytic reactions (see Table 2) (11). PPi has a relevant physiological role in amebas, since its intracellular concentration is approximately 0.2 mM, higher than the K_m of PPi-dependent enzymes (11,12). Figure 1 shows the catabolism of glucose to pyruvate in

E. histolytica, highlighting the enzymes dependent on PPi.

Carbohydrate Metabolism: Glycolysis and PPi-Dependent Enzymes

The main products of glucose degradation in *E. histolytica* are ethanol, acetate and CO_2 . Their ratio depends on the degree of aerobicity. In aerobic conditions the ratio ethanol/acetate is 1/3, while in anaerobiosis the only products are ethanol and CO_2 (13,14).

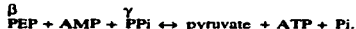
Glucose enters the cell by a specific transport mechanism (15) which is apparently the rate limiting step in the utilization of glucose, since no regulatory mechanism of glycolysis has been described. Free glucose has not been detected inside the cell, because it is immediately phosphorylated or stored as glycogen. All glycolytic enzymes are soluble and, even though some key enzymes of glycogen metabolism have been identified, the main enzyme glycogen synthetase has not been detected (6). Glucose-6-phosphate catabolized in glycolysis comes from glycogen by the action of phosphoglucomutase, or directly from phosphorylation of glucose that enters the cell by the action of a glucokinase, rather than by hexokinase. There is no indication that glucose-6-phosphate is degraded by the pentose phosphate shunt, since no activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase has been detected (5).

Phosphoglucoisomerase then produces fructose-6-phosphate. The subsequent reaction is the transformation of fructose-6-phosphate to fructose-1,6-bisphosphate. In most cells this transformation is catalyzed by an ATP-dependent phosphofructokinase in an irreversible reaction which is an important regulatory step in glycolysis. But in *E. histolytica* and other protist parasites like *Trichomonas vaginalis*, *Tritrichomonas foetus*, *Giardia lamblia*, *Toxoplasma gondii*, *Naegleria fowleri*, and in other non-parasitic protists, this step is catalyzed by a PPi-dependent phosphofructokinase. The reaction is reversible and apparently has no regulatory function in *E. histolytica* (10,16,17). The gene for this enzyme has been recently cloned and sequenced, and the deduced amino acid sequence was found to be similar to that of the corresponding enzymes of *Propionibacterium* and *Naegleria* (18).

Fructose-1,6-bisphosphate forms phosphoenolpyruvate through the normal glycolytic reactions of the Embden-Meyerhof pathway. Very recently, the gene for enolase, the enzyme that catalyzes the dehydration of 2-phosphoglycerate to phosphoenolpyruvate (PEP), has been cloned and sequenced (19).

The conversion of PEP to pyruvate is catalyzed by the enzyme pyruvate phosphate dikinase (PPDK). In 1968, Reeves (20) reported the purification of this enzyme, making it the first of the PPi-dependent enzymes described in amebas. PPDK catalyzes a similar reaction to that catalyzed by pyruvate kinase, which *E. histolytica* lacks

completely. The reaction for PPK is (21):



The enzyme transfers the phosphate from PEP and one phosphate from PPI to the β and γ positions of ATP, respectively. This reaction is completely reversible. The enzyme has a strict dependence on PPI as a donor of phosphate groups instead of ATP, and prefers AMP instead of ADP as the substrate to phosphorylate. The gene that codes for this protein has been identified (22,23). Preliminary evidence of the primary sequence suggests that the binding sites for PEP are different from those on pyruvate kinase (24).

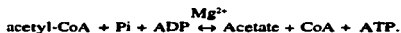
An alternative route for the formation of pyruvate from PEP is through the action of a PPI-dependent PEP-carboxytransphosphorylase (Table 2 and Figure 1). This enzyme fixes CO_2 and produces PPI and oxaloacetate, which is reduced to malate by a malate dehydrogenase with the concomitant oxidation of NADH. Malate is then decarboxylated and oxidized by a malic enzyme by reducing a molecule of NADP^+ . This alternative route has been postulated as a mechanism by which the ameba regenerates glycolytically reduced NAD^+ by the phosphoglycerate kinase reaction with a final transhydrogenation of NADH to NADPH (5).

Pyruvate Metabolism

Since *E. histolytica* has no mitochondria, it also lacks the tricarboxylic acid cycle, and thus, pyruvate plays a very important role in the final products of carbohydrate metabolism. Oxidative decarboxylation of pyruvate to acetyl-coenzyme A (acetyl-CoA) is catalyzed by a pyruvate:ferredoxin oxidoreductase instead of the classical pyruvate dehydrogenase complex. The first protein is either dimeric or tetrameric with a molecular mass of 240 kDa, while the second is a multienzymatic system with a particle weight of approximately 10^6 kDa. The pyruvate:ferredoxin oxidoreductase of *E. histolytica* was purified and characterized (25,26). It uses Fe-S ferredoxin protein, flavin mononucleotide

(FMN), flavin adenine dinucleotide (FAD) or riboflavin as acceptor, but not NAD^+ or NADP^+ . The reaction of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase, also named pyruvate synthetase, is reversible (26). The ferredoxin has been characterized (27) and the gene that encodes it has been cloned (28).

Acetyl-CoA can produce acetate with the help of an acetate thiokinase which has some specificity for adenine nucleotides (26). There is a net synthesis of a molecule of ATP, which provides additional energy to that produced by glycolysis:



E. histolytica also has an acetate kinase dependent on PPI (Table 2) whose exact function has not been determined (29). Alternatively, acetyl-CoA may be transformed into a thiohemiacetal bound to acetaldehyde dehydrogenase, which is then reduced to ethanol by an NADH-dependent alcohol dehydrogenase (30).

In 1971 Reeves, Montalvo and Lushbaugh (31) purified an NADPH-dependent alcohol dehydrogenase, which was later characterized by Lo and Chang (32). It is known that this enzyme reduces free acetaldehyde and that its alcohol dehydrogenase activity is apparently of less importance than that of another NADH-dependent enzyme.

The cloning of the gene and characterization of a NADPH-dependent aldehyde dehydrogenase which is independent of Co-A was described by Zhang and collaborators (33). The same group has also purified to homogeneity and cloned the gene for a NADPH-dependent alcohol dehydrogenase (34). A gene that encodes a 97 kDa enzyme for which activities of alcohol dehydrogenase and acetaldehyde dehydrogenase were characterized, was also described recently (35,36). This finding confirmed the first observations by Lo and Reeves (30) that the same protein could catalyze the activities of NADH aldehyde dehydrogenase and NAD⁺ alcohol dehydrogenase.

Table 2

Pyrophosphate Dependent Reactions in *E. histolytica* and Their Corresponding Nucleotide Dependent Reactions in Other Cells

Pyrophosphate dependent reactions (Enzyme reaction)	NTP dependent reactions (Enzyme reaction)
<i>Phosphofructokinase</i> $\text{PPI} + \text{Fru-6-P} \leftrightarrow \text{Fru-1,6-P}_2 + \text{Pi}$	<i>Phosphofructokinase</i> $\text{ATP} + \text{Fru-6-P} \rightarrow \text{Fru-1,6-P}_2 + \text{ADP}$
<i>Pyruvate phosphate dikinase</i> $\text{PEP} + \text{AMP} + \text{PPI} \leftrightarrow \text{pyruvate} + \text{ATP} + \text{Pi}$	<i>Pyruvate kinase</i> $\text{PEP} + \text{ADP} \rightarrow \text{pyruvate} + \text{ATP}$
<i>PEP carboxytransphosphorylase</i> $\text{PEP} + \text{Pi} + \text{CO}_2 \leftrightarrow \text{oxaloacetate} + \text{PPI}$	<i>PEP carboxykinase</i> $\text{PEP} + \text{GDP} + \text{CO}_2 \leftrightarrow \text{oxaloacetate} + \text{GTP}$
<i>PPI - acetate kinase</i> $\text{Acetyl-P} + \text{Pi} \rightarrow \text{acetate} + \text{PPI}$	<i>Acetate kinase</i> $\text{Acetyl-P} + \text{ADP} \leftrightarrow \text{acetate} + \text{ATP}$



Figure 1. Carbohydrate metabolism in *Entamoeba histolytica*. a) PPI-phosphofructokinase; b) ATP-phosphofructokinase; c) phosphoglycerate kinase; d) PEP carboxytransferase; e) PEP carboxykinase; f) malate dehydrogenase; g) malate dehydrogenase (decarboxylating); h) pyruvate kinase; i) pyruvate phosphate dikinase; j) pyruvate:ferredoxin oxidoreductase; k) acetate thiokinase; l) acetaldehyde dehydrogenase; m) alcohol dehydrogenase. *Nucleotide dependent enzymes absent in *E. histolytica*.

Apparently, NADH reduced by glycolysis can be reoxidized in the reactions associated to ethanol formation, and thus the transhydrogenation from NADH to NADPH in the formation of pyruvate may appear to be futile. But under aerobic conditions where acetate is formed, the reoxidation of NADH can be diminished, which is why this route may be an additional mechanism of regenerating NAD⁺ and forming NADPH. In addition, nicotinamide nucleotide transhydrogenase activity has been detected (37) and the gene that codes for this enzyme has been cloned (38,39). NADPH can donate reducing equivalents to a flavin by means of a NADPH-flavin oxidoreductase (40) and initiate electron transport.

Electron Transport

The mechanism of electron transport from reduced substrates to molecular oxygen in *E. histolytica* has not been clearly elucidated. Several studies have shown the absence of proteins with heme groups like cytochromes. Nevertheless, non-heme iron and acid labile sulfur have been detected in trophozoites (41). Weinbach (6) proposed that electrons flow from reduced substrates to NAD⁺ (P⁺), then to flavins, followed by an iron-sulfur protein which is similar to ferredoxin, then ubiquinone, and through an unknown acceptor which has an electronegative potential similar to cytochrome c. The

final electron acceptor is molecular oxygen which is reduced to water.

The function of this "aerobic" pathway for the generation of energy in the parasite is not clear. Even though ubiquinone has been detected in *E. histolytica* (which, as already mentioned, lack mitochondria) the concentration levels of this compound in the respiratory chain are between 5 and 50 times less than in other typically aerobic protists (42). There is no catalase in this parasite, so that it is unlikely that hydrogen peroxide is formed. Yet, it may have other oxygen intermediates like the superoxide anion, because the activity for superoxide dismutase has been detected (43) and the gene that codes for an iron-containing enzyme of this type has been cloned (44). It has been suggested that ubiquinone could have antioxidant properties in *Leishmania* (42). It remains to be established if it has a similar function in amebas.

Therapy of Parasitic Diseases

Worldwide, there is a great interest in developing drugs and vaccines against parasitic diseases. Both approaches should be complementary (45-47). This type of research requires the difficult step of identifying appropriate target molecules of the parasite for prophylaxis or treatment of the disease. This scheme has been applied to relatively few parasitic diseases, since it requires knowledge of the biology of the organism and of the interactions established in the host-parasite relationship.

There are currently two tendencies for the discovery of antiparasitic drugs: the empirical pathway and the rational pathway (48). The first consists of trying the antiparasitic activity of a great number of randomly selected compounds either in a pure state or in mixtures obtained generally from natural sources (49). This strategy does not require a great amount of information about the target molecule. Most of the drugs now in use have been developed from this type of strategy. Its origins can be traced back many centuries to natural medicine. Their effects can be currently enhanced considerably by biotechnological, analytical, organic synthesis, and computational methodologies (49).

The rational strategy consists of the recognition or design of a compound that has antiparasitic activity for which the specific target is known, and which preferably is a biochemical or metabolic idiosyncrasy of that organism. This molecule or lead is then used as a template to redesign, by computational methods, a similar molecule which has better inhibitory properties on the target molecule; generally an enzyme whose three-dimensional structure is known (50). Any compound, obtained by either of the two strategies, after being synthesized, must be tested for its relative toxicity in the host, its chemical stability, its metabolism, its ability to reach the right compartment, and other properties which turn out to be a tight bottleneck for many drug candidates.

Current Therapy of Amebiasis

The election of a drug for the treatment of amebiasis depends on the locale of the infection, i.e., intestinal or extraintestinal. Thus the drugs used for treatment are divided into those with luminal, systemic and mixed action (for reviews, see References 51-53). It should be noted that their mechanism of action is known in only a few cases.

Luminal agents. A common property of these compounds is their low absorption by the intestine. They are used for intestinal infections in which there has been no tissue damage. These drugs include diloxanide furate (Furamide), the group of halogenated 8-hydroxyquinolines like diiodohydroxyquin (Iodoquinol) and iodochlorohydroxyquin (Clioquinol or Enteroioform). The latter two drugs have an important toxic effect known as subacute myelitis-optic neuropathy which caused the interruption of their use in Japan (53).

Paromomycin (Humatin) is an amebicidal amino glycoside antibiotic that also has an effect on pathogenic and nonpathogenic intestinal microorganisms. Erythromycin and the tetracyclines - chlortetracycline, oxytetracycline and tetracycline - are agents that act at the level of the intestinal wall by apparently affecting enteric microorganisms which are essential for the proliferation of amebas.

Systemic agents. This category includes emetine which was used in natural medicine as the root of the *Ipecacuanha* plant. Emetine blocks the synthesis of proteins in the trophozoite by inhibiting the translocation of the peptidyl-tRNA-transferase in the ribosome from the aminoacyl to the peptidyl site (51). This drug distributes in various organs but concentrates mainly in the liver, and has severe adverse effects on the cardiovascular system. Dehydroemetine, an analogous compound, has less side effects, but requires the same precautions as those necessary for emetine. Chloroquine (Aralene) is another compound whose main action is in the liver because it is concentrated by this organ.

Anticellulogenes. The derivatives of nitroimidazole used most frequently in therapy of amebiasis are tinidazole (Fasigny), ornidazole (Tiberal) and metronidazole (Flagyl: 1 hydroxyethyl, 2 methyl, 5 nitroimidazole). Metronidazole is used very often since it has both luminal and systemic activities. These compounds have cytotoxic activity when their nitro group is reduced to free nitro radicals or superoxide anions. Activation intermediates of metronidazole apparently have their effect by altering the helical structure of DNA when they interact with guanines and cytosines (53,54).

In anaerobic protists, ferredoxin reduced by the action of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (in the oxidative decarboxylation of pyruvate to acetyl-CoA), can act as electron donor to the reactive group of nitroimidazoles, thus diverting them from the pathway for the production of energy (8,53). Oxygen is a strong competitor of

metronidazol as an electron acceptor. There is no reduction of the drug in its presence; therefore, the compound is more effective against anaerobic protists and bacteria such as *Trichomonas*, *Giardia* and *Bacteroides* (54). Current treatment with metronidazol lasts 10 days with relatively few secondary effects, but there are reports of its carcinogenic effect in rodents and its mutagenic effect in bacteria (Reference 52 and references therein; Reference 53).

An Alternative Approach to the Treatment of Amebiasis

What are some of the other alternatives for the development of drugs for the treatment of amebiasis? Although there are a great number of possibilities, the enzymes involved in several metabolic pathways have recently attracted attention of research groups for the development of antiparasitic drugs. Some examples of enzymes whose three-dimensional structures have been solved and are currently targets for rational drug design are hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase from protist parasites (55) and dihydrofolate reductase-thymidilate synthase from *Leishmania* (56). These proteins are involved in purine and pyrimidine synthesis. Trypanothione reductase from *Trypanosoma* is also being studied with this approach (50). The glycolytic enzymes triosephosphate isomerase and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase from *Trypanosoma* have been crystallized. Inhibitor prototypes have been designed based on knowledge of the three-dimensional structure with the aid of computational molecular modeling methods. Lead molecules that have some inhibitory effect are modified by a "linked fragment approach", i.e., the drug is designed by adding blocks or chemical groups to the lead compound, and these molecules are synthesized and tested in the laboratory. This and similar approaches have progressively improved the inhibitor activities of some compounds (57). From studies initiated by Reeves on the energy metabolism of *E. histolytica* we know it actively uses PPI in its carbohydrate metabolism. Humans do not share this peculiarity since our glycolysis is strictly dependent on ATP. Consequently, it has been proposed that the PPI-dependent enzymes of parasites provide good targets for therapeutic investigation. Reeves considered this possibility and used phosphonate derivatives as PPI analogs for the inhibition of these enzymes (10).

Competitive inhibition of PPI-dependent phosphofruktokinase in amebas by PPI analogs 1,1-hydroxyethyl diphosphonate; 1,1-hydroxyethylene bisphosphonate; 1,1-hydroxynonane diphosphonate and their tetrasodium salts has been reported (58). It was speculated that the inhibition of the enzyme by these compounds could be responsible for the reduced cytolytic activity of trophozoites against cells from hamster ovary (CHO).

PPDK, another PPI-dependent enzyme in the glycolytic pathway of amebas, could be a good target for the design of specific inhibitors. Some putative substrate binding regions have been determined in its primary sequence (23). The region proposed as the PEP binding site shows no similarity with the corresponding one in pyruvate kinase (24) which makes it ideal for designing specific drugs. PPDK from the parasite *Giardia intestinalis* has been purified and characterized and could be used for initial experiments with this parasite (59).

Other enzymes of carbohydrate metabolism whose inhibition was studied are alcohol dehydrogenase, which transforms acetaldehyde into ethanol, and the malic enzyme, that works in an alternative pathway of PPDK forming pyruvate. Several groups are interested in the study of alcohol dehydrogenase with therapeutic purposes and, as mentioned previously, several genes that encode these proteins have been cloned (33-36). González-Garza and collaborators (60) reported the inhibition of the malic enzyme and alcohol dehydrogenase of amebas by gossypol. This compound, which acts on NAD⁺ and NAD⁺ oxidoreductases, inhibited both enzymes in a non-competitive way. The levogyrous form was more active primarily against the malic enzyme. The same group has also reported the toxic effect of gossypol on trophozoites (61).

Conclusion

In recent years, there has been interest in the study of molecules, particularly enzymes that exist exclusively in some parasites and not in the human or other hosts, with the purpose of developing drugs that affect selectively the target without affecting the host. Based on previous knowledge of antiparasitic compounds and the determination of the three-dimensional structure of the target molecule, there are some examples of new prototype drugs whose therapeutic efficacy is now being tested. Examples of this are trypanothione reductase (50), triosephosphate isomerase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of trypanosomes (57).

The studies on the inhibition of glycolytic enzymes of many parasites have several advantages. In a great number of parasitic diseases, the organisms that infect their hosts generally obtain their energy from glycolysis. This is due to the abundant availability of glucose in the tissues of the host. The parasite does not use all the energy that can be extracted from a glucose molecule and wastes it secreting secondary metabolites like acetate, ethanol, succinate, etc. This is not only true for protist parasites but also for helminths (62).

Rational drug design has been possible due to a greater knowledge of the biochemistry of parasites and of the interactions between parasite and host cells: both target cells and cells involved in the response to this interaction. On the other hand, improvement of biochemical

technologies for the purification of proteins, enzymatic assays, knowledge of enzymatic function and determination of three-dimensional structures of proteins allow the understanding of details of target molecules and their probable ligands. In addition, recombinant DNA technology permits the determination of primary sequences of proteins, their expression and mutagenesis, which have in some cases contributed to the functional characterization of enzymes. All these advances will accelerate the development of new therapeutic strategies against parasitic diseases.

Acknowledgment

The authors thank Dr. Diego González-Halphen for critical review of the manuscript.

References

- Meza I. *Entamoeba histolytica*: phylogenetic considerations. *A review*. *Arch Med Res* 1992; 23(2):1.
- Bakker-Grunwald T, Wüstmann C. *Entamoeba histolytica* as a model for the primitive eukaryotic cell. *Parasitol Today* 1993; 9(1):27.
- Hasegawa M, Hashimoto T, Adachi J, Iwabe N, Miyata T. Early branchings in the evolution of eukaryotes: ancient divergence of *Entamoeba* that lacks mitochondria revealed by protein sequence data. *J Mol Evol* 1993; 36:380.
- Sogin ML, Hinkle G, Leipe D. Universal tree of life. *Nature* 1993; 362:795.
- McLaughlin J, Aley S. The biochemistry and functional morphology of the *Entamoeba*. *J Protozool* 1985; 32(2):221.
- Weinbach EC. Metabolism of *Entamoeba histolytica*. In Ravdin JJ, Ed. *Amebiasis. Human Infection by Entamoeba histolytica*. New York: John Wiley & Sons, 1988:69.
- Weinbach EC. Biochemistry of enteric parasitic protozoa. *Trends Biochem Sci* 1981; 6:254.
- Müller M. Energy metabolism of protozoa without mitochondria. *Annu Rev Microbiol* 1988; 42:465.
- Müller M. Energy metabolism of ancestral eukaryotes: a hypothesis based on the biochemistry of amitochondriate parasitic protists. *BioSystems* 1992; 28:33.
- Mertens E. ATP versus pyrophosphate: glycolysis revisited in parasitic protists. *Parasitol Today* 1993; 9(4):122.
- Reeves RE. How useful is the energy in inorganic pyrophosphate?. *Trends Biochem Sci* 1976; 1:53.
- Wood HG. Some reactions in which inorganic pyrophosphate replaces ATP and serves as a source of energy. *Fed Proc* 1977; 36(9):2197.
- MONTALVO FE, REEVES RE, WARREN LG. Aerobic and anaerobic metabolism in *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol* 1971; 30:249.
- Weinbach EC, Diamond LS. *Entamoeba histolytica*. I. Aerobic metabolism. *Exp Parasitol* 1974; 35:232.
- Serrano R, Reeves RE. Glucose transport in *Entamoeba histolytica*. *Biochem J* 1974; 144:43.
- Reeves RE, South DJ, Bhatt JJ, Warren LG. Pyrophosphate: D-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase. A new enzyme with the glycolytic function of 6-phosphofructokinase. *J Biol Chem* 1974; 249(24):7737.
- Reeves RE, Serrano R, South DJ. 6-phosphofructokinase (pyrophosphate). *J Biol Chem* 1976; 251(10):2958.
- Huang MH, Albach RA, Chang KP, Tripodi RL, Kemp RG. Cloning and sequencing a putative pyrophosphate-dependent phosphofructokinase gene from *Entamoeba histolytica*. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1260:215.
- Beanan MJ, Bailey GB. The primary structure of an *Entamoeba histolytica* enolase. *Mol Biochem Parasitol* 1995; 69:119.
- Reeves RE. A new enzyme with the glycolytic function of pyruvate kinase. *J Biol Chem* 1968; 243(11):3202.
- Reeves RE, Menzies RA, Hu DS. The pyruvate-phosphate dikinase reaction. The fate of phosphate and the equilibrium. *J Biol Chem* 1968; 243(20):5466.
- Saavedra-Lira E, Robinson O, Pérez-Monfroy R. Partial nucleotide sequence of the enzyme pyruvate, orthophosphate dikinase of *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS. *Arch Med Res* 1992; 23(2):39.
- Saavedra-Lira E, Pérez-Monfroy R. Cloning and sequence determination of the gene coding for the pyruvate phosphate dikinase of *Entamoeba histolytica*. *Gene* 1994; 142:249.
- Pocalyco DJ, Carroll JL, Martin BM, Babbitt PC, Dunaway-Mariano D. Analysis of sequence homologies in plant and bacterial pyruvate phosphate dikinase, enzyme I of the bacterial phosphoenolpyruvate sugar phosphotransferase system and other PEP-utilizing enzymes. Identification of potential catalytic and regulatory motifs. *Biochemistry* 1990; 29(48):10757.
- Takeuchi T, Weinbach EC, Diamond LS. Pyruvate oxidase (CoA acetylating) in *Entamoeba histolytica*. *Biochem Biophys Res Commun* 1975; 65:591.
- Reeves RE, Warren LG, Susskind B, Lo H-S. An energy-conserving pyruvate to acetate pathway in *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem* 1977; 252(2):726.
- Reeves RE, Guthrie JD, Lobelle-Rich P. *Entamoeba histolytica*: isolation of ferredoxin. *Exp Parasitol* 1980; 49:83.
- Huber M, Garfinkel L, Gittler C, Mirelman D, Revel M, Rozenblat S. Nucleotide sequence analysis of an *Entamoeba histolytica* ferredoxin gene. *Mol Biochem Parasitol* 1988; 31:27.
- Reeves RE, Guthrie JD. Acetate kinase (pyrophosphate). A fourth pyrophosphate-dependent kinase from *Entamoeba histolytica*. *Biochem Biophys Res Commun* 1975; 66(4):1389.
- Lo H-S, Reeves RE. Pyruvate to alcohol pathway in *Entamoeba histolytica*. *Biochem J* 1978; 171:225.
- Reeves RE, Montalvo FE, Luthbaugh TS. NADP-dependent alcohol dehydrogenase: the enzyme from *Entamoeba histolytica* and some enzyme inhibitors. *Int J Biochem* 1971; 2:55.
- Lo H-S, Chang CJ. Purification and properties of NADP-linked alcohol dehydrogenase from *Entamoeba histolytica*. *J Parasitol* 1982; 68(3):372.
- Zhang WW, Shen PS, Descoteaux S, Samuelson J. Cloning and expression of the gene for an NADP-dependent aldehyde dehydrogenase of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 63:157.
- Kumar A, Shen PS, Descoteaux S, Pohl J, Bailey G, Samuelson J. Cloning and expression of an NADP-dependent alcohol dehydrogenase gene of *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 85:1782.
- Yang W, Li E, Klotz T, Stanley SL. *Entamoeba histolytica* has an alcohol dehydrogenase homologous to the multifunctional adhE gene product of *Escherichia coli*. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 64:253.

36. Bruchhaus I, Tannich E. Purification and molecular characterization of the NAD⁺-dependent acetaldehyde/alcohol dehydrogenase from *Entamoeba histolytica*. *Biochem J* 1994; 303:743.
37. Harlow DR, Weinbach EC, Diamond LS. Nicotinamide nucleotide transhydrogenase in *Entamoeba histolytica*, a protozoan lacking mitochondria. *Comp Biochem Physiol* 1976; 53B:141.
38. Yu Y, Samuelson J. Primary structure of an *Entamoeba histolytica* nicotinamide nucleotide transhydrogenase. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 68:323.
39. Clark CG, Roger AJ. Direct evidence for secondary loss of mitochondria in *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92:6518.
40. Lo H-S, Reeves RE. Purification and properties of NADPH: flavin oxidoreductase from *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 1980; 2:23.
41. Weinbach EC, Diamond LS, Claggett CE, Kon H. Iron-sulfur proteins of *Entamoeba histolytica*. *J Parasitol* 1976; 62(1):127.
42. Ellis JE, Setchell KDR, Kaneshiro ES. Detection of ubiquinone in parasitic and free-living protozoa, including species devoid of mitochondria. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 65:213.
43. Weinbach EC, Takeuchi T, Claggett EC, Inohue F, Kon H, Diamond LS. Role of iron-sulfur proteins in the electron transport system of *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* 1980; 11:75.
44. Tannich E, Bruchhaus I, Walter RD, Horstmann RD. Pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*: identification and molecular cloning of an iron-containing superoxide dismutase. *Mol Biochem Parasitol* 1991; 49:61.
45. Milon G. Drugs or vaccines? *Parasitol Today* 1994; 10(10):402.
46. Cerami A, Warren KS. Drugs. *Parasitol Today* 1994; 10(10):404.
47. Tanner M, Evans D. Vaccines or drugs: complementarity is crucial. *Parasitol Today* 1994; 10(10):406.
48. Croft SL. A rationale for antiparasitic drug discovery. *Parasitol Today* 1994; 10(10):385.
49. Hudson AT. The contribution of empiricism to antiparasitic drug discovery. *Parasitol Today* 1994; 10(10):387.
50. Douglas KT. Rational drug design in parasitology. *Parasitol Today* 1994; 10(10):389.
51. Guamer V. Treatment and prevention of amebiasis. In Kretscher RR, Ed. *Amebiasis. Infection and Disease by Entamoeba histolytica*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990:221.
52. Norris SM, Ravdin JI. The pharmacology of antiamebic drugs. In Ravdin JI, Eds. *Amebiasis. Human Infection by Entamoeba histolytica*. New York: John Wiley & Sons, 1988:734.
53. Webster LT. Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections. In Goodman Gilman A, Rall TW, Nies AS, Taylor P, Eds. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York: Pergamon Press, 1990:999.
54. Müller M. Reductive activation of nitroimidazoles in anaerobic microorganisms. *Biochem Pharmacol* 1986; 35(1):37.
55. Ullman B, Carter D. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase as a therapeutic target in protozoal infections. *Infect Agents Dis* 1995; 4(1):29.
56. McKie JH. Homology modelling of the dihydrofolate reductase-thymidilate synthase bifunctional enzyme of *Leishmania major*, a potential target for rational drug design in leishmaniasis. *Drug Des Discov* 1994; 11(4):269.
57. Verlinde CLMJ, Merrit EA, van den Akker F, Kim H, Feil I, Delboni LF, Mande SC, Sarfay S, Petra PH, Hol WGJ. Protein crystallography and infectious diseases. *Prot Sci* 1994; 3:1670.
58. Jiménez CE, Cuevas RE, Jiménez CJM, Ortiz B. Eliminación *in vitro* del efecto citotóxico de *Entamoeba histolytica* por inhibición de su fosfofructoquinasa. *Rev Latinoam Microbiol* 1992; 34:275.
59. Hrdý I, Mertens E, Nohýnkova E. *Giardia intestinalis*: detection and characterization of a pyruvate phosphate dikinase. *Exp Parasitol* 1993; 76:438.
60. González-Garza MT, Matlin SA, Mata-Cárdenas BD, Saïd-Fernández S. *Entamoeba histolytica*: inhibition of malic enzyme and alcohol dehydrogenase by (+)-, (-)- and (-)- gossypol. *Arch Med Res* 1993; 24(2):183.
61. González-Garza MT, Matlin SA, Mata-Cárdenas BD, Saïd-Fernández S. Differential effects of the (+)- and (-)- gossypol enantiomers upon *Entamoeba histolytica* axenic cultures. *J Pharm Pharmacol* 1993; 45(2):144.
62. Tielsen AGM. Energy generation in parasitic helminths. *Parasitol Today* 1994; 10(9):346.