

Estudio molecular de las enzimas implicadas en la biosíntesis de los folatos: posibles blancos de acción de fármacos

Molecular study of the enzymes involved in the folate biosynthesis pathway, alternative targets for drugs

THOMAS, M.^a C.^{1,2}; BALLANTINE, S. P.¹; KELLAM, P.¹; BAINS, S.¹ y DELVES, C. J.¹

¹ Glaxo Wellcome, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire, SG1 2NY.

² Dirección actual: Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra". C.S.I.C. Ventanilla 11. 18001 Granada.

RESUMEN

Los derivados de los folatos en todas las células son cofactores esenciales en la biosíntesis de purinas, pirimidinas y ciertos aminoácidos. La mayoría de los microorganismos han de sintetizar los folatos *de novo* al carecer del sistema de transporte activo que permite a los eucariotas superiores utilizar los folatos preformados procedentes de la dieta.

La síntesis *de novo* de dihidrofolato a partir de GTP requiere la participación de varias actividades enzimáticas que son exclusivas de microorganismos, por lo que, son muy buenas dianas para fármacos. Así al no tener homólogos en mamíferos, se puede permitir un alto nivel de selección. Dihidropteroato sintasa, enzima que cataliza la formación de dihidropteroato a partir de ácido p-amino benzoico y 6-hidroximetil-7,8-dihidropterin pirofosfato es la diana de las sulfonamidas.

La caracterización molecular de las diferentes enzimas que participan en esta ruta metabólica, folding e interacciones entre los dominios ayudará en el diseño de nuevos agentes antimicrobianos.

Palabras clave: DHNA (dihidroneopterin aldolasa). PPPK (6-hidroximetil-7,8-dihidropterin pirofosfokinasa). DHPS (dihidropteroato sintasa). DHFS (dihidrofolato sintasa). DHFR (dihidrofolato reductasa).

ABSTRACT

Folate derivatives are essential co-factors in the biosynthesis of purines, pyrimidines and certain amino acids in living cells. Most microbial cells must synthesise folates *de novo* since they lack the carrier-mediated active transport system of mammalian cells which allows the use of preformed dietary folates.

The *de novo* synthesis of dihydrofolate from GTP requires the participation of several enzyme activities that are unique to microbial cells. The enzymes of the folic acid biosynthesis pathway represent, therefore, ideal targets for antimicrobial chemotherapy since they have no mammalian counter-parts, and high level selectivity should be achievable. Indeed, dihydropteroate synthase which catalyses the condensation of p-

aminobenzoic acid and 6-hydroxi-methyl-7,8-dihydropterin pyrophosphate to form dihydropteroate, is the target of sulfa drugs.

The molecular characterization of individual enzyme activities, domain folding and domain interactions within the polypeptide, should aid the design of novel antimicrobial agents.

Keywords: DHNA (dihydroneopterin aldolase). PPPK (6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase). DHPS (dihydropteroate synthase). DHFS (dihydrofolate synthase). DHFR (dihydrofolate reductase).

Recibido: 15-01-97.

Acceptado: 21-02-97.

BIBLID [0004-2927(1997) 38:2-3; 129-135]

Los agentes quimioterapéuticos son la primera línea de defensa en el tratamiento de muchas enfermedades producidas por microorganismos. Por una parte, la elevada toxicidad de muchos de estos compuestos y por otra, la resistencia a drogas, complica tanto el tratamiento como la profilaxis de las enfermedades. En la mayoría de los casos el mecanismo de acción y/o el mecanismo de resistencia a un medicamento no es bien conocido. Por ello, es necesario tanto el descubrimiento y desarrollo de nuevas drogas que resulten efectivas en organismos resistentes a otras drogas, como el estudio de nuevos blancos de acción para fármacos.

Pneumocystis carinii pneumonia es la primera causa de morbilidad y mortalidad en pacientes afectados de sida. El tratamiento con una combinación de antifolatos, trimetopin, inhibidor de la dihidrofolato reductasa (DHFR) y sulfametoxazol, inhibidor de la dihidropteroato sintasa (DHPS), han mostrado ser efectivos en el tratamiento y profilaxis de esta enfermedad. Sin embargo, existe un alto número de pacientes con intolerancia a estos medicamentos, por lo que se hace necesario el desarrollo de una nueva terapia y/o el descubrimiento de nuevos blancos de acción para fármacos.

Los derivados del folato son cofactores esenciales en la biosíntesis de purinas, timidilato, glicina, metionina y ácido pantoteico en todas las células. La mayoría de los microorganismos han de sintetizar los folatos *de novo* al carecer del sistema de transporte activo que permite a los eucariotas superiores utilizar los folatos preformados procedentes de la dieta.

La biosíntesis de dihidrofolato a partir de GTP requiere la participación de una serie de enzimas (Fig.1). Dihydroneopterin aldolasa (DHNA) cataliza la conversión de 7, 8 dihydroneopterin a 6- hidroximetil-7,8-dihidropterin, el cual es sustrato de la 6- hidroximetil-7,8- dihidropterin pirofosfo kinasa (PPPK) para formar 6- hidroximetil-7,8-dihidropterin pirofosfato. Este compuesto es utilizado junto al ácido para-amino benzoico (PABA) por la enzima dihidropteroato sintasa (DHPS) para la producción de 7,8-dihidropteroato.

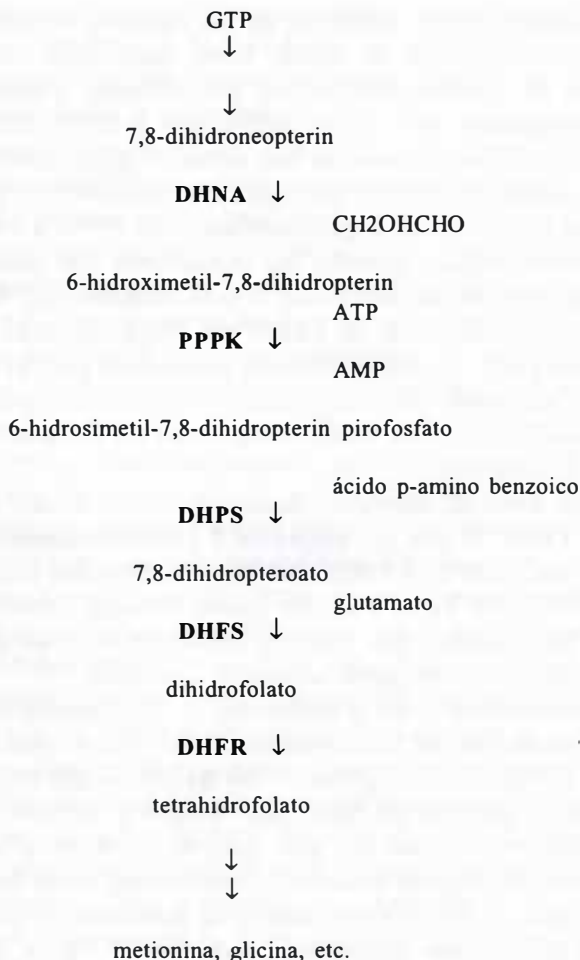


Fig. 1.—Enzimas involucradas en la biosíntesis de dihidrofolato a partir de GTP. DHNA (dihidroneopterin aldolasa), PPPK (6-hidroxiometil-7,8-dihidropterin pirofosfokinasa) y DHPS (dihidropteroato sintasa) son exclusivas de microorganismos.

Estas enzimas son exclusivas de microorganismos, sólo GTP ciclohrolasa I la primera enzima de la ruta biosintética, la cual cataliza la formación de dihidroneopterin trifosfato a partir de GTP, es expresada en eucariotas superiores. Esta ruta biosintética es por tanto ideal como blanco de acción de fármacos, al no tener homólogos en mamíferos. Así en contraste con otras enzimas más estudiadas y mejor conocidas como la dihidrofolato reductasa (DHFR), puede permitirse un alto grado de selectividad. Además esta ruta incluye la enzima DHPS diana de los fármacos sulfonamidas, antibióticos de amplio espectro utilizados frente a bacterias, protozoos parásitos y hongos.

La caracterización molecular de las enzimas envueltas en la biosíntesis de los folatos *de novo* ha estado hasta hace poco restringida a especies bacterianas. En *Escherichia coli* se han clonado, expresado y analizado el producto de expresión de los genes codificantes de PPPK, DHPS y DHFS (1,2,3,4). En *Streptococcus pneumoniae* se han descrito igualmente los genes monofuncionales codificantes de las proteínas con actividad PPPK y DHPS (5,6,7). También ha sido descrito el gen codificante de PPPK y DHPS en *Plasmodium falciparum* habiéndose descrito las mutaciones que producidas en este gen son responsables de la resistencia a sulfonamidas (8). Recientemente se ha descrito el gen codificante de DHPS de *Staphylococcus haemolyticus* (9).

El mayor grado de complejidad lo presenta el gen *fas* de *P. carinii* el cual fue aislado utilizando oligonucleótidos degenerados basados en dos péptidos cuyas secuencias se encuentran conservadas en las proteínas Sul de *Bacillus subtilis* y *S. pneumoniae* y una librería de cDNA de *P. carinii*. Este gen *fas* codifica una proteína altamente insoluble de 740 amino ácidos y peso molecular 83979 Kda. El gen *fas* mapea en 4 dominios denominados FasA y FasB (DHNA), FasC (PPPK) y FasD (DHPS) y contiene las tres actividades DHNA, PPPK, DHPS (10). En el extremo amino terminal contiene 38 amino ácidos altamente hidrofóbicos que parecen corresponder a un péptido líder que no tiene homología con ninguna secuencia conocida.

El conocimiento a nivel molecular de las enzimas que están implicadas en la ruta metabólica de la biosíntesis de los folatos, podría permitir el diseño de nuevos fármacos cuya aplicación en quimioterapia tendría amplio espectro al encontrarse presente en bacterias, hongos y parásitos. Para el estudio y caracterización molecular del gen *fas*, se produjeron y expresaron varias construcciones utilizando el sistema baculovirus. Cada fragmento se clonó en pBS y de aquí se clonó en el vector de transfección p36c. Células SF9 de insecto se transforman simultáneamente con el vector de transfección y el virus de la poliedrosis nuclear *Autographa californica* (AcMNPV). Mediante métodos establecidos se aíslan los baculovirus recombinante que expresan en altos niveles de cada constructo. Las diferentes actividades pueden detectarse mediante cromatografía en papel, detectando el producto final de la reacción por marcaje radioactivo. Así, en la reacción se incorpora el sustrato de cada enzima, PABA tritiado, y en su caso, las enzimas purificadas PPPK y DHPS de *E. coli*.

Se comenzó a truncar el extremo amino terminal estableciendo de esta manera las secuencias que resultaban necesarias para cada una de las actividades, así como aquellas que apuntaban a una posible interacción entre el extremo amino (FasA) y carboxi terminal (FasD), de la cual la actividad DHPS era dependiente. También se pudo observar que la actividad DHPS además de depender de la presencia del extremo amino terminal, requiere la presencia del dominio FasC (11). Tratando de aumentar la solubilidad del

polipéptido, se eliminó en una siguiente construcción la secuencia correspondiente al péptido líder comenzando el polipéptido en una metionina artificialmente creada en posición 39. Esta secuencia mostró contener las tres actividades aunque se vio afectada la actividad DHPS (11).

Para entender mejor la relación entre FasA y FasB y sus implicaciones en la funcionalidad de la DHNA se realizaron mutaciones puntuales dirigidas en aminoácidos que se encontraban conservados en la DHNA de *P. carinii* y sus homólogas bacterianas, utilizando como molde el polipéptido FasAB comenzando en una metionina natural. Como control se realizaron igualmente mutaciones en posiciones no conservadas. Los diferentes mutantes se expresaron en *E. coli* y se purificaron hasta homogeneidad. El estudio de la actividad DHNA en cada uno de los mutantes mostró que 5 de los 6 mutantes en posiciones invariables tenían un dramático efecto en la actividad DHNA. En dos de ellos no se detectó actividad, mientras que en los otros tres mutantes en los que la mutación había afectado la actividad, esta se había reducido hasta 24 veces respecto a la proteína nativa. Uno de los mutantes modificado en una posición conservada, al igual que los mutantes en los que el cambio de un aminoácido por otro se había producido en posiciones no conservadas, contenían niveles de actividad comparables a los de la proteína nativa (12).

El análisis de la masa molecular de cada uno de los mutantes, mediante cromatografía de afinidad en Superdex-200, mostró que aquellos mutantes que conservaban actividad DHNA eluían en una fracción que se correspondía a la fracción en la que eluía la proteína nativa. Sin embargo aquellas proteínas en las que la mutación había reducido considerablemente o abolido la actividad DHNA, la fracción en la que eluía la proteína era muy diferente a la de la proteína nativa. Estos estudios permitieron concluir que la/s mutación/es que resultaban en pérdida total o parcial de actividad, se correspondían con una conformación alterada de la proteína (12). La desnaturalización-renaturalización de proteína nativa/proteína mutada permite la formación de heterodímeros. De la actividad de los mismos se deduce que es posible "rescatar" la actividad en un alto porcentaje.

Utilizando mutantes de *E. coli* sensibles a la temperatura (1) se aisló el gen *fas* en *Candida albicans*. Para investigar cada una de las actividades se realizaron experimentos de expresión *in vitro* del polipéptido completo comenzando en el único posible ATG iniciador conocido en la secuencia. Tan solo se detectó actividad PPPK. En el caso de existir en *C. albicans*, al igual que en *P. carinii*, una interacción entre el extremo amino y carboxiterminal de la proteína de la que depende la actividad DHPS, la no detección de actividades DHNA y DHPS podría explicarse porque el polipéptido carecería del extremo amino de cuya secuencia ambas actividades dependen.

Para valorar la importancia de esta ruta metabólica realizamos experimentos de transformación en *C. albicans* puesto que *P. carinii* no puede

crecerse *in vitro*. Estos experimentos se dirigirían a eliminar del genoma el gen *fas*. Para ello se construyó un vector de transformación en el que se utilizaría un gen seleccionador flanqueado por secuencias homólogas a las del gen *fas* de *C. albicans*. En experimentos de transformación lo más utilizado para la selección de los transformantes, es incluir en el vector de transformación un gen que produce la resistencia a un antibiótico, de manera que tras la transformación del organismo con el vector se puedan seleccionar los transformantes por crecimiento en presencia del correspondiente antibiótico. Así por ejemplo, en experimentos de transformación en protozoos parásitos, se han empleado entre otros los genes que codifican las fosfotransferasas de higromicina y neomicina que proporcionan la resistencia a higromicina B y G418 respectivamente. *C. albicans* es resistente a estos antibióticos por lo que no pueden ser utilizados. Por ello en los experimentos de transformación se utilizó la cepa de *C. albicans* CAI4 (*ura-*) la cual sólo es capaz de crecer en medio suplementado con uracilo y, para la selección de los transformantes, entre secuencias del gen *fas* se incluyó el casete *hisG-URA3-hisG*. De esta manera en medio sin uracilo sólo las levaduras transformadas podrán crecer.

Así se transformó *C. albicans* con PEG obteniéndose transformantes que tras ser analizados mediante PCR mostraron contener una copia interrumpida del gen *fas* y una copia intacta del gen *fas*. Tras crecimiento de los transformantes en medio enriquecido no pudo ser posible eliminar el cassette *hisG-URA3-hisG*, por lo que fue necesario realizar una inactivación del gen *URA3* por crecimiento de los transformantes en medio conteniendo ácido 5' fluorótico. Si bien sucesivas transformaciones no permitieron generar transformantes nulos, se están realizando estudios de crecimiento con la levadura que sólo contiene una copia del gen *fas*, de manera que se pueda calibrar la importancia de esta ruta metabólica.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) TALARICO, T. L., RAY, P. H., DEV, I. K., MERRILL, B. M. & DALLAS, W. S.: *J Bacteriol* (1992), **174**:5971-5977.
- (2) DALLAS, W. S., GOWEN, J. E., RAY, P. H., COX, M. J. & DEV, I. K.: *J Bacteriol* (1992), **174**:5961-5970.
- (3) BOGNAR, A. L., OSBORNE, C., SHANE, B., SINGER, S. C & FERONE, R.: *J Biol Chem* (1985), **260**:5625-5630.
- (4) BOGNAR, A. L., OSBORNE, C. & SHANE, B.: *J Biol Chem*, (1987), **262**:12337-12343.
- (5) LÓPEZ, P., GREENBERG, B. & LACKS, S. A. : *J Bacteriol* (1990), **172**:4766-4774.
- (6) LÓPEZ, P., ESPINOSA, M., GREENBERG, B. & LACKS, S. A.: *J Bacteriol*, (1987), **169**:4320-4326.
- (7) LÓPEZ, P. & LACKS, S. A.: *J Bacteriol* (1993), **175**:2214-2220.
- (8) BROOKS, D. R., WANG, P., READ, M., WATKINS, W. M., SIMS, P. F. G. & HYDE, J. E.: *Eur J Biochem* (1994), **224**:397-405.