

03062

13
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

"CLONACION MOLECULAR DEL GENE QUE CODIFICA PARA LA PIRUVATO FOSFATO DICINASA DE *Entamoeba histolytica*"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A :
BIOL. EMMA CECILIA SAAVEDRA LIRA

MEXICO D.F.

MARZO 1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

A la memoria de la Dra. Aurora Brunner Liebshard.

A mis padres, por enseñarme que el amor incondicional sí existe.

A mis hermanos Toño, Juan, Ramón José y Benja por su cariño y por estar siempre en las buenas y en las malas.

A mis sobrinos José Carlos, Jimena, Montserrat, Juan Sebastián, Alejandro, Eli, Diego y los que vienen, esperando un futuro digno para ellos.

A mis amigos, ellos saben quiénes son y lo mucho que significan para mí.

A aquellos que me han querido de una forma diferente.

Agradecimientos.

Esta investigación se realizó en el Departamento de Microbiología del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, bajo la dirección del Dr. Ruy Pérez-Montfort.

Agradezco al Dr. Pérez Montfort el haberme permitido trabajar en su laboratorio, las magníficas oportunidades que me ha dado, su confianza y apoyo en mi desempeño profesional y por mantener un bonito grupo de trabajo.

Agradezco al Dr. Armando Gómez Puyou por la confianza que ha depositado en mí, al Dr. Juan Pedro Laclette por sus sugerencias y apoyo en el aprendizaje de algunas técnicas de biología molecular y por las oportunidades que me ha brindado, a los Dres. Alicia González Manjarrez y Roberto Coria Ortega por el tiempo dedicado a la revisión de ésta tesis, al Dr. Roberto Hernández Fernández por sus sugerencias en los tutoriales.

Agradezco a la Biól. Nallely Cabrera y a la Dra. Laura Ongay-Larios por su apoyo técnico.

Mil gracias a Octavio Robinson por haberme llevado a ése laboratorio y por su amistad desde los primeros años en éste instituto, a Nallely y Laurita por escucharme siempre, a mis compañeros de laboratorio María Elena, Laila, Miriam, Judith, Pedro y Lino por formar un equipo de trabajo divertido.

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

RESUMEN

La transformación de fosfoenolpiruvato a piruvato es un paso fundamental en la glucólisis. En la mayoría de las células ésta reacción es catalizada por la piruvato cinasa, sin embargo, en el parásito protoctista *Entamoeba histolytica* no se ha detectado actividad para ésta enzima. En éste organismo se ha descrito una enzima denominada Piruvato Fosfato Dicinasa (PPDK) que cataliza la reacción equivalente a la de la piruvato cinasa.

En éste trabajo se clonó y se determinó la secuencia de nucleótidos del gene que codifica para la PPDK de *Entamoeba histolytica*. La secuencia de aminoácidos deducida mostró similitudes con las secuencias reportadas para *Bacteroides symbiosus*, *Flaveria trinervia* y maíz. Así mismo, el análisis de la secuencia y su alineamiento permitió realizar una serie de predicciones que nos pueden sugerir los sitios de unión de sustratos, así como detalles de la estructura tridimensional de la proteína.

ABREVIATURAS

Acetil-P	Fosfato de acetilo
Acetil-CoA	Acetil- Coenzima A
ADP	Difosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albúmina de suero de bovino
DNA	Acido desoxiribonucleico
cDNA	DNA complementario al RNA mensajero
rDNA	DNA que codifica para el RNA ribosomal
EDTA	Acido etilén diamino tetracético
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FMN	Flavín mononucleótido
GDP	Difosfato de guanosina
GTP	Trifosfato de guanosina
kDa	kiloDaltones
NADP	Nicotín adenín dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotín adenín dinucleótido fosfato forma reducida
NBRF/PIR	National Biomedical Research Foundation/Protein Information Resource
NTP	Nucleótido trifosfato
pb	pares de bases
PEP	Fosfoenolpiruvato
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
Pi	Fosfato inorgánico
PPi	Pirofosfato
PPDK	Piruvato Fosfato Dicinaasa
PTS	Sistema de transporte de azúcares dependiente de fosfoenolpiruvato
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Tris	Tris (hidroximetil) amino metano
RNA	Acido ribonucleico
mRNA	RNA mensajero

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	
I.1 Amibiasis: perspectiva general	1
I.2 Características generales de <i>Entamoeba histolytica</i>	3
I.3 El metabolismo energético en <i>E. histolytica</i>	6
I.3.1 Metabolismo de los carbohidratos: Glucólisis y enzimas dependientes de pirofosfato	9
I.3.2 Conversión de PEP a piruvato por la Piruvato Fosfato Dicinaasa de <i>E. histolytica</i>	10
I.3.3 Metabolismo del piruvato	11
I.3.4 Transporte de electrones	14
I.4. Antecedentes de la enzima Piruvato Fosfato Dicinaasa (PPDK)	17
I.4.1. Propiedades físicas y moleculares de la PPDK	18
I.4.2. Estequiometría y mecanismo	19
I.4.3. Cinética y regulación	21
I.4.4. Genética de la PPDK	22
II. OBJETIVO	25
III. METODOLOGÍA	26
IV. RESULTADOS	29
V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	36
PERSPECTIVAS	42
REFERENCIAS	43
APÉNDICE	50

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Amibiasis: perspectiva general.

La amibiasis es la infección humana causada por el parásito protoctista *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903. Este organismo generalmente vive como comensal en el lumen del intestino grueso, sin embargo, puede invadir la mucosa intestinal produciendo disentería o ameboma o atravesar la pared intestinal y dar lugar a lesiones extraintestinales, principalmente en el hígado (Martínez-Palomo, 1982).

A pesar de que la amibiasis está ampliamente distribuida a nivel mundial, con una incidencia del 10%, solamente un pequeño porcentaje de los infectados presenta lesiones graves como colitis hemorrágica o abscesos extraintestinales (Walsh, 1988). Esta enfermedad afecta principalmente a poblaciones subalimentadas que viven en condiciones sanitarias precarias y que carecen de una adecuada instrucción en higiene, por lo tanto, es una de muchas enfermedades que se asocian a la pobreza e ignorancia (Sepúlveda, 1982). En nuestro país, esta enfermedad se encuentra entre las 10 causas principales de muerte, con una incidencia del 2 al 5%, dependiendo de la zona geográfica (Carrol, Farr y Clifton, 1981).

Debido a la amplia distribución de la amibiasis en nuestro país, es de suma importancia conocer los factores que permiten al parásito invadir la mucosa intestinal, entrar a los vasos sanguíneos y diseminarse a otros órganos. Basándose en numerosas observaciones de la patogénesis amibiana, aparentemente existen varios pasos que llevan a la invasión de los tejidos del hospedero (Ravdin, 1988). Entre ellos se encuentran:

1. Colonización del intestino por amibas con capacidades virulentas.
2. Disrupción de la mucosa del intestino causada por enzimas o productos tóxicos e involucrando contacto íntimo o adherencia a la mucosa intestinal.
3. Lisis de las células del intestino y de las células inflamatorias del hospedero, provocando la invasión de la mucosa, úlceras del cólon y lisis tisular.
4. Resistencia a los mecanismos de defensa celular que resultan en la invasión de órganos distantes.

Existe una gran controversia sobre la patogenicidad o no patogenicidad de ciertas cepas amebianas o sobre la virulencia de las mismas. Esta confusión se deriva por el uso indiscriminado de los términos patogenicidad y virulencia: patogenicidad es la capacidad de una cepa de causar enfermedad mientras que la virulencia se refiere al grado ó la medida de tal capacidad (Montfort y Pérez-Tamayo, 1994). Actualmente se ha llegado al acuerdo de que los diferentes aislados de *E. histolytica* considerados "patógenos" y "no patógenos" deben ser catalogados como dos especies distintas: *E. histolytica* Schaudinn, 1903 y *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925, respectivamente. Esto implica que *E. histolytica* es un patógeno de virulencia variable en ciertas condiciones (Clark y Diamond, 1994).

A pesar de que existen ciertas evidencias que sugieren que hay diferencias a nivel genético entre "amibas patógenas" y "amibas no patógenas", existe también el punto de vista de Mirelman y Orozco cuyos resultados sugieren una interconversión entre ésos dos fenotipos

(McKerrow, 1994). La controversia persistirá hasta que no conozcamos en detalle la biología de la amiba.

La mayor parte de los grupos de investigación en el campo de la amibiasis se han enfocado en determinar el factor o los factores que permiten el establecimiento de una relación con el hospedero humano y con la producción de enfermedad. Sin embargo, también es de suma importancia conocer la biología celular de la amiba, en sus aspectos estructurales y funcionales, que permitirán un conocimiento más profundo del parásito, lo que puede llevar a entender mejor la patogénesis de la enfermedad.

1.2 Características generales de *Entamoeba histolytica*.

Entamoeba histolytica es un organismo unicelular que presenta una fase móvil, el trofozoíto, que es el causante de la enfermedad y una forma inmóvil, infectiva, que es el quiste. El trofozoíto posee un ectoplasma que continuamente está modificando su forma debido a la locomoción del parásito. Esta se lleva a cabo a través de pseudópodos, que además sirven para la nutrición.

Este organismo ha sido considerado en muchos casos como un modelo de una célula eucariótica "primitiva" (Meza, 1992; Bakker-Grunwald y Wöstmann, 1993; Hasegawa *et al*, 1993; Sogin, Hinkle y Leipe, 1993). Este parásito carece de algunas estructuras típicamente eucariontes, la más notable es la falta de mitocondrias, organelos involucrados en la producción de energía; además no contiene

peroxisomas, ni un aparato de Golgi evidente. Aparte del núcleo, la característica estructural más evidente es la presencia de numerosas vesículas. A nivel funcional éste parásito también se aparta de las características típicamente eucariontes que se revisarán posteriormente.

La tabla I resume algunas características de *E. histolytica*.

TABLA I

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *Entamoeba histolytica*.

Morfología

- Ausencia de mitocondrias y peroxisomas
- Aparato de Golgi subdesarrollado

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.

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

Organización del DNA y RNA

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

* tomado de Bakker-Grunwald y Wöstmann, 1993.

Todas esas características han sido consideradas como las bases para colocar a *E. histolytica* junto con *Giardia* y *Vairimorpha* (un microsporidio) en un nuevo subreino denominado Arquezoa, que incluye a aquellos organismos cuyos ancestros se ramificaron de la línea principal eucarionte antes de que la simbiosis con las protomitocondrias ocurriera (Bakker-Grunwald y Wöstmann, 1993)

1.3 El metabolismo energético en *E. histolytica*.

Se han escrito diversas revisiones sobre la bioquímica y morfología funcional de *E. histolytica* (McLaughlin y Aley, 1985; Weinbach, 1988) además de varias en las que se trata el metabolismo de parásitos que carecen de mitocondrias (Weinbach, 1981; Müller, 1988; Müller, 1992; Mertens, 1993). El siguiente tema que se tratará, es sobre el metabolismo de los carbohidratos.

En *E. histolytica*, la glucosa es degradada a piruvato por la vía glucolítica clásica. Sin embargo existen dos diferencias significativas que distinguen a éste parásito de su hospedero: la falta de una lactato deshidrogenasa (por lo cual el lactato no es un producto final de la glucólisis) y el uso del pirofosfato inorgánico en lugar del ATP en algunas reacciones glucolíticas (Tabla II) (Reeves, 1968; Reeves, 1976). La concentración de pirofosfato intracelular en el parásito se encuentra alrededor de 0.2mM, la cual está por arriba de la K_m de las enzimas dependientes de pirofosfato, por lo que éste compuesto tiene relevancia fisiológica (Reeves, 1976; Wood, 1977). La figura 1 muestra el catabolismo de la glucosa hasta piruvato en *E. histolytica*, así mismo se indican las enzimas dependientes de pirofosfato.

TABLA II

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

Reacciones clásicas dependientes de NTP	Reacciones dependientes de pirofosfato.
$ATP + \text{Fru-6-P} \rightarrow \text{Fru-1,6-P}_2 + ADP$ <i>Fosfofructocinasa dependiente de ATP</i>	$PPi + \text{Fru-6-P} \leftrightarrow \text{Fru-1,6-P}_2 + Pi$ <i>Fosfofructocinasa dependiente de PPi</i>
$PEP + ADP \rightarrow \text{piruvato} + ATP$ <i>Piruvato cinasa</i>	$PEP + AMP + PPi \leftrightarrow \text{piruvato} + ATP + Pi$ <i>Piruvato fosfato dicinasa</i>
$PEP + GDP + CO_2 \leftrightarrow \text{oxaloacetato} + GTP$ <i>PEP carboxicinas</i>	$PEP + Pi + CO_2 \leftrightarrow \text{oxaloacetato} + PPi$ <i>PEP carboxitransfosforilasa</i>
$\text{Acetil-P} + ADP \leftrightarrow \text{acetato} + ATP$ <i>Acetato cinasa</i>	$\text{Acetil-P} + Pi \rightarrow \text{acetato} + PPi$ <i>PPi-acetato cinasa</i>

* tomado de Mertens, 1993

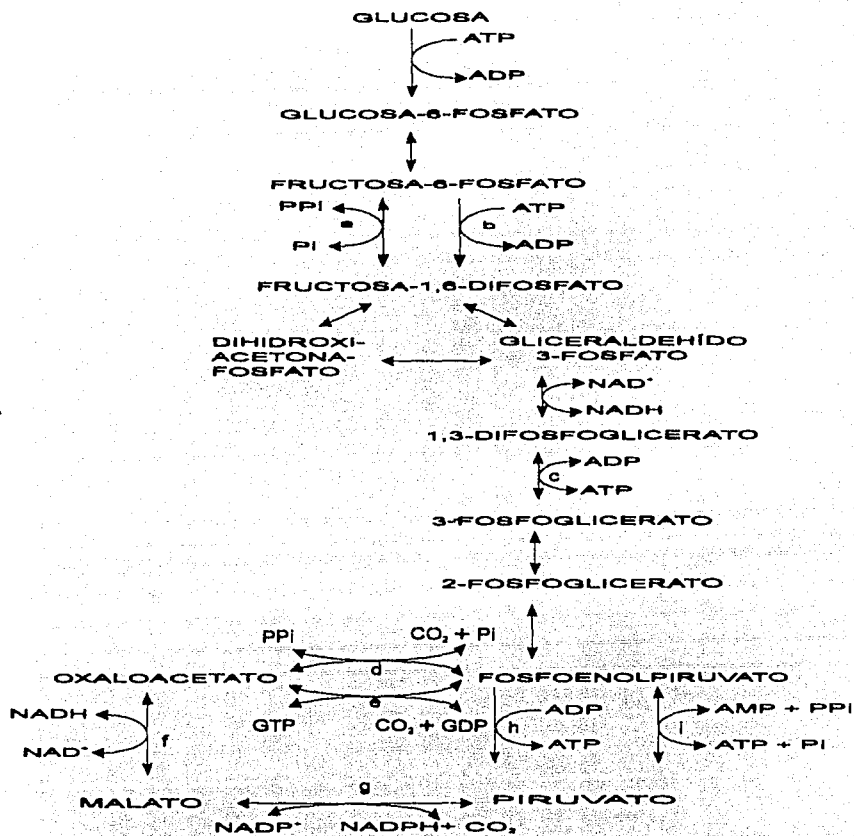


Fig. 1 Metabolismo de los carbohidratos en *Entamoeba histolytica*.

a) Fosfofructocinasa dependiente de PPI; b) Fosfofructocinasa dependiente de ATP*; c) cinasa del fosfoglicerato; d) PEP carboxitransfosforilasa; e) PEP carboxicinas*; f) malato deshidrogenasa; g) malato deshidrogenasa (descarboxilante); h) piruvato cinasa*; i) piruvato fosfato dicinasa.

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

I.3.1. Metabolismo de los carbohidratos: Glucólisis y enzimas dependientes de pirofosfato.

Los productos principales de la degradación de la glucosa en *E. histolytica* son etanol, acetato y CO₂ 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 CO₂ (Montalvo, Reeves y Warren, 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 éste es el paso limitante en la utilización de glucosa, ya que no se han descrito mecanismos regulatorios en la glucólisis. No se ha detectado glucosa libre, ya que es inmediatamente fosforilada o almacenada como glucógeno. A pesar de que se han podido identificar algunas enzimas clave del metabolismo del glucógeno, no se ha detectado la enzima principal: glucógeno sintetasa (Weinbach, 1988). La glucosa 6-fosfato que es catabolizada en la glucólisis proviene del glucógeno vía la acción de la fosfoglucomutasa o directamente a través de la fosforilación de la glucosa que entra a la célula por la acción de una glucoquinasa, más que por una hexoquinasa. No se ha detectado actividad de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa que indique que la glucosa-6-fosfato sea degradada por la vía de las pentosas.

La acción secuencial de una fosfoglucoisomerasa produce fructosa-6-fosfato. La siguiente reacción es la conversión de fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-bifosfato. En la mayoría de las células ésta reacción está catalizada por una fosfofructocinasa dependiente de ATP en una reacción irreversible y que es un punto de regulación alostérica de la glucólisis.

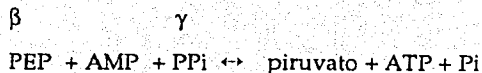
Sin embargo, en parásitos como *E. histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, *Tritrichomonas foetus*, *Giardia lamblia*, *Toxoplasma gondii* y *Naegleria fowleri*, además de otros protoctistas no parásitos, este paso es catalizado por una fosfofructocinasa dependiente de pirofosfato, en una reacción reversible, que aparentemente no tiene una función reguladora en la amiba (Reeves *et al*, 1974; Reeves, Serrano y South, 1976; Mertens, 1993).

La fructosa -1,6 difosfato forma PEP a través de las secuencias glucolíticas normales de la vía de Embden-Meyerhof. Todas las enzimas glucolíticas son solubles.

I.3.2 Conversión de PEP a piruvato por la Piruvato Fosfato Dicinasa de *E. histolytica*.

La conversión de PEP a piruvato la cataliza la enzima piruvato fosfato dicinasa, que es el punto de interés de ésta tesis de maestría, por lo que posteriormente se hará referencia más extensa sobre ésta enzima.

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 amibas y la reacción inversa en plantas. La reacción es la siguiente (Reeves, Menzies y Hsu, 1968):



La enzima transfiere el grupo fosfato del PEP y un grupo fosfato del pirofosfato a las posiciones β y γ en el AMP, respectivamente.

Se determinó que ésta reacción es completamente reversible, la enzima tiene una estricta dependencia de pirofosfato en lugar de ATP como donador de grupos fosfato y prefiere el AMP, en lugar del ADP, como sustrato a fosforilar.

Una ruta alternativa para la formación de piruvato a partir de PEP es a través de la acción de una PEP carboxitransfosforilasa dependiente de pirofosfato (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 ameba regenera el NAD^+ reducido glucolíticamente, a través de una transhidrogenación del NADH al NADPH (McLaughlin y Aley, 1985).

I.3.3. Metabolismo del piruvato.

Al ser *E. histolytica* un eucarionte sin mitocondrias no es de sorprenderse que también carezca del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, por lo que el piruvato juega en éste 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 una piruvato: ferredoxina oxidoreductasa (Kerscher y Oesterhelt, 1982) en lugar del complejo de la piruvato deshidrogenasa presente en la mayoría de las células. La primera es una proteína dimérica o tetramérica de aproximadamente 240 kDa mientras que el segundo es un sistema multienzimático con un peso partícula de aproximadamente 10^3 kDa. La piruvato: ferredoxina oxidoreductasa de *E. histolytica* fué purificada y caracterizada (Takeuchi, Weinbach y Diamond, 1975; Reeves *et al*, 1977) y utiliza como aceptores la proteína Fe-S ferredoxina, FMN, FAD ó riboflavina, pero no NAD^+ ó NADP^+ . La reacción de la piruvato:ferredoxina oxidoreductasa es reversible, por lo que también se le ha denominado a éste complejo piruvato sintetasa (Reeves *et al*, 1977). Ya se ha caracterizado a la ferredoxina (Reeves, Guthrie y Lobelle-Rich, 1980) y recientemente se ha clonado el gene que la codifica (Huber *et al*, 1988).

La acetil-CoA puede dar lugar a acetato por una acetato tiocinasa 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 producida en la glucólisis:



Además *E. histolytica* contiene una acetato quinasa dependiente de pirofosfato, para la cual no se ha determinado exactamente su función (Reeves y Guthrie, 1975).

Alternativamente, la acetil-CoA se transforma a etanol a través de su conversión a un tiohemiacetal unido a la enzima acetaldehído deshidrogenasa, el cual es reducido a etanol por una alcohol deshidrogenasa dependiente de NADH (Lo y Reeves, 1978). Inicialmente Reeves, Montalvo y Lushbaugh (1971) purificaron una alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH, la cual se caracterizó posteriormente (Lo y Chang, 1982). Ahora se sabe que ésta enzima reduce acetaldehído libre y aparentemente su actividad es de menor importancia comparada con la enzima dependiente de NADH.

Recientemente se ha incorporado la tecnología del DNA recombinante para el estudio de éstas enzimas. El grupo de Samuelson describió la clonación del gene y la caracterización de una aldehído deshidrogenasa dependiente de NADP⁺ que es independiente de Co-A (Zhang *et al*, 1994). En cuanto a la alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH, éste mismo grupo la purificó a homogeneidad y clonó el gene que la codifica (Kumar *et al*, 1992).

Se identificó una enzima de 97 kDa con actividades de alcohol deshidrogenasa y acetaldehído deshidrogenasa, de la cual se clonó el gene (Yang *et al*, 1994) y se caracterizó (Bruchhaus y Tannich, 1994). Este hecho confirmó las primeras observaciones realizadas por Reeves (1971) que las actividades de NADH aldehído deshidrogenasa y NAD⁺-alcohol deshidrogenasa podían residir en una sola proteína.

Aparentemente, el NADH reducido glucolíticamente puede ser reoxidado en las reacciones asociadas a la formación de etanol, y así, la transhidrogenación NADH a 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 disminuída, 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 oxidoreductasa (Lo y Reeves, 1980) e iniciar la transferencia de electrones que a continuación se describe.

1.3.4 Transporte de electrones.

El mecanismo de transporte de electrones desde sustratos reducidos hasta el oxígeno molecular todavía no se ha elucidado con exactitud en *E. histolytica*. Diversos estudios han indicado la falta de proteínas con grupos hemo. Sin embargo se ha detectado hierro no hémico y azufre lábil a ácidos en trofozoitos (Weinbach *et al*, 1976). Weinbach (1988) propuso un esquema del flujo de electrones (Fig.2) desde sustratos reducidos al NAD(P) , a flavinas, posteriormente a una proteína fierro-azufre similar a la ferredoxina, seguida por ubiquinona y después a un aceptor desconocido que posee un potencial electronegativo similar al del citocromo c. El aceptor de electrones final es oxígeno molecular, el cual es reducido a agua .

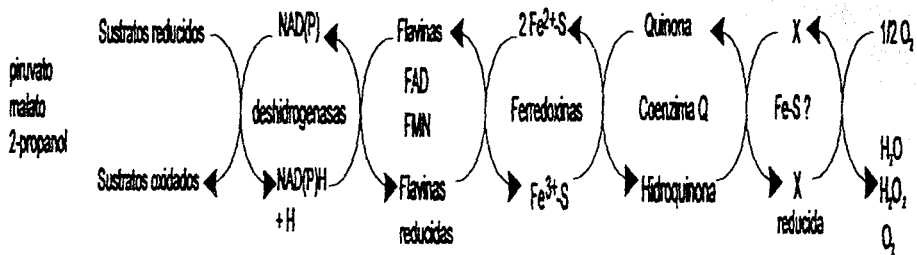


Fig.2 Flujo de electrones en la cadena respiratoria amibiana.
Tomado de Weinbach, 1988.

Hay que hacer notar que la función de ésta ruta "aeróbica" en la generación de energía de éste parásito no es muy clara. A pesar de que se ha detectado ubiquinona en *E. histolytica* (un organismo carente de mitocondrias) los niveles de éste componente de la cadena respiratoria se encuentran entre 5 y 50 veces menos concentradas que en otros protoctistas típicamente aeróbicos (Ellis, 1994; Ellis, Setchell y Kaneshiro, 1994).

Ya que no existe catalasa en éste parásito, parece poco probable que se forme peróxido de hidrógeno. Sin embargo, otro tipo de intermediarios del oxígeno como el anión superóxido probablemente se encuentran, ya que se ha detectado actividad de superóxido dismutasa (Weinbach *et al*, 1980) y se ha clonado el gene que codifica para una enzima de éste tipo que contiene fierro (Tannich *et al* 1991). También se le ha adjudicado a la ubiquinona propiedades antioxidantes en el parásito *Leishmania*. Queda por determinar si existe una función similar de la ubiquinona en la amiba (Ellis, Setchell y Kaneshiro, 1994).

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. Estos compuestos poseen actividad citotóxica cuando se reduce su grupo nitro. En protoctistas anaeróbicos la ferredoxina reducida por la reacción de la piruvato:ferredoxina oxidoreductasa es el donador de electrones a ése grupo reactivo de los

nitroimidazoles, lo que los hace reactivos en su actividad como antiparasítico (Müller, 1986).

1.4. Antecedentes de la enzima Piruvato Fosfato Dicinaasa (PPDK).

La PPDK se describió por primera vez en 1968 en dos organismos: el maíz y *E. histolytica*.

Hatch y Slack describieron el aislamiento de una enzima que cataliza la interconversión reversible de piruvato a fosfopiruvato (PEP), la cual tenía su función en la vía de los ácidos dicarboxílicos de cuatro carbonos (C_4). Estos investigadores designaron a la enzima fosfopiruvato sintetasa. Los pasos iniciales de la fijación de bióxido de carbono en pastos tropicales (plantas C_4) involucran la carboxilación del PEP por la PEP carboxilasa en las células mesófilas, seguida por la reducción del oxaloacetato formado por una malato deshidrogenasa para su posterior descarboxilación en las células túnculo vasculares por cualquiera de tres descarboxilasas: enzimas málicas dependientes de $NADP^+$ ó NAD^+ ó por una PEP carboxicinaasa. Es así como se concentra el CO_2 en las células fotosintéticas y se regenera piruvato. Para completar el ciclo, el piruvato es convertido a PEP por la fosfopiruvato sintetasa (PPDK), regenerándose el aceptor inicial. Esta ruta es conocida actualmente como la ruta de Hatch y Slack para la fijación de bióxido de carbono (Hatch y Slack, 1968). Es interesante notar que en *E. histolytica* la ruta alternativa para la formación de piruvato tiene una serie de reacciones similares a ésta ruta de plantas (ver apartado 1.3.2)

Por otro lado y casi al mismo tiempo, Reeves (1968) reportó el aislamiento y caracterización a partir de extractos de *E. histolytica* de una nueva enzima con la función glucolítica de la piruvato cinasa. Determinó que diferente a las piruvato cinasas (las cuales utilizan como sustrato al ADP) ésta enzima prefería al AMP y que era inactiva en ausencia de pirofosfato; le asignó el nombre de piruvato fosfato ligasa (AMP) ó PPDK. Este descubrimiento fué importante ya que como se mencionó anteriormente, no se había detectado actividad de piruvato cinasa en extractos de trofozoítos amibianos. Posteriormente se describió el aislamiento de enzimas similares en *Bacteroides symbiosus* (Reeves, 1971), *Acetobacter xylinum* (Benziman y Palgi, 1970) y más recientemente se reportó la purificación de la enzima en trofozoítos del parásito *Giardia intestinalis* (Hrdý, Mertens y Nohýnková, 1993).

1.4.1 Propiedades físicas y moleculares de la PPDK.

Las propiedades físicas y moleculares de varias PPDK han sido reportadas (South y Reeves, 1975; Benziman, 1975; Milner, Michaels y Wood, 1975; Hatch y Slack, 1975).

La PPDK de maíz es un homotetrámero cuyas subunidades tienen una masa de 94 kDa. Al igual que otras PPDK, es relativamente lábil: se inactiva en ausencia de compuestos tiol, ausencia de Mg^{2+} y a temperaturas por debajo de 10°C. Esta inactivación se puede prevenir por la adición de concentraciones fisiológicas de piruvato o PEP. La enzima de *B. symbiosus* es un homodímero cuyas subunidades tienen una masa molecular de 94 kDa estimada por geles de poliacrilamida-SDS.

1.4.2 Estequiometría y mecanismo.

El mecanismo de reacción de la PPK se determinó para plantas (Evans y Wood, 1968) y *B. symbiosus* (Reeves, Menzies y Hsu, 1968), éste último organismo también carente de piruvato cinasa. El esquema principal es el que se mencionó previamente y consiste en la transferencia del grupo fosfato del PEP al AMP en la posición β y un grupo fosfato del pirofosfato en la posición γ del ATP final. A diferencia de la enzima de ameba, la de bacteria se activa fuertemente por iones amonio.

La dirección fisiológica de operación de la PPK es diferente en éstos organismos. En plantas C_4 funciona hacia la síntesis de PEP, aunque la energética de la reacción favorece la reacción inversa a pH de 7.0, como en el caso de bacterias y amebas. En plantas ésta reacción se asegura por la presencia de altos niveles de adenilato cinasa y pirofosfatasa (Edwards *et al*, 1985), aspecto completamente diferente para amebas, por la ausencia de las últimas.

Los primeros reportes indicaron que por cada equivalente de piruvato utilizado en la reacción, un equivalente de ATP desaparece y se genera un equivalente de PEP para la reacción en plantas. Esto también es válido para la reacción inversa.

A través de marcaje isotópico y digestión tróptica, se identificó un péptido con la secuencia GGMTSHAAVVAR cuyo residuo histidil es el aceptor de los grupos fosforilo del PEP y pirofosfato (Goss, Evans y Wood, 1980). Así mismo, se identificó que éste mismo péptido contiene el residuo treonil que es susceptible de fosforilarse por la proteína PDRP (pyruvate phosphate dikinase regulatory protein, Burnell y Hatch, 1986)

ó BFRP (bifunctional regulatory protein) y que regula el estado de activación o desactivación en plantas (Roeske *et al*, 1988). Este mismo grupo de investigadores reportó tempranamente que el sitio de unión de AMP/ATP es independiente del sitio de unión del PEP/piruvato (Evans, Goss y Wood, 1980) y por estudios de competencia entre los diferentes sustratos se determinó que la enzima posee un mecanismo catalítico de tipo ping-pong (Milner y Wood, 1976). Más recientemente, a través de estudios del efecto de la ocupación de un sustrato en la catálisis en un segundo sitio de la enzima bacteriana, se ha sugerido que ésta contiene sitios separados e independientes para la unión del ATP/AMP y piruvato/PEP (Thrall y Dunaway-Mariano, 1994). Así mismo, utilizando técnicas de proteólisis y marcaje isotópico con los diferentes sustratos, se ha identificado a nivel de la estructura primaria las regiones que están involucradas en la unión de los sustratos. Estos resultados sugieren fuertemente que la enzima está arreglada en dominios estructurales (Carroll *et al*, 1994).

Se han propuesto dos mecanismos de reacción diferentes para la PPK de maíz y bacteria (Jenkins y Hatch, 1985; Wang *et al*, 1988; Carroll *et al*, 1990):

Bacteria	Plantas
1) $E_{His} + ATP \leftrightarrow E_{His}P^{\beta} p\gamma + AMP$	1) $E_{His} + ATP + Pi \leftrightarrow E_{His}P^{\beta} + AMP + p\gamma Pi$
2) $E_{His} P^{\beta} p\gamma + Pi \leftrightarrow E_{His}P^{\beta} + p\gamma Pi$	2) $E_{His}P^{\beta} + \text{piruvato} \leftrightarrow E_{His} + PEP^{\beta}$
3) $E_{His}P^{\beta} + \text{piruvato} \leftrightarrow E + PEP^{\beta}$	

La diferencia básica entre los dos esquemas es el intermediario pirofosforil-enzima en la reacción que cataliza la enzima bacteriana. Estos mecanismos se han propuesto a partir de estudios en los cuales se caracterizaron los estados intermediarios de la reacción de la PPDK de bacteria (Thrall *et al*, 1993) así como también en la de plantas (Jenkins y Hatch, 1985). Se han determinado las constantes de velocidad y la energética para la reacción de la enzima bacteriana (Mehl, Xu y Dunaway-Mariano, 1994).

1.4.3 Cinética y regulación

La enzima requiere Mg^{2+} libre para su actividad así como el magnesio unido al nucleótido. La actividad es estimulada por iones amonio en ambas direcciones. A diferencia de la piruvato cinasa que requiere K^+ para su actividad (Murihead, 1987; Murihead y Watson, 1992), la PPDK requiere el ión únicamente en la dirección de síntesis de PEP, pero es menos evidente su efecto en la dirección de síntesis de ATP.

El pH óptimo en la dirección de formación de PEP es aprox. 8.3 mientras que en la dirección inversa el pH óptimo es de 6.8.

Todos los productos de la reacción en cualquier sentido tienen efecto inhibitorio, esto es, piruvato y P_i en la reacción directa y AMP y pirofosfato en la dirección de síntesis de PEP.

1.4.4. Genética de la PPK.

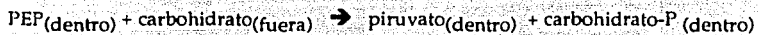
En 1988 se reportó la estructura primaria de la PPK de maíz deducida de DNA complementario. El mRNA de la PPK es de 3,171 bases, el cual codificaría para una proteína de 102.673 kDa. Comparaciones con la enzima purificada de la planta indicaron que la enzima se sintetiza como un precursor, con 71 residuos amino-terminales extras que corresponden al péptido señal, para el transporte del precursor hacia el cloroplasto. La enzima madura consiste de 876 residuos, lo que equivale a una masa molecular de 95.353 kDa (Matsuoka *et al*, 1988), peso aproximado al que se había calculado en geles de poliacrilamida-SDS (94 kDa). Posteriormente se reportó la estructura, el mapeo genético y la expresión del gene de la PPK de maíz (Matsuoka, 1990). El gene estructural comprende una región de 12 kilobases, con 19 exones y 18 intrones; es un gene de copia única y está localizado en el cromosoma 6. Además se identificó una región 5' que flanquea al gene y que funciona como promotor, al cual se unen factores proteicos cuya interacción es esencial para la transcripción del gene (Matsuoka y Numazawa, 1991).

Ya se ha reportado la estructura primaria de la PPK de la planta dicotiledónea de metabolismo C₄ *Flaveria trinervia* (Rosche y Westhoff, 1990). El marco de lectura abierto se puede traducir a un polipéptido precursor de 953 aminoácidos, con una masa molecular de 103.9 kDa. Basándose en la similitud de una secuencia consenso para el sitio de corte del péptido señal en la secuencia de maíz, se predijo una proteína madura de aproximadamente 95 kDa.

La secuencia del gene y la secuencia de aminoácidos de la PPK de *Bacteroides symbiosus* fué reportada por el grupo de Dunaway-Mariano

(Pocalyko *et al*, 1990). El gene tiene un tamaño de 2592 nucleótidos que codifica para una proteína de 840 residuos aminoácidos, con una masa molecular de 93.126 kDa. La comparación con la secuencia de maíz muestra un porcentaje de similitud de 53%. También se encontraron similitudes con la enzima I del sistema de transporte de azúcares dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS) y con la PEP sintetasa de *Escherichia coli* (Niersbach *et al*, 1992).

El sistema de transporte de azúcares dependiente de PEP en bacterias es un complejo que está involucrado en una gran diversidad de funciones para la internalización de azúcares en la célula, p.e. quimioatracción, transporte a través de la membrana y fosforilación. La fosforilación de cualquier azúcar involucra 5 reacciones de transferencia de grupos fosforilo desde el PEP hasta el azúcar, y cuatro proteínas fosforiladas que son intermediarias en dichas reacciones. El proceso general es el siguiente (Postma, Lengeler y Jacobson, 1993):



La enzima I es la primera de ellas y transfiere el grupo fosforilo del PEP a la enzima HPr, la siguiente en la cascada, a través de un intermediario enzima I-fosfato (Wu y Saier, 1990). Esta enzima por lo tanto cataliza una reacción similar a la PPDK.

La similitud que tienen las PPDK con la enzima I del sistema PTS fué confirmada con la comparación de varias secuencias de enzimas I de diversas bacterias con las PPDK y PEP sintetasa de *E. coli* (Reizer *et al*,

1993). En éste trabajo se propone un árbol filogenético de proteínas de la familia de la Enzima I en las que están incluidas éstas tres enzimas. En éste árbol se encuentran tres grupos que correlacionan con sus funciones catalíticas y fisiológicas: por un lado se encuentran el grupo de las enzimas I, el de las PPK y el grupo de la PEP sintetasa de *E. coli*; éstos dos últimos grupos están más cercanos unos de otros que con el grupo de la enzima I, como podría esperarse de sus actividades fisiológicas.

II. OBJETIVO

Con el objeto de conocer más acerca del metabolismo energético de *E. histolytica*, éste trabajo de investigación se enfocó a la clonación del gene que codifica para la piruvato fosfato dicinasa y a su caracterización.

Se determinó cómo se encuentra representado éste gene en el genoma de la amiba. También se analizó la secuencia de aminoácidos que se derivó de la secuencia de nucleótidos con respecto a las posibles funciones que cada región puedan tener, por comparación con estudios de otras enzimas homólogas ó relacionadas funcionalmente.

El estudio a nivel bioquímico de ésta enzima a través de la sobre-expresión del gene y la purificación de la proteína recombinante, nos permitirá conocer más acerca del metabolismo de los carbohidratos en la amiba. Así mismo, el conocimiento funcional de la PPDK puede proveer las bases para estudios terapéuticos en los cuales puede considerársele como blanco para el diseño de inhibidores que afecten específicamente la glucólisis de la amiba, ya que ésta enzima no está presente en el hospedero humano.

III. METODOLOGÍA

La parte correspondiente a materiales y métodos se incluye en los trabajos respectivos (Apéndice).

III.1 Metodología adicional.

Para el análisis del número de copias del gene que codifica para la PPK se realizó análisis de tipo Southern (Southern, 1975) y se empleó metodología convencional (Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989; Ausubel *et al*, 1987).

III.1.1 Extracción del DNA genómico.

El DNA se extrajo siguiendo la metodología descrita por Tannich *et al*, 1991 con pequeñas variaciones. Brevemente, se utilizaron 40×10^6 trofozoítos de la cepa HM1:IMSS. Los trofozoítos se lavaron en PBSA (NaH_2PO_4 1.9 mM, Na_2HPO_4 8.1 mM, NaCl 154 mM pH 7.2) y se lisaron con 2 ml de Nonidet P-40 al 1% en PBSA a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, el lisado se centrifugó a $2000 \times g$ por 10 min. para purificar los núcleos. Estos se lisaron por 30 min a 50°C con 3 ml de buffer de lisis (NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0, sarcosil al 0.5% y Proteinasa K 0.5 mg/ml). El lisado nuclear se extrajo dos veces con un volumen igual de fenol-cloroformo (1:1) y una vez con cloroformo, separando las fases acuosas por centrifugación a $12,000 \times g$ por 10 min. Se tomó la fase acuosa del último paso y se precipitó el DNA con 1/10 de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 3 volúmenes

de etanol absoluto por 15 min a -70°C . Se centrifugó a $27,000 \times g$ por 15 min y el precipitado se lavó con etanol al 70%, se secó y se disolvió en buffer TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM pH 8.0).

III.1.2 Análisis de Southern Blot.

Este análisis se realizó acorde a la metodología descrita por Southern (1975).

Aproximadamente 10 microgramos de DNA genómico se digirieron con diferentes enzimas de restricción de acuerdo a las instrucciones indicadas por los proveedores (BRL, Bethesda).

Los fragmentos obtenidos se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% en buffer de TBE (Tris 0.089M, ácido bórico 0.089M y EDTA 0.002M pH 8.0) y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. El DNA se desnaturalizó por una hora en una solución de NaCl 1.5M- NaOH 0.5M y posteriormente se neutralizó con una solución de Tris-HCl 1M pH 8.0-NaCl 1.5M por otros 60 min.

La transferencia de los fragmentos de DNA a filtros de nylon se realizó por capilaridad (Maniatis, 1984) y el DNA se fijó al filtro por entrecruzamiento con luz ultravioleta usando un Stratalinker (Stratagene).

El filtro se prehibridó con una solución que contenía 6X SSC (SSC 20X : NaCl 3M, citrato de sodio 0.3M, pH 7.0), solución de Denhardt (ficol 1%, polivinilpirrolidona 1%, BSA 1%), SDS al 0.2%, Tris-HCl 20 mM pH 8.0, EDTA 2 mM pH 8.0 y DNA de esperma de salmón 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

desnaturalizado por calentamiento por 5 min. El filtro se incubó en ésta solución por 4 hrs a 65°C.

La hibridación se realizó utilizando como sonda el fragmento EcoRI de 956 nucleótidos de una clona de cDNA que aislamos y que corresponde a parte del gene que codifica para la PPK de *E. histolytica* (ver artículo 1). La sonda se marcó por Nick Translation con dCTP α ³²P siguiendo las instrucciones de los proveedores (BRL, Bethesda). La sonda se desnaturalizó por calentamiento, se agregó a la solución de prehibridación y se incubó a 65°C por 14 hrs.

Terminada la hibridación se eliminó el exceso de sonda con lavados de alta astringencia con SSC 2X, SDS 0.1% (2 veces a temperatura ambiente por 15 min. y una vez a 65°C por 60 min).

Los fragmentos que hibridaron se visualizaron por autoradiografía.

III.2 Análisis de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos.

El análisis y manipulación de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se realizó utilizando el programa PCGENE.

IV. RESULTADOS

Parte de los resultados obtenidos en éste trabajo de investigación fueron publicados en los siguientes artículos:

1.- Saavedra-Lira, E., O. Robinson y R. Pérez-Montfort. 1992. Partial nucleotide sequence of the enzyme pyruvate, orthophosphate dikinase of *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS. *Arch. Med. Res.* **23**(2): 39-40.

2.- 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.

Resumen del artículo 1.

En la primera publicación se describió el aislamiento de una clona de una biblioteca de DNA complementario de *E. histolytica* de la cepa HM1:IMSS cuya secuencia de 552 nucleótidos y la secuencia de aminoácidos que se derivó, al ser comparadas con los bancos de datos Genbank y NBRF/PIR, mostró similitudes entre 54.9 y 58.5% a nivel de nucleótidos y entre 48.6 y 49.4% a nivel de aminoácidos, con las secuencias reportadas para la piruvato ortofosfato dicinasa (PPDK) de maíz, *Flaveria trinervia* y *Bacteroides symbiosus*. Esta clona contenía la secuencia del sitio activo¹ y la secuencia correspondía a aproximadamente 20% del gene.

¹Hasta el momento en que se envió éste trabajo a publicación se habían secuenciado únicamente los 552 nucleótidos. Posteriormente se lograron secuenciar otros 404 nucleótidos y se observó que hubo un error en la secuencia reportada de los primeros nucleótidos. La secuencia de aminoácidos correcta del

A pesar de que ésta enzima había sido descrita y caracterizada por Reeves en 1968, y ha sido estudiada a nivel de mecanismo de reacción y regulación en plantas y bacterias, poco o ningún trabajo adicional se había descrito para la enzima de amiba hasta éste reporte.

Resumen del artículo 2.

En éste trabajo se reportó la secuencia completa del gene que codifica para la PPKK de *E. histolytica*. La secuencia se derivó de tres clonas sobrelapadas que fueron aisladas de una biblioteca de DNA genómico de amiba de la cepa HM1:IMSS. La secuencia de 3033 nucleótidos contenía un marco de lectura abierto de 2658 nucleótidos que codifica para una proteína de 886 residuos aminoácidos con una masa molecular de 97.899 kDa.

La secuencia de aminoácidos deducida se comparó con los bancos de datos SwissProt y NBRF/PIR y el alineamiento de la secuencia de *E. histolytica* mostró similitudes de 51, 48 y 47 % con las PPKK de *B. symbiosus*, maíz y *F. trinervia*, respectivamente. Esta similitud fué la que se obtuvo para la secuencia completa, sin embargo, a lo largo de ella se observaron regiones de alta similitud separadas por regiones de menor similitud, algunas de las cuales se han propuesto como los sitios de unión de sustratos. Se identificó el motivo del sitio catalítico GGKTSAAVVAR que en amiba contiene un residuo de lisina (K) en lugar de una metionina (M) conservada en las otras secuencias. Además se identificaron regiones

sitio activo era GGKTSAAVVAR, es decir que los dos primeros residuos de glicina se habían deducido erróneamente como arginina (R) y asparagina (N).

que también poseen similitud con la enzima I del sistema de transporte de azúcares dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS) que pueden estar involucradas en la unión del PEP ó que pueden dar ciertas características estructurales a la proteína.

Resultados adicionales.

IV.1 Análisis de restricción de la secuencia de nucleótidos.

La secuencia de nucleótidos obtenida para el gene que codifica para la PPK se sometió a análisis por computadora utilizando el programa PCGENE para reconocer los sitios de restricción del gene.

El mapa de restricción que se obtuvo se muestra en la figura 3. En dicha figura también se indica la localización de las clonas que se aislaron, así como la estrategia de secuenciación. La dirección de las flechas indica la dirección en la que se secuenciaron los fragmentos de cada clona utilizando diferentes primers. La línea marcada como sonda es el fragmento completo de la clona de cDNA que se utilizó en los experimentos de hibridación

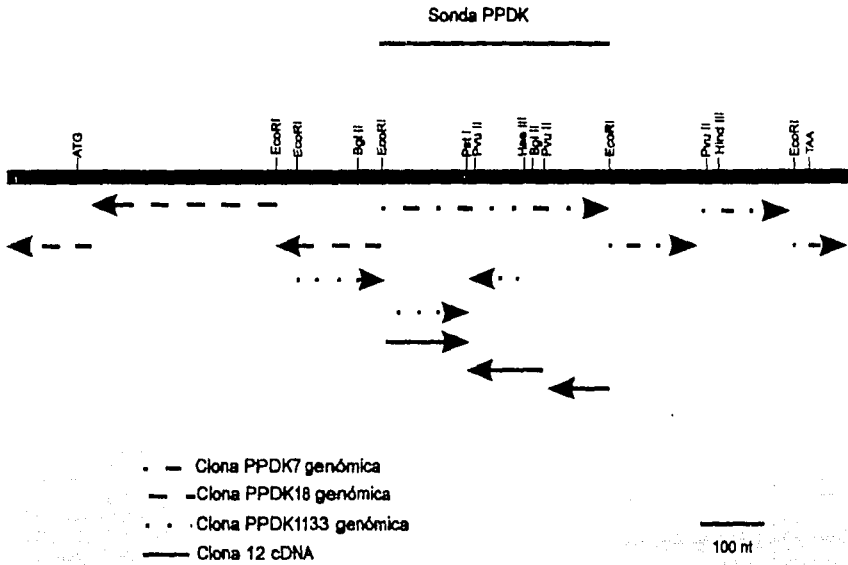


Fig. 3 Mapa de restricción y estrategia de secuenciación del gene que codifica para la PPK. Se indican la localización de las clonas que se aislaron para obtener la secuencia completa del gene.

FALLA DE ORIGEN

IV.2 Determinación del número de copias del gene para la PPK en el genoma amibiano.

La figura 4 muestra el patrón de hibridación de la clona de cDNA que contiene parte del gene de la PPK con el DNA genómico de *E. histolytica* para la determinación del número de copias del gene presentes en el genoma amibiano.

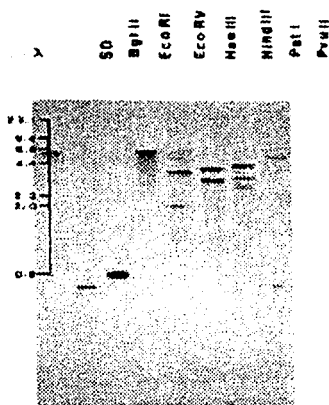


Fig. 4 Número de copias del gene que codifica para la PPK en el genoma de la amiba. Análisis de Southern blot de DNA genómico de *E. histolytica* HM1:IMSS digerido con diversas endonucleasas de restricción e hibridado con una sonda homóloga que contiene parte del gene que codifica para la piruvato fosfato dicinasa (λ : marcador de peso molecular DNA del fago λ cortado con HindIII; SD: DNA genómico sin digerir).

La tabla III resume el número de sitios de restricción que posee la secuencia del gene -deducido por análisis con el programa PCGENE-, el número de bandas que deberían hibridar con la sonda para la PPDK (de acuerdo al mapa de restricción que se obtuvo y a la localización de la sonda homóloga) y el número de bandas observadas en el southern blot.

Tabla III
Análisis de restricción y patrón de hibridación. Determinación del número de copias en el genoma.

Enzima de restricción	No. de sitios de restricción en el gene	No. de bandas que deberían hibridar con la sonda	No. de bandas observadas en el Southern blot.
Bam HI	0	1	1 alto peso molecular
Bgl II	2	1	1
Eco RI	5	1	1
Eco RV	0	1	1 alto peso molecular
Hae III	1	2	2
Hind III	1	1	2*
Pst I	1	2	3*
Pvu II	3	3	3

* A pesar de que no existe concordancia para éstas dos enzimas entre el número de bandas esperadas por análisis de restricción y el número de bandas observadas, el patrón de hibridación con las demás enzimas de restricción sugieren que el gene está en copia única en el genoma (ver abajo).

Como se puede observar en la tabla, para la mayoría de las enzimas de restricción que se utilizaron existe una correspondencia entre el número de bandas que deberían hibridar con la sonda y el número de bandas que hibridaron con la sonda para la PPDK. También existe una concordancia entre los tamaños esperados de los fragmentos que hibridaron con la sonda y que se pueden determinar con el mapa de

restricción de la figura 3. Por ejemplo, con Bgl II deben hibridar dos fragmentos de aprox. 700 y 300 pares de bases (pb.) de los cuales se observa el de 700; con Eco RI se observa el de 900 (hibridan fragmentos homólogos y del mismo tamaño) y con PvuII se observan tres: uno de alto peso molecular, uno menor de 600 pb. y uno de aprox. 700 pb. Los resultados del patrón de hibridación sugieren fuertemente que el gene se encuentra en copia única en el genoma de *E. histolytica*.

V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

El resultado de éste trabajo de investigación, ha sido la clonación y caracterización de la secuencia del gene que codifica para la piruvato fosfato dicinasa de *Entamoeba histolytica*. Los resultados del análisis de Southern blot sugieren fuertemente que el gene se encuentra en copia única en el genoma. Al igual que la mayoría de los genes en amiba, probablemente éste no contiene intrones. Evidencias parciales de esto son: a) la semejanza en las secuencias de las clonas que se aislaron de cDNA y genómicas (solamente para un fragmento del gene); b) al ser traducida la secuencia de nucleótidos a secuencia de aminoácidos no se detectaron codones de terminación que interrumpieran la traducción.

El marco de lectura abierto que se encontró es de 2658 nucleótidos y codifica para una proteína de 886 residuos con una masa de aproximadamente 98 kDa para el monómero. De manera similar a otros genes de amiba, el de la PPK es rico en adenina y timina (65.7%), lo cual refleja la abundancia de éstos nucleótidos en el genoma (63-77%) (Tannich y Horstmann, 1992; Char y Farthing, 1992).

La secuencia de aminoácidos que se derivó de la secuencia de nucleótidos muestra similitudes de 51, 48 y 47% con las secuencias reportadas para las PPK de *Bacteroides symbiosus*, maíz y la planta *Flaveria trinervia*. El análisis del uso de codones demuestra una preferencia en el uso de adenina y timina en la tercera posición. Los codones preferidos son los mismos que se han reportado para *E. histolytica* (Tannich y Horstmann, 1992; Char y Farthing, 1992), excepto para los aminoácidos fenilalanina (TTT vs TTC), treonina (ACA vs. ACT) y alanina (GCA vs GCT).

El alineamiento de las cuatro secuencias de aminoácidos de las PPDK (figura 2 del artículo número 2) muestra que existen regiones muy conservadas. Una de ellas plenamente identificada en la estructura de la proteína es el motivo del sitio activo GG(K/M)TSHAAVVAR, presente también en las enzimas I del sistema de transporte de azúcares dependiente de PEP (Reizer *et al*, 1993) y la PEP sintetasa de *E. coli* (Niersbach *et al* 1992). Recientemente Reizer *et al* (1993) han propuesto la designación de una familia de proteínas similares a la enzima I, en las que están incluidas las que he mencionado y ha confirmado la validez de la firma ó secuencia consenso propuesta por Bairoch (1992) que identifica a ésta familia :

TXXGGXTXH(STA)(STA)(LIVM)(LIVM)(STA)R

Existen otras secuencias conservadas dentro de las PPDK, algunas de las cuales también están presentes en las enzimas I. Varias de éstas regiones se han propuesto como sitios involucrados en la unión de sustratos (ver más adelante) (Reizer *et al*, 1993). Con respecto al alineamiento de las secuencias de las PPDK con las secuencias de las enzimas I reportadas para diferentes bacterias, éste muestra similitudes entre 27-36% pero únicamente en la región carboxilo terminal (a partir del residuo 242 en la secuencia de la PPDK de amiba está el inicio del extremo amino terminal de las enzimas I).

Se identificó una región en las PPDK que en la enzima I se ha propuesto como el sitio flexible de unión de dos dominios estructurales (figura 2, artículo 2). Para la enzima I se han realizado estudios de

calorimetría diferencial, tanto de la enzima nativa como de un péptido que se obtiene por digestión con proteasas (LiCalsi *et al*, 1991; Lee *et al*, 1994). A través de éstos estudios se ha determinado que la enzima I está compuesta de dos dominios y que existen interacciones cooperativas que estabilizan al dominio carboxilo terminal. La sensibilidad a proteólisis también indicó que existe un dominio amino-terminal de 30 kDa que es altamente resistente a proteólisis y además éste péptido es el que posee la más alta T_m en los estudios de calorimetría. Si localizamos la secuencia de éste péptido en las secuencias de PPDK, éste se encuentra en la porción media de la proteína (residuos 242 a 512 en la secuencia de la PPDK de amiba) y contiene la secuencia del sitio activo. Por lo tanto se podría decir que éste péptido es más o menos independiente del péptido en el que está el sitio de unión del PEP (porción carboxilo terminal).

Es interesante que la estructura de las PPDK y de la enzima I van acorde a las actividades fisiológicas de las mismas; por ejemplo, la enzima I del PTS transfiere el grupo fosfato del fosfoenolpiruvato a la proteína HPr, la siguiente enzima en la cascada de dicho sistema (Postma, Lengeler y Jacobson, 1993). En la enzima I no está presente el extremo amino terminal de las PPDK y esto pudiera deberse a que la enzima I no acepta grupos fosforilo del ATP. Esto nos lleva a pensar que en las PPDK, el probable sitio de unión de nucleótido se encuentra en el extremo amino terminal, siendo que tal hecho se ha demostrado en los estudios de marcaje de los sitios de unión de sustratos que se describen a continuación .

El grupo de Dunaway-Mariano ha realizado estudios de digestión con subtilisina de la PPDK de bacteria para identificar los sitios de unión

de sustratos (Carroll *et al*, 1994). Las investigaciones han sugerido que la PPK se encuentra arreglada tridimensionalmente en cuatro dominios estructurales. Estos investigadores observaron que la digestión de la proteína con la proteasa subtilisina produce dos péptidos estables: uno amino terminal de 25 kDa y uno carboxilo terminal de 35 kDa. En la región intermedia existe un sitio susceptible de corte que produce un péptido de 32 kDa relativamente inestable y que contiene la secuencia del sitio activo.

Para identificar los sitios de unión de sustratos utilizaron los análogos de sustratos bromopiruvato y el 2'3' dialdehído adenosina 5' monofosfato (oAMP) y posterior digestión con la proteasa de la enzima modificada covalentemente. Con ésta metodología lograron determinar que el sitio de unión de piruvato se encuentra en el péptido carboxilo terminal de 35 kDa, lo que concuerda de una forma muy fina con la predicción de la unión de éste sustrato en el extremo carboxilo terminal, basada en el alineamiento de las secuencias de las enzimas I y PEP sintetasa. Por otro lado, para el sitio de unión de nucleótido, encontraron que el fragmento que se marcaba era el péptido amino-terminal de 25 kDa, deducción que se podía derivar también de la falta de éste péptido en las enzimas I y PEP sintetasa.

La utilización de los análogos de sustrato adenilimidodifosfato (AMPPNP) y oxalato, aparentemente producen un cambio conformacional en la proteína que altera en cierto sentido el patrón de hidrólisis de la proteína, lo que sugiere que existen cambios conformacionales cuando se unen éstos sustratos.

Los resultados que obtuvo éste grupo son importantes en el sentido de que indican que la estructura tridimensional de la PPK consiste de

dominios, cada uno de ellos independiente y encargado de la unión de los diferentes sustratos. Probablemente el dominio del sitio activo es flexible (por su susceptibilidad a proteólisis) lo que permite la interacción con los demás.

El clonar el gene que codifica para la PPK de *E. histolytica* abre una puerta para conocer algo más del metabolismo de los carbohidratos en la amiba. La clonación del gene es una gran ventaja, ya que abre la posibilidad de contar con grandes cantidades de la proteína recombinante para realizar estudios bioquímicos tales como la función, el mecanismo de reacción, cinética, etc.

El contar con la secuencia de aminoácidos de dicha proteína también nos permite hacer una serie de análisis y predicciones acerca de las interacciones a nivel de estructura secundaria que puedan llevarse a cabo. Además se pueden realizar estudios para conocer detalles de la estructura tridimensional de la proteína, aplicando diversas metodologías como fluorescencia, dicroísmo circular o calorimetría.

Este tipo de estudios permitirá conocer a una enzima que es un punto clave en la generación de energía del parásito y probablemente éste hecho pueda ser relevante en estudios terapéuticos. Actualmente, existen varios ejemplos en los que el conocimiento de la estructura tridimensional de una proteína ha llevado al diseño de inhibidores específicos para la misma o el rediseño de compuestos antiparásitos que anteriormente existían (Croft, 1994; Hudson, 1994; Douglas, 1994, Verlinde *et al*, 1994).

Por último, el desarrollo de un medio axénico para amibas por Diamond en la década de los sesentas, revolucionó el estudio de la

patogénesis de la amibiasis así como también develó parte de la biología de la amiba; sin embargo, los aspectos genéticos de éste organismo han sido un misterio por varias décadas por la poca flexibilidad del organismo y por las características atípicas de un eucarionte inherentes al parásito. Sin embargo, en 1994 se logró el diseño de dos metodologías que permiten transfectar, hasta éste momento transitoriamente, a *E. histolytica* (Nickel y Tannich, 1994; Purdy *et al.*, 1994) un objetivo deseado de mucho tiempo atrás. Este nuevo avance permitirá el conocimiento de aspectos tan interesantes como la identificación de regiones que regulan la expresión de los genes. También se abre la posibilidad de transfectar una cepa "no patogénica" con genes "patogénicos", cuya expresión permiten a *E. histolytica* causar daño a su hospedero.

PERSPECTIVAS

En décadas recientes ha habido un gran interés en el estudio de moléculas, particularmente enzimas que están exclusivamente en ciertos parásitos y no en el humano, con el fin de desarrollar drogas que interaccionen selectivamente con el blanco, sin afectar seriamente al humano. Basándose en el conocimiento previo de compuestos antiparasitarios y la determinación de la estructura tridimensional de la molécula blanco, existen ejemplos de intentos de diseño de nuevas drogas que sean más eficaces en su efecto.

Esto ha sido posible en muchos casos por el mejoramiento en las tecnologías para la determinación de las estructuras tridimensionales de proteínas (predicción de estructura para proteínas que no han podido cristalizarse, cristalografía y resonancia magnética nuclear; por citar algunas de ellas); en la creación de programas de computación que permiten el modelado de moléculas así como también en la capacidad de dichos programas de estudiar interacciones entre dos moléculas, por ejemplo complejos enzima-droga (docking).

En un futuro, tal tipo de estudios se pueden aplicar para el estudio de la PPK de *E. histolytica*. La clonación de genes y la expresión de proteínas son técnicas de biología molecular que actualmente ayudan en gran medida a conseguir todos esos objetivos.

REFERENCIAS

- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.A. Smith, J.G. Seidman y K. Struhl. 1987. **Current Protocols in Molecular Biology**. John Wiley, Nueva York.
- Bairoch, A. 1992. PROSITE: A dictionary of sites and patterns in proteins. *Nucleic Acids Res.* **20**: 2013-2018.
- 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. y A. Palgi. 1970. Characterization and properties of the pyruvate phosphorylation system of *Acetobacter xylinum*. *J. Bacteriol.* **104** (1):211-218.
- Benziman, M. 1975. Pyruvate, orthophosphate dikinase from *Acetobacter xylinum*. *Meth. Enzymol.* **42**:192-199.
- Bruchhaus, I. y E. Tannich. 1994. Purification and molecular characterization of the NAD⁺ - dependent acetaldehyde/alcohol dehydrogenase from *Entamoeba histolytica*. *Biochem. J.* **303**:743-748.
- Burnell, J.N. y M.D. Hatch. 1986. Activation and inactivation of an enzyme catalyzed by a single, bifunctional protein: a new example and why. *Arch. Biochem. Biophys.* **245**(2):297-304.
- Carroll, E., P. Farr y R. Clifton. 1981. **Parasitología Clínica**. p 141-166.
- 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.
- Char, S. y M.J.G. Farthing. 1992. Codon usage in *Entamoeba histolytica*. *Int. J. Parasitol.* **22**(3): 381-383.
- Clark, C.G. y L.S. Diamond. 1994. Pathogenicity, virulence and *Entamoeba histolytica*. *Parasitol. today.* **10** (2):46-47.
- Croft, S.L. 1994. A rationale for antiparasite drug discovery. *Parasitol. today.* **10** (10) : 385-386.
- Douglas, K.T. 1994. Rational drug design in parasitology. *Parasitol. today.* **10** (10): 389-392.

- Edwards, G.E., H. Nakamoto, J.N. Burnell 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.* 65: 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.
- Evans, C.T., N.H. Goss y H.G. Wood. 1980. Pyruvate phosphate dikinase: affinity labeling of the adenosine 5'-triphosphate-adenosine 5'-monophosphate site. *Biochemistry.* 19 (25): 5809-5814.
- Goss, N.H., C.T. Evans y H.G. Wood. 1980. Pyruvate phosphate dikinase: sequence of the histidyl peptide, the pyrophosphoryl and phosphoryl carrier. *Biochemistry.* 19 (25): 5805-5808.
- Hasegawa, M., T. Hashimoto, J. Adachi, N. Iwabe y T. Miyata. 1993. Early branchings in the evolution of eukaryotes: Ancient divergence of Entamoeba that lacks mitochondria revealed by protein sequence data. *J.Mol.Evol.* 36:380-388.
- Hatch, M.D. y C.R. Slack. 1968. A new enzyme for the interconversion of pyruvate and phosphopyruvate and its role in the C₄ 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.
- Hrdý, I., E. Mertens y E. Nohýnková. 1993. *Giardia intestinales*: detection and characterization of a pyruvate phosphate dikinase. *Exp. Parasitol.* 76: 438-441.
- Huber, M., L. Garfinkel, C. Gitler, D. Mirelman, M. Revel y S. Rozenblatt. 1988. Nucleotide sequence analysis of an *Entamoeba histolytica* ferredoxin gene. *Mol.Biochem.Parasitol.* 31: 27-34.
- Hudson, A.T. 1994. The contribution of empiricism to antiparasite drug discovery. *Parasitol. today.* 10 (10): 387-389.
- Jenkins, C.L.D. y M.D. Hatch. 1985. Properties and reaction mechanism of C₄ leaf pyruvate, Pi dikinase. *Arch.Biochem.Biophys.* 239(1):53-62.

- Kerscher, L. y D. Oesterhelt. 1982. Pyruvate: ferredoxin oxidoreductase- new findings on an ancient enzyme. *TIBS* 7:371-374.
- Kumar, A., P.S. Shen, S. Descoteaux, J. Pohl, G. Bailey y J. Samuelson. 1992. Cloning and expression of an NADP -dependent alcohol dehydrogenase gene of *Entamoeba histolytica*. *PNAS. USA.* 85:1782-1786.
- Lee, B.R., P. Lecchi, L. Pannell, H. Jaffe y A. Peterkofsky. 1994. Identification of the N-terminal domain of enzyme I of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system produced by proteolytic digestion. *Arch. Biochem. Biophys.* 312 (1): 121-124.
- LiCalsi, C., T.S. Crocenzi, E. Freire y S. Roseman. 1991. Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system: Structural and thermodynamic domains of enzyme I of *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 266(29):19519-19527.
- 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.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch y J. Sambrook. 1982. **Molecular Cloning. A laboratory manual.** Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Martínez-Palomo, A. 1982. **The biology of *Entamoeba histolytica*.** Wiley, Inglaterra.
- Matsuoka, M., Y. Ozeki, N. Yamamoto, H. Hirano, Y. Kano-Murakami y Y. Tanaka. 1988. Primary structure of maize pyruvate, orthophosphate dikinase as deduced from cDNA sequence. *J. Biol. Chem.* 263 (23):11080-11083.
- 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. y T. Numazawa. 1991. Cis-acting elements in the pyruvate, orthophosphate dikinase gene from maize. *Mol. Gen. Genet.* 228:143-152.
- McKerrow, J.H. 1994. Amebiasis: new focus on an old infection. *Parasitol. today* 10(5):165-166.
- McLaughlin, J. y S. Aley. 1985. The biochemistry and functional morphology of the *Entamoeba*. *J. Protozool.* 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.
- Meza, I. 1992. *Entamoeba histolytica*: phylogenetic considerations. A review. *Arch. Med. Res.* 23(2):1-5.
- 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-
- Montalvo, F.E., R.E. Reeves y L.G. Warren. 1971. Aerobic and anaerobic metabolism in *Entamoeba histolytica*. *Exp. Parasitol.* 30:249-256.
- Montfort, I. y R. Pérez-Tamayo. 1994. Is phagocytosis related to virulence in *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903?. *Parasitol. today*. 10(7): 271-273.
- 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.
- Murihead, H. 1987. Pyruvate kinase. En: **Biological macromolecules and assemblies**. F.A. Jornak y A. McPherson, eds. vol 3. Wiley, Londres. pp 144-186
- Murihead, H. y H. Watson. 1992. Glycolytic enzymes: from hexose to pyruvate. *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 870-876.
- Nickel, R. y E. Tannich. 1994. Transfection and transient expression of chloramphenicol acetyltransferase gene in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *PNAS USA*. 91:7095-7098.
- Niersbach, M., F. Kreuzaler, R.H. Geerse, P.W. Postma y H.J. Hirsch. 1992. Cloning and nucleotide sequence of the *Escherichia coli* K-12 *ppsA* gene, encoding PEP synthase. *Mol. Gen. Genet.* 231: 332-336.
- 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 I of the bacterial phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system and

other PEP-utilizing enzymes. Identification of potential catalytic and regulatory motifs. *Biochemistry*. **29**(48):10757-10765.

- Postma, P.W., J.W. Lengeler y G.R. Jacobson. 1993. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol.Rev.* **57**(3):543-594.

- Purdy, J.E., B.J. Mann, L.T. Pho y W.A. Petri, Jr. 1994. Transient transfection of the enteric parasite *Entamoeba histolytica* and expression of firefly luciferase. *PNAS USA*. **91**:7099-7103.

- 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., F.F. Montalvo y T.S. Lushbaugh. 1971. NADP⁺-dependent alcohol dehydrogenase: the enzyme from *Entamoeba histolytica* and some enzyme inhibitors. *Int.J.Biochem.* **2**:55-64.

- 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.

- 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.Susskind y H.S. Lo. 1977. An energy-conserving pyruvate to acetate pathway in *Entamoeba histolytica*. *J.Biol.Chem.* **252**(2):726-731.

- Reeves, R.E., J.D. Guthrie y P. Lobelle-Rich. 1980. *Entamoeba histolytica*: isolation of ferredoxin. *Exp. Parasitol.* **49**: 83-88.

- Reizer, J., C. Hoischen, A. Reizer, T.N. Pham y M.H. Saier, Jr. 1993. Sequence analyses and evolutionary relationships among the energy-coupling proteins enzyme I and HPr of the bacterial phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *Prot.Sci.* 2:506-521.
- Roeske, C.A., R.M. Kutny, R.J.A. Budde y R. Chollet. 1988. Sequence of the phosphothreonyl site peptide from inactive maize leaf pyruvate,orthophosphate dikinase.*J.Biol.Chem.* 263(14):6683-6687.
- Rosche, E. y P. Westhoff. 1990. Primary structure of pyruvate, orthophosphate dikinase in the dicotyledonous C₄ plant *Flaveria trinervia*. *FEBS letters.* 273(1,2):116-121.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. **Molecular Cloning. A laboratory manual.** Cold Spring Harbor, Nueva York.
- 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.
- Sogin, M.L., G. Hinkle y D. Leipe. 1993. Universal tree of life. *Nature.* 362: 795.
- South, D.J. y R.E. Reeves. 1975. Pyruvate, orthophosphate dikinase from *Bacteroides symbiosus*. *Meth.Enzymol.* 42: 187-191.
- Southern, E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.* 98:503
- Takeuchi, T., E.C. Weinbach y L.S. Diamond. 1975. Pyruvate oxidase (CoA acetylating) in *Entamoeba histolytica*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*65: 591-596.
- Tannich, E., I. Bruchhaus, R.D. Walter y R.D. Horstmann. 1991. Pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*: identification and molecular cloning of an iron-containing superoxide dismutase. *Mol.Biochem.Parasitol.* 49:61-72.
- Tannich, E. y R.D. Horstmann. 1992. Codon usage in pathogenic *Entamoeba histolytica*.*J.Mol.Evol.*34:272-273.
- 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.

- 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. *Prof.Sci.* 3:1670-1686.
- Walsh, 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.* 35:232-243.
- Weinbach, E.C., L.S. Diamond, C.E. Claggett y H. Kan. 1976. Iron-sulfur proteins of *Entamoeba histolytica*. *J. Parasitol.* 62(1):127-128.
- Weinbach, E.C., T. Takeuchi, E.C. Claggett, F. Inohue, H. Kon y L.S. Diamond. 1980. Role of iron-sulfur proteins in the electron transport system of *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.* 11:75-81.
- 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.
- Wu, L.F. y M.H. Saier, Jr. 1990. On the evolutionary origins of the bacterial phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *Mol. Microbiol.* 4(7):1219-1222.
- Yang, W., E. Li, T. Kairong y S.L. Stanley, Jr. 1994. *Entamoeba histolytica* has an alcohol dehydrogenase homologous to the multifunctional *adhE* gene product of *Escherichia coli*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 64:253-260.
- Zhang, W.W., P.S. Shen, S. Descoteaux y J. Samuelson. 1994. Cloning and expression of the gene for an NADP⁺-dependent aldehyde dehydrogenase of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 63: 157-161.

APÉNDICE

Partial Nucleotide Sequence of the Enzyme Pyruvate, Orthophosphate Dikinase of *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS

E. Saavedra Lira, O. Robinson, and R. Pérez Montfort

Departamento de Microbiología, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apdo. Postal 70242, 04510 México, D.F.

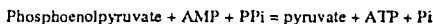
Abstract

We isolated a clone from a lambda gt11 cDNA library of *E. histolytica*, subcloned its insert in the vector pTZ18R and sequenced it by the method of Sanger. Sequence comparison with Genbank and of the corresponding amino acid sequence with the NBRF/PIR data bank using the FastA program, showed homologies between 54.9 and

58.5% for the nucleotides and between 48.6 and 49.4% for the amino acids with pyruvate, orthophosphate dikinases from maize, *Flaveria trinervia* and *Bacteroides symbiosus*. The sequence obtained for *E. histolytica* represents about 20% of the complete gene or protein sequence.
KEY WORDS: Pyruvate, Orthophosphate dikinase, PPDK, Partial sequence, *E. histolytica*.

Introduction

Carbohydrate metabolism in the protozoan *E. histolytica* differs in some aspects from that of man "aerobic" organisms (1). In the glycolytic pathway the transformation of phosphoenolpyruvate to pyruvate is one of the two reactions of substrate phosphorylation in which there is ATP production. In most eukaryotic organisms, pyruvate kinase catalyzes this reaction by transferring the phosphate group of phosphoenolpyruvate to ADP, yielding ATP and pyruvate as products. There is no pyruvate kinase present in *E. histolytica* (1), but another enzyme dephosphorylates phosphoenolpyruvate. Soon after, Hatch and Slack described a new enzyme for the interconversion of pyruvate into phosphopyruvate in tropical grasses (2). Reeves reported the identification and partial purification of an enzyme in *E. histolytica* trophozoites, which catalyzes the formation of pyruvate from phosphoenolpyruvate in a reaction that is strictly dependent on inorganic pyrophosphate and in which there is a dependence on AMP as the substrate, instead of ADP (3). This enzyme received the trivial name, pyruvate, orthophosphate dikinase or pyruvate, phosphate dikinase (PPDK) (4). It catalyzes the following reaction:



Enzymes catalyzing the same reaction have been only described in certain plants and bacteria (2,4-7).

This work reports the identification of a nucleotide sequence from a complementary DNA (cDNA) library of *E. histolytica* which shows homology with the reported sequences for PPDK from maize, *Flaveria trinervia* and *Bacteroides symbiosus* (5-7).

Materials and Methods

cDNA library. The cDNA library of *E. histolytica* strain HM1:IMSS, prepared in lambda gt11, was a generous gift of Dr. Isaura Meza and

This work was supported in part by grant IN200289 from DGAPA/UNAM.

Dr. Marco Antonio Meraz (CINVESTAV, IPN México, D.F.). Its construction has been described previously (8).

Polymerase chain reaction (PCR) amplification. The EcoRI-EcoRI insert was amplified in 25 cycles as follows: denaturation for 1 min at 94°C, alignment at 50°C for 3 min, and polymerization at 72°C for 1 min. We used nucleotides that were specific for lambda gt11 and which have restriction sites for the endonucleases SstI and SalI (a kind gift of Dr. Abraham Landa, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México, D.F.).

Subcloning in pTZ18R and sequencing. The insert was digested with SstI and SalI and ligated into pTZ18R (Pharmacia). The recombinant vector was used to transform *Escherichia coli* TG1 cells (9), from which single-stranded templates were purified and sequenced by the dideoxy chain-termination method of Sanger (10).

Results

A clone was isolated from a cDNA library of *E. histolytica* strain HM1:IMSS prepared in lambda gt11 whose insert was amplified by PCR, subcloned into pTZ18R and sequenced.

Homology searches of the sequence (635 nucleotides) were performed with the data bank Genbank (release 72.0) using the FastA program (11). The percentages of identity were 58.5, 56.2 and 54.9 over 644, 625 and 627 nucleotide overlaps with PPDK from *F. trinervia*, *B. symbiosus* and maize, respectively.

One of the six reading frames coded for a sequence of 184 amino acids and was compared with the NBRF/PIR data bank (release 30.0) also using the FastA program. The percentages of identity were 49.4, 48.9 and 48.6 over 178, 180 and 179 amino acid overlaps for maize, *B. symbiosus* and *F. trinervia*, respectively.

These sequences of nucleotides and amino acids correspond to approximately 20% of the complete gene or protein sequence. The sequence of 552 nucleotides and their relative position to the reported sequences for maize, *B. symbiosus* and *F. trinervia* is shown in Figure 1.

aggattttaacctgcagaggaggcaaaaaatcacacgcagctgctgctagaggtatgggtaaacatgtgttc
 aggagctgaaggaaataaagtgtggtgctaagaaaatgctaagattggaagccttgaaatcatgaaggagatattt
 aactatgtatggaactgactggtgctataaggagaagtccaatagaagaaccacaagtggatcaggatattcgg
 aacctcttaaaatgggccaatgaaatgaaatgaaatggaattttgccaatgcagactcttcacagctgtaagaagc
 cctgattggagctgaaggtattggacttgcagaactgaacgtatgtcaalgcagttgaaagctccaattgtgcaag
 tgattcttcaaatccctgaagaaagaagaataatctaatgaactatgcacttcaaaaaaagatttcaggattat
 gaagactatgaatggactccagtcactgacactctgatccaccattacalgaattc

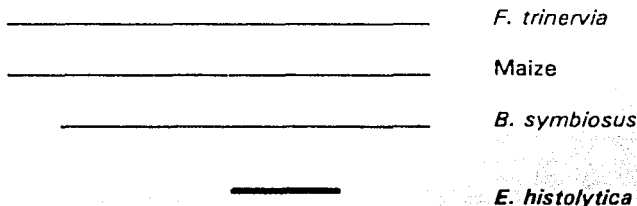


Figure 1. Partial nucleotide sequence of PPDK from *E. histolytica* and location diagram of the region of homology for three enzymes whose sequences have been reported previously (5-7). The 5' end of the genes is on the left side. The length of the lines is proportional to the length of the sequences. Accession number Gen Bank L03389.

Discussion

The sequence shown in Figure 1 corresponds to a part of the PPDK sequence of *E. histolytica*, because of the following reasons:

1. The enzyme has been partially purified from extracts of trophozoites (3).

2. The overall homology of the *E. histolytica* sequence with that of bacteria and plants is similar to that shown between the sequence of PPDK of *B. symbiosus* and those of maize and *F. trinervia* (7).

3. This sequence shows segments of very high homology and other segments of very low homology, just as it occurs between the sequence of *B. symbiosus* and the two sequences of PPDK from plants (7). One of the high homology segments corresponds to the region containing the histidine involved in catalysis, and the threonine involved in the phosphorylation/dephosphorylation reaction that regulates the activation state in the plant enzyme (6). This sequence (GGMTSHAAVVAR) is identical in the three genes sequenced previously and corresponds to amino acids 450 to 461 in *B. symbiosus*, 530 to 541 in *F. trinervia*, and 524 to 535 in maize (5-7). The corresponding *E. histolytica* sequence (amino acids 9 to 18 of the fragment) is RNKTSHAAVVAR, which is identical in 9 of the 12 residues and three are two conservative substitutions (G for N and M for K, respectively).

There are three other regions of very high homology with all three published sequences, which correspond to amino acids 38 to 61, 112 to 124, and 172 to 184 in the sequenced fragment. These regions are also very conserved in the other three PPDK sequences.

On the basis of this evidence we conclude that this clone has a part of the sequence coding for PPDK of *E. histolytica*.

PPDK is an important enzyme in the photosynthetic pathway of C₃ plants. It has also been found in bacteria like *Propionibacterium shermanii*, *Acetobacter xylinum*, *Rhodospirillum rubrum* and *B. symbiosus*. The studies on structure, regulation and mechanism of action have been performed with enzymes from sugar cane, maize, *P. shermanii* and *B. symbiosus*. Even though this enzyme was discovered almost simultaneously in plants, bacteria, and *E. histolytica*, little or no work has been performed on the protozoan enzyme since that time. Since the enzyme is important in the production of ATP for *E. histolytica*, and is absent from its natural and experimental hosts,

selective inhibition of this enzyme may lead to inhibition of growth and perhaps to alternatives for prevention or treatment of amebiasis. The elucidation of the complete sequence of this enzyme might also shed some light on the evolutionary relationship between certain groups of plants and bacteria and *E. histolytica*.

References

- McLaughlin J, Aley S. The biochemistry and functional morphology of the *Entamoeba*. J Protozool 1985; 32:221.
- Hatch MD, Slack CR. A new enzyme for the interconversion of pyruvate and phosphopyruvate and its role in the C₃ dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. Biochem J 1968; 106:141.
- Reeves RE. A new enzyme with the glycolytic function of pyruvate kinase. J Biol Chem 1968; 243:3202.
- Reeves RE, Menzies RA, Hsu DS. The pyruvate-phosphate dikinase reaction. J Biol Chem 1968; 243:5486.
- Matsuoka M, Ozeki Y, Yamamoto N, Hirano H, Kano-Murakami Y, Tanaka Y. Primary structure of maize pyruvate, orthophosphate dikinase as deduced from cDNA sequence. J Biol Chem 1988; 263:11080.
- Rosche E, Westhoff P. Primary structure of pyruvate, orthophosphate dikinase in dicotyledonous C₄ plant *Flaveria trinervia*. FEBS Lett 1990; 273:116.
- Pocalyko DJ, Carroll LJ, 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; 29:10757.
- Edman U, Meza I, Agabian N. Genomic and cDNA actin sequences from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84:3024.
- Mandel M, Higa A. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. J Mol Biol 1970; 53:154.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74:5463.
- Pearson WR, Lipman DJ. Improved tools for biological sequence comparison. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85:2444.

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, U.N.A.M. 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 trineretia*, 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 protists. In these organisms, key enzymes of the glycolytic pathway like phosphofruktokinase 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. (52-5) 622-5657; Fax (52-5) 622-5630; e-mail: rmontfor@ifcsun1.ifsiol.unam.mx

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

Abbreviations: aa, amino acid(s); AMP, adenosine 5'-monophosphate; ATP, adenosine 5' triphosphate; bp, base pair(s); cDNA, DNA complementary to RNA; *E.*, *Entamoeba*; kb, kilobase(s) or 1000 bp; nt, nucleotide(s); PEP, phosphoenolpyruvate; PPDK, pyruvate phosphate dikinase; PPDK, gene encoding PPDK; PP_i , inorganic pyrophosphate; SSC, 0.15 M NaCl 0.015 M Na_2 citrate pH 7.6.

```

-228          caaaaag aaaaataaac tcaataccea catgctgac tatttaact
-180 gtaactcca tgaattttc caatactta aagaqtcca catagattt acaaaagaa
-120 tcaacttcca atgctcaag gtcagctgga tcaagaatc tgaagttcc tgaagttcc tgaagttcc
+00 tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
1  ATGcaaaagq taaatcctt ccaaaagatt gctgcaacca acaaaagatt cctctgagga
61 aagggctgct gacttgcac aaagcaaaaa atcgacttcc agtttccccc agattttct
121 tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
181 atgcaaaag tcaaaaccca tatgcaatc gctgcaacca acaaaagaaa agttcttggg
241 ggaagaaaga atccacttcc tttctcagtc agtcaaggg cttgctatgc tctgcaaggt
301 tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
361 tcaaaaccca atgaaagat tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
421 aagaattctc tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
481 aagaaagggg tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
541 gctctcaata tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
601 caatctaat tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
661 tcaaaaccca atcaaaagat tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
721 tcaaaaccca atcaaaagat tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
781 tcaaaaccca atcaaaagat tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
841 gctctgctct gctaaagacc acaaaacatt atcccaaaa tggcagagaa tgcagattct
901 cctgctgctc atcaaaagat tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
961 tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
1021 ggaagaaaga atcaaaagat tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
1081 atcaaaagat tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
1141 aagaattctc tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
1201 ggaagaaaga atcaaaagat tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
1261 aagaagctc tctctctgag aagaagaaat acaaaaccca atctcaatg agttcttctt
1321 gctgaaagta tctcaactct caagagagaa acaaaaccca acaagctctc cctctgagga
1381 gctatggtc aactatgct tcaaaaccca gaaagaaata aagttcact tcaaaaccca
1441 atctgaaag tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
1501 atcagctgct tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
1561 tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
1621 gaaactctc atcaaaagat tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
1681 tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
1741 tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
1801 gaaactctc atcaaaagat tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
1861 tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
1921 acaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
1981 gaaactctc atcaaaagat tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
2041 gaaactctc atcaaaagat tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
2101 gaaactctc atcaaaagat tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
2161 atcaaaagat tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
2221 atcaaaagat tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
2281 gaaactctc atcaaaagat tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
2341 acaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
2401 acaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
2461 acaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
2521 gaaactctc atcaaaagat tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
2581 tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
2641 atcaaaagat tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
2701 tctgtctctc atcaaaagat tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca
2761 gaaactctc atcaaaagat tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca tcaaaaccca

```

Fig. 1. Nucleotide sequence of *E. histolytica* PPKD. Start and stop codons shown in capital letters are underlined. GenBank accession number: U03239. Methods: Clones from a λ ZAP genomic library were hybridized with a 960-bp *Eco*RI fragment from a cDNA clone that has 20% of the PPKD gene (Saavedra-Lira et al., 1992). Hybridization temperature was 65°C and washing conditions were 2 × SSC/0.1% SDS at 65°C for 60 min. Positive clones were excised in vivo (Short et al., 1988) and their nt sequence was determined by the dideoxy chain-termination method (Sanger et al., 1977) using oligodeoxynucleotides as primers.

bases using the FASTA program (Pearson and Lipman, 1988) and the resulting similarities were 51, 48 and 47% with the PPKD of *Bacteroides symbiosus* (Pocalyko et al., 1990), maize (Matsuoka et al., 1988) and *Flaveria trinervia* (Rosche et al., 1990), respectively. Alignment of the four sequences (Fig. 2) shows regions of high similarity. The highly conserved motif GGMTSHAADV (aa 450 to 461 in the *E. histolytica* sequence) can also be identified in all sequences. There is a substitution of Met by Lys in this stretch of aa for *E. histolytica*. This sequence corresponds to the active-site region which contains a His residue that functions as an acceptor of phosphoryl groups and a Thr residue whose state of phosphorylation regulates the activation state of the enzyme in plants (Pocalyko et al., 1990). Furthermore, some regions that are present in the energy-coupling protein Enzyme I of the bacterial PEP: sugar phosphotransferase system (re-

gions A, B and C in Fig. 2), are also conserved. It has been proposed that these sites are involved in the PEP binding and in the transfer of phosphate groups to the catalytic His residue (Reizer et al., 1993).

The PPKD sequence of *E. histolytica* also contains a region present in the other three sequences (Q), which is rich in the aa residues Q, R, P, E and S, similar to the region proposed as a linker between structural domains in Enzyme I (Reizer et al., 1993).

Our results confirm the existence of PPKD in trophozoites of *E. histolytica*. The study of this enzyme will broaden our knowledge about the metabolism of this parasite whose main energetic source is glycolysis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Nallely Cabrera and Laura Ongay for technical assistance. This work was supported by a grant from DGAPA, UNAM (IN202693).

REFERENCES

- Matsuoka, M., Ozeki, Y., Yamamoto, N., Hirano, H., Kano-Murakami, Y. and Tanaka, Y.: Primary structure of maize pyruvate, orthophosphate dikinase as deduced from cDNA sequence. *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 11080–11083.
- Mertens, E.: ATP versus pyrophosphate: glycolysis revisited in parasitic protists. *Parasitol. Today* 9 (1993) 122–126.
- Pearson, W.R. and Lipman, D.J.: Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 2444–2448.
- Pocalyko, D.J., Carroll, L.J., Martin, B.M., Babbitt, P.C. and 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* 29 (1990) 10757–10765.
- Reeves, R.E.: A new enzyme with the glycolytic function of pyruvate kinase. *J. Biol. Chem.* 243 (1968) 3202–3204.
- Reizer, J., Hoischen, C., Reizer, A., Pham, T.N. and Saier Jr., M.H.: Sequence analyses and evolutionary relationships among the energy-coupling proteins Enzyme I and HPR of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *Protein Sci.* 2 (1993) 506–521.
- Rosche, E. and Westhoff, P.: Primary structure of pyruvate, orthophosphate dikinase in the dicotyledonous *C.* plant *Flaveria trinervia*. *FEBS Lett.* 273 (1990) 116–121.
- Saavedra-Lira, E., Robinson, O. and Pérez-Montfort, R.: Partial nucleotide sequence of the enzyme pyruvate, orthophosphate dikinase of *Entamoeba histolytica* HMI:IMSS. *Arch. Med. Res.* 23 (1992) 39–40.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 5463–5467.
- Short, J.M., Fernández, J.M., Sorge, J.A. and Huxie, W.D.: λ ZAP: a bacteriophage λ expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 7583–7600.

