

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra Parazitologie



Mgr. Věra Zedníková

Alternativní oxidoreduktázy 2-keto kyselin (KOR) u *Trichomonas vaginalis*: artefakt histochemického barvení

Alternative 2-keto acid oxidoreductases (KOR) in *Trichomonas vaginalis*: Artifact of histochemical staining

Rigorózní práce

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze,

Podpis

1 Abstrakt

V roce 1999 vyšla publikace (Brown *et al.*, 1999), ve které byly u *Trichomonas vaginalis* popsány dva nové enzymy karbohydrátového metabolismu, tzv. alternativní oxidoreduktázy 2-keto kyselin (KOR). Podle autorů jsou tyto enzymy plně aktivní v trichomonádách rezistentních k metronidazolu, jako substrát přednostně metabolizují indolpyruvát a, na rozdíl od příbuzné pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázy (PFO), nepoužívají ferredoxin jako elektronový akceptor. Brown *et al.* navrhovali, že by KOR mohly představovat náhradní zdroj energie pro trichomonády rezistentní k metronidazolu, jež eliminovaly katabolismus pyruvátu v hydrogenosomech.

V práci z roku 2012 jsme zjistili, že aktivita KOR byla způsobena neenzymatickou redukcí nitrotetrazoliové modři (NBT) pomocí indolpyruvátu a Tritonu X-100 používaného pro přípravu membránových frakcí. Měření aktivit v celkovém lyzátu trichomonád prokázalo, že indolpyruvát je metabolizován pomocí PFO, což bylo potvrzeno v pokusech s purifikovaným enzymem. Domnělá aktivita alternativních oxidoreduktáz 2-keto kyselin v buňkách trichomonád rezistentních k metronidazolu byla způsobena experimentálním artefaktem a tyto enzymy u *T. vaginalis* neexistují.

Abstract

In 1999, Brown *et al* reported that *Trichomonas vaginalis* possesses two new enzymes of carbohydrate metabolism, alternative 2-keto acid oxidoreductases (KOR). These enzymes preferentially used indolepyruvate in a reaction that resembled that of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (PFO). However, the KOR did not use ferredoxin as electron acceptor and remained active in metronidazole-resistant trichomonads lacking PFO. Therefore, it was proposed that the KORs may help trichomonads to survive in the presence of metronidazole.

In the study from 2012, we showed that the apparent KOR activity was caused by the non-enzymatic reduction of the indicator dye, nitroblue tetrazolium (NBT), by indolepyruvate, which is facilitated by Triton X-100 used to prepare the membrane fractions. The low level indolepyruvate-dependent activity that is present in *T. vaginalis* strains sensitive to metronidazole is catalyzed by PFO, which was verified using the pure enzyme. Presumed activity of alternative 2-keto acid oxidoreductases was caused by an experimental artifact and these enzymes do not exist in *T. vaginalis*.

2 Úvod

Trichomonas vaginalis je bičíkatý anaerobní prvok, který způsobuje sexuálně přenosné onemocnění trichomoniázu. Jedná se o nejčastější urogenitální infekci nevirového původu člověka s odhadem více než 280 miliónů nových případů každý rok (WHO, 2008).

Jakožto anaerobové nemají trichomonády typické respirující mitochondrie. Místo nich vlastní organely mitochondriálního typu, hydrogenosomy (Müller, 1993). Hydrogenosomy dostaly své jméno podle jednoho z konečných produktů jejich metabolismu, vodíku (Lindmark a Müller, 1973).

Role hydrogenosomů spočívá mj. v tvorbě Fe-S center, probíhají zde některé reakce energetického metabolismu (tzv. „extended glycolysis“) a tyto organely obsahují také enzymy potřebné k odstraňování nebezpečných ROS – Reactive Oxygen Species (reaktivní sloučeniny kyslíku). Substráty pro energetický metabolismus hydrogenosomů pocházejí z glykolýzy probíhající v cytosolu. Jeden z klíčových enzymů v metabolismu hydrogenosomů je pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza (PFO), neboli pyruvát syntáza (Yoon *et al.*, 1997). Enzym katalyzuje reverzibilní oxidativní dekarboxylaci pyruvátu na CO₂, acetyl-CoA a 2 elektrony. Akceptorem uvolněných elektronů je elektrontransportní protein [2Fe-2S] ferredoxin. Ferredoxin následně odevzdává elektrony [FeFe] hydrogenáze (Payne *et al.*, 1993), která redukuje protony za vzniku molekulárního vodíku a zároveň dochází k reoxidaci ferredoxinu. Acetyl-CoA je dále přeměněn pomocí enzymu acetát:sukcinát-CoA transferázy (ASCT) na konečný produkt metabolismu acetát a vedlejší produkt sukcinyl-CoA (Jenkins *et al.*, 1991). Sukcinát thiokináza (STK, též sukcinyl-CoA syntetáza) přeměňuje sukcinyl-CoA na sukcinát, energie thioesterové vazby je v tomto kroku konzervována a dochází k substrátové fosforylaci ADP na ATP.

V genomu *T. vaginalis* bylo identifikováno celkem sedm genů pro PFO (Carlton *et al.*, 2007). Tyto geny byly pojmenovány PFO A, B1, B2, C, D, E a F, přičemž patrně všechny jsou ve „wild type“ buňkách exprimovány. Na základě celkové podobnosti primární struktury můžeme rozdělit tyto paralogy do 2 skupin – (1) PFO A, B1 a B2, (2) PFO C, E, F a poněkud zvlášť stojící PFO D, která má od ostatních paralogů nejdelsí a nejodlišnější sekvenci (Carlton *et al.*, 2007).

PFO je protein náchylný k inaktivaci kyslíkem, asociovaný s vnitřní hydrogenosomální membránou. Kyslík poškozuje Fe-S centra proteinu oxidací železa, což vede k nestabilitě a rozpadu enzymu (Lindmark a Müller, 1973; Outten, 2007). PFO je homodimerní protein obsahující patrně čtyři [4Fe-4S] centra (avšak počet center zatím nebyl

jednoznačně stanoven) a nekovalentně vázaný tiamin pyrofosfát. Nativní molekulová hmotnost tohoto enzymu je přibližně 240 kDa (Williams *et al.*, 1987).

PFO je dle všeobecně přijímaného konceptu jeden z klíčových enzymů vystupující při aktivaci antimikrobiálních léčiv proti trichomoniáze 5-nitroimidazolů, mezi které patří i metronidazol. Toto léčivo vstupuje do buněk trichomonád pasivní difúzí (Müller a Lindmark, 1976) a akumuluje se v hydrogenosomu, kde probíhá také jeho aktivace. V přítomnosti metronidazolu nejsou uvolněné elektrony vzniklé při dekarboxylaci pyruvátu předány enzymu hydrogenáze, ale právě tomuto léčivu, které je redukováno na cytotoxickou formu, pravděpodobně nitroradikálový aniont a další redukční meziprodukty s krátkou životností (nitroso radikál, hydroxylamin) (Edwards, 1993a). Předpokládá se, že především vysoce reaktivní nitro radikál poškozují DNA, proteiny a lipidy a v důsledku způsobuje buněčnou smrt.

Již několik let po první aplikaci metronidazolu proti trichomoniáze byl pozorován vznik rezistence u *Trichomonas vaginalis* k tomuto léčivu (Edwards, 1993b). Rezistenci k metronidazolu jde u *T. vaginalis* navodit také *in vitro*, a to při dlouhotrvající kultivaci v médiu se subletální koncentrací metronidazolu, při které postupně dochází k podstatným metabolickým změnám v cytosolu a v hydrogenosomech trichomonád. Pro úplnou rezistenci trichomonád k metronidazolu musí být odstraněny klíčové dráhy aktivace metronidazolu zahrnující především PFO a feredoxin, ale také hydrogenázu, jablečný (malic) enzym a NADH:feredoxin oxidoreduktázu (rudimentární homolog respiračního komplexu I). V konečné fázi vývoje rezistence, tzv. anaerobní rezistenci, je tedy aktivita PFO v podstatě nulová (Kulda, 1999). Trichomonády rezistentní k metronidazolu kompenzují ztrátu energie pramenící z poklesu aktivit hydrogenosomálních enzymů zvýšenou aktivitou cytosolických enzymů laktát dehydrogenázy, pyruvát kinázy a NADP-dependentního jablečného enzymu (Kulda, 1999).

V roce 1999 vyšla publikace (Brown *et al.*, 1999), ve které byly popsány u *Trichomonas vaginalis* dva nové enzymy karbohydrátového metabolismu, tzv. alternativní oxidoreduktázy 2-keto kyselin (KOR1 a KOR2). Podle autorů jsou tyto enzymy pravděpodobně plně aktivní v trichomonádách rezistentních k metronidazolu, na rozdíl od hydrogenosomálního enzymu pyruvát:feredoxin oxidoreduktázy. Tyto enzymy patrně nepředávají ze substrátu uvolněné elektrony feredoxinu, a tudíž nedejme k reduktivní aktivaci metronidazolu (Brown *et al.*, 1999). Brown *et al.* navrhovali, že by KOR mohly představovat pro trichomonády rezistentní k metronidazolu alternativní způsob, jak syntetizovat v hydrogenosomu ATP. Acyl-CoA, který by se tvořil v reakci katalyzované pomocí KOR, by

mohl být zpracován enzymy ASCT a STK za vzniku ATP. Oba tyto enzymy zůstávají aktivní i v trichomonádách rezistentních k metronidazolu (Ellis *et al.*, 1992). Aryl-CoA, produkovaný také pomocí KOR, by patrně též mohl být využit k tvorbě energie v zatím nedefinované dráze (Brown *et al.*, 1999).

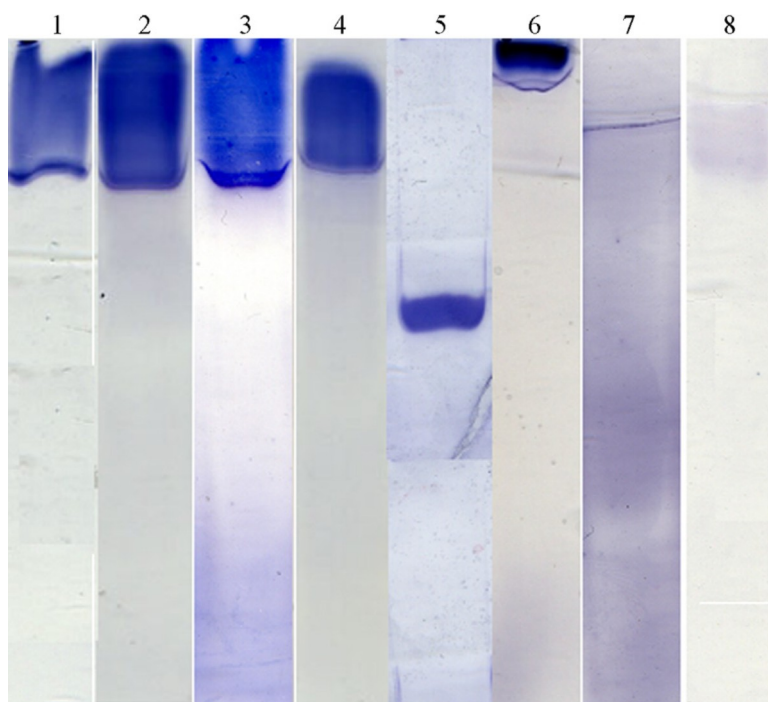
Dle autorů tyto enzymy pravděpodobně metabolizují, stejně jako PFO, širokou škálu substrátů, jako např. pyruvát, α -ketobutyrát či α -ketomalonát, a také deaminované formy aromatických aminokyselin, např. indolpyruvát či fenylpyruvát. Podle autorů citované práce jsou KOR díky těmto aktivitám nezbytné pro přežití trichomonád rezistentních k metronidazolu, jež mají defektní energetický metabolismus pyruvátu v hydrogenosomech. KOR jim umožňují syntetizovat ATP na účet jiných substrátů a představují pro trichomonády alternativní zdroj energie. Při pozdější analýze genomu trichomonád ovšem nebyly nalezeny geny jiných oxidoreduktáz alfa ketokyselin, než právě sedm již zmíněných paralogů PFO (Carlton *et al.* 2007). Jiné enzymy potenciálně schopné katalyzovat výše uvedené reakce než právě paralogy PFO nebyly identifikovány ani v proteomu hydrogenosomů (Schneider *et al.* 2011).

Na základě publikace (Brown *et al.*, 1999) bylo mým cílem charakterizovat alternativní oxidoreduktázy 2-keto kyselin (KOR) v buňkách *T. vaginalis* a určit jejich vztah k enzymu pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáze D. Údajné KOR byly nalezeny pomocí biochemických metod. V pokusech bylo ukázáno, že se tyto KOR vyskytují převážně v membránových frakcích a jako substrát preferují indolpyruvát. Vzhledem k primární struktuře PFOD, značně odlišné od ostatních paralogů PFO jsem předpokládala, že by tento protein mohl metabolizovat některý ze substrátů identifikovaných ve zmíněné publikaci a tedy představovat některou z identifikovaných alternativních oxidoreduktáz 2-keto kyselin.

V mých pokusech byl zpracováván celkový lyzát trichomonád a hydrogenosomy purifikované pomocí izopyknické centrifugace na gradientu Percollu. Příprava membránových frakcí byla reprodukována dle publikace autorů Brown *et al.* s jediným rozdílem, kdy detergent použitý pro primární solubilizaci membrán byl 0,5% oktylglukosid místo 0,5% dodecylglukosidu. Jednotlivé frakce byly separovány pomocí nedenaturující elektroforézy. Pro vizualizaci aktivity KOR byl gel inkubován v anaerobním pufu bez β -merkaptetanolu s 10 mM indolpyruvátem, 200 μ M CoA a 2 mg/ml nitro blue tetrazolium (NBT). Přítomnost aktivity byla prokázána redukcí NBT na modrý formazan v gelu (obr. 1).

Dráha 1 na obrázku 1 představuje celkový lyzát *T. vaginalis* s 1% Tritonem X-100 a dráha 2 čisté hydrogenosomy obsahující 1% Triton X-100 inkubované dle publikovaného postupu. V obou případech je jasně viditelný signál, což odpovídá datům ze zmíněné publikace. Jako negativní kontrola (obr. 1, dráha 3) byly použity čisté hydrogenosomy obsahující 1% Triton X-100 inkubované bez koenzymu A, esenciálního kofaktoru enzymatické reakce katalyzované PFO i KOR (tato kontrola nebyla v publikaci použita). Z obrázku je zřejmé, že také došlo k barevné reakci v gelu. Zjištění, že by data publikovaná autory Brown *et al.* nemusela být výsledkem enzymatické aktivity KOR, vedla k následným pokusům. Na obrázku 1, dráha 4 je znázorněn gel s hydrogenosomy s 1% Tritonem X-100, který byl po ukončení elektroforézy zahříván při 70 °C po dobu 30 minut a následně inkubován s indolpyruvátém, CoA a NBT. Zahřívání gelu mělo za cíl denaturaci proteinů, přesto je na obrázku jasně patrný signál. Jako kontrola, že k denaturaci enzymů skutečně došlo, byla stanovena aktivita hydrogenosomálního jablečného enzymu. Spektrofotometrické měření ukázalo, že je tento enzym po 30 minutách inkubace v 70 °C neaktivní. Jako další negativní kontroly nám posloužily lidské červené krvinky smíchané s 1% Tritonem X-100 a čistý vzorkový pufr pro nativní elektroforézu obsahující 1% Triton X-100 (obr. 1, dráha 5, 6). Oba vzorky byly inkubovány s indolpyruvátém, NBT a bez CoA.

Výsledky jasně ukazují, že došlo k vytvoření modrého formazanu. Čisté hydrogenosomy s 1% Tritonem X-100 inkubované v anaerobním pufru s CoA, NBT a bez indolpyruvátu nevykazovaly žádnou barevnou reakci (obr. 1, dráha 7). A stejně tomu bylo i u hydrogenosomů bez Tritonu X-100 inkubovaných s indolpyruvátém, NBT a CoA (obr. 1, dráha 8).



Obr. 1: Nedenaturující elektroforéza membránových frakcí *T. vaginalis*. Dráhy 1, 2 a 4 byly inkubovány s kompletní reakční směsí – indolpyruvát, NBT, CoA. *Vysvětlivky:* 1, celkový lyzát *T. vaginalis* s 1% Tritonem X-100; 2, čisté hydrogenosomy obsahující 1% Triton X-100; 3, čisté hydrogenosomy obsahující 1% Triton X-100 inkubované bez CoA; 4, čisté hydrogenosomy obsahující 1% Triton X-100 zahříváné po ukončení separace proteinů 30 minut při 70 °C; 5, lidské červené krvinky s 1% Tritonem X-100 inkubované bez CoA; 6, vzorkový pufr obsahující pouze 1% Triton X-100 inkubovaný bez CoA; 7, čisté hydrogenosomy s 1% Tritonem X-100 inkubované bez indolpyruvátu; 8, čisté hydrogenosomy bez Tritonu X-100.

Tyto výsledky, naznačující, že barevná reakce v gelu je artefakt nesouvisející s enzymovou aktivitou, vedly k dalším ověřovacím pokusům. V aerobní kyvetě byl smíchán ve 2 ml fosfátového pufru 5 mM indolpyruvát a 1 mg/ml NBT. Po přidání několika mikrolitrů 10% Tritonu X-100 došlo během krátké chvíle k výraznému modro-fialovému zbarvení směsi. Nebyl-li ke směsi přidán Triton X-100, proběhla barevná reakce v řádech minut. Pokud byla místo pufru použita voda, k barevné reakci nedošlo.

Při anaerobním spektrofotometrickém měření enzymatické aktivity celkového lyzátu rezistentních trichomonád obsahujícího 1% Triton X-100 s methyl viologenem jako akceptorem elektronů a indolpyruvátém také nebyla naměřena žádná aktivita. Při měření

aktivity s celkovým lyzátem parentních trichomonád byla pozorována indolpyruvát- a CoA-dependentní redukce methyl viologenu. Tato aktivita dosahovala přibližně 5% aktivity enzymu PFO měřené za stejných podmínek s pyruvátem. Pro kontrolu byla aktivita změřena také s purifikovanou hydrogenosomální PFO a indolpyruvátem. A skutečně, methyl viologen byl redukován, a to s podobnou účinností jako při použití celkového lyzátu parentního kmene trichomonád Tv 10-02 a indolpyruvátu.

Brownem *et al.* identifikovaná aktivita alternativních oxidoreduktáz 2-keto kyselin v buňkách trichomonád rezistentních k metronidazolu tedy nebyla prokázána. Redukce NBT na modro-fialový formazan je vyvolána neenzymatickou reakcí s indolpyruvátem v přítomnosti Tritonu X-100. Skutečnost, že látky obsahující aromatický indolový kruh (tedy i indolpyruvát) dokáží redukovat tetrazoliové soli, potvrdila i dostupná literatura (Glennner *et al.*, 1960). *T. vaginalis* tedy nevlastní alternativní oxidoreduktázy, které by v hydrogenosomech přispívaly k energetickému metabolismu, a není třeba pátrat po zdroji nekonvenčních substrátů hydrogenosomálního metabolismu (indolové sloučeniny) ani po neznámých akceptorech elektronů, které by neredukovaly metronidazol, jak navrhovali Brown *et al.* Všechny tyto výsledky byly shrnuty v publikaci Zedníková *et al.*, 2012.

Použitá literatura:

Brown, D. M., Upcroft, J. A., Dodd, H. N., Chen, N., Upcroft, P. 1999. Alternative 2-keto acid oxidoreductase activities in *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol.* **98**, 203-214.

Carlton, J. M., Hirt, R. P., Silva, J. C., Delcher, A. L., Schatz, M., Zhao, Q., Wortman, J. R., Bidwell, S. L., Alsmark, U. C., Besteiro, S., Sicheritz-Ponten, T., Noel, C. J., Dacks, J. B., Foster, P. G., Simillion, C., Van de, P. Y., Miranda-Saavedra, D., Barton, G. J., Westrop, G. D., Müller, S., Dessi, D., Fiori, P. L., Ren, Q., Paulsen, I., Zhang, H., Bastida-Corcuera, F. D., Simoes-Barbosa, A., Brown, M. T., Hayes, R. D., Mukherjee, M., Okumura, C. Y., Schneider, R., Smith, A. J., Vaňáčová, Š., Villalvazo, M., Haas, B. J., Perteza, M., Feldblyum, T. V., Utterback, T. R., Shu, C. L., Osoegawa, K., de Jong, P. J., Hrdý, I., Horvátová, L., Zubáčová, Z., Doležal, P., Malik, S. B., Logsdon, J. M., Jr., Henze, K., Gupta, A., Wang, C. C., Dunne, R. L., Upcroft, J. A., Upcroft, P., White, O., Salzberg, S. L., Tang, P., Chiu, C. H., Lee, Y. S., Embley, T. M., Coombs, G. H., Mottram, J. C., Tachezy, J., Fraser-Liggett, C. M., Johnson, P. J. 2007. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science.* **315**, 207-212. Cavalier-Smith, T. 1986. The kingdoms of organisms. *Nature.* **324**, 416-417.

Edwards, D. I. 1993a. Nitroimidazole Drugs - Action and Resistance Mechanisms I. Mechanisms of Action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* **31**, 9-20.

Edwards, D. I. 1993b. Nitroimidazole Drugs - Action and Resistance Mechanisms II. Mechanisms of Action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* **31**, 201-10.

Ellis, J. E., Cole, D., Lloyd, D. 1992. Influence of oxygen on the fermentative metabolism of metronidazole-sensitive and resistant strains of *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol.* **56**, 79-88.

Glenner, G. G., Weissbach, H., Redfield, B. G. 1960. The histochemical demonstration of enzymatic activity by a nonenzymatic redox reaction – reduction of tetrazolium salts by indolyl-3-acetaldehyde. *J Histochem Cytochem.* **8**, 258-61.

Jenkins, T. M., Gorrell, T. E., Müller, M., Weitzman, P. D. 1991. Hydrogenosomal succinate thiokinase in *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *Biochem Biophys Res Commun.* **179**, 892-896.

Kulda, J. 1999. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *Int. J Parasitol.* **29**, 199-212.

Lindmark, D. G., Müller, M. 1973. Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *J Biol Chem.* **248**, 7724-7728.

Müller, M., Lindmark, D. G. 1976. Uptake of metronidazole and its effect on viability in trichomonads and *Entamoeba invadens* under anaerobic and aerobic conditions. *Antimicrob Agents Chemother.* **9**, 696-700.

Müller, M. 1993. The hydrogenosome. *J Gen Microbiol.* **139**, 2879-2889.

Outten, F. W. 2007. Iron-sulfur clusters as oxygen-responsive molecular switches. *Nat Chem Biol.* **3**, 206-7.

Payne, M. J., Chapman, A., Cammack, R. 1993. Evidence for an [Fe]-type hydrogenase in the parasitic protozoan *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Lett.* **317**, 101-4.

Schneider, R. E., Brown, M. T., Shiflett, A. M., Dyall, S. D., Hayes, R. D., Xie, Y., Loo, J. A., Johnson, P. J. 2011. The *Trichomonas vaginalis* hydrogenosome proteome is highly reduced relative to mitochondria, yet complex compared with mitosomes. *Int J Parasitol.* **41**, 1421-34.

Williams, K., Lowe, P. N., Leadlay, P. F. 1987. Purification and characterization of pyruvate: ferredoxin oxidoreductase from the anaerobic protozoon *Trichomonas vaginalis*. *Biochem J.* **246**, 529-36.

World Health Organization. Geneva. 2001. Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections.
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75181/1/9789241503839_eng.pdf

Yoon, K. S., Ishii, M., Kodama, T., Igarashi, Y. 1997. Purification and characterization of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *Arch Microbiol.* **167**, 275-9.

Zedníková, V., Beltrán, N. C., Tachezy, J., Hrdý, I. 2012. Alternative 2-keto acid oxidoreductases in *Trichomonas vaginalis*: artifact of histochemical staining. *Mol Biochem Parasitol.* **181**, 57-9.



Short communication

Alternative 2-keto acid oxidoreductases in *Trichomonas vaginalis*: Artifact of histochemical staining

Věra Zedníková, Neritza Campo Beltrán, Jan Tachezy, Ivan Hrdý*

Department of Parasitology, Charles University in Prague, Viničná 7, 128 44 Prague 2, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 July 2011

Received in revised form

13 September 2011

Accepted 16 September 2011

Available online 22 September 2011

Keywords:

Trichomonas

Keto acid oxidoreductase

Hydrogenosome

Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase

Metronidazole

Nitroblue tetrazolium

ABSTRACT

Trichomonas vaginalis has been reported to possess alternative 2-keto acid oxidoreductases (KORs). These enzymes preferentially used indolepyruvate in a reaction that resembled that of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (PFO). However, the KORs did not reduce ferredoxin and remained active in metronidazole-resistant trichomonads lacking PFO. Therefore, it was proposed that the KORs may help trichomonads to survive in the presence of metronidazole. The KORs were identified using activity staining on native gels (Brown DM, Upcroft JA, Dodd HN, et al. Alternative 2-keto acid oxidoreductase activities in *T. vaginalis*. Mol Biochem Parasitol 1999;98:203–14). In the current study, we showed that the apparent KOR activity was caused by the non-enzymatic reduction of the indicator dye, nitroblue tetrazolium, by indolepyruvate, which is facilitated by Triton X-100 used to prepare the membrane fractions. We could not confirm the presence of KORs in metronidazole-resistant *T. vaginalis*. The low level indolepyruvate-dependent activity that is present in *T. vaginalis* strains sensitive to metronidazole is catalyzed by PFO, which was verified using the pure enzyme. Therefore, our results suggest that alternative 2-keto acid oxidoreductases do not exist in *T. vaginalis*.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

Trichomonas vaginalis is a flagellated protist belonging to the supergroup Excavata. It causes the most common non-viral genitourinary infection of humans and has a worldwide annual incidence of up to 170 million cases [1]. *Trichomonas* is an unusual eukaryote that is a fermentative anaerobe with hydrogenosomes instead of typical mitochondria. Hydrogenosomes are mitochondrion-related organelles that lack a genome and form hydrogen by reacting protons with electrons that are derived from metabolized substrates, such as pyruvate and malate. The production of hydrogen is catalyzed by a hallmark hydrogenosomal enzyme, the hydrogenase. The electron donor in this reaction is the reduced form of the electron carrier [2Fe2S] ferredoxin, which is reduced by another typical hydrogenosomal enzyme, pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (PFO) [2]. A two-subunit remnant of respiratory complex 1 also donates electrons to ferredoxin by oxidizing NADH [3]. PFO is a Fe–S protein that mediates the oxidative decarboxylation of pyruvate and forms acetyl coenzyme A in a CoA-dependent reaction [4]. Acetyl-CoA serves as a substrate for ATP synthesis via succinyl coenzyme A in reactions that are catalyzed by acetate/succinate CoA transferase and succinate thiokinase [2].

In 1999, new enzymes involved in *T. vaginalis* carbohydrate metabolism were added to the existing list. These enzymes were

called alternative 2-keto acid oxidoreductases (KOR1 and KOR2) and were identified using biochemical methods, which showed that KOR1 and KOR2 resided in the membrane (predominantly the hydrogenosomal membrane) fractions [5]. Similar to PFO, these enzymes were reported to utilize 2-keto acids including deaminated forms of aromatic amino acids (indolepyruvate, phenylpyruvate) in a CoA-dependent reaction. However, unlike PFO, KOR1 and KOR2 were found to be equally active in trichomonads that are highly resistant to metronidazole, which is a widely used drug that targets anaerobic pathogenic microorganisms [5]. Laboratory-derived *T. vaginalis* strains with extreme metronidazole resistance (growing in $>100 \mu\text{g ml}^{-1}$ metronidazole) lack PFO and other hydrogenosomal proteins (hydrogenase, malic enzyme, ferredoxin) and exhibit altered carbohydrate metabolism [6]. By oxidatively decarboxylating pyruvate, PFO generates low-redox-potential electrons that are transferred to the nitro group of metronidazole via ferredoxin, reducing this nitro group to form cytotoxic products, including the reactive nitro-anion radical intermediate. Elimination of the PFO- and ferredoxin-dependent pathway of the reductive activation of metronidazole is a characteristic feature for laboratory-derived *Trichomonas* strains that are resistant to metronidazole. However, the elimination of PFO prevents acetyl coenzyme A formation and consequently ATP synthesis in the hydrogenosomes [7]. The reported presence of alternative 2-keto oxidoreductases in trichomonads was proposed to account for the energy balance while avoiding metronidazole reduction by replacing ferredoxin with an unidentified electron acceptor, to

* Corresponding author. Tel.: +420 221951811; fax: +420 224919704.
E-mail address: hrdy@cesnet.cz (I. Hrdý).

broaden the spectrum of known catabolic substrates, circumvent the loss of PFO and help resistant trichomonads survive in the presence of the drug [5]. The identification of alternative 2-keto oxidoreductases in trichomonads was based on in-gel activity assays using indolepyruvate as a substrate and nitroblue tetrazolium (NBT) as a reducible acceptor. Tetrazolium dyes are commonly used in assays of the metabolic activity of tissues, cells or isolated proteins that reduce an electron-transporting cofactor (usually NAD⁺ or NADP⁺). This cofactor then reduces the soluble, colorless or weakly colored tetrazolium salt, yielding an intensely dark-colored insoluble formazan [8]. When used with non-denaturing polyacrylamide gels containing separated proteins, this so-called histochemical staining can be used to detect and distinguish a wide variety of redox enzymes that use the same oxidizable substrate but differ in their electrophoretic mobilities. The enzymatic activity is visualized as a colored band that forms in the gel upon its incubation in a suitable buffer containing a substrate, all necessary cofactors and tetrazolium dye.

As presented in the original report, bands corresponding to the suspected indolepyruvate-dependent activity were observed in non-denaturing gels used to separate *T. vaginalis* membrane fractions that had been treated with Triton X-100 (KOR1) followed by 1 M sodium acetate (KOR2). The bands were interpreted as indicating the presence of 2-keto acid oxidoreductases, so far in *T. vaginalis* unknown enzymes. These enzymes were similar to PFO based on their requirement for coenzyme A but differed from PFO based on the electrophoretic mobility, detergent solubility (KOR1), requirement of an electron acceptor other than ferredoxin and maintenance of the enzymatic activity in metronidazole-resistant trichomonads.

A draft of the *T. vaginalis* genome sequence was published in 2007 [9]. While providing an invaluable inventory of the coding potential of *T. vaginalis* (the genome size is estimated to be approximately 160 mega bases), the annotation, among other features, revealed that many *Trichomonas* proteins are coded by multi-gene families. This finding is also valid for the proteins that constitute the core hydrogenosomal catabolic pathway, including PFO, ferredoxin, hydrogenase, malic enzyme and others that are coded by 7–9 distinct genes [9]. With the genome sequence available, we decided to re-address the question of the existence of alternative 2-keto oxidoreductases, because the corresponding proteins/genes have not been identified. We speculated that some of the more divergent PFO-like genes may code for the proteins with the observed activity. We reproduced the described procedure for the preparation of membrane fractions of *T. vaginalis* (strain T1, provided by J.H. Tai, Institute of Biomedical Sciences, Taipei, Taiwan) [5] using the whole-cell lysate or Percoll-purified hydrogenosomes as the starting material [10] because KOR1 activity was proposed to predominantly reside in the hydrogenosomes [5]. The only difference from the described protocol was the use of 0.5% octylglucoside instead of 0.5% dodecylglucoside to wash the membranes obtained from the starting material in the assay buffer (50 mM HEPES, pH 7.5, 200 μ M thiamine pyrophosphate, 2.5 mM MgCl₂ and 5 mM β -mercaptoethanol) [5]. The supernatant from the octylglucoside wash was discarded, and the resulting pellet (corresponding to 10–20 ml of culture with approximately 3×10^6 cells ml⁻¹ or hydrogenosomes that were purified from 2 l of *T. vaginalis* culture) was extracted for 30 min on ice with approximately 400 μ l of the assay buffer containing 1% Triton X-100 and then centrifuged at 100 000 \times g for 40 min. A total of 10–30 μ l of the resulting supernatant was loaded onto a non-denaturing polyacrylamide gel (Laemmli system without SDS, using 5% stacking gel and 9% separating gel, acrylamide:bisacrylamide ratio of 37.5:1). The gel was run with cooling for approximately 4 h, washed and incubated in assay buffer without β -mercaptoethanol as previously described [5]. The staining solution (10 ml) contained 200 μ M CoA,

5 mM indolepyruvate and 1 mg ml⁻¹ NBT. Within minutes, dark-blue bands with a trailing smear appeared in the gel (Fig. 1, lanes 1, 2). (For interpretation of the references to color in this text, the reader is referred to the web version of the article.) However, the negative control, which lacked the necessary cofactor coenzyme A, produced the same result (Fig. 1, lane 3). Realizing that the color development may not have been the result of enzymatic activity, we performed another control in which the gel was heated at 70 °C for 30 min after the completion of electrophoresis. The staining pattern was identical to that using the non-denatured sample (Fig. 1, lane 4). The enzyme inactivation by this treatment was verified by the complete inactivation of the hydrogenosomal malic enzyme, which is the most abundant hydrogenosomal membrane-associated protein and is easily detected by in-gel activity staining [11,12] (not shown). Additional controls using indifferent protein sample rich in membranes (human red blood cells mixed with Laemmli sample buffer with 1% Triton X-100 and without SDS and reducing agent) or the sample buffer containing only 1% Triton X-100 without any protein produced colored bands in the gel after staining with indolepyruvate (Fig. 1, lanes 5 and 6, respectively). The staining pattern was also dependent on the amount of loaded protein. Less protein yielded sharper bands and reduced the trailing smear (not shown). Controls omitting indolepyruvate in the incubation assay mixture or Triton X-100 in the sample did not display detectable staining (Fig. 1, lanes 7 and 8, respectively). We then set up the reaction in a test tube, mixing NBT (1 mg ml⁻¹) with indolepyruvate (5 mM) in PBS (phosphate-buffered saline, pH 7.4). Upon addition of few microliters of 10% Triton X-100, the mixture rapidly turned violet-brown, demonstrating that the non-enzymatic reduction of NBT yielding formazan is greatly stimulated by Triton X-100. Subsequently, we reviewed the available literature resources and found that the non-enzymatic reduction of tetrazolium salts with indoleacetaldehyde, a compound that contains an indole bicyclic aromatic ring identical to that in indolepyruvate, has been observed in studies using the monoamine oxidase histochemical detection system with tryptamine as a substrate. However, the exact chemistry of this NBT reduction has not been studied [13]. In addition, the enhancing effect of Triton X-100 on tetrazolium salt reduction has been described as well [14,15]. It was proposed that univalently reduced, uncharged tetrazolium radicals rapidly partition into Triton X-100 micelles which greatly increases their local concentration and stimulates the formation of pigmented formazan [14]. Therefore, we inferred that the stained bands in the native gels are caused by the non-enzymatic reduction of NBT by indolepyruvate, which was stimulated by Triton X-100 that was possibly bound to hydrophobic proteins. Triton X-100 alone, which is a nonionic detergent, did not migrate into the gel and promoted formazan formation at the bottom of the sample-loading well (Fig. 1, lane 6).

The previous study claimed that KORs using indolepyruvate as a substrate remained equally active in the highly metronidazole-resistant *T. vaginalis* strain and that the enzymes used methyl viologen, benzyl viologen and NBT as acceptors with equal efficiency [5]. We used the Triton X-100-treated lysate of the *T. vaginalis* strain TV 10-02 MR 100, which lacks PFO [6] and has a similar level of metronidazole resistance as the strain used in the original study, to verify the reported KOR activity with indolepyruvate. We employed the standard, anaerobic spectrophotometric assay with methyl viologen as an acceptor [16]. We were unable to detect any indolepyruvate-dependent activity (not shown). Using the same assay and the lysate from metronidazole-sensitive strain T1, we observed an indolepyruvate- and CoA-dependent reduction of methyl viologen, which amounted to approximately 5% of the activity of PFO with pyruvate (not shown). To verify that this indolepyruvate-dependent activity was catalyzed by the known hydrogenosomal PFO, we used the highly purified enzyme

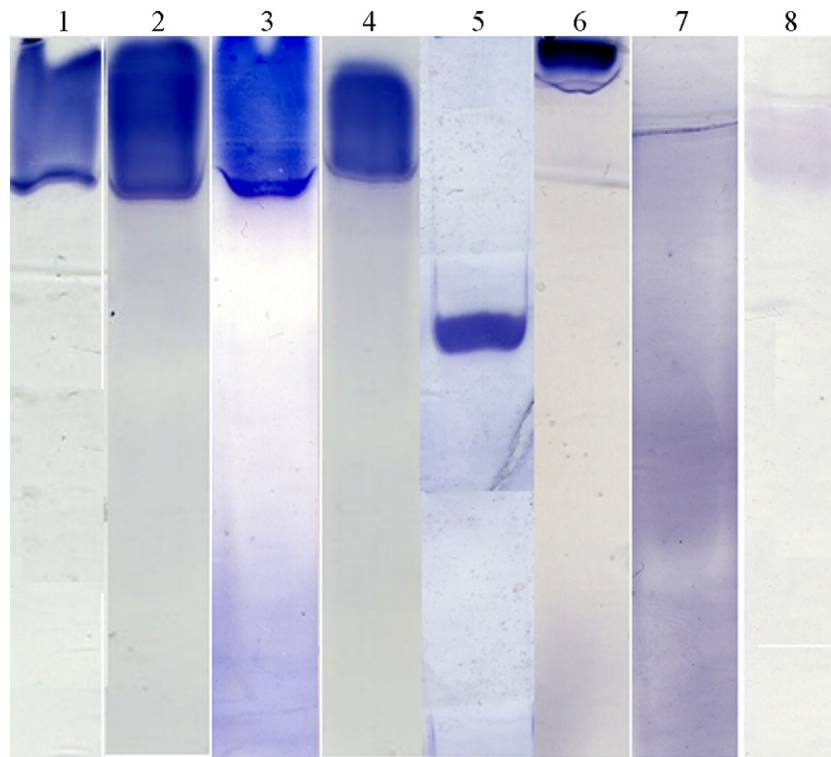


Fig. 1. Non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis of *T. vaginalis* membrane fractions. The gel was developed using the assay buffer (see text for composition) containing 5 mM indolepyruvate, 200 μ M CoA and 1 mg ml⁻¹ NBT unless specified otherwise. Approximately 15–50 μ g of protein was loaded per lane. Lane 1, whole *T. vaginalis* cells that were lysed with 1% Triton X-100. Lane 2, Percoll-purified hydrogenosomes with 1% Triton X-100. Lane 3, Percoll-purified hydrogenosomes with 1% Triton X-100. The incubation mixture did not contain CoA. Lane 4, Percoll-purified hydrogenosomes with 1% Triton X-100. The gel slice was heated at 70 °C for 30 min after electrophoresis and before staining. Lane 5, human red blood cells with 1% Triton X-100. The incubation mixture did not contain CoA. Lane 6, Laemmli sample-loading buffer with 1% Triton X-100 and without protein. Lane 7, Percoll-purified hydrogenosomes with 1% Triton X-100. The incubation mixture did not contain indolepyruvate. Lane 8, Percoll-purified hydrogenosomes without Triton X-100.

[17] in the subsequent assay. Indeed, the purified PFO displayed indolepyruvate-dependent activity, which was 4.5% of the PFO activity with pyruvate (not shown).

In summary, we must conclude that the previously described activities of alternative 2-keto acid oxidoreductases that use indolepyruvate as a preferred substrate were artifacts that were caused by the non-enzymatic conversion of NBT into formazan by indolepyruvate in the presence of Triton X-100 due to the chemistry that has been already described. Likely, no such enzymes exist in *T. vaginalis*, because we were unable to detect this activity in metronidazole-resistant cells lacking PFO using a standard assay with methyl viologen as an acceptor. The low level indolepyruvate-dependent activity that was found in metronidazole-sensitive trichomonads was catalyzed by hydrogenosomal PFO, which has been previously characterized.

Acknowledgements

This work was supported by the grants LC07032 and MSM0021620858 from the Czech Ministry of Education, Youth and Sports.

References

- [1] Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, et al. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:300–17.
- [2] Müller M. The hydrogenosome. *J Gen Microbiol* 1993;139:2879–89.
- [3] Hrdy I, Hirt RP, Dolezal P, et al. *Trichomonas* hydrogenosomes contain the NADH dehydrogenase module of mitochondrial complex I. *Nature* 2004;432:618–22.
- [4] Williams K, Lowe PN, Leadlay PF. Purification and characterization of pyruvate: ferredoxin oxidoreductase from the anaerobic protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Biochem J* 1987;246:529–36.
- [5] Brown DM, Upcroft JA, Dodd HN, et al. Alternative 2-keto acid oxidoreductase activities in *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol* 1999;98:203–14.
- [6] Rasoloson D, Vanacova S, Tomkova E, et al. Mechanisms of in vitro development of resistance to metronidazole in *Trichomonas vaginalis*. *Microbiology-SGM* 2002;148:2467–77.
- [7] Kulda J. Trichomonads. hydrogenosomes and drug resistance. *Int J Parasitol* 1999;29:199–212.
- [8] Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 2005;11:127–52.
- [9] Carlton JM, Hirt RP, Silva JC, et al. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* 2007;315:207–12.
- [10] Sutak R, Dolezal P, Fiumera HL, et al. Mitochondrial-type assembly of FeS centers in the hydrogenosomes of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:10368–73.
- [11] Drmota T, Proost P, Van Ranst M, et al. Iron-ascorbate cleavable malic enzyme from hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*: purification and characterization. *Mol Biochem Parasitol* 1996;83:221–34.
- [12] Hrdy I, Mertens E, Van Schaftingen E. Identification, purification and separation of different isozymes of NADP-specific malic enzyme from *Trichomonas foetus*. *Mol Biochem Parasitol* 1993;57:253–60.
- [13] Glenner GG, Weissbach H, Redfield BG. The histochemical demonstration of enzymatic activity by a nonenzymatic redox reaction – reduction of tetrazolium salts by indolyl-3-acetaldehyde. *J Histochem Cytochem* 1960;8:258–61.
- [14] Liochev SI, Batinic-Haberle I, Fridovich I. The effect of detergents on the reduction of tetrazolium salts. *Arch Biochem Biophys* 1995;324:48–52.
- [15] Nishikimi M. The generation of superoxide anion in the reaction of tetrahydropteridines with molecular oxygen. *Arch Biochem Biophys* 1975;166:273–9.
- [16] Lindmark DG, Müller M. Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Trichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *J Biol Chem* 1973;248:7724–8.
- [17] Smutna T, Goncalves VL, Saraiva LM, et al. Flavodiiron protein from *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes: the terminal oxygen reductase. *Eukaryot Cell* 2009;8:47–55.