

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

TESIS

**PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA
HEXOCINASA, FOSFOFRUCTOCINASA DEPENDIENTE DE
PIROFOSFATO Y TRIOSAFOSFATO ISOMERASA
RECOMBINATES DE *Entamoeba histolytica***

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

Erika Pineda Ramírez

MÉXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	M. en C. Raúl Aguilar Caballero
Vocal	Q.F.B. Ruth Edith Martín Fuentes
Secretario	Dra. Emma Cecilia Saavedra Lira
1er. Suplente	M. en C. Francisco Ruiz Terán
2º. Suplente	Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

El trabajo se desarrolló en el departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

Asesora: Dra. Emma Cecilia Saavedra Lira

Sustentante: Erika Pineda Ramírez

A mis flacos:

Papá, gracias por enseñarme que la nobleza no es falta de carácter, Mamá gracias por toda la fuerza y el coraje con los que me enseñaste a vivir. Aunque físicamente ya no están aquí, cada vez que los necesito los encuentro en los gestos y las palabras de mis hermanos. A ustedes no solo les dedico esta tesis si no todos los logros de mi vida. Sé que estarían orgullosos de mí. ¡¡¡Siempre vivirán en mis sueños y en mi corazón, los extraño tanto, en este momento me hacen mucha falta!!!

Agradecimientos

A la vida por darme la oportunidad de llegar a este momento que alguna vez creí imposible de alcanzar.

A la Dra. Emma Saavedra por la confianza al darme la oportunidad de realizar este proyecto, por el tiempo dedicado a explicarme tantas cosas y sobre todo permitirme aprenderlas a mi tiempo y a mi manera.

A el Dr. Rafael Moreno por dejarme formar parte de su grupo de trabajo durante casi dos años, por explicarme con toda la paciencia del mundo y sobre todo por ayudar a que me diera cuenta de que soy capaz de lograr muchas cosas, en verdad gracias.

A Mary por estar llena de amor hacia la vida, Javier por la paciencia y nobleza que tanto admiro, Lauro por tu fortaleza, Rosalba por ir siempre tras tus ideales y luchar por ellos, Paco por tanta ternura y franqueza, César por la firmeza y dedicación, Ira por la inocencia y por siempre escucharme, eres mi mejor amiga. A todos por el amor, por entenderme y dejarme cometer mis propios errores y estar siempre conmigo cuando los necesito. Por darme su hombro para llorar, sus brazos para apoyarme y su sonrisa para seguir adelante, son lo mejor que tengo.

Al resto de mi familia: Elena, Mine y Daisy por todo su cariño y apoyo, a Laus por escucharme cuando te necesito y por siempre hacerme reír, te estás convirtiendo en una gran mujer; a Panchito por llenar la casa de alegría con tus travesuras y risas, eres la mayor bendición que la vida pudo mandarnos, te adoro. A mis tíos por nunca dejarnos solos.

A quienes empezaron junto conmigo este camino: Israel, Diana, Aldo, Gris, Amilcar, Dulce, Maguito, Belem, Claus, Gusa, Rodrigote, Luis, Édgar, Batis, Cristian, Gabo, Rosse, Pedro y José Winnie; cuando la Facultad se volvió mi segunda casa ustedes fueron mi segunda familia. Siempre tendrán un lugar muy importante en mi corazón. Este es apenas el principio. **GRACIAS AMIGOS.** Saben que cuentan conmigo siempre ¡¡¡Carpe diem!!!

A Diana, por todo el cariño y apoyo, por entenderme sin juzgarme, por tu ternura, te admiro mucho amiga. A Israel, ¿alguna vez te he dicho por qué te digo "cuate"? por que *cuatl* en náhuatl significa "más que amigo, casi hermano, eso es lo que tú eres para mí, casi un hermano; gracias por dejarme aprender de ti, por no dejarme sola aún cuando estaba cometiendo grandes errores, por ayudarme a salir adelante. Decir que los quiero mucho no abarca todo lo que siento por ustedes, en verdad los admiro y espero tenerlos en mi vida para siempre.

A Ricardo Jasso por todo tu apoyo y porque confías en mi siempre, en ocasiones más de lo que yo misma lo hago. Te quiero muchísimo. Eres un ejemplo a seguir y gran ser humano, de verdad he aprendido mucho de ti. Gracias amigo.

A Rus: ¿cómo puedo agradecer toda tu paciencia y comprensión?, Las palabras no me alcanzan para decirte cuanto te agradezco todo lo que hiciste por mi, en ti encontré una gran amiga. A Jime y Luz,¡¡¡las quiero mucho amigas!!!

Al resto del grupo del Dr. Moreno: David, Marce, Norma, Sara y Alvarito por enseñarme tantas cosas en este tiempo, por las críticas y comentarios sobre mi proyecto y sobre todo por siempre recibirme con una sonrisa. A todos en el laboratorio: José Salud, JJ, Paulina, Fer, Oralia, el Sr. Javier, Carlos, Fer Ibarra, Édgar, Lalito, por hacer del departamento un excelente lugar de trabajo.

A mis amigos de toda la vida: San, Rafa, Jimena y Gus por todo el apoyo que me han demostrado siempre. A Maguitos por cuidarme y quererme mucho.

A la H. Facultad de Química por darme los mejores años de mi vida como estudiante, los mejores amigos que jamás creí encontrar, los maestros que luego se volvieron mis grandes amigos, por que ahí aprendí que en la universidad no sólo se estudia una carrera, se aprende a ser una mejor persona y a vivir luchando por lo que se cree.

ÍNDICE

	Página
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. Historia	3
2.2. Amibiasis	3
2.3. Morfología	4
2.4. Ciclo biológico	5
2.5. Metabolismo	8
2.6. Breve repaso al control metabólico	8
2.7. Glucólisis en mamíferos	9
2.8. Glucólisis en <i>Entamoeba histolytica</i>	12
3. ANTECEDENTES	15
3.1. Características de la HK	15
3.1.1. Mecanismo de reacción de la HK	16
3.1.2. La HK de <i>E. histolytica</i>	16
3.2. Características de la PPI-PFK	17
3.2.1. La PPI-PFK de <i>E. histolytica</i>	18
3.3. Características de la TIM	19
3.3.1. La TIM de <i>E. histolytica</i>	20
4. JUSTIFICACIÓN	21
5. HIPÓTESIS	21
6. OBJETIVOS	21
7. METODOLOGÍA	22
7.1. Identificación de los genes	22
7.2. Diseño de los oligonucleótidos	22
7.3. Extracción de DNA de <i>E. histolytica</i>	23
7.4. Amplificación del gen, PCR	24
7.5. Purificación del producto de PCR. Electroforesis	25
7.6. Purificación del gen. Gene clean	26
7.7. Ligación al vector para productos de PCR pGEM	27
7.8. Obtención de células competentes de <i>E. coli</i>	27
7.9. Transformación	28
7.10. Extracción del plásmido. Easy preps	29
7.11. Digestión. Corroboración de la identidad del gen	29
7.12. Purificación del DNA plasmídico. Mini preps	30
7.13. Secuenciación del gen	30
7.14. Extracción del gen del vector pGEM	30
7.15. Ligación al vector pET 28	31
7.16. Transformación en bacterias <i>E. coli</i> BL21DE3pLysS	31
7.17. Sobreexpresión de las proteínas	31
7.18. Purificación	32

7.19. Determinación de pureza	33
7.20. Cuantificación	33
7.21. Determinación de las características cinéticas. Ensayos espectrofotométricos	34
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
8.1. Identificación de los genes	36
8.2. Amplificación de los genes. PCR	38
8.3. Análisis del patrón de digestión de los genes amplificados	39
8.4. Clonación del gen en el vector de sobreexpresión pET28	40
8.5. Sobreexpresión de la proteína	41
8.6. Purificación	43
8.7. Determinación del grado de pureza	44
8.8. Caracterización cinética	45
8.8.1. Determinación del pH óptimo	45
8.8.2. Afinidad por los sustratos	47
8.8.2.1. Hexocinasa	47
8.8.2.2. Fosfofructocinasa dependiente de pirofosfato	50
8.8.2.3. Triosafofosfato isomerasa	53
8.8.3. Inhibidores	55
8.8.3.1. ADP	56
8.8.3.2. AMP	58
8.8.3.4. Glucosa 6-fosfato	59
9. DISCUSIÓN GENERAL	63
10. CONCLUSIONES	64
11. PERSPECTIVAS	64
12. BIBLIOGRAFÍA	65

2. INTRODUCCIÓN:

2.1. Historia

Entamoeba histolytica fue descubierta en 1875 por Lösh en Rusia. Este investigador encontró y aisló trofozoítos del parásito en la materia fecal y en el cólon de un enfermo de disentería. Con estos microorganismos inoculó por vía oral y rectal a un perro y volvió a aislar al protozoo de la materia fecal del cólon del animal, pero no sospechó que dicha amiba fuera la causante de la colitis aguda. De 1886 a 1891 Kartulis, Hlava y Concilman aportan las pruebas de que las amibas son las causantes de la disentería y el absceso hepático. Schaudin en 1903 le da el nombre a la amiba de *Entamoeba histolytica*. En 1913, Walker y Sellards infectaron humanos con el parásito produciéndoles amibiasis. Más adelante en ese siglo, Boeck cultivó *in vitro* a las amibas y Diamond obtuvo un cultivo puro de trofozoítos que permitió el avance en el estudio bioquímico y fisiológico del parásito (Tay, 1995).

2.2. Amibiasis

Los síntomas de la amibiasis son generalmente la presencia de evacuaciones diarreicas, disentería, dolor abdominal, pérdida de peso y deshidratación. Los alimentos y bebidas contaminados con heces que contienen quistes de *E. histolytica* son las fuentes más comunes de infección; sin embargo también se puede transmitir por prácticas sexuales orales o anales con personas infectadas (Romero, 1999). En medio húmedo y frío los quistes se conservan por más de doce días y en agua de 9 a 30 días (Faust, 1984).

Las infecciones por este parásito varían considerablemente de país en país. En Estados Unidos se reporta entre 1 y 2% de personas portadoras, en Colombia de 4 a 50%, Argentina 13 a 22%, etc (Romero 1999). En México durante mucho tiempo se manejó la cifra de 27%, sin embargo con el avance de las pruebas de laboratorio de parasitología; se considera a la infección en un orden del 15% (Romero 1999). La organización mundial de la salud (WHO) reporta una incidencia mundial de 48 millones de casos por año y 100 000 muertes anuales causadas por esta enfermedad

(http://www.who.int/vaccine_research/documents/Parasitic_Diseases.pdf (23 de Febrero del 2005)).

2.3. Morfología

E. histolytica existe en la naturaleza en tres estadios morfológicos principales (Romero, 1999): el trofozoíto (forma móvil o vegetativa), el prequiste y el quiste (ambos inmóviles).

Trofozoíto: Es una célula de forma y dimensiones variables cuyas medidas fluctúan entre 10 y 60 micras de diámetro. Tienen movimiento característico por la emisión de pseudópodos rápidos. (Fig. 1 A) Es anaerobio facultativo, su citoplasma carece de algunos organelos que se encuentran en la mayoría de los eucariontes como son: citoesqueleto estructurado, microtúbulos citoplasmáticos, mitocondrias y sistema de lisosomas primarios y secundarios (Martínez, 1987), se alimenta por fagocitosis y digestión intracelular de nutrientes (Ortiz, 1994).

Quiste: Los quistes son formas redondas o ligeramente ovaladas de 8 a 20 micras de diámetro. Su citoplasma es incoloro permitiendo la visualización de los llamados cuerpos cromatoides y nucleólos en número de uno a cuatro (Martínez, 1987). Los quistes son una forma de resistencia de la *E. histolytica*, ya que pueden sobrevivir fuera del huésped por semanas o meses en un ambiente húmedo. El proceso de enquistamiento de la amiba se da cuando las condiciones ambientales le son desfavorables a los trofozoítos. Aún hoy, dicho evento dista mucho de ser entendido cabalmente por la incapacidad de reproducir el fenómeno para la *E. histolytica in vitro*, sin embargo, se ha podido confirmar un papel importante de la quitina (polímero de N-acetilglucosamina unida por enlaces β (1-4), muy común en hongos, crustáceos e insectos pero ausente en humanos) en la transformación *in vitro* del trofozoito de *E. invadens* a quiste. Esto pudo comprobarse con inhibidores específicos de quitina los que disminuyeron notablemente el número de quistes formados en cultivo (Avron *et al.*, 1982).

Prequiste: Si las condiciones del medio ambiente en que se mueve el trofozoito en el intestino grueso son poco favorables para su vida, el parásito empieza a inmovilizarse y rodearse de una doble membrana gruesa que le confiere resistencia.

Quiste (forma infectiva): Conforme el tiempo avanza hay gran actividad en el interior del prequiste, el núcleo se divide primero en dos y luego en cuatro que es como existe en el quiste. Al final de la maduración el quiste está recubierto de una pared y mide de 5 a 20 micras. (Fig . 1 B)



Fig. 1 A. Trofozoito de *E. histolytica*



Fig. 1 B. Quiste de *E. histolytica*

2.4. Ciclo biológico

El ciclo biológico de *E. histolytica* se muestra en la figura 2. Una vez que se ingiere, el quiste maduro desciende por el tubo digestivo hasta llegar al estómago donde entra en contacto con los jugos gástricos, iniciando de esta manera el proceso de desenquistamiento siendo el pH del medio el causante del inicio de este proceso (Romero, 1999). En esta etapa se duplican los núcleos a 8, la pared de resistencia se reblandece y se liberan pequeñas formas de trofozoítos llamadas amébulas metaquísticas que crecen a trofozoítos maduros y se multiplican por fisión binaria. La colonización por este parásito se da en el intestino grueso (de donde puede movilizarse a otros órganos como el hígado para producir el absceso hepático). Alternativamente, el trofozoito puede ser arrastrado por el tránsito intestinal para ser expulsado

en las heces en forma de quiste, cerrando el ciclo biológico cuando el quiste es ingerido por otra persona.

El período de incubación de la amibiasis intestinal varía de días hasta varios meses, el cual depende sobre todo de la endemidad de la infección; en aquellas regiones donde la amibiasis tiene mayor prevalencia, el período de incubación es más largo, incluso puede haber individuos portadores crónicos de *E. histolytica* a nivel intestinal que nunca desarrollan manifestaciones clínicas de enfermedad. El espectro de manifestaciones clínicas de la amibiasis intestinal va de pacientes asintomáticos hasta un cuadro severo de gran toxicidad sistémica que incluso puede ocasionar la muerte. En el desarrollo de los cuadros severos de la infección, la capacidad de la amiba de invadir los tejidos, juega un papel muy importante. Los cuadros clínicos de la amibiasis intestinal son: a) colonización asintomática; b) colitis amibiana aguda, es el cuadro más común, se manifiesta por dolor abdominal y evacuaciones disminuidas de consistencia acompañadas de moco y/o sangre; c) colitis fulminante, la que ocurre con mayor frecuencia en niños y que se manifiesta por dolor abdominal difuso, evacuaciones diarreicas con sangre fresca abundante y fiebre; d) ameboma, que se presenta como una masa intestinal que ocasiona dolor abdominal y que puede producir obstrucción del tránsito intestinal (Avron *et al*; 1982)

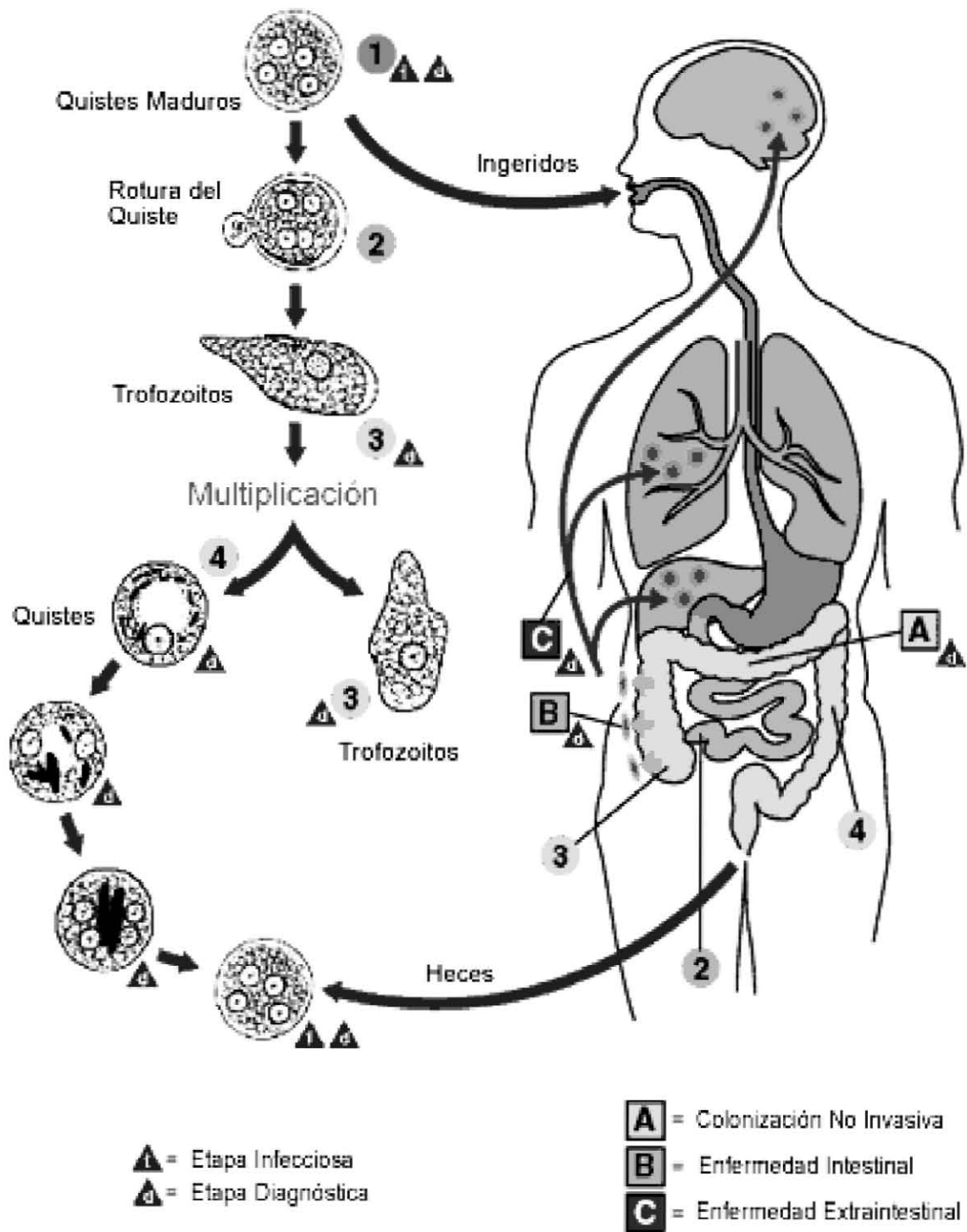


Figura 2: Ciclo biológico de *E. histolytica*. En esta figura se ilustra el ciclo biológico del parásito iniciando desde la ingestión de los quistes pasando por el desenquistamiento y la duplicación del trofozoíto hasta ser eliminado en las heces otra vez en forma de quiste

2.5. Metabolismo:

El metabolismo de *E. histolytica* tiene algunas diferencias con respecto al del hospedero. Este parásito carece de peroxisomas, retículo endoplásmico típico y mitocondrias funcionales. La ausencia de mitocondrias, aunado a que no se han detectado las actividades de las enzimas involucradas en el ciclo de Krebs y en la cadena transportadora de electrones indican que la glucólisis es la principal vía de obtención de energía en forma de ATP (Reeves, 1984; Mc Laughlin y Aley, 1985).

La vía glucolítica en la amiba presenta también particularidades al compararla con el catabolismo de la glucosa en mamíferos: contiene enzimas dependientes de pirofosfato que son la fosfofructocinasa dependiente de pirofosfato (PPI-PFK) y la piruvato fosfato dicinasa (PPDK), que catalizan reacciones equivalentes a la ATP-PFK y piruvato cinasa (PK) respectivamente. Estas últimas se propone que son los puntos de control en la glucólisis de todas las células, por lo que la presencia de la PPI-PFK y la PPDK en amibas necesariamente debe de tener repercusiones en como se controla el flujo glucolítico en este parásito (Montalvo *et al* 1967; Saavedra y Pérez-Monfort, 1996).

2.6. Breve repaso al control metabólico

Una vía metabólica es una serie de reacciones enzimáticas consecutivas que generan productos específicos. Dichas vías se caracterizan por ser irreversibles, tener una etapa limitante obligada, ser reguladas y llevarse a cabo en sitios específicos de la célula (Voet *et al* 1992).

Para establecer la estructura de control de una vía metabólica es necesario determinar cuáles son las enzimas reguladoras de la vía, es decir aquellas enzimas que por sus propiedades bioquímicas son un punto limitante en el flujo de metabolitos en la vía, e identificar moduladores de la actividad de estas enzimas.

Algunos de los criterios para tratar de dilucidar la estructura de control son los siguientes:

- Identificación del paso o los pasos limitantes de la velocidad de la vía. Una forma de hacerlo es medir los valores de ΔG *in vivo* de todas las reacciones de la vía. Mientras una enzima opere más lejos del equilibrio

es más probable que sea un punto de control. Una aproximación que se puede hacer *in vitro* es medir la velocidad de todas las enzimas en un extracto celular en el sentido directo y reverso de la vía y hacer un cociente Velocidad directa/ Velocidad reversa; mientras más pequeño sea el valor menos probable es que esta enzima sea un punto de control de la vía porque indicaría que la reacción es fácilmente reversible.

- Identificación *in vitro* de los efectores alostéricos de las enzimas de la vía.
- Medición *in vivo* de los reguladores propuestos para determinar si la concentración de dichos inhibidores es compatible con los mecanismos de regulación propuestos.

2.7. Glucólisis en mamíferos

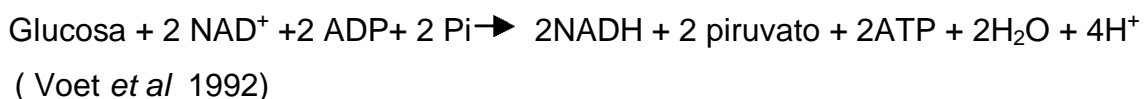
Esta vía es a partir de la cual una molécula de glucosa es transformada en 2 de piruvato con la ganancia neta de 2 ATPs y 2 NADHs (Voet *et al* 1992).

En la mayoría de las células, la glucosa entra a través de un transportador específico hasta el citosol donde se encuentran las enzimas glucolíticas. Son 10 las reacciones necesarias para la conversión de glucosa en piruvato (Figura 3); se puede considerar que la glucólisis ocurre en 2 fases (Voet *et al* 1992):

Fase 1: Son las primeras 5 reacciones. Es la fase preparatoria en la que la glucosa es fosforilada y fragmentada dando lugar a la formación de dos moléculas de gliceraldehído 3 fosfato. En esta fase se consumen dos ATPs. (figura 3). Reacciones 1-5)

Fase 2: Consta de las últimas 5 reacciones. En esta etapa las dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato se convierten en piruvato, produciendo 4 ATPs, por lo que el rendimiento neto de la glucólisis es 2 ATPs por molécula de glucosa + 2 NADHs (figura 3, reacciones 6-10)

La reacción global es:



Como todas las vías, la glucólisis presenta una estructura de control en la que las enzimas que ejercen funciones regulatorias del flujo glucolítico tradicionalmente reportadas son la hexocinasa y la fosfofructocinasa (que catalizan la fosforilación de la glucosa para formar glucosa-6-fosfato y la también fosforilación de la fructosa-6-fosfato para obtener fructosa-1,6-

bifosfato, respectivamente). También se mencionan a la PK como un posible punto de control en esta vía (Voet *et al* 1992).

Los estudios cinéticos de estas tres enzimas han aportado información sobre la existencia de algunos metabolitos que pueden regular la actividad de estas enzimas (tabla 1) . Se han determinado los valores de ΔG para todas las enzimas de la vía en el músculo cardiaco y en el caso de la HK, PFK y PK resultaron tener valores negativos (-27.2, -15.9 y -13.9 kJ.mol⁻¹ respectivamente) (Voet *et al*;1992), esto apoya la hipótesis de que estas enzimas son un punto de control del flujo debido a que, de acuerdo con los valores de ΔG , estas enzimas catalizan reacciones irreversibles.

En contraste en la glucólisis de *E. histolytica*, las dos enzimas que llevan a cabo la reacción de la ATP-PFK y la PK, la PPI-PFK y la PPDK, catalizan reacciones reversibles (Reeves *et al* 1968 y Reeves *et al* 1976) para las cuales no se ha determinado ningún tipo de regulación alostérica, por lo que es posible pensar que la estructura de control la glucólisis del parásito esté distribuida de manera distinta a lo que ocurre en mamíferos.

TABLA 1. INHIBIDORES Y ACTIVADORES DE LAS ENZIMAS REGULADORAS DE LA

Enzima	Inhibidores	Activadores
Hexocinasa	G6P	
PFK	Altas concentraciones de ATP y citrato	ADP, AMP, AMPc, FBP, NH ₄ ⁺ , Pi, F6P F2,6P ₂ FBP
PK	ATP	F1,6P ₂

GLUCÓLISIS.

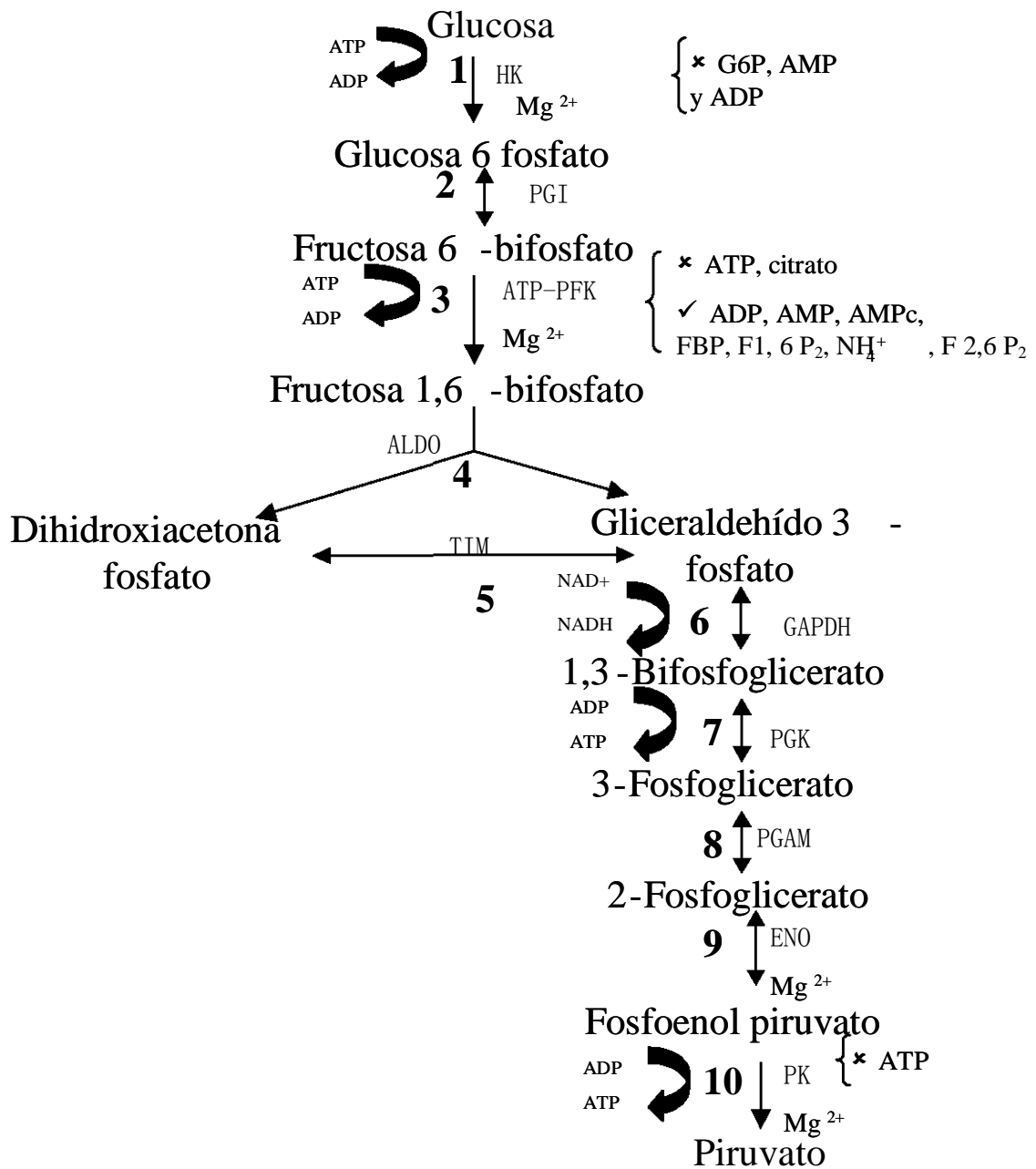


Fig 3. Glucólisis en mamíferos. HK: Hexocinasa, PGI: fosfoglicosa isomerasa, ATP-PFK: ATP fosfofructocinasa, ALDO: Aldolasa, TIM: triosa fosfato isomerasa, GAPDH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, PGK: fosfoglicerato cinasa, PGAM: fosfoglicerato mutasa, ENO: Enolasa, PK: Piruvato cinasa. * Inhibidores, ✓ Activadores.

2.8. Glucólisis en *Entamoeba histolytica*

La vía glucolítica en la amiba (figura 4) presenta particularidades al compararla con el catabolismo de la glucosa en mamíferos. Contiene enzimas dependientes de pirofosfato (PPi-PFK y PPDK, que catalizan las mismas reacciones que la ATP- PFK y PK respectivamente) y carece de lactato deshidrogenasa, por lo que el lactato no es el producto final de la vía. En su lugar, los productos finales del catabolismo de la glucosa son etanol, acetato y CO₂ y su concentración depende del nivel de aerobiosis en que se encuentre la célula (Weinbach y Diamond, 1974).

El catabolismo de la glucosa en este parásito inicia con la entrada del carbohidrato a la célula a través de un transportador. El transportador tiene poca afinidad por su sustrato y la máxima velocidad de transporte se aproxima a la velocidad del flujo glucolítico medida en el trofozoíto, lo que sugiere que el transportador puede ser un punto limitante del flujo en la glucólisis (Reeves, 1974).

La glucosa es entonces fosforilada por una glucocinasa dando como producto glucosa-6-fosfato (Reeves, Montalvo, Sillero; 1967) . Otra forma de obtención de este metabolito es a partir de la degradación de glucógeno por la acción de la glucógeno fosforilasa (Saavedra- Lira y Pérez- Monfort, 1996). No se tienen evidencias de que la glucosa-6-fosfato sea degradada por la vía de las pentosas fosfato debido a que no se ha detectado actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Reeves; 1984, McLaughlin y Aley, 1985).

La glucosa-6-fosfato es convertida en fructosa-6-fosfato por la glucosa 6-fosfato isomerasa. La siguiente reacción es la conversión de fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-bifosfato. En muchos organismos, ésta transformación es catalizada por la ATP-PFK, la cual es una reacción irreversible que es considerada un punto de control de la vía como se ha mencionado anteriormente. En *E. histolytica* y otros parásitos como *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis* y *Toxoplasma gondii*, este paso es catalizado por la PPi-PFK en una reacción que es reversible y que aparentemente no representa un punto de regulación en la glucólisis de la amiba (Reeves *et al* 1974 y Reeves *et al* 1976)

La conversión de fructosa-1,6-bifosfato a fosfoenol piruvato es a través de las reacciones normales de la vía de Embden-Meyerhof (Fig 4),. La obtención de

piruvato a partir de fosfoenol piruvato es catalizada por la PDK. Reeves purificó parcialmente por primera vez a esta enzima en 1968 (Reeves *et al* 1968) y posteriormente fue caracterizada por nuestro grupo de investigación (Saavedra-Lira y Pérez-Monfort; 1994, Saavedra-Lira *et al* 1998). La reacción catalizada por esta enzima es reversible y requiere de PEP, AMP y PPi para sintetizar el ATP, a diferencia de la reacción de la piruvato cinasa en la que se sintetiza ATP a partir de PEP y ADP (Fig. 4) y que se ha propuesto como el otro sitio de control del flujo glucolítico.

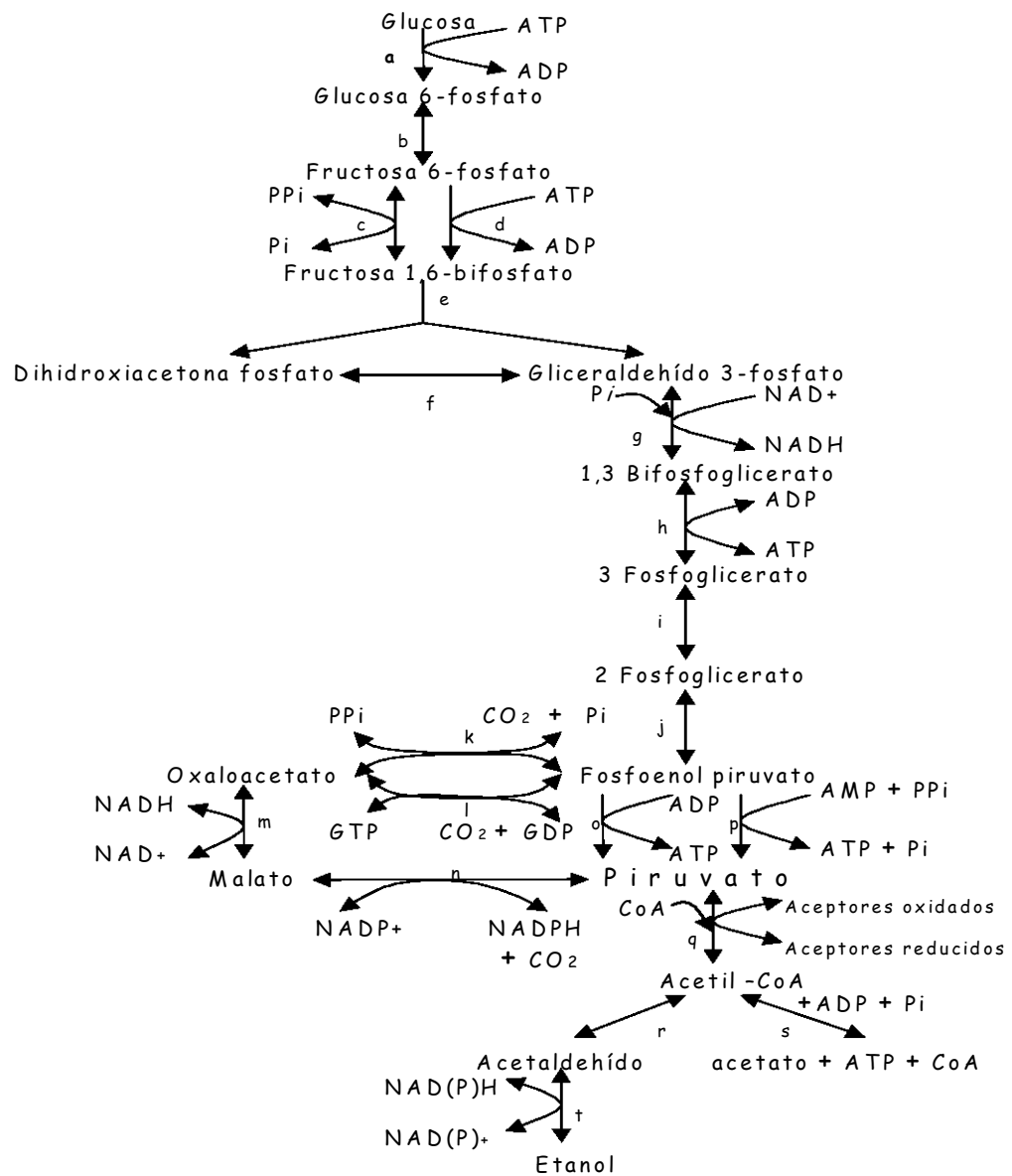


Figura 4: Metabolismo de carbohidratos en *Entamoeba histolytica*. a) HK, b) PGI, c) PPI-PFK, d) ATP-PFK, e) ALDO, f)TIM, g)GAPDH, h)PGK, i) PGAM, j) ENO, k) PEP carboxitrasfosforilasa, l) PEP carboxilasa, m) malato deshidrogenasa, n) malato deshidrogenasa (descarboxilante), o) PK, p) PPDK q) piruvato ferredoxina oxido reductasa, r) acetaldehido deshidrogenasa, s) acetato tiocinasa, t) alcohol deshidrogenasa. (Modificado de Saavedra-Lira y Perez-Monfort; 1996)

Debido a que la PPI-PFK y la PPDK catalizan reacciones reversibles y no se tienen reportes de metabolitos que regulen su actividad, es posible pensar que el control del flujo glucolítico en *E. histolytica* es distinto a lo ya reportado en mamíferos, donde se menciona que el control reside en la HK, ATP-PFK y PK. Es por eso que en este proyecto se caracterizaron a la HK, PPI-PFK y TIM en condiciones óptimas de pH y temperatura, así mismo realizamos los análisis en condiciones fisiológicas ya que estos parámetros no se han reportado y pueden tener relevancia en el análisis del control del flujo glucolítico.

1. RESUMEN

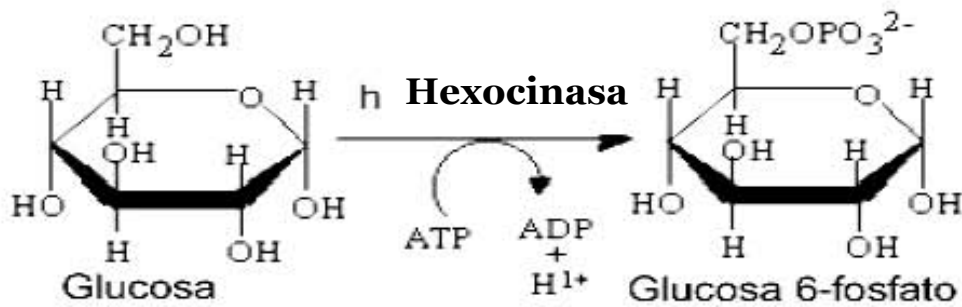
Entamoeba histolytica tiene como vía de obtención de energía en forma de ATP a la glucólisis debido a que no lleva a cabo ciclo de Krebs ni fosforilación oxidativa. En dicha vía existen enzimas dependientes de pirofosfato, como la fosfofructocinasa y la piruvato fosfato dicinasa. En la actualidad existe muy poca información acerca de las características cinéticas de las enzimas involucradas en la glucólisis de este parásito en condiciones cercanas a las fisiológicas, por lo que el objetivo de esta tesis es la caracterización bioquímica de la hexocinasa (HK), fosfofructocinasa dependiente de pirofosfato (PPI-PFK) y triosafosfato isomerasa en estas condiciones. A través de la amplificación y clonación de los genes, se sobreexpresaron en *E. coli* y purificaron a las proteínas recombinantes. Se determinó su perfil de actividad al variar el pH y se estudiaron las características cinéticas al pH óptimo y al fisiológico (6.0-7.0). Los valores de K_m y V_{max} a pH óptimo concuerdan con lo ya reportado en la literatura para las tres enzimas recombinantes. A pH fisiológico se observó que la HK no presentó una diferencia significativa en ambos parámetros con respecto a los medidos a pH óptimo. La PPI-PFK resultó tener un pH óptimo de 7.0 pero a pH fisiológico de 6.0 presenta una disminución de un 70% en su $V_{m\acute{a}x}$, los valores de las K_m por F6P y PPI se aumentaron al doble y un orden de magnitud, respectivamente. En el caso de la TIM no se aprecia diferencia en la V_{max} a pH óptimo y fisiológico pero el valor de K_m disminuye a pH 6.0. La HK presenta inhibición por AMP y ADP por lo que se realizaron ensayos para determinar las K_i de estos metabolitos contra el ATP. En ambos casos se aprecia un aumento en el valor de K_i al disminuir el pH y estos valores se encuentran por debajo de las concentraciones de dichos metabolitos libres cuantificadas en la célula amibiana por nuestro grupo de trabajo. Al determinar el patrón de inhibición de estos metabolitos se determinó un mecanismo competitivo para el ADP y mixto en el caso del AMP. De acuerdo a lo anterior, se concluye que la HK puede representar un punto de control en la glucólisis de *E. histolytica* debido a que presenta inhibición a niveles fisiológicos de estos metabolitos. Por otro lado la PPI-PFK y la TIM difícilmente pueden controlar en algún grado el flujo de esta vía en el parásito.

El trabajo presentado en esta tesis formó parte del artículo Glycolysis in *Entamoeba histolytica* por Saavedra-Lira, Encalada, Pineda, Jasso- Chávez & Moreno- Sánchez, (2005).FEBS Journal **272** (7), 1767-1783 (Anexo).

3. ANTECEDENTES

3.1. Características de la HK

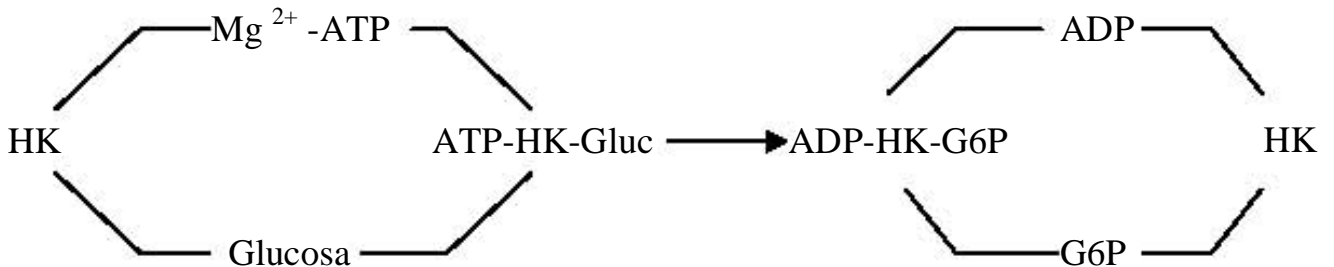
Cataliza la transferencia de un grupo fosfato del ATP a la glucosa para formar glucosa-6-fosfato



El segundo sustrato de la hexocinasa es el complejo Mg²⁺ - ATP.

3.1.1. Mecanismo de reacción de la HK

La hexocinasa posee un mecanismo bi bi al azar, en el que la enzima forma un complejo ternario con la glucosa y el Mg²⁺ - ATP (Colowick, 1973). El mecanismo es el siguiente:



Debido a que es un mecanismo al azar no hay un orden para la unión de cada uno de los sustratos a la enzima. De igual forma, no se puede establecer cual de los productos se va a liberar primero.

3.1.2. La HK de *E. histolytica*

En el caso de *Entamoeba histolytica* se ha reportado la existencia de dos isoenzimas de la hexocinasa con características cinéticas muy similares entre sí. Se determinaron algunos parámetros cinéticos como la K_m por la glucosa: 40 μM , K_m por el ATP: 200 μM (en promedio de ambas isoformas); inhibición competitiva con respecto a la glucosa por la N-acetil-D-glucosamina, D-glucosamina y D-xilosa e inhibición también competitiva con respecto al ATP del AMP y el ADP. Todos los ensayos fueron hechos a pH 7.0 (Reeves *et al* 1967).

En el grupo de Kroschewski en el 2000 purificaron a ambas isoenzimas recombinantes y examinaron sus propiedades cinéticas determinando que ambas enzimas tenían el mismo comportamiento con respecto a la temperatura y el pH (actividad máxima a 45 ° C y pH óptimo entre 8 y 9) (Kroschewski *et al* 2000) .

Los datos cinéticos que obtuvieron son los siguientes:

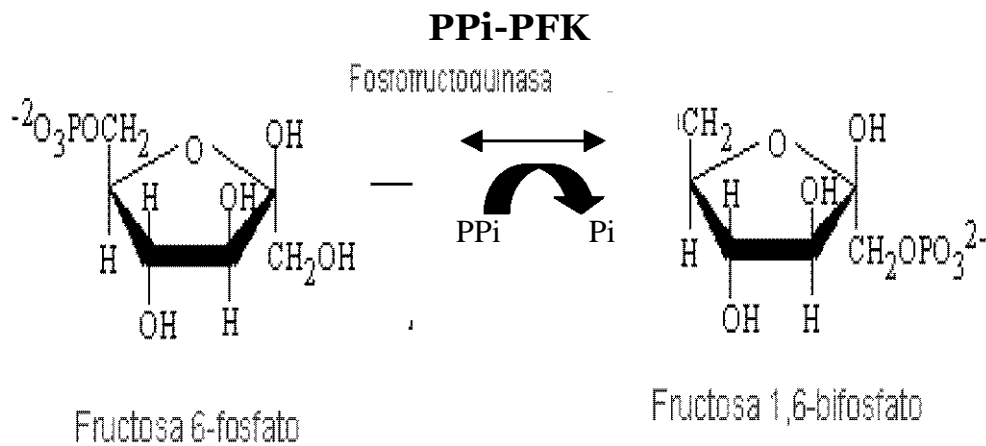
	HK1	HK2
V_{max} (U mg^{-1})	236	195
K_m glu (μM)	59	47
K_m ATP (μM)	183	657
K_i AMP (μM)	0.65 (Competitivo)	31 (Competitivo)
K_i ADP (μM)	36 (Competitivo)	193 (Competitivo)

También determinaron que la glucosa-6-fosfato no era un inhibidor de estas enzimas como sí lo es en las células de mamífero (Kroschewski *et al* 2000).

3.2. Características de la PPI-PFK

Esta enzima cataliza la misma reacción que la ATP-PFK excepto que requiere de pirofosfato para fosforilar a la fructosa-6-fosfato en una reacción reversible (Reeves *et al* 1974).

Esta enzima ha sido descrita en varios microorganismos como *Naegleria fowleri*, *Borrelia burgdorferi* y *Treponema pallidum* (Mertens *et al*;1998).



3.2.1. La PPi-PFK en *E. histolytica*

Se reportaron los primeros estudios de la PPi-PFK de *E. histolytica* en 1974, los autores la purificaron parcialmente y determinaron algunas de sus características cinéticas como son K_m por PPi: 14 μM , K_m por F6P: 38 μM y una V_{max} de 0.25 $\mu\text{moles}/\text{min} \times \text{mg}$ en el sentido directo. Para la reacción reversa determinaron K_m por Pi: 800 μM y K_m por F1,6BP: 18 μM con una $V_{m\acute{a}x}$ de 0.17 $\mu\text{moles}/\text{min} \times \text{mg}$ (Reeves *et al* 1974).

Posteriormente ese mismo grupo determinó que el PPi no puede ser sustituido por acetil fosfato, ADP, AMP, polifosfato, entre otros (Reeves, Serrano y South; 1976). Además encontraron que la enzima requiere de metales divalentes para tener actividad y que presenta un mecanismo secuencial al azar en el que la unión de los sustratos se da de manera aleatoria .

En 2001 el grupo de Robert Kemp (Deng *et al* 1998) clonaron el gen y purificaron a la enzima recombinante. Los autores determinaron un peso molecular de 60.6 kDa y a nivel de secuencia de aminoácidos encontraron que

tenía una mayor semejanza con la PPI-PFK de plantas que con la de bacterias.

Los datos que obtuvieron son:

<i>V max</i> (μmoles/min x mg)	310
<i>Km</i> PPI (μM)	34 – 42
<i>Km</i> F6P (μM)	85 – 105
pH óptimo	6.4 – 7.2
Oligomerización	Dímero

Valores medidos a 30° C y pH 7.2

3.3. Características de la TIM

La triosafosfato isomerasa (TIM) cataliza la interconversión de gliceraldehído-3-fosfato a dihidroxiacetona fosfato y viceversa.

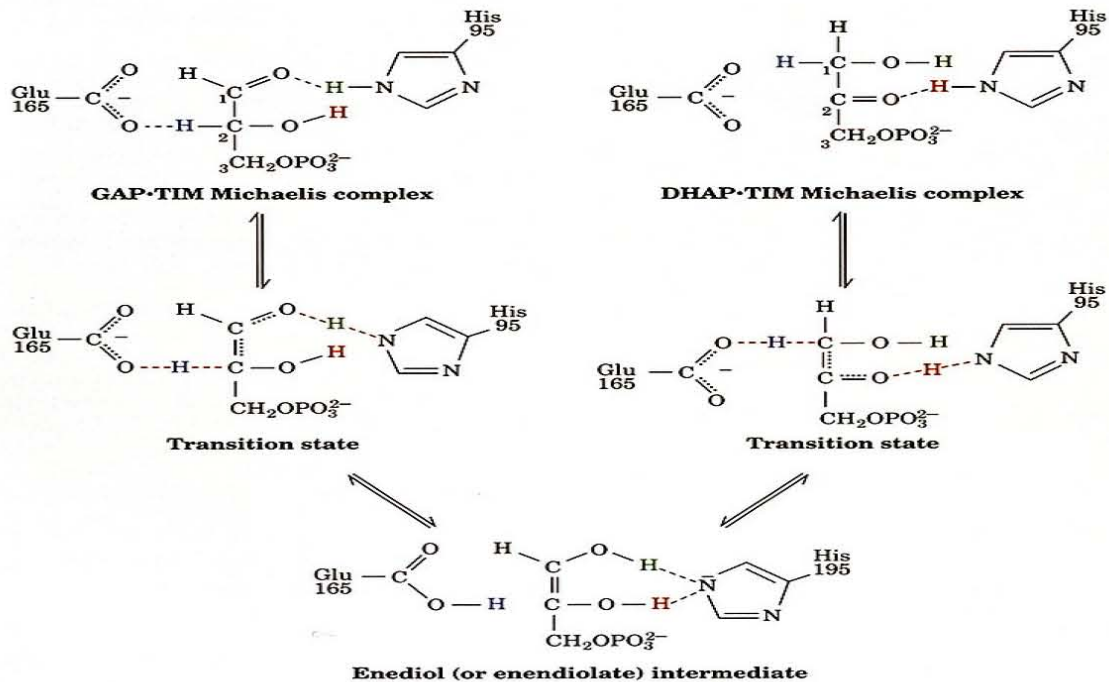


Fig. 5. Reacción catalizada por la TIM. Tomado de Voet *et al* 1992

La DHAP y el G3P son isómeros aldosa- cetosa, por lo que se ha determinado que la reacción ocurre a través de un intermediario enediol (fig 5) .

La velocidad de la reacción bimolecular entre la TIM y su sustrato en la reacción reversa (GAP → DHAP) está controlada por la difusión, por lo que la formación del producto DHAP se lleva a cabo con la misma rapidez con la que la enzima y el sustrato chocan. Por lo tanto, ningún aumento en la eficiencia catalítica produce ningún aumento en la velocidad de reacción, es por esto que se dice que esta enzima ha alcanzado la perfección catalítica (Horecker *et al* 1972).

Una de las características más notables de la TIM es su extraordinaria capacidad catalítica, convierte de 7000 a 10 000 μ moles de sustrato por minuto por miligramo de enzima a 25° C en la reacción reversa (Horecker *et al* 1972)

3.3.1. La TIM en *E. histolytica*:

Existe muy poca información cinética acerca de la TIM de la amibas. En 1997 Landa y cols, reportaron la secuencia del gen, y la expresión y propiedades de la enzima recombinante. La enzima en este parásito es muy similar a la perteneciente a otros microorganismos como *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania mexicana* y *Giardia lamblia* (más de 40% de identidad posicional en todos los casos). Las propiedades bioquímicas que determinaron estos autores son: peso mayor a 28 kDa y $Km_{G3P} : 1.05 \pm 0.23$ mM a pH 7.4 (Landa *et al* 1997).

4. JUSTIFICACIÓN

El objetivo general de nuestro grupo de trabajo es determinar la estructura de control en la glucólisis de *E. histolytica* por lo que es necesario caracterizar cinéticamente a todas las enzimas involucradas en la vía en las mismas condiciones fisiológicas de pH y temperatura. Los datos reportados hasta ahora en la literatura para las tres enzimas analizadas en esta tesis y para las demás enzimas del resto de la vía difícilmente cumplen con estos requisitos por lo que fue necesario determinar las propiedades de la HK, PPI-PFK y TIM en las condiciones estándares de nuestro laboratorio.

5. HIPÓTESIS

Si alguna de las tres enzimas, HK, TIM y PPI-PFK, presentan regulación alostérica y/o su velocidad en el sentido reverso de la glucólisis es mayor a la velocidad en el sentido directo, desde el punto de vista del control metabólico esa enzima podría representar un punto de control del flujo en la glucólisis de *E. histolytica*

6. OBJETIVOS

- ✓ Clonar los genes que codifican para la HK, PPI-PFK y TIM
- ✓ Purificar y caracterizar bioquímicamente a la HK1, PPI-PFK y TIM recombinantes de *E. histolytica* en condiciones óptimas y fisiológicas de pH y temperatura
- ✓ Determinar el efecto de metabolitos que puedan regular su actividad

7. METODOLOGÍA

7.1. Identificación de los genes

En el banco de secuencias del genoma de *Entamoeba histolytica* (www.tigr.org/+db/e2k1/ena1/) se buscaron los genes que codifican para las enzimas a estudiar, usando la herramienta “gene name search”. La secuencia de aminoácidos de las enzimas de amibas se compararon con las secuencias de otros genes de las enzimas reportadas para otros organismos utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) para determinar el porcentaje de identidad y similitud entre las secuencias comparadas.

7.2. Diseño de los oligonucleótidos

Una vez conocidas las secuencias de nucleótidos de los genes, se diseñaron los oligonucleótidos basados en la secuencia de nucleótidos que codifican para los primeros 5-6 aminoácidos y los últimos 4 aminoácidos. Estos oligonucleótidos contenían sitios para enzimas de restricción para facilitar la subclonación del gen amplificado en los vectores que vamos a utilizar.

La secuencia de los oligonucleótidos es:

HK

Fw: 5' GTA  CAAGAAATCATTGAT 3'

Rw: 5' AGC  TTAGTGTTTACATGCAAC 3'

PPi-PFK


Fw: 5' GTA  CATATG TCTCTTCTGCTCTC 3'


Rw: 5' AGC  GGATCC TTAATTTTGTTC AAGGAG 3'


TIM


Fw: 5' GTAG  CCATGG GGGCGGGTAAATTTGTC 3'


Rw: 5' AGC  CTCGAG GAATTTCTCAGAACTGA 3'


 Sitios de restricción para Nde I

 Sitios de restricción para Hind III

 Sitios de restricción para Bam HI

 Sitios de restricción para Xho I

 Sitios de restricción para Nhe I

 Sitio de restricción para Nco I

Los oligonucleótidos se utilizaron para amplificar los genes de interés por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y utilizando DNA de *E. histolytica* tal como se describe a continuación.

7.3. Extracción de DNA de *E. histolytica*

La extracción de DNA se realizó como previamente se ha descrito (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/eha1/>).

Los trofozoítos de *E. histolytica* cepa HMI:MSS se aislaron de un absceso hepático amibiano en hámster. Se inocularon 50 ml medio TYI-S-33 con 7×10^5 trofozoítos y se incubaron por 72 horas a 36.5°C.

Las células se cosechan centrifugando a 1250 x g durante 5 min. El sobrenadante es desechado y el pellet celular se lavó 2 veces con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2mM, pH 7.4). Se hicieron alícuotas de 50 µL y a cada una se le agregó 250 µL de buffer de lisis (0.25% SDS en 0.1 M EDTA pH 8.0). y se adicionó proteinasa K a 100 µg/mL y se incubó por 1 hora a 55 ° C.

Se adicionaron 75 µL de NaCl 3.5 M, se mezcló suavemente y entonces se adicionó 42 µL de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) al 10% en NaCl 0.7 M, esta mezcla debe calentarse previamente a 55 ° C para disminuir su viscosidad y pueda utilizarse fácilmente. Se incubó a 55 ° C por 20 minutos. El CTAB es un detergente catiónico que atrapa a los polisacáridos en condiciones salinas.

A temperatura ambiente se adicionó un volumen de cloroformo, se mezcló bien por inversión y se centrifugó a 20817 x g por 10 minutos a 4 ° C. En este paso se precipita el complejo CTAB polisacáridos.

El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se adicionó 1 volumen de una mezcla fenol: cloroformo 1:1, se mezcló por inversión y se centrifugó en las condiciones anteriores.

Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se extrajo nuevamente con un volumen de cloroformo y se centrifugó en las condiciones mencionadas.

El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se adicionó 1mL de etanol al 100%, esto con el fin de precipitar al DNA que se extrajo. El tubo se incubó a

temperatura ambiente por 5 minutos, luego se centrifugó por 15 minutos a 20817 x g. El sobrenadante se eliminó y el pellet se lavó con 1mL de etanol al 70%, al final se centrifugó a máxima velocidad por 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se dejó secar. Una vez seco el pellet se resuspendió en 100 μ L de agua estéril.

7.4. Amplificación del gen, PCR

Una vez que se tuvo el DNA genómico de *E. histolytica* puro y con los oligonucleótidos que se diseñaron de acuerdo a la secuencia descrita en el apartado 7.2 se amplificaron los genes que codifican para las proteínas que estamos estudiando. Lo anterior se hizo utilizando la reacción en cadena de la polimerasa. El DNA puro se utilizó como templado y como primers los oligonucleótidos diseñados.

Las condiciones de esta reacción fueron:

MgCl₂..... 1.5 mM
dNTP's..... 0.2 mM
DMSO..... 1 μ L
BSA..... 0.001 mg
Oligonucleótido Fw..... 200 ng
Oligonucleótido Rw 200 ng
DNA..... 1 μ g aprox
Enzima Taq polimerasa...1 μ L
Buffer.....5 μ L

La reacción se llevó a cabo en un termociclador, el cual fue programado de la siguiente manera: 95 ° C por 5 minutos, 40 ciclos de un minuto de desnaturalización a 95 ° C, 1 minuto de alineamiento a 45-60 ° C y 1.5 minutos de extensión a 72°C y finalmente 10 minutos a 72° C.

7.5. Purificación del producto de PCR. Electroforesis

La electroforesis en gel es uno de los métodos más empleados para la separación de macromoléculas (Voet *et al* 1992). La composición usualmente empleada para estos geles es agarosa o poliacrilamida, estos compuestos

generan una red en la que el tamaño de poro puede controlarse. La separación de moléculas a través de una cromatografía en gel se basa en la filtración y en las movilidades electroforéticas de las moléculas que se están separando. En esta técnica el gel retrasa la migración de las moléculas grandes pues su movimiento se haya impedido por el tamaño de las partículas del gel (Voet *et al* 1992). A las muestras se les adiciona un buffer que contiene glicerina y azul de bromofenol como indicador de corrimiento. Una vez montado el gel con las muestras se introduce en una cámara de electroforesis a través de la cual se hará pasar una corriente, ayudando así a la migración de las muestras hacia el ánodo (figura 5)

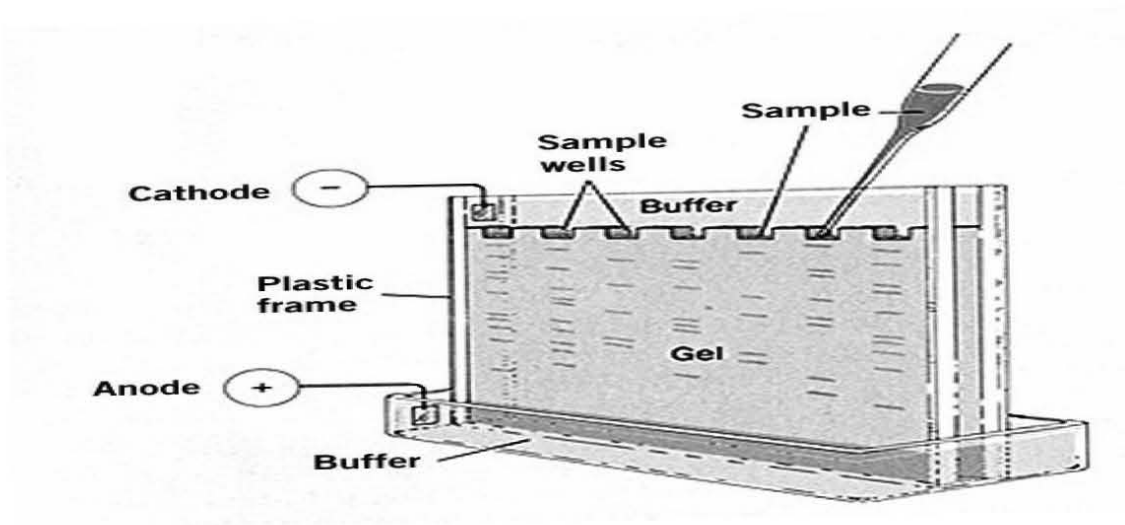


Fig 5: Cámara de electroforesis en gel. La muestra se carga en los pozos y haciendo pasar una corriente a través del gel se separa de acuerdo a su tamaño. Tomado de Voet *et al* 1992

En nuestro caso el producto de PCR obtenido se hizo correr en un gel de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En el gel también se utilizó un marcador de peso molecular de 1kb que nos ayudó a determinar el tamaño de cada una de los fragmentos que se apreciaron en el gel. Posteriormente se colocó el gel en una cámara de electroforesis que contenía buffer TBE 0.5x (44.6 mM Tris, 1 mM EDTA y 45 mM Ácido bórico) y se aplicó una corriente de 100 volts.

Para observar el resultado del gel se utilizó un transiluminador con luz UV, ya que el bromuro de etidio se intercala entre las bases del DNA y fluoresce al ser expuesto a este tipo de luz.

7.6. Purificación del gen. Gene clean

Una vez que se observó en el gel de agarosa los fragmentos de DNA de los genes que codifican para las proteínas que vamos a estudiar, se cortaron las bandas y se purificó el DNA mediante la técnica de Gene clean (Gene clean II Kit, Bio 101) que consiste en los siguientes pasos:

Se adicionó 4.5 volúmenes de NaI 6 M y 0.5 volúmenes TBE modifier. Se incubó a 45-55° C hasta que la agarosa se disolvió. Luego se adicionaron 5 µL de Glass milk (perlas de vidrio). Se mezcló e incubó en hielo por 5 minutos para favorecer la unión del DNA a las perlas de vidrio. Posteriormente se centrifugó a 20817 x g por 5 segundos; el sobrenadante se descartó y se adicionó 1 ml de New wash (NaCl, Tris, EDTA, Etanol) para lavar las perlas. El tubo con la mezcla se centrifugó bajo las condiciones ya mencionadas. El sobrenadante fue eliminado otra vez y se lavaron las perlas 3 veces más con New Wash, centrifugando entre cada lavado. Cuando se eliminó por última vez el sobrenadante, se dejó secar el tubo perfectamente para luego adicionar 20 µL de agua estéril. Se centrifugó a máxima velocidad por 5 segundos y el sobrenadante fue recuperado en un nuevo tubo.

El fundamento de esta técnica es que al calentar la mezcla del fragmento de gel, NaI y TBE modifier la agarosa se disuelve y el DNA es liberado, luego las perlas de vidrio contenidas en el Glass milk atrapan al DNA; la agarosa junto con el TBE modifier y NaI son eliminados durante los lavados con New wash, finalmente el DNA es recuperado al ser resuspendido en agua y despegarse de las perlas de vidrio.

7.7. Ligación al vector para productos de PCR pGEM

Una vez que se obtuvieron los fragmentos de los genes puros, se hizo una reacción de ligación al vector pGEM-Teasy vector (Promega). En cada reacción se utilizaron 0.06 µg del vector pGEM, 5 U de T4 DNA ligasa y 10 µL de 2x Rapid ligation buffer (60 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 2 mM ATP, 10% PEG, pH 7.8). La reacción de ligación se dejó incubando durante toda la noche a 4 ° C.

El pGEM –T easy vector es un vector adecuado para clonar productos de PCR ya que la molécula lineal en sus regiones terminales contiene un triplete de timinas, que permiten que se una al producto de PCR que tiene en cada extremo adeninas adicionadas por la DNA polimerasa. También este vector contiene sitios de restricción para EcoR I y Not I que facilita la recuperación del gen para los siguientes pasos de clonación. Además el vector confiere a las células transformadas resistencia a la ampicilina .

7.8. Obtención de células competentes de *E. coli*

Una célula competente es aquella que por algún tratamiento físico o químico tiene permeable la membrana y por lo tanto es capaz de permitir la entrada de DNA plásmidico.

Para obtener a las células competentes se hizo un precultivo de 5mL de medio LB (0.5% de extracto de levadura, 1% de NaCl y 1% de triptona) sin antibiótico inoculado con bacterias *E. coli* de las cepas TOP 10 y BL 21De3pLysS (Novagen), los cultivos se incubaron a 37 °C en agitación toda la noche.

Se tomaron 500 µL del precultivo para inocular 50 mL de medio LB y se incubó en las mismas condiciones hasta alcanzar una absorbancia entre 0.4 - 0.5 a 660 nm. El cultivo se enfrió en hielo por 10 minutos y se cosecharon las células por centrifugación a 1800 x g por 10 minutos a 4 ° C. El pellet fue resuspendido en 33 mL de CaCl₂ 0.1 M estéril y enfriado a 4 ° C. Se incubó en hielo por una hora y nuevamente las células fueron cosechadas en las condiciones anteriores. El precipitado se resuspendió en 2 mL de una mezcla de CaCl₂ 0.1 M con glicerol estéril al 17%. Se tomaron alícuotas de 100 µl en tubos eppendorf estériles y se almacenaron a –70 ° C.

7.9. Transformación

Se adicionaron 50 µL de células *E. coli* TOP 10 (Novagen) competentes al tubo que contenía la reacción de ligación, se agitó cuidadosamente para luego dejar incubar a las células en hielo por una hora. En esta etapa de la transformación lo que ocurre es que el plásmido interacciona con las células

ya que estas al encontrarse en estado competente tienen la membrana permeable.

Luego de la incubación en hielo se les dió a las células un choque térmico calentándolas en un baño de agua a 42 ° C por 1 minuto para favorecer la entrada del plásmido a la célula y luego se incubaron en hielo por otros 5 minutos., para que los poros que existen en las células competentes se cierran por acción de la baja temperatura, así el plásmido que alcanzó a entrar en las células permanece dentro de ellas.

Finalmente las células se incuban en medio LB (0.5% de extracto de levadura, 1% de NaCl y 1% de triptona) a 37 ° C por una hora, esto con el fin de que las células se recuperen de el tratamiento térmico.

Se cosecharon a las células a 1800 g's por 5 minutos, se agregó 10 µM de IPTG y 0.4 mg de X –gal. Se plaqueó la mezcla en cajas petri con medio LB sólido con ampicilina 0.1 mg / mL y se incubaron a 37 ° C por toda la noche.

El medio LB con ampicilina, IPTG y X-gal es un medio selectivo y diferencial que nos va a ayudar a reconocer las colonias bacterianas que contienen el plásmido.

7.10. Extracción del plásmido. Easy preps

Se seleccionaron 10 colonias blancas y se sembraron en 3 mL de medio LB con ampicilina, los cultivos se incubaron con agitación a 37 ° C durante toda la noche.

Las células se cosecharon centrifugando a 1800 x g por 5 minutos y el pellet se resuspendió en 100 µL de buffer de lisis (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA, 15% sacarosa, 2mg/mL lisozima, 0.2 mg/mL RNAsa pancreática, 0.1 mg/ml BSA). El tubo se dejó incubando a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente las células se hirvieron por 1 minuto y luego se pusieron en hielo por el mismo lapso de tiempo. Debido al tratamiento anterior las células se rompen y el plásmido queda liberado. Finalmente se centrifugó a 20817 x g por 20 minutos para que la mayoría de los contaminantes y el DNA genómico precipiten y el plásmido quede en el sobrenadante el cual es transferido a un tubo limpio.

7.11. Digestión. Corroboración de identidad del gen

La digestión se hace para asegurarnos que el gen que se introdujo en el plásmido contiene los sitios para las enzimas de restricción deducidas de la secuencia de aminoácidos, así como los sitios introducidos por el PCR. De esta manera, si el patrón de restricción concuerda con lo que esperamos para cada gen, es posible pensar que se está trabajando con el gen deseado.

Para cada reacción se utilizaron 1 U de enzima Eco RI (Biolabs), 2µL de buffer (50 mM NaCl, 100 mM Tris – HCl, 10 mM MgCl₂, 0.025% Triton X-100, pH 7.5), 15µL de DNA extraído en la Easy preps y se incubó en un baño de agua a 37 ° C por 1 hora. Una vez transcurrido este tiempo, las muestras se corrieron en un gel de agarosa (según las condiciones anteriormente mencionadas).

También se hicieron digestiones con las enzimas Hind III, Bam HI, y Pst I en las condiciones ya señaladas.

7.12. Purificación del DNA plasmídico. Mini preps

De las muestras que obtuvimos resultados positivos se hicieron cultivos de 3 mL en medio LB con ampicilina, se incubaron a 37 °C en agitación por toda la noche.

Utilizando el *Kit Wizard plus SV minipreps DNA purification system* (Promega) se extrajo el plásmido de las células cultivadas con un grado mayor de pureza.

Este sistema de purificación está basado en la utilización de membranas que retienen el DNA y que permiten la extracción de DNA plasmídico. El DNA que se obtiene se encuentra tan puro que puede ser secuenciado directamente. El proceso consiste en cosechar a las células, lissarlas, centrifugar el lisado para que el sobrenadante que contiene los plásmidos se pase por una columna en la que se encuentra una membrana que va a retener el plásmido. Dicha columna es lavada y secada, para finalmente eluir el DNA con agua libre de nucleasas.

7.13. Secuenciación del gen.

Para asegurarnos de que el gen amplificado es el que codifica para la proteína que queremos purificar, una alícuota de los plásmidos se sometió a secuenciación automática. Una vez que se tiene la secuencia del gen se comparó con la existente en el banco del genoma de *E. histolytica*. De este modo podemos comprobar la identidad del gen y detectar la ausencia de mutaciones introducidas durante la reacción de PCR.

7.14. Extracción del gen del vector pGEM

Utilizando reacciones de digestión con enzimas de restricción se extrajo el gen del vector pGEM. Las reacciones de digestión se llevaron a cabo de la manera descrita previamente. Las mezclas se corrieron en un gel de agarosa y se cortaron los fragmentos del gel para hacerles Gene clean y purificar el gen.

7.15. Ligación al vector pET 28

Una vez que se obtuvo al gen puro se hizo una ligación, esta vez al vector de sobreexpresión pET 28 (Novagen). La ligación se hizo utilizando 4 U de T4 ligasa, 10 μ L de buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1mM ATP, 25 μ g/mL BSA, pH 7.5), 10 μ L del gen purificado, y 4 μ L del vector pET 28.

El sistema de vectores pET es útil para la clonación y sobreexpresión de proteínas en *E. coli*. Se basa en los sistemas manejados por el promotor T7 ,

desarrollados por Studier. El vector pET que se utilizó le adiciona a la proteína sobreexpresada una cola de 7 histidinas en el extremo carboxilo terminal, además confiere resistencia a la kanamicina.

Al adicionar IPTG al medio de cultivo de las células *E. coli* transformadas con el plásmido que contenga al vector pET 28 se promueve la transcripción de el gen que codifica para la T7 RNA polimerasa en el genoma de *E. coli*. Esta enzima a su vez se une al promotor T7 localizado en el pET el cual está unido al gen de interés, iniciándose la transcripción del mismo para sintetizar la proteína recombinante.

7.16. Transformación en bacterias *E. coli* BL 21DE3pLysS

Siguiendo el procedimiento ya mencionado para la transformación, se introdujo el plásmido pET 28 con el gen a las bacterias *E. coli* BL 21DE3pLysS. Éstas se plaquearon en medio LB con Kanamicina y se incubaron a 37 °C por toda la noche.

7.17. Sobreexpresión de las proteínas

Se seleccionaron 10 colonias de las bacterias *E. coli* BL 21 transformadas y se cultivaron en 3 mL de medio LB con kanamicina hasta alcanzar una densidad óptica entre 0.5 –0.6 a 600 nm, en ese momento se induce la sobreexpresión de la proteína al adicionarle 0.4 mM de IPTG, a partir de ese momento las células se incuban a temperatura ambiente en agitación durante toda la noche. Para monitorear la sobreexpresión de las proteínas se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 12.5 % como se describe a continuación: Se tomaron 20 µL de cultivo bacteriano y se le adicionaron 5 µL del buffer de carga (glicerol, azul de bromofenol +β-mercaptoetanol). El gel se corrió en una cámara de electroforesis a 100 volts. Una vez que las muestras se separaron en el gel, éste se reveló con una solución de Azul de coomasie y luego se incubó con solución desteñidora. Se observaron las bandas que correspondían a la proteína de nuestro interés para poder determinar en cual de las colonias se estaba sobreexpresando la mayor cantidad.

Se seleccionó una colonia para hacer un cultivo en mayor escala, esta vez se cultivaron 50 mL de medio LB con kanamicina. Las células crecidas e inducidas como anteriormente se describió se cosechan a 1800 x g por 10 minutos, luego se resuspendieron en 10 mL de buffer de lisis (100 mM de trietanolamina- HCl pH 7.4, 300 mM NaCl y 2 mM imidazol). Las bacterias se sonicaron en hielo con 5 pulsos de 1 minuto por un minuto de descanso entre cada uno. La mezcla sonicada se centrifugó a 12062 x g por 10 minutos , se separó el sobrenadante, y el pellet se resuspendió en 2 mL de buffer de lisis.

Para observar si la proteína sobreexpresada es soluble se hicieron geles de poliacrilamida-SDS al 12.5 % en los que se corrieron tanto el precipitado como el sobrenadante. Es importante que la proteína que estamos purificando esté en forma soluble en el sobrenadante porque esta es la forma en que la podemos purificar.

Cuando se conoce que la proteína es sobreexpresada de forma soluble se escala el cultivo a un volumen de 100 mL para iniciar con la purificación.

7.18. Purificación

Se realizaron cultivos de 100 mL de bacterias y se indujo la sobreexpresión de las proteínas de acuerdo a como se describió anteriormente.

El proceso de purificación es una cromatografía de afinidad con metales, debido a que las enzimas a purificar se sobreexpresan con una cola de 7 histidinas adicionada en el vector pET 28. Las histidinas se pegan al cobalto acoplado en la resina.

El proceso consiste en mezclar el sobrenadante del sonicado de las bacterias que sobreexpresan a la proteína y la resina previamente equilibrada con buffer de lisis. Se incuba por 30 minutos en agitación. La resina es centrifugada a 1250 g's por 5 minutos y el sobrenadante es desechado. La resina se lava 2 veces con 10 mL de buffer de lisis y se realiza un tercer lavado adicionando al buffer de lisis 10 mM de imidazol para eliminar impurezas, finalmente la proteína se eluye con el buffer de lisis que contiene 100 mM de imidazol, se colectan los primeros 5 mL de enzima eluída.

Las proteínas se almacenaron en dos condiciones: glicerol con una concentración final del 50 % a -20°C y en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.2 M a 4°C .

7.19. Determinación de pureza

Para determinar el grado de pureza de las proteínas purificadas se corrieron en un gel de poliacrilamida-SDS bajo las condiciones anteriores. Una vez revelado se hizo un análisis densitométrico al gel para conocer la pureza de las muestras.

7.20. Cuantificación

Se determinó la concentración de las proteínas utilizando la técnica de Lowry (Lowry *et al*; 1951). Las muestras se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) a una concentración final del 13% para eliminar interferencia del imidazol. El TCA se eliminó por centrifugación de las muestras a $20817 \times g$ por 10 minutos. La proteína se resuspendió en $100 \mu\text{L}$ de SDS al 10 % .

Para la cuantificación se realizó una curva patrón utilizando BSA en concentraciones de 0, 20, 40, 60 y $80 \mu\text{g}$. A todas las muestras se les adicionó 1 mL del reactivo de Lowry y se dejaron incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se les adicionaron $100 \mu\text{L}$ del reactivo de Folin diluido 1:2, dejándolas incubar nuevamente por un tiempo entre 10 – 30 min.

Se determinó la absorbancia de las muestras a 660 nm y haciendo uso de la curva patrón se calcularon las concentraciones de las enzimas.

7.21. Determinación de las características cinéticas. Ensayos espectrofotométricos

Para determinar los parámetros cinéticos de las enzimas se hicieron ensayos espectrofotométricos a una longitud de 340 nm en celdas de plástico de 1 mL y con el medio de reacción (imidazol 50 mM, 10 mM de acetato, Mes y Tris) a 37°C .

Para determinar el perfil de pH, se utilizó la mezcla de buffer ajustando a diferentes valores por la adición de HCl o NaOH.

Caracterización cinética

HK

5 mM MgCl₂, 1 mM NADP⁺, 1-2 unidades de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH Roche), 1mM de glucosa, 0.3 mM ATP. La reacción se empezó con 0.29 – 0.38 U de la HK.

Los experimentos de inhibición se hicieron con concentraciones de AMP de 0 – 0.1 mM, ADP de 0 – 0.66 mM y ATP entre 0 – 0.4 mM

En el experimento de la inhibición por G6P el sistema acoplante fue 3 U de PK-LDH (Roche), 0.3 mM NADH y 0.2 mM de PEP, variando las concentraciones de glucosa (0 – 1 mM) y G6P (0 – 12 mM).

PPi-PFK

Reacción directa

10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0.15 mM NADH, 1.5 – 3 U α-glicerofosfato deshidrogenasa, 4.5 – 9 triosafosfato isomerasa (GDH/TIM mix), 0.5 – 1 U Aldolasa (Roche), 1 mM PPi. La reacción se empezó con 0.04 U de PPi-PFK

Reacción reversa

Buffer 50 mM KH₂PO₄ pH 7.0 y 6.0. 5 – 15 mM MgCl₂, 1 mM NADP⁺, 2 – 4 U G6PDH (Roche), 1.9 – 2.3 U hexosa fosfato isomerasa (HPI) de *E. histolytica* y 1mM de f1,6- BP. La reacción se empezó con 0.03 – 0.04 U de PPi-PFK.

TIM

Reacción directa

2.5 mM EDTA, 5mM de cisteína, 1 mM NAD⁺, 10 mM de arsenato, 3.2 – 7.4 U de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH Roche), 4 mM DHAP. La reacción se empezó con 0.04 – 0.07 de TIM.

Reacción reversa

2.5 mM EDTA, 0.15 mM NADH, 1.7 – 3.4 U de α-glicerofosfato deshidrogenasa (Roche), 3 mM de G3P. La reacción se empezó con 0.24 – 0.43 U de TIM

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

8.1 Identificación de los genes

En la base de datos del genoma de *E. histolytica* se buscaron los genes que codifican para la HK, PPI-PFK y TIM. Las secuencias reportadas para estos genes son las siguientes:

HK

```
ATGCAAGAAATCATTGATCAATTTGCTATTGATAAAGAAAAGATGGAAATTATTGTTTCT
AAACTCTTAGAAGAGATGGAAAATGGACTTCAAGACAAACCAAGTACTCTTCAAATGCTT
CCAACGTATGCTCCTATTCTACTGGAAAAGAAGTTGGTACTTTTATGGGTATTGATGTT
GGTGGAACTAATCTTAGAGTCTTATTATTAGAAATCCCTGAACCTGGTGTTCGTGGAGAA
CTTAAATCAGTTGAATGTATTATGCCAAAACATCAACAACCGTTGATCAATTCTTTGGG
TTTATTGCTCAAAGATTAAGAATTTGTTGAAAATAACAATTTAAAAGAAAAAGAAATT
AAAGCTGGATTAACATTTTCTTTGCTGTTGAACAAATTGCTATAGACAAAGGAATTCAA
CAATCATGGTCAAAGGATGGGATGTTAAGGAGTCTATTGGAAAAGACATTGTTGAAATT
TTCCATAACCAACTTGCAAAAATCAATGTTAACAATATTAGAATAGTTGCATTTATCAAT
GATACAGTAGGAACATTTGCCAATCTTGCATATGATGATGCATCATGTGGTATGGGACTT
```

ATTTTTGGTACAGGAACTAATGGATGTTATATTGAGAAAACATCAAATTTTGCTGCTTCT
AAATTGAAATCAGTTTATAAAGAAGATTATATGATTGTTAACACCGAATGGGGAGGATTA
CAATTTCCAGAAGTTGGACTCAACAGATTTGATGATATGATTAATGATGTTAGCGTTAAT
AAAGACCAACAACGATATGAAAAGATGATTTTCAGGTATTTACATGGGATGGTTAGCAAGA
TTAGCTATTAGAGAATTAATTGAGAAAAAAGTTATTTTTGAACGATATGCTGATGCTGAA
GTTTTTCTAATTCACCAGATGACACTCAATTTAATGATAAAAAGAAATATTCATCAAGA
CATACTGAAATAGTTGAAGACACTTCTCCTGAACTTTCTCGTGTTGACACCATTTTAAAG
TCACTTGGAGTTAATGACTCTACTTTAGAAGAAAGAAAGATCCTTAAGGCTATAACTGAG
GCAGTTGTTAAAAGAGCTGCTTATCTTTCTGCAGCTGCAACAGTTGCCTTATACCGTAAG
ATGGTTCCATATATGAAAGAAAGAACTACTGCTGGTATTGATGGTACTGTTTATGAAAAG
TCTGTTCCATTTAAGAGATTCTATCTTGAAGCAATCCGTCTTTTACAACCAAAGAAAAC
TTTACTTGTCAGTTATCTAAAGATGGATCTGGACTTGGTGCTGTCATTGTTGCTGCTGCT
GTTGCATGTAAACACTAA

PPI-PFK

ATGTCAGAAAGAAGACATGTCCATCAAAGAAATGATTTACTTATTGCTAAAAACCAGAA
GAACCACTTCCATCATTAAAAATTACATCATTAGGAGAATGTAAATATGAAAATACATAT
GCATCACCTGAACCTTTTGTAGATGGAATGACAATGTCTATGTCTGCTATTAAAATTGAT
GGAATACCTGTTAATGAATGTGAAGCTGAGTTAGCAGGACCAATGGAAAAATATTCTTC
ATTCCAGAAAGAACCAAAGTTGGAATAGTAACATGTGGAGGATTATGTCCAGGATTAAT
AATGTTATTAGAGGATTAGTTATGAACCTTCAAATAGATATGGAGTTAAACAAATTTAT
GGTTTAAAAATATGGTTATGAAGGACTTGTTCTGAATTATCTGAACAAATGAACTTGAC
ACATCTGTTGTAGATGATATTCATCAAAGAGGTGGAACTATATTAGGTACTTCAAGAGGA
GCTCAAGACCCTAAAATTATGGCACAATTTCTTATTGACAATAATTTTAATATTCTCTTC
ACATTAGGAGGAGATGGTACATTAAGAGGGGCAAATGCAATTAATAAAGAATTAAGAAGA
AGAGGTAGTCCTATTGCAGTTGTTGGTATTCTAAACTATTGACAATGACATTTGTTAT
ACAGACTCTACTTTGGGTTTGATACTGCTGTAGAATTAGCACAAGAAGCTATTAATTCA
GTTTCATTGTGAAGCTAAATCAGCAAAGAATGGAGTTGGAATAGTTAACTAATGGGTAGA
GATGCAGGGTTTATTGCATTATATGCATCAGTTGCATCAGGAGATGTAAATTTAGTATTA
ATTCCTGAGGTTGATACACCAATTGAAGAGATTCTTAAATGACAGAAAGAAGATTAATG
TCAAAGGACATATAGTGATTGTTATTGCTGAAGGGGCATGTCAAATCTTAAACCAAAA
GGTCTTGATCTTGGTAGTGATAAATCAGGAAATATTGTTTCATTGGGATGCTGTTACATAT
ATTAGACAAGAAATAGATAAGTATTTAGAAAATAAAAAAATAGAACATACTATTAATTT
GTTGATCCATCTTATATGATTCGATCAGCACCATGTAGTGCAGCTGATGCACATTTCTGT
TTATGTTTAGCAAATGCAGCAGTTCATGTAGCTATGGCAGGAAAAACAGGATTAGTTATT
TGTCATCATCATAACAATTTTGTTCATACCAATTGAAAGGGCATGTTATTATTTGAAA
AGAGTGAACCCTGAAGGACCAATGTTATCAATGATGAAGTCTATTGAGTCTGTTGAATGA

TIM

ATGTCAGCTCGTAAATTTGTCGTTGGTGGAAATTGGAAATGTAATGGTACTCTTGCTAGT
ATTGAAACTTTAACTAAAGGAGTTGCTGCTTCAGTTGATGCTGAACTTGCTAAGAAAGTT
GAAGTTATTGTTGGAGTTCCATTTATTTATATTCCAAAAGTTCAACAAATTCTTGCAAGGA
GAAGCTAATGGTGTCTAATACTCGTTTCTGCAGAAAATGCATGGACTAAATCAGGAGCA
TATACTGGAGAAGTTCATGTTGGAATGTTAGTTGATTGCCAAGTTCCATATGTTATTCTT
GGACATTCTGAAAGAAGACAAATTTTCCATGAAAGTAATGAACAAGTTGCTGAAAAAGTT
AAAGTTGCTATTGATGCTGGATTAAGTCATTGCCTGTATTGGCGAACTGAAGCACAA
AGAATTGCTAATCAAAGTGAAGAAGTTGTTGCAGCACAACTTAAAGCTATTAATAATGCT
ATTTCAAAGAAGCATGGAAGAATATTATTCTTGCAATGAACCAGTCTGGGCTATTGGA
ACTGGTAAGACTGCTACTCCAGATCAAGCTCAAGAAGTTCATCAATACATCAGAAAGTGG
ATGACTGAAAATATTTCTAAAGAAGTTGCTGAAGCTACAAGAATTCAATATGGTGGATCT
GTTAATCCAGCTAACTGTAATGAACTTGCTAAGAAAGCTGACATTGATGGTTTCTTAGTT
GGAGGAGCTTCATTAGATGCTGCTAAATCAAGACTATCATTAACTCAGTTTCTGAGAAA
TTCTAA

Una vez identificadas las secuencias de nucleótidos de los genes se compararon las secuencias de aminoácidos traducidas con las mismas enzimas de otros organismos. La tabla 2 muestra el % de identidad y similitud encontrado para estos genes.

TABLA 2. COMPARACIÓN ENTRE LAS SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LA HK, PPI-PFK Y TIM DE *E. HISTOLYTICA* Y DE OTROS ORGANISMOS. SE MUESTRAN SOLO LOS PORCENTAJES MÁS ALTOS ENCONTRADAS AL HACER LA COMPARACIÓN (TOMADO DE SAAVEDRA *ET AL* 2005)

Enzima	Organismo	% identidad	% de similitud
HK	Humanos, HK tipo IV	30	52
PPI-PFK	Plantas, bacterias	46 – 56	63 – 73
TIM	Hongos, plantas y humanos	49 – 56	64 – 69

Como podemos observar en la tabla 2, la HK de *E. histolytica* presenta la mayor similitud con la HK tipo IV de humanos, esto nos puede hablar un poco de las características cinéticas de dicha enzima, para la cual se ha reportado que de las HK existentes en humanos es la menos afín a la glucosa (K_m : 5-8 mM comparándola con K_m de 20-130 μ M de las otras tres HK presentes en humanos) (Bhuvaneshwari *et al*; 1999), tiene un peso molecular de 50 KDa (contra 100 KDa del resto de las HKs) (Liang *et al* 1994), en condiciones fisiológicas se encuentra virtualmente inactiva con manosa y fructosa (Kenji *et al* 2004) y lo que parece más interesante es que su actividad no se ve afectada por la concentración de Glucosa-6-fosfato (Pollard y Cornish; 1982), lo cual concuerda con lo reportado para la HK de amiba (Kroschewski *et al* 2000).

Amplificación de los genes por PCR

Los genes se amplificaron a partir de DNA genómico con los oligonucleótidos específicos como se describió en la sección de metodología. Se separaron los productos de PCR en un gel de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio, en la figura 7 se muestra dicho gel revelado en luz UV. El tamaño de los fragmentos amplificados corresponde al tamaño del gen deducido de la secuencia de nucleótidos y previamente reportados HK 1.3 Kpb, PPI-PFK 1.6 Kpb y TIM 0.8 Kpb (Kroschewski *et al*; (2000), Deng y Huang (1998) y Landa *et al* (1997), respectivamente).

También en la figura se observa que en los tres casos se amplificó solo un fragmento, es decir se observa una sola banda, esto por la especificidad de los oligonucleótidos empleados.

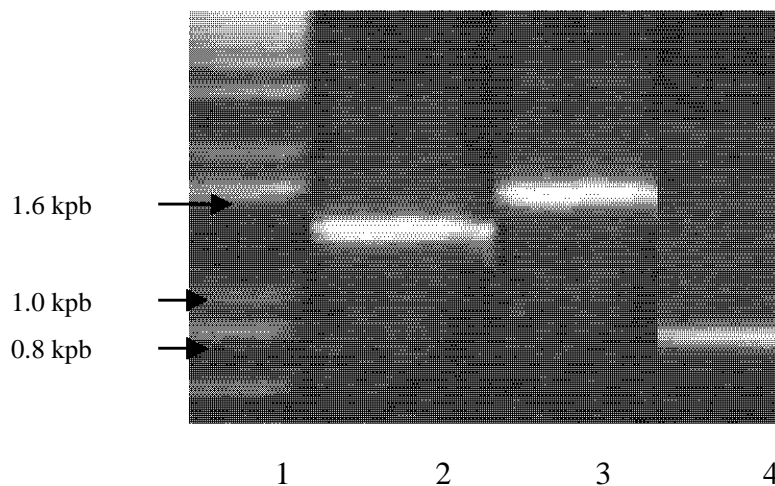


Fig. 7. Los productos de PCR se corrieron en este gel de agarosa. 1) Marcador de peso molecular, 2) HK, 3) PPi-PFK y 4) TIM

8.3. Análisis del patrón de digestión de los genes amplificados.

Para comprobar que el gen amplificado en la reacción de PCR era el correspondiente al de las enzimas que queremos purificar se hicieron reacciones de digestión con enzimas de restricción. En la figura 8 se muestra un gel de agarosa con bromuro de etidio revelado en luz UV en el que se separaron los productos de la digestión realizada para la HK y la TIM. Las digestiones permiten extraer el gen del vector pGEM. En la fotografía podemos observar la banda correspondiente al vector, aproximadamente 3 Kpb y un poco más abajo la banda que corresponde al gen (1.3 kpb para el caso de la HK y 0.8 Kpb para la TIM). El carril con el plásmido sin digerir es para comprobar la eficiencia de la digestión.

Para la PPi-PFK se hicieron las digestiones directo al producto de PCR, los fragmentos obtenidos en cada una de las digestiones concuerdan con el patrón esperado: Eco RI fragmentos de 341, 617 y 683 Kpb (carril 1), Hind III 600 y 1040 Kpb (carril 2) y Pst I 126, 249 y 1266 Kpb (carril 3).

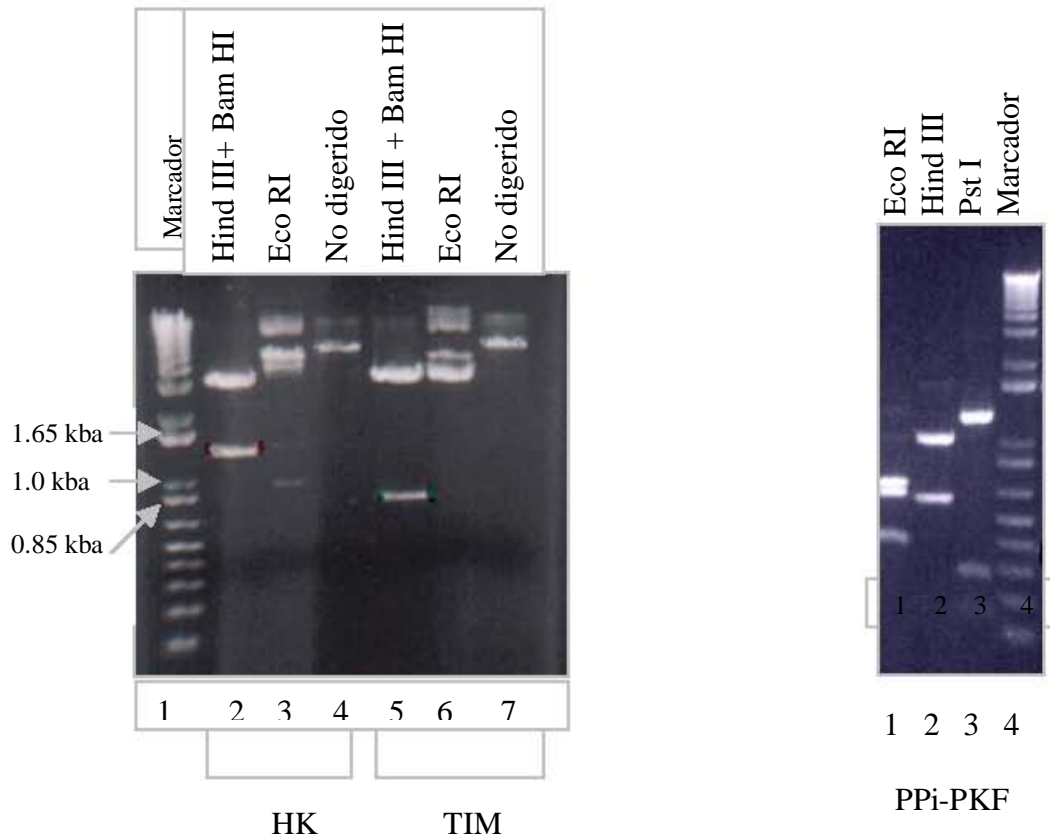


Fig.8 Digestiones de los productos de PCR de las tres enzimas.

Con base en los resultados de las digestiones realizadas a los genes confirmamos que dichos genes presentan el patrón de restricción esperado para cada uno de ellos.

8.4. Clonación del gen en el vector de sobreexpresión pET28

Una vez que se corroboró la identidad del gen a través de las digestiones con enzimas de restricción y de la secuenciación, se procedió a clonarlo en el vector de sobreexpresión pET 28 de acuerdo a lo descrito en la sección de metodología. Se seleccionaron 10 colonias en las que se creyó podía encontrarse el plásmido y se sembraron en medio LB líquido con kanamicina. Se indujo a la sobreexpresión de las proteínas con 0.4 mM de IPTG.

8.5. Sobreexpresión de la proteína

La figura 9 muestra los geles de poliacrilamida-SDS al 12.5 % en los que se corrieron las diferentes colonias de bacterias BL21 lisadas a las que se les introdujo el plásmido que contiene el vector pET 28 y el gen de las proteínas que nos interesa purificar y que fueron inducidas con IPTG. En los tres casos se puede apreciar una banda más intensa, que corresponde con el peso molecular de la proteína determinado de la secuencia de aminoácidos deducida de los genes más la etiqueta de histidinas adicionada por el vector pET 28 (HK 53 kDa, PPI-PFK 64 KDa y TIM 31 KDa). Esto nos indica que las proteínas están siendo sobreexpresadas por la bacteria y en ninguno de los tres casos se observa que una colonia sobreexpresara más que otra.

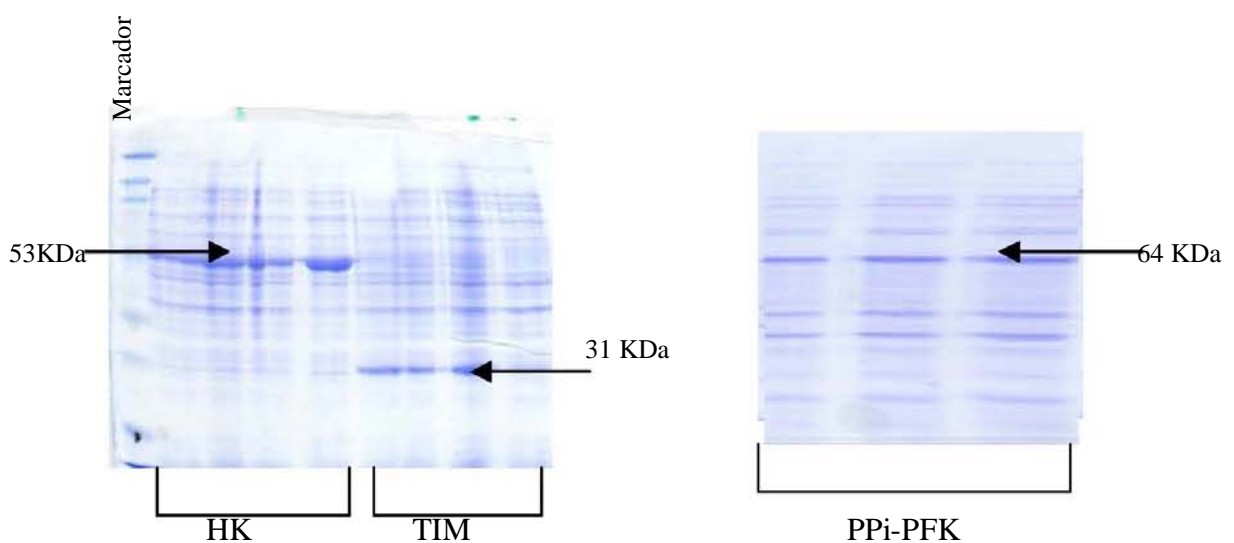


Figura 9. Sobreexpresión de las proteínas en *E. coli* BL21DepLysS. Cada carril representa una colonia independiente

Una vez que se observó que las bacterias están sobreexpresando a la proteína, el siguiente paso fue determinar si las proteínas se estaban sobreexpresando de manera soluble o no, esto es importante ya que para poder purificar a las proteínas en su forma nativa requerimos que sean solubles. Se seleccionó una colonia de cada proteína y se realizó un cultivo líquido en medio LB. Las células se cosecharon, sonicaron y centrifugaron (ver Metodología) para separar la parte soluble (sobrenadante) y la insoluble (precipitado). Las alícuotas del sobrenadante y precipitado de las bacterias se separaron en un gel de poliacrilamida-SDS (figura 10). Se puede observar que las proteínas se sobreexpresaron de manera soluble ya que la banda más

← 64 kDa

intensa que concuerda con cada uno de los pesos moleculares se encuentra en el sobrenadante.

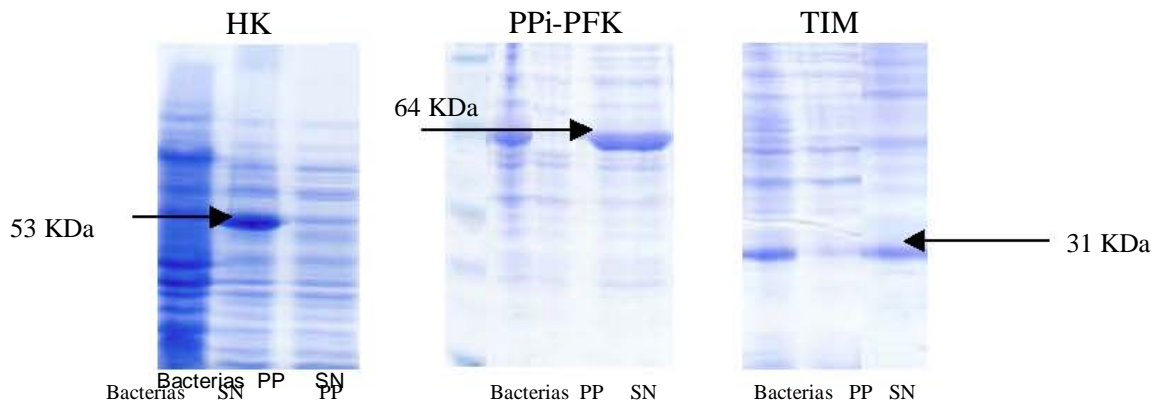


Fig. 10. Geles PAGE-SDS del sobrenadante (SN) y precipitado (PP) de lisados de bacterias que sobreexpresan las enzimas

De acuerdo a la figura 10 concluimos que las proteínas se están sobreexpresando de manera soluble por lo que pudimos proseguir con los pasos de purificación.

8.6. Purificación

Una vez que determinamos que las proteínas se estaban sobreexpresando de manera soluble se puede proseguir con la purificación de las mismas.



Fig. 11: Marcha de purificación de la PPI-PFK. Los carriles corresponden a 1) Bacterias, 2) Eluato que no se pegó a la resina , 3) lavado con 10 mM de imidazol 4) elución con 100 mM de imidazol

Podemos observar que las bacterias sobreexpresaron a la enzima en forma abundante. Después de haber pasado el lisado por la columna se aprecia que la mayor cantidad de la proteína quedó unida a la resina ya que en el eluído no existe una banda intensa(carril 2); en el primer lavado con imidazol se despega un poco de proteína ya que se observa una banda tenue en el carril 3, finalmente la proteína se eluye con 100 mM de imidazol con un alto grado de pureza ya que se aprecia una sola banda intensa en el carril 4. Esto mismo se hizo con la HK y la TIM (figuras no mostradas).

8.7. Determinación del grado de pureza

Con las proteínas purificadas se corrió un gel de poliacrilamida-SDS en el que se cargó la misma cantidad de proteína en cada carril (figura 12) y se sometió a análisis densitométrico para determinar el grado de pureza de las enzimas. En los tres casos la pureza resultó ser mayor al 95 %.

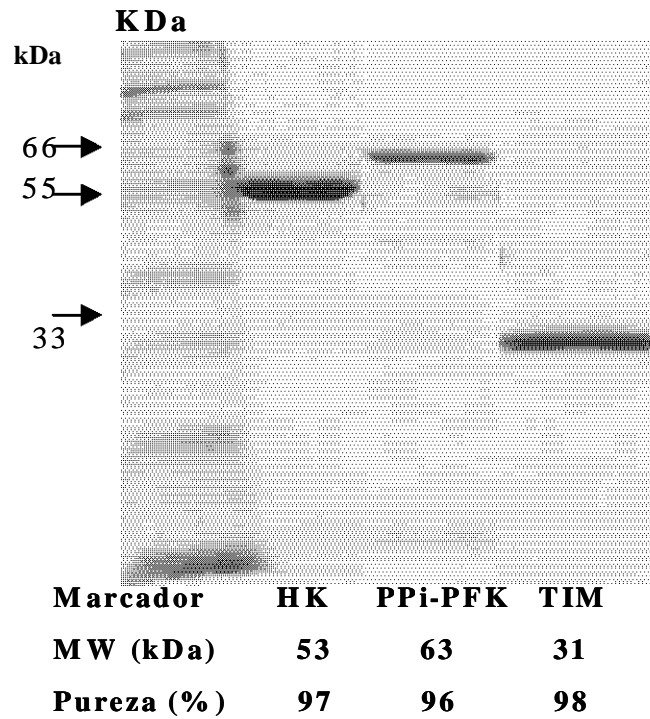


Fig. 12. Gel de poliacrilamida SDS con las proteínas purificadas

8.8. Caracterización cinética

8.8.1 Determinación del pH óptimo

Ya con las proteínas purificadas se procedió a los estudios de las propiedades cinéticas de las mismas. Como primer paso se determinó el perfil de pH para las tres enzimas (figura 13).

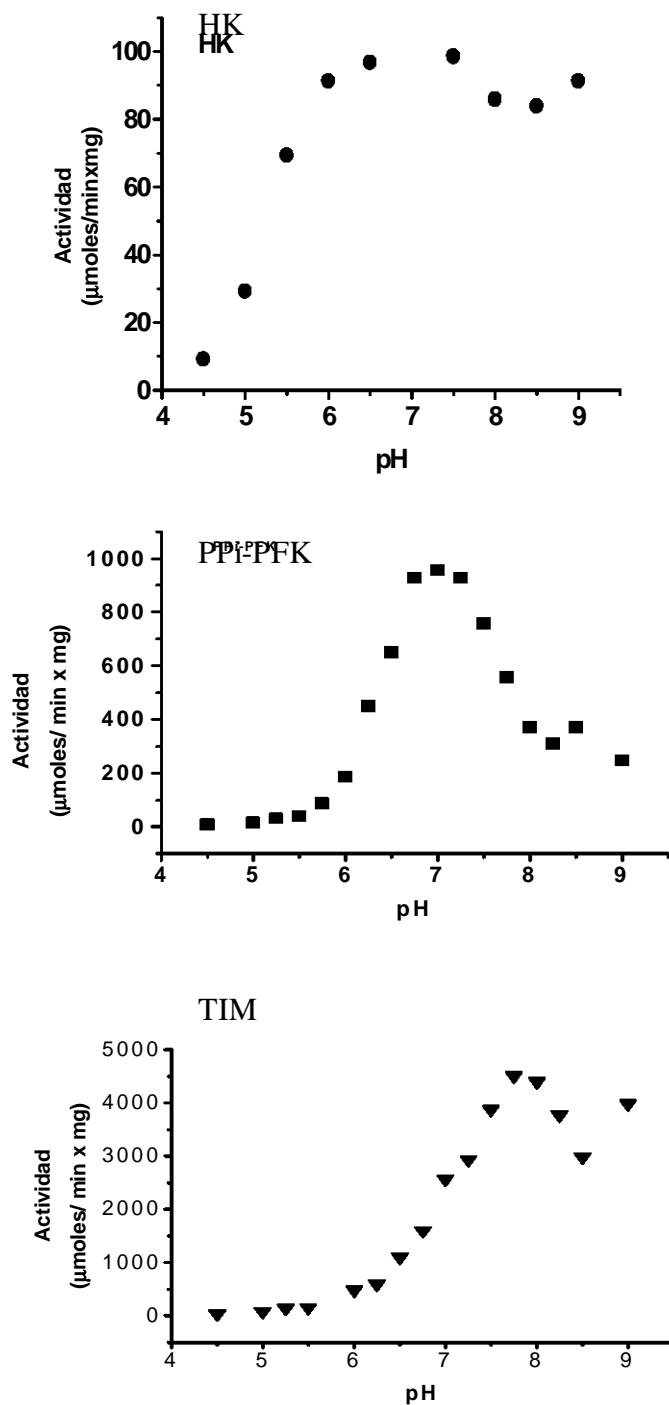


Fig. 13. Perfil de pH para las tres enzimas. La HK y la PPI-PFK corresponden a la reacción directa y la TIM en la reversa

El rango de actividad dependiente de pH de la HK es muy amplio, teniendo más del 95 % de su actividad máxima a valores de pH entre 6 y 9. Para fines comparativos de nuestros datos con los ya reportados para esta enzima vamos a establecer el pH óptimo de la misma en 8.0 dado que las características cinéticas ya reportadas se hicieron a ese pH (Kroschewski *et al* 2000).

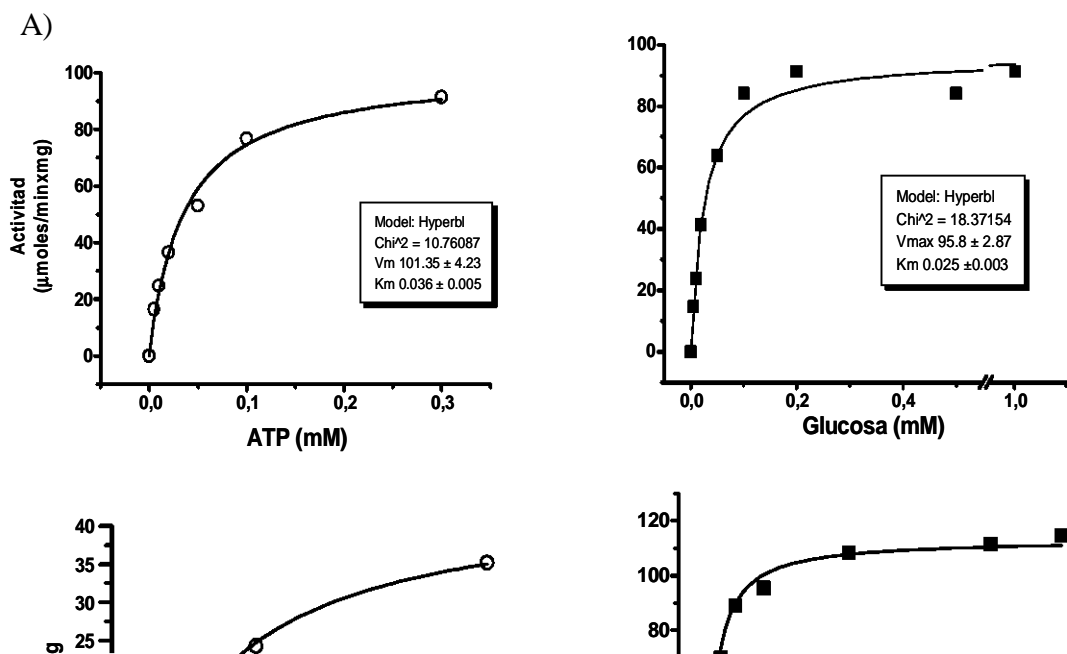
Para la PPI-PFK y la TIM se puede apreciar que el 95 % de su actividad máxima se obtiene en un intervalo muy estrecho de pH, para la PPI-PFK es entre 6.75 y 7.25 teniendo el valor máximo a 7.0 y para la TIM este rango va de 7.5 a 8.25 siendo a pH de 7.75 en el que la TIM tiene su máxima actividad. Estos valores de pH concuerdan con los reportados para estas dos enzimas; para la PPI-PFK es de 7.2 (Deng *et al* 1998) y para la TIM 7.4 (Landa *et al* 1997). También es importante resaltar que en condiciones fisiológicas de pH (6.0-7.0) la triosafosfato isomerasa se encontraría trabajando entre un 10 y 50 % de su velocidad máxima en la reacción reversa de la glucólisis, aunque dicho valor de velocidad sigue siendo muy alto comparado con el de la HK y el de la PPI-PFK. Sin embargo habría que considerar en este caso que la velocidad de la TIM en la reacción directa es 1 / 10 de la reacción en el sentido reverso.

8.8.2. Afinidad por los sustratos:

8.8.2.1 HEXOCINASA

Después de determinar el pH óptimo para las tres enzimas se determinaron las afinidades para cada uno de sus sustratos.

Para la HK se determinó la afinidad por el ATP y la glucosa a pH 6.0, 7.0 y 8.0, los datos se graficaron haciendo uso del software Origin 5.0 y se ajustaron a la ecuación de una hipérbola (figura 14)



B)

C)

Fig. 14. Afinidad de la HK por sus sustratos a diferentes pHs. A) pH 6.0, B) 7.0 y C) 8.0. En los ensayos para determinar la K_m por el ATP se utilizó una concentración fija de glucosa de 1mM y para aquellos en los que se varió la glucosa se utilizó 3 mM de ATP

Sólo se utilizó a la glucosa como sustrato de esqueleto de carbono ya que Reeves determinó que esta enzima es principalmente afín a esta hexosa, aunque si puede fosforilar a otras como la manosa, glucosamina y 2-desoxi glucosa con menor eficiencia. (Reeves *et al* 1967). Debido a la especificidad de su sustrato Reeves la llamó glucocinasa.

En la figura 14 se muestran las gráficas representativas de concentración de sustrato contra actividad de la HK a los tres valores de pH. Dichas gráficas se ajustaron a la ecuación de una hipérbola ($y = P1*x/(P2 + x)$), esta ecuación puede ser interpretada como la ecuación de Michaelis-Menten: $V_o = V_{max} * [S]/(K_m + [S])$, en donde V_o es velocidad inicial, V_{max} : velocidad máxima, S es la concentración de sustrato y K_m la constante de Michaelis-Menten (Voet;

2002). Es evidente que tanto las cinéticas de afinidad por el ATP y por la glucosa a los tres pHs corresponden a cinéticas Michaelianas ya que se pueden ajustar a la ecuación de una hipérbola. Haciendo uso del ajuste se determinaron los valores de afinidad por cada uno de los sustratos, Es importante comentar que los valores de velocidad máxima y de afinidad por cada uno de los sustratos no se vieron significativamente modificados al variar el pH del ensayo, por lo que podemos decir que la actividad de esta enzima no se va a ver drásticamente modificada por los cambios de pH dentro de la célula. La tabla 3 muestra los valores promedio de cada K_m determinadas con por lo menos 2 preparaciones diferentes de proteína.

TABLA 3: PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA HK A LOS TRES PHs DE TRABAJO. V_{MAX} (μ MOLES/ MIN X MG), K_m (μ M). LOS DATOS SON EL PROMEDIO DE AL MENOS 2-4 PREPARACIONES DE PROTEÍNA. LAS DETERMINACIONES PARA LA HK HUMANA TIPO IV SE HICIERON A PH 7.1 (MOULAY, VEIGA-DA-CUNHA Y VAN SCHAFTINGEN; 2000)

	Parámetros	pH 8.0	pH 7.0	pH 6.0	HK humana tipo IV
HK	V_{max}	158 \pm 62	105 \pm 13	86 \pm 20	85
	K_m glucosa	33	40	25	8000
	K_m ATP	84	77	121 \pm 25	100

Los valores de afinidad y velocidad máxima a pH 8.0 se encuentran dentro del rango de lo reportado (V_{max} : 236 U/ mg, K_m_{glu} : 59 μ M, K_m_{ATP} : 183 μ M) (Kroschewski et al 2000). Al hacer la comparación de las características cinéticas reportadas para la HK humana tipo IV con los parámetros cinéticos de la HK de amiba a pH 7.0 que nosotros determinamos, concluimos que son

similares en los valores de V_{max} y afinidad por el ATP, pero existe una gran diferencia en la afinidad de ambas enzimas por la glucosa, la HK humana tipo IV es mucho menos afín por dicho sustrato que la HK amibiana (su K_m es 80 veces mayor a la afinidad de la HK de amiba que nosotros determinamos). Decidimos hacer la comparación entre estas dos enzimas porque, como ya se mostró anteriormente, es la HK tipo IV con la que la secuencia de aminoácidos de la HK de amiba presenta un mayor porcentaje de similitud.

8.8.2.2. FOSFOFRUCTOCINASA DEPENDIENTE DE PIROFOSFATO

Para la fosfofructocinasa dependiente de pirofosfato se determinó la afinidad por sus dos sustratos en ambos sentidos de la glucólisis, debido a que esta enzima cataliza una reacción reversible (Reeves *et al* 1976).

En este caso se muestran sólo las gráficas obtenidas a pH 6.0 en el sentido directo de la vía (figura 15), los resultados a pH 7.0 se encuentran en la tabla 4

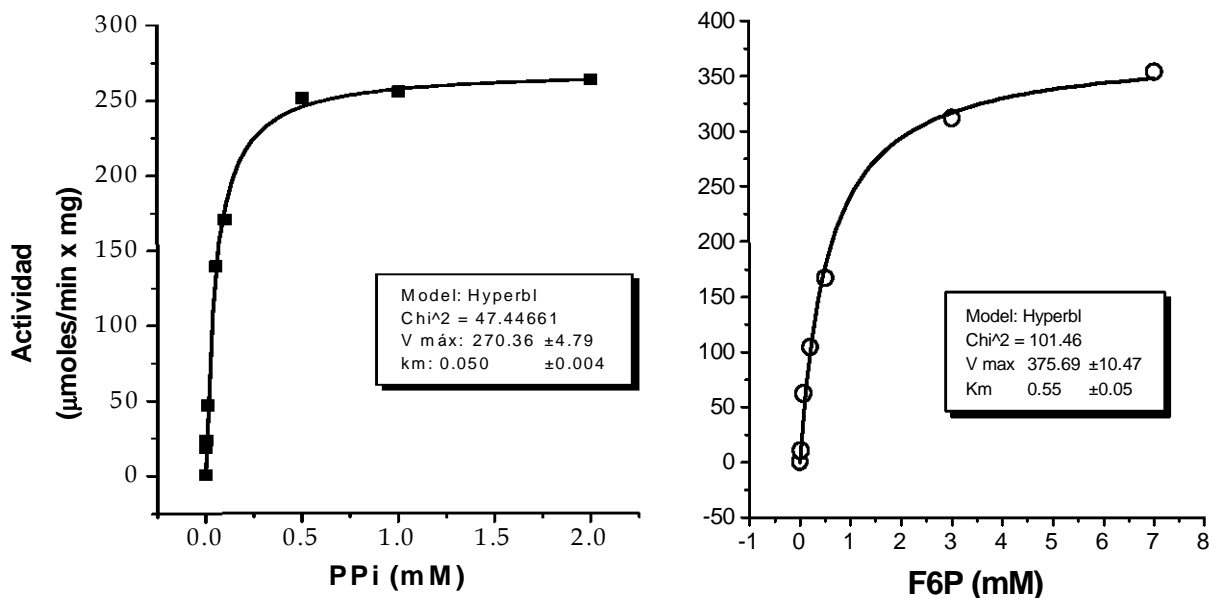


Fig. 15. Afinidad de la PPI-PFK por sus sustratos en el sentido directo de la glucólisis a pH 6.0

La figura 16 presenta gráficas representativas de las cinéticas en la reacción reversa. Los valores de la afinidad por la Fru1-6BP y Pi se indican en la tabla 4.

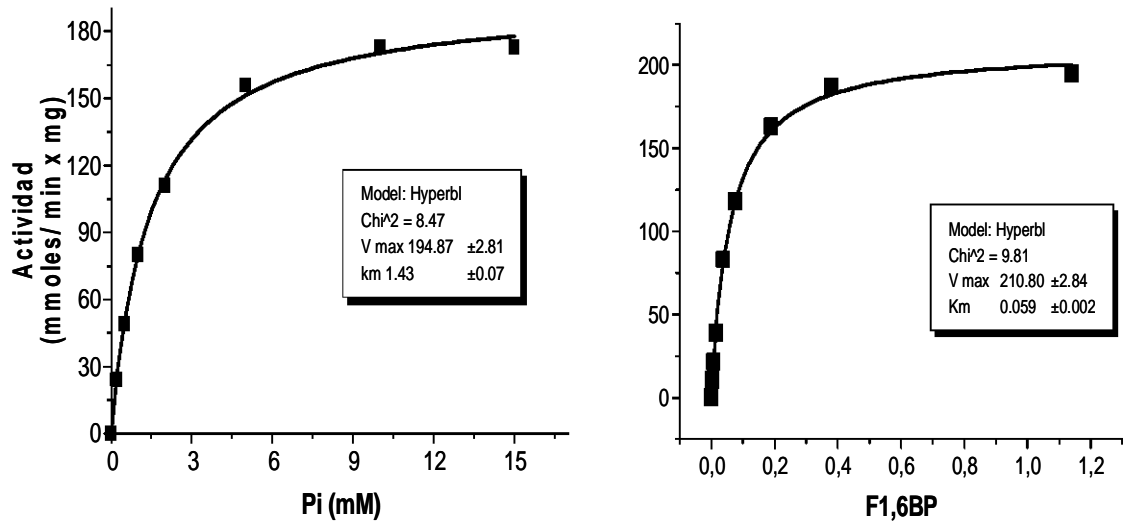


Fig. 16. Afinidad de la PPI-PFK por sus sustratos en el sentido reverso a pH 7.0

En el caso de la PPI-PFK podemos observar que, al igual que en el caso de la HK sigue una cinética de Michaelis-Menten ajustándose a una hipérbola (figuras 15 y 16). En el sentido directo de la vía los valores de velocidad máxima son casi del doble a pH 7.0 con respecto a los de pH 6.0 (tabla 4). Como ya se mencionó anteriormente el pH óptimo de actividad para esta enzima es 7.0. La afinidad por sus sustratos se ve afectada al cambio de pH (tabla 4), en la K_m por la F6P no existe una gran diferencia a los dos valores de pH, siendo 1.5 veces mayor a pH 6.0; en contraste el valor de K_m por el PPI es 7.6 veces mayor a pH 6.0 con respecto al pH 7.0. En la reacción reversa de la glucólisis se observa que no existe diferencia en los valores de V_{max} al igual que en la afinidad por la F1,6BP a los dos valores de pH, pero la afinidad por el Pi es 1.6 veces menor a pH 6.0.

TABLA 4: PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA PPI-PFK. V_{MAX} (μ MOLES/ MIN X MG), KM (MM). LOS DATOS SON EL PROMEDIO DE 2 PREPARACIONES DE PROTEÍNA. LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA PPI-PFK DE *THERMOPROTEUS TENAX* FUERON DETERMINADOS A PH 7.5. (SIEBERS, KLENK Y HENSEL; 1998)

	Parámetros	pH 7.0	pH 6.0	<i>Thermoproteus tenax</i>
PPI-PFK pH opt 7.0	V_{max} Fw	298	112	270
	Km F6P	455	695	53
	Km PPI	50	380	23
	V_{max} Rw	392	338	210
	Km F1, 6BP	124	109	33
	Km Pi	1440	2300	1430

Al comparar los datos que obtuvimos a pH 7.0 con lo ya reportado para esta enzima por otros autores (Deng *et al* 1998) nos damos cuenta que la velocidad en el sentido directo y la Km por el PPI son muy parecidas a lo reportado, sin embargo la Km por la fructosa 6- fosfato es tres veces mayor a lo determinado en dicho artículo que es 85 –105 μ M.

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, el gen de la PPI-PFK de *E. histolytica* presenta el mayor porcentaje de similitud con las PPI-PFK de plantas y bacterias, En la tabla 4 se muestran los parámetros cinéticos reportados en la literatura para el caso de la bacteria *Thermoproteus tenax* (Siebers, Klenk y

Hensel; 1998), se seleccionó esta bacteria por que sus características cinéticas ya se tienen muy bien estudiadas. Se puede observar que los parámetros cinéticos de estas dos enzimas son muy parecidos entre si , a excepción de la afinidad por la F6P siendo mucho más afín por este sustrato la PPI-PFK de la bacteria (la K_m por la F6P de *E. histolytica* a pH 7.0 es 8.6 veces mayor que la de la bacteria) . También existe una diferencia en la afinidad de ambas PPI-PFK's por la F1,6 BP, la K_m por este sustrato de la amiba es 3.7 veces mayor a lo reportado para la bacteria.

De manera general, al comparar los parámetros cinéticos de la PPI-PFK de *E. histolytica* en los sentidos directo y reverso concluimos que, aunque existe una pequeña diferencia en las velocidades máximas para ambos sentidos (es mayor la velocidad en el sentido reverso aproximadamente 1.3 – 3.0 veces a pH 7.0 y 6.0 respectivamente) al igual que la afinidad por la F6P y la F1,6BP en donde se aprecia que la enzima es más afín por el sustrato en el sentido reverso (la K_m por la F6P es 2-6 veces mayor que la K_m por la F1,6BP); la diferencia más notoria es la afinidad por el PPI y el Pi, en donde la K_m por el Pi es aproximadamente 28 veces mayor que la K_m por el PPI a pH 7.0, esta diferencia tan grande nos hace pensar que la PPI-PFK de la amiba podría realizar preferentemente la reacción en el sentido directo de la vía, por lo que esta enzima podría no representa un punto de control en la glucólisis del parásito.

8.8.2.3. TRIOSAFOSFATO ISOMERASA

Para la triosafosfato isomerasa se determinaron las afinidades por sus sustratos en el sentido directo y reverso a diferencia de lo reportado por Landa *et al* 2000 que únicamente lo hicieron en el sentido reverso. La figura 17 muestra las gráficas de dichos experimentos a pH 8.0

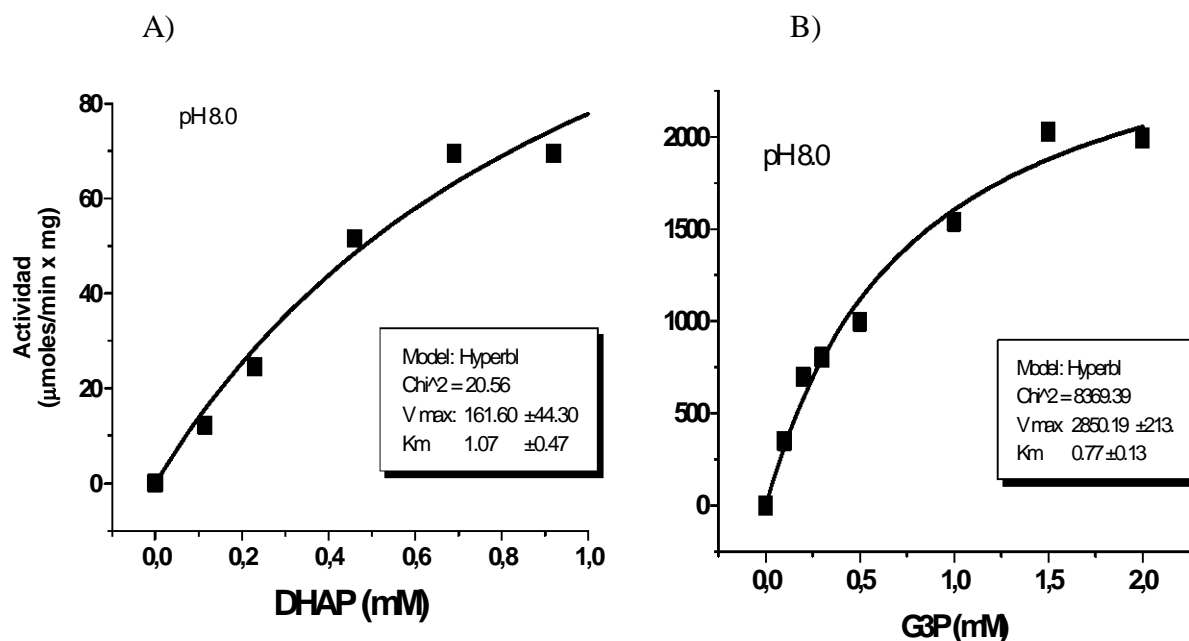


Fig. 17: Afinidad de la TIM por sus sustratos en el sentido directo (A) y reverso de la glucólisis (B) a pH 8.0.

La TIM también presenta una cinética Michaeliana (figura 17) en la reacción reversa y directa de la glucólisis. En la tabla 5 se resumen los parámetros cinéticos determinados para la TIM a pH óptimo y fisiológicos.

Tanto la velocidad como la afinidad son mayores en la reacción reversa comparados con los valores en la reacción directa. Esta enzima también ve afectada su actividad al variar el pH.

TABLA 5: PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA TIM A PH ÓPTIMO Y FISIOLÓGICOS. V_{MAX} (μMOLES/ MIN X MG), KM (μM). ENTRA PARÉNTESIS SE ENCUENTRAN EL NÚMERO DE REPETICIONES EMPLEANDO DISTINTAS PREPARACIONES DE PROTEÍNA EN CADA CASO.

	Parámetros	pH 8.0	pH 7.0	pH 6.0
TIM pH opt 8.0	<i>V max Fw</i>	270 ± 108 (3)	284 (2)	199 ± 91(3)
	<i>Km DHAP</i>	1655(2)	1400(1)	455(2)
	<i>V max Rw</i>	3364 ± 702(4)	1697 ± 891(4)	1096 ± 312(4)
	<i>Km G3P</i>	830 (2)	740 (1)	320 (2)

La velocidad máxima en el sentido directo para la TIM no se ve afectada por cambios en el pH, pero la afinidad por la DHAP aumenta al disminuir el pH (la Km a pH 6.0 es del 30% del valor de la Km a pH 8.0). En el sentido reverso la velocidad a pH disminuye al disminuir el pH (a pH 6.0 es del 50 % del valor de a pH óptimo), en contraste, la afinidad aumenta a pH 6.0 Sin embargo. al hacer la comparación de la afinidad en el sentido directo con la afinidad que presenta esta enzima por su sustrato en el sentido reverso podemos darnos cuenta que es de casi el 50% a pH 8.0 y 7.0. Es decir que esta enzima es más afín por su sustrato en el sentido reverso y que también es más veloz en este sentido.

8.8.3. Inhibidores

Se estudió el efecto del AMP , ADP y G6P en condiciones cercanas a las fisiológicas sobre la actividad de la HK. Kroschewski *et al* (2000) reportó que esta enzima presenta inhibiciones competitivas del AMP y el ADP con respecto al ATP y además en ese mismo artículo se determinó que la HK no es inhibida por G6P como lo es la hexocinasa en mamíferos (Voet *et al* 2002).

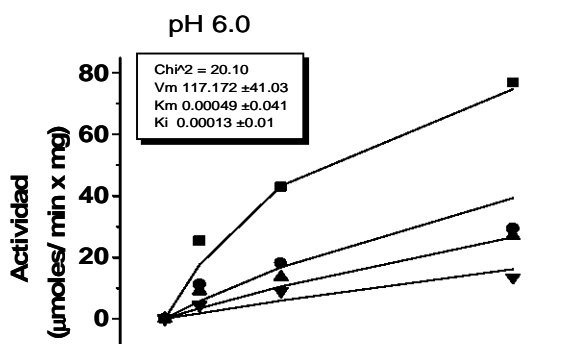
8.8.3.1 ADP

En la figura 18 se muestra las gráficas obtenidas en ensayos enzimáticos en los que se varió la concentración de ATP en presencia de una concentración fija de ADP a pH 6.0, 7.0 y 8.0.

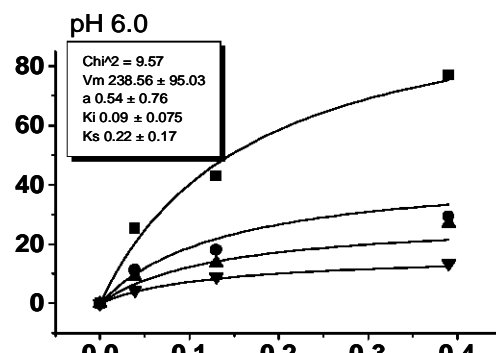
El ADP tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de la HK como ya se había reportado previamente para la enzima de amiba (Kroschewski *et al* 2000). Con concentraciones cercanas a 0.3 mM de ADP, la actividad enzimática disminuyó aproximadamente un 50% de la velocidad en ausencia del inhibidor con 0.15 mM de ATP.

Para poder determinar el mecanismo de inhibición que presenta el ADP se realizaron ajustes utilizando el programa de cálculo Origin 5.0 al que se le editaron las ecuaciones para la inhibición mixta ($V_o = V_{max} [S] / \alpha K_m + \alpha' [S]$) en donde α es un factor que modifica la afinidad de la enzima por el sustrato) y competitiva ($V_o = V_{max} [S] / \alpha K_m + [S]$) establecidas por Micheaelis- Menten (Voet 2002); a este tipo de ajuste se le conoce como ajuste global no lineal porque toma todas las series de datos y hace el ajuste a la ecuación editada de tal manera que los valores de K_m , V_{max} y K_i obtenidos del ajuste son los globales de todas las series de datos existentes en el experimento.

A) Tipo competitivo



B) Tipo mixto



pH 8.0

pH 8.0

Fig. 18: Ajustes globales no lineales para inhibiciones competitivas y mixtas del ADP vs ATP a los tres pHs. Concentraciones fijas de ADP (mM): ■ 0.06, ● 0.2, ▲ 0.36 y ▼ 0.66.

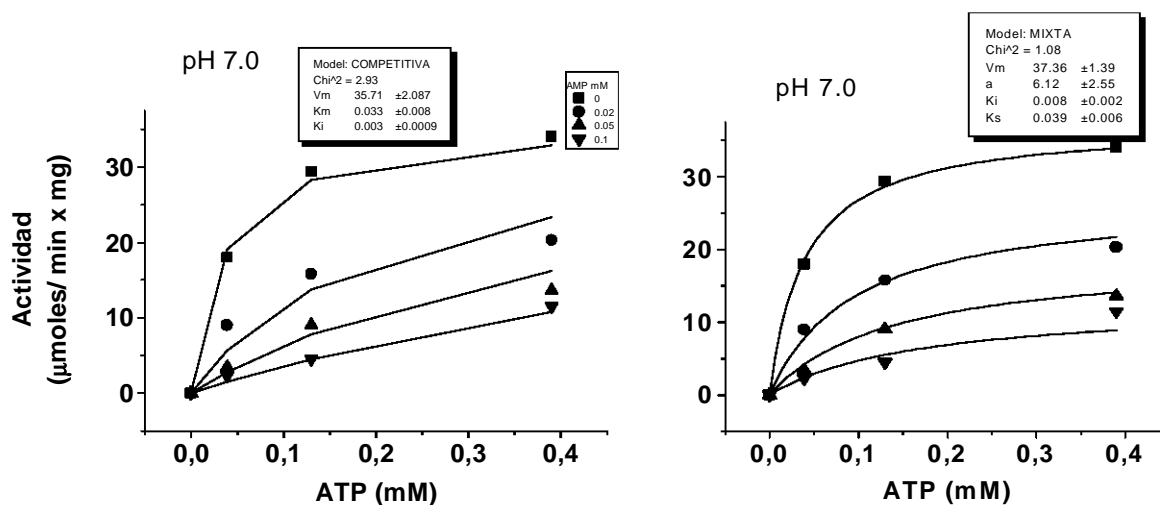
Tomando en cuenta el porcentaje de error y el valor de α , las gráficas se ajustan mejor a un tipo de inhibición competitiva ($1 < \alpha < 20$), excepto a pH 7.0 donde el mejor ajuste es de tipo mixto. Los valores de K_i encontrados van de 97 a 235 μM , (tabla 6), donde el valor de K_i a pH 8.0 se encuentra dentro de lo reportado (36 μM , Kroschewski *et al* 2000). Estos valores de K_i están por debajo de las concentraciones de ADP total determinadas por nuestro grupo de trabajo (1-3 mM), por lo que podemos pensar que la HK en condiciones

fisiológicas puede encontrarse parcialmente inhibida por ADP, dependiendo de la concentración de ADP libre que se encuentre en la célula.

8.8.3.2. AMP

El AMP tiene un potente efecto inhibitor sobre la actividad de la Hexocinasa, Kroschewski *et al*; 2000 reportó un tipo de inhibición competitiva del AMP con respecto al ATP con un valor de K_i de $0.65 \mu\text{M}$ a pH 8.0. La figura 19 muestra el gráfico obtenido a pH 7.0 del efecto inhibitor del AMP en la actividad de la enzima amibiana. Este metabolito es también un inhibidor de la HK con respecto al ATP. A concentración de 0.13 mM la presencia de AMP disminuye la actividad de la enzima un 50%; esto nos indica que el AMP es un inhibidor más potente que el ADP, ya que se requiere una menor concentración de AMP para disminuir la actividad de la HK.

Para determinar el tipo de inhibición, se realizó el ajuste global no lineal (la fig 19 muestra dicho ajuste a pH 7.0), resultando una mejor concordancia con el



ajuste de la inhibición tipo mixta. Los experimentos a los tres pH's dieron valores de K_i entre 4.5 y 36 μM (tabla 6). Lo anterior no concuerda con los datos reportados anteriormente, pues se establecía un mecanismo de inhibición competitivo con K_i de 0.65 μM . Los valores de K_i encontrados están también por debajo de las concentraciones de AMP TOTAL encontradas por nuestro grupo de trabajo (1mM); por lo tanto podemos deducir que la HK se va a encontrar parcialmente inhibida por AMP en condiciones fisiológicas si la concentración de AMP libre se encuentra en el rango micromolar.

Fig. 19. Ajuste global no lineal para un tipo de inhibición competitiva y mixta a pH 7.0

TABLA 6: RESULTADOS DE LA INHIBICIÓN DEL AMP Y EL ADP CONTRA EL ATP (K_i μMOLAR)

Metabolito	Tipo de inhibición	K_i		
		pH 8.0	pH 7.0	pH6.0
ADP	Competitiva	97	120	235
AMP	Mixta	4.5	24	36

8.8.3.3. Glucosa 6-fosfato

Uno de los metabolitos que regulan fuertemente la actividad de algunas isoenzimas de la HK humana es la G6P, el producto de la reacción. (Wilson; 1995).

Para la HK de *Entamoeba histolytica* se ha reportado que no es sensible a inhibición por G6P (Kroschewski *et al* 2000 y Reeves, Montalvo y Sillero; 1967). Kroschewski determinó que a concentración de 10 mM este metabolito estimulaba la actividad de la HK en un 13%, desafortunadamente en ese artículo no se especula sobre la posible causa de dicho efecto.

Nosotros estudiamos este efecto a pH 6.0 y 7.0. En concordancia con lo ya reportado no encontramos un efecto inhibitorio en la actividad de la HK por la presencia de G6P. A concentraciones entre 0.05-0.3 mM de glucosa si se aprecia una disminución en la actividad de hasta un 65 % con 10mM de el inhibidor, pero a concentraciones mayores de glucosa-6-fosfato parece que la enzima recupera su actividad (fig. 20). Esto podría deberse a que la glucosa 6 fosfato se encuentra parcialmente hidrolizada por lo que aumentaría la concentración de glucosa en el ensayo y la concentración del inhibidor estaría sobreestimada.

Para analizar en detalle el efecto de la G6P sobre la actividad de la HK amibiana, se disectó y aseguró el buen funcionamiento del sistema de enzimas acoplantes. En la figura 21 se muestran los diagramas que representan los sistemas empleados para la obtención de los valores de K_m para la glucosa y el ATP y el tipo de gráfica que se obtuvo (A), y el sistema empleado para determinar la K_i por la glucosa 6 -fosfato y la gráfica obtenida tomando en cuenta las distintas concentraciones de glucosa sin inhibidor (B). Es importante enfatizar que se hizo el cambio de sistema de enzimas acoplantes porque, como se observa en la figura 21 (A), en el sistema empleado para determinar los valores de K_m por la glucosa y el ATP la G6P es utilizada por la G6PDH para formar 6Pgluconato, por lo que este sistema no es útil para determinar el efecto inhibitorio de la glucosa 6-fosfato en la actividad de la hexocinasa. Se observa que de acuerdo con las gráficas de la figura 21 los valores de K_m por la glucosa en los dos sistemas empleados son parecidos (0.02-0.05 mM) pero

el comportamiento es totalmente distinto. En el caso de la gráfica A se observa un comportamiento Michaeliano, en contraste la gráfica B presenta un comportamiento inhibitorio a concentraciones mayores de 0.6 mM, efecto que no se observa en el ensayo acoplado a G6PDH.

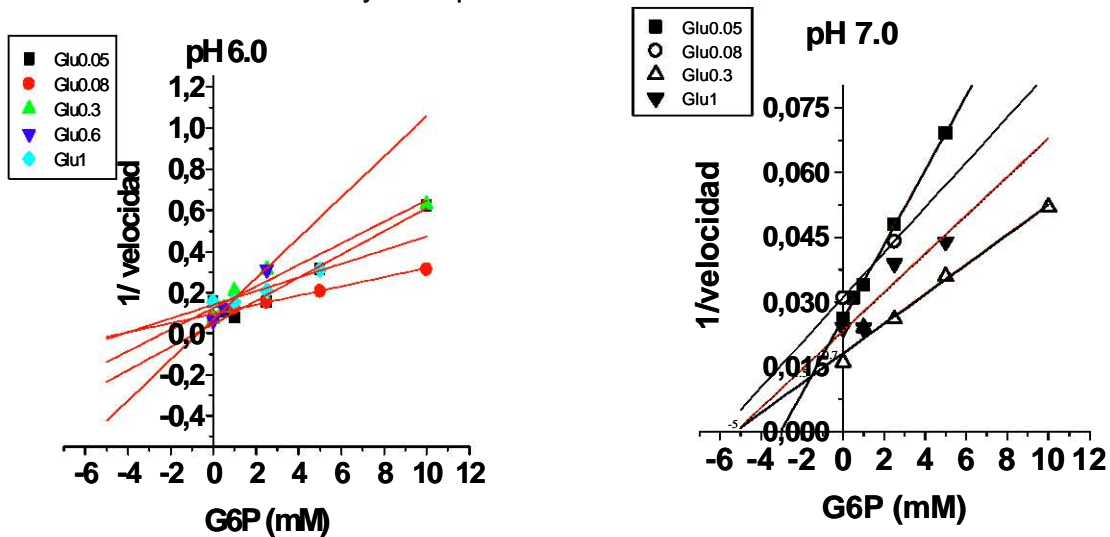
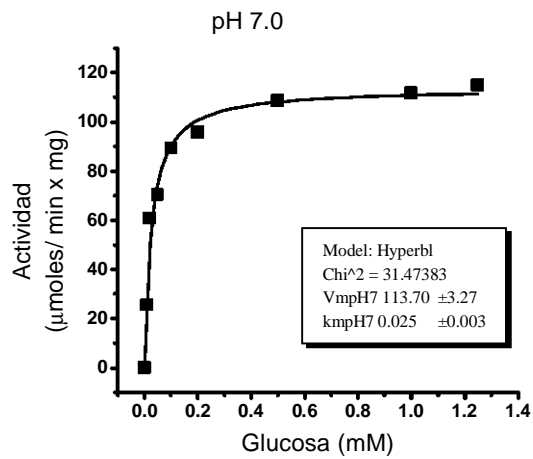
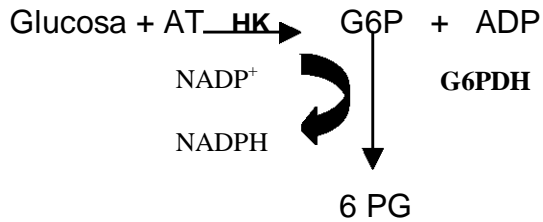


Fig. 20. Gráficas de dobles recíprocos de inhibición de la G6P con respecto a la glucosa a pH 6 y 7.

Para descartar que el efecto de activación de la HK a mayores concentraciones de G6P observado al realizar los experimentos de inhibición por la G6P se debiera a las enzimas acoplantes se hizo otro control con todos los sustratos y enzimas excepto la HK, donde no se observó actividad en el sistema; por otro lado se adicionó hasta 10 mM de G6P al sistema sin HK y la actividad no mostraba ningún comportamiento extraño, por lo que concluimos que la glucosa 6-fosfato no es un inhibidor significativo de la actividad de la HK .

A) Ensayo para determinar la afinidad de la HK por la glucosa y el ATP



B) Ensayo para determinar la K_i de la G6P por la glucosa

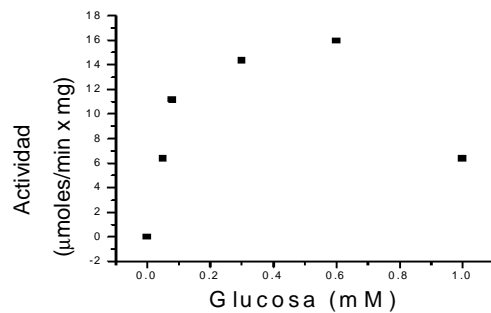
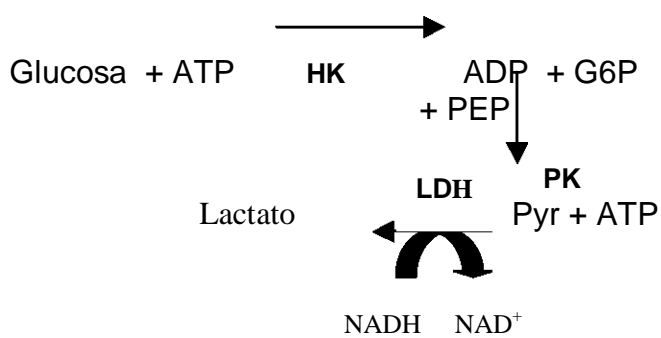


Fig 22. Sistemas utilizados para determinar los parámetros cinéticos de la HK

9. DISCUSIÓN GENERAL

Para determinar si la HK, PPI-PFK y TIM son sitios de control del flujo glucolítico de *E. histolytica* es necesario tomar en cuenta la velocidad en el sentido directo y en el reverso de la vía, al igual que el efecto de los metabolitos sobre la actividad de las enzimas.

De acuerdo con los datos cinéticos de estas tres enzimas, la HK puede representar un punto de control ya que, aunque su actividad no se ve afectada por los cambios de pH, la enzima cataliza una reacción irreversible, además de que tiene inhibidores fisiológicos como el AMP y ADP. Los valores de K_i encontrados para ambos metabolitos se encuentran por debajo de las concentraciones totales en el interior de la amiba. Sorprendentemente la G6P no es un inhibidor de la actividad de esta enzima, esto marca una diferencia ya que es a través de este metabolito como principalmente se regulan algunas isoenzimas de la HK presentes en mamíferos (Wilson; 1995).

La PPI-PFK varía su actividad al cambiar el pH y en condiciones óptimas (pH 7.0 en este caso) se encuentra trabajando a la máxima velocidad y es muy afín por sus sustratos.

Al hacer la comparación de la velocidad en el sentido directo y en el reverso de la glucólisis, la PPI-PFK es solamente 30 % más veloz en el sentido reverso de la vía que en el directo (298 $\mu\text{moles/ min x mg}$ contra 392 $\mu\text{moles/ min x mg}$ a pH 7.0) pero en contraste, es mucho más afín por el PPI que por el Pi (K_m por el PPI de 50 μM versus K_m por el Pi de 1440 μM a pH 7.0). Lo anterior nos indica que esta enzima va a estar trabajando preferentemente en el sentido de la degradación de glucosa. Debido a que no se ha reportado ningún tipo de inhibición para esta enzima, podemos decir que la PPI-PFK difícilmente representaría un punto de control de la glucólisis de la amiba.

Finalmente la TIM es mucho más veloz en el sentido reverso que en el directo ,de igual forma la afinidad por el G3P es mayor que por la DHAP por lo que podríamos pensar que esta enzima es un punto de control, pero al comparar la velocidad en el sentido directo con el resto de las enzimas de la vía podemos darnos cuenta que sigue siendo muy veloz (ejemplo: la Aldolasa tiene una velocidad de 31 y la PPDK de 12 $\mu\text{moles/ min x mg}$, ambas a pH 7.0) (

Saavedra *et al*; 2005) , por lo que aún siendo más eficiente en el sentido reverso sigue siendo de las enzimas más veloces en el sentido directo por lo tanto la TIM es poco probable que represente un punto de control de la vía glucolítica en *E. histolytica*.

10. CONCLUSIONES

A través de la utilización de técnicas de biología molecular se logró purificar a la HK, PPI-PFK y TIM recombinantes de *E. histolytica*. Se midieron sus características cinéticas en condiciones cercanas a las fisiológicas. De acuerdo con la teoría de control, se determinó que sólo la HK puede representar un punto de control en la glucólisis de la amiba debido a que presenta inhibidores fisiológicos de su actividad. Esto resulta importante si se habla de los fármacos empleados para curar la amibiasis pues podría diseñarse uno que ataque específicamente a esta enzima, matando a el parásito para curar la enfermedad.

Para poder establecer si realmente la HK es un punto de control de la vía es necesario evaluar su funcionamiento trabajando en conjunto con el resto de las enzimas de la vía. Para lograr lo anterior se requiere de la reconstrucción *in vitro* de la vía intentando simular las condiciones en el interior del parásito.

11. PERSPECTIVAS

- Determinar el efecto de el AMP y el ADP sobre la estructura terciaria de la HK amibiana
- Establecer si existe un sitio de unión específico en la HK para estos metabolitos
- Determinar si existen diferencias en la secuencia de aminoácidos de la HK amibiana y la HK humana tipo IV que expliquen que la G6P no tenga efecto inhibitorio sobre la HK de *E. histolytica*

Glycolysis in *Entamoeba histolytica*

Biochemical characterization of recombinant glycolytic enzymes and flux control analysis

Emma Saavedra, Rusely Encalada, Erika Pineda, Ricardo Jasso-Chávez and Rafael Moreno-Sánchez

Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, México D.F., México

Keywords

catalytic efficiency; *Entamoeba*; flux control; glycolysis; pathway reconstruction

Correspondence

E. Saavedra, Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Juan Badiano no. 1, Col. Sección XVI, Tlalpan, México D.F. 14080, México
Fax: +5255 5573 0926
Tel: +5255 5573 2911, ext. 1422
E-mail: emma_saavedra2002@yahoo.com

(Received 24 September 2004, revised 20 January 2005, accepted 11 February 2005)

doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04610.x

The synthesis of ATP in the human parasite *Entamoeba histolytica* is carried out solely by the glycolytic pathway. Little kinetic and structural information is available for most of the pathway enzymes. We report here the gene cloning, overexpression and purification of hexokinase, hexose-6-phosphate isomerase, inorganic pyrophosphate-dependent phosphofructokinase, fructose-1,6 bisphosphate aldolase (ALDO), triosephosphate isomerase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), phosphoglycerate kinase, phosphoglycerate mutase (PGAM), enolase, and pyruvate phosphate dikinase (PPDK) enzymes from *E. histolytica*. Kinetic characterization of these 10 recombinant enzymes was made, establishing the kinetic constants at optimal and physiological pH values, analyzing the effect of activators and inhibitors, and investigating the storage stability and oligomeric state. Determination of the catalytic efficiencies at the pH optimum and at pH values that resemble those of the amoebal trophozoites was performed for each enzyme to identify possible controlling steps. This analysis suggested that PGAM, ALDO, GAPDH, and PPDK might be flux control steps, as they showed the lowest catalytic efficiencies. An *in vitro* reconstruction of the final stages of glycolysis was made to determine their flux control coefficients. Our results indicate that PGAM and PPDK exhibit high control coefficient values at physiological pH.

Entamoeba histolytica is the causal agent of human amoebiasis and is responsible for up to 48 million cases worldwide per year, with a fatal outcome in 100 000 of those infected (<http://www.who.int/>). Metronidazole therapy to control the disease is effective in mild-to-moderate amoebic dysentery; however, parasites persist in the intestine of 40–60% of patients who are treated [1]. Moreover, recent reports describe the *in vitro* generation of strains resistant to metronidazole

[2]. These observations make it necessary to develop new strategies for the future treatment of *E. histolytica* amoebiasis. *E. histolytica* is a parasite that relies solely on glycolysis for ATP supply, as it is devoid of the Krebs cycle and oxidative phosphorylation enzymes [3,4]. Therefore, glycolytic enzymes might be promising drug targets for using to control *E. histolytica* amoebiasis, by affecting a key pathway in the energy metabolism of this parasite.

Abbreviations

ALDO, fructose-1,6-bisphosphate aldolase; 1,3BPG, 1,3-bisphosphoglycerate; 2PG, 2-phosphoglycerate; 3PG, 3-phosphoglycerate; Eh(Enzyme), enzyme of *Entamoeba histolytica*; ENO, enolase; Fru(1,6)P₂, fructose-1,6-bisphosphate; Fru6P, fructose-6-phosphate; G3P, glyceraldehyde-3-phosphate; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Glc6P, glucose-6-phosphate; GrnP, dihydroxyacetone phosphate; HK, hexokinase; HPI, hexose-6-phosphate isomerase; PGAM, phosphoglycerate mutase; PGK, phosphoglycerate kinase; PPDK, pyruvate phosphate dikinase; PPI, inorganic pyrophosphate; PPI-PFK, inorganic pyrophosphate-dependent phosphofructokinase; PYK, pyruvate kinase; TPI, triosephosphate isomerase.

The activity of all glycolytic enzymes has been detected in extracts of amoebal trophozoites cultured under monoxenic or axenic conditions [3,5]. Glycolysis in this parasite diverges from that in most other organisms in that it uses inorganic pyrophosphate (PPi) as an alternative phosphoryl donor to ATP in several reactions. It has a PPi-dependent phosphofructokinase (PPi-PFK) [6,7] and a pyruvate phosphate dikinase (PPDK) [8,9], and the partial kinetic characterization of these recombinant enzymes has been described previously [10,11]. Low activities of ATP-PFK and pyruvate kinase (PYK) have been detected, corresponding to $\approx 10\%$ of those measured for PPi-PFK [7,12] and PPDK [13] respectively.

Hexokinase (HK), purified from monoxenically cultured parasites [14], or recombinant HK isoenzymes [15], cannot phosphorylate fructose and galactose. Amoebal HK isoenzymes are strongly inhibited by AMP and ADP, but glucose 6-phosphate (Glc6P), the potent modulator of some mammalian HK enzymes [16], is a weak inhibitor of the amoebal enzymes [14,15].

The mass-action ratios of the PPi-PFK and PPDK reactions, determined in amoebal extracts, are close to the respective equilibrium constants [7,9], which indicates that these reactions are near thermodynamic equilibrium in the live organism and, hence, are reversible under physiological conditions. Furthermore, no allosteric regulation has been described for these enzymes. In consequence, it may be hypothesized that the control of glycolysis in *E. histolytica* differs from that in mammalian systems. Indeed, in the few mammalian cell types (such as erythrocytes [17], or intact heart [18]) where glycolytic flux control has been evaluated, most of the flux control resides on the HK and ATP-PFK activities, with a smaller contribution of ATPase and PYK [17], fructose-1,6-bisphosphate aldolase (ALDO), triosephosphate isomerase (TPI) and glycerol-3-phosphate dehydrogenase [18], or glucose transporters [19].

Few kinetic data are available for amoebal TPI [20], phosphoglycerate kinase (PGK) [21] or enolase (ENO) [22]; furthermore, no kinetic or structural characterization has been described for hexose-6-phosphate isomerase (HPI), ALDO, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) or phosphoglycerate mutase (PGAM).

With the long-term objective of understanding how the glycolytic flux in *E. histolytica* is controlled, we cloned the genes, and overexpressed, purified and determined the kinetic parameters of the 10 glycolytic enzymes responsible for the conversion of intracellular glucose to pyruvate. For each enzyme, the quaternary

structure was also determined. A comparison of the catalytic efficiencies (k_{cat}/K_m) at the pH optimum for each enzyme, and at values that are close to the internal pH of trophozoites (pH 6.0 and 7.0), was performed to identify possible glycolytic flux control steps. Additionally, an *in vitro* reconstruction of the final stages of glycolysis (from 3-phosphoglycerate to pyruvate) was made to determine the flux control coefficients of the enzymes by applying the theory of metabolic control [23].

Results

Protein sequence analysis

Amino-acid sequence comparisons and phylogenetic analyses have previously been described for the majority of *E. histolytica* glycolytic enzymes: HK and HPI [24], PPi-PFK [25], ALDO [26], TPI [20] GAPDH [27], ENO [28] and PPDK [29]. The percentage similarity and identity of each amoebal enzyme to major phylogenetic groups are shown in Table 1. To our knowledge, no phylogenetic analysis has included *E. histolytica* (Eh)PGK and PGAM sequences. The EhPGK amino-acid sequence showed 63–70% similarity with PGK from groups as diverse as vertebrates, yeast and bacteria. EhPGAM showed high similarity (54–64%) to 2,3 bisphosphoglycerate (2,3BPG)-

Table 1. Percentages of identity and similarity of the amino acid sequences of the *Entamoeba histolytica* glycolytic enzymes. ALDO class II, fructose-1,6-bisphosphate aldolase class II; ENO, enolase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HK, hexokinase; HPI, hexose-6-phosphate isomerase; PGAM, phosphoglycerate mutase; PGK, phosphoglycerate kinase; PPDK, pyruvate phosphate dikinase; PPi-PFK, pyrophosphate-dependent phosphofructokinase; TPI, triosephosphate isomerase. The data shown were obtained from the BLASTP search of the gene name search tool for the *E. histolytica* genome database (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/eha1/>) and represent the highest percentages when comparing major phylogenetic groups.

Enzyme	Organisms	% Identity	% Similarity
HK	Human, type IV	30	52
HPI	Human	59	75
PPi-PFK	Plants, bacteria	46–56	63–73
ALDO class II	Bacteria, cyanobacteria, protozoa	60	80
TPI	Fungi, plants, human	49–56	64–69
GAPDH	Vertebrates, plants	66	76–80
PGK	Bacteria, yeast, vertebrates	46–57	63–70
PGAM	Plants, trypanosomatids, <i>Bacillus stearothermophilus</i>	36–46	54–64
ENO	Yeast, vertebrates	57–60	70–74
PPDK	Bacteria, plants	46–51	63–69

independent PGAMs (iPGAMs) from *Bacillus stearothermophilus*, some plants and trypanosomatids [30–32]. The typical molecular masses of the iPGAMs are 20 kDa higher than those of the cofactor-dependent PGAMs present in mammalian systems [33].

In the phylogenetic analysis described by Sanchez *et al.* [26], EhALDO clusters with class II fructose-1,6-bisphosphate [Fru(1,6) P_2] aldolases. Class II aldolases require a heavy metal (Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+}) as a cofactor and are found in bacteria, fungi and some protozoans, whereas class I aldolases do not require a metal cofactor and are present in bacteria, protozoa, animal and plant cells [34]. This analysis [26] indicates that EhALDO belongs to the class II aldolases, whereas EhPGAM can be grouped together with the iPGAMs. Of interest, from the perspective of drug development, is the fact that class II ALDO, iPGAM, and the PPi-dependent enzymes PPi-PFK and PPDK, are not found in human cells (Table 1).

Gene cloning, overexpression and purification of recombinant glycolytic enzymes

The genes of HK, HPI, PPi-PFK, ALDO, TPI, GAPDH, PGK, PGAM, ENO and PPDK were cloned and the proteins overexpressed and purified (Fig. 1). Densitometric analysis of the Coomassie blue-stained proteins showed a purity of 95–99% (Fig. 1). The usual yield was 1–3 mg of purified protein per 100 mL of bacterial culture.

Biochemical properties of amoebal glycolytic enzymes

Storage stability

To preserve the activity of the purified enzymes, several storage conditions were explored. The enzymes were stored in the presence of 50% (v/v) glycerol at either $-20\text{ }^\circ\text{C}$ or $4\text{ }^\circ\text{C}$, or in 3.2 M ammonium sulfate at $4\text{ }^\circ\text{C}$. All enzymes displayed the highest stability in 50% (v/v) glycerol at $-20\text{ }^\circ\text{C}$; the decay factor under this optimal storage condition is shown in Table 2. Most of the enzymes (EhHK, EhHPI, EhPPi-PFK, EhTPI, EhPGK, EhPGAM, and EhENO) retained 50% of their initial rate value for at least 2 months, showing a gradual reduction in activity thereafter. EhALDO was a relatively unstable enzyme; when purified using fresh metal affinity resin, it showed high activity and its decay could be partially prevented by the addition of 0.1 mM Fru(1,6) P_2 when stored. Purification of EhALDO using reused resin resulted in low activity and the production of highly unstable enzymes. EhGAPDH was purified and stored in the presence of 10 mM β -mercaptoethanol, which preserved its activity for at least 1 month, otherwise its activity decayed within days. Inactivation of recombinant EhPPDK by cold storage was previously observed during storage in 50 mM imidazole [11]. However by storing EhPPDK in 50% (v/v) glycerol at $-20\text{ }^\circ\text{C}$, a 50% increase in activity was recorded during the first month of storage. Glycerol might promote the oligomerization of PPDK to its tetrameric structure. All

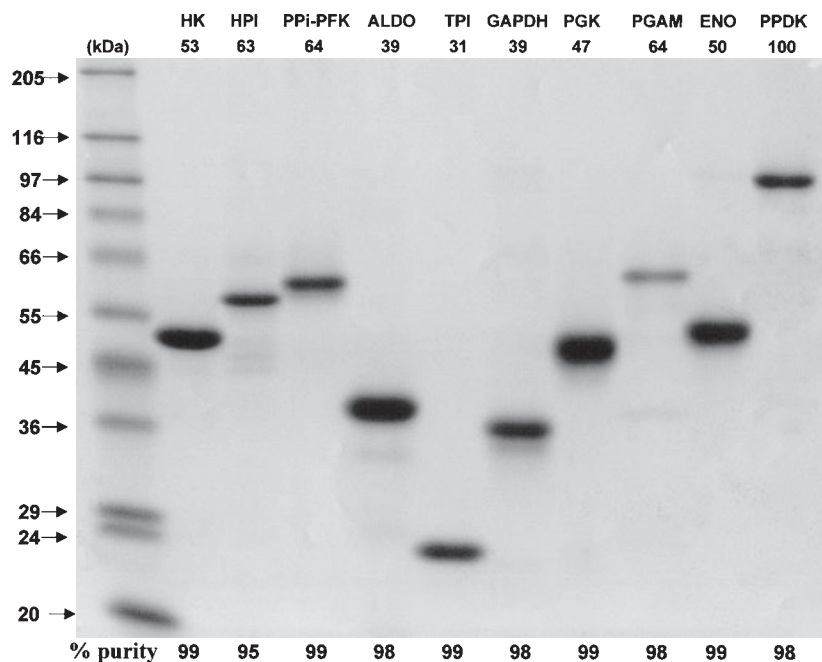


Fig. 1. SDS/PAGE showing the 10 recombinant purified *Entamoeba histolytica* glycolytic enzymes. The enzyme molecular mass indicated corresponds to that of the His₆-tailed protein plus the recognition peptide for thrombin cleavage digestion. The percentage purity was determined by densitometric analysis.

Table 2. Biochemical properties of *Entamoeba histolytica* glycolytic enzymes. ALDO class II, fructose-1,6-bisphosphate aldolase class II; ENO, enolase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HK, hexokinase; HPI, hexose-6-phosphate isomerase; PGAM, phosphoglycerate mutase; PGK, phosphoglycerate kinase; PPDK, pyruvate phosphate dikinase; PPI-PFK, pyrophosphate-dependent phosphofructokinase; TPI, triosephosphate isomerase. ND, not determined.

Enzyme	Decay factor t_{50} (months) ^a	pH optimum forward reaction	Interval ^b reverse reaction	Quaternary structure ^c
HK	2	6.5–7.5	Irreversible	Dimer
HPI	8	6.5–8.0	7.5–9.0	Dimer
PPI-PFK	2	6.8–7.4	6.0–8.0	Dimer
ALDO	2	7.0–7.5	ND	Tetramer
TPI	2	≈ 7.0 ^d	7.5–8.2	Dimer
GAPDH	1	7.3–7.6	5.8–6.7	Tetramer
PGK	> 6	7.3–7.6	5.5; 8.5 ^e	Dimer
PGAM	> 2	5.8–6.2	≈ 7.0 ^d	Monomer
ENO	3	6.5–7.7	≈ 6.0 ^d	Tetramer
PPDK	3	5.8–6.4	≈ 7.0 ^d	Tetramer

^a The decay factor was determined in samples stored in 50% (v/v) glycerol at -20°C at the following average concentrations (expressed as $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$): HK, 0.4; HPI, 0.34; PPI-PFK, 0.11, ALDO, 0.32; TPI, 0.18; GAPDH, 0.27; PGK, 0.4; PGAM, 0.15; ENO, 0.35; and PPDK, 0.14. ^b The pH interval where the enzyme displays > 95% V_{max} . ^c The number of subunits determined by using FPLC sieve chromatography. ^d The pH values tested were 6.0, 7.0 and 8.0. ^e The pH curve displayed two peaks of activity at pH values of 5.8 and 8.0.

enzymes were stored at very dilute concentrations (0.15–0.4 mg of protein per mL) in glycerol. Hence, the storage stability might be improved by using more concentrated protein solutions. This was not explored.

pH dependency

A few enzymes exhibited broad ranges of optimum pH (EhHK forward, EhHPI forward and reverse, EhPPI-PFK reverse and EhENO forward reactions), although most displayed a narrow pH range at around neutral pH (Table 2). The pH dependencies of HK [15], PPI-PFK [10] and TPI [20] recombinant enzymes were similar to those previously reported. In contrast, the optimal pH values for the human enzymes are displaced towards the pH range from 7 to 10 (cf. BRENDA enzyme database <http://www.brenda.uni-koeln.de>).

Quaternary structure

The oligomeric structures of EhPPI-PFK, EhPPDK, and EhTPI were in agreement with those previously reported [10,11,20] (Table 2). The number of subunits of the active forms of seven amoebal glycolytic

enzymes, not previously described (HK, HPI, ALDO, GAPDH, PGK, PGAM, ENO), was also determined (Table 2) by considering the molecular mass shown in Fig. 1. A comparison with the oligomeric structure of their homologues found in the enzyme database BRENDA demonstrated that EhHK (dimer), EhHPI (dimer), and EhGAPDH (tetramer) have the same subunit composition as their counterparts. EhPGAM displayed a monomeric structure similar to the few iPGAMs described in the literature [30,33]. EhALDO was a tetramer, whereas the few class II aldolases reported are dimers, with the exception of the tetrameric ALDO from the bacterium *Thermus aquaticus* [35]. EhPGK showed a dimeric structure: only one dimeric structure for a PGK enzyme (for that found in *Pyrococcus woesei* enzyme) has been described [36]; all other PGK enzymes available in the BRENDA database are monomers. EhENO displayed a four-subunit structure, while vertebrate, plants and *Escherichia coli* ENOs are dimers, and those of some bacteria are octamers [37].

Kinetic characterization

The kinetic parameters reported for some amoebal glycolytic enzymes have been determined at pH values of 7–8 and at temperatures of 25–30 °C. However, another report states that the *E. histolytica* cytosolic pH could be very similar to that of the medium in which it is cultured (pH 6.5) [38]; thus, the cytosolic pH of amoebae living in the lumen of the intestine is uncertain. The rate of enzyme activity would be drastically affected by changes in pH. Moreover, an acidic cytosolic pH could modify, to some degree, the affinities of the enzymes for their substrates and products. For these reasons, the catalytic properties of the 10 amoebal glycolytic enzymes were determined under more physiological conditions. Thus, the kinetic parameters were measured at 37 °C, the temperature at which amoebas grow *in vitro* and in the host, and at optimal pH and at pH values of 6.0 and 7.0.

The V_{max} values of the His-tagged recombinant enzymes in the forward (glycolytic) direction (Table 3) were in agreement with those previously reported for the native or recombinant enzyme without His-tag HKs ($236 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$) [14,15] and PPI-PFK ($316 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$) [6,7,10]. For the other enzymes, the V_{max} values were well within the range of the most reported enzyme activities from other sources included in the BRENDA enzyme database (activities in $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$: HK, 144–200; ALDO, 2–20; GAPDH, 9–200; PGK, 600–700; iPGAMs, 100–500; and ENO, 50–100). Remarkably,

Table 3. Kinetic parameters of *Entamoeba histolytica* glycolytic enzymes at optimal and physiological pH values in the forward reaction. 1,3BPG, 1,3-bisphosphoglycerate; 2PG, 2-phosphoglycerate; 3PG, 3-phosphoglycerate; ALDO class II, fructose-1,6-bisphosphate aldolase class II; ENO, enolase; Fru(1,6)P₂, fructose-1,6-bisphosphate; Fru6P, fructose-6-phosphate; G3P, glyceraldehyde-3-phosphate; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Glc6P, glucose-6-phosphate; GrnP, dihydroxyacetone phosphate; HK, hexokinase; HPI, hexose-6-phosphate isomerase; PGAM, phosphoglycerate mutase; PGK, phosphoglycerate kinase; PPK, pyruvate phosphate dikinase; PPI, inorganic pyrophosphate; PPI-PFK, pyrophosphate-dependent phosphofructokinase; TPI, triosephosphate isomerase. M, mixed-type inhibitor; C, simple competitive inhibitor. The numbers in parenthesis indicate the number of independent enzyme preparations assayed.

Enzyme	Optimal pH	pH 7.0	pH 6.0
HK1			
V_{\max}^a	158 ± 62 (3) ^c	105 ± 13 (3)	86 ± 20 (3)
K_m Glu ^b	33 (2)	40 (2)	25 (2)
K_m ATP	84 (2)	77 (1)	121 ± 25 (3)
K_i AMP (M)	4.5 (1)	24 (1)	36 (2)
K_i ADP (C)	97 (1)	120 (1)	235 (1)
HPI			
V_{\max}	608 ± 107 (3) ^c	541 ± 187 (3)	392 ± 125 (3)
K_m Glc6P	750 (2)	660 ± 209 (3)	610 (2)
PPI-PFK			
V_{\max}	^d	298 (2)	112 (2)
K_m Fru6P		455 (2)	695 (2)
K_m PPI		50 (2)	380 (2)
ALDO			
V_{\max} (-CO ²⁺)	^d	24 ± 4 (3)	2.8 ± 1.4 (3)
V_{\max} (+CO ²⁺)		31 ± 10 (3)	15 (2)
K_m Fru(1,6)P ₂		4 (2)	28 ± 13 (4)
TPI			
V_{\max}	270 ± 108 (3) ^c	284 (2)	199 ± 91 (3)
K_m GrnP	1655 (2)	1400 (1)	445 (2)
GAPDH			
V_{\max}	^d	27 ± 1(3)	13 ± 4 (3)
K_m G3P		33 (2)	43 ± 17 (3)
K_m NAD ⁺		59 (1)	83 (2)
PGK			
V_{\max}	^d	628 ± 51 (6)	279 ± 90 (6)
K_m 1,3BPG		127 ± 29 (3)	125 (2)
K_m GDP		292 ± 96 (5)	40 ± 26 (3)
K_m ADP		3400 (1)	600 (1)
PGAM			
V_{\max}	^e	42 (2)	53 ± 3 (4)
K_m 3PG		500 ± 260 (3)	830 ± 400 (4)
ENO			
V_{\max}	^d	103 ± 23 (6)	89 ± 24 (6)
K_m 2PG		55 ± 1 (2)	60 (2)
PPDK			
V_{\max}	12 ^f	8 (2)	8.1 ± 2 (6)
K_m phosphoenolpyruvate	20	24 (1)	30 (1)
K_m AMP	5	20 (1)	2 (1)
K_m PPI	100	470 (1)	91 (1)

^a V_{\max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$). ^b K_m (μM); K_i (μM). ^c pH optimum 8.0; ^d pH optimum 7.0. ^e pH optimum 6.0. ^f Data from [11]; pH optimum 6.3.

at pH 7.0, EhPPDK had the slowest rate of activity (i.e. the lowest V_{\max} value) followed by EhALDO (in the absence of added heavy metals) and EhGAPDH. In general, ALDO (both class I and class II) are among the enzymes with the slowest rates of activity in typical glycolytic pathways (with ATP-PFK instead of PPI-PFK and PYK instead of PPK). At pH 6.0, the V_{\max} values of amoebal PGAM and PPK showed a slight increase, those of HK, HPI, TPI and ENO were relatively unchanged, and those of PPI-PFK, ALDO, GAPDH and PGK decreased by 12–50%, with ALDO (in the absence of heavy metals) now having the slowest rate of activity, followed by PPK and GAPDH.

In the reverse reaction (Table 4), EhPGK, EhPGAM, EhENO and EhPPDK showed V_{\max} values that were lower than in the forward reaction. The EhGAPDH V_{\max} value of the reverse reaction was almost twice as high as that of the forward reaction. The EhTPI V_{\max} value was almost 40 times higher in the reverse reaction than in the forward reaction. TPI is one of the most efficient catalysts in nature in its reverse reaction, although its rate in the forward reaction was similar to that of the other glycolytic enzymes. The presence of the His-tag affected the EhTPI rate in the reverse reaction, as previously noted [20]; however, the K_m values were not altered (see below). EhHPI, EhPPI-PFK and EhALDO exhibited similar rates in both directions, and the EhHPI rate in the reverse reaction was similar to values reported in the BRENDA database for HPIs from human, mice and spinach (500–1000 U·mg⁻¹).

In the forward direction, the most susceptible enzyme to pH change was EhALDO, with an eightfold decrease in its V_{\max} value when the pH was decreased from 7.0 to 6.0 in the absence of added cobalt (Table 3). However, in the presence of 0.2 mM CoCl₂, only a 50% decrease in V_{\max} was observed at pH 6.0. In the reverse reaction, the most susceptible enzymes were HPI and TPI, which showed a decrease of almost 30% in their V_{\max} values when the pH was decreased from 7.0 to 6.0 (Table 4). Omission of acetate and imidazole from the reaction buffer did not alter the V_{\max} values of the recombinant enzymes (see Tables 3 and 4), except for a slight stimulatory effect on the PGAM V_{\max} (15%) and a threefold higher ALDO V_{\max} in the absence of added heavy metal (as expected by the removal of a chelating agent).

The K_m values for the substrates in the forward and reverse reactions of the 10 recombinant enzymes (Tables 3 and 4, respectively) were also within the same order of magnitude as those already described for *E. histolytica*. At pH 6.0, the 2.6-times lower K_m

Table 4. Kinetic parameters of *Entamoeba histolytica* glycolytic enzymes at optimal and physiological pH values in the reverse reaction. ND, not determined. 1,3BPG, 1,3-bisphosphoglycerate; 2PG, 2-phosphoglycerate; 3PG, 3-phosphoglycerate; ALDO class II, fructose-1,6-bisphosphate aldolase class II; ENO, enolase; Fru(1,6) P_2 , fructose-1,6-bisphosphate; Fru6P, fructose-6-phosphate; G3P, glyceraldehyde-3-phosphate; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GrnP, dihydroxyacetone phosphate; HK, hexokinase; HPI, hexose-6-phosphate isomerase; PGAM, phosphoglycerate mutase; PGK, phosphoglycerate kinase; PPK, pyruvate phosphate dikinase; Pi, inorganic phosphate; PPI-PFK, pyrophosphate-dependent phosphofructokinase; TPI, triosephosphate isomerase. The numbers in parenthesis indicate the number of independent enzyme preparations assayed.

Enzyme	Optimal pH	pH 7.0	pH 6.0
HK	Irreversible		
HPI			
V_{max}	620 ± 92 (4) ^a	284 ± 91 (3)	182 ± 32 (3)
K_m Fru6P	480 ± 63 (3)	130 (1)	460 ± 30 (3)
PPI-PFK			
V_{max}	^b	392 (1)	338 (1)
K_m Fru(1,6) P_2		124 (2)	109 (2)
K_m Pi		1440 (1)	2300 (1)
ALDO			
V_{max}	ND	29 (1)	34 (2)
K_m G3P		108 (1)	210 (2)
K_m GrnP		105 (1)	264 (2)
K_i G3P		ND	1920 (1)
TPI			
V_{max}	3364 ± 702 (4) ^a	1697 ± 891 (4)	1096 ± 312 (4)
K_m G3P	830 (2)	740 (1)	320 (2)
GAPDH			
V_{max}	^c	36 ± 9 (3)	40 ± 18 (3)
K_m 3PG		246 (2)	570 (2)
K_m 1,3BPG		10	16
K_m NADH		ND	ND
PGK			
V_{max}	^b	87 (2)	62 (2)
K_m 3PG		570 (2)	505 (2)
K_m GTP		75 (2)	61 (2)
K_m ATP		3300 (2)	1840 (1)
PGAM			
V_{max}	^b	13 (1)	6 (1)
K_m 2PG		66 (1)	106 (1)
ENO			
V_{max}	^b	26 (1)	33 (1)
K_m phosphoenolpyruvate		63 (1)	102 (1)
PPDK			
V_{max}	^b	2.3 (2)	1.5 (2)
K_m pyruvate		68 (1)	305 (1)
K_m ATP		ND	284 (1)

^a pH optimum 8.0; ^b pH optimum 7.0. ^c pH optimum 6.0.

for glyceraldehyde-3-phosphate (G3P) of TPI compared well to the values of 0.83 mM (Table 4) and 0.67 mM reported for the untagged protein at pH 7.4 [20]. Determination of the ENO K_m for 2-phospho-

glycerate (2PG) and of the ALDO K_m for Fru(1,6) P_2 in amoebal extracts yielded values identical to those obtained with the recombinant enzymes. Similar K_m values of PPK for its three substrates, obtained using amoebal extracts and recombinant enzyme, have also been previously reported [13]. Therefore, the presence of the His-tag in at least some recombinant enzymes did not affect their kinetic parameters.

It is noteworthy that although EhALDO, and, in general, fructose bisphosphate aldolases, have the slowest rates of enzymes in glycolysis (Table 3), they show the highest affinities for their substrate Fru(1,6) P_2 (amoebal, 4 μ M; other organisms 1–10 μ M) and are among the most abundant glycolytic enzymes in most cells, for example in skeletal muscle [39] and *Trypanosoma brucei* parasite [40]. As previously described for other aldolases [34], EhALDO showed substrate inhibition in the reverse reaction at high concentrations of G3P, with a K_i of 1.9 mM. As reported by Reeves [21], EhPGK displayed an affinity for GDP that was one order of magnitude higher than its affinity for ADP (Table 3), suggesting that EhPGK preferentially generates GTP instead of ATP. GTP may be used directly for protein and nucleic acid synthesis or signal transduction processes; moreover, activity of a nucleoside diphosphokinase could readily transphosphorylate GTP to ADP to produce ATP. In contrast, EhPGK might use ADP only if the *in vivo* ADP concentration is higher than that of GDP.

The decrease in V_{max} of amoebal TPI and PGK at pH 6.0 in comparison to pH 7.0 was compensated by the three- to sevenfold increase in affinity for their corresponding substrates [dihydroxyacetone phosphate (GrnP) and GDP, respectively]. Strikingly, the opposite was observed for ALDO, where the lower V_{max} at pH 6.0 was accompanied by a higher K_m value for Fru(1,6) P_2 , suggesting that this enzyme might be a flux-controlling site of glycolysis when the amoebal cytosol becomes acidic and the substrate, heavy metal, or enzyme concentration is limiting. Furthermore, a twofold increase in the K_m of EhPGAM for 3PG at pH 6.0 was observed, suggesting that this enzyme may represent another potentially rate-controlling step in amoebal glycolysis.

Modulators

AMP and ADP were strong-mixed and competitive-type inhibitors of EhHK activity, respectively. The K_i values at pH 6.0 from Dixon (1/v vs. [I]) [41] and Cornish-Bowden (S/v vs. [I]) [42] plots (Table 3) were four- to sixfold higher than those at pH 8.0 for the

natural and recombinant enzymes (0.65–8 μM for AMP and 36–45 μM for ADP) [14,15]. However, the K_i values for AMP and ADP of our recombinant HK at pH 8.0 were indeed similar to those described previously. A slight mixed-type inhibitory effect by Glc6P ($K_i > 1 \text{ mM}$) was observed at low glucose concentrations.

To test whether EhALDO displayed characteristics similar to those of its metallo-aldolase homologues, the effect of Zn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} and Mn^{2+} , which are known activators of class II aldolases [34], was determined. CoCl_2 (30 μM) increased, by a factor of 4.5, the activity of an EhALDO enzyme purified on reused metal-affinity resin, whereas the activity was doubled by this metal with an enzyme purified on fresh resin. In the presence of 0.1 mM EDTA, EhALDO activity was abolished, but fully restored by the further addition of 0.2 mM CoCl_2 (data not shown). A twofold activation of EhALDO was induced by 60 μM Zn^{2+} , 0.5 mM Cd^{2+} or 0.5 mM Mn^{2+} ; higher metal concentrations were inhibitory (data not shown). Thus, these results established that EhALDO belongs to the class II aldolases because it requires a heavy metal ion for enzymatic activity.

EhGAPDH was specific for NAD^+ ; in the presence of 0.5 mM NADP^+ , no reaction was detected (data not shown). EhPGAM was not activated by 2,3BPG up to a concentration of 0.5 mM (data not shown), which indicates that this enzyme belongs to the cofactor-independent group, supporting the conclusion (see above) drawn from its amino-acid sequence.

Most enolases are activated by low concentrations of monovalent or divalent cations, but inhibited by higher concentrations of these cations [43]. EhENO was inactive in the absence of Mg^{2+} . Its activity was maximal with 5 mM MgCl_2 , while higher concentrations (20 mM) inhibited by 50%. With 1 mM MnCl_2 , only 20% of the activity observed with 5 mM Mg^{2+} was achieved; 5 mM Mn^{2+} inhibited by 50%. With 0.5 mM CoCl_2 , 50% of the activity with 5 mM Mg^{2+} was achieved, whereas 1 mM Co^{2+} inhibited by 50%. KCl and NaCl (40 mM) inhibited by 25 and 50% the EhENO activity, respectively. During storage stability experiments, EhENO was activated by 60% after 1 week of storage in 3.2 M ammonium sulfate at 4 °C. This was followed by a faster reduction in activity (60%) during the next 3–4 weeks in comparison to the sample stored in 50% (v/v) glycerol at –20 °C, which maintained 50% of the initial activity after 3 months (Table 2). This inactivation was probably caused by the known effect of ammonium in subunit dissociation of EhENO [43].

Comparison of the catalytic efficiencies for amoebal glycolytic enzymes

The k_{cat}/K_m ratio, usually called the catalytic efficiency or specificity constant [42], allows the comparison of kinetic properties among enzymes, as it involves their catalytic capacities as well as their substrate and product affinities. Such a comparison of catalytic efficiencies, instead of solely V_{max} or K_m values, may provide further information about the enzymes that control the pathway flux. Thus, in a hypothetical pathway in which the concentration of the enzymes is similar and the stoichiometry of the reactions identical (or the concentration of the coupling metabolites – NADH/NAD^+ or ATP/ADP – is saturating), knowledge of the k_{cat}/K_m ratios may help to determine the distribution of flux control. However, a more strict and physiological kinetic parameter is the V_{max}/K_m ratio, which includes the enzyme concentration ($V_{\text{max}} = K_{\text{cat}}[\text{E}]_{\text{total}}$). This is of physiological relevance when V_{max} is experimentally determined in cellular extracts instead of in purified recombinant enzyme. Further explanation of the V_{max}/K_m ratio can be found in Northrop [44].

Kacser & Burns [45] derived an equation (Eqn 1) for ratios of flux control coefficients of unsaturated enzymes of a linear pathway, in terms of catalytic efficiencies:

$$C_1 : C_2 : C_3 : \dots \equiv [(K_{m1}/V_{\text{max}1}) : (K_{m2}/V_{\text{max}2} K_{\text{eq}1}) : (K_{m3}/V_{\text{max}3} K_{\text{eq}1} K_{\text{eq}2}) : \dots] \quad (\text{Eqn 1})$$

Thus, there is a tendency for enzymes with lower catalytic efficiencies (and lower concentrations) to have the highest flux control coefficients. However, as emphasized by Kacser & Burns [45], catalytic efficiencies are not, by themselves, a proper measure of flux control coefficients i.e. no single kinetic parameter necessarily determines a given flux control. Equation 1 of catalytic efficiency ratios represents the correct formulation, which also involves the equilibrium constants. By using the simplified Haldane expressions for unsaturated enzymes [$v = (V_f/K_m)(\text{S-P}/K_{\text{eq}})$], in which V_f represents the maximal forward rate, Eqn 1 yields equivalent equations in terms of either steady-state intermediary pools or disequilibrium ratios [45].

Heinrich & Rapoport [46] derived a complex equation for determining single flux control coefficients that also involves catalytic efficiencies of the forward and reverse reactions and the equilibrium constants:

$$C_i = \frac{k_z \left(\frac{V_f}{K_s} - \frac{V_r}{K_p} \right)_i^{-1} (1 + K_{\text{eq}i}) \prod_{j=i+1}^n K_{\text{eq}j}}{1 + k_z \sum_{k=1}^n \left(\frac{V_f}{K_s} - \frac{V_r}{K_p} \right)_k^{-1} (1 + K_{\text{eq}k}) \prod_{j=k+1}^n K_{\text{eq}j}}$$

in which V_f and V_r represent the maximal forward and reverse rates, K_s and K_p are the Michaelis constants for substrate s and product p , and k_z is the first-order rate constant of the last irreversible step.

The values of the flux control coefficients may also be determined from the elasticity coefficients [$\varepsilon_S^{Ei} = (\delta v / \delta S)(S/v)$] of the enzymes (Ei) towards their substrates (S) and products [23]. The relationship between ε_S^{Ei} and V_{max}/K_m ratios can be visualized from considering that, for instance, the irreversible Michaelis–Menten equation can be expressed as $v = (V_{max}/K_m) S/(1 + S/K_m)$, in which V_{max} and V_{max}/K_m are the fundamental kinetic constants and K_m is, in fact, a derived parameter determined by their ratio [44].

In the glycolytic direction, EhPGAM was the less efficient enzyme in the pathway at both pH 6.0 and 7.0, followed by EhALDO (at pH 6.0 but not at pH 7.0 or in the presence of Co^{2+}), GAPDH and, surprisingly, TPI (Table 5). EhPPDK was also one of the less efficient enzymes when considering the PPI moiety. However flux control by these enzymes may be decreased if their cellular contents are higher than those of the other pathway enzymes.

Remarkably, the catalytic efficiencies displayed by EhHK, PPI-PFK and EhPPDK (for phosphoenolpyruvate) were relatively high. This suggests that these enzymes would not be rate controlling for the glycolytic flux (a) unless the inhibition by AMP and ADP on the EhHK activity has physiological significance and (b) if the PPI concentration is limiting for the PPI-PFK and PPDK activities.

The values of the catalytic efficiencies in the reverse reaction were lower than those in the forward reaction (Table 6), suggesting that the glycolytic direction is kinetically favored under physiological conditions. Moreover, there is no evidence of a gluconeogenic pathway in *E. histolytica* trophozoites [3].

***In vitro* reconstruction of the final stages of amoebal glycolysis**

Analysis of the kinetic properties of the recombinant glycolytic enzymes indicated that EhPPDK and EhPGAM had the slowest activity and were the least efficient enzymes of the final section of the glycolytic pathway, when analysed at pH 7.0. Moreover, they are

Table 5. k_{cat} and catalytic efficiency parameters at optimal and physiological pH values of *Entamoeba histolytica* glycolytic enzymes in the forward reaction. 1,3BPG, 1,3-bisphosphoglycerate; 2PG, 2-phosphoglycerate; 3PG, 3-phosphoglycerate; ALDO class II, fructose-1,6-bisphosphate aldolase class II; ENO, enolase; Fru(1,6) P_2 , fructose-1,6-bisphosphate; Fru6P, fructose-6-phosphate; G3P, glyceraldehyde-3-phosphate; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Glc6P, glucose-6-phosphate; GrnP, dihydroxyacetone phosphate; HK, hexokinase; HPI, hexose-6-phosphate isomerase; PGAM, phosphoglycerate mutase; PGK, phosphoglycerate kinase; PPDK, pyruvate phosphate dikinase; PPI, inorganic pyrophosphate; PPI-PFK, inorganic pyrophosphate-dependent phosphofructokinase; TPI, triosephosphate isomerase.

Enzyme	Substrate	Optimal pH		pH 7.0		pH 6.0	
		k_{cat}^a	k_{cat}/K_m^b	k_{cat}	k_{cat}/K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m
HK1	Glu	279 ^c	8.5	186	4.7	152	6.1
	ATP		3.3		2.4		1.3
HPI	Glc6P	1288 ^c	1.7	1146	1.7	830	1.4
PPI-PFK	Fru6P	^d		626	1.4	235	0.34
	PPI				13		0.62
ALDO	Fru(1,6) P_2	^d					
	(– Co^{2+})			62	16	7.2	0.26
	(+ Co^{2+})			80	20	39	1.4
TPI	GrnP	279 ^d	0.17	293	0.2	206	0.46
GAPDH	G3P	^d		70	2.1	34	0.79
	NAD+				1.2		0.41
PGK	1,3BPG	^d		984	7.7	437	3.5
	GDP				3.4		11
	ADP				0.29		0.73
PGAM	3PG	^e		45	0.09	57	0.07
ENO	2PG	^d		170	3.1	147	2.5
PPDK	Phosphoenolpyruvate	80	4	53	2.2	87	1.8
	AMP		16		2.7		27
	PPI		0.8		0.1		0.59

^a Turnover numbers (k_{cat} , s^{-1}) were estimated from the calculated molecular masses (Table 2 and Fig. 1) and V_{max} values (Table 3).

^b [$(k_{cat}/K_m) \times 10^6$, $M^{-1} \cdot s^{-1}$]. ^c pH optimum 8.0; ^d pH optimum 7.0; ^e pH optimum 6.0.

Table 6. k_{cat} and catalytic efficiency parameters at optimal and physiological pH values of *Entamoeba histolytica* glycolytic enzymes in the reverse reaction. ND, not determined. 1,3BPG, 1,3-bisphosphoglycerate; 2PG, 2-phosphoglycerate; 3PG, 3-phosphoglycerate; ALDO class II, fructose-1,6-bisphosphate aldolase class II; ENO, enolase; Fru(1,6) P_2 , fructose-1,6-bisphosphate; Fru6P, fructose-6-phosphate; G3P, glyceraldehyde-3-phosphate; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GrnP, dihydroxyacetone phosphate; HK, hexokinase; HPI, hexose-6-phosphate isomerase; PGAM, phosphoglycerate mutase; PGK, phosphoglycerate kinase; PPK, pyruvate phosphate dikinase; PPI, inorganic pyrophosphate; PPI-PFK, pyrophosphate-dependent phosphofructokinase; TPI, triosephosphate isomerase.

Enzyme	Substrate	Optimal pH		pH 7.0		pH 6.0	
		$k_{\text{cat}}^{\text{a}}$	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}^{\text{b}}$	k_{cat}	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$	k_{cat}	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$
HK1		Irreversible	Irreversible				
HPI	Fru6P	1313 ^c	2.7	601	4.6	385	0.84
PPI-PFK	Fru(1,6) P_2		^d	823	6.6	710	6.5
	PPI				0.57		0.31
ALDO	G3P	ND		75	0.69	87	0.41
	GrnP				0.71		0.33
TPI	G3P	3476 ^c	4.2	1753	2.4	1132	3.5
GAPDH	3PG		^e	94	0.38	104	0.18
	1,3BPG				9.4		6.5
PGK	3PG		^d	136	0.24	97	0.19
	GTP				1.8		1.6
	ATP				0.04		0.053
PGAM	2PG		^d	14	0.21	6.4	0.060
ENO	Phospho $enol$ pyruvate		^d	43	0.7	55	0.54
PPDK	Pyruvate		^d	15	0.22	10	0.033
	ATP				ND		0.035

^a Turnover numbers (k_{cat} , s^{-1}) were estimated from the calculated molecular masses (Table 2 and Fig. 1) and V_{max} values (Table 4).

^b [$(k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$]. ^c pH optimum 8.0; ^d pH optimum 7.0; ^e pH optimum 6.0.

among the enzymes with the lowest affinities for their substrates (PPI and 3PG, respectively). These findings suggest that EhPPDK and EhPGAM might exert significant flux control on the final stages of amoebal glycolysis. This is in contrast to other reconstituted glycolytic systems for which PGAM has been considered to be a noncontrolling step [17,47].

To test this hypothesis, the final stages of the glycolytic pathway, responsible for the conversion of 3PG into pyruvate, was reconstituted *in vitro*. To reach a steady-state rate, the formation of pyruvate was coupled to (commercial) lactate dehydrogenase (LDH), and the rate of NADH consumption by LDH was measured. Although a steady-state rate of NADH oxidation was achieved, we are aware that the system was not under true steady-state conditions, as there was net accumulation of the products ATP and P_i (and NAD^+ and lactate) and net consumption of the substrate 3PG.

Preliminary experiments carried out to determine the metabolite concentrations under steady-state conditions in amoebal trophozoites incubated in the presence of external glucose, reported the following concentrations of metabolites: phospho $enol$ pyruvate, not detectable; AMP, 3.3 mM; pyruvate, 1 mM; ATP, 1 mM; and 2PG, 0.18 mM. The concentrations of other metabolites in this part of the pathway have previously

been reported (phospho $enol$ pyruvate, 0.8 mM and PPI, 0.4 mM); however, in this experiment the glycolytic flux was not under steady-state conditions [48].

The flux control coefficients (C_{Ei}^{J}) of amoebal PGAM, ENO and PPK (as well as commercial LDH) were determined from the dependence on the enzyme concentration of measured steady-state flux rates at pH 7.0 (Fig. 2). The selected relative enzyme activities to estimate flux control were 1 for PGAM, 7.5 for ENO, and 1.6 for PPK (see the legend to Fig. 2 for absolute values). Indeed, the PGAM, ENO and PPK activities in amoebal extracts at pH 7.0 and 37 °C were 85, 677 and 219 $\text{mU}\cdot\text{mg}^{-1}$ of protein, respectively. At saturating concentrations of PPI and 3PG, flux rates of 24–27 $\text{nmoles}\cdot\text{min}^{-1}$ were reached. Under these conditions, PPK and PGAM shared the flux control, with ENO (and LDH) exerting a negligible effect; ENO only exerted significant flux control when its concentration decreased to 25% of the initial value (Fig. 2).

Moreover, at a nonsaturating and more physiological concentration of 3PG (0.4 mM), the flux rate decreased to 16 $\text{nmoles}\cdot\text{min}^{-1}$; PGAM exerted most of the flux control (0.66), but PPK still showed a significant flux control coefficient (0.38) (data not shown). The same analysis with a saturating concentration of 3PG at pH 6.0 showed flux rates of

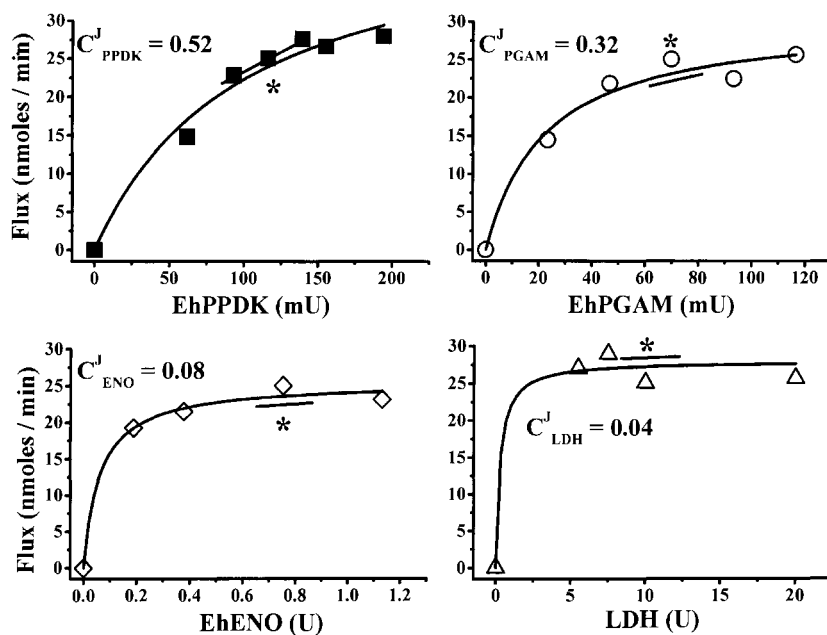


Fig. 2. Effect of enzyme concentration on flux through the final stages of *Entamoeba histolytica* glycolysis in a reconstructed system at pH 7.0. The assay conditions are described in the Experimental procedures. When varying the concentration of one enzyme, the concentration and activity of the others were kept constant at the following units: phosphoglycerate mutase (PGAM), 70 mU (pH 6.0); enolase (ENO), 753 mU (pH 7.0); pyruvate phosphate dikinase (PPDK), 116 mU (pH 6.0) and lactate dehydrogenase (LDH), 10 U (pH 7.0). The asterisk indicates the experimental point at which the flux control coefficient was determined.

48–50 nmoles·min⁻¹, while the flux control coefficients of PGAM and PPDK were now 0.24 and 0.4, respectively. The decrease in the flux control coefficient at pH 6.0 is in agreement with the pH dependency displayed by these enzymes, as their optimal pH values are close to 6.0.

The lower catalytic efficiency of PGAM in comparison to that of PPDK and ENO (Table 5) may be compensated for by an enhanced expression, which should promote a lower C^J_{PGAM} . To investigate this, the glycolytic final stages was reconstituted with a higher concentration of PGAM than of PPDK at pH 6. The control analysis showed C^J_{Ei} values of 0.08 and 0.2 for PGAM and 0.85 and 0.57 for PPDK at 10 and 39 mU of added PPDK, respectively. PGAM was 91 mU, ENO was 309 mU and LDH was 11 U; ENO exerted no flux control under these conditions.

Thus, it is proposed that PGAM and PPDK, together with TPI, might control glycolysis in *E. histolytica* at pH 7.0. Furthermore, PGAM, PPDK, ALDO (in the absence of heavy metals), and GAPDH may control the pathway flux at pH 6.0 (Table 5).

This proposal might be compromised if the intracellular concentration of these potentially controlling enzymes is higher than the rest of the pathway enzymes. The intracellular concentrations of all the intermediary metabolites should also be experimentally evaluated to establish, for instance, which enzymes are active at nonsaturating substrate concentrations and which enzymes undergo significant product inhibition. Experimental analysis of these aspects is currently being performed in our laboratories.

In addition, the importance of the amoebal glucose transporter, which was not studied in this work, cannot be ruled out. According to the theoretical model of the glycolysis control flux described for *T. brucei* [49], the glucose transporter shows the highest flux control coefficient of the pathway at physiological glucose concentrations or lower.

Discussion

This work describes, for the first time, the kinetic characterization of recombinant glycolytic enzymes involved in the pathway from glucose to pyruvate in *E. histolytica*. According to their catalytic efficiencies, several enzymes were identified as potential controlling steps of the glycolytic flux in amoebal trophozoites. Thus, EhPGAM and EhPPDK may be flux control steps at pH 7.0. If the amoebal cytosolic pH acidifies under some conditions, then PGAM and PPDK, together with ALDO and GAPDH, would share the control of glycolytic flux.

These results may have clinical implications because the amoebal ALDO (class II), iPGAM and PPDK are not present in the human host and are similar to those of their bacterial counterparts. Moreover, the flux control coefficients of EhPGAM, EhENO and EhPPDK, determined in an *in vitro* reconstituted system, established that PPDK and PGAM, but not ENO, may contribute significantly to control the flux in this part of the amoebal glycolysis pathway.

In this work, the kinetic properties of the enzymes were determined from purified enzymes, studied under

the same experimental conditions of temperature, pH and buffer composition and in the forward and reverse reactions. This allowed a realistic comparison to be made between the catalytic efficiencies of the pathway enzymes, which certainly overcomes the difficulties encountered when trying to compare kinetic data obtained under different assay conditions in different laboratories. This type of comparison has been made in only two other published reports – for the parasite *T. brucei* [49] and for *Saccharomyces cerevisiae* [50] – in which the datasets were used to build theoretical models of glycolytic flux control.

Similarly to the trophozoite stage of *E. histolytica*, the bloodstream stage of *T. brucei* relies on the ATP produced by glycolysis to support the cellular ATP needs, as this stage of parasite cannot carry out oxidative phosphorylation [51]. According to the theoretical model of control of glycolysis developed by Bakker *et al.* [49], which, to date, is the only one described for parasites, the control of flux resides mainly in the glucose transporter, followed by ALDO, GAPDH, PGK and glycerol-3-phosphate dehydrogenase. In *T. brucei*, HK, ATP-PFK and PYK exert essentially no flux control. By analogy, the glucose transporter in *E. histolytica* might contribute to control glycolytic flux; however, this was not analyzed in the present study. Such investigations can be carried out by using live trophozoites.

It has been proposed that a strategy for finding new drugs to treat diseases caused by several protist parasites is to exploit differences in the enzymes of key metabolic pathways, such as glycolysis, between the parasite and humans [52,53]. An alternative strategy is to look for enzymes in the parasite that are absent from human cells [54]. Metabolic control analysis provides quantitative information about the prospects of decreasing the flux of a metabolic pathway by inhibiting one or several of its enzymes. This is established by allowing identification of enzymes with the highest flux control coefficients, which, in turn, can be considered as the best candidates for drug design. Therefore, an ideal target enzyme should have a high flux control in the parasite and a low flux control in the host.

For *E. histolytica*, PPI-PFK and PPDK have been proposed as suitable therapeutic targets for drug design because of their absence in human cells [55–57]. At that time, it was not known whether PPI-PFK or PPDK might exert control of the glycolytic flux in the amoebal trophozoite. If PPI-PFK and PPDK contribute only to a small extent in the control of flux, then their inhibition needs to be almost complete to obtain a significant reduction of the flux to affect the energy metabolism of the parasite. Recently, PPI analogs have been synthesized that have shown strong effects on

parasite survival [58], although their molecular targets have not yet been identified. The analysis of the kinetic properties and the initial control flux analysis reported here suggest that PPDK, but not PPI-PFK, may indeed exert significant control of glycolytic flux in *E. histolytica*. Moreover, according to the results of the present work, ALDO, PGAM, PPDK, and GAPDH may also contribute, to some extent, to control the glycolytic flux in the parasite.

Experimental procedures

Database screening

Genomic searches were initially made in the TIGR *E. histolytica* genome database (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/cha1/>) using, as queries, amino-acid sequences of glycolytic enzymes from several sources, mostly bacteria and protozoa. Alignments were made by using the CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) and the BLAST search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) tools. In addition, gene name searches were made in the annotated release (28 January 2003) of the amoebal genome sequence project. The 10 glycolytic enzymes studied in this work were found in the database.

Gene cloning

Genomic DNA was purified from *E. histolytica* strain HM1:IMSS by using cetyltrimethylammonium bromide extraction according to the methodology described in the *Entamoeba* homepage (<http://homepages.lshmt.ac.uk/entamoeba/dnaisoln.htm>). Genes (except PPDK, see below) were amplified by PCR using amoebal genomic DNA as the template and oligonucleotides, based on the codons of the five amino acids, from the 5' and 3' ends of each gene. The primers contained restriction sites for *Nde*I, *Nhe*I or *Nco*I (5' end), and *Hind*III, *Bam*HI or *Xho*I (3' end), for cloning the genes into the expression vector. The PCR conditions were 95 °C for 5 min; 40 cycles of 1 min denaturation at 95 °C, 1 min annealing at 45–60 °C, and 1.5 min of extension at 72 °C; followed by a final incubation at 72 °C for 10 min. The PCR products were cloned by using the pGEM vector (Promega, Madison, WI, USA) and sequenced. No sequence alterations were found in the amplified genes compared to the annotated sequences from the genomic database. The complete ORFs were then transferred to the pET28 vector (Novagen, Madison, WI, USA) following digestion by the appropriate restriction enzyme for each gene. These constructs allowed the overexpression of proteins with a His-tag at their N terminus, except for TPI in which the His-tag was fused to the C terminus. To overexpress the enzymes, the resulting plasmids were used to transform *E. coli*

BL21DE3pLysS. The preparation and characterization of recombinant EhPPDK was as described previously [11].

Overexpression and purification of recombinant enzymes

One-hundred millilitres of LB (Luria–Bertani) [59] containing 30 µg·mL of kanamycin (for EhPPDK 100 µg·mL of ampicillin [11]) was inoculated with bacteria harboring the overexpression plasmids. Cultures were grown at 37 °C to an attenuation (*D*) of 0.6 at 600 nm, and then transferred to 25 °C overnight after induction of recombinant gene expression by the addition of 0.4 mM isopropyl thio-β-D-galactoside.

Bacteria were harvested and suspended in 10 mL of lysis buffer consisting of 100 mM triethanolamine/HCl, 300 mM NaCl, 2 mM imidazole, pH 7.4, and a complete EDTA-free protease inhibitors cocktail (Roche, Indianapolis, IN, USA). The purification procedure for ALDO, GAPDH and TPI enzymes was improved by adding 10 mM β-mercaptoethanol to the lysis buffer. The cells were lysed by sonication (five sonications, each of 1 min duration) in a water-ice bath. The homogenate was centrifuged at 12 000 *g*. Bacterial supernatants were added batch-wise to a TALON-metal affinity resin (Clontech, Palo Alto, CA, USA) previously equilibrated with lysis buffer. Three washes with lysis buffer were made; in the last wash, the resin containing the recombinant proteins was loaded into a gravity-flow column. The column was washed once with lysis buffer containing 10 mM imidazole. The proteins were eluted with lysis buffer containing 100 mM imidazole. The purified proteins were stored in 50% (v/v) glycerol at –20 °C or 4 °C, or in 3.2 M ammonium sulfate at 4 °C. Protein determination was carried out according to Lowry [60], using samples of purified enzymes precipitated by 13% (v/v) trichloroacetic acid in order to eliminate interference by imidazole buffer. The purity of recombinant protein was determined by densitometric analysis on 10% (w/v) SDS/PAGE gels [61] of protein samples (8 µg).

Molecular sizing

The native molecular weight of the *E. histolytica* recombinant glycolytic enzymes was determined by molecular exclusion chromatography using Fast Performance Liquid Chromatography equipment (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The enzymes (0.6–1.5 mg) were filtered through a column (56 × 1.7 cm) packed with Sephacryl S-200 previously equilibrated with 10 mM Hepes, pH 7.0. The column was calibrated with the following molecular mass standards (Amersham, Piscataway, NJ, USA): blue dextran (2 × 10⁶ Da), horse spleen ferritin (440 kDa), bovine liver catalase (232 kDa), rabbit muscle aldolase (158 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), bovine pancreas chymotrypsinogen A (25 kDa), bovine pancreas ribonuclease A

(13.7 kDa) and vitamin B12 (1.7 kDa). The distribution coefficient (K_{av}) was determined from the equation: $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$, where V_e is the elution volume of the protein, V_o is the column void volume [equivalent to the elution volume for blue dextran (59 mL)], and V_t is the total bed volume (127 mL). The elution volume was taken to be the average of the absorbance peak at 280 nm of enzymes eluted from the column, which corresponded to the highest peak of activity for each eluted enzyme.

Kinetic assays

Kinetic experiments were carried out by using modifications of previously described methodologies [62] in coupled assays in the forward and reverse reactions at 37 °C. The incubation buffer (buffer mix) was a mixture of 50 mM imidazole plus 10 mM each of acetate, Mes and Tris adjusted to the indicated pH value, except for the PGK forward and PPDK reverse reactions, in which 50 mM potassium phosphate was used. pH dependency experiments were carried out in the same buffer, but at different pH values (the pH was adjusted at intervals of 0.25–0.5). In experiments carried out at low or high pH values, care was taken that the activities of the coupling enzymes were not limiting and that, during the period of the assay (up to 1–3 min), the enzyme stability was not affected. The reactions were started by the addition of specific substrate or enzyme, with no significant differences observed in the initial velocity rates, except for ALDO and GAPDH, where the reaction was started only by substrate addition to achieve longer linear initial velocities and to avoid the nonspecific oxidation of G3P, respectively. Controls were used to ensure that the reaction rate was a linear function of the enzyme concentration. K_m values were calculated by curve fitting to Michaelis–Menten or substrate-inhibition equations by using the ORIGIN MICROCAL program. The kinetic assays for each enzyme are described, in detail, below.

Optimal kinetic assay conditions at 37 °C

EhHK Forward

pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 1 mM NADP⁺, 1–2 U Glc6P dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* (Roche), 1 mM glucose, 0.3 mM ATP and the reaction was started with 0.29–0.38 U EhHK. The K_m values for glucose and ATP were determined by varying the concentrations between 0.01 and 5 mM, and 0.01 and 1 mM, respectively. Inhibition experiments by AMP or ADP vs. ATP were carried out in this assay medium by varying the concentration of AMP and ADP between 0 and 0.6 mM at several fixed concentrations of ATP between 0.04 and 0.4 mM. In experiments to test Glc6P inhibition, the coupling system was 3 U PYK-LDH (Roche), 0.3 mM NADH and 2 mM phosphoenolpyruvate at varying concentrations of glucose and

Glc6P. The K_i values were determined from Dixon [41] and Cornish-Bowden plots [42].

EhHPI Forward

The reaction was started by adding 0.16–0.2 U EhHPI to several different concentrations of Glc6P (0.1–7.5 mM) in 1 mL of buffer, pH 8.0, and stopped after 1 min by the addition of 2 mL of concentrated HCl. The formation of Fru6P was detected with resorcinol [63], using Fru6P as the standard. The rate was corrected for the color development occurring in the absence of enzyme. The forward reaction was also assayed with a coupled enzymatic assay, which consisted of buffer mix, pH 7.0, 10 mM MgCl₂, 0.15 mM NADH, 1 mM EDTA, 1–1.5 U EhPPI-PFK, 0.36–0.45 U aldolase (Roche), 1.5–3 U glycerol-3-phosphate dehydrogenase, 4.5–9 U TPI (Roche), 1 mM PPI and Glc6P concentrations between 0.1 and 8 mM. The reaction was started by the addition of 0.19–0.23 U EhHPI.

EhHPI Reverse

pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM NADP⁺, 2 U Glc6P dehydrogenase and 5 mM Fru6P, starting the reaction with 0.19–0.23 U EhHPI. To determine the K_m value, the concentration of Fru6P was varied between 0.1 and 8 mM.

EhPPI-PFK Forward

pH 7.0, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0.15 mM NADH, 1.5–3 U glycerol-3-phosphate dehydrogenase, 4.5–9 U TPI (Roche), 0.5–1.0 U aldolase (Roche), 1 mM PPI, and 1 mM Fru6P, starting the reaction with 0.04 U EhPPI-PFK. K_m values for Fru6P and PPI were determined by varying the concentrations between 0.01 and 1.0 and from 0.1 to 5 mM, respectively.

EhPPI-PFK Reverse

Buffer comprising 50 mM KH₂PO₄, pH 7.0 (buffer mix at pH 7.0 was used to determine the K_m for Pi), 5–15 mM MgCl₂, 1 mM NADP⁺, 2–4 U Glc6P dehydrogenase (Roche), 1.9–2.3 U EhHPI, and 1 mM Fru(1,6)P₂, starting the reaction with 0.03–0.04 U EhPPI-PFK. To calculate the K_m values, Fru(1,6)P₂ and Pi were varied between 0.004 and 1.5 mM and from 0.2 to 15 mM, respectively.

EhALDO Forward

pH 7.0, 0.15 mM NADH, with or without 0.2 mM CoCl₂, 1.5–3 U glycerol-3-phosphate dehydrogenase, 4.5–9 U TPI (Roche), and 0.5 mM Fru(1,6)P₂; the reaction was started by the addition of 0.044–0.2 U enzyme. The K_m value for Fru(1,6)P₂ was determined by varying its concentration

between 0.008 and 2 mM. The effect of heavy metals was determined in kinetic assays at pH 7.0 in the presence of 0.1 mM EDTA, by varying the concentration of the following divalent metals: CoCl₂, 0–1.2 mM; ZnSO₄, 0–3 mM; CdCl₂, 0–0.8 mM; and MnCl₂, 0–1 mM.

EhALDO Reverse

pH 6.0, 15 mM MgCl₂, 1 mM NADP⁺, 0.5 mM CoCl₂, 2–4 U Glc6P dehydrogenase; 6–8 U EhHPI, 0.5–1 U EhPPI-PFK, 10 mM Pi, 2 mM GrnP, 0.55 mM G3P and 0.044–0.2 U EhALDO. The addition of G3P started the reaction. To determine the K_m values, G3P was varied between 0.009 and 2.7 mM and GrnP between 0.05 and 3 mM.

EhTPI Forward

pH 8.0, 2.5 mM EDTA, 5 mM cysteine, 1 mM NAD⁺, 10 mM arsenate (AsO₄), 3.2–7.4 U GAPDH (Roche), 4 mM GrnP; the reaction was started with 0.04–0.07 U EhTPI. The K_m value was determined by varying the GrnP concentration between 0.1 and 3.0 mM.

EhTPI Reverse

pH 8.0, 2.5 mM EDTA, 0.15 mM NADH, 1.7–3.4 U glycerol-3-phosphate dehydrogenase (Roche), 3 mM G3P; the reaction was started by adding 0.24–0.43 U of enzyme. The K_m value was determined by varying the G3P concentration from 0.3 to 6.0 mM.

EhGAPDH Forward

pH 7.0, 5 mM cysteine, 1 mM NAD⁺, 10 mM AsO₄, 1 mM G3P; the reaction was started by the addition of 0.11–0.18 U EhGAPDH. The K_m value was determined by varying the G3P (0.07–2.0 mM) and NAD⁺ (0.01–1.5 mM) concentrations.

EhGAPDH Reverse

pH 6.0, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 20 mM cysteine, 0.15 mM NADH, 0.6 mM GTP, 2–4 U EhPGK, 5 mM 3PG; 0.24–0.4 U EhGAPDH were added to start the reaction. The concentrations of 3PG used to determine the K_m value varied between 0.1 and 10 mM; the concentration of 1,3BPG present at each concentration of 3PG was calculated by using a K_{eq} of 1320.

EhPGK Forward

pH 7.0, 50 mM potassium phosphate buffer plus 10 mM each of acetate, Mes and Tris, 5 mM MgCl₂, 2 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA, 0.7 mM NAD⁺, 1.6–3.2 U GAPDH,

1 mM GDP, 3 mM G3P, 0.1–0.15 U EhPGK. To determine the K_m value for G3P, the substrate was varied (0.02–3.0 mM) and the concentration of 1,3BPG present at each concentration of G3P was calculated by using a K_{eq} of 0.086. To determine the K_m values for the nucleotides, the concentrations of GDP were varied between 0.02 and 2.0 mM and those for ADP between 0.1 and 6 mM.

EhPGK Reverse

pH 7.0, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 2 mM dithiothreitol, 0.15 mM NADH, 1.6–3.2 U GAPDH, 0.6 mM GTP, 2 mM 3PG; 0.03–0.04 U EhPGK. To determine the K_m values for substrates, the following concentration ranges were tested: 3PG, 0.1–4.0 mM; GTP, 0.05–1.0 mM; and ATP, 0.5–7.0 mM.

EhPGAM Forward

pH 6.0, 5 mM MgCl₂, 0.2 mM NADH, 0.9 mM ADP, 2.5 U EhENO (or Enolase from Sigma, St. Louis, MO, USA), 1 U PYK/LDH (Roche), 5 mM 3PG; 0.11–0.13 U EhPGAM. Spurious PGAM contaminating activity from coupling EhENO or ENO (Sigma) enzymes was determined by setting up a parallel reaction without EhPGAM at each 3PG concentration assayed (0.04–10.0 mM).

The dependency of 2,3BPG was determined in this assay at concentrations of the cofactor up to 0.5 mM.

EhPGAM Reverse

pH 7.0, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 2 mM dithiothreitol, 0.15 mM NADH, 0.16 U EhPGK, 1.6 U GAPDH, 1 mM GTP, 1 mM 2PG. Spurious contaminating activity from EhPGK or GAPDH enzymes was subtracted during the first few seconds of the enzyme reaction, to avoid depletion of substrate before the addition of EhPGAM (0.025–0.029 U). To determine the K_m value, 2PG was varied from 0.02 to 1.0 mM.

EhENO Forward

pH 7.0, 5 mM MgCl₂, 0.15 mM NADH, 0.45 U PYK-LDH, 0.9 mM ADP, 1 mM 2PG. The reaction was started by the addition of 0.112–0.38 U EhENO. The substrate 2PG was varied between 0.025 and 1.0 mM to determine the K_m .

EhENO Reverse

pH 7.0, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 2 mM dithiothreitol, 0.15 mM NADH, 1 mM GTP, 0.25 mM phosphoenolpyruvate, 0.2 U EhPGAM, 1.2 U EhPGK, 1.6 U GAPDH; and 0.038–0.112 U EhENO. Phosphoenolpyruvate was varied (0.02–1.0 mM) to determine the K_m value.

EhPPDK Forward

pH 6.0, 10 mM MgCl₂, 0.15 mM NADH, 14 U LDH, 1 mM phosphoenolpyruvate, 0.09 mM AMP, 2 mM PPI. The reaction was started by the addition of 0.049–0.057 U EhPPDK. To determine the K_m values, the substrates were varied as follows: phosphoenolpyruvate, 0.01–2.0 mM; AMP, 0.01–0.5 mM; and PPI, 0.1–4.0 mM.

EhPPDK Reverse

Buffer comprising 50 mM potassium phosphate, pH 7.0, containing 10 mM each of acetate, Mes and Tris, 10 mM MgCl₂, 2 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA, and 0.2 mM NADH. The coupling enzymes were added at the following concentrations, taking into account the V_{max} in the reverse reaction at pH 7.0: 0.09 mU EhENO, 0.08 mU EhPGAM, 0.25 mU EhPGK, 3.2 U (forward reaction) GAPDH (Roche), 1 mM GTP, 2.1 mM ATP, 1 mM pyruvate. The reaction was started by the addition of 0.0022–0.0025 U PPDK. To determine the K_m value, pyruvate was varied between 0.02 and 2.0 mM.

***In vitro* reconstruction of the final stages of the glycolytic pathway**

The final stages of the glycolytic pathway comprising PGAM, ENO and PPDK (and LDH from rabbit muscle as a coupling enzyme) was reconstituted *in vitro* to determine their flux control coefficients. The assay reaction was carried out in buffer mix, pH 7.0, at 37 °C, including 10 mM MgCl₂, 0.5 mM AMP, 0.16 mM NADH, 2 mM PPI, and 11–28 U LDH (Roche); the reaction was started by the addition of 4 mM 3PG. Under these conditions, a steady-state rate of NADH oxidation was reached after 55–90 s and lasted for at least 1.5 to 3 min longer (depending on the enzyme concentration tested, with the longest transition and steady-state times at the lowest enzyme concentrations). The concentration of enzymes was varied around the specific activity determined in *E. histolytica* clarified extracts measured in the kinetic assay conditions described above.

Acknowledgements

We thank Alfonso Olivos for providing the *E. histolytica* trophozoites used for the purification of genomic DNA, and thank Dr Paul A. Michels for his critical review of the manuscript.

References

- Petri WA (2003) Therapy of intestinal protozoa. *Trends Parasitol* **19**, 523–526.

- 2 Samarawickrema NA, Brown DM, Upcroft JA, Thammapalerd N & Upcroft P (1997) Involvement of superoxide dismutase and pyruvate:ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. *J Antimicrob Chemother* **40**, 833–840.
- 3 Reeves RE (1984) Metabolism of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903. *Adv Parasitol* **23**, 105–142.
- 4 McLaughlin J & Aley S (1985) The biochemistry and functional morphology of the *Entamoeba*. *J Protozool* **32**, 221–240.
- 5 Reeves RE (1974) Glycolytic enzymes in *E. histolytica*. *Arch Med Res* **5**, 411–414.
- 6 Reeves RE, South DJ, Blytt HJ & Warren LG (1974) Pyrophosphate:D-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase. *J Biol Chem* **249**, 7737–7741.
- 7 Reeves RE, Serrano R & South DJ (1976) 6-Phosphofructokinase (pyrophosphate). *J Biol Chem* **251**, 2958–2962.
- 8 Reeves RE (1968) A new enzyme with the glycolytic function of pyruvate kinase. *J Biol Chem* **243**, 3202–3204.
- 9 Reeves RE, Menzies RA & Hsu DS (1968) The pyruvate-phosphate dikinase reaction. *J Biol Chem* **243**, 5486–5491.
- 10 Deng Z, Huang M, Singh K, Albach RA, Latshaw SP, Chang KP & Kemp RG (1998) Cloning and expression of the gene for the active PPI-dependent phosphofructokinase of *Entamoeba histolytica*. *Biochem J* **329**, 659–664.
- 11 Saavedra-Lira E, Ramírez-Silva L & Pérez-Montfort R (1998) Expression and characterization of recombinant pyruvate phosphate dikinase from *Entamoeba histolytica*. *Biochim Biophys Acta* **1382**, 47–54.
- 12 Chi AS, Deng Z, Albach RA & Kemp RG (2001) The two phosphofructokinase gene products of *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem* **276**, 19974–19981.
- 13 Saavedra E, Olivos A, Encalada R & Moreno-Sánchez R (2004) *Entamoeba histolytica*: kinetic and molecular evidence of a previously unidentified pyruvate kinase. *Exp Parasitol* **106**, 11–21.
- 14 Reeves RE, Montalvo F & Sillero A (1967) Glucokinase from *Entamoeba histolytica* and related organisms. *Biochemistry* **6**, 1752–1760.
- 15 Kroschewski H, Ortner S, Steipe B, Scheiner O, Wiedermann G & Duchene M (2000) Differences in substrate specificity and kinetic properties of the recombinant hexokinases HXK1 and HXK2 from *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* **105**, 71–80.
- 16 Colowick SP (1973) The hexokinases. In *The Enzymes*, Vol. IX (Boyer PD, ed), pp. 1–48. Academic Press, New York.
- 17 Rapoport TA, Heinrich R & Rapoport SM (1976) The regulatory principles of glycolysis in erythrocytes *in vivo* and *in vitro*. A minimal comprehensive model describing steady states, quasi-steady states and time-dependent processes. *Biochem J* **154**, 449–469.
- 18 Kashiwaya Y, Sato K, Tsuchiya N, Thomas S, Fell DA, Veech RL & Passonneau JV (1994) Control of glucose utilization in working perfused rat heart. *J Biol Chem* **269**, 25502–25514.
- 19 Torres NV, Souto R & Melendez-Hevia E (1989) Study of the flux and transition time control coefficient profiles in a metabolic system *in vitro* and the effect of an external stimulator. *Biochem J* **260**, 763–769.
- 20 Landa A, Rojo-Domínguez A, Jiménez L & Fernández-Velasco DA (1997) Sequencing, expression and properties of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *Eur J Biochem* **247**, 348–355.
- 21 Reeves RE & South DJ (1974) Phosphoglycerate kinase (GTP). An enzyme from *Entamoeba histolytica* selective for guanine nucleotides. *Biochem Biophys Res Commun* **58**, 1053–1057.
- 22 Hidalgo ME, Sánchez R, Pérez DG, Rodríguez MA, García J & Orozco E (1997) Molecular characterization of the *Entamoeba histolytica* enolase gene and modelling of the predicted protein. *FEMS Microbiol Lett* **148**, 123–129.
- 23 Fell D (1997) *Understanding the Control of Metabolism*. Portland Press, London.
- 24 Henze K, Horner DS, Suguri S, Moore DV, Sanchez LB, Muller M & Embley TM (2001) Unique phylogenetic relationships of glucokinase and glucosephosphate isomerase of the amitochondriate eukaryotes *Giardia intestinalis*, *Spironucleus barkhanus* and *Trichomonas vaginalis*. *Gene* **281**, 123–131.
- 25 Mertens E, Ladorr US, Lee JA, Miretsky A, Morris A, Rozario C, Kemp RG & Muller M (1998) The pyrophosphate-dependent phosphofructokinase of the protist, *Trichomonas vaginalis*, and the evolutionary relationships of protist phosphofructokinases. *J Mol Evol* **47**, 739–750.
- 26 Sánchez LB, Horner DS, Moore DV, Henze K, Embley TM & Muller M (2002) Fructose-1,6-bisphosphate aldolases in amitochondriate protists constitute a single protein subfamily with eubacterial relationships. *Gene* **295**, 51–59.
- 27 Henze K, Badr A, Wettren M, Cerff R & Martin W (1995) A nuclear gene of eubacterial origin in *Euglena gracilis* reflects cryptic endosymbioses during protist evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 9122–9126.
- 28 Hannaert V, Brinkmann H, Nowitzki U, Lee JA, Albert MA, Sensen CW, Gaasterland T, Muller M, Michels P & Martin W (2000) Enolase from *Trypanosoma brucei*, from the amitochondriate protist *Mastigamoeba balamuthi*, and from the chloroplast and cytosol of *Euglena gracilis*: pieces in the evolutionary puzzle of the eukaryotic glycolytic pathway. *Mol Biol Evol* **17**, 989–1000.

- 29 Saavedra-Lira E & Pérez-Montfort R (1994) Cloning and sequence determination of the gene coding for the pyruvate phosphate dikinase of *Entamoeba histolytica*. *Gene* **142**, 249–251.
- 30 Jedrzejewski MJ, Chander M, Setlow P & Krishnasamy G (2000) Structure and mechanism of action of a novel phosphoglycerate mutase from *Bacillus stearothermophilus*. *EMBO J* **19**, 1419–1431.
- 31 Chevalier N, Rigden DJ, van Roy J, Opperdoes FR & Michels PA (2000) *Trypanosoma brucei* contains a 2,3-bisphosphoglycerate independent phosphoglycerate mutase. *Eur J Biochem* **267**, 1464–1472.
- 32 Guerra DG, Vertommen D, Fothergill-Gilmore LA, Opperdoes FR & Michels PA (2004) Characterization of the cofactor-independent phosphoglycerate mutase from *Leishmania mexicana mexicana*. *Eur J Biochem* **271**, 1798–1810.
- 33 Fothergill-Gilmore LA & Watson HC (1989) The phosphoglycerate mutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **62**, 227–313.
- 34 Horecker BL, Tsolas O & Lai CY (1972) Aldolases. In *The Enzymes*, Vol. VII (Boyer PD, ed), pp. 213–258. Academic Press, New York.
- 35 Sauve V & Sygusch J (2001) Molecular cloning, expression, purification, and characterization of fructose-1,6-bisphosphate aldolase from *Thermus aquaticus*. *Protein Expr Purif* **21**, 293–302.
- 36 Hess D, Krüger K, Knappik A, Palm P & Hensel R (1995) Dimeric 3-phosphoglycerate kinases from hyperthermophilic Archaea. *Eur J Biochem* **233**, 227–237.
- 37 Brown CK, Kuhlman PL, Mattingly S, Slates K, Calie PJ & Farrar WW (1998) A model of the quaternary structure of enolases, based on structural and evolutionary analysis of the octameric enolase from *Bacillus subtilis*. *J Protein Chem* **17**, 855–866.
- 38 Aley SB, Cohn ZA & Scott WA (1984) Endocytosis in *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* **160**, 724–737.
- 39 Srivastava DK & Bernhard SA (1987) Biophysical chemistry of metabolic reaction sequences in concentrated enzyme solution and in the cell. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **16**, 175–204.
- 40 Missot O & Opperdoes FR (1984) Simultaneous purification of hexokinase, class-I fructose-bisphosphate aldolase, triosephosphate isomerase and phosphoglycerate kinase from *Trypanosoma brucei*. *Eur J Biochem* **144**, 475–483.
- 41 Dixon M & Webb EC (1979) *Enzymes*. Academic Press, New York.
- 42 Cornish-Bowden A (1995) *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. Portland Press, London.
- 43 Wold F (1971) Enolase. In *The Enzymes* (Boyer PD, ed), pp 499–538. Academic Press, New York.
- 44 Northrop DB (1999) So what exactly is $\frac{V}{K}$, anyway? *Biochem Health Res* **27**, 250–263.
- 45 Kacser H & Burns JA (1973) The control of flux. *Symp Soc Exp Biol* **27**, 65–104.
- 46 Heinrich R & Rapoport TA (1974) A linear steady-state treatment of enzymatic chains. *Eur J Biochem* **42**, 89–95.
- 47 Giersch C (1995) Determining elasticities from multiple measurements of flux rates and metabolite concentrations. Application of the multiple modulation method to a reconstituted pathway. *Eur J Biochem* **227**, 194–201.
- 48 Varela-Gómez M, Moreno-Sánchez R, Pardo JP & Pérez-Montfort R (2004) Kinetic mechanism and metabolic role of pyruvate phosphate dikinase from *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem* **279**, 54124–54130.
- 49 Bakker BM, Michels PA, Opperdoes FR & Westerhoff HV (1999) What controls glycolysis in bloodstream form *Trypanosoma brucei*? *J Biol Chem* **274**, 14551–14559.
- 50 Teusink B, Passarge J, Reijenga CA, Esgalhado E, van der Weijden CC, Schepper M, Walsh MC, Bakker BM, van Dam K, Westerhoff HV & Snoep JL (2000) Can yeast glycolysis be understood in terms of *in vitro* kinetics of the constituent enzymes? Testing biochemistry. *Eur J Biochem* **267**, 5313–5329.
- 51 Hannaert V, Bringaud F, Opperdoes FR & Michels PA (2003) Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid Biol Dis* **2**, 11.
- 52 Bakker BM, Westerhoff HV, Opperdoes FR & Michels PA (2000) Metabolic control analysis of glycolysis in trypanosomes as an approach to improve selectivity and effectiveness of drugs. *Mol Biochem Parasitol* **106**, 1–10.
- 53 Verlinde CL, Hannaert V, Blonski C, Willson M, Perie JJ, Fothergill-Gilmore LA, Opperdoes FR, Gelb MH, Hol WG & Michels PA (2001) Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. *Drug Resist Update* **4**, 50–65.
- 54 Mansour TE (2002) *Chemotherapeutic Targets in Parasites*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- 55 Eubank WB & Reeves RE (1982) Analog inhibitors for the pyrophosphate-dependent phosphofructokinase of *Entamoeba histolytica* and their effect on culture growth. *J Parasitol* **68**, 599–602.
- 56 Bruchhaus I, Jacobs T, Denart M & Tannich E (1996) Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase of *Entamoeba histolytica*: molecular cloning, recombinant expression and inhibition by pyrophosphate analogues. *Biochem J* **316**, 57–63.
- 57 Saavedra-Lira E & Perez-Montfort R (1996) Energy production in *Entamoeba histolytica*: new perspectives in rational drug design. *Arch Med Res* **27**, 257–264.
- 58 Ghosh S, Chan JM, Lea CR, Meints GA, Lewis JC, Tovian ZS, Flessner RM, Loftus TC, Bruchhaus I, Kendrick H et al. (2004) Effects of bisphosphonates on the growth of *Entamoeba histolytica* and *Plasmo-*

- dium* species *in vitro* and *in vivo*. *J Med Chem* **47**, 175–187.
- 59 Sambrook J & Russell DW (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- 60 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ (1951) Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265–275.
- 61 Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- 62 Bergmeyer HU (1983) *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim.
- 63 Reithel FJ (1966) Phosphoglucose isomerase. *Methods Enzymol* **IX**, 565–568.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Bhuvaneshwari, M; Cuesta, A; Davis, E; Matschinski, F; Harrison, R; Weber, I. Structural model of human glucokinase in complex with glucose and ATP. (1999). *Diabetes*; **48**, 1698-1705.
- Bruchhaus, I., Jacobs, T., Denart, M. & Tannich, E. (1996) Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase of *Entamoeba histolytica*: molecular cloning, recombinant expression and inhibition by pyrophosphate analogues. *Biochem. J.* **316**, 57-63.
- Chi, A.S; Deng, Z; Albach, R.A; Kemp, T. G. (2001) The two phosphofructokinases gene products of *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* **276**, 19974 – 19981.
- Colowick, S.P. (1973) The hexokinases. *In The enzymes.* (Boyer P.D.) vol II. Academic Press, NY, 1- 48.
- Deng, Z; Huang, M. (1998). Cloning and expression of the gene for the active PPI- dependent phosphofructokinase of *Entamoeba histolytica*. *Biochem. J.*; **329**: 656.
- Espinoza CM; Martínez PA. (2000). *Recent developments in amoebiasis research. Current opinion in infectious diseases.*; 13:451-456.
- Faust E. (1984) *Parasitología clínica*. Salvat editores, 1a edición; Barcelona, España; 135-165.
- Horecker, B. L; Solas, O; Laic, Y. (1972). Triosephosphate isomerase. *In Enzymes.* (Boyer. P.D.). vol VII, pp 326. Academic Press, NY.
- Kenji, K; Morihiro; M; Teruyuki, N; Jun-ichi, E; Yasufumi, N. (2004) Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase. *Structure* **12** (429-438).

- Kroschewski H. Ortner S. Steipe B. (2000) Differences in substrate specificity and kinetic properties of the recombinant hexokinase HXK1 and HXK2 from *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol* ; **105**: 71.
- Landa A. Rojo DA. Jimenez L. Fernández VA. (1997). Sequencing, expression and properties of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *Eur. J. Biochem*; 247: 348.
- Zhong, L; Zhang, W; Weber, I; Harrison, R; PilKis, S; (1994). Site-directed mutagenesis studies on the determinants of sugar specificity and cooperative behavior of human β - cell glucokinase. *The J. Biol. Chem.* 269-**44** 27458-27465.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- McLaughlin J, Aley S.(1985). The biochemistry and functional morphology of *Entamoeba*. *J. Protozool*; **32** (2): 221.
- Mertens E. Lador US. Lee JA. (1998). The pyrophosphate-dependent phosphofructokinase of the protist *Trichomonas vaginalis*, and the evolutionary relationship of protist phosphofructokinases. *J. Mol. Evol*; **45**:739.
- Montalvo FE; Reeves RE; Warren LG. (1997). Aerobic and anaerobic metabolism in *Entamoeba histolytica*. *Exp. Parasitology*. 1997; 30: 249.
- Moukil, M; Veiga-da.Cunha, M; Van Schaftingen, E. (2000). Study of the regulatory properties of glucokinase by site-directed mutagenesis. *Diabetes*, **49**: 195- 201.

- Muller M.(1988). Energy metabolism of protozoa without mitochondria. *Annu. Rev. Microbiol*; **42**: 465-478.
- Pollard, K; Cornish, A. (1982. Mechanism of liver glucokinase. *Mol. Cell. Biochem*; **44** (2) 71-80.
- Reeves RE. (1968) A new enzyme with the glycolytic function of piruvate kinase. *J. Biol. Chem*; **243** (11): 3202.
- Reeves, R. E. (1974) Glycolytic enzymes in *E. histolytica*. *Arch. Inv. Med.* **5**, 411-414.
- Reeves, R. E. (1984) Metabolism of *Entamoeba histolytica*. Schaudinn, 1903. *Adv. Parasitol.* **23**, 105-142.
- Reeves RE. Montalvo F. Sillero A. (1967). Glucokinase from *Entamoeba histolytica* and related organisms. *Biochem.* **6**:1752-1760.
- Reeves RE. Serrano R. South DJ. (1976). 6-phosphofructokinase (pyrophosphate). *J. Biol. Chem*; **25** (10): 2958.
- Reeves RE, South DJ, Blytt HJ, Warren LG. (1974). Pyrophosphate: D-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase. A new enzyme with the glucoytic function of 6-phosphofructokinase. *J. Biol. Chem*; **249**(24): 7737.
- Romero CR. (1999). *Microbiología y parasitología humanas*. Editorial Médica panamericana, 1a edición; México; 592-595.
- Saavedra, Emma, Encalada, Rusely, Pineda, Erika, Jasso-Chávez, Ricardo & Moreno-Sánchez, Rafael (2005) Glycolysis in *Entamoeba histolytica*. Biochemical characterization of recombinant glycolytic enzymes and flux control analysis. *FEBS Journal* **272** (7), 1767-1783.
- Saavedra-Lira, E. & Perez-Montfort, R. (1996) Energy production in *Entamoeba histolytica*: New perspectives in rational drug design. *Arch. Med. Res.* **27**, 257-64.

- Siebers, B; Hans-Peter, K; Reinhard, H. (1998). PPI-dependent phosphofructokinase from *Thermoproteus tenax*, an archaeal descendant of an ancient line in phosphofructokinase evolution. *J. Bacteriol* **180** (8) 2137-2143.
- Straus, D; Raines, R; Kawasima, E. (1985). Active site of triosephosphate isomerase: *in vitro* mutagenesis and characterization of an altered enzyme. *Biochem.* **82** 2272-2276.
- Tay ZJ. (1995). *Parasitología médica*. Méndez editores. 5a edición; México; 49-66.
- Weinbach EC; Diamond LS. (1974) *Entamoeba histolytica*. I aerobic metabolism. *Exp. Parasitol.*; **35**: 232.
- Wilson, J.R; (1995). Hexokinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* **126**:65 198.
- Xu LZ, Zhang W, Weber IT, Harrison RW, PilKis SJ. (1994) Site-directed mutagenesis studies on the determinants of sugar specificity and cooperative behavior of human beta-cell glucokinase. *J. Biol .Chem.* **269**(44):27458-65.