

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**DETERMINACIÓN DEL MECANISMO CINÉTICO Y PAPEL METABÓLICO DE
LA PIRUVATO FOSFATO DICINASA DE *Entamoeba histolytica*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A:

BIOL. MARCELA LILIÁN VARELA GÓMEZ

DIRIGEN:

DR. RUY PÉREZ MONTFORT

DR. RAFAEL MORENO SÀNCHEZ



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.

La presente Tesis se realizó en el laboratorio del Dr. Ruy Pérez Montfort en el Departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular y en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, bajo la dirección del Dr. Rafael Moreno Sánchez.

Jurado asignado:

Dr. Adolfo García Sainz	Presidente
Dr. Ruy Pérez Montfort	Secretario
Dra. Adela Rodríguez Romero	Vocal
Dr. Guillermo Mendoza Hernández	Vocal
Dra. Alicia González Manjares	Vocal
Dr. Rafael Moreno Sánchez	Suplente
Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez	Suplente

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.	1
I.A. Mecanismos cinéticos	1
I.B. Algunos ejemplos	4
I.C. Técnicas para distinguir entre mecanismos cinéticos	6
I.C.1. Ensayos de velocidad Inicial	7
I.C.2. Ensayos de inhibición	15
I.C.3. Intercambio isotópico	42
I.D. Mecanismos cinéticos de la PPK	55
I.E. Metabolismo energético de <i>Entamoeba histolytica</i>	62
CAPÍTULO II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.	66
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS.	68
III.A. Mecanismo cinético	68
III.A.1. Ensayos con inhibidores sin salida : AMPS y PNP	68
III.A.2. Ensayos de velocidad inicial con moléculas análogas de AMP (CMP, GMP y TMP)	68
III.A.3. Experimentos de fluorescencia	69
III.A.4. Estabilidad térmica de la EhPPDK	70
III.A.5. Inhibición por producto: a concentraciones saturantes de cosustrato	70
III.B. Papel metabólico	71
III.B.1. Características de los trofozoitos de <i>Entamoeba histolytica</i>	71
III.B.2. Determinación del volumen intracelular de <i>Entamoeba histolytica</i>	72
III.B.3. Determinación de metabolitos en extractos ácidos de trofozoitos	73
III.B.4. Consumo de protones de la reacción catalizado por la EhPPDK	74
CAPÍTULO IV. RESULTADOS.	76
Resultados publicados	76
Resultados complementarios no publicados	83
IV. A. Mecanismo cinético	83
IV.A.1. Ensayos con los inhibidores sin salida : AMPS y PNP	83
IV.A.2. Ensayos de velocidad inicial con moléculas análogas al AMP (CMP, GMP y TMP)	86
IV.A.3. Experimentos de fluorescencia	88
IV.A.4. Estabilidad térmica de la EhPPDK	92
IV.A.5. Inhibición por producto: a concentraciones saturantes de cosustrato	98

IV.B. Papel metabólico	108
IV.B.2. Determinación del volumen intracelular de <i>Entamoeba histolytica</i>	108
IV.B.3. Determinación de metabolitos en extractos ácidos de trofozoítos	117
IV.B.4. Consumo de protones de la reacción catalizado por la EhPPDK	120
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN GENERAL.	124
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES.	133
CAPÍTULO VII. PERSPECTIVAS.	134
CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS.	136
ANEXO 1.	166
ANEXO 2.	168

RESUMEN

La piruvato fosfato dicinasa es una enzima que cataliza de manera reversible la transferencia de los grupos fosfato del fosfoenolpiruvato y pirofosfato al AMP. Esta enzima no se encuentra en el humano pero sí en parásitos como *Trypanosoma cruzi* y *T. brucei*, *Leishmania spp.*, *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica*, por lo que se le propuso como blanco terapéutico. Hay reportes que describen dos mecanismos cinéticos diferentes para esta enzima. Los mecanismos difieren principalmente en el número de reacciones parciales que participan. En el mecanismo de la enzima de *Propionibacterium shermanii* son tres y dos en el de *Clostridium symbiosum* y maíz. Las diferencias entre los mecanismos cinéticos reportados para la piruvato fosfato dicinasa, su importancia como blanco terapéutico y el grave problema de la amibiasis en México fueron las causas principales que dieron origen a este trabajo.

Mediante estudios de velocidad inicial en estado estacionario y de pirofosforilación con sustratos radiactivos, inhibición por producto y ecuaciones de velocidad deducidas a partir de diferentes mecanismos propuestos se concluyó que el mecanismo cinético de la piruvato fosfato dicinasa es de tipo Uni (fosfoenolpiruvato) Uni (piruvato) Bi (AMP primero y pirofosfato después) Bi (fosfato primero y ATP después) ping pong no clásico con la formación de un complejo ternario sin salida entre la enzima fosforilada, el AMP y el piruvato.

En este trabajo también se determinó de manera cuantitativa el posible papel metabólico de la piruvato fosfato dicinasa de la amiba en condiciones cercanas a las fisiológicas. De acuerdo a los datos presentados en este trabajo, el

equilibrio de la reacción que cataliza la enzima está desplazado hacia la síntesis de fosfoenolpiruvato.

Además de estos datos experimentales, este trabajo pretende ser un instrumento de consulta en lo que se refiere a la teoría de los mecanismos cinéticos y en lo que se conoce sobre algunos aspectos del metabolismo de la amiba.

ABSTRACT

Pyruvate phosphate dikinase catalyzes the reversible phosphorylation between phosphoenolpyruvate, pyrophosphate and AMP. This enzyme has been proposed as possible chemotherapeutic target because it is absent from the human host, but is present in parasites like *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei*, *Leishmania spp.*, *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica*. Two different kinetic mechanisms have been reported for this enzyme. The main difference between these mechanisms is the number of partial reactions that make up in the complete reaction: three for the *Propionibacterium shermanii* enzyme and two for the *Clostridium symbiosum* and corn enzymes. This work was begun to find out which of these two kinetic mechanisms was followed by the pyruvate phosphate dikinase of *Entamoeba histolytica*. Also to advance the research on the very important health problem of amebiasis in México and to explore the characteristics of the enzyme as a good chemotherapeutic target.

The kinetic mechanism determined for the amebal enzyme is a non classical Uni (phosphoenolpyruvate) Uni (pyruvate) Bi (AMP first and pyrophosphate next) Bi (phosphate first and ATP next) ping pong with the ternary complex formation between AMP, enzyme and pyruvate. This conclusion was reached based on experimental data of steady state initial velocity patterns, radioactive binding experiments, product inhibition patterns and velocity equations.

The metabolic role of this enzyme was also determined in this work; thus being first quantitative report of the amoebal enzyme function determined in near

physiological conditions. According to the experimental data phosphoenolpyruvate synthesis is thermodynamically favored.

This work is also an extense introduction to kinetic mechanisms and a review of some aspects of the current knowledge of *E. histolytica* metabolism.

ABREVIATURA

C4PPDK: Piruvato fosfato dicinasa de plantas C₄

CsPPDK: Piruvato fosfato dicinasa de *Clostridium symbiosum*

E: Enzima libre

EA: Complejo enzima-sustrato A

EB: Complejo enzima-sustrato B

EAB: Complejo ternario de la enzima con los sustratos A y B

EE: Estado estacionario

EhPPDK: Piruvato fosfato dicinasa de *Entamoeba histolytica*

EP: Complejo enzima-producto P

EPQ: Complejo ternario de la enzima con los productos P y Q

EQ: Complejo enzima-producto Q

EqR: Equilibrio rápido

F: Enzima químicamente modificada

FSC-H: Parámetro de citometría de flujo, dispersión frontal

FB: Complejo enzima modificada-sustrato B

FP: Complejo enzima modificada-producto P

GWD: α -glucano agua dicinasa

HK: Hexocinasa

k₋₁: constante de velocidad de la disociación del complejo enzima-sustrato

K_A: Constante de Michaelis-Menten para el sustrato A

K_B: Constante de Michaelis-Menten para el sustrato B

k_{cat} : constante catalítica

K_{eq} : Constante de equilibrio

K_{ia} : Constante de disociación del sustrato A

K_{ic} : Constante de inhibición competitiva

K_{ij} : Constante de inhibición incompetitiva que hace referencia al efecto del inhibidor sobre el intercepto de los dobles recíprocos ($1/V_{max}$); sinónimo de K_{iu}

K_{is} : Constante de inhibición competitiva que hace referencia al efecto del inhibidor sobre la pendiente de dobles recíprocos (K_m/V_{max}); sinónimo de K_{ic}

K_{iu} : Constante de inhibición incompetitiva

K_m : Constante de Michaelis-Menten

K_{ms} : Constante de Michaelis-Menten del sustrato

K_{mp} : Constante de Michaelis-Menten del producto

LDH: Lactato deshidrogenasa

MK: Miocinasa

PEP: Fosfoenolpiruvato

PFK: Fosfofructocinasa

PFK-ATP: Fosfofructocinasa dependiente de ATP

PFK-PPi: Fosfofructocinasa dependiente de pirofosfato

Pi: Fosfato

Pir: Piruvato

PPDK: Piruvato fosfato dicinasa

PPi: Pirofosfato

PPS: Piruvato agua dicinasa

PsPPDK: Piruvato fosfato dicinasa de *Propionibacterium shermanii*

PVF: Proteína verde fluorescente

PYK: Piruvato cinasa (a veces también se le abrevia PK)

SSC-H: Parámetro de citometría de flujo, dispersión lateral

v: velocidad inicial

V_{\max} ó V : velocidad máxima;

$(V_{\max})_{\text{ap}}$ ó V_{app} : Velocidad máxima aparente

V_{maxf} : Velocidad máxima del sentido directo de la reacción, el sentido termodinámicamente favorecido (forward)

V_{maxr} : Velocidad máxima del sentido reverso de la reacción.

V_{max}/K_m : Eficiencia catalítica; **$(V_{\text{max}}/K_m)_{\text{ap}}$:** Eficiencia catalítica aparente

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

I. A. Mecanismos cinéticos

El mecanismo cinético de una enzima se refiere al orden de unión de los sustratos y al de liberación de los productos. Existen tres principales mecanismos cinéticos: azar, ordenado y ping pong. Los mecanismos al azar y ordenado se clasifican como mecanismos SECUENCIALES (Figura 1) debido a que es necesario que los dos sustratos (en el caso de una enzima birreactante) estén unidos a la enzima para poder llevar a cabo la catálisis. Estos mecanismos secuenciales pueden tener diferentes subtipos de acuerdo a la relación entre los valores de k_{cat} y k_{-1} . Pueden clasificarse como mecanismo en equilibrio rápido ($k_{cat} \ll k_{-1}$) o en estado estacionario ($k_{cat} \geq k_{-1}$). Existe otro mecanismo cinético secuencial ordenado, que es muy singular debido a que no se acumula el complejo ternario entre la enzima y los dos sustratos bajo las condiciones de la reacción (Figura 1). Este mecanismo se conoce como Theorell-Chance en honor a los investigadores que lo propusieron en 1951 para la enzima alcohol deshidrogenasa de caballo (Segel, 1975). El complejo ternario no se acumula debido a que una vez que el segundo sustrato se une al complejo EA (sustrato A unido a la enzima libre), la catálisis es “instantánea”, es decir, la constante de velocidad de formación del complejo EAB es muy lenta en comparación con la constante de velocidad de transformación a EPQ. El mecanismo ping pong o de enzima sustituida o de doble desplazamiento se clasifica como un mecanismo cinético NO SECUENCIAL. Es no secuencial debido a que NO es requisito que

los dos sustratos estén unidos al mismo tiempo a la enzima para que se lleve a cabo la catálisis (Figura 1).

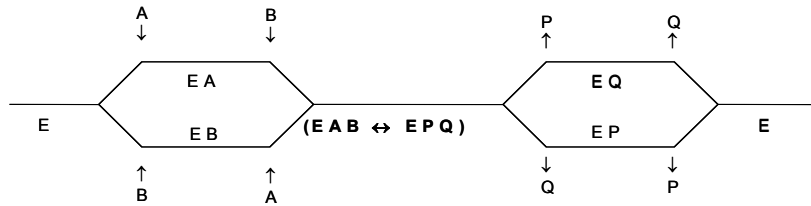
Existen también los llamados mecanismos híbridos, que son en los que una parte del mecanismo es de un tipo y la otra parte es de otro; por ejemplo, un mecanismo trirreactante en el cual el sustrato A se une a la enzima libre como en un mecanismo ordenado, pero los sustratos B y C pueden unirse indistintamente (al azar) al complejo EA previamente formado.

I. A. 1. Nomenclatura

Los mecanismos cinéticos reciben un nombre particular en el cual primero se señala, a través de prefijos, el número de sustratos y productos que participan en la reacción (uni, bi, tri, etc.). Por ejemplo, en el caso de una enzima **trirreactante (tres sustratos)** con un mecanismo cinético ordenado y dos productos en el sentido directo de la reacción (forward) se nombraría Ter Bi ordenado y en el sentido reverso sería Bi Ter ordenado. En el caso de la Figura 1, todos los mecanismos que se muestran en los diagramas de Cleland tienen dos sustratos y dos productos, por lo que al nombre de cada mecanismo lo anteceden los prefijos Bi Bi.

Los mecanismos híbridos tienen las mismas reglas de nomenclatura, sólo que se les agrega el término “híbrido” antes de mencionar los mecanismos cinéticos que lo componen. Existe una gran variedad de nombres para este tipo de mecanismos que no siguen fielmente la nomenclatura aquí señalada (ver adelante en el artículo de revisión, la figura 4 de mecanismos cinéticos reportados para PPDK).

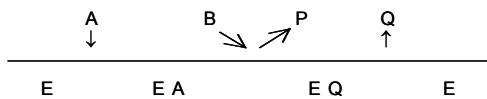
Mecanismo cinético Bi Bi al azar



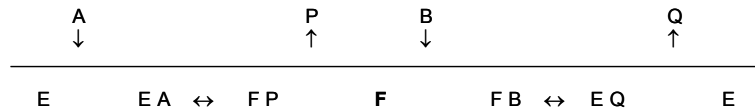
Mecanismo cinético Bi Bi ordenado



Mecanismo Bi Bi Theorell-Chance



Mecanismo Bi Bi Ping Pong



Mecanismo híbrido Azar-Ordenado en un sistema trirreactante



Figura 1. Diagramas de Cleland de los mecanismos secuenciales con dos sustratos y dos productos (Bi Bi) : azar, ordenado y ping pong. Los sustratos son A y B, los productos son P y Q. Las formas de la enzima son : enzima libre (E), complejo de la enzima con el sustrato A (EA), complejo de la enzima con los dos sustratos y los dos productos, que se forma sólo en el caso de los mecanismos secuenciales, llamado “*complejo ternario*” (EAB y EPQ respectivamente). Complejos de la enzima con los productos (EP y EQ). En el caso del mecanismo ping pong, la forma de la enzima F es la llamada *enzima sustituida*, que forma de manera independiente complejos con el primer producto y con el segundo sustrato (FP y FB respectivamente).

I. B. Algunos ejemplos

El mecanismo cinético de las enzimas se ha relacionado con la estructura propia de cada una de ellas, así como también con el mecanismo de la reacción que catalizan. A este último respecto, en este apartado se relacionan los mecanismos cinéticos: ordenado, al azar y ping pong con respecto a las diferentes clases generales de enzimas (oxidorreductasas, transferasas, ligasas, liasas e hidrolasas). Esta relación se hizo sin hacer distinción entre si correspondían a mecanismos en estado estacionario o en equilibrio rápido, así como tampoco en el número de sustratos (Bi o Tri) y/o productos (Uni, Bi o Tri) involucrados. Se utilizaron un total de 161 referencias, con un promedio de 54 referencias por cada mecanismo cinético (Tabla I). De las 38 referencias analizadas en las que se reportó el mecanismo cinético de alguna oxidorreductasa (EC 1), el 50% de ellas se refiere a un mecanismo ping pong, 31% a un mecanismo ordenado y 18% a un mecanismo secuencial al azar. Así mismo, el mecanismo ping pong (41%) fue el más frecuente para las transferasas (EC 2; referencias totales 46), seguido, al igual que las oxidorreductasas, por los mecanismos secuenciales ordenado (31%) y al azar (28%). Coincidentemente, además de presentar preferencia por un mecanismo ping pong, estos dos grupos de enzimas se encargan de catalizar reacciones en las que existe un grupo donador que intercambia electrones (reacciones de oxidorreducción) o grupos químicos (transferasas) con una segunda molécula aceptora. Es probable que las reacciones de transferencia y la incidencia de mecanismos ping pong no se trate solamente de una coincidencia. En este tipo de reacciones es necesario que la molécula donadora se desprenda del grupo transferible y que posteriormente éste se transfiera a la molécula

aceptora, lo cual se encuentra bien sustentado o apoyado en un mecanismo de tipo ping pong. Por otra parte cuando los electrones o grupos químicos no se transfieren a la enzima directamente, se requiere que los dos sustratos estén presentes (formando un complejo ternario con la enzima) en el momento de la catálisis. Este es un análisis general en el que no se hacen distinciones entre las familias que conforman cada categoría de enzimas. Sin embargo, es importante señalar que dentro de las oxidorreductasas, las deshidrogenasas dependientes de NADH o NADPH tienen principalmente un mecanismo ordenado en las que la coenzima es el primer sustrato. Por otra parte, todas las enzimas que transfieren electrones en la cadena respiratoria, oxidorreductasas también, tienen un mecanismo ping pong. Posiblemente por eso es que se encontraron mucho más representados estos dos mecanismos cinéticos para las oxidorreductasas (Tabla I). Además, muchas de estas enzimas también tienen mecanismos híbridos ordenado-azar, lo que quiere decir que la secuencia de unión de los sustratos es obligatorio, en tanto que la liberación de los productos es al azar.

A diferencia de los dos grupos anteriores de enzimas, los 23 reportes de las hidrolasas (EC 3) mostraron que éstas tienen una preferencia mayor por los mecanismos secuenciales (ordenado y al azar: 39% cada una) que por el mecanismo ping pong (21%). En el caso de las liasas (EC 4; referencias totales 24) se observó preferencia por los mecanismos secuenciales en lugar de no secuencial (21%), solamente que a diferencia de las hidrolasas, estas enzimas tienen mayor representación para el mecanismo al azar (46%) que para el ordenado (33%). Con respecto a las ligasas (28 referencias totales), que son enzimas que acoplan la hidrólisis de ATP a la formación de enlaces covalentes

(EC 6), también presentaron una ligera preferencia por el mecanismo al azar (36%) y para los mecanismos ordenado y ping pong no se encontraron diferencias en cuanto al número de reportes analizados (32%).

Mecanismo cinético	Oxidoreductasas (%)	Transferasas (%)	Hidrolasas (%)	Liasas (%)	Ligasas (%)
Azar	18	28	39	46	36
Ordenado	31	31	39	33	32
Ping pong	50	41	21	21	32

Tabla I. Porcentaje de citas bibliográficas del porcentaje de mecanismos cinéticos reportados para los diferentes grupos generales de enzimas.

I. C. Técnicas para distinguir entre mecanismos cinéticos

Existen varias técnicas experimentales que se utilizan ampliamente para determinar de manera muy precisa, el mecanismo cinético de las enzimas. Estas herramientas permiten comparar los datos experimentales con patrones predichos para diferentes mecanismos cinéticos y de esta manera, eliminar los que no concuerdan y apoyar los que coinciden. El número de posibilidades de mecanismos cinéticos no es muy grande y además se pueden reducir aún más mediante una primera aproximación experimental. Para distinguir específicamente entre mecanismos muy particulares, se emplean entonces otro tipo de técnicas diseñadas especialmente para este fin. A continuación se describen algunas de estas técnicas para determinar mecanismos cinéticos.

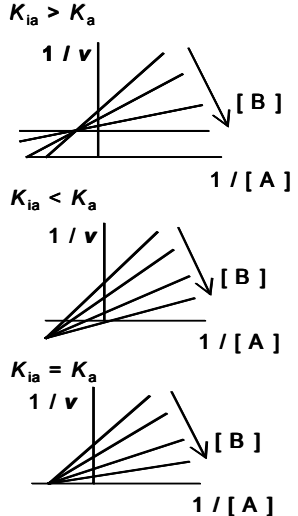
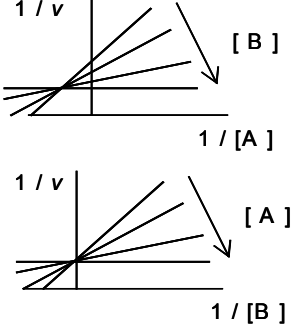
I. C 1. Ensayos de velocidad inicial

Se llama *velocidad inicial* a la velocidad de la reacción durante los primeros minutos o segundos, cuando la formación de producto es lineal con respecto al tiempo. Durante los primeros minutos o segundos, la concentración de sustrato es mucho mayor que la concentración de enzima. El método general para determinar los patrones de velocidad inicial para estudiar los mecanismos cinéticos consiste en variar la concentración de un sustrato frente a diferentes concentraciones fijas del (los) otro (s) y en ausencia de productos (sólo en casos muy particulares se utiliza una concentración fija de uno de los productos, Cleland, 1970). Los mecanismos secuenciales en general tienen una ecuación de velocidad inicial de la siguiente forma:

$$v = \frac{V[A][B]}{K_{ia}K_B + K_A[B] + K_B[A] + [A][B]} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde v es la velocidad inicial, $[A]$ y $[B]$ son las concentraciones de los sustratos, V es la constante cinética de velocidad máxima, K_{ia} es la constante de disociación del sustrato A, K_A y K_B son las constantes de Michaelis-Menten para los sustratos A y B respectivamente. Los mecanismos cinéticos que producen una familia de líneas rectas que se intersectan al graficar $1/[A]$ a varias concentraciones de B y viceversa se ajustan a esta ecuación de velocidad inicial. Las líneas se intersectan a la izquierda del eje "y", ya sea sobre el eje "x" ($K_{ia} > K_A$), por debajo de éste ($K_{ia} < K_A$) o por arriba del mismo eje ($K_{ia} = K_A$). La

igualdad de K_{ia} y K_A es mera coincidencia y no debe tomarse como carácter diagnóstico para distinguir entre un mecanismo al azar u ordenado. En la tabla II se presentan los mecanismos cinéticos que tienen patrones intersectantes en gráficos de doubles recíprocos y las ecuaciones que describen a cada uno. En el caso del mecanismo cinético Bi Bi ping pong, el gráfico de doubles recíprocos está formado por una serie de líneas paralelas, a diferencia de las intersectantes que son diagnósticas de cualquiera de los mecanismos secuenciales.

Mecanismo cinético	Ecuación de velocidad	Doubles recíprocos (Ver Anexo 1)
Azar (EqR) Azar (EE) Ordenado (EE) Theorell-Chance	$v = \frac{V[A][B]}{K_{ia}K_B + K_A[B] + K_B[A] + [A][B]}$	 <p>$K_{ia} > K_a$</p> <p>$K_{ia} < K_a$</p> <p>$K_{ia} = K_a$</p> <p>Nota: Se obtiene el mismo patrón si el sustrato variable es B</p>
Ordenado (EqR)	$v = \frac{V[A][B]}{K_AK_B + K_B[A] + [A][B]}$	

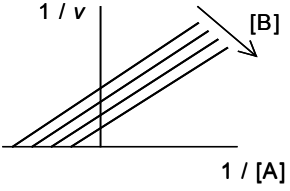
Ping Pong	$v = \frac{V[A][B]}{K_A[B] + K_B[A] + [A][B]}$	 <p data-bbox="1071 388 1404 434">Nota: Se obtiene el mismo patrón si el sustrato variable es B</p>
-----------	--	---

Tabla II. Ecuaciones de velocidad en ausencia de productos y patrones gráficos de dobles recíprocos de los mecanismos cinéticos bi bi al azar y ordenado en equilibrio rápido (EqR) y en estado estacionario (EE), Theorell-Chance y ping pong. En las ecuaciones v es velocidad inicial, V es velocidad máxima, A y B son los sustratos, K_A y K_B son las constantes de Michaelis-Menten de los sustratos A y B respectivamente y K_{ia} es la constante de disociación del sustrato A .

Los patrones gráficos de los experimentos de velocidad inicial no aportan resultados concluyentes sobre el mecanismo cinético, ya que a pesar de ser una herramienta muy utilizada, constituye solamente una primera aproximación sobre el tipo de mecanismo cinético de una enzima. Además, se debe ser muy cuidadoso con la interpretación de estos datos, ya que por ejemplo, un patrón de líneas aparentemente paralelas podría ser en realidad un patrón intersectante en algún punto lejano del tercer cuadrante de la gráfica, y por lo tanto, corresponder a un mecanismo secuencial en vez de ping pong.

Otro ejemplo es el caso de algunos mecanismos ordenados en EE, muy particulares, en los que el término $K_A[B]$ de la Ecuación 1 no existe debido a que la unión del primer sustrato está en equilibrio termodinámico (Cleland, 1970). Como resultado, la ecuación para el sustrato A no es simétrica a la que se obtiene variando el sustrato B , por lo que el patrón gráfico para cada uno de ellos es diferente al que se muestra en la Tabla II para un mecanismo ordenado en EE.

Estos patrones gráficos confunden entre sí los mecanismos secuenciales ordenado en EE y en EqR.

Los patrones cinéticos analizados corresponden a enzimas birreactantes; sin embargo, en el caso de enzimas trirreactantes, estos patrones gráficos son aún menos específicos. Por ejemplo, se propuso que la tirosina aminotransferasa de hígado de rata tenía un mecanismo de tipo ordenado, en el que se unían secuencialmente la tirosina, el fosfato de piridoxal y el α -cetoglutarato (Diamondstone *et al.*, 1963). En estos experimentos los dobles recíprocos se calcularon utilizando la concentración total de fosfato de piridoxal, sin tomar en cuenta que también se formaba fosfato de piridoxina (en presencia de tirosina), que actúa también como coenzima. Como resultado, se obtuvieron patrones de líneas intersectantes entre los tres sustratos, lo que llevó a proponer un mecanismo secuencial. Sin embargo, una vez considerada la verdadera concentración de la coenzima, las gráficas resultaron ser líneas paralelas que, junto con otro tipo de experimentos, permitieron proponer un mecanismo ping pong para esta enzima (Litwack *et al.*, 1968). A continuación se presenta un ejemplo de un estudio de velocidad inicial, utilizando los datos experimentales que se obtuvieron en este proyecto y que se publicó como problema bioquímico en el Boletín de Educación Bioquímica (Varela-Gómez y Moreno-Sánchez, 2000). Todos los reportes de mecanismos cinéticos de cualquier enzima tienen estudios de velocidad inicial, pero siempre deben ir acompañados de otro tipo de ensayos que permitan determinar con precisión y confianza el mecanismo cinético. En los

siguientes apartados de este capítulo se describen algunas de estas herramientas experimentales que apoyan a los estudios de velocidad inicial.

PROBLEMA BIOQUÍMICO

TEMA: Cinética enzimática

La piruvato fosfato dicinasa (PPDK) es una enzima trirreactante que cataliza de manera reversible la conversión de fosfo(enol)piruvato (PEP), pirofosfato (PPi) y AMP en piruvato, fosfato y ATP. Esta enzima se encuentra en *Entamoeba histolytica* (EhPPDK) pero está ausente en el ser humano, por lo que ha sido considerada como una enzima blanco para el diseño de fármacos en contra de este parásito.

Para determinar el mecanismo cinético de reacción de una enzima trirreactante, es conveniente ana-

lizarla experimentalmente mediante combinaciones de sólo dos sustratos, manteniendo constante y saturante al tercero; es decir como si fuera una enzima birreactante. Por lo tanto la actividad de la EhPPDK se determinó a diferentes concentraciones de AMP y PEP con PPi saturante. El experimento se realizó acoplando la reacción de la EhPPDK con la de la lactato deshidrogenasa y siguiendo espectrofotométricamente la desaparición de NADH (0.2mM) a 340 nm y 25°C.

A continuación se presentan las velocidades iniciales del experimento descrito:

AMP (μM)	Velocidad inicial ($\mu\text{mol NADH/mg/min}$)		
	PEP (μM)		
	10	20	40
1	1.18	1.29	1.33
3	1.67	2.00	2.50
5	1.54	2.50	2.96
7	2.00	2.86	3.20
9	2.50	3.33	-

Determinar el mecanismo cinético que existe entre el PEP y el AMP en la reacción catalizada por la EhPPDK y los parámetros V_{max} y K_m para AMP y PEP.

PROBLEMA BIOQUÍMICO

RESPUESTA.

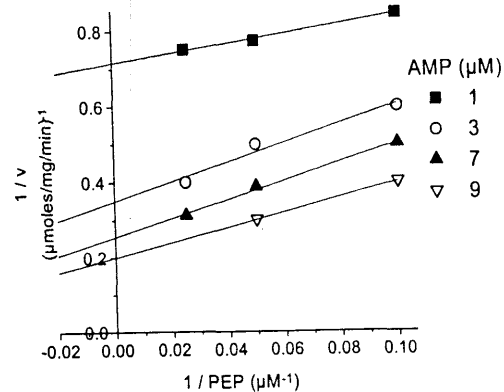
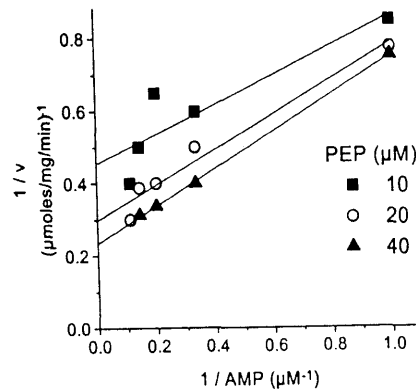
Existen dos categorías de mecanismos cinéticos de reacción: los secuenciales (azar y ordenado) en los que se forma el complejo enzima-sustratos antes de iniciar la formación de los productos y los no secuenciales (Ping Pong o doble desplazamiento) donde la enzima transforma cada sustrato en su producto correspondiente (Segel, 1975).

Cada uno de estos mecanismos posee su propia ecuación de velocidad, con lo que pueden ser diferenciados. Se graficaron los datos del problema mediante dos diferentes tipos de regresiones lineales Hanes y dobles recíprocos.

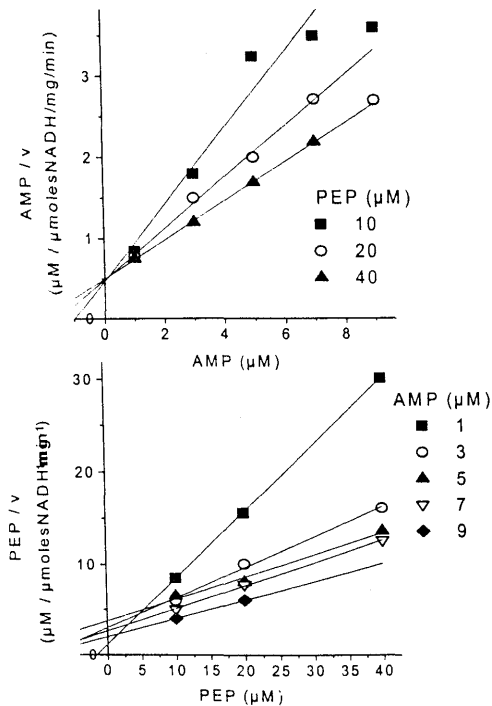
En el caso de los gráficos de Hanes parece ser que las rectas se cruzan sobre el eje de las ordenadas, lo que indicaría que la EhPPDK tiene un mecanismo cinético de doble desplazamiento para el PEP y el AMP; sin embargo esta tendencia no queda completamente clara. Las líneas de los dobles recíprocos

parecen ser paralelas, apoyando un mecanismo de tipo Ping Pong. La distribución de los puntos experimentales a lo largo de las rectas producto del ajuste no es del todo satisfactoria, debido a la dispersión de los datos, por lo que podría haber alguna duda al sugerir un mecanismo de doble desplazamiento a partir de estos patrones gráficos.

Gráficos de Dobles Recíprocos



Gráficos de Hanes



La linearización de una ecuación no lineal es muy común; sin embargo estas manipulaciones matemáticas involucran un rearrreglo de la distribución del error. El grado de inexactitud introducido por este tipo de análisis depende de los rearrreglos hechos en la ecuación y del error presente en los datos originales (Leatherbarrow, 1990).

Con la regresión no lineal no hay manera de incrementar el error experimental ya que no es nece-

sario reorganizar los datos experimentales originales y en consecuencia no existe ninguna distorsión en la distribución del error. La regresión no lineal muestra la mejor curva que se ajuste a los datos experimentales, en tanto que la regresión lineal muestra la recta que mejor se ajusta a la manipulación de los datos experimentales (Leatherbarrow, 1990).

el que corresponde a la ecuación del mecanismo de doble desplazamiento.

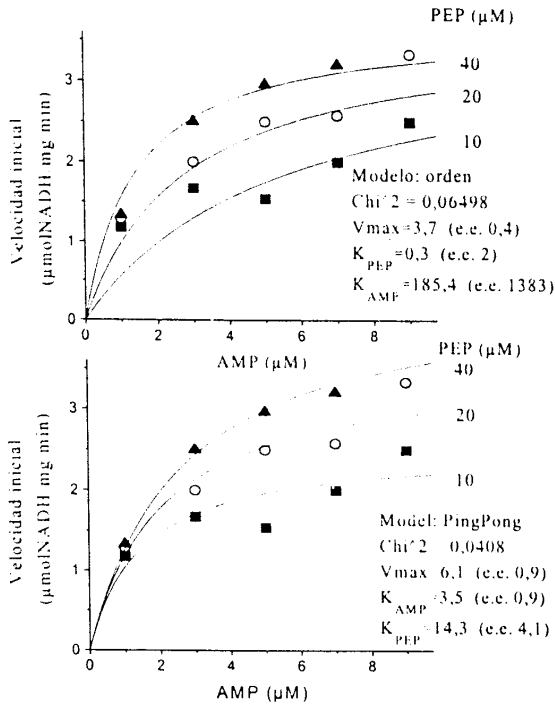
Ecuación para un mecanismo de tipo Ping Pong:

$$v = \frac{V_{max}(AB)}{K_m(A) + K_m(B) + (AB)}$$

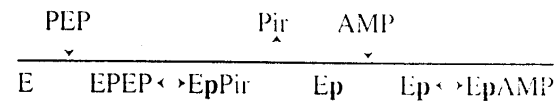
El único inconveniente de la regresión no lineal, es que los cálculos son muy complejos debido a los algoritmos que se utilizan para realizar las iteraciones, por lo que es necesaria una computadora. Como actualmente cada laboratorio tiene la capacidad de contar por lo menos con un equipo de cómputo, este inconveniente no representa ninguna dificultad. Origin, SigmaPlot, GraFit y CurveFit son algunos programas comerciales de computadora que realizan regresiones no lineales.

Conociendo el mecanismo cinético que existe entre el AMP y PEP se puede plantear un esquema de Cleland para esta reacción parcial de la reacción catalizada por la EhPPDK.

Regresión no lineal



Por regresión no lineal puede analizarse cualquier ecuación que pueda ser escrita como $y = f(x)$. Los datos del problema que aquí se presenta fueron ajustados mediante el paquete Origin versión 3.73 a la ecuación que describe un mecanismo Ping Pong y uno ordenado para poder comparar entre estos mecanismos. Debido a que la χ^2 es más pequeña en el ajuste para la ecuación de Ping Pong y a que los errores experimentales y los valores de las constantes cinéticas determinadas a partir del ajuste (V_{max} y K_m) son mucho más reales que los obtenidos para la ecuación del mecanismo ordenado, se consideró como mejor ajuste



Esquema de Cleland de la reacción parcial en la que sólo se toman en cuenta los cosustratos AMP y PEP.

Se sabe que el PEP y PPI tienen un mecanismo de doble desplazamiento en esta enzima y el PPI se une a la enzima fosforilada (EP) una vez que se ha liberado el piruvato (Pir). El PPI cede uno de sus grupos y sólo hasta entonces puede unirse el AMP para que la enzima pirofosforilada ceda los fosfatos y se produzca ATP.

Bibliografía

Leatherbarrow R (1990) TIBS. 15(12):455-458 pp.
 Segel I (1975) Ezyme kinetics. John Wiley and Sons, New York. Cap.9. pp 606-626

Marcela Varela Gómez y Rafael Moreno Sánchez

I. C. 2. Ensayos de Inhibición

Este tipo de herramienta es la segunda más ampliamente utilizada para determinar mecanismos cinéticos. Antes que nada, cabe aclarar que los inhibidores son sustancias que disminuyen la velocidad de una reacción catalizada por una enzima (Cornish-Bowden, 1995). Los inhibidores que se utilizan para determinar mecanismos cinéticos pueden ser productos, sustratos alternos u otras moléculas análogas a cualquiera de estos. Los inhibidores que se utilizan para los fines que estamos analizando son *reversibles*, lo cual implica que son capaces de formar complejos dinámicos (asociación-disociación) con propiedades catalíticas diferentes a las que tiene la enzima en ausencia del inhibidor. Los inhibidores reversibles pueden ser *totales* (lineales) o *parciales* (hiperbólicos). Al saturar con un inhibidor total se elimina completamente la actividad enzimática y al re-graficar la ordenada ($1/V_{\max}$ vs. $[I]$) y la pendiente (K_m/V_{\max} vs. $[I]$) de los dobles recíprocos (ver Anexo 1) se generan líneas rectas, por lo que también se le llama inhibición lineal.

Cuando permanece una actividad enzimática residual en presencia de una concentración saturante de inhibidor, se tiene inhibición parcial y en los re-gráficos de dobles recíprocos se obtiene una curva hiperbólica. Ambos tipos de inhibición tienen una subclasificación que depende del efecto del inhibidor sobre la eficiencia catalítica (V_{\max} / K_m) y la velocidad máxima (V_{\max}). Un inhibidor *competitivo* se caracteriza por disminuir la afinidad de la enzima por su sustrato ($(V_{\max} / K_m)_{ap}$) sin afectar la velocidad máxima aparente ($(V_{\max})_{ap}$). La inhibición *incompetitiva*

disminuye el parámetro V_{max} y no afecta la eficiencia catalítica. Finalmente, un inhibidor *no competitivo* produce la disminución del valor de ambos parámetros (V_{max} y V_{max} / K_m). Las características de estos tipos de inhibición, se resumen en la Tabla III.

Tipo de inhibidor	$(V_{max})_{ap}$	$(V_{max}/K_m)_{ap}$	Patrón dobles recíprocos (Ver Apéndice 1)
Competitivo	V_{max}	$\frac{(V_{max} / K_m)}{1 + \frac{[I]}{K_{ic}}}$	
Incompetitivo	$\frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_{iu}}}$	(V_{max} / K_m)	
No competitivo	$\frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_{iu}}}$	$\frac{(V_{max} / K_m)}{1 + \frac{[I]}{K_{ic}}}$	

Tabla III. Tipos de inhibidor de acuerdo al parámetro cinético que modifican. En los gráficos de dobles recíprocos, la pendiente corresponde al inverso de la eficiencia catalítica (V_{max}/K_m) y la ordenada al origen al inverso de la V_{max} . En las ecuaciones, $(V_{max})_{ap}$ es velocidad máxima aparente (aparente se refiere “en presencia de inhibidor”), el cociente $(V_{max}/K_m)_{ap}$ es la eficiencia catalítica aparente, K_{ic} es la constante de inhibición competitiva que se refiere a la constante de equilibrio: $K_{ic} = [E][I]/[EI]$ y K_{iu} es la constante de inhibición incompetitiva que corresponde a la constante de disociación: $K_{iu} = [EA][I]/[EAI]$.

Todos los patrones gráficos de dobles recíprocos presentados en la Tabla III corresponden a inhibidores totales, por lo que los regráficos de pendientes y ordenadas al origen son funciones lineales de la concentración del inhibidor

(Figura 2A y 2B). Sin embargo, se pueden obtener curvas hiperbólicas si el inhibidor es parcial, o parabólicas (Figura 2C) en el caso de que dos o más moléculas de inhibidor afecten la velocidad o la afinidad de la enzima por su sustrato. En estos casos, los regráficos son funciones hiperbólicas o parabólicas del inhibidor (Figura 2C). Los regráficos son útiles para determinar con mayor precisión el tipo de inhibición una vez que se le ha asignado el carácter de competitivo, incompetitivo o mixto a partir de los gráficos de dobles recíprocos. Para el caso de los regráficos que son lineales, estos son útiles porque también permiten determinar el valor real de las constantes cinéticas K_i , V_{max}/K_m y V_{max} , entre otras (Segel, 1975). Los regráficos, al igual que los dobles recíprocos, no solamente se utilizan para determinar el efecto de inhibidores, sino también para una gran variedad de análisis cinéticos.

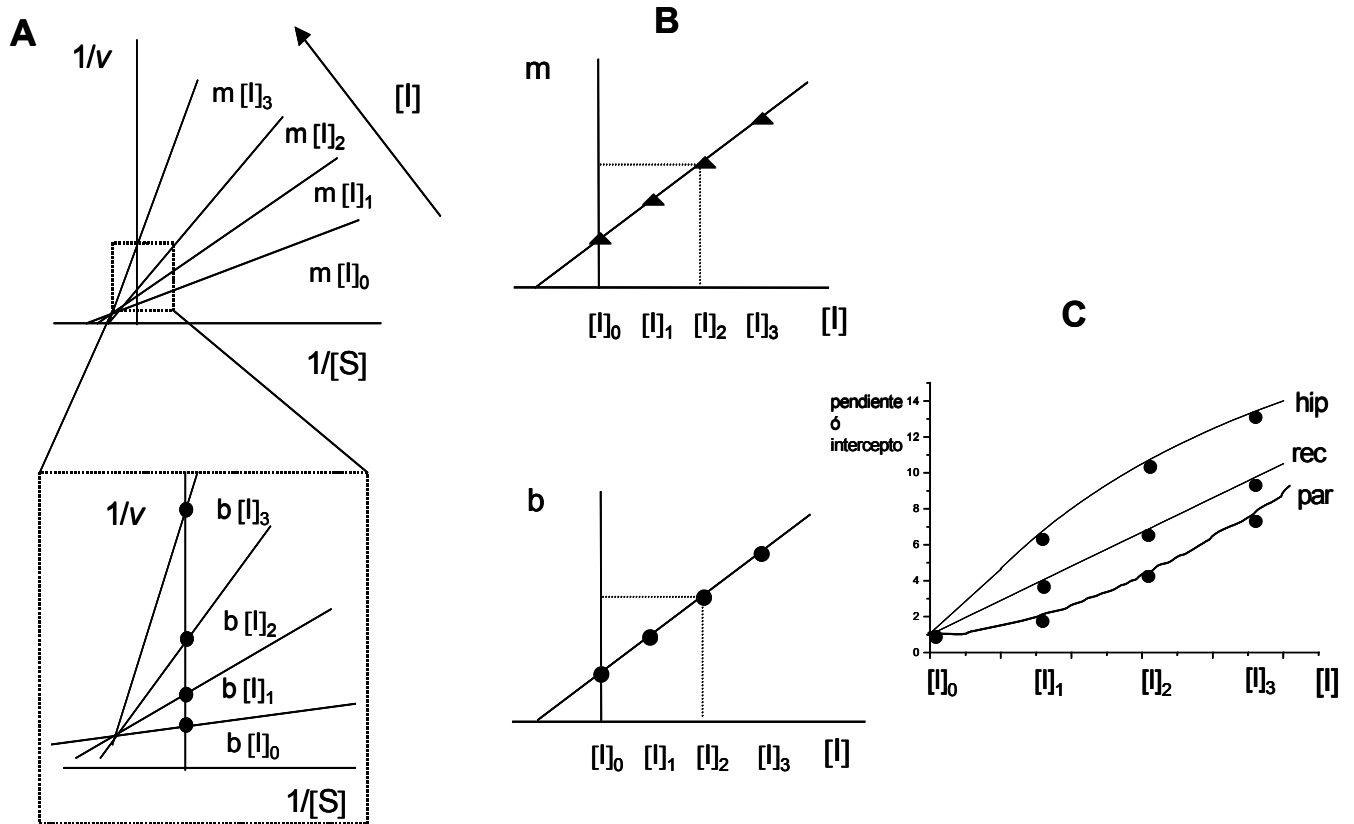


Figura 2. A. Gráfica de dobles recíprocos en la que se indican las pendientes (m) de las rectas obtenidas al variar la concentración de sustrato frente a diferentes concentraciones de inhibidor ($[I]_n$ $n= 0,1,2,3$) y en el recuadro marcado por líneas punteadas se muestra un acercamiento que resalta las ordenadas al origen (b) de cada línea correspondiente a diferentes concentraciones de inhibidor. **B.** Regráficos que se obtienen al graficar la concentración de inhibidor contra las pendientes (superior) y los interceptos (inferior) de la figura A. **C.** Diferentes formas de regráficos de acuerdo al tipo de inhibición del que se trate: **hip** hiperbólico que corresponde a un inhibidor parcial; **rec** recto que corresponde a un inhibidor total y **par** parabólico que corresponde a un inhibidor con más de dos sitios de unión.

Una vez entendido el tema de inhibición se pueden revisar los ensayos particulares de inhibición que se utilizan para determinar los mecanismos cinéticos. Algunos de los inhibidores empleados con este fin son los productos de

la reacción (inhibición por producto), las moléculas análogas a productos o sustratos e inhibidores sin salida.

I. C. 2. a. Inhibición por producto

I. C. 2. b. Reacciones reversibles: relación entre cinética y termodinámica.

La reversibilidad de una reacción depende sobretodo del valor de la energía libre de Gibbs (ΔG). En una reacción catalizada por enzimas, la velocidad neta de la reacción depende de las constantes de Michaelis-Menten de los sustratos y de los productos, así como de la velocidad máxima de las reacciones en ambos sentidos. La relación que existe entre la termodinámica y la cinética está expresada en la ecuación de Haldane, en la que se establecen los límites de la conducta cinética que una enzima puede desarrollar sin desobedecer las leyes de la termodinámica (Ecuación 2) (Cornish-Bowden, 1995).

$$\frac{[P]_{eq}}{[S]_{eq}} = K_{eq} = \frac{V_{maxf}K_{mP}}{V_{maxr}K_{mS}} = \frac{V_{maxf}/K_{mS}}{V_{maxr}/K_{mP}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde $[S]_{eq}$ y $[P]_{eq}$ son las concentraciones al equilibrio del sustrato y producto, respectivamente; K_{eq} es la constante de equilibrio; V_{maxf} y V_{maxr} son las velocidades máximas de las reacciones en sentido hacia delante (forward) y reverso (reverse), respectivamente; K_{mS} y K_{mP} son las constantes de Michaelis-Menten para el sustrato y el producto.

Esta relación de Haldane (Ecuación 2) se obtiene a partir del supuesto de que la velocidad neta de una reacción unirreactante, catalizada reversiblemente por una enzima, debe ser cero cuando se alcanza el equilibrio. En la misma ecuación se observa que puede haber dos diferentes relaciones, la primera de ellas, que está inmediatamente después del signo de igualdad del término K_{eq} , corresponde a una relación entre velocidad y constantes de Michaelis-Menten ($\frac{V_{maxf}K_{mP}}{V_{maxr}K_{mS}}$), en tanto que la última expresión corresponde a una relación entre *eficiencias catalíticas* (V_{max}/K). Este parámetro es un valor propio y particular de cada enzima por cada sustrato. Este parámetro es el que determina cuál es el sustrato preferido de una enzima cuando ésta se encuentra rodeada de una gran diversidad de posibles sustratos. Cada sustrato de la enzima tiene su propio valor de eficiencia catalítica.

Para examinar el intervalo permitido por la termodinámica sobre la conducta cinética se utilizan las constantes de Michaelis-Menten en lugar de las eficiencias catalíticas (Cornish-Bowden, 1995). El sentido termodinámicamente favorecido de la reacción estará complementado, a nivel cinético, por los valores de velocidad más altos y los valores más pequeños de K_m en ese sentido. Por ejemplo, considerando que no hay diferencias entre las V_{maxf} y V_{maxr} , si $K_{mS} \ll K_{mP}$, el equilibrio se alcanzará más rápidamente en sentido de la reacción directa (forward, síntesis de P) que en el sentido reverso y lo contrario sucedería si $K_{mS} \gg K_{mP}$. Cabe mencionar que independientemente de cual sea el valor del ΔG de la reacción, las enzimas SIEMPRE catalizan la reacción por lo que el equilibrio se alcanza en menos tiempo.

Algunas enzimas *in vivo* son capaces de catalizar una reacción de manera reversible, en tanto que otras preferentemente y/o estrictamente lo hacen en un solo sentido. Desde el punto de vista fisiológico, el que una enzima catalice una reacción irreversible tiene mucho sentido, ya que el flujo de una vía metabólica tiene la misma dirección que el sentido directo (forward) de la reacción irreversible. Sin embargo, dentro de las células también existen enzimas que catalizan reacciones reversibles, que participan en diferentes vías y cuyo sentido está determinado por las concentraciones intracelulares y por la afinidad de la enzima por cada uno de los sustratos, como ya se expuso anteriormente.

Independientemente de que una enzima catalice una reacción reversible o irreversible, todas poseen afinidad por su producto, lo cual se explota eficazmente tanto por la célula como por los cinetistas, para determinar los patrones de inhibición que contribuyen muy importantemente al estudio de los mecanismos cinéticos. Dentro de la célula la inhibición por producto se utiliza para regular la actividad de algunas enzimas. Algunos ejemplos de enzimas que presentan este tipo de inhibición son algunos tipos de hexocinasas que se inhiben por su producto: la glucosa-6 fosfato ($K_{i\text{Glc-6-P}} = 0.02 \text{ mM}$ para las hexocinasas tipo I citosólica y II y 0.1 mM para la de tipo III, (Wilson, 2003), la piruvato deshidrogenasa mitocondrial (mtPDC) es inhibida por su producto acetil-CoA : (mtPDC de células vegetales $K_{i\text{NADH}} = 20 \text{ }\mu\text{M}$ y $K_{i\text{acetil-CoA}} = 20 \text{ }\mu\text{M}$ Tovar-Méndez, *et al.*, 2003) y la citrato sintetasa por el citrato (valores para la citrato sintetasa de homogenados de corazón de la trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss*, ($K_{i\text{citrato}} = 8.8 \text{ mM}$, $K_{i\alpha\text{-cetoglutarato}} = 13.95 \text{ mM}$ y $K_{i\text{NADH}} = 0.45 \text{ mM}$, Ferguson *et al.*, 1991).

Para determinar los mecanismos cinéticos se aprovecha la reversibilidad de las reacciones considerando la afinidad de la enzima por sus productos, para estudiar el efecto de éstos sobre la velocidad de la reacción o sobre la afinidad de la enzima por los sustratos. De esta manera se completa el esquema del mecanismo cinético.

I. C. 2. c. Reglas generales para predecir patrones de velocidad inicial.

Con respecto a los estudios cinéticos, la ventaja de la inhibición por producto es que, a diferencia de los ensayos de velocidad inicial, es posible determinar el orden de liberación de los productos, y el de unión de los sustratos. La inhibición por producto se debe a que cuando una reacción es reversible, la velocidad de la misma disminuye conforme el producto se acumula, aún cuando la disminución en la concentración del sustrato sea imperceptible (Cornish-Bowden, 1995). Los patrones de inhibición por producto pueden predecirse más o menos de la misma forma que los patrones de velocidad inicial, a partir de las ecuaciones de velocidad y del efecto del inhibidor sobre las constantes cinéticas V_{\max} y V_{\max}/K_m . Los patrones de inhibición se observan en las gráficas de dobles recíprocos y los efectos del inhibidor sobre las constantes cinéticas se obtienen de los cambios en el intercepto ($1/V_{\max}$) que se simboliza como K_{ij} (la segunda “i” hace referencia al “intercepto”) y de su efecto sobre la pendiente (K_m/V_{\max}) que se expresa en una K_{is} (el sufijo “s” hace referencia a la pendiente, en Inglés “slope”). Muchos autores utilizan este tipo de nomenclatura respecto a las constantes de inhibición, sin embargo, también se utilizan ampliamente los sinónimos K_{iu} (“u” por

el Inglés de incompetitiva, “uncompetitive”) en lugar de K_{ii} y K_{ic} (“c” por competitiva) en vez de K_{is} .

A continuación se revisarán, de manera general, las reglas que Cleland formuló para predecir el efecto de un compuesto (producto de la reacción, sustrato o producto alterno o moléculas análogas a sustrato o producto que forman complejos sin salida) sobre la pendiente o intercepto de las gráficas de dobles recíprocos cuando se varía un sustrato (Cleland, 1963). Estas reglas se resumen y ejemplifican en los problemas bioquímicos publicados en la Revista de Educación Bioquímica (Varela-Gómez M, 2003 y Varela-Gómez M, 2004 *en prensa*) que se incluyen a continuación.

PROBLEMA BIOQUÍMICO

Marcela Varela Gómez,
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Tema: Cinética enzimática: Inhibición por producto

La enzima málica tiene un mecanismo Bi Ter ordenado en estado estacionario en el que participan como sustratos el malato y el NAD⁺ y como productos el

piruvato, el bicarbonato (HCO₃) y el NADPH. Determine usando un diagrama de Cleland el orden de unión de los sustratos y el orden de liberación de los productos de acuerdo a los patrones de inhibición por producto que se presentan en la siguiente tabla:

TABLA I

PATRONES DE INHIBICIÓN POR PRODUCTO DETERMINADOS PARA LA REACCIÓN CATALIZADA POR LA ENZIMA MÁLICA ⁽¹⁾			
Producto Inhibidor	Substrato variable	Substrato fijo no saturante	Tipo de inhibición
NADH	NAD ⁺	malato	Competitivo
NADH	malato	NAD ⁺	No competitivo
HCO ₃	NAD ⁺	malato	No competitivo
HCO ₃	malato	NAD ⁺	No competitivo
Piruvato	NAD ⁺	malato	Incompetitivo
Piruvato	malato	NAD ⁺	Incompetitivo

⁽¹⁾ Hsu RY, Lardy HA, Cleland WW (1967) JBC 242: 5315.

RESPUESTAS AL PROBLEMA BIOQUÍMICO

Los estudios de inhibición por producto son uno de los enfoques más comúnmente utilizados en la determinación del mecanismo cinético de una enzima, debido a que a partir de estos se puede deducir el orden de unión de los sustratos y de liberación de los productos en ambos sentidos de la reacción.

Para estos experimentos las velocidades iniciales se determinan de manera usual pero se utilizan diferentes concentraciones fijas de inhibidor (incluyendo cero) en la mezcla de reacción y concentraciones saturantes o no saturantes del sustrato fijo variable. Cabe enfatizar que la concentración del sustrato fijo debe cuidarse, pues puede modificar el patrón de inhibición por producto. En el caso de la enzima málica presentamos los resultados de los experimentos a concentraciones no saturantes del sustrato fijo (1).

El tipo de inhibición por producto se puede determinar fácilmente al analizar el efecto del inhibidor sobre la pendiente y el intercepto sobre el eje vertical (ordenada al origen) de gráficas de dobles recíprocos.

Un producto (P) actuará como un **inhibidor competitivo** con respecto a un sustrato variable (S) solamente si *P* y *S* son mutuamente excluyentes, lo cual implica que *P* y *S* compiten por la misma forma de la enzima o si *P* se une antes que *S* en una secuencia ordenada para dar lugar a una forma de la enzima que no une *S* (2). En este caso solamente la pendiente del gráfico de dobles recíprocos se ve afectada, pero no la ordenada al origen al variar la concentración del producto (Tabla IIA).

Si en el gráfico de dobles recíprocos los interceptos sobre el eje vertical son los que se modifican y no la pendiente al aumentar la concentración de producto, se obtendrá una serie de líneas paralelas que corresponden al patrón gráfico de un inhibidor de tipo incompetitivo (Tabla IIB). *P* será un **inhibidor incompetitivo** con respecto a *S* solamente si *S* debe unirse antes que *P* en la secuencia de reacción (2). En este caso *P* y *S* no son mutuamente excluyentes porque se unen a diferentes formas de la enzima y no están interconectados por pasos reversibles porque existen entre ellos pasos que experimentalmente no se llevan a cabo (ver explicación más adelante).

P actuará como un **inhibidor mixto o no competitivo** con respecto a *S* si *P* y *S* son mutuamente

excluyentes y *P* puede unirse antes que *S* (2). En este caso tanto las pendientes como los interceptos se incrementan al aumentar la concentración de producto y las líneas convergen en un punto a la izquierda del eje vertical, ya sea por arriba, en o debajo del eje horizontal, incluso pueden no cruzarse en el mismo punto (Tabla IIC). Es conveniente aclarar que se puede clasificar a un compuesto indistintamente como inhibidor no competitivo o como inhibidor mixto. Algunos autores consideran un inhibidor no competitivo a aquél en el que las líneas de dobles recíprocos se cruzan sobre el eje de las equis y al resto de los patrones de cruce (por encima o por debajo) los definen como mixtos (2). Sin embargo, Cleland (3) considera que no existe una justificación teórica sólida que permita distinguir entre ambos tipos de inhibidores, por lo cual define como inhibidor no competitivo a cualquier compuesto que modifique tanto interceptos ($1/V_{m\acute{a}x}$) como pendientes ($K_m/V_{m\acute{a}x}$) en el gráfico de dobles recíprocos al aumentar su concentración.

Una vez revisados estos antecedentes, podemos definir el mecanismo cinético de la enzima málica analizando los patrones de inhibición por producto que se muestran en la Tabla I. En el caso de la enzima málica el producto NADH es un inhibidor competitivo con respecto al sustrato variable NAD^+ , lo cual indica que estas dos moléculas se unen a la misma forma de la enzima. Con esta evidencia podemos proponer que ambas moléculas sólo se pueden unir a la enzima libre (E), es decir, en la reacción forward de la enzima málica el NAD^+ es el primer sustrato que se une y el NADH es el último de los tres productos en liberarse.

Con esta información se puede concluir que el malato se une en segundo lugar. Para apoyar esta propuesta en la secuencia de unión de los sustratos se analiza el tipo de inhibición del NADH con respecto al malato. Si el malato es el segundo sustrato en unirse, eso implicaría que el NADH y el malato se unen a diferentes formas de la enzima (*E* y *ENAD⁺* respectivamente), y en consecuencia, el NADH inhibiría la reacción de manera no-competitiva con respecto al malato. Además el malato y el NADH pueden estar conectados reversiblemente debido a que

TABLA II

PATRONES GRÁFICOS DE DOBLES RECÍPROCOS Y DEFINICIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS

TIPO DE INHIBICIÓN	$V_{m\acute{a}x}_{ap}$	$(V_{m\acute{a}x}/K_m)_{ap}$	PATRÓN GRÁFICO
A. Competitivo	$V_{m\acute{a}x}$	$\frac{(V_{m\acute{a}x}/K_m)}{(1 + I/K_{ic})}$	
B. Incompetitivo	$\frac{V_{m\acute{a}x}}{(1 + I/K_{iu})}$	$V_{m\acute{a}x}/K_m$	
C. No competitivo o mixto	$\frac{V_{m\acute{a}x}}{(1 + I/K_{iu})}$	$\frac{V_{m\acute{a}x}/K_m}{(1 + I/K_{ic})}$	

$V_{m\acute{a}x}_{ap}$ (Velocidad máxima aparente) y $(V_{m\acute{a}x}/K_m)_{ap}$ (Constante de especificidad) para cada tipo de inhibición. P = concentración de inhibidor; K_{ic} = constante de inhibición competitiva; K_{iu} = constante de inhibición incompetitiva.

existe una secuencia ordenada estricta desde la liberación del NADH hasta la unión del malato al complejo enzima-NAD⁺. La interconexión entre un sustrato y un producto por pasos reversibles conduce a una competencia, indirecta, por la enzima. Por

lo tanto esperaríamos que el NADH fuera un inhibidor no competitivo (o mixto) con respecto al malato como se muestra en la Tabla I. Con los datos analizados podemos proponer un esquema cinético parcial de la reacción de la enzima málica (Esquema I).

160

Varela Gómez M



Esquema I. Diagrama de Cleland obtenido a partir de los patrones de inhibición por producto del NADH con respecto a los dos sustratos.

Para determinar el orden de liberación de los otros dos productos (HCO_3^- y piruvato) es necesario analizar sus patrones de inhibición con respecto a ambos sustratos. De acuerdo con los datos que se presentan en la tabla I, el HCO_3^- es un inhibidor no competitivo con respecto a ambos sustratos. Este patrón de inhibición indica que este producto se une a una forma diferente de la enzima a la que se unen los sustratos, pero las cuales están interconectados por pasos reversibles. Por otro lado, el piruvato es un inhibidor de tipo incompetitivo con respecto a ambos sustratos. Esto sugiere que el piruvato se une a una forma de la


enzima diferente a la que se unen los sustratos, pero a diferencia de lo que se determinó para el HCO_3^- , no existen pasos reversibles que interconecten directamente a las formas de la enzima que unen los sustratos y al piruvato. La explicación de que no existan pasos reversibles entre la liberación del piruvato y la unión del NAD^+ y el malato es que entre estos eventos se produce la liberación de otro producto.

Finalmente, con este análisis podemos proponer que el HCO_3^- es el primer producto que se libera y el piruvato el segundo. Por lo tanto el esquema de Cleland final para la enzima málica es el siguiente:



REFERENCIAS

1. Hsu RY, Lardy HA, Cleland WW (1967) *JBC* **242**, 5315.
2. Segel, H I. (1975). *Enzyme Kinetics*. John Wiley and Sons, New York, USA pp 342-344
3. Cleland, W W (1970) *Steady State Kinetics*. *En: The Enzymes volumen 2*. Editor: Boyer PD. Academic Press., New York pp 1-65



**Comercializadora e Importadora de Productos Químicos,
S.A. de C.V.**

Proveedores de Insumos Nacionales e Importados para la Industria Farmacéutica, Química, Cosmética, Alimenticia, Hospitalaria e Investigación

* Biología Molecular	* Fibrosis	* Inmunología
* Microbiología	* Farmacología	* Validación
* Bioquímica	* Virología	* Equipos para Laboratorio
* Inmuno química	* Etc....	

Somos tu mejor opción, cotizaciones en menos de 24 horas, Excelente tiempo de entrega, contáctanos.

Calle 3 Privada Alicia Mz. 8 Lote 3 Col. Cuchilla Pantitlán, México, D. F.
Tel.: 5115-4708 Tel./Fax: 5758-9726 E-Mail: cipquim@hotmail.com

PROBLEMA BIOQUÍMICO

Marcela Lilián Varela-Gómez

BLa asparagina sintetasa A cataliza la reacción de amidación del aspartato para formar el aminoácido no esencial asparagina mediante la hidrólisis de ATP a pirofosfato (PPi) y AMP. Se han hecho experimentos de velocidad inicial y de inhibición por producto, entre otros, para determinar el mecanismo cinético de la asparagina sintetasa A de *Escherichia coli* (3).

En las siguientes tablas se muestran los patrones gráficos de los experimentos de velocidad inicial entre los sustratos y los patrones de inhibición por producto, tanto los determinados experimentalmente para esta enzima trirreactante como aquellos pronosticados para un mecanismo con una reacción parcial ordenada (3).

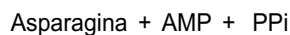


TABLA I.

PATRONES GRÁFICOS DE DOBLES RECÍPROCOS (LINEWEAVER-BURK: LB)
OBTENIDOS DE LOS EXPERIMENTOS DE VELOCIDAD INICIAL.

Sustrato variable	Sustrato fijo variable	Patrón gráfico (LB)
NH ₃	Aspartato	Paralelas
NH ₃	MgATP	Paralelas
MgATP	Aspartato	Intersectantes
MgATP	NH ₃	Paralelas
Aspartato	MgATP	Intersectantes
Aspartato	NH ₃	Paralelas

TABLA I.

PATRONES DE INHIBICIÓN POR PRODUCTO.

Producto	Sustrato variable no saturante	Pronosticado	Experimental
AMP	NH ₃	Incompetitivo	No competitivo
AMP	MgATP	Competitivo	Competitivo
AMP	Aspartato	No competitivo	No competitivo
PPi	NH ₃	Competitivo	Competitivo
PPi	MgATP	No competitivo	No competitivo
PPi	Aspartato	No competitivo	No competitivo
Asparagina	NH ₃	No competitivo	No competitivo
Asparagina	MgATP	Incompetitivo	No competitivo
Asparagina	Aspartato	Incompetitivo	Competitivo

Con los datos de las Tablas I y II diseña en un diagrama de Cleland el mecanismo cinético de la asparagina sintetasa de *E. Coli*.

RESPUESTA AL PROBLEMA BIOQUÍMICO

De acuerdo con la Tabla I, el MgATP y Aspartato tienen un mecanismo cinético secuencial entre ellos. Los mecanismos al azar y ordenado se clasifican como mecanismos SECUENCIALES debido a que es necesario que los dos sustratos (en el caso de una enzima birreactante) estén unidos a la enzima de manera consecutiva formando un complejo ternario para poder llevar a cabo la catálisis. Estos mecanismos secuenciales pueden tener diferentes subtipos de acuerdo a la relación entre los valores de k_{cat} y k_{-1} de cada uno de ellos, ya que puede ser un mecanismo en equilibrio rápido ($k_{cat} \ll k_{-1}$) o en estado estacionario ($k_{cat} \approx k_{-1}$). Los mecanismos secuenciales en general tienen una ecuación de velocidad inicial de la siguiente forma (3):

$$v = \frac{V[A][B]}{K_{ia}K_b + K_A[B] + K_B[A] + [A][B]}$$

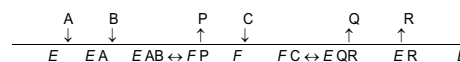
Donde v es la velocidad inicial, A y B son las concentraciones de los sustratos, V es la constante cinética de velocidad máxima, K_A es la constante de disociación del sustrato A, y K_B y K_{ia} son las constantes de Michaelis-Menten para los sustratos A y B, respectivamente.

En el caso del NH_3 , respecto a los otros dos sustratos, MgATP y Aspartato, el patrón gráfico de velocidad inicial es paralelo, lo cual es diagnóstico de un mecanismo Ping Pong. El mecanismo Ping Pong está clasificado como mecanismo cinético NO SECUENCIAL. Es no secuencial debido a que no es requisito que los dos sustratos estén unidos al mismo tiempo a la enzima para que se lleve a cabo la catálisis (1). Estas evidencias sugieren que en este mecanismo cinético Ter-Ter, existen dos reacciones parciales; sin embargo, para determinar el orden de unión de los sustratos y el de liberación de los productos es necesario analizar los patrones de inhibición por producto. En el caso de los patrones de inhibición por producto pronosticados por un mecanismo parcial ordenado (Tabla II), estos sugieren un mecanismo cinético ordenado entre MgATP y Aspartato y una liberación del mismo tipo entre AMP y Asparagina. Esta conclusión se obtuvo a partir de analizar que el AMP es un inhibidor competitivo respecto al ATP, lo cual sugiere que se unen a la misma forma de la enzima y sólo podrían hacerlo si A es MgATP y R el AMP (ambos se unen a la enzima libre: E), o si fueran C y P, respectivamente, y se unieran a la forma F modificada (Ver esquema 1). Sin embargo, la última opción queda completamente descartada porque el AMP proviene directamente del MgATP y no es posible entonces que primero se libere P (AMP) y luego se una C (MgATP) en la reacción "forward". Asimismo, el PPI muestra un patrón de inhibición

de tipo competitivo respecto al NH_3 , indicando que se unen a la misma forma de la enzima, por lo que este par corresponde a P y C, respectivamente.

Si efectivamente el AMP es el último producto en liberarse, entonces la inhibición de este producto con respecto al Aspartato debería ser no competitiva debido a que se unen a diferentes formas de la enzima y están interconectados por pasos reversibles (1). Bajo estas circunstancias se esperaría una inhibición incompetitiva del AMP con respecto a C, debido a que se unen a diferentes formas de la enzima y existe un paso de liberación de producto intermedio entre ellos. En este caso, B y Q serían Aspartato y Asparagina y se esperaría que la Asparagina tuviera una inhibición de tipo no competitivo respecto a C (probablemente NH_3) e incompetitivo respecto a los otros dos sustratos (Aspartato y MgATP).

De acuerdo con todo el análisis anterior, el patrón de inhibición esperado corresponde con el siguiente esquema de Cleland.



Esquema 1. Diagrama de Cleland del mecanismo cinético basado en los patrones de inhibición predichos para la asparagina sintetasa. Donde: **A** MgATP,

B Aspartato, **C** NH_3 , **P** PPI, **Q** Asparagina y **R** AMP.

Respecto a los patrones obtenidos experimentalmente, estos no concuerdan con aquellos predichos para un mecanismo con una reacción parcial en la que los sustratos y los productos se unen de manera ordenada. Las principales diferencias se encuentran en que los patrones de inhibición incompetitiva que se predicen no se presentan y experimentalmente son no competitivos o competitivos. Otra diferencia notoria es el patrón de inhibición competitiva que existe entre los pares AMP/MgATP, Asparagina/Aspartato y PPI/ NH_3 . De acuerdo con las reglas generales para predecir patrones de inhibición por producto (1, 2), **la inhibición competitiva se observa cuando el sustrato y el producto son mutuamente excluyentes**. La mutua exclusión entre moléculas puede deberse a que ambas se unen a la misma forma de la enzima o a que comparten el mismo sitio de unión dentro de la enzima.

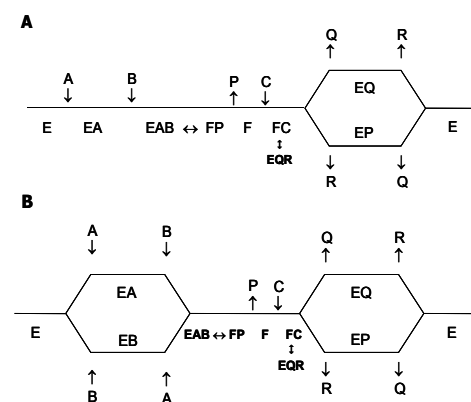
De acuerdo con los patrones de inhibición determinados experimentalmente para la asparagina

sintetasa, las inhibiciones competitivas entre AMP/MgATP y Asparagina/Aspartato se deben a que estas moléculas tienen el mismo sitio de unión dentro de la enzima, lo cual es posible aún a pesar de unirse a diferentes formas de la enzima de acuerdo al mecanismo cinético. Por otra parte, la inhibición competitiva entre el PPI y NH₃ se mantiene tanto en el patrón predicho como en el determinado experimentalmente y puede explicarse como que ambas moléculas se unen a la misma forma de la enzima y no necesariamente a que las dos ocupen el mismo sitio dentro de ella, como es el caso de las moléculas estructuralmente semejantes (como AMP/ATP y Asparagina/Aspartato).

Finalmente, la inhibición incompetitiva entre Asparagina/MgATP, Asparagina/Aspartato y AMP/NH₃ no se observó experimentalmente. Estos patrones incompetitivos constituyen el diagnóstico de un paso intermedio de liberación de producto dentro de la reacción que involucra al par de moléculas que se está analizando (1), confirmándose de esta manera que el mecanismo cinético predicho correspondía a la liberación ordenada de la Asparagina y AMP. Los patrones de inhibición no competitivos determinados para los pares Asparagina/MgATP y AMP/Aspartato, sugieren que la Asparagina y el AMP se liberan al azar (esquema 2A), ya que ambos presentan el mismo tipo de inhibición respecto a los sustratos MgATP y Aspartato.

Con estos datos, no se puede distinguir si los sustratos A y B se unen a la enzima de manera ordenada como se planteó en el esquema 1 o al azar (esquema 2B). Sin embargo, de acuerdo con los datos experimentales interpretados, existen dos posibles mecanismos cinéticos

que pueden ser evaluados posteriormente utilizando otra serie de herramientas cinéticas (por ejemplo: intercambio isotópico, formación de complejos sin salida, ensayos cinéticos con combinaciones de productos y/o sustratos, etc.) para determinar el verdadero mecanismo cinético de la enzima. De hecho, se ha propuesto (3) que la enzima tiene un mecanismo cinético como el que se presenta en la figura 2A.



Esquema 2. Diagramas de Cleland de las diferentes posibilidades de mecanismos cinéticos basados en los datos experimentales mostrados en la Tabla II para la asparagina sintetasa.

REFERENCIAS

- 1.- Segel, H.I. (1975). Enzyme Kinetics. John Wiley and Sons, New York, NY, USA pp. 342-344.
- 2.- Varela-Gómez, M. (2003). Cinética Enzimática : Inhibición por producto. REB 22 (3) : 155, 158-160.
- 3.- Cleland, W W. (1970) Steady State Kinetics *En: The enzymes* Vol. 2. Editor: Boyer P.D. Academic Press. pp. 1-65.

Estas reglas generales tienen sus excepciones, por lo que es necesario considerarlas para poder hacer una predicción precisa sobre el tipo de patrón de inhibición esperado. Algunas de las excepciones a estas reglas, ocurren, por ejemplo, al considerar **concentraciones saturantes o no saturantes de los co-sustratos**, lo cual puede modificar considerablemente el tipo de inhibición. Por ejemplo, el cambio puede ser tan drástico que con la saturación de uno de los co-sustratos puede abatirse la inhibición incompetitiva o no competitiva que se observa a concentraciones no saturantes del mismo. La inhibición incompetitiva se abate a concentraciones saturantes del co-sustrato porque la forma de la enzima a la que se une el compuesto inhibidor tiene muy bajas concentraciones de estado estacionario debido a que la mayoría está formando un complejo con el co-sustrato saturante.

La inhibición competitiva es la única que no puede abatirse, aún en presencia de concentraciones saturantes de los co-sustratos, por lo que se le considera como *inhibición competitiva pura*. Por otra parte, la inhibición no competitiva puede abatirse debido a que al utilizar concentraciones saturantes del co-sustrato, la secuencia de reacción que a concentraciones no saturantes es reversible, puede hacerse irreversible (favorecerse un solo sentido). En este mismo tipo de inhibición no competitiva, la secuencia reversible entre los dos puntos de interés (liberación de producto y unión del sustrato) puede considerarse como irreversible cuando entre dichos puntos existe **la liberación de un producto que no esté presente en el ensayo en concentraciones significativas** (Segel, 1975). De esta manera, aunque pudiera predecirse una inhibición no competitiva, experimentalmente se observaría una inhibición incompetitiva, a menos que se

agreguen concentraciones importantes del producto que se libera entre los puntos de interés.

En la tabla IV se presentan los patrones de inhibición por producto predichos con base en las reglas generales de Cleland para mecanismos cinéticos Bi Bi secuenciales y no secuenciales, considerando concentraciones no saturantes y saturantes del cosustrato. Es muy importante aclarar que estos patrones de inhibición no siempre concuerdan con los que se obtienen experimentalmente. Esto se debe a que los patrones que se presentan en la tabla IV no consideran que el sustrato A y el producto P son moléculas estructuralmente análogas que se unen al mismo sitio dentro de la estructura tridimensional de la enzima y en consecuencia compiten aunque no se unan a la misma forma de la enzima (Ver anexo 1).

Mecanismo cinético	Esquema de Cleland	Concentración cosustrato					
		No saturante			Saturante		
		Prod	Sust var	Patrón	Prod	Sust var	Patrón
Azar (EqR)		P	A B	C C	P	A B	--- ---
		Q	A B	C C	Q	A B	--- ---
Azar (EE)		P	A B	NC NC	P	A B	I I
		Q	A B	NC NC	Q	A B	I I
Ordenado (EqR)		P	A B	--- ---	P	A B	--- ---
		Q	A B	C C	Q	A B	--- ---
Ordenado (EE)		P	A B	NC NC	P	A B	I NC
		Q	A B	C NC	Q	A B	C ---
Theorell-Chance		P	A B	NC C	P	A B	--- C
		Q	A B	C NC	Q	A B	C ---
Ping Pong		P	A B	NC C	P	A B	--- C
		Q	A B	C ---	Q	A B	C NC

Tabla IV. Patrones de inhibición por producto predichos para los mecanismos cinéticos bi bi secuenciales (azar, ordenado y Theorell-Chance) y no secuenciales (ping pong)) considerando concentraciones saturantes y no saturantes del cosustrato. Nótese que en los esquemas de Cleland correspondientes a los mecanismos cinéticos en equilibrio rápido, el complejo ternario de la enzima con los productos y la liberación de los productos tienen un tamaño de letra menor a la del resto de los componentes. Esto se hizo con el fin de señalar que en este tipo de mecanismos la formación de los complejos con los productos y la velocidad de catálisis es baja en comparación con los que se llevan a cabo en estado estacionario (Revisar apartado A). Abreviaturas usadas: EqR: Equilibrio rápido, EE: Estado estacionario, Prod : Producto, Sust var: sustrato variable (se considera cosustrato al que no se está variando en el ensayo), C: Inhibición competitiva, NC: inhibición no competitiva, I: Inhibición incompetitiva, --- No inhibición.

Algunas otras excepciones se refieren a casos más complicados, como por ejemplo: enzimas con más de un sitio catalítico o mecanismos cinéticos no clásicos. Un ejemplo importante con respecto a los patrones de inhibición de un mecanismo ping pong, llamado no clásico por poseer dos sitios catalíticos independientes interconectados por una biotina covalentemente unida es el de la transcarboxilasa descrito por Northrop y Wood en 1969. En este mecanismo los patrones de velocidad inicial indicaban un mecanismo de tipo ping pong, pero los patrones de inhibición por producto no correspondían en lo absoluto con los predichos para un mecanismo clásico. En un mecanismo ping pong clásico P es un inhibidor no competitivo con respecto a A y Q también lo es con respecto a B; por otra parte, P es un inhibidor competitivo respecto a B y Q respecto de A (figura 1, mecanismo bi bi ping pong). Sin embargo, en el mecanismo ping pong no clásico descrito para la transcarboxilasa (Northrop, 1969) se encontró que P (propionil-CoA) era inhibidor competitivo con respecto a A (metilmalonil-CoA) y Q (oxaloacetato) con respecto a B (piruvato). Este tipo de inhibiciones no clásicas se deben a que la enzima tiene dos sitios catalíticos en los que se llevan a cabo, de

manera independiente, las reacciones parciales que intervienen en la carboxilación del piruvato, y la transferencia del grupo carboxilo es mediada por la biotina covalentemente unida a la estructura proteica. En uno de los sitios se une el metilmalonil-CoA que al ceder un grupo carboxilo a la biotina se transforma en propionil-CoA, que ocupa el mismo sitio de unión que el metilmalonil-CoA; es por eso que el tipo de inhibición entre este par de moléculas es competitivo. La biotina carboxilada transfiere el grupo carboxilo al otro dominio de la enzima en donde se une el piruvato. El grupo carboxilo se transfiere al piruvato y finalmente se obtiene oxalacetato que comparte el sitio de unión con el piruvato, así que estas dos moléculas son mutuamente excluyentes, es decir que el oxalacetato es un inhibidor competitivo con respecto al piruvato. Este es uno de los factores que modifica los patrones clásicos de inhibición por producto.

En un mecanismo cinético de tipo *iso*, la enzima tiene un cambio conformacional que controla la velocidad de la reacción. Para una enzima que une sus sustratos y libera sus productos de manera ordenada y que además tiene un cambio conformacional importante entre la forma libre (E) y la enzima modificada (E') que libera al último producto (Q), el patrón de inhibición de Q con respecto a A es no competitivo, en lugar de competitivo, como se predeciría para un mecanismo ordenado clásico. Un ejemplo de este tipo de mecanismo bi bi *iso* ordenado es el de la enzima betaína-aldehído deshidrogenasa de las hojas de amaranto (Valenzuela-Soto *et al.*, 1993). Esta enzima cataliza la oxidación de la betaína aldehído mediante NAD^+ para formar glicina betaína y $\text{NADH} + \text{H}^+$. Los estudios de velocidad inicial sugirieron un mecanismo secuencial.

Por otra parte, los datos de inhibición por producto permitieron descartar un mecanismo al azar en equilibrio rápido. Asimismo, la inhibición no competitiva del NADH (el último producto en liberarse) respecto al NAD^+ (el primer sustrato en unirse) sugirió la presencia de un cambio conformacional importante entre la forma de la enzima que unen al NAD^+ y la que une el NADH. Este cambio limita la velocidad neta de la reacción. Experimentos realizados con compuestos análogos formadores de complejos sin salida apoyaron el mecanismo bi bi *iso* ordenado. La inhibición producida por estos análogos de los sustratos o de los productos se utiliza para determinar mecanismos cinéticos, por lo que a continuación se presenta un apartado en el que se hace referencia a este tipo de herramienta cinética.

I. C. 2. d. Inhibidores sin salida y moléculas análogas a sustratos y/o productos

Las moléculas análogas a los sustratos y productos de la enzima se unen a la misma forma de la enzima con la que se acomplejan los verdaderos sustratos y/o productos, aunque con diferente afinidad, e interactúan con el mismo sitio de unión dentro de la estructura de la proteína. A pesar de que las moléculas análogas se unen a la enzima, la reacción no puede ser catalizada, por lo que se forman complejos sin salida y por eso se les conoce como “inhibidores sin salida” (dead-end inhibitors). Si el inhibidor sin salida se une exactamente en el mismo sitio que el sustrato o producto verdadero, entonces serán mutuamente excluyentes y, en consecuencia, este inhibidor será competitivo puro con respecto al verdadero sustrato (Cleland, 1970). Esta característica es requisito

indispensable para determinar los patrones de inhibición con respecto al resto de los sustratos y así definir o confirmar el mecanismo cinético.

Sin embargo, también hay casos en los que el inhibidor sin salida es capaz de unirse al mismo tiempo que está unido el sustrato verdadero, compartiendo el mismo espacio dentro de la estructura proteica pero unidos a diferentes aminoácidos. El grado en el que antagonizan o sinergizan entre ellos puede dar información relevante respecto a la geometría del sitio de unión y de los cambios conformacionales inducidos por la unión de las moléculas a ese sitio (Cleland, 1970).

En algunos casos se utilizan sustratos o productos alternos que participan en la catálisis de la enzima a diferencia de los inhibidores sin salida. El uso de los inhibidores sin salida y de los sustratos alternos depende del mecanismo cinético y del tipo de información que se requiera para aclararlo (Cleland, 1970).

Para ejemplificar el uso de sustratos o productos alternos, consideremos un mecanismo uni bi ordenado de una enzima que cataliza la hidrólisis de varios ésteres de fosfato. Mediante estudios de inhibición por producto y patrones de velocidad inicial se sugiere que independientemente del éster que se trate, el primer producto liberado (P) depende del tipo de éster hidrolizado y el producto final (Q) es el fosfato. Para comprobarlo se puede utilizar en lugar del sustrato A, el sustrato alternativo D (otro éster de fosfato) que es hidrolizado por la enzima en los productos S (en lugar de P) y Q (que se sugiere es el fosfato). En esta reacción con D se esperaría que los productos S y Q tuvieran el mismo patrón de inhibición que P y Q con respecto al sustrato A, con lo que se establecería más confiablemente el orden de liberación de los productos. Este es sólo un ejemplo

sencillo de un caso supuesto para un mecanismo uni bi, sin embargo, puede haber un mayor número de suposiciones y de posibles patrones de inhibición y de evidencias que apoyarían este mecanismo o lo rechazarían (Cleland, 1970).

El estudio con inhibidores sin salida se utiliza mucho más que la técnica con sustratos o productos alternos porque supone un menor número de complicaciones, ya que los compuestos que forman complejos sin salida no participan en la catálisis de la enzima. *Una de las funciones más útiles de los inhibidores sin salida es la de verificar el orden de adición de los sustratos en aquellos casos en los que los datos de inhibición por producto no sean suficientemente claros.* Debido a que estos inhibidores sin salida no participan en las secuencias de reacción, como lo harían los sustratos o los productos verdaderos, ejercen un efecto sobre las pendientes y/o los interceptos de los gráficos de dobles recíprocos. Estos efectos pueden ser predichos de acuerdo con las reglas propuestas por Cleland para determinar los patrones de inhibición en mecanismos cinéticos (Cleland, 1963). Un inhibidor sin salida forma complejos con una forma de la enzima y constantemente se están asociando y disociando, estableciendo una condición de equilibrio rápido. Generalmente se obtienen patrones gráficos lineales de dobles recíprocos. Sin embargo, cuando más de una molécula de inhibidor sin salida se une a la misma forma de la enzima ($E + I \leftrightarrow EI + I \leftrightarrow EI_2$) o a formas diferentes de ésta, el patrón de dobles recíprocos es parabólico, lo cual complica la interpretación del mecanismo cinético. Para ejemplificar el uso de estos complejos sin salida en la determinación de los mecanismos cinéticos, consideremos un mecanismo bi uni uni bi ping pong en el

que se utiliza un inhibidor sin salida (I) análogo al sustrato C (figura 3). En este mecanismo cinético se predice que I es un *inhibidor competitivo con respecto a C*, debido a que ambos se unen a la misma forma de la enzima (F). Con respecto al sustrato A, la inhibición de I debería ser incompetitiva, ya que se unen a diferentes formas de la enzima (E y F respectivamente) y no están interconectados de manera reversible; en este caso, la saturación con C eliminaría la inhibición. El mismo patrón de inhibición se esperaría si el sustrato variable fuera B.

Sustrato variable	Forma de la enzima	Secuencias reversibles interconectadas	Patrón de inhibición predicho
A	E (libre)	NO	Incompetitivo
B	EA	NO	Incompetitivo
C	F (modificada)	NO	Competitivo

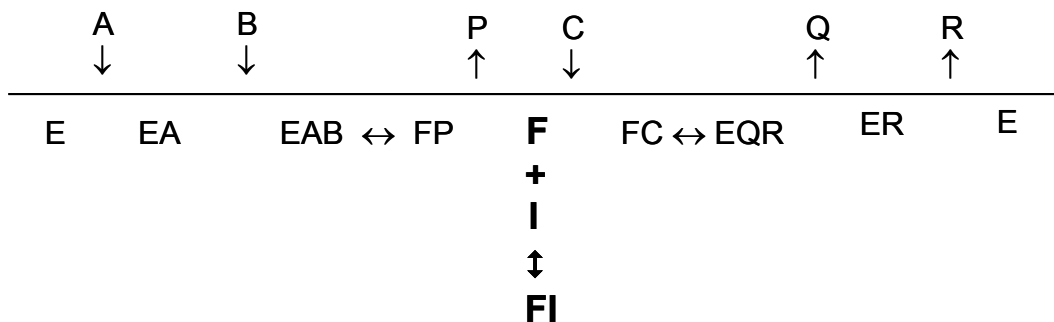


Figura 3. Tabla en la que se resumen los patrones de inhibición predichos para el efecto de un análogo del sustrato C que forma el complejo sin salida FI en un mecanismo bi uni uni bi ping pong. En la parte inferior, el diagrama de Cleland de un mecanismo bi uni uni bi ping pong en el que se muestra la formación del complejo sin salida (FI) promovido por el inhibidor I análogo del sustrato C.

Los patrones de inhibición para un inhibidor sin salida dependen de la forma de la enzima a la cual se une, así como de la concentración de co-sustrato

utilizada, de acuerdo con las reglas que se explicaron anteriormente en el apartado de inhibición por producto. Un análisis mucho más detallado del tipo de inhibición de I con respecto a cualquiera de los tres sustratos (A, B y C), al unirse a las formas de la enzima E, EA, EAB, EQR o ER, en un mecanismo como el que hemos analizado (Figura 3), se enlistan en el trabajo de Cleland de 1963.

La ventaja de las reglas para predecir patrones de inhibición es que se puede sugerir el tipo de inhibición de un producto o inhibidor simplemente por inspección visual del mecanismo cinético de una enzima, sin tener que definir la ecuación de velocidad, que suele ser un procedimiento mucho más elaborado. Asimismo, con estas reglas se pueden construir esquemas cinéticos a partir de los datos obtenidos experimentalmente.

Es común que a altas concentraciones de sustrato, éste se comporte como inhibidor sin salida, por lo que la inhibición por sustrato se considera una herramienta diagnóstica más para determinar mecanismos cinéticos. Entre sus ventajas se encuentran que los experimentos son fáciles de realizar y la interpretación de los resultados generalmente es muy clara. La inhibición sin salida se debe a que el sustrato se une a una forma de la enzima diferente con la que normalmente reacciona; este tipo de inhibición se conoce como lineal o total debido, a que la gráfica de dobles recíprocos es una línea recta. Sin embargo, también puede observarse inhibición hiperbólica o parabólica, si dos moléculas de sustrato se combinan con la misma forma de la enzima para formar un complejo sin salida (Cleland, 1970). La inhibición por sustrato sigue las mismas reglas de

Cleland, para predecir patrones de velocidad inicial en presencia de inhibidores (Sección C.2.a.b.).

Por supuesto que las concentraciones altas de sustrato también pueden reflejarse como un efecto inhibitorio debido a que producen efectos secundarios sobre la viscosidad de la mezcla de reacción, la fuerza iónica, la osmolaridad entre otros. Es por eso que para los experimentos de inhibición por sustrato es necesario establecer el intervalo de concentración que inhibe la reacción por su unión a la enzima y no por efectos sobre las propiedades de la mezcla de reacción.

I. C. 3. Intercambio isotópico.

Esta técnica es la tercera herramienta cinética más utilizada para deducir o confirmar un mecanismo cinético (Cleland, 1970). Los isótopos son átomos del mismo elemento que difieren en el número de neutrones que tienen en el núcleo y por lo tanto en su masa atómica (http://www.ocean.stanford.edu/bomc/chem/lecture_16.pdf). Por ejemplo, el átomo de oxígeno ^{16}O es el más abundante naturalmente (99.8%) y tiene 8 protones y 8 neutrones (masa atómica = 16); el ^{18}O es un isótopo poco abundante (0.2%) y no radiactivo que se diferencia del ^{16}O en que tiene 10 neutrones y su masa atómica es mayor (masa atómica = 18). Los isótopos pueden ser radiactivos o no, por lo que su cuantificación puede llevarse a cabo mediante diferentes técnicas experimentales (entre ellas resonancia magnética nuclear). Algunos de los isótopos más utilizados en este tipo de estudios son ^2H , ^3H , ^{14}C , ^{18}O y ^{32}P . Es importante señalar que existen diferentes usos para los isótopos en el campo de la cinética. Las dos principales aplicaciones son: *el intercambio isotópico y los efectos de los isótopos* (Tabla V). *El intercambio isotópico supone* que la sustitución de un átomo no tiene ningún efecto sobre la cinética de la enzima y solamente se utiliza para identificar moléculas que desde un punto de vista químico son indistinguibles (Cornish-Bowden, 1995). Por otra parte, *los efectos isotópicos* se refieren a que los isótopos de las moléculas sustituidas son capaces de modificar las propiedades cinéticas o de equilibrio (Cornish-Bowden, 1995).

Condición	Intercambio isotópico	Efectos de los isótopos
Característica distintiva	Ningún efecto sobre las propiedades cinéticas.	Efecto sobre las propiedades cinéticas.
Localización de la sustitución del átomo por el isótopo	Alejada del sitio de reacción	Primario: Enlace reactivo Secundario: Alejado un enlace del enlace reactivo Solvente: El enlace que se forma con el solvente
Grado de sustitución	Traza	100% (idealmente)
Propiedad isotópica	Radioactiva	Diferente masa atómica
Isótopos comúnmente utilizados	^3H , ^{14}C , ^{32}P	^2H , ^3H

Tabla V. Características de las diferentes técnicas que utilizan isótopos para estudios cinéticos (Modificado de Cornish-Bowden, 1995)

Las técnicas cinéticas que se han descrito en los apartados anteriores (C1-C2) se refieren a la medición de las velocidades netas observadas para una reacción química. La velocidad neta se refiere a la diferencia entre las velocidades absolutas de ida (forward) y reversa de la reacción completa. La principal diferencia de la técnica descrita en este apartado (C3) con las anteriores (C1-C2) es que *el intercambio isotópico permite medir la velocidad unidireccional de ciertos pasos dentro de una secuencia de reacción* y mediante esto determinar, por ejemplo, el paso que controla la velocidad de la reacción (Segel, 1975).

Por ejemplo, en un mecanismo bi bi ordenado (ver Fig. 1) en presencia de ambos sustratos y productos, la velocidad neta de formación de P será igual a la de formación de Q; sin embargo, en un estudio de intercambio isotópico la velocidad inicial a la cual aparece P a partir del sustrato radiactivo A (A^*) puede ser diferente a la velocidad de formación de Q a partir de B^* (Segel, 1975). Justamente esto es lo que mide el intercambio isotópico y es mediante este tipo de información que puede precisarse el orden de liberación de los productos o la unión de los sustratos y así confirmar o modificar un mecanismo cinético. Los experimentos se llevan a cabo generalmente en condiciones de equilibrio químico, pero no es un requisito indispensable. Además, los ensayos deben hacerse en presencia de uno o más de los productos, ya que sin productos, la velocidad inicial de la aparición de la marca en P o Q es igual a la velocidad inicial de la reacción completa.

Las ecuaciones de velocidad para el intercambio isotópico son generalmente muy complicadas, por lo que es difícil determinar las constantes cinéticas, así que en muchos casos se utiliza sólo como una herramienta cualitativa (Segel, 1975). Estas técnicas son muy poderosas y producen una gran cantidad de información debido a que se usan diferentes combinaciones experimentales (presencia de un sustrato, ausencia de sustratos, presencia de todos los productos o sólo uno, etc.).

Por ejemplo, mediante el estudio de los efectos de diferentes isótopos sobre la catálisis del citocromo P450 1A2 de conejo, se determinaron las velocidades de los pasos individuales de unión de sustratos y liberación de productos de manera individual. Estos datos fueron obtenidos utilizando algunos anisoles marcados en

el grupo metilo como sustratos. A partir de estos experimentos se pudo determinar que (i) la velocidad de unión del sustrato es sumamente rápida ($k > 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$); (ii) que la liberación del producto no es el paso limitante de la reacción; (iii) que el paso de reducción por el primer electrón es rápido, aún en ausencia de ligandos ($k > 700 \text{ min}^{-1}$); (iv) que la unión del O_2 al átomo de fierro del citocromo P450 es tan rápida como la unión del sustrato ;y (v) que el paso más lento (14 min^{-1}) reside en la catálisis del complejo P450 Fe^{2+} - sustrato – O_2 (Guengerich *et al.*, 2004). Se realizó otra serie de experimentos con deuterio para determinar que particularmente dentro del paso catalítico, el verdaderamente limitante de la velocidad era la hidrólisis del enlace C-H de los sustratos (los anisoles). Con toda esta valiosa información se puede construir un esquema detallado del mecanismo cinético del citocromo P450 y también modelos matemáticos para predecir comportamientos cinéticos en condiciones cercanas a las fisiológicas.

Para profundizar sobre este tema existe una gran cantidad de literatura en la que se analizan, de manera detallada, el intercambio isotópico entre cada sustrato y su propio producto junto con la determinación de las ecuaciones correspondientes para los mecanismos cinéticos ordenados, ping pong, y al azar (Segel, 1975: pp 846-883; Cornish-Bowden, 1995: pp: 159-177 y Cleland, 1970: pp:43-52).

I. D. Mecanismos cinéticos de la Piruvato Fosfato Dicinaasa.

La piruvato fosfato dicinasa (PPDK) es una enzima trirreactante que cataliza la transferencia del fosfato del fosfoenolpiruvato (PEP) y del pirofosfato (PPI) al AMP; los productos de esta reacción son el ATP, el piruvato (pir) y el fosfato (Pi).

El estudio cinético de esta enzima con tres sustratos y tres productos es complicado, debido al número de moléculas que participan en la reacción y a las interacciones entre éstas y las tres diferentes formas de la enzima: enzima libre (E), enzima fosforilada (EP) y enzima pirofosforilada (EPP). Sin embargo, existe un extenso estudio de las características cinéticas de la PPDK de diferentes organismos que, en casos como el de la PPDK de *Clostridium symbiosum* (CsPPDK), se complementan con estudios sobre la estructura de la enzima silvestre y de diferentes mutantes. A continuación se presenta una revisión sobre las características cinéticas, estructurales y funcionales de la PPDK, publicada en la Revista de Educación Bioquímica.

ESTRUCTURA, CINÉTICA Y PAPEL DE LA PIRUVATO FOSFATO DICINASA: UNA ENZIMA BLANCO PARA EL DISEÑO DE FÁRMACOS Y CLAVE EN LA FOTOSÍNTESIS C₄*

Marcela Lilián Varela Gómez

RESUMEN

La piruvato fosfato dicinasa (PPDK) cataliza la transferencia de los grupos fosfato del pirofosfato (PPi) y del fosfoenolpiruvato (PEP) a una molécula de AMP para sintetizar ATP, fosfato y piruvato. Se ha encontrado en una gran variedad de organismos, desde bacterias y protistas parásitos hasta plantas de tipo C₄ como el maíz. Esta enzima se propone como un blanco potencial para el diseño de fármacos en contra de los parásitos que la poseen debido a que no está presente en el hospedero humano. En este trabajo se da una visión global acerca de lo que actualmente se conoce sobre la PPDK.

PALABRAS CLAVE: piruvato fosfato dicinasa, enzimas dependientes de pirofosfato, fotosíntesis C₄.

ABSTRACT

Pyruvate phosphate dikinase (PPDK) catalyzes the transfer of phosphate groups from pyrophosphate (PPi) and phosphoenolpyruvate (PEP) to AMP and synthesizing ATP, phosphate and pyruvate. This enzyme occurs in a great variety of organisms such as bacteria, protist parasites, and C₄ plants like maize. Because it is absent from the human host, PPDK has been considered an important target for drug design against parasites. This article reviews the current knowledge about PPDK.

KEY WORDS: pyruvate phosphate dikinase, pyrophosphate-dependent enzymes, C₄ photosynthesis

INTRODUCCIÓN

La piruvato fosfato dicinasa (PPDK) cataliza de manera reversible la transferencia de los grupos fosfato del PEP y el PPi a una molécula de AMP (Fig. 1).

La PPDK se encontró de manera independiente, pero casi simultánea, a finales de la década de los sesentas en las bacterias *Clostridium symbiosum* (1) y *Propionibacterium shermanii* (2), en el protista parásito *Entamoeba histolytica* (3) y en las hojas de varias plantas C₄ tales como el maíz (4). Actualmente existen reportes de PPDK en una gran variedad de seres vivos que van desde organismos unicelulares marinos co-

mo una especie de actinomiceto termófilo (5), pasando por protistas de vida libre como *Euglena gracilis* y protistas parásitos como *Giardia duodenalis* (6), *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania spp.* (7), hasta plantas de tipo C₃ tales como el arroz (8) y algunas especies de plantas con metabolismo C₃-C₄ como *Flaveria* y *Eleocharis* (9, 10). Es importante hacer notar que hasta la fecha no existen reportes de esta enzima en ningún representante del reino animal.

El análisis filogenético de Maldonado y Fairlamb (11) muestra que las PPDKs de tripanosomátidos, bacterias y otros protistas for-

man un grupo diferente del que incluye a las de plantas, lo cual sugiere que la adquisición de este gen pudo haber ocurrido mediante un evento de transferencia horizontal durante los procesos endosimbióticos en los ancestros de estos organismos unicelulares.

REACCIÓN QUE CATALIZA

Mediante estudios de intercambio isotópico se determinó que en presencia de ³²P-fosfoenolpiruvato la PPDK de *E. histolytica* sintetiza ATP marcado en la posición β. Al hacer el experimento en presencia de PPi radiactivo se obtuvo ATP marcado en la posición γ (1-3) (Fig.

*Recibido: 26 de septiembre de 2002 Aceptado: 21 de enero de 2003

Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apartado Postal 70-242, C.P. 04510, México D. F. Tel. 5622-5657, Fax 5622-5630. Correo E: mvarela@ifisiol.unam.mx

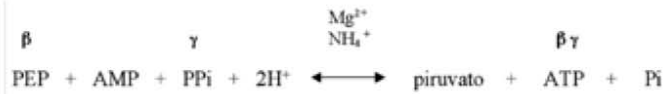


Figura 1. Reacción catalizada por la PPK. PEP: fosfoenolpiruvato; PPI: pirofosfato; Pi: fosfato; β : fosfato β del ATP; γ : fosfato γ del ATP.

1). Reeves *et al.* (1) observaron también que no había incorporación de marca al PEP a partir de fosfato marcado (^{32}Pi), lo cual indica que el PEP se sintetiza a partir del ATP y no por la transferencia del fosfato libre al piruvato. Estudios sobre el equilibrio de la reacción utilizando la PPK de *C. symbiosum* mostraron que la constante de equilibrio varía directamente con el cuadrado de la concentración del ión hidrógeno (Fig. 1). La participación de dos iones hidrógeno en la reacción en el sentido de la síntesis de ATP requiere que los cuatro protones del PPI estén disociados, lo cual sugiere fuertemente que la especie reactiva es el Mg^{2+}PPi (1). La reacción catalizada por la PPK sólo puede llevarse a cabo en presencia de

Mg^{2+} . En la figura 1 se muestra que la reacción catalizada por la PPK también requiere de cationes monovalentes para su activación, como el NH_4^+ . A la fecha no se conoce el papel que desempeña este ión, que es esencial para la mayoría de las PPKs reportadas, con excepción de la de *E. histolytica* (13).

PROPIEDADES FÍSICAS, MOLECULARES Y ESTRUCTURALES

Se ha reportado que la masa molecular de los monómeros de la PPK está entre 94 y 100 kDa (5, 7, 12, 13). Las PPKs de las bacterias *Microbispora rosea* y *G. duodenalis* tienen una estructura dimérica, mientras que las de plantas tipo C_4 y *E. histolytica* son tetraméricas.

La PPK de maíz se inactiva a

temperaturas por debajo de 10°C debido a que el tetrámero activo se disocia formando monómeros y dímeros que pueden ensamblarse nuevamente al elevar la temperatura (12, 14). La inactivación por frío es una característica común de las PPKs de diferentes especies de plantas C_4 . Sin embargo, la velocidad de inactivación varía significativamente incluso entre organismos de la misma especie. La inactivación por frío de la enzima de maíz se evita por la presencia de Mg^{2+} , así como por la unión de piruvato o PEP (14). Resultados obtenidos con mutantes tolerantes al frío de la PPK de *Flaveria brownii* sugieren que los aminoácidos involucrados en esta tolerancia están directa o indirectamente relacionados con la asociación de subunidades y están localizados en el extremo C-terminal (14). Con respecto a otras PPKs se determinó que las de *P. shermanii*, *Flaveria pringlei*, *E. histolytica* y parcialmente la de *C. symbiosum* son sensibles al frío, en tanto que las PPKs de *M. rosea* y *F. brownii* son tolerantes (5, 14).

Actualmente se conoce la estructura cristalográfica de las PPKs de *C. symbiosum* (15) y *T. brucei* (16) con una resolución de 2.3 Å y 3 Å respectivamente. El cristal de la PPK de *C. symbiosum* reveló una molécula de tres dominios plegados independientemente que corresponden a cada uno de los dominios funcionales identificados bioquímicamente (Fig. 2). El dominio C-terminal tiene una conformación de barril α/β que contiene el sitio de unión del par PEP / piruvato. A 45 Å de distancia de este sitio se encuentra el dominio N-terminal con los sitios de unión para AMP / ATP y PPI / Pi. El tercer dominio está entre los anteriormente descritos y contiene a la histidina catalítica (His 455 en la PPK de *C. symbio-*

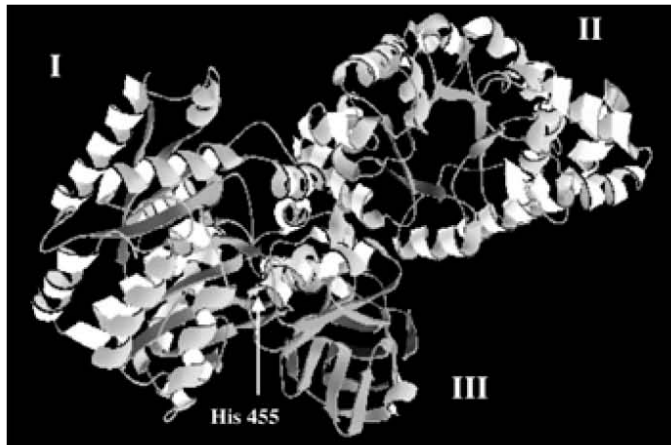


Figura 2. Estructura en modelo de listones del monómero de PPK de *Clostridium symbiosum*. I. Dominio de unión del AMP/ATP; II. Dominio de unión del PEP/piruvato en el que se observa claramente la estructura de barril α/β ; III. Dominio de la histidina catalítica ubicada en la posición 455.

sum) responsable de la transferencia de los grupos fosfato involucrados en la reacción (15).

Para la transferencia del fosfato del ATP al piruvato, el dominio de la fosfohistidina sufre un cambio conformacional dramático, de manera que este residuo es capaz de interactuar alternativamente con los sustratos unidos al dominio amino y al carboxilo, que están separados por 45 Å de distancia (Fig. 3).

CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS

En todas las PPDKs descritas a la fecha, la relación de velocidad inicial contra la concentración de cualquiera de los sustratos sigue una cinética hiperbólica. Para la PPDK de maíz, el requerimiento por ATP no puede ser sustituido por UTP, CTP o GTP (12). La PPDK de *M. rosea* es específica para AMP, no tiene actividad en presencia de UMP, IMP, TMP, CMP y GMP (5).

En la Tabla I se enlistan los valores de las constantes de Michaelis-Menten (K_m) de los sustratos de PPDKs de diferentes organismos. El AMP es el sustrato que presenta los valores más pequeños de K_m (entre 0.85-10 μ M). La mayor afinidad por AMP la tiene la PPDK de maíz (0.85-1.1 μ M). En el otro extremo, el Pi es el sustrato por el que las PPDKs presentan valores de K_m más altos (0.38 - 1 mM). Los valores de K_m de las plantas C_4 son muy parecidos, pero en el caso de las PPDKs de bacterias los valores de K_m no son tan parecidos entre ellas y lo mismo pasa con los valores de los protistas parásitos (Tabla I). Estas diferencias en afinidades pueden atribuirse a la mayor diversidad de estructuras en la familia de PPDKs de los protistas parásitos y que son de un origen diferente al de las PPDKs de plantas.

La actividad de la PPDK en cualquiera de los sentidos de la reacción es dependiente de la presencia de

Mg^{2+} , ya que los verdaderos sustratos de la enzima deben estar acomplejados con este ión. Sin embargo, en el caso de la PPDK de maíz se ha sugerido que este catión divalente es también necesario para mantener a la enzima en su forma activa (11). El Mg^{2+} no puede ser sustituido por otros cationes divalentes tales como Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} en la actividad de las PPDKs de maíz (12), bacterias (1) y protistas parásitos (11), pero en *M. rosea* se preserva un 28% de la actividad en presencia de Mn^{2+} y un 53% en presencia de Co^{2+} (5). El intervalo de concentración óptimo de Mg^{2+} total es de 2 - 5 mM para las diferentes PPDKs.

Los cationes monovalentes tales como NH_4^+ o K^+ también son indispensables para la catálisis de algunas PPDKs como la de maíz (12), *C. symbiosum* (2) y *G. lamblia* (6); sin embargo, la actividad de la

PPDK de *E. histolytica* es independiente de estos iones (13). Aún no se sabe cuál es el mecanismo de activación por los iones NH_4^+ y K^+ de la PPDK, pero se ha descartado que la carga de este catión tenga un papel similar a la del K^+ esencial en algunas piruvato cinasas (PK), ya que en el cristal de *C. symbiosum* se observa un aminoácido cargado positivamente en la posición equivalente a la que ocupa este ión en la PK (15).

El pH óptimo de la reacción en sentido de la síntesis de PEP se encuentra en el intervalo de 8.0 - 8.5 (11) y para la reacción en sentido de formación de ATP es 6.3 - 7 (2, 5, 13).

Se han reportado dos mecanismos cinéticos diferentes para la PPDK (Fig. 4). Se determinó un mecanismo cinético Tri Uni Uni ping pong no clásico (TUU) para la PPDK de *P.*

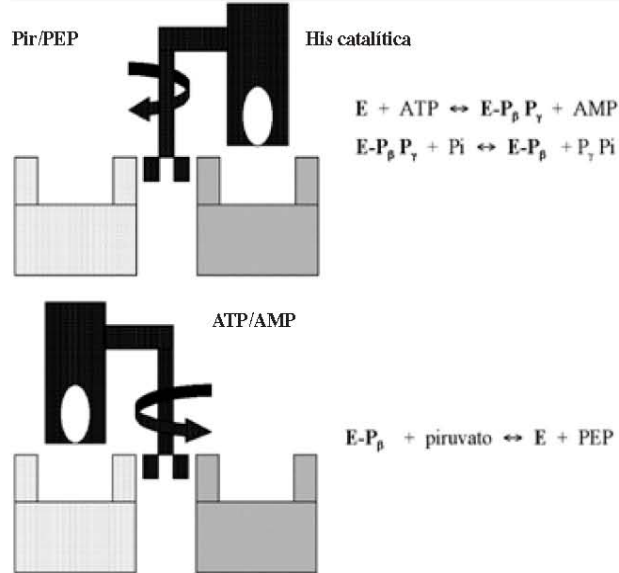


Figura 3. Modelo simplificado de los dos estados conformacionales de la PPDK de *Clostridium symbiosum* incluyendo las reacciones parciales asociadas con cada uno de ellos. ■ Dominio del ATP/AMP, □ Dominio del piruvato/PEP, ● Dominio de la His catalítica. ○ His catalítica.

Shermanii y Bi Bi Uni Uni ping pong (BBUU) para las PPDks de plantas C_4 y *C. symbiosum*. Las principales diferencias entre estos mecanismos residen en que en el mecanismo TUU son tres reacciones parciales las involucradas en la síntesis de ATP o PEP (Fig. 4 A), mientras que en el BUU son sólo dos reacciones parciales (Fig. 3 y 4 B). Esto se debe a que la reacción parcial entre AMP-PPi y ATP-Pi es ping pong en el caso del TUU y secuencial en el caso del BBUU. En el mecanismo BBUU el intercambio Pi-PPi requiere de ATP y AMP y el intercambio ATP-AMP se acelera varias veces en presencia de Pi-PPi, lo que indica que estos sustratos participan en una sola reacción parcial.

PAPEL METABÓLICO DE LA PPDK

El papel fisiológico de la PPDk depende del organismo en el que se encuentre. Por ejemplo, en las plantas C_4 desempeña un papel fundamental en la síntesis de PEP, que es la molécula aceptora del CO_2 atmosférico. Sin embargo, en organismos parásitos se desconoce aún su papel metabólico.

La PPDk es capaz de catalizar la reacción en cualquiera de los dos sentidos, dependiendo de condiciones tales como el pH, las concentraciones de sustratos y productos, entre otros factores. Termodinámicamente, la reacción en el sentido de la síntesis de ATP se favorece a pH 7 y la síntesis de PEP requiere de valores de pH mayores, como 8, que es el que hay dentro del cloroplasto de las células especializadas de las plantas C_4 . Hasta ahora, sólo se ha determinado la constante de equilibrio para la conversión de ATP, Pi y piruvato a AMP, PPi y PEP a pH 7 y 25°C utilizando la PPDk de *C. symbiosum* para catalizar la reacción. Se utilizó $[^{14}C]$ piruvato y se midió la relación $[^{14}C]$ piruvato/ $[^{14}C]$ fosfoe-

nolpiruvato en el equilibrio. Se calculó que la $K_{eq}(\text{obs}) = \frac{[AMP][PPi][PEP]}{[ATP][Pi][\text{piruvato}]}$ es 0.003 (17). En los siguientes apartados se trata de manera particular y con mayor profundidad el papel metabólico de la PPDk.

SÍNTESIS FISIOLÓGICA DE PEP CATALIZADA POR LA PPDK

En plantas C_4 , la PPDk cataliza la reacción en el sentido de la síntesis de PEP. Para asegurar que la reacción catalizada por la PPDk se lleve a cabo en este sentido, se acopla con altos niveles de adenilato cina y pirofosfatasa que disminuyen los niveles de AMP y PPi respectivamente. La fotosíntesis de plantas C_4 depende de la presencia de dos tipos de células fotosintéticas que anatómicamente y bioquímicamente son muy particulares, éstas son las células del mesófilo (superficie de la hoja) y las células de la vaina, adyacentes al tejido vascular (Fig. 5 A). La PPDk se localiza en el cloroplasto de las células del mesófilo en donde el pH es 8. La PPDk sintetiza PEP en este compartimento y después este metabolito se transporta al citosol con el fin de que el CO_2 atmosférico sea fijado por

carboxilación mediante la PEP carboxilasa. Esto produce ácidos dicarboxílicos de 4 carbonos como el oxaloacetato, que luego es convertido a malato por la malato deshidrogenasa dependiente de NADP. El malato es transportado a las células de la vaina y es descarboxilado en el cloroplasto de estas células por una de tres diferentes enzimas, según el tipo de planta: enzima málica dependiente de NADP, enzima málica dependiente de NAD o la PEP carboxicinas. El piruvato formado por la acción de la enzima málica lo utiliza la PPDk para regenerar el PEP aceptor del CO_2 atmosférico y así comenzar de nuevo el ciclo C_4 (Fig. 5 A).

El ciclo C_4 actúa con el fin de concentrar CO_2 en las células de la vaina, donde se encuentra localizada de manera exclusiva la vía reductora de pentosas fosfato. Debido a la alta concentración de CO_2 en estas células, la reacción de oxigenasa de la ribulosa-bisfosfato carboxilasa (rubisco) se suprime, y en consecuencia, la fotorrespiración es despreciablemente baja. Esto permite que estas plantas fotosinteticen con una conductancia estomatal reducida y en consecuencia tengan una al-

TABLA I

Constantes de Michaelis-Menten de los sustratos de la PPDk de diferentes organismos (μM)

Organismo	AMP	PPi	PEP	ATP	Pir*	Pi	Ref.**
<i>P. shermanii</i>	15	120	36	43	100	1000	(5)
<i>C. symbiosum</i>	3.5	100	60	100	80	600	(5)
<i>M. rosea</i>	5	38	280	200	130	-	(5)
<i>G. lamblia</i>	5	29	24	-	-	-	(5)
<i>E. histolytica</i>	<5	100	21	-	-	-	(13)
<i>E. histolytica</i>	<10	100	70	-	-	-	(1)
<i>Saccharum officinarum</i>	<4	40	110	90	110	500	(5)
<i>Zea mays</i> pH 8.0	1.1	40	110	31	95	380	(11)

* Piruvato, ** Referencia

ta eficiencia en la utilización de agua (12). El ciclo C_4 solamente se lleva a cabo durante el día, por lo que las enzimas que forman parte de éste también deben estar reguladas. La actividad de la PPDK de maíz es regulada por la activación de la proteína reguladora de la PPDK (PDRP); la PDRP es activa durante los períodos de luz e inactiva en la oscuridad. La PPDK de maíz tiene una regulación covalente mediada por la PDRP. La inactivación de la PPDK es el resultado de la fosforilación dependiente de ADP de un residuo de treonina altamente conservado y vecino de la histidina catalítica; la inactivación ocurre sobre la forma catalíticamente fosforilada (en la histidina catalítica 389) de la PPDK. El proceso de reactivación involucra la desfosforilación fosforolítica del residuo de Thr, dando lugar al PPI; la activación ocurre más rápidamente con la PPDK no fosforilada en la His catalítica (Fig. 5 B). La velocidad de inactivación de esta enzima depende de los niveles de ADP, así como de su estado de fosforilación, lo cual está directamente influenciado por los cocientes ATP / AMP y piruvato / PEP y por factores ambientales tales como la temperatura.

En las plantas crasuláceas con

metabolismo ácido (CAM) la PPDK también participa de manera importante, ya que es la responsable de la síntesis del aceptor primario del CO_2 atmosférico. Las plantas CAM, como las C_4 , fijan CO_2 atmosférico y lo concentran para saturar a la rubisco y reducir al mínimo la fotorrespiración. A diferencia de las plantas C_4 , las CAM llevan a cabo los ciclos C_3 y C_4 dentro de la misma célula, pero están separados temporalmente. Fijan CO_2 por la noche y lo re-asimilan por el día, con lo que el uso del agua es tan eficiente como en las plantas C_4 .

Como se acaba de exponer, la PPDK tiene un papel importante en la fotosíntesis de las plantas C_4 y CAM; sin embargo, no se conoce su función en hojas de las plantas C_3 o en las intermedias C_3-C_4 . En este tipo de plantas se destaca la presencia de una PPDK citosólica, mientras que en el caso de las plantas C_4 es exclusivamente cloroplástica. Se sabe que en raíces de arroz la expresión de la PPDK citosólica se incrementa frente a situaciones de estrés, tales como baja en la concentración de oxígeno o en situaciones de déficit hídrico (8). También se sabe que la planta intermedia C_3-C_4 *Eleocharis vivipara* es capaz de adoptar un

metabolismo de tipo C_4 bajo condiciones terrestres y C_3 en condiciones acuáticas. Es de suponerse que el desarrollo de la fotosíntesis C_4 en este organismo requiere la presencia de PPDK que sintetice PEP en el cloroplasto. En esta planta, además de una PPDK cloroplástica, existe una PPDK citosólica, pero lo novedoso es que la enzima se encuentra en las raíces, mientras que en las plantas C_4 la PPDK se encuentra exclusivamente en las hojas (10).

Las propionibacterias, como *P. shermanii*, son capaces de crecer con lactato y piruvato como fuente de carbono debido a que pueden convertir piruvato a PEP, que es necesario para la formación de compuestos de 4 carbonos, carbohidratos, glicerol y otros componentes celulares. Esta conversión no ocurre a través de la descarboxilación del oxaloacetato, ni por la reacción reversa de la PK, ni por la actividad de la PEP sintetasa, sino que es catalizada por la PPDK. La actividad de esta enzima se induce hasta 10 veces más en las bacterias cultivadas en lactato en vez de glicerol, posiblemente debido a que la PPDK es esencial para la formación de PEP a partir de lactato (2). También se ha observado una inducción de PPDK en el actinomicete termófilo *M. rosea* cultivado en lactato o piruvato, en contraste con la baja actividad de esta enzima cuando se le cultiva en presencia de maltosa o glucosa (5). Esto sugiere que, *in vivo*, la PPDK cataliza la síntesis de PEP en este organismo.

SÍNTESIS FISIOLÓGICA DE ATP CATALIZADA POR LA PPDK

Debido a la ausencia de PK en protistas sin mitocondrias como *E. histolytica*, se ha sugerido que la PPDK sustituye la función de esa enzima para la síntesis de ATP. Sin embargo, recientemente se reportó la presencia

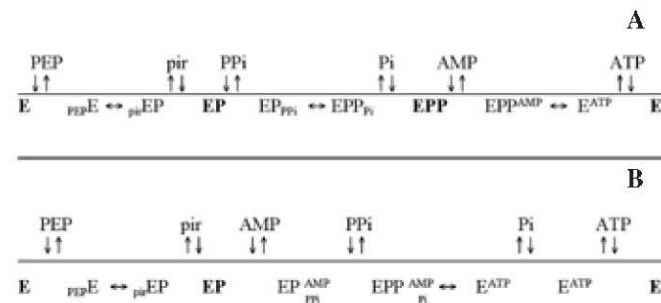


Figura 4. Esquemas de Cleland de los mecanismos cinéticos reportados para la PPDK. A. Mecanismo tri uni uni ping pong (TUU) de la PPDK de *P. shermanii*, B. Mecanismo bi bi uni uni ping pong (BBUU) ping pong de las PPDKs de plantas C_4 y *Clostridium symbiosum*.

de PK en *G. intestinalis* (18). Esto pone en duda la función atribuida a la PPDK en estos protistas. Park *et al.* (18) señalan que la PK y la PPDK de *G. intestinalis* trabajan en el sentido de la síntesis de ATP, ya que la PPDK no puede actuar en el sentido opuesto porque no se ha reportado gluconeogénesis en este parásito. Por otra parte, las contribuciones relativas de la PK y la PPDK a la glucólisis son inciertas (18). Por otra parte, debido a que la concentración de PPi en *G. intestinalis* y *E. histolytica* es alta y ambos carecen de pirofosfatasa inorgánicas, se ha propuesto que la PPDK puede constituir una ruta alternativa para la utilización del PPi y de esta manera incrementar el rendimiento de ATP. La PPDK de *G. intestinalis* pudiera estar involucrada, junto con la adenilato cinasa, en mantener el equilibrio entre adenín nucleótidos que son consumidos o formados por transferencias de energía (18). Todos estos resultados hacen necesario evaluar con mucho más detalle el papel metabólico de la PPDK en estos parásitos.

En *T. brucei*, al igual que en *G. intestinalis* y *P. shermanii*, hay actividad tanto de PK como de PPDK. En los tripanosomátidos estas dos enzimas se encuentran en distintos compartimentos subcelulares: la PPDK es glicosomal y la PK es citosólica (7, 13). En el glicosoma no se ha encontrado actividad de pirofosfatasa, y hay producción de PPi a partir de vías metabólicas tales como la síntesis de purinas y pirimidinas y la β -oxidación. Por lo tanto, se ha sugerido que la PPDK pudiera estar utilizando el PPi glicosomal para sintetizar ATP. Por otra parte, se ha observado que en el estadio de tripomastigote de *T. brucei* (forma alargada presente en el torrente sanguíneo de vertebrados) no existe actividad de PPDK y tampoco hay actividad mitocondrial. Los autores sugieren

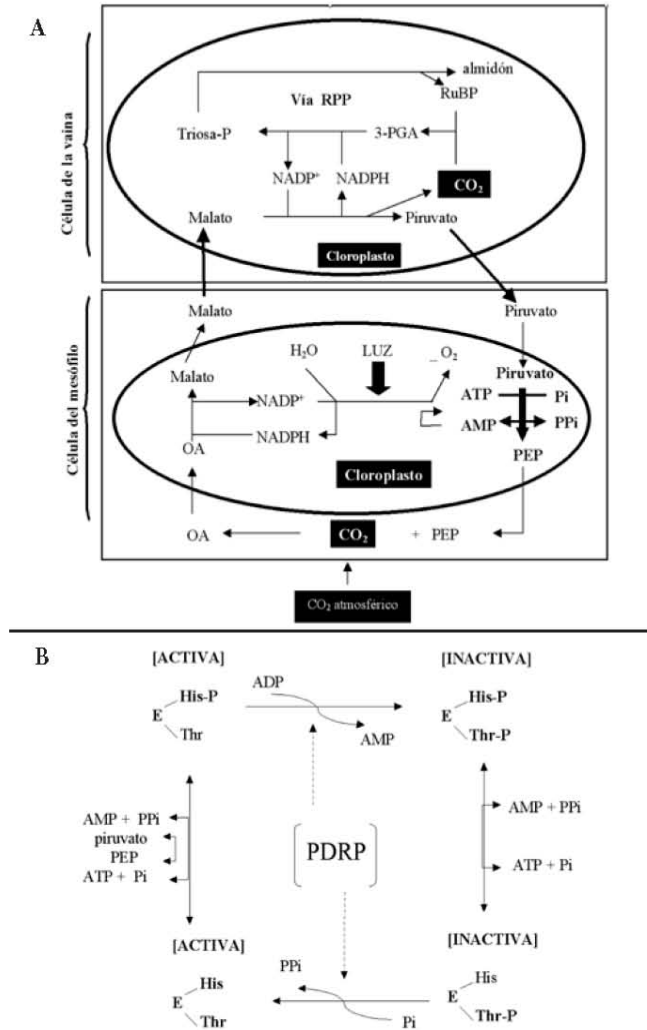


Figura 5. A) Esquema de la vía fotosintética del subgrupo de plantas C_4 que contienen a la enzima málica dependiente de NADP, en el que se resalta el papel de la PPDK en el cloroplasto de la célula del mesófilo. RPP: vía reductora de las pentosas fosfato; RuBP: ribulosa 1,5-bisfosfato; 3-PGA: 3-fosfoglicerato; OA: oxaloacetato. B) Modelo del mecanismo de inactivación mediada por ADP y activación mediada por Pi de la piruvato fosfato dicinasa por acción de la PDRP. Estas reacciones se cree que son responsables de la regulación de la PPDK mediada por los periodos luz-oscuridad en hojas de plantas C_4 . E His: PPDK; E His-P: PPDK fosforilada en la His catalítica; E His-P y E His: representan formas inactivadas de la enzima por fosforilación del residuo de Thr. (tomado de referencia 12).

que la función de la PPDK esté asociada indirectamente con alguna función mitocondrial (síntesis de ATP) en otro estadio del parásito. Los tripomastigotes del torrente sanguíneo expulsan todo el piruvato


producido aeróbicamente, mientras que en otros estadios el PEP es dirigido nuevamente al glicosoma para la formación de L-malato, que es luego reducido a succinato. Por lo tanto, la PPDK podría sintetizar PEP en el glicosoma a partir del piruvato citosólico para luego ser reducido a L-malato. Esto se ve apoyado por la evidencia de que se ha encontrado actividad de una enzima glicosomal requerida para la producción de L-malato, la PEP carboxicinasa, que está presente en todas las formas de vida del parásito, con excepción del tripomastigote (7).

A la fecha no existen estudios que demuestren contundentemente el papel que juega la PPDK en el metabolismo de los protistas parásitos mencionados en esta última sec-

ción, y todo lo que pueda decirse de la participación metabólica de esta enzima es mera especulación. Sin embargo, los estudios a este respecto son necesarios y serían muy útiles, no solamente por el conocimiento básico que se genere, sino también porque esta enzima no está presente en el humano y, en consecuencia, constituye un blanco potencial para el diseño de fármacos en contra de estos parásitos.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se ha generado mucho conocimiento sobre la PPDK con respecto a aspectos tales como el cinético, bioquímico, metabólico e incluso regulatorio en el caso de las plantas C_4 y *C. symbiosum*. Sin embargo, en el caso de la PPDK de protistas pará-

sitos o de otro tipo de plantas tales como las C_3 o las intermedias C_3-C_4 se sabe muy poco. En la mayoría de los casos solamente se tiene una caracterización enzimática muy básica, pero algo tan importante como el papel metabólico que desempeña la PPDK en protistas parásitos no está científicamente documentado. Debido a que esta enzima se ha propuesto como candidato para el diseño de fármacos por su ausencia en el ser humano, es necesario investigar a fondo la importancia metabólica de ésta en cada uno de los parásitos que la poseen con el fin de establecer si verdaderamente constituye un buen blanco para combatir enfermedades tales como la amebiasis, giardiasis, tripanosomiasis y leishmaniasis, entre otras. 

REFERENCIAS

1. Reeves E R, Menzies A R y Hsu S D (1968) The Pyruvate-Phosphate Dikinase Reaction. *J Biol Chem* 243: 5486-5491.
2. Evans J H y Wood G H (1968) The mechanism of the pyruvate, phosphate dikinase reaction. *Biochemistry* 61: 1448-1453.
3. Reeves E R (1968) A new enzyme with the glycolytic function of pyruvate kinase. *J Biol Chem* 243: 3202-3204.
4. Hatch M D y Slack C R (1968) A new enzyme for the interconversion of pyruvate and phosphoenolpyruvate and its role in the C_4 dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. *Biochem J* 106: 141-146
5. Eisaki N, Tatsumi H, Murakami S y Horiuchi T (1999) Pyruvate phosphate dikinase from a thermophilic actinomyces *Microbispora rosea* subsp. *aereata*: purification, characterization and molecular cloning of the gene. *Biochim Biophys Acta* 1431: 363-373.
6. Hiltbold A, Thomas M R y Köhler P (1999) Purification and characterization of recombinant pyruvate phosphate dikinase from *Giardia*. *Mol Biochem Parasitol* 104: 157-169.
7. Bringaud F, Baltz D, y Baltz T (1998) Functional and molecular characterization of a glycosomal PPI-dependent enzyme in trypanosomatids: Pyruvate, phosphate dikinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7963-7968.
8. Moons A, Valcke R y Montagu V M (1998) Low-oxygen stress and water deficit induce cytosolic pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK) expression in roots of rice, a C_3 plant. *Plant Journal* 15: 89-98.
9. Rosche E y Westhoff P (1990) Primary structure of pyruvate, orthophosphate dikinase in the dicotyledonous C_4 plant *Flaveria trinervia*. *FEBS Lett.* 273: 116-121.
10. Agarie S, Kai M, Takatsuji H y Ueno O (1997) Expression of C_3 and C_4 photosynthetic characteristics in the amphibious plant *Eleocharis vivipara*: structure and analysis of the expression of isogenes for pyruvate, orthophosphate dikinase. *Plant Mol Biol* 34: 363-369.
11. Maldonado R A y Fairlamb A H (2001) Cloning of a pyruvate phosphate dikinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 112: 183-191.

12. Edwards E G y Nakamoto H (1985) Pyruvate, Pi dikinase and NADP-malate dehydrogenase in *C₄* photosynthesis: properties and mechanism of light/dark regulation. *Ann Rev Plant Physiol* 36: 255-286.
13. Saavedra-Lira E y Pérez-Montfort R (1998) Expression and characterization of recombinant pyruvate phosphate dikinase from *Entamoeba histolytica*. *Biochim Biophys Acta* 1382: 47-54.
14. Ohta S, Usami S, Ueki J, Kumashiro T, Komari T y Burnell N J (1997) Identification of the amino acid residues responsible for cold tolerance in *Flaveria brownii* pyruvate, orthophosphate dikinase. *FEBS Lett* 403: 5-9.
15. Herzberg O, Chen C, Kapadia G, McGuire M, Carroll J L, Noh J S y Dunaway-Mariano D (1996) Swiveling-domain mechanism for enzymatic phosphotransfer between remote reaction sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2652-2657.
16. Cosenza LW, Bringaud F, Baltz T, Vellieux FM (2002) The 3.0 Å resolution crystal structure of glycosomal pyruvate phosphate dikinase from *Trypanosoma brucei*. *J Mol Biol* 318: 1417-32
17. Dunaway-Mariano D (1999) Intermediates and Energetics in Pyruvate Phosphate Dikinase. *Meth Enzymol* 308: 149-177.
18. Park H J, Schofield J P y Edwards R M (1997) Pyruvate Kinase Is Present in *Giardia intestinalis*. *Exp Parasitol* 87: 153-156.

I. E. Metabolismo energético de *Entamoeba histolytica*.

A nivel funcional, la amiba se aparta de una célula eucariótica típica, ya que carece de ciclo de Krebs y de una cadena de transporte de electrones típica, por lo que la mayor parte del ATP que se produce, proviene de la degradación de la glucosa a piruvato mediante la glucólisis (Saavedra-Lira, 1996). La glucólisis es un proceso metabólico universal que tiene muy pequeñas diferencias desde bacterias hasta los eucariontes más complejos. Una de las desviaciones más significativas del esquema glucolítico convencional se encuentra en algunos protistas unicelulares como *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis* y *Entamoeba histolytica* (Bringaud *et al.*, 1998). Llama la atención que en la glucólisis de organismos amitocondriados y algunos mitocondriados como *Trypanosoma*, el pirofosfato (PPi) reemplaza al ATP en varias reacciones glucolíticas. Los organismos carentes de mitocondrias dependen de una fosfofructocinasa dependiente de PPi (PFK-PPi) y pueden tener una de las otras dos enzimas dependientes de PPi relacionadas con la glucólisis: la piruvato fosfato dicinasa (PPDK) y la fosfoenolpiruvato carboxifosfotransferasa (Bringaud *et al.*, 1998).

E. histolytica requiere de carbohidratos específicos como la glucosa externa o de glucógeno endógeno que puedan ser transformados en glucosa. La entrada de la glucosa a los trofozoítos puede ser mediante un sistema de transporte específico (figura 4 no. 1) o a través de endocitosis. Aunque la endocitosis no es un proceso importante de incorporación de carbohidratos, ya que a través del transporte específico se incorpora aproximadamente 100 veces más glucosa que

la introducida por endocitosis (Martínez- Palomo, 1982). Una vez que la glucosa entra a la célula, se fosforila por ATP para formar glucosa 6-fosfato a través de la acción de una hexocinasa no específica (figura 4, no. 2), regulada por AMP (Martínez- Palomo, 1982). La actividad de la hexocinasa es 20 veces mayor que la velocidad de transporte de glucosa, por lo que no se ha encontrado glucosa libre en *E. histolytica* (McLaughlin y Aley, 1985). Se sabe que la glucosa también se almacena como glucógeno, porque se ha determinado la presencia de este polisacárido en trofozoítos de amiba. Sin embargo, no se conocen los factores que regulan una u otra vía y aún más importante es que, a pesar de que se ha determinado la presencia de UDP-glucosa pirofosforilasa, fosfoglucomutasa y glucógeno fosforilasa, no se ha demostrado la presencia de glucógeno sintasa a la fecha (Takeuchi *et al.*, 1977).

En *E. histolytica* la conversión de fructosa 6-fosfato a fructosa 1,6-difosfato es catalizada por una PFK-PPi (figura 4 no. 4) que es más rápida ($k_{cat} = 325 \text{ s}^{-1}$ Wang *et al.*, 1998) que la también presente PFK dependiente de ATP (PFK-ATP, $k_{cat} = 88 \text{ s}^{-1}$ Wang *et al.*, 1998). La PFK-PPi, a diferencia de la PFK-ATP (figura 4 no. 5), no se regula alostéricamente, por lo que se ha propuesto que el punto de control de la glucólisis no existe en este nivel en la vía de *E. histolytica*. El resto de las enzimas que participan en la glucólisis son solubles y no existe evidencia de organelos subcelulares análogos a los glicosomas de los tripanosomas (McLaughlin y Aley, 1985).

La segunda enzima glucolítica dependiente de PPi es la PPK, que sintetiza ATP por medio de la transferencia de los grupos fosfato del fosfoenolpiruvato (PEP) y del PPi al AMP, obteniéndose además piruvato (pir) y

fosfato (Pi) como productos (fig 4 no. 12). Esta enzima fue reportada por primera vez por Reeves en 1968, quién sugirió que debido a que no se había encontrado actividad de piruvato cinasa (PYK), la PPK debería participar como parte de la glucólisis, sustituyendo la reacción que cataliza la PK ($\text{ADP} + \text{PEP} \rightarrow \text{ATP} + \text{pir}$).

Sin embargo, recientemente se demostró la presencia de PK en extractos de trofozoítos de *E. histolytica* (Saavedra *et al.*, 2004). La PYK de *E. histolytica* (fig. 4 no. 13) tiene regulación alostérica por ciertos ligandos capaces de activar o inhibir su actividad. Se reportó que la fructosa-1,6 bis-fosfato es un activador no esencial, cuyo único y principal efecto fue incrementar la afinidad de la enzima por el ADP, de 1.05 ± 0.24 mM sin activador a 0.21 mM en presencia del activador (Saavedra *et al.*, 2004). También en presencia de activador, la adición de fosfato (50 mM) inhibió la velocidad de la reacción en un 27 % y modificó la afinidad de la enzima por el ADP, pero la mayor inhibición se encontró en presencia de 16.6 mM de citrato (74%), con una disminución de la afinidad por el PEP (Saavedra *et al.*, 2004). Otros ligandos que disminuyen la velocidad de la PYK son el α -cetoglutarato y la fructosa-6-fosfato (Saavedra *et al.*, 2004). Otro aspecto importante de esta enzima es que a diferencia de la mayoría de las PKs eucarióticas, ésta no requiere de iones monovalentes como el K^+ para su actividad, lo cual, junto con un alineamiento de secuencias de aminoácidos del segmento hipotético de PK, apoyan la alta similitud de la enzima de amiba con la de origen bacteriano (Saavedra *et al.*, 2004).

Otra ruta alterna para la formación de piruvato es mediante una transhidrogenación del NADH con el NADP^+ , utilizando la acción secuencial de la

fosfoenolpiruvato carboxitransfosforilasa, la malato deshidrogenasa y la enzima málica. La fosfoenolpiruvato carboxitransfosforilasa de *E. histolytica* cataliza una reacción ($\text{PEP} + \text{Pi} + \text{CO}_2 \leftrightarrow \text{oxaloacetato} + \text{PPi}$) análoga a la reacción que cataliza la fosfoenolpiruvato carboxicinasa, que se encuentra distribuida extensamente en varios protistas parásitos y helmintos ($\text{PEP} + \text{GDP} + \text{CO}_2 \leftrightarrow \text{oxaloacetato} + \text{GTP}$) (McLaughlin y Aley, 1985).

Una vez producido el piruvato, éste puede seguir diferentes rutas catabólicas dependiendo del grado de anaerobiosis; sin embargo, independientemente de las condiciones de oxígeno presente, el fin común es la producción de acetilcoenzima A (McLaughlin y Aley, 1985). Los trofozoítos de *E. histolytica* son capaces de desarrollarse en el lumen del intestino donde el ambiente es esencialmente anaeróbico, aunque también son capaces de consumir oxígeno, a pesar de carecer de mitocondrias. Este metabolismo puede ser ventajoso, ya que le permite al parásito cambiar del ambiente del lumen intestinal, donde la presión de oxígeno es baja, a uno con alta irrigación sanguínea, que se encuentra al invadir órganos sólidos (Martínez-Palomo, 1982).

Los productos de la asimilación de carbohidratos son los mismos no importa si el parásito está metabolizando aeróbica o anaeróbicamente; sólo difieren las proporciones de los productos. Anaeróbicamente la formación de etanol excede la de acetato por una relación 3:1, mientras que aeróbicamente la proporción se invierte y en algunas circunstancias no se forma etanol (Weinbach, 1988).

El acetil-CoA puede formarse a partir de piruvato por la reacción catalizada por la piruvato: ferredoxina oxidoreductasa (fig. 4 no. 14), después este acetil-

CoA puede ser catabolizado por diferentes vías. Por ejemplo, el acetato se forma a partir de acetil-CoA mediante una reacción catalizada por una acetato tiocinasa (fig. 4 no. 15) dependiente de Mg^{2+} y que no utiliza PPI (McLaughlin y Aley, 1985). Por otra parte, en la producción de etanol no participa la piruvato descarboxilasa, ya que no se ha encontrado esta actividad en *E. histolytica* (McLaughlin y Aley, 1985). Se ha propuesto que el acetil-CoA formado a partir de piruvato por acción de la piruvato: ferredoxina oxidoreductasa, se reduce a acetaldehído por una acetaldehído deshidrogenasa (fig 4 no. 16) y finalmente éste se reduce a etanol por una alcohol deshidrogenasa dependiente de NADH (fig. 4 no. 17) o de NADPH (fig. 4 no. 18; McLaughlin y Aley, 1985).

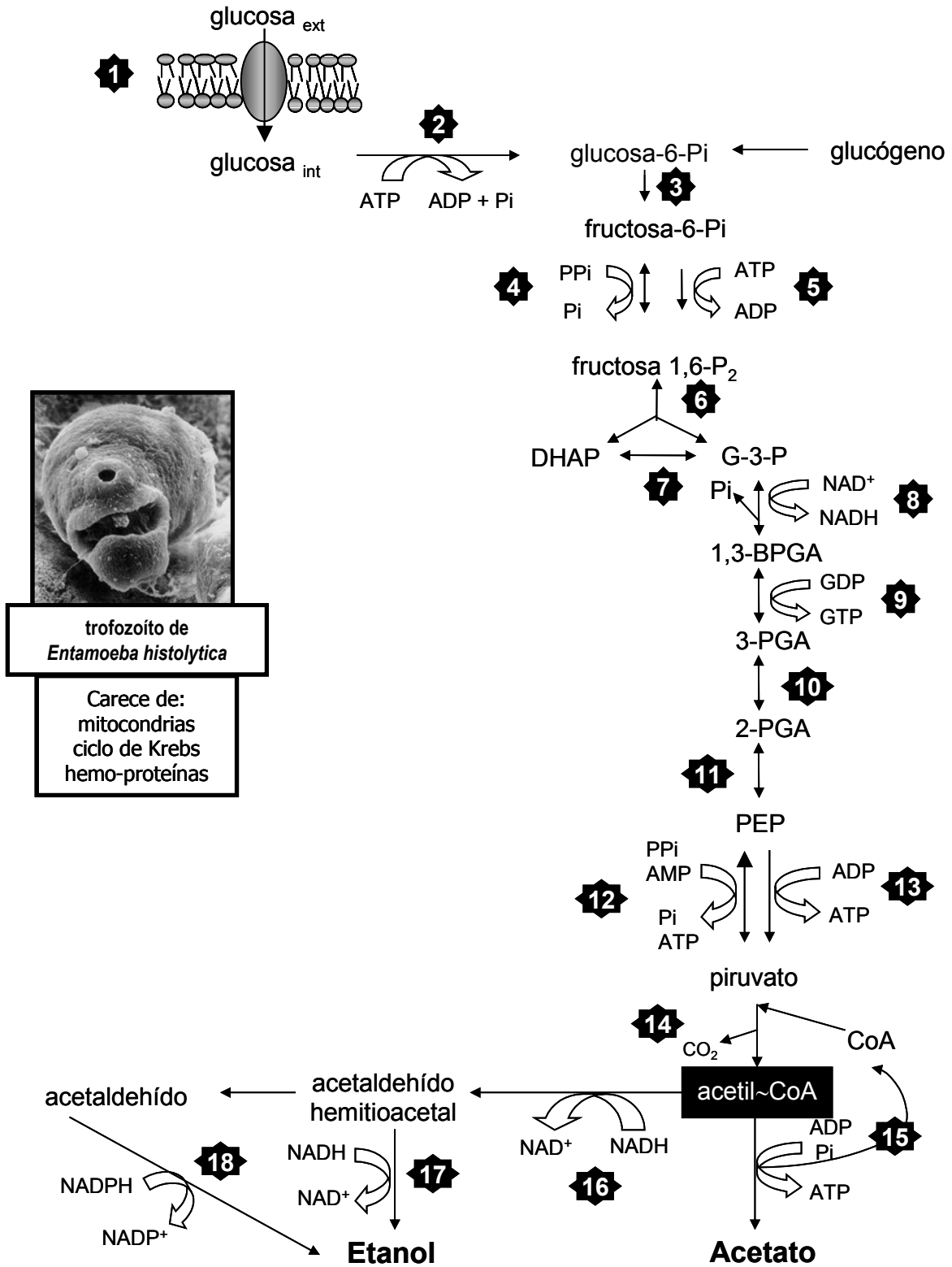


Figura 4. Metabolismo energético de *Entamoeba histolytica*. 1 transportador de glucosa; una vez dentro es transformada en glucosa-6-Pi por una hexocinasa (2),

3 glucosafosfato isomerasa, 4 fosfofructocinasa dependiente de PPI, 5 fosfofructocinasa dependiente de ATP, 6 aldolasa, 7 triosa fosfato isomerasa, 8 gliceraldehído fosfato deshidrogenasa, 9 fosfoglicerato cinasa dependiente de GTP, 10 fosfoglicerato mutasa, 11 enolasa, 12 piruvato fosfato dicinasa, 13 piruvato cinasa, 14 piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, 15 acetato tiocinasa, 16 acetaldehído deshidrogenasa, 17 alcohol deshidrogenasa dependiente de NADH, 18 alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH. Fructosa 1,6-P₂ fructosa 1,6 bisfosfato, DHAP dihidroxiacetona fosfato, G3-P gliceraldehído 3-fosfato, 1,3-BPGA 1,3-bifosfoglicerato, 3-PGA 3-fosfoglicerato, 2-PGA 2 fosfoglicerato.

En condiciones aeróbicas, la amiba tiene una respiración endógena activa estimulada por glucosa, galactosa, piruvato y ciertos alcoholes alifáticos (Weinbach, 1988). La oxidación de piruvato en *E. histolytica* requiere oxígeno molecular y se produce acetato. El acetato producido es muy abundante por lo que se considera como el principal producto final del metabolismo aeróbico de este parásito. (Weinbach, 1988). Sin embargo, aún no se sabe cómo es que los electrones se transfieren de los sustratos reducidos al oxígeno molecular. Tampoco se conoce cuál es el aceptor final de los electrones en condiciones anaeróbicas (McLaughlin y Aley, 1985).

Recientemente se reportó que en la glucólisis reconstruida *in vitro* con las enzimas de amiba (Saavedra *et al.*, 2005), la fosfoglicerato mutasa (PGAM), la PDK ($C^J_{PGAM} = 0.66$ y $C^J_{PDK} = 0.38$) y la triosa fosfato isomerasa (TPI) son las enzimas que ejercen mayor control sobre el flujo de esta vía a pH 7. En estos experimentos se utilizaron condiciones de temperatura y de concentración de algunos metabolitos cercanas a las fisiológicas. Al reconstruir la vía a pH 6 encontraron que el control del flujo se distribuye además de la PGAM y la PDK, en la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (ALDO) y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) ($k_{cat}/K_m = 0.07, 0.59, 0.26$ y 0.79 respectivamente;

Saavedra *et al.*, 2005). Sin embargo, es muy importante considerar la concentración real de cada proteína y de los metabolitos, así como el valor preciso de pH de los trofozoítos de amiba, para poder establecer un blanco terapéutico con mayor confianza. Además de estos avances en cuanto al estudio metabólico de la amiba, es necesario determinar el papel del transporte de glucosa en el control del flujo, ya que hace varios años se propuso que éste es el paso limitante de la velocidad del consumo de glucosa y no su metabolismo (Martínez- Palomo, 1982).

I. F. El papel del pirofosfato inorgánico y el diseño de fármacos.

El pirofosfato inorgánico en la amiba se produce como producto secundario de numerosos procesos anabólicos, tales como la activación de ácidos grasos para su degradación y la activación de aminoácidos durante la síntesis de proteínas. Otra fuente adicional de formación de PPI, es a partir del acetyl fosfato que obtiene la amiba de las bacterias del espacio intestinal y que es transformado en PPI por la PPI-acetato cinasa (McLaughlin y Aley, 1985). En la mayoría de las células la concentración intracelular de PPI se mantiene constante debido a la presencia de pirofosfatasas alcalinas; sin embargo, algunas células son capaces de utilizar la energía de hidrólisis del PPI ($\Delta G^\circ = -4$ kcal/mol) para favorecer algunas reacciones endergónicas para la síntesis de diversos compuestos.. Por ejemplo, la Acetil-CoA sintetasa de *E. histolytica* produce ATP y acetato a partir de acetyl-Co A y PPI inorgánico. Entre este tipo de células se encuentran principalmente bacterias y parásitos como *E. histolytica*, *T. cruzi*, *T. brucei*, *Leishmania*, *G. lamblia*, entre otros. Algunos autores sugieren que la utilización de

Pi por enzimas como la PFK y la PPDK en *E histolytica* es una manera eficiente de utilizar el P_{Pi}; sobretodo porque no se han reportado actividades de pirofosfatasas solubles en este parásito (McLaughlin y Aley, 1985). El P_{Pi} representa una importante fuente de energía en este organismo ya que a pesar de no existir pirofosfatasas, hay varias enzimas dependientes de P_{Pi} que utilizan la hidrólisis de este compuesto para sintetizar ATP (Martínez-Palomo, 1982).

La única pirofosfatasa reportada para esta amiba es una enzima membranal de la cual no se sabe qué tanto participa en la regulación de la concentración de P_{Pi} (McLaughlin y Aley, 1985). Sin embargo, debido a que la afinidad de la pirofosfatasa membranal por el P_{Pi} ($K_{m_{P_{Pi}}} \approx 1 \text{ mM}$, McLaughlin y Aley, 1985) es mucho menor que la de la PFK y la PPDK por el mismo sustrato ($K_{m_{P_{Pi}}} = 40 \text{ }\mu\text{M}$, Wang *et al.*, 1998 $K_{m_{P_{Pi}}} = 101 \pm 10 \text{ }\mu\text{M}$ Varela-Gómez, 2000 respectivamente), y debido a que la concentración de P_{Pi} que se ha encontrado en los trofozoítos de amiba está en el intervalo de 100-350 μM (McLaughlin y Aley, 1985 y Reeves, 1975), se sugiere que no existe competencia entre ellas y que las últimas (PFK y PPDK) tendrían un papel más relevante en la regulación de la concentración de P_{Pi}, que la pirofosfatasa membranal.

Existen varias coincidencias entre los pares de enzimas dependientes y no dependientes de P_{Pi}, las PFKs y PPDK/PYK. En ambos casos, las enzimas que utilizan P_{Pi} (PFK-P_{Pi} y PPDK) no tienen regulación alostérica y son más rápidas que las no dependientes de P_{Pi} ($k_{cat} \text{ PFK-P}_{Pi} / k_{cat} \text{ PFK-ATP} = 3.7$; $\text{nmoles min}^{-1}(\text{mg}^{-1}) \text{ PPDK} / \text{nmolesmin}^{-1}(\text{mg}^{-1}) \text{ PK} = 1.35$; Wang *et al.*, 1998, Saavedra *et al.*, 2004 respectivamente).

Estas características del metabolismo energético de *E. histolytica* son tema de interés de muchos grupos que quieren comprender cómo sobrevive este parásito y la manera de inhibir su crecimiento. Se han utilizado diferentes enfoques para inhibir el crecimiento de las amibas, debido a que estos parásitos son resistentes a los fármacos con los que comúnmente se trataban, además de que estos medicamentos tienen efectos secundarios sobre el hospedero. La emetina, potente amebicida, tiene severos efectos secundarios en el intestino, hígado, corazón y otros órganos debido a su alta acumulación y lenta eliminación (Upcroft *et al.*, 2001). El metronidazol tiene muchos menos efectos secundarios que la emetina, pero existen muchas cepas axénicas de *E. histolytica* resistentes a este fármaco y los quistes generalmente no son eliminados con este medicamento. Por eso, los tratamientos contra amibiasis consisten en una combinación de iodoquinol y metronidazol.

Desde hace varios años se hace investigación para inhibir el metabolismo de la amiba y otros parásitos con compuestos dirigidos contra las enzimas propias del parásito pero ausentes del hospedero humano, tales como la PPI-PFK (Byington *et al.*, 1997. Bruchhaus *et al.*, 1996) la PDK (Saavedra-Lira, 1997), la farnesil pirofosfato sintetasa (Garzón *et al.*, 2004) y la pirofosfatasa vacuolar de protones (Rodríguez *et al.*, 2000) entre otras. Los principales inhibidores que se han utilizado para inhibir estas enzimas y el crecimiento de los parásitos, son los bifosfonatos, que son moléculas análogas al PPI y que se utilizan en el tratamiento de la osteoporosis. Muy recientemente se ha trabajado en el diseño de fármacos o inhibidores del crecimiento de los parásitos a raíz del conocimiento de que

algunos de ellos poseen mecanismos específicos de interferencia de RNA (Ullu *et al.*, 2004, Kaur y Lohia, 2004).

CAPÍTULO II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II. A. Hipótesis.

El mecanismo cinético de la piruvato fosfato dicinasa de *Entamoeba histolytica* posee mayor semejanza con el mecanismo cinético uni uni bi bi ping pong no clásico reportado para *Clostridium symbiosum* y plantas C₄ como *Zea mays*. Este tipo de mecanismo difiere del mecanismo hexa uni ping pong, reportado para la enzima de *Propionibacterium shermanii*. Con respecto al papel metabólico de la PPDK en *E. histolytica*, se propuso que participaba en la glucólisis, ocupando un papel importante en la síntesis de ATP, la principal fuente de energía de este parásito.

II. B. Objetivos generales y particulares.

Para evaluar las hipótesis expuestas en el párrafo anterior se plantearon los siguientes objetivos:

1. Determinar el mecanismo cinético de la EhPPDK.
 - 1.a. Establecer los patrones de velocidad inicial de los sustratos y compararlos con los previamente reportados.
 - 1.b. Estudiar la inhibición por producto de cada uno de los productos respecto a cada uno de los sustratos.
 - 1.c. Determinar el orden de unión entre el PPi y el AMP por técnicas experimentales diversas.

2. Determinar el valor del ΔG de la reacción catalizada por la EhPPDK en condiciones cercanas a las fisiológicas (pH 6.3 y 37 °C).

2.a. Determinar la constante de equilibrio de la reacción catalizada por la EhPPDK, en condiciones cercanas a las fisiológicas, y calcular el valor del ΔG estándar.

2.b. Determinar las concentraciones intracelulares de los sustratos y productos de la EhPPDK para calcular la constante de acción de masas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS.

III. A. Mecanismo cinético

III. A. 1. Ensayos con los inhibidores sin salida: AMPS y PNP.

Estos experimentos se diseñaron con el fin de determinar el tipo de inhibición de la adenosina 5' monofosforotioato (AMPS) y del imidodifosfato (PNP) con respecto a los sustratos verdaderos de la enzima (AMP y PPI). La mezcla de reacción de los ensayos para determinar el tipo de inhibición del AMPS respecto al AMP estaba compuesta por 50 mM de imidazol (pH 6.3), 20 mM de NH_4Cl , 0.2 mM de NADH, 10 mM de MgCl_2 , 0.5 mM de PEP, 0.5 mM de PPI y 13 U de lactato deshidrogenasa (LDH). En estos ensayos el AMP fue el sustrato variable y las diferentes concentraciones utilizadas estuvieron en el intervalo de 5 a 100 μM y las concentraciones de AMPS variaron desde 0 hasta 1 mM.

Los ensayos para determinar la inhibición de PNP respecto a PPI se hicieron en un amortiguador de 50 mM de imidazol (pH 6.3), 20 mM de NH_4Cl , 0.2 mM de NADH, 10 mM de MgCl_2 , 0.05 mM de PEP, 0.05 mM de AMP y 13 U de lactato deshidrogenasa. Las concentraciones de PPI variaron entre 10 y 300 μM , mientras que el intervalo de concentraciones de PNP fue 0-1 mM.

III. A. 2. Ensayos de velocidad inicial con moléculas análogas al AMP (CMP, GMP y TMP).

Estos experimentos se diseñaron con el fin de probar si la EhPPDK podía utilizar como sustrato algún otro nucleótido monofosfato además del AMP y para

determinar si alguno de estos podía ser utilizado como molécula formadora de complejo sin salida para determinar el orden de unión entre el AMP y el PPi.

Los ensayos se hicieron en amortiguador de imidazol 50 mM pH 6.3, 20 mM de NH_4Cl , 0.2 mM de NADH, 0.6 mM de PEP, 3.8 mM de PPi, 13 U de LDH, 10 mM de MgCl_2 y 0.2 mM de cada nucleótido monofosfato adicionados de manera independiente (citidina monofosfato ó CMP, guanidina monofosfato ó GMP y timidina monofosfato ó TMP).

También se diseñaron los experimentos para determinar el tipo de inhibición del GMP respecto al AMP. La velocidad de la reacción catalizada por la EhPPDK se determinó a 25 °C en amortiguador de imidazol 50 mM (pH 6.3), 20 mM de NH_4Cl , 0.2 mM de NADH, 0.05 mM de PEP, 0.1 mM de PPi, 13 U de LDH, y 36 mM de MgCl_2 , el intervalo de concentración de AMP fue de 0.01-0.1 mM y para GMP de 0 a 20 mM.

III. A. 3. Experimentos de fluorescencia.

Estos ensayos se hicieron con el fin de determinar si había algún cambio conformacional importante debido a la unión de los sustratos a la EhPPDK, y de esta manera determinar el orden de unión de los sustratos. El medio de reacción en el que se obtuvieron los espectros de fluorescencia (espectrofluorómetro SLM Aminco) consistió en amortiguador MES 60 mM pH 6.3 en lugar de imidazol, porque éste último interfería con la absorción y la emisión de fluorescencia.

Todas las mezclas de reacción contenían además de MES, 10 mM de MgCl_2 y 0.06-0.2 mg de EhPPDK. El espectro de emisión se obtuvo excitando a

una longitud de onda de 295 nm y el de excitación manteniendo fija la longitud de emisión a 360 nm. Con esta longitud de onda se reportó la fluorescencia de los triptofanos 213, 527 y 852 de cada monómero de EhPPDK. Los ensayos consistieron en: a) EhPPDK como control, b) EhPPDK + 0.6 mM de PEP, c) EhPPDK + 4 mM de PPI, d) EhPPDK + 0.6 mM de AMP, e) EhPPDK + 0.6 mM de PEP + 4 mM de PPI, f) EhPPDK + 0.6 mM de PEP + 0.6 mM de AMP, g) EhPPDK + 0.6 mM de PEP + 0.6 mM de AMP + 4 mM de PPI.

III. A. 4. Estabilidad térmica de la EhPPDK.

Se estudió la desnaturalización térmica de la EhPPDK incubando a la enzima con cada uno de sus sustratos por separado y varias combinaciones de estos. Todos los ensayos se hicieron en el amortiguador de 60 mM de MES pH 6.3, 6 mM de $MgCl_2$, 0.15 mg/mL de EhPPDK y a 55°C durante 30 minutos, obteniendo alícuotas cada 5 y 10 minutos. Se midió la actividad específica de cada una de estas alícuotas en 50 mM de imidazol pH 6.3, 6 mM de $MgCl_2$ a 25°C y a concentraciones saturantes de los sustratos (0.6 mM PEP, 0.6 mM PPI y 1 mM PPI). Los diferentes ensayos montados para este apartado fueron: a) Ensayo control solamente con EhPPDK, b) EhPPDK + 0.08 mM de PEP, c) EhPPDK + 0.4 mM de PPI, d) EhPPDK + 0.08 mM de AMP, e) EhPPDK + 0.08 mM de PEP + 0.08 mM de AMP, f) EhPPDK + 0.08 mM de PEP + 0.4 mM de PPI.

III. A. 5. Inhibición por producto: Pi con respecto a AMP (PPI saturante) y Pir con respecto a PPI (AMP saturante).

Los experimentos de inhibición por producto a concentraciones saturantes de uno de los cosustratos se hicieron en una mezcla de reacción que contenía 50 mM de imidazol pH 6.3, 0.05 mM de PEP, una concentración saturante de PPI (1mM), concentraciones variables de Pi (0-40 mM) y AMP (10-200 μ M). La concentración de magnesio libre se mantuvo constante a 7 mM. La reacción de la EhPPDK se midió a 25°C y en presencia de 13U de LDH y 0.2 mM de NADH. Para los ensayos de inhibición de Pir (0-1mM) con respecto a PPI (30-300 μ M), la concentración de AMP se mantuvo saturante a 1 mM y las demás condiciones se mantuvieron como se describió en el párrafo anterior. Las ecuaciones se dedujeron utilizando el programa de computadora REFERASS (Varon *et al.*, 1997).

III. B. Papel metabólico

III. B. 1. Características de los trofozoítos de *E. histolytica*.

Los trofozoítos de *E. histolytica* cepa HM1:IMSS nos los proporcionaron en el laboratorio de la Dra. Irgard Montfort, sede de la Facultad de Medicina de la UNAM en el Hospital General. Se cosecharon en la fase estacionaria de crecimiento después de 72 horas de cultivo. Las amibas se cultivaron a 37°C en medio TYI-S-33 suplementado con 10% de suero de bovino adulto y 3% de una mezcla de vitaminas. Los trofozoítos se centrifugaron a 1500 rpm durante 3 minutos y 10°C.

III. B. 2. Determinación del volumen intracelular de *E. histolytica*.**III. B. 2. a. Citometría.**

Una vez centrifugadas las células (5×10^6) se resuspendieron en amortiguador de fosfatos 0.14 M (pH 7.2). Las células se incubaron a temperatura ambiente, o se colocaron en hielo seco, con el fin de que los trofozoítos redujeran su volumen y adoptaran una forma esférica en lugar de ameboide. Una vez obtenida esta forma esférica, las células se fijaron con una solución de formol al 10% para obtener datos de citometría más confiables. Se determinaron por citometría la dispersión frontal (FSC) y la dispersión de tamaño (SSC) en un citómetro FACSCalibur de Becton Dickinson. También se adquirieron los datos de citometría de esferas sintéticas de látex de 6 μm , 9.6 μm , 20 μm y 65 μm (estándares de tamaño para el contador Coulter CC L6, L9.6, L20 y L65 de Coulter Corporation) con el fin de extrapolar la información obtenida para los trofozoítos y determinar el volumen de estas células.

III. B. 2. b. Determinación con inulina radiactiva.

Los trofozoítos se lavaron tres veces con un medio de 250 mM de sacarosa, 100 mM de Hepes pH 7.2 y 1 mM de EGTA (SHE).

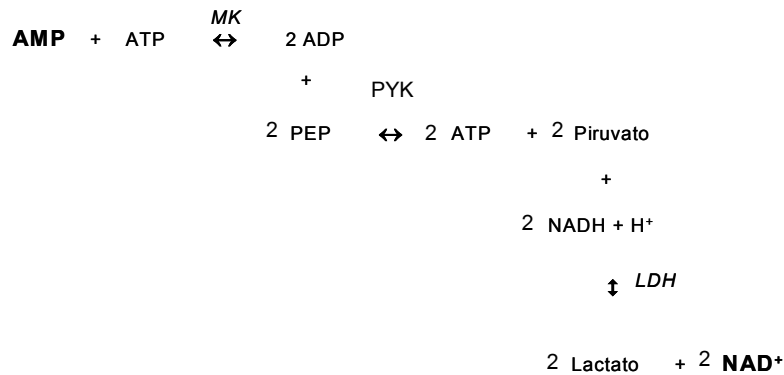
Se incubaron 1×10^7 células en presencia de agua tritiada (aproximadamente 110,000 cpm) durante 45 segundos y 25 °C y la misma cantidad de células, de manera independiente, se incubó en presencia de [^3H]-inulina (aproximadamente 60,000 cpm) durante 15 segundos y 25 °C. Al término de esta incubación las amibas se colocaron en gradientes de bromododecano y silicón con una capa de ácido perclórico (PCA) al 30% que al ser más densa que

el bromododecano o el silicón, se ubicaba en el fondo del gradiente en el tubo de microfuga. Arriba de esta solución hidrofílica se encontraba la capa hidrofóbica de bromododecano/silicón y sobre ésta, una capa de amortiguador SHE en la que se resuspendían los trofozoítos previamente incubados con $^3\text{H}_2\text{O}$ o [^3H]-inulina. Los tubos se centrifugaron a 17,000 rpm durante 4 minutos y a 4 °C. Finalmente se tomó una muestra de 2/3 partes de la fase que contenía a las amibas y la misma proporción de la fase de PCA y se determinó la radiactividad (cpm) en las fracciones superior e inferior en un analizador de centelleo líquido Packard Tri-carb 2100 TR. El volumen intracelular se calculó de acuerdo con lo reportado por Avilés y colaboradores (2003).

III. B. 3. Determinación de metabolitos en extractos ácidos de trofozoítos de *E. histolytica*

En la sección “Metabolic Role” del artículo de Varela-Gómez *et al.*, 2004 se describe el método para determinar la concentración de cada uno de los sustratos de la EhPPDK (PEP, AMP, PPi, piruvato, fosfato y ATP), así como del Mg^{2+} . Para medir el AMP también se utilizó el ensayo de miocinasa (MK) y piruvato cinasa (PYK) acopladas con lactato deshidrogenasa (LDH), en lugar de EhPPDK acoplada a LDH. Este método no se reportó en el artículo debido a que el ensayo con MK no funcionó con los extractos, a diferencia de cuando se utilizó la EhPPDK. El ensayo que utiliza a la MK contenía 20 mM de MOPS (pH 7.8), 5mM de MgSO_4 , 150 mM de KCl, 1mM de PEP, 1mM de ATP, 0.04 mM de NADH, 1U de MK, 1U de PK y 1U de LDH. En el ensayo se sigue la desaparición de NADH

en el espectrofluorómetro, debido a la transformación de piruvato a lactato mediante la LDH. El piruvato lo produce la PYK que utiliza al PEP del ensayo y al ADP que produce la MK y que depende de la concentración de AMP en el extracto ácido (Ver esquema inferior).



Esquema de la reacción de la miocinasa (MK) acoplada a piruvato cinasa (PYK) y lactato deshidrogenasa (LDH) para cuantificar AMP.

III. B. 4. Consumo de protones de la reacción catalizada por la EhPPDK

Se determinó el número de protones consumidos durante la síntesis de ATP catalizada por la EhPPDK, siguiendo el cambio de fluorescencia de la piranina. En los ensayos se utilizó como amortiguador 0.5 mM de imidazol pH 6.3, 3 μM de piranina y 6 mM de MgCl_2 . En cada experimento se utilizaron soluciones estándar y calibradas de HCl y NaOH. Asimismo, se determinó el incremento de la fluorescencia de la piranina al añadir diferentes concentraciones de EhPPDK (0 - 0.01 mg), con el fin de considerar este cambio en la fluorescencia y evitar la sobreestimación del número de protones que la reacción consume. Los experimentos se realizaron en un medio que contenía 0.2 mM de PEP, 1 mM de

Pi y 0.2 mM de AMP. El incremento de la fluorescencia se midió en un espectrofluorómetro Shimadzu RF5000U a una longitud de onda de excitación de 450 nm y de emisión de 507 nm, con una apertura de ventanas de 5 nm. Para descartar un efecto de este indicador fluorescente sobre la enzima, se determinó la actividad específica de la EhPPDK en presencia y ausencia de piranina. Se midió espectrofotométricamente la desaparición de NADH al acoplar la reacción de EhPPDK con la LDH (13 U) en un medio con 0.2 mM de NADH, 6 mM de MgCl₂, 0.2 mM de PEP, 0.2 mM de AMP, 1 mM de Pi y con y sin 0.003 mM de piranina y a 25 °C.

IV. RESULTADOS.

Resultados publicados

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
© 2004 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

Vol. 279, No. 52, Issue of December 24, pp. 54124–54130, 2004
Printed in U.S.A.

Kinetic Mechanism and Metabolic Role of Pyruvate Phosphate Dikinase from *Entamoeba histolytica**

Received for publication, February 16, 2004, and in revised form, September 7, 2004
Published, JBC Papers in Press, October 14, 2004, DOI 10.1074/jbc.M401697200

Marcela Varela-Gómez^{‡§}, Rafael Moreno-Sánchez^{‡||}, Juan Pablo Pardo^{||},
and Ruy Perez-Montfort^{†**}

From the [‡]Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70242, 04510 México D. F., México, the ^{||}Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D. F., México, and the [†]Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Juan Badiano No. 1, Col. Sección XVI, 14080 México D. F., México

The kinetic mechanism and the metabolic role of pyruvate phosphate dikinase from *Entamoeba histolytica* were investigated. The initial velocity patterns in double reciprocal plots were parallel for the phosphoenolpyruvate/AMP and phosphoenolpyruvate/pyrophosphate substrate pairs and intersecting for the AMP/pyrophosphate pair. This suggests a kinetic mechanism with two independent reactions. The rate of ATP synthesis at saturating and equimolar concentrations of phosphoenolpyruvate, AMP, and pyrophosphate was inhibited by phosphate, which is consistent with an ordered steady-state mechanism. Enzyme phosphorylation by [³²P]_ipyrophosphate depends on the formation of a ternary complex between AMP, pyrophosphate, and pyruvate phosphate dikinase. In consequence, the reaction that involves the AMP/pyrophosphate pair follows a sequential steady-state mechanism. The product inhibition patterns of ATP and phosphate versus phosphoenolpyruvate were noncompetitive and uncompetitive, respectively, suggesting that these products were released in an ordered process (phosphate before ATP). The ordered release of phosphate and ATP and the noncompetitive inhibition patterns of pyruvate versus AMP and versus pyrophosphate also supported the sequential kinetic mechanism between AMP and pyrophosphate. Taken together, our data provide evidence for a uni uni bi ping-pong mechanism for recombinant pyruvate phosphate dikinase from *E. histolytica*. The ΔG value for the reaction catalyzed by pyruvate phosphate dikinase (+2.7 kcal/mol) determined under near physiological conditions indicates that the synthesis of ATP is not thermodynamically favorable in trophozoites of *E. histolytica*.

Pyruvate phosphate dikinase (PPDK)¹ catalyzes the reversible conversion of AMP, phosphoenolpyruvate (PEP) and pyro-

phosphate (PP_i) to ATP, pyruvate (Pyr) and inorganic phosphate (P_i). The enzyme is found in bacteria such as *Propionibacterium shermanii* (1) and *Clostridium symbiosum* (2), in the mesophyll cells of C₄ plants (3), in leaves and roots of C₃ plants (4) and C₃-C₄ intermediate plants (5), in the protists *Entamoeba histolytica* (6), *Giardia lamblia* (7), trypanosomatids, and *Euglena* (8), and in a thermophilic actinomyces microorganism (9). The functional role of PPDK depends on the organism. For example, it is well established that PPDK is responsible for the synthesis of the primary CO₂ acceptor (PEP) in the C₄ cycle (10). PPDK also synthesizes PEP in *P. shermanii*, *Acetobacter xylinum*, *Rhodospirillum rubrum*, *Microbispora rosea* (9), and *Rhizobium meliloti* (11). However, in *E. histolytica*, *G. lamblia*, C₃ plants, and trypanosomatids the role of PPDK has not been determined.

In the reaction catalyzed by PPDK the transfer of the phosphoryl groups from PEP and PP_i to AMP is mediated by a catalytic histidine (His) residue (12). This residue rotates 45 Å from the PEP/Pyr domain to the AMP-ATP/PP_i-P_i domain after its phosphorylation by PEP (12) and is also phosphorylated by a phosphoryl group derived from PP_i (13). Enzymes that have functional and amino acid sequence similarities to PPDK, such as enzyme I of the bacterial PEP-sugar phosphotransferase system (14) and PEP synthase (12), show the same mechanism of phosphoryl group transfer.

Previous studies on PPDK from *P. shermanii* (PsPPDK) and *C. symbiosum* (CsPPDK) described two different kinetic mechanisms. The initial velocity patterns between PEP, AMP, and PP_i determined for PsPPDK yielded sets of parallel lines in the double reciprocal plots (15), indicating that each substrate participates in an individual partial reaction according to a non-classical tri uni uni ping pong mechanism (TUU) (Scheme 1). The term non-classical in this mechanism refers to a proposal of three physically and catalytically independent sites (15). On the other hand, the initial velocity patterns for the CsPPDK (16) and the PPDK from C₄ plants (10), were intersecting for AMP/PP_i and parallel for PEP/AMP and PEP/PP_i. This suggests two partial reactions in a non-classical uni uni bi ping pong mechanism (UUBB) (Scheme 2). This mechanism has been labeled as non-classical because the patterns of product inhibition (16) are consistent with a UUBB with two sites that are catalytically and physically independent, instead of only one site.

It is surprising that the same enzyme displays different kinetic mechanisms in different organisms. In this regard, the mechanism that best describes the kinetics of EhPPDK (Schemes 1 and 2) has not been established. Therefore the present study was carried out to determine the kinetic mechanism of rEhPPDK. In addition we determined the intracellular concentrations of the substrates and products of PPDK, in

* This work was supported by Grants IN200600 and IN214202 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico-Universidad Nacional Autónoma de México (to R. P.-M). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[†] Recipient of Scholarship 153119 from CONACYT-Mexico.

^{**} To whom correspondence should be addressed: Departamento de Bioquímica, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70242, 04510 México D. F., México. Tel.: 52-55-56225657; Fax.: 52-55-56225630; E-mail: ruy@ife.unam.mx.

¹ The abbreviations used are: PPDK, pyruvate phosphate dikinase; PEP, phosphoenolpyruvate; PP_i, pyrophosphate; P_i, inorganic phosphate; Pyr, pyruvate; rEhPPDK, recombinant pyruvate phosphate dikinase from *Entamoeba histolytica*; Ps, *Propionibacterium shermanii*; Cs, *Clostridium symbiosum*; TUU, tri uni uni ping-pong mechanism; UUBB, uni uni bi ping-pong mechanism.

Pyruvate Phosphate Dikinase from *Entamoeba histolytica*

54125

order to evaluate the metabolic role of PPDK in *E. histolytica*, because there is a lack of information on this relevant subject.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

rEhPPDK Purification

rEhPPDK was overexpressed and purified from the *Escherichia coli* strain BL21DE3pLysS, as described in Ref. 17. A minor modification was the addition of one tablet of protease inhibitors (Complete Mini EDTA-free tablets from Roche Diagnostics) to 10 ml of bacterial extract at the beginning of the procedure.

Kinetic Mechanism

Initial Velocity Studies—The rate of the reaction catalyzed by PPDK was determined in the direction of pyruvate synthesis by coupling lactate dehydrogenase from rabbit muscle (13 units/ml, Roche Diagnostics) and following the consumption of NADH (0.2 mM) at 340 nm. The reaction was assayed at 25 °C in 50 mM imidazole buffer at pH 6.3 and in the presence of 10 mM MgCl₂ (total) and 4.5 mM NH₄Cl. The initial velocity studies were analyzed by non-linear regression (Microcoical Origin version 6) by fitting the data to the corresponding equations of steady-state ordered, ping-pong, and rapid equilibrium random bi bi mechanisms (Equations 1, 2, and 1, respectively). In Equations 1 and 2, v = initial velocity, V_{max} = maximal velocity, [A] and [B], K_A and K_B are the concentration and Michaelis-Menten constants of substrates A and B, respectively, and K_{iA} is the dissociation constant for substrate A.

$$v = \frac{V_{max} \times [A][B]}{K_{iA}K_B + K_A B + K_B A + [A][B]} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$v = \frac{V_{max} \times [A][B]}{[A][B] + K_B A + K_A B} \quad (\text{Eq. 2})$$

inhibition, and linear noncompetitive inhibition (Equations 3, 4, and 5, respectively).

$$v = \frac{V_{max}[A]}{K_A \times \left(1 + \frac{[I]}{K_{iI}}\right) + [A]} \quad (\text{Eq. 3})$$

$$v = \frac{V_{max}[A]}{K_A + [A] \times \left(1 + \frac{[I]}{K_{iI}}\right)} \quad (\text{Eq. 4})$$

$$v = \frac{V_{max}[A]}{K_A \times \left(1 + \frac{[I]}{K_{iI}}\right) + [A] \times \left(1 + \frac{[I]}{K_{iA}}\right)} \quad (\text{Eq. 5})$$

[I] is the inhibitor concentration; K_{iI} is the inhibitor constant that affects the intercept ($1/V_{max}$); K_{iA} is the inhibitor constant that affects the slope (K_m/V_{max}); the other terms are the same as those defined for Equations 1 and 2.

The experiments of inhibition by P_i were designed according to the kinetic equations for a UUBE ping-pong mechanism, assuming either a steady-state ordered mechanism (Equation 6), or a rapid equilibrium random mechanism (Equation 7) for the binding of AMP and PP_i. These two equations were determined using the computer program REFERASS (19).

At equimolar concentrations of the three substrates of the reaction (PEP, PP_i, and AMP) and in presence of the product P_i (Q), but in the absence of the other two products (ATP and Pyr), the following Equations 8 and 9 are derived from Equations 6 and 7.

$$v = \frac{V_f V_r \left([ABC] - \frac{[PQR]}{K_{eq}} \right)}{V_r K_B K_C [A] + V_r K_C [AB] + V_r K_B [AC] + \frac{V_f}{K_{eq}} K_R K_Q [P] + \frac{V_f}{K_{eq}} K_R [PQ] + V_r K_B K_C [AQ] + \frac{V_f}{K_{eq}} K_Q [PR] + \frac{V_f}{K_{eq}} K_R [QR] + \frac{V_f}{K_{eq}} K_Q [PR] + V_r K_A [BC] + \frac{V_f}{K_{eq}} K_B K_Q [CP] + V_r K_C [ABQ] + \frac{V_f}{K_{eq}} K_A [APQ] + \frac{V_f}{K_{eq}} K_R [BQR] + V_r \frac{K_A}{K_B} [ACP] + V_r \frac{K_A}{K_B} [BCR] + \frac{V_f}{K_{eq}} K_R [BQR] + V_r \frac{K_C}{K_Q K_{iC}} [ABCQ] + \frac{V_f}{K_{eq}} K_Q [CPR] + \frac{V_f}{K_{eq}} K_Q [CPR] + V_r \frac{K_A}{K_B K_{iC}} [BCQR] + V_r [ABC] + \frac{V_f}{K_{eq}} [PQR] + \frac{V_f}{K_{eq}} K_B K_Q [AP]} \quad (\text{Eq. 6})$$

$$v = \frac{V_f V_r \left([ABC] - \frac{[PQR]}{K_{eq}} \right)}{V_r K_B K_C [A] + \frac{V_f}{K_{eq}} K_Q K_R [P] + V_r K_B [AC] + V_r K_C [AB] + V_r K_Q [BC] + V_r \frac{K_B K_C}{K_{iB}} [AP] + \frac{V_f}{K_{eq}} K_R [PQ] + \frac{V_f}{K_{eq}} K_R [QR] + \frac{V_f}{K_{eq}} K_Q [PR] + V_r [ABC] + \frac{V_f}{K_{eq}} [PQR] + V_r \frac{K_A}{K_Q} [BCQ] + \frac{V_f}{K_{eq}} K_R [CQR] + \frac{V_f}{K_{eq}} K_R [BQR] + V_r \frac{K_A}{K_B} [BCR] + \frac{V_r K_A}{K_Q K_{iB}} [BCQR]} \quad (\text{Eq. 7})$$

Product Inhibition Studies—Initial velocities of EhPPDK were determined in the absence and in the presence of the inhibitor product at various concentrations of one substrate and constant concentrations of the other two co-substrates. The reaction buffer contained 50 mM imidazole (pH 6.3), 7 mM free Mg²⁺ (added as MgCl₂ and determined by using the computer program Chelator, Ref. 18) and 4.5 mM NH₄Cl at 25 °C. With the exception of the experiments where Pyr was used as a product inhibitor, the reaction was coupled to the NADH lactate dehydrogenase system. When inhibition by Pyr was studied, the rate of ATP formation was measured by coupling the EhPPDK reaction to hexokinase from yeast (5 units/ml from Roche Diagnostics), and glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* (5 units/ml from Roche Diagnostics). The reaction medium also contained 0.5 mM NADP⁺, 5 mM glucose, 8 mM MgCl₂ (total), 0.1 mM PEP, 0.1 mM AMP, 50 mM imidazole (pH 6.3), and 4.5 mM NH₄Cl. Data obtained from product inhibition studies were analyzed by both linear (double reciprocal plots) and non-linear regression (see equations below). The data were computer-fitted to equations for linear competitive inhibition, linear uncompetitive

$$v = \frac{V_f [A]^2}{coef_a + coef_{a2} [A]^2 + \left(1 + \frac{K_C \times [Q]}{K_{iQ} \times K_{iC}}\right) \times [A]^3} \quad (\text{Eq. 8})$$

$$v = \frac{V_f \times [A]^3}{coef_a \times [A] + coef_{a2} \times [A]^2 + [A]^3} \quad (\text{Eq. 9})$$

At saturating concentrations of the three substrates, Equations 8 and 9 simplify to Equations 10 and 11, respectively.

$$V_{max} = \frac{V_f}{K_C + \frac{1}{K_{iQ} \times K_{iC}} \times [Q]} \quad (\text{Eq. 10})$$

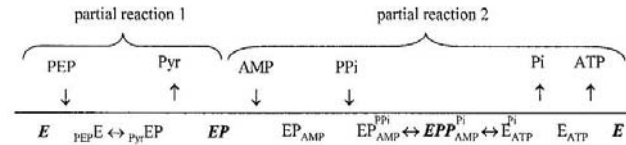
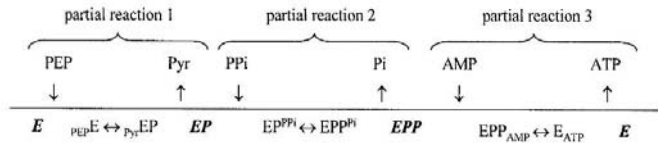
$$V_f = V_{max} \quad (\text{Eq. 11})$$

In Equations 6, 7 and 8, 9, and 10, 11: V_f is the maximal velocity for the synthesis of ATP; V_r is the maximal velocity for the synthesis of PEP; [A], [B], and [C] are the concentrations of substrates PEP, AMP, and PP_i, respectively; [P], [Q], and [R] are the concentrations of prod-

54126

Pyruvate Phosphate Dikinase from *Entamoeba histolytica*

SCHEME 1. Cleland diagram of the kinetic mechanism of PsPPDK: non-classical tri uni uni ping pong.



SCHEME 2. Cleland diagram of the kinetic mechanism of CsPPDK and PPDk from C₄ plants: non-classical uni uni bi bi ping pong. In both schemes: E, free enzyme; EP, phosphorylenzyme; EPP, pyrophosphorylenzyme.

TABLE I
Observed kinetic patterns and apparent Michaelis constants

Substrate			Observed pattern			
Varied	Variable fixed	Fixed ^a	rEhPPDK ^b	$\frac{K_m \gg PP_i}{rEhPPDK}$	CsPPDK ^c	PsPPDK ^d
PEP	AMP	PP _i	parallel	0.024 ± 0.012	parallel	parallel
PEP	PP _i	AMP	parallel	0.032 ± 0.010	parallel	parallel
AMP	PEP	PP _i	parallel	0.004 ± 0.001	parallel	parallel
AMP	PP _i	PEP	intersecting	0.023 ± 0.011	intersecting	parallel
PP _i	PEP	AMP	parallel	0.062 ± 0.023	parallel	parallel
PP _i	AMP	PEP	intersecting	0.126 ± 0.031	intersecting	parallel

^a Concentrations were PEP, 0.6 mM; PP_i, 1 mM; AMP, 0.6 mM.
^b This work.
^c $K_m \gg PP_i$ mean ± S.D. of four different enzyme preparations for rEhPPDK.
^d Ref. 15.
^e Ref. 1.

ucts Pyr, P_i, and ATP, respectively; K_{eq} is the equilibrium constant of the reaction; K_i is the dissociation constant of the substrate or the product that is indicated next as a subindex in capitals; K is the Michaelis-Menten constant of the product or substrate that is indicated. In Equations 8 and 9, A is the equimolar concentration of each substrate. For Equation 8, $coef_{s1} = K_{i3}K_0 + K_AK_0[Q]/K_{i2}$ and $coef_{s2} = K_{i3} + K_0 + K_A + K_0[Q]/K_{i2}$. For Equation 9, $coef_{s1} = K_{i3}K_0$ and $coef_{s2} = K_A + K_{i3} + K_0 + K_A[Q]/K_{i2}$. The initial velocity in these experiments was determined at different concentrations of P_i and constant and saturating concentrations of AMP, PP_i, and PEP (1 mM).

Pyrophosphorylation of rEhPPDK with ³²P_i.—The reaction was started by the addition of rEhPPDK (0.4 mg of protein, equivalent to 1.04 nmol) to 500 μl of medium containing 50 mM imidazole (pH 6.3), 10 mM MgCl₂, 4.5 mM NH₄Cl, 2 mM ³²P_i (~14 μCi; Perkin Elmer), and the indicated substrates. The reaction was stopped after 0.5–1.5 s of incubation at room temperature by the addition of 10% trichloroacetic acid. Longer times of incubation (30–60 s) did not increase the ³²P_i incorporation into PPDk. After centrifugation, the supernatant was removed; the precipitated protein was washed another five times with 10% trichloroacetic acid. It was finally resuspended in 1.5 ml of 10% SDS and mixed with 5.5 ml of water. The covalent incorporation of ³²P_i into rEhPPDK was determined in a Beckman LS100C counter by measuring the Cerenkov radiation.

Metabolic Role

Intracellular Content of Metabolites.—Trophozoites of *E. histolytica* strain HMI IMSS were grown axenically at 37 °C in TYI-S-33 medium supplemented with 10% adult bovine serum and 3% of a vitamin mixture. The cultured cells (~1 × 10⁸) were collected by centrifugation, resuspended in SHE buffer (250 mM sucrose, 100 mM Hepes pH 7, and 1 mM EGTA) and washed twice with the same buffer. The cells were then mixed with 3% (v/v) perchloric acid/20 mM EDTA and centrifuged at 800 × g for 2 min. The supernatant was recovered, neutralized, and conserved at -70 °C until use. The intracellular concentration of substrates and products of the reaction catalyzed by EhPPDK were determined by using standard enzymatic and colorimetric assays (20), except for AMP and PP_i, in which rEhPPDK was used. Because the true substrates of PPDk, like PEP, PP_i, and ATP, are complexes with Mg²⁺, the total concentration of this metal was also determined. *E. histolytica* trophozoites (1 × 10⁷ cells/0.2 ml) were mixed with 1 ml of 70% nitric

acid and 1 ml of 98% sulfuric acid and heated for 40 min. The magnesium content in the digested extracts was determined by atomic absorption spectrometry in a Varian apparatus. The intracellular volume used to calculate the metabolite concentration was 13 μl/10⁷ cells. This corresponds to the volume reported for bovine alveolar macrophages, which are morphologically very similar to trophozoites from *E. histolytica* (21).

Determination of K_{eq} and ΔG.—The determination of ΔG for the reaction PEP + AMP + PP_i ⇌ Pyr + ATP + P_i required the measurement of the equilibrium constant (K_{eq}) at 37 °C and pH 6.3 (the assumed *in vivo* conditions for *E. histolytica*). The K_{eq} of the reaction catalyzed by EhPPDK was estimated in these conditions from the concentration of P_i and ATP at equilibrium. The initial concentrations were 0.05 mM PEP, 0.05 mM AMP, and 0.035 mM PP_i.

RESULTS AND DISCUSSION

rEhPPDK Purity and Stability.—The densitometric analysis of the SDS-electrophoresis gel routinely showed purity greater than 90% for all rEhPPDK used in these experiments. The stability of the enzyme stored in imidazole buffer was increased by adding a commercially available mixture of protease inhibitors. Enzyme activity remained stable for at least 60 days at room temperature (data not shown).

Kinetic Mechanism.—Initial velocities of EhPPDK were determined at variable concentrations of one of the substrates with fixed variable concentrations of the second and a constant concentration of the third substrate. The kinetic patterns and the apparent Michaelis-Menten constants obtained by non-linear regression analysis are summarized in Table I. The patterns for PEP and PP_i (concentration of AMP constant) and PEP and AMP (concentration of PP_i constant) were parallel, indicating a ping-pong kinetic mechanism for PEP *versus* PP_i and AMP. The pattern for AMP and PP_i (concentration of PEP constant) was intersecting (Fig. 1); the same pattern was obtained when AMP was the variable substrate, suggesting that these substrates have a sequential kinetic mechanism in which AMP or PP_i binds first (ordered mechanism), or one in which

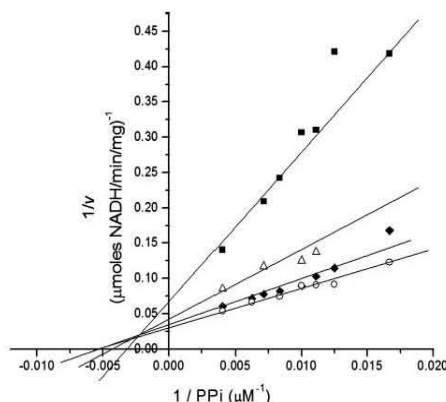


FIG. 1. Representative double reciprocal plot of the PPDK rate versus variable PP_i concentrations at fixed concentrations of AMP and constant concentration of PEP. The data were globally fitted to Equation 1. Concentrations of AMP were: ■, 0.01 mM; △, 0.06 mM; ◆, 0.08 mM; and ○, 0.3 mM.

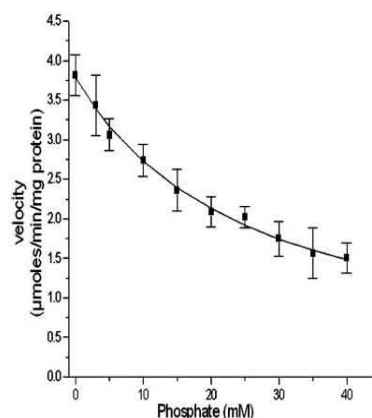


FIG. 2. Inhibition by phosphate of the synthesis of ATP catalyzed by PPDK. The plot of phosphate against velocity was computer-fitted to the equation $V_v/[P_i](1 + [P_i]/K)$ that was determined by modification of Equation 10 ($\chi^2 = 0.004$; V_v (forward velocity) = 3.78 ± 0.04 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$; $K = K_o/K_{iQ} K_{iO} = 0.039 \pm 0.002$). The concentrations of AMP, PEP, and PP_i were constant and saturating (1 mM).

either substrate binds first (random mechanism). This intersecting pattern (Fig. 1) suggested that the reaction catalyzed by EhPPDK involves a partial reaction in which a ternary AMP-EP- PP_i complex is formed.

These patterns (Table I) corresponded to those predicted for a UUBB ping-pong kinetic mechanism. Identical double-reciprocal patterns were reported for the PPDK from *C. symbiosum* under similar conditions (16), whereas the AMP/ PP_i patterns were parallel for the enzyme from *P. shermanii* (15). This is the main difference between these two kinetic mechanisms (shown in Schemes 1 and 2).

Product Inhibition Studies—The intersecting pattern of the AMP/ PP_i pair (Fig. 1) may result from three different sequential kinetic mechanisms: a random rapid-equilibrium, a steady-state ordered or a steady-state random mechanisms (22). In an attempt to discern between the three of them, initial velocity data determined with different concentrations of P_i , were analyzed using Equations 10 and 11. Equation 10 predicts that in a UUBB ping-pong mechanism, with a steady-state ordered addition of AMP and PP_i , the second product (P_i) will inhibit the enzyme activity. In contrast, Equation 11 predicts that in a UUBB ping-pong mechanism with a random rapid equilibrium for the reaction between AMP/ PP_i , the effect of P_i on the initial rate is negligible in the presence of saturating and equimolar concentrations of the three substrates. The equation considering a steady-state random mechanism between these substrates was not derived because its analysis is exceedingly complex. Thus, based on Equations 10 and 11, the hyperbolic decay in the plot of apparent maximal velocity versus P_i concentration (Fig. 2) suggested that the interaction of the enzyme with AMP and PP_i could not be explained by a random rapid equilibrium mechanism.

To distinguish between steady-state random and ordered mechanisms other product inhibition patterns were examined. These were determined by measuring the initial velocity catalyzed by PPDK as a function of a variable substrate, in the direction of ATP synthesis. The results from these experiments are summarized in Table II. The product inhibition patterns for P_i versus AMP and PP_i , and ATP versus PP_i and AMP, were noncompetitive (Table II), indicating that P_i and ATP, and PP_i and AMP bind to different enzyme forms and indicating that substrates and products were reversibly interconnected. This may occur in the pyrophosphorylated form of the enzyme

(EPP), because the AMP/ PP_i and ATP/ P_i pairs participate in the same reversible partial reaction. The noncompetitive inhibition exerted by ATP against AMP (Table II) also supported a reversible conversion between these two ligands.

The release order for ATP and P_i was determined from their product inhibition patterns against PEP. The kinetic prediction for an ordered mechanism between these two products is that the last product released should act as a competitive inhibitor against PEP, whereas the first released product is an uncompetitive inhibitor. For a random mechanism, the prediction is noncompetitive inhibition by both products. The inhibition patterns (Table II) showed that ATP and P_i were released in an ordered sequence, although in a non-classical manner, since the observed inhibition patterns did not strictly correspond to those expected. The uncompetitive inhibition of P_i against PEP indicated that these ligands bind to different enzyme forms and that P_i was released before ATP. However the noncompetitive inhibition of ATP versus PEP did not fit the predicted pattern for the last released product. Alternative explanations for this noncompetitive inhibition are the formation of dead-end complexes, the existence of an *iso* mechanism (23), or the existence of a non-classical UUBB ping-pong mechanism (15, 16).

Evidence for the presence of dead-end complexes with ATP came from noncompetitive inhibition by GMP with respect to AMP (data not shown). The data suggested that GMP and AMP bind to the same enzyme form (EP), but that GMP interacts with another form, possibly the free enzyme, leading to a dead-end complex. This finding agrees with the noncompetitive pattern observed for ATP versus PEP and with the existence of dead-end complexes.

Another explanation for the noncompetitive inhibition of ATP versus PEP is an *iso* mechanism; this involves a rate-limiting step associated with isomerization of the free enzyme in the catalytic cycle. In this mechanism, the free enzyme that binds the first substrate is conformationally different from the free enzyme form that binds the last product released. Thus, the inhibition pattern between the first substrate and the last product is noncompetitive, instead of competitive (23). PPDK exhibits two-site catalysis with two independent active sites separated by 45 Å. To complete a catalytic cycle the enzyme undergoes a transition between two different conformations,

Pyruvate Phosphate Dikinase from *Entamoeba histolytica*

54129

TABLE III
Incorporation of $^{32}\text{P}_i$ (from PP₁) into rEhPPDK

Assay components	nmol $^{32}\text{P}_i$ /nmol rEhPPDK	Percentage of $^{32}\text{P}_i$ incorporated into rEhPPDK
$^{32}\text{PP}_1$ (2 mM)	0.077 ± 0.020	7.4 ± 2.0 (3) ^a
$^{32}\text{PP}_1$ (2 mM) + AMP (0.6 mM)	0.048 ± 0.015	5.2 ± 1.2 (3)
$^{32}\text{PP}_1$ (2 mM) + PEP (0.6 mM)	0.067 ± 0.012	6.2 ± 0.5 (3)
$^{32}\text{PP}_1$ (2 mM) + PEP (0.6 mM) + AMP (0.6 mM)	0.211 ± 0.032	21.0 ± 3.1 (11)

^a The number of experiments is shown in parentheses.TABLE IV
Concentrations of metabolites related to the reaction catalyzed by PPDK

Concentrations determined in acid extracts of trophozoites from *E. histolytica*. These concentrations were calculated by assuming that amoebal trophozoites have an intracellular volume similar to that of bovine alveolar macrophages, which is $13 \mu\text{l}$ per 1×10^7 cells (21).

Substrate	nmol/10 ⁷ cells	mM
PEP	10.4 ± 4.0 ($n = 3$) ^a	0.8 ± 0.2
AMP	12.3 ± 5.2 ($n = 6$)	0.95 ± 0.31
PP ₁	5.3 ± 1.4 ($n = 6$)	0.41 ± 0.12
Pyr	5.8 ± 2.5 ($n = 5$)	0.45 ± 0.11
ATP	13.7 ± 6.0 ($n = 7$)	1.05 ± 0.41
P _i	108.7 ± 50.4 ($n = 4$)	8.36 ± 3.22

^a n , number of experiments.

$$K_{MA} = \frac{[\text{Pyr}][\text{P}_i][\text{ATP}]}{[\text{PEP}][\text{PP}_1][\text{AMP}]} \quad (\text{Eq. 12})$$

The total concentration of Mg^{2+} was 9.6 ± 1.6 mM (125 ± 9 nmol/10⁷ cells). This concentration is high enough to assume safely that Mg-PEP, Mg-PP₁, and Mg-ATP (the true substrates) are formed. Our data of the concentrations of PEP, Pyr, and PP₁ were in the same order of magnitude of those reported by Reeves *et al.* (0.21 ± 0.09 mM and 0.38 ± 0.11 mM, 0.35 ± 0.09 mM, respectively, Ref. 27). Also, the concentration of ATP was in the same order of magnitude, but it was approximately two times higher than the value reported before, 1.05 ± 0.41 mM (Table IV) and 0.40 ± 0.08 mM (27). These differences may result from using different *E. histolytica* strains and/or different growth and incubation conditions.

PPDK catalyzes PEP synthesis in C₄ plants (10). It is localized in chloroplasts of mesophyll cells, which have a pH of 8 in the stroma, and where the reaction is coupled with pyrophosphatases and adenylate kinases (10). It has been estimated that, under physiological conditions, the reaction catalyzed by CsPPDK goes toward the synthesis of ATP ($\Delta G \approx -1$ kcal/mol, Ref. 28). However, in that work the authors used the concentrations of the metabolites reported for *E. coli* and not those of *C. symbiosum* (28–30).

A PEP synthesizing role has been proposed for PPDK in other organisms such as *P. shermanii* and *M. rosea* from the measurement of its activity in different growth media (1, 9). Other authors have suggested that PPDK catalyzes synthesis of ATP in parasite protists such as *E. histolytica* and *Giardia intestinalis* because of the lack of pyruvate kinase in these organisms. However, it is noted that recent works showed in *G. intestinalis* (31) and *E. histolytica* trophozoites (32) have significant pyruvate kinase activity. Thus, it was judged relevant to evaluate the metabolic role of PPDK in *E. histolytica* under near physiological conditions. At pH 6.3, 37 °C and the initial concentrations of substrates and Mg^{2+} (which were in excess over those of the metabolites) described under "Experimental Procedures," the reaction catalyzed by PPDK reached equilibrium after 40 min (data not shown). The equilibrium concentrations were 0.04 mM for P_i, and 0.015 mM for ATP and pyruvate. The equilibrium concentrations of AMP (0.035 mM),

PEP (0.035 mM), and PP₁ (0.01 mM) were calculated by subtracting the concentration of ATP at equilibrium from the initial substrate concentrations. With these values, the equilibrium constant for the reaction was calculated ($K_{\text{eq}} = 0.73$; $\Delta G^\circ = +0.19$ kcal/mol). This value differed from that reported for the reaction catalyzed by CsPPDK (333 for the same reaction at 25 °C, 5 mM MgCl_2 and pH 7, Ref. 28). In both cases, the K_{eq} was determined without considering the concentration of protons. This parameter could be important because it has been reported that the reaction catalyzed by EhPPDK requires 2 μmol of H⁺ for each μmol of ATP synthesized in the pH range of 6.5–8.4, and in the presence of 8.3 mM MgCl_2 (a limiting concentration when compared with the metabolite concentrations we used), and presumably at room temperature (2). Hence, proton consumption of the reaction at pH 6.3 (assay conditions) was measured following the fluorescence of pyranine. The value obtained was $1.7 \pm 0.1 \mu\text{mol}$ of H⁺, which was in full agreement with that reported by Reeves (6). However, proton consumption was not considered explicitly in the calculation of ΔG , since K_{MA} and K_{eq} were determined at pH 6.3, and the concentration of protons cancels in the equation for the determination of ΔG (+2.7 kcal/mol). Therefore, it seems that in the assumed physiological conditions for amoeba trophozoites the PPDK reaction is not so close to its thermodynamic equilibrium. In consequence, net ATP synthesis catalyzed by PPDK should be expected when substrates accumulate and products diminish under particular metabolic conditions of the trophozoites. The apparent lack of pyrophosphatases (34) together with an active vacuolar proton-transporting ATPase, which acidifies the intravacuolar milieu and that is involved in the phagocytosis of bacteria and erythrocytes (33, 35), may fulfill the required conditions for driving the synthesis of ATP by EhPPDK.

Acknowledgments—We thank Alfonso Olivos-García and Mario Nequiz-Avedaño for supplying trophozoites of *E. histolytica* HM1: IMSS, Nalley Cabrera for technical support, and Armando Gómez-Puyou for critical revision of the manuscript.

REFERENCES

- Evans, H. J., and Wood, H. G. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **61**, 1448–1453
- Reeves, R. E., Menzies, R. A., and Hsu, D. S. (1968) *J. Biol. Chem.* **243**, 5486–5491
- Hatch, M. D., and Slack C. R. (1968) *Biochem. J.* **106**, 141–146
- Moons, A., Valcke, R., and Van Montagu, M. (1998) *Plant J.* **15**, 89–98
- Agarie, S., Motoshi, K., Takatsuki, H., and Ueno, O. (1997) *Plant. Mol. Biol.* **34**, 363–369
- Reeves, R. (1968) *J. Biol. Chem.* **243**, 3202–3204
- Hrdý, I., Mertens, E., and Nohýnková, E. (1993) *Exp. Parasitol.* **76**, 438–441
- Bringaud, F., Baltz, D., and Baltz, T. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 7963–7968
- Eisaki, N., Tatsumi, H., Murakami, S., and Horiuchi, T. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1431**, 363–373
- Edwards, G., Nakamoto, H., Burnell, J., and Hatch, M. (1985) *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36**, 255–286
- Österås, M., Driscoll, B., and Finan, T. (1997) *Microbiol.* **143**, 1639–1648
- Herzberg, O., Chen, C., Kapadia, G., McGuire, M., Carroll, L., Noh, S., and Dunaway-Mariano, D. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 2652–2657
- Thrall, S. H., Mehl, A. F., Carroll, L. J., and Dunaway-Mariano, D. (1993) *Biochemistry* **32**, 1803–1809
- Ginsburg, A., and Peterkofsky, A. (2002) *Arch. Biochem. Biophys.* **397**, 273–278
- Milner, Y., and Wood, H. G. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 7920–7928
- Wang, H. C., Ciskanik, L., Dunaway-Mariano, D., von der Saal, W., and Villafranca, J. (1988) *Biochemistry* **27**, 625–633
- Saavedra-Lira, E., Ramirez, L., and Pérez-Montfort, R. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1382**, 47–54
- Schoenmakers, T. J., Visser, G. J., Flik, G., and Theuvsen, A. P. (1992) *BioTechniques* **12**, 870–874, 876–879
- Varon, R., García-Sevilla, F., García-Moreno, M., García-Canovas, F., Peyro, R., and Duggleby, R.G. (1997) *Comput. Appl. Sci.* **13**, 159–167
- Bergmeyer, H. U. (ed) (1986) *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. VI & VII 3rd Ed., pp. 118–501, Editorial VCH, Germany
- Scorneaux, B., and Shryock, T.R. (1999) *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **22**, 6–12
- Segel, I. (1975) *Enzyme Kinetics. Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*, pp. 560–590, John Wiley & Sons, Inc., New York

54130

Pyruvate Phosphate Dikinase from Entamoeba histolytica

23. Northrop, D. B., and Rebolz, K. L. (1997) *Arch. Biochem. Biophys.* **342**, 317-321
24. Herzberg, O., Chen, C. C., Liu, S., Tempezyk, A., Howard, A., Wei, M., Ye, D., and Dunaway-Mariano, D. (2002) *Biochemistry* **41**, 780-787
25. Wei, M., Li, Z., Ye, D., Herzberg, O., and Dunaway-Mariano, D. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 41156-41165
26. Xu, Y., McGuire, M., Dunaway-Mariano, D., and Martin, B. M. (1995) *Biochemistry* **34**, 2195-2202
27. Reeves, E. E., Warren, L. G., and Guthrie, J. D. (1974) *Arch. Invest. Med.* **5**, 331-336
28. Mehl, A., Xu, Y., and Dunaway-Mariano, D. (1994) *Biochemistry* **33**, 1093-1102
29. Kukko-Kalske, E., and Heinonen, J. (1985) *Int. J. Biochem.* **17**, 575-580
30. Lowry, O. H., Carter, J., Ward, J. B., and Glaser, L. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 6511-6521
31. Park, J. H., Schofield, P. J., and Edwards, M. R. (1997) *Exp. Parasitol.* **87**, 153-156
32. Saavedra, E., Olivos, A., Encalada, R., and Moreno-Sánchez, R. (2004) *Exp. Parasitol.* **106**, 11-21
33. Ghosh, K. S., and Samuelson, J. (1997) *Infect. Immun.* **65**, 4243-4249
34. McLaughlin, J., Lindmark, D. G., and Muller, M. (1978) *Arch. Invest. Med.* **9**, 141-148
35. Yi, Y., and Samuelson, J. (1994) *Mol. Biochem. Parasitol.* **66**, 165-169

Resultados complementarios no publicados

IV. A. Mecanismo cinético

IV. A. 1. Ensayos con los inhibidores sin salida: AMPS y PNP.

En estos ensayos se utilizan moléculas estructuralmente parecidas a los sustratos AMP y PPi, que no participan en la reacción catalizada por la enzima, por lo que se forman complejos sin salida entre la forma de la enzima correspondiente y el inhibidor. A partir de los patrones de inhibición de cada uno de estos inhibidores respecto a los sustratos se desea obtener el orden de unión del AMP y PPi. Primero se determinó que la EhPPDK no cataliza la reacción con ninguno de los dos inhibidores sin salida (recuadros de las figuras 5A y 5B) y después se hicieron los ensayos de inhibición. Los patrones gráficos de líneas intersecantes en los experimentos de inhibición de AMPS respecto a AMP correspondieron a un inhibidor de tipo no competitivo (figura 5A). El mismo patrón de inhibición se obtuvo en los experimentos de PNP respecto a PPi (figura 5B). La utilidad de usar inhibidores sin salida es que, en teoría, deben unirse a la misma forma de la enzima a la que se une el verdadero sustrato y de esta manera facilitar la determinación del orden de unión de los sustratos. Es esencial que la molécula inhibidora sea un inhibidor competitivo del sustrato al que es análogo.

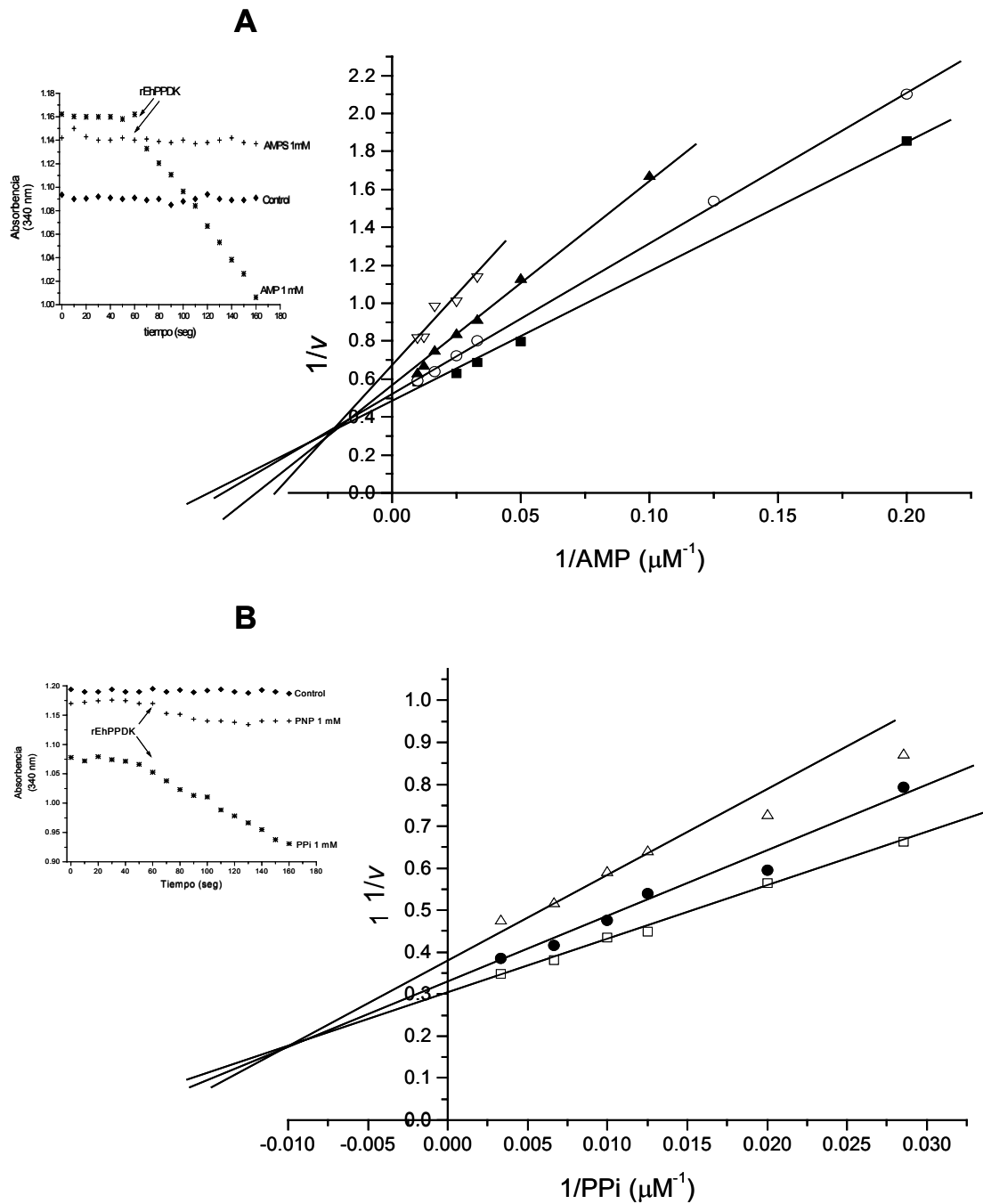


Figura 5. A. Patrón de inhibición no competitiva de un experimento representativo midiendo la velocidad de la EhPPDK variando la concentración de AMP a diferentes concentraciones de AMPS \blacksquare 0 mM, \circ 0.15 mM, \blacktriangle 0.3 mM, ∇ 1 mM. **B.** Experimento representativo de la inhibición de diferentes concentraciones de

PNP (\square 0 mM, \bullet 0.1 mM, \triangle 0.6 mM) respecto a concentraciones variables de PPI. En ambas figuras se muestra como recuadro la gráfica de absorbencia a 340 nm con respecto al tiempo en las que se observa la actividad de la EhPPDK en presencia de los sustratos verdaderos (\ast AMP y PPI), los sustratos análogos (+ AMPS y PNP) y los controles (\blacklozenge).

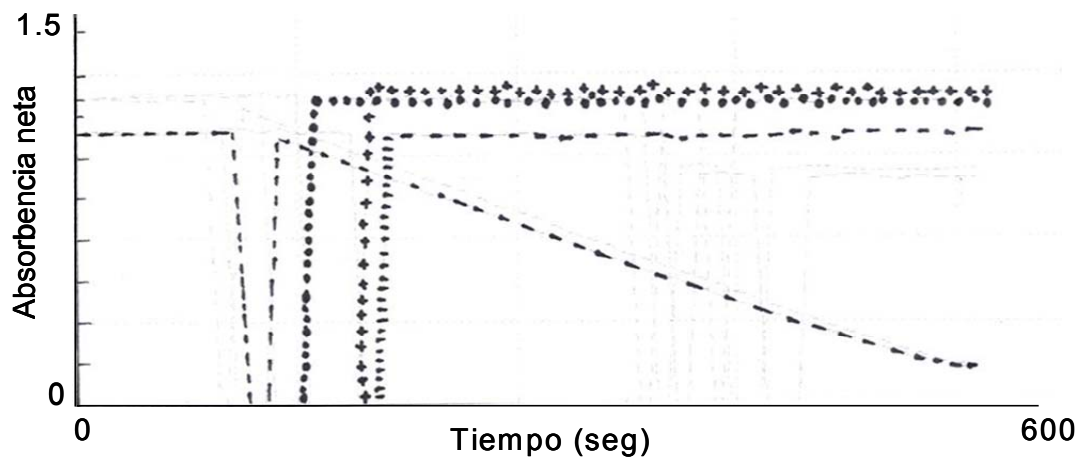
La inhibición no competitiva del AMPS y el PNP con respecto al AMP y PPI sugiere que estos inhibidores son capaces de formar complejos sin salida con más de una forma de la enzima. Este tipo de comportamiento no es útil para determinar el patrón de unión del AMP y PPI, por lo que se descartó el estudio con este tipo de inhibidores y se utilizaron otras herramientas, tales como la inhibición por producto a concentraciones tanto saturantes como no saturantes del cosustrato. Estos datos se especifican en el artículo publicado e incluido en esta tesis (Varela-Gómez *et al.*, 2004).

El AMPS y el PNP se utilizaron previamente para determinar el mecanismo cinético de la CsPPDK (Wang *et al.*, 1988). En este caso los inhibidores formaron los complejos sin salida que se esperaban, produciendo patrones de inhibición competitivos respecto al AMP y PPI respectivamente. Además los patrones de inhibición del PNP y AMPS respecto al AMP, PEP y PPI coincidieron con los predichos para un mecanismo ordenado en el que el AMP se une antes que el PPI (Wang *et al.*, 1988). La discrepancia entre los patrones de inhibición del AMPS y el PNP entre la EhPPDK y la CsPPDK puede deberse a diferencias estructurales que permiten que en el caso de la EhPPDK los inhibidores se unan a más de una forma de la enzima..

IV. A. 2. Ensayos de velocidad inicial con moléculas análogas al AMP (CMP, GMP y TMP).

Debido a que el AMPS y el PNP no dieron los resultados que se esperaban, se utilizaron otros compuestos parecidos al AMP, tales como GMP, CMP y TMP. Primero se determinó si la enzima era capaz de utilizarlos como sustrato (figura 6A). y se encontró que la EhPPDK cataliza la reacción solamente en presencia de AMP. De estos nucleótidos monofosfato, el GMP es el que estructuralmente se parece más al AMP, razón por la cual se utilizó para determinar el patrón de inhibición con respecto al AMP. La inhibición del GMP con respecto al AMP fue de tipo no competitivo (figura 6B), al igual que el patrón de inhibición del AMPS respecto al AMP. Este patrón no competitivo sugiere que el GMP, al igual que el AMPS, son capaces de unirse a más de una forma de la enzima y por eso el patrón de inhibición no es competitivo respecto al AMP.

A.



B.

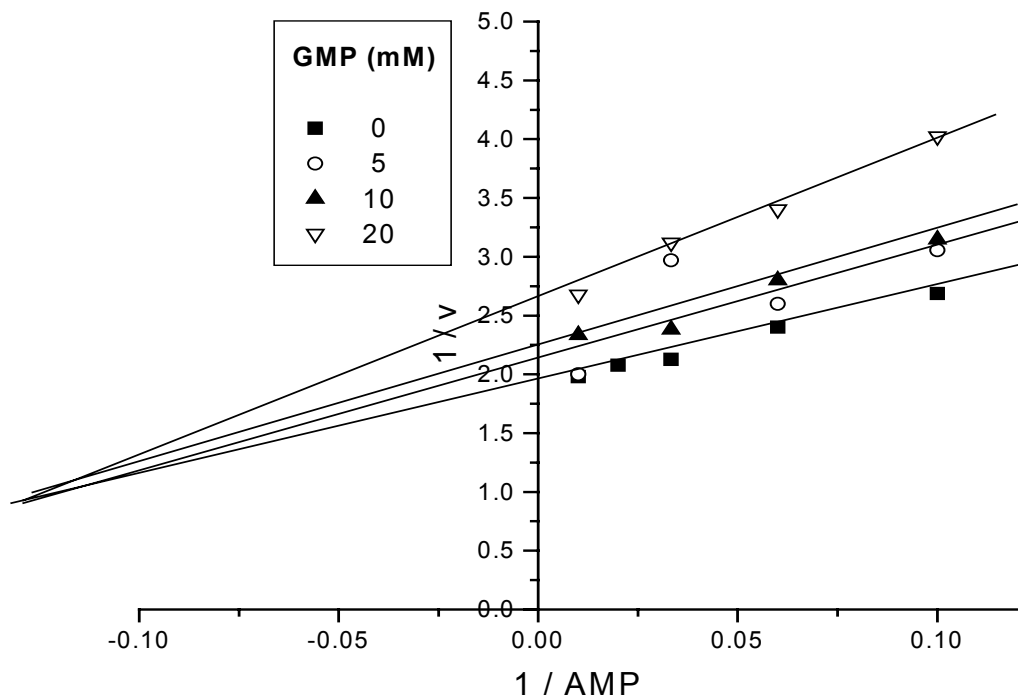


Figura 6. A. Trazo experimental en el que se muestra la actividad de la EhPPDK en presencia de diferentes nucleótidos monofosfato (2 mM cada uno): (--) AMP, (•) GMP, (+) CMP, (*) TMP. **B.** Gráfico de dobles recíprocos en el que se muestra el patrón de líneas intersectantes de un experimento representativo en el que se mide la velocidad de la EhPPDK al variar la concentración de AMP frente a diferentes concentraciones de GMP: ■ 0 mM, ○ 5 mM, ▲ 10 mM, ▽ 20 mM.

IV. A. 3 . Experimentos de fluorescencia.

La fluorescencia se puede usar para seguir la unión de diferentes ligandos, debido a que hay cambios conformacionales que afectan el microambiente en el cual están inmersos los aminoácidos aromáticos y por ende se modifica su eficiencia cuántica, lo cual se refleja en los espectros de fluorescencia. Incluso se pueden determinar los valores de las constantes de afinidad. Un ejemplo es el de la determinación de la unión de las fenotiacinas, al complejo de Ca^{2+} -calmodulina previamente fusionada con la proteína verde fluorescente (PVF). Cuando estos inhibidores se unen a la calmodulina, los cambios conformacionales de esta proteína modifican el microambiente de la PVF y esta señal es la que se registra y analiza (Puckett *et al.*, 2004). En otro caso se determinó que el GTP, que es un inhibidor de la adenilato ciclasa de mamífero, se une con mucha mayor afinidad a la forma catalíticamente más activa de la enzima. Estos estudios se hicieron siguiendo la fluorescencia de un fluoróforo, llamado 2'(3')-o-N-metilntraniloil (MANT), fusionado al GTP (Mou *et al.*, 2004). Los análisis conformacionales, junto con otro tipo de estudios tales como “docking” de moléculas, permiten determinar las características de unión de los sustratos, como se reportó para la enzima convertidora de angiotensina somática I (Bersanetti *et al.*, 2004).

Los espectros de fluorescencia de la EhPPDK en ausencia y presencia de sus sustratos se muestran en las figuras 7 A y B. El espectro de fluorescencia de la enzima en ausencia de cualquiera de los sustratos posee dos picos principales a 362 y 385 nm y un hombro a 330 nm. Este espectro probablemente se debe a la distribución de los triptofanos (215, 527 y 852) en la proteína. También puede

deberse a que se utilizó una longitud de onda de excitación de 295 nm, la cual está un poco alejada de la longitud de onda máxima de absorción del triptofano (280 nm) ya que con esta última se tenía una alta interferencia en los espectros de fluorescencia en presencia de AMP. El AMP es capaz de absorber una mayor cantidad de luz a 280 nm, pero a 295 nm, esta absorción es insignificante.

En la figura 7A se observan los espectros de fluorescencia de la EhPPDK en ausencia de sustratos y en presencia de cada uno de los sustratos. En ninguno de los casos se observa un corrimiento de longitudes de onda, lo que habla de que la posible unión de los sustratos a la enzima no modifica su espectro de fluorescencia debido a que no existe un cambio conformacional que modifique la señal de los triptofanos. El único espectro en el que se ve un ligero cambio en la intensidad de fluorescencia a 362 y 385 nm es en el caso de la mezcla EhPPDK y 0.6 mM de PEP, pero este cambio no es significativo (Fig. 7A). Como se observa en la figura 7A, todos los espectros de fluorescencia, independientemente de las condiciones experimentales, se sobrelapan. El cambio, aunque pequeño, en la intensidad de fluorescencia de la EhPPDK en presencia de PEP sugiere que el PEP se une a la enzima, aún en ausencia de los otros sustratos. Estos resultados apoyan los datos que indican que el PEP es el primer sustrato en unirse. El siguiente paso era saber si había alguna diferencia entre los espectros de fluorescencia de las combinaciones PEP más PPI y PEP más AMP (figura 7B), para así determinar cuál era el segundo sustrato en unirse. No se encontraron diferencias entre los espectros de fluorescencia de las combinaciones de PEP con los otros dos sustratos de la reacción (fig. 7B). La principal diferencia se observó entre el espectro de la enzima libre y el de la enzima en presencia de

concentraciones saturantes de PEP y AMP, aunque esta diferencia no es significativa (figura 7B). Debido a que los resultados de los experimentos de fluorescencia no fueron claros respecto a determinar el orden de unión de los sustratos se optó por utilizar otro tipo de técnicas para lograrlo.

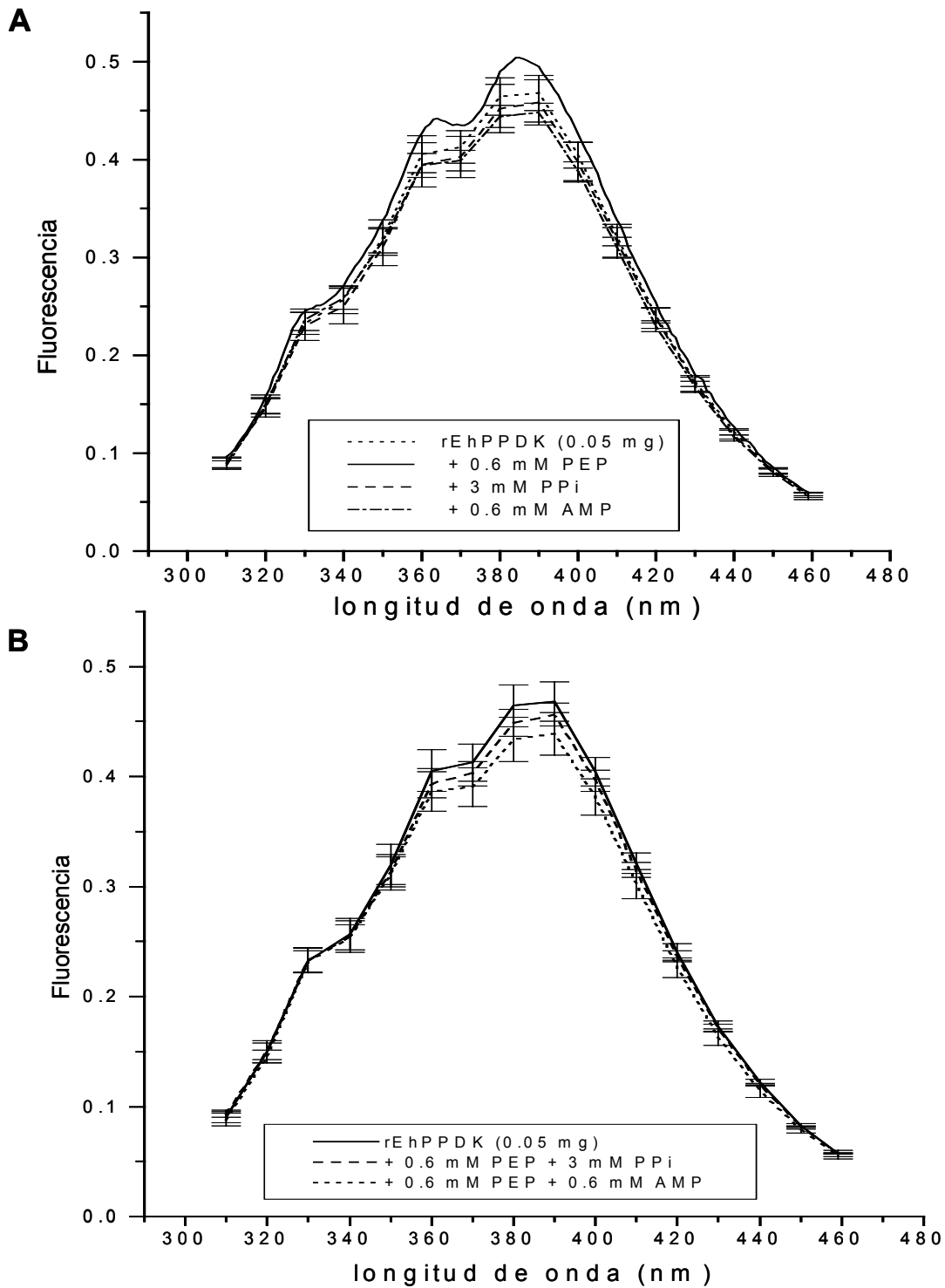


Figura 7. Espectros de fluorescencia de la EhPPDK para determinar el orden de unión de los sustratos. **A.** Se muestran los datos de cuatro experimentos junto con la desviación estándar de la EhPPDK libre (-----), enzima más 0.6 mM PEP (——), enzima en presencia de 3 mM PPI (----) y enzima en presencia de 0.6 mM AMP

(-----). **B.** Se muestran los datos de cinco experimentos en los que se observa el cambio de fluorescencia de la enzima libre (—) respecto a los ensayos en presencia de 0.6 mM PEP y 3 mM PPI (-----) y en una solución con 0.6 mM de PEP y 0.6 mM AMP (.....).

IV. A. 4. Estabilidad térmica de la EhPPDK.

En esta sección se presentan los experimentos en los que se estudió la estabilidad térmica de la enzima en presencia y ausencia de los sustratos, con el fin de determinar si la unión de alguno de estos se refleja en una mayor o menor estabilidad contra la inactivación térmica. De los cursos temporales que se muestran en la figura 8A, se calculó que la enzima, en ausencia de sustratos, tiene la constante de inactivación más alta ($k_{inac} = 0.07 \text{ min}^{-1}$). Al incubar a la enzima en presencia de 0.08 mM de PEP no se observó ningún cambio con respecto a la enzima incubada sin sustratos (fig. 8A).

La EhPPDK se protegió contra la termoinactivación al incubarla en presencia de los otros dos sustratos (fig. 8A), principalmente con 0.08 mM de AMP, ya que la constante de inactivación fue de 0.046 min^{-1} . En el caso de la inactivación en presencia de 0.4 mM de PPI, la protección fue intermedia entre la incubación de la enzima con PEP y con AMP (fig. 8A) y el valor de la constante de inactivación es muy parecido al que se obtuvo con la enzima sin sustratos o en presencia de PEP ($k_{inac} = 0.06 \text{ min}^{-1}$).

La protección que ofrecen algunos ligandos se debe en muchas ocasiones a la unión de estas moléculas a sitios específicos, con lo que se estabiliza la estructura tridimensional de la proteína. De esta manera, en algunos casos, la inactivación térmica resulta mucho menor que en ausencia de ligandos. Por

ejemplo, Yang *et al.* (2004) encontraron que una pirofosfatasa de frijol mungo era más resistente a la inactivación térmica a 60 °C en presencia de sustrato (Mg^{2+} -PPi) ($k_{\text{inac}} = 4.6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) que en su ausencia ($k_{\text{inac}} = 8.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) o que la enzima incubada con el inhibidor isotiocianato de fluoresceína (FITC; $k_{\text{inac}} = 14.1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$). Estos cambios en el comportamiento de la pirofosfatasa vacuolar sugirieron que la unión del sustrato favorece cierta conformación de la enzima que es diferente a la que favorece la unión del FITC. Estas dos conformaciones podrían tener diferente estabilidad térmica debido a las diferentes interacciones fisicoquímicas entre los residuos de aminoácidos de la proteína (Yang *et al.*, 2004). La presencia de sustratos también permitió incrementar la estabilidad térmica de tres fosfoenolpiruvato carboxinasas dependientes de ATP que difieren en su estado de oligomerización (Ravanal *et al.*, 2003).

Los siguientes ensayos se realizaron para determinar la protección de la enzima al incubarla en presencia de diferentes combinaciones de los sustratos (figura 8B) y de esta manera, encontrar cambios en la constante de inactivación al incubarla a la enzima en presencia del primer sustrato (PEP, determinado a partir de otro tipo de experimentos) y alguno de los otros dos sustratos para de esta manera tratar de identificar el orden de unión entre el AMP y PPI. La predicción era que si el AMP y el PPI se unían al azar, estas combinaciones tendrían la misma constante de inactivación; en cambio, si la unión fuera ordenada entonces se obtendría una constante de inactivación mayor para la pareja del primer y segundo sustratos que para el primero y tercero. Sin embargo, como se observa en la figura 8B, no existe diferencia alguna entre las constantes de inactivación de

la enzima sola ($k_{\text{inac}} = 0.07 \text{ min}^{-1}$) y al incubarla en presencia de 0.08 mM de PEP más 0.4 mM de PPI o 0.08 mM de PEP más 0.08 mM de AMP ($k_{\text{inac}} = 0.07 \text{ min}^{-1}$). El que no se hayan encontrado diferencias significativas no quiere decir necesariamente que estos sustratos (AMP y PPI) no se unan a la enzima.

Posiblemente las interacciones específicas originadas a partir de la unión de estos sustratos no favorezcan la estabilidad de la enzima y en consecuencia no protegen a la enzima de la desnaturalización térmica. No siempre los sustratos protegen a la proteína; en ocasiones, los inhibidores análogos de los sustratos y algunos productos de la reacción protegen la estructura de las enzimas mucho más efectivamente que los propios sustratos. Por ejemplo, se determinó que una fosfatasa ácida de semillas de frijol castor (*Ricinus communis* L.) se protegió de manera notable contra la desnaturalización térmica en presencia de 10 mM de fosfato y 10 mM de p-nitrofenol-p-NP, los productos de la reacción (Granjeiro *et al.*, 2004). Asimismo, se determinó que la temperatura media de desnaturalización (T_m) de la enzima se incrementó a 75 °C en presencia de los productos de la reacción, pero no se observó protección en presencia de los sustratos. Esto se puede deber a las diferentes interacciones específicas que se forman al unirse los productos y que no son las mismas que se forman al unirse los sustratos. Como consecuencia, la estabilidad de la enzima aumenta en ciertas condiciones (en presencia de productos) y la proteína no se protege de la inactivación térmica en presencia de los sustratos (Granjeiro *et al.*, 2004).

Así que no necesariamente la falta de protección ante la inactivación térmica de la EhPPDK (Figuras 8A y 8B) se debe a que el sustrato no se una a la

enzima, ya que la misma unión de alguno de los sustratos puede favorecer una forma de la enzima menos estable que la de la enzima sin sustratos o simplemente no tener ningún efecto de protección, como se observó en presencia de PEP, PPI, PEP junto con AMP y PEP más PPI. Por otra parte, el AMP fue el único con el cual se encontró una mayor protección ante la inactivación térmica. El AMP podría unirse y favorecer una estructura proteica más estable que la de la enzima en ausencia de cualquiera de los sustratos. Sin embargo, no se puede determinar la causa exacta de la protección de la EhPPDK por AMP.

Al incubar algunas enzimas en presencia de ciertos compuestos se obtiene protección ante la inactivación térmica, ya que estos modifican la fuerza iónica u osmolaridad del medio de incubación, con lo que se favorece la estructura nativa de la proteína. Muchos microorganismos hipertermófilos tienen una alta concentración de compuestos como el 2-O- α -manocilglicerato, que es un osmolito cargado negativamente y que protege de manera importante la estructura de diferentes proteínas a altas temperaturas (Faria *et al.*, 2004). Por ejemplo, este osmolito protege a la nucleasa A recombinante de *Staphylococcus aureus* de la desnaturalización térmica, debido a que provoca la desestabilización de la estructura desnaturalizada de la proteína y a su vez favorece la estabilización de las interacciones específicas del estado nativo (Faria *et al.*, 2004).

También se debe señalar que la concentración de los sustratos a la que se incubó a la enzima es importante, ya que de acuerdo con la concentración utilizada se puede proteger en mayor o menor grado a la proteína. Las concentraciones de los sustratos que se utilizaron para hacer estos experimentos

(fig. 8A y 8B) fueron cuatro veces el valor de la K_m (Varela-Gómez, 2000), con el fin de mantenerlos casi saturantes pero en la misma proporción respecto a su constante de afinidad. Así, al incubar a la EhPPDK en presencia de 0.4 mM de PPI no se observó un importante efecto protector con respecto al ensayo control (figura 8A), pero al incubar a la enzima en presencia de 2 mM de PPI (20 veces el valor de K_m) se encontró una notable protección contra la inactivación térmica (Figura 9). La constante de inactivación en presencia de esta concentración de PPI fue muy cercana a cero ($k_{inac} = 0.0003 \text{ min}^{-1}$).

De nuevo, este tipo de protección puede deberse a la unión específica del PPI a la enzima o a algún efecto sobre la mezcla de reacción (fuerza iónica por ejemplo) que aumente la estabilidad de la enzima. En el artículo Varela-Gómez *et al.*, 2004 se reportaron unos experimentos en los que, mediante marcaje radiactivo, se muestra que el PPI se une a la enzima libre en ausencia de los otros dos sustratos. Una primera explicación es que en nuestra preparación de proteína hay una proporción importante (alrededor del 7%) de enzima fosforilada (EP) y/o pirofosforilada (EPP) que, de acuerdo con otra serie de experimentos, es la forma a la que se une el PPI o el AMP. La segunda explicación es que la forma libre de la enzima une al PPI pero con una afinidad muy baja. No se determinó la proporción de enzima fosforilada o pirofosforilada presente en la preparación ni la constante de afinidad de la enzima libre por el PPI en ausencia de los otros dos sustratos, pero con el experimento de la figura 9 se apoya la suposición de que el PPI se une a la enzima libre a altas concentraciones (20 veces el valor de K_m).

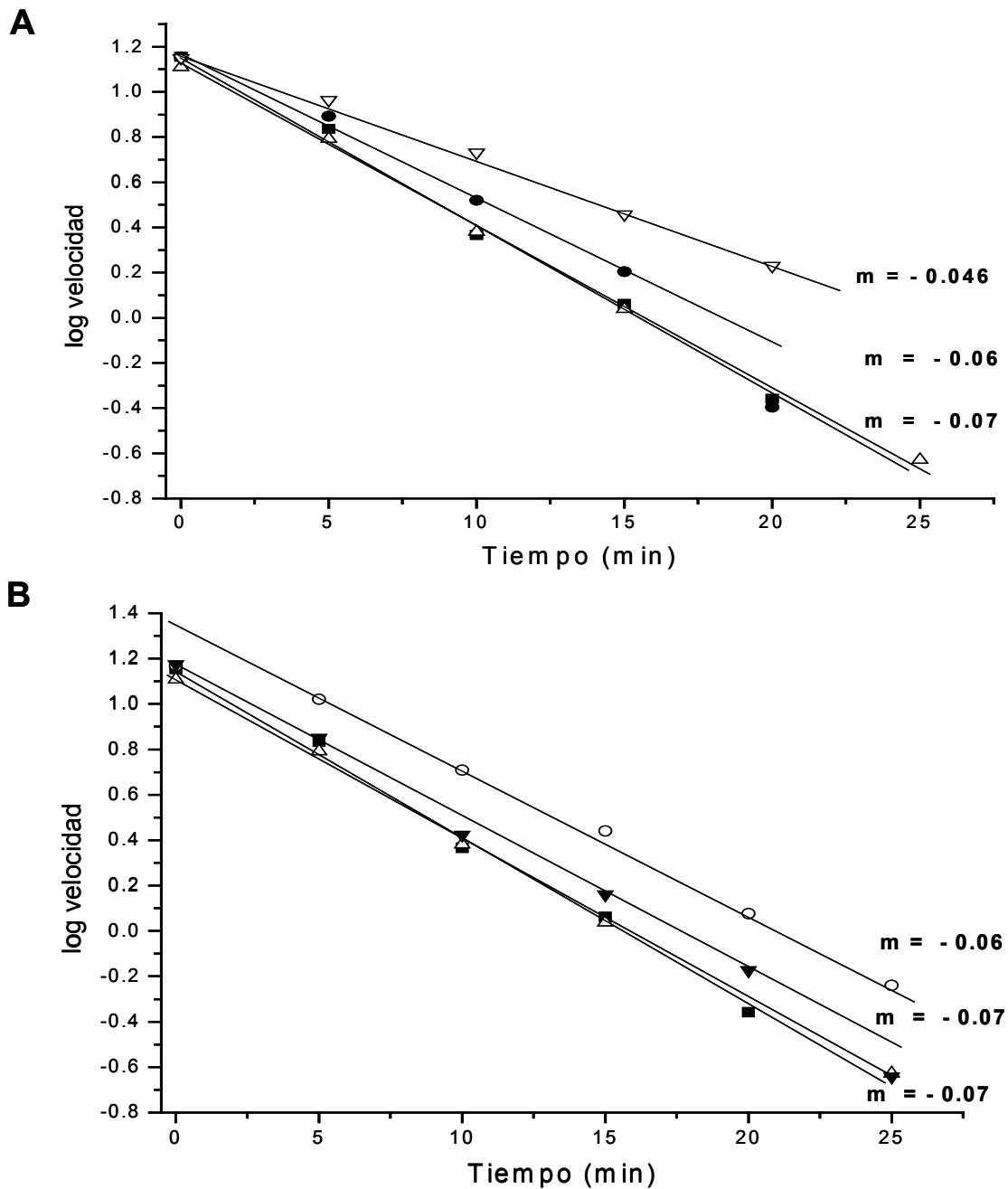


Figura 8. Inactivación térmica de la EhPPDK a 55 °C en presencia y ausencia de de sustratos. A. Incubación de la enzima control (0.15 mg/mL) en ausencia de sustratos (■), en presencia de 0.08 mM PEP (△), en presencia de 0.4 mM de PPi (●) y de 0.08 mM AMP (▽). B. Inactivación térmica de la EhPPDK frente a diferentes combinaciones de sustratos, control (■), en presencia de 0.08 mM PEP (△), incubada con 0.08 mM PEP y 0.4 mM PPi (▼) e incubada con una mezcla de 0.08 mM PEP y 0.08 mM AMP (○). En las dos gráficas m es la pendiente y corresponde a la constante de inactivación.

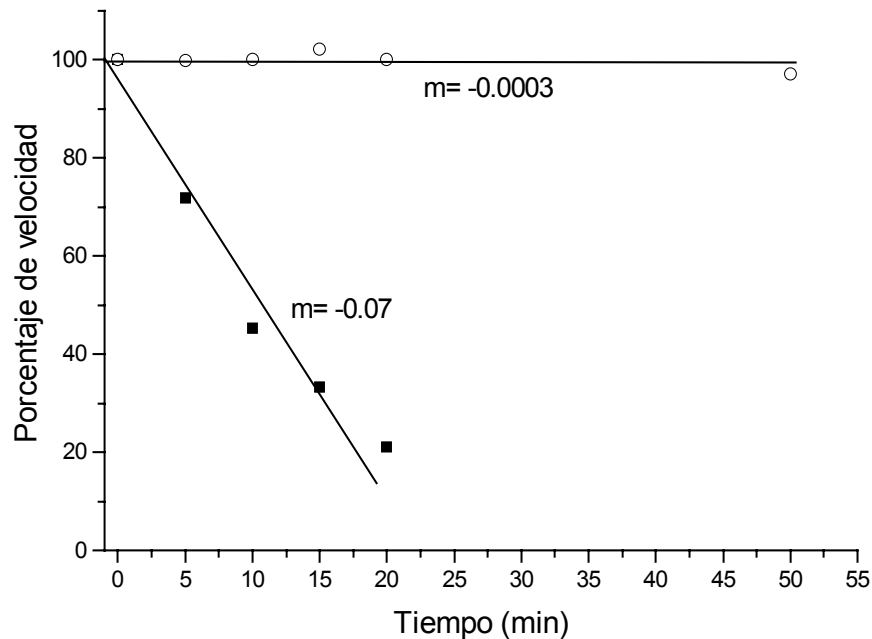
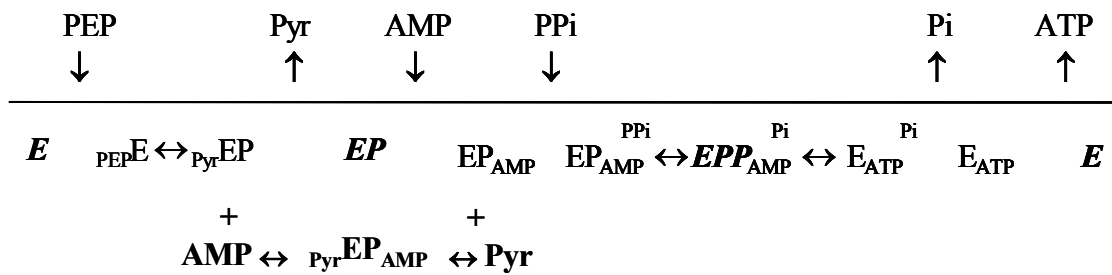


Figura 9. Experimento de inactivación térmica a 55 °C en presencia de 0.15 mg/mL de EhPPDK como control (■) y en presencia de 2 mM PPI (○).

IV. A. 5. Inhibición por producto a concentraciones saturantes del cosustrato.

Los patrones de inhibición por producto pueden modificarse de acuerdo con la concentración del cosustrato, tal como se describió en la Introducción (I.C.2). Estos patrones se pueden predecir para un mecanismo cinético planteado. En la Tabla VI se muestran los patrones de inhibición por producto para cada sustrato, a concentraciones subsaturantes de los cosustratos, para la EhPPDK (Varela-Gómez *et al.*, 2004), la PsPPDK (hexa uni, Milner y Wood, 1976), y la CsPPDK (uni uni bi bi, Wang *et al.*, 1998.). También se presentan las predicciones de la



Esquema 1. Diagrama de Cleland del mecanismo cinético Uni Uni Bi Bi ping pong propuesto para la piruvato fosfato dicinasa de *E. histolytica* con base en los experimentos descritos en Varela-Gómez *et al.*,2004.

Los patrones de inhibición por producto que se deducen de la ecuación para el mecanismo Uni Uni Bi Bi (Varela-Gómez *et al.*, 2004) y los patrones de inhibición a concentraciones saturantes del cosustrato (Tabla VI) generaron una gran discusión entre los revisores del Journal of Biological Chemistry y nosotros. A continuación se incluyen algunos fragmentos de los correos electrónicos sobre las principales observaciones del editor y revisor de la revista y las respuestas con las que defendimos la evidencia experimental del artículo.

Fecha: Tue, 02 Mar 2004 17:52:01 -0600
De: "Dr. Ruy Perez Montfort" <ruy@ifc.unam.mx>
Para: mvarela@ifc.unam.mx
Responder-a: ruy@ifc.unam.mx
Asunto: [Fwd: From the JBC re: Manuscript M4:01697]

----- Original Message -----

Subject: From the JBC re: Manuscript M4:01697
Date: Tue, 2 Mar 2004 15:03:50 -0500
From: ycoleman@asbmb.faseb.org
To: ruy@ifc.unam.mx

March 2, 2004

Dr. Ruy Perez-Montfort
Departamento de Bioquímica
Instituto de Fisiología Celular
Ciudad Universitaria
Mexico, D.F. 04510, Mexico

M4:01697

Dear Dr. Perez-Montfort:

Your manuscript entitled "Kinetic Mechanism and Metabolic role of Pyruvate Phosphate Dikinase from *Entamoeba histolytica*" with Drs. M. Varela-Gomez, R. Moreno-Sanchez and J.P. Pardo has been reviewed by the Editorial Board. I am sorry to tell you that your manuscript was not recommended for publication in the Journal, in its present form. The Reviewing Editor found a significant amount of the data to be directly relevant to the mechanistic questions raised but has a major concern regarding the interpretation of several product inhibition studies. The Reviewing Editor decided not to check the derivation of the general equations that relate to the product inhibition studies for the model proposed but is concerned about the predictive analysis of the data. An example of this problem is if the last part of the mechanistic proposal is the departure of inorganic phosphate prior to the departure of ATP in the process, then it should be predicted that there is no phosphate binding site on the enzyme without the presence of ATP. If that is correct, the analysis of the data is not correct and raises questions regarding the appropriate equation that would suggest otherwise. There are some additional problems regarding nomenclature used in the manuscript, the use of significant figures, and the terminology. The Reviewing Editor has described most of these questions in detail in the accompanying critique. As a result of these concerns, I must regretfully decline your manuscript for publication in the Journal, in its present form. It is important to consider the product inhibition data and how it fits to the model proposed or propose a model that better fits the data obtained. If you can add additional data that would satisfy the concerns of our Reviewing Editor we would always be pleased to review a new version of the manuscript. However, any revised manuscript will be returned to the same Reviewing Editor who evaluated the original, so it is critical that the major concerns identified in the review be satisfied if the manuscript is to be published in the Journal.

Sincerely yours,
Richard W. Hanson
for the Editorial Board RWH/yc

Comments for author:

The manuscript submitted by Dr. Perez-Montfort and colleagues contains the results of kinetic studies and some metabolic analyses to determine the kinetic mechanism and the metabolic role of the interesting enzyme pyruvate phosphate dikinase from *Entamoeba histolytica*. The authors seem to have done a good job in doing most of the appropriate kinetic studies although the same level of rigor was not applied to the “metabolic studies”.

... There is a potential major flaw in the analysis of the product inhibition studies from an analysis of data and interpretation. If my analysis is correct, there must also be a flaw in the **equations 3a and 3b**. Before I would attempt to check the derivations, the authors should reanalyze and check the equations and their applications. If the kinetic mechanism is as suggested, the inhibition patterns from phosphate would be predicted to differ. Specific comments and details are listed below:

... **p. 14, l. 1-2**: This is counter intuitive. If Pi binds only to E-ATP then in initial velocity steady state studies in the absence of ATP, no inhibition is predicted. If the reaction at that point is random, then the formation of E-Pi can take place and therefore inhibition. With these fundamental concerns, please clarify the conclusions raised in this paper.

... **p. 14, top**: See previous comments. Doesn't the data argue for a random process?

... **p. 14, last 2 lines & p. 15, l. 1-2**: If K_{ic} is the K_d for E + ATP, a value of 0.14 mM should be sufficient to see effects of the proposed competitive inhibition against PEP and NC with AMP. Please clarify.

Dear Dr. Hanson:

We are submitting an extensively revised version of the manuscript entitled "Kinetic mechanism and metabolic role of pyruvate phosphate dikinase from *Entamoeba histolytica*" for publication in the Journal of Biological Chemistry. A previous manuscript we sent on February 16, 2004 was given number M4:01697. In your letter of response (dated March 2, 2004) you and a member of the Editorial Board raised major concerns about that manuscript, which we have tried to satisfy in this new version of our work.

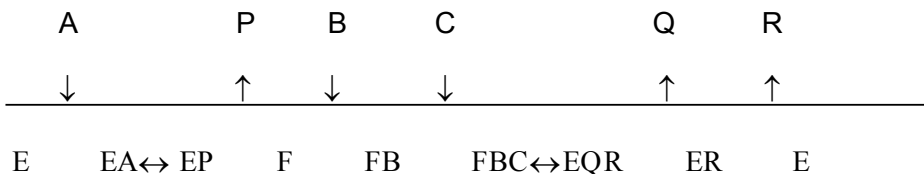
A very important difference in this version is that new results from measuring the ATP concentration, suggested by the referee (see point **p. 11, top para.: ...**), in addition to the Pi concentration at equilibrium (that had already been measured in the first version of this work) forced us to recalculate the equilibrium constant of the reaction catalyzed by PPK. This new value indicates that the PPK reaction is not near the thermodynamic equilibrium in the conditions we studied, instead of thermodynamically favoring the synthesis of ATP, as had been concluded in our previous manuscript. The result of a negative ΔG value for the reaction in the previous version of the manuscript was due to a miscalculation in the concentration of Pi that was corrected in this new version as a result of measuring the ATP concentration. Thus, our discussion and conclusions have been altered accordingly.

For the sake of clarity, we have decided to combine our responses to all to all the issues raised by your letter and the referee's comments.

Response to the referee's and Dr. Hanson's comments.

There is a potential major flaw ...

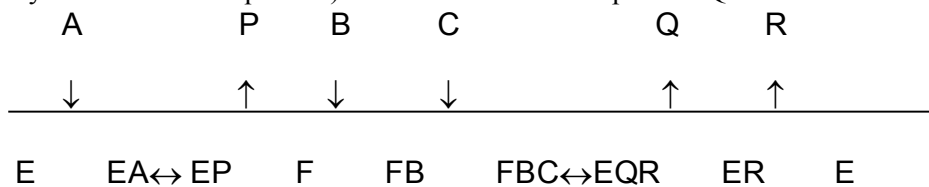
The section of Results and Discussion was re-organized as suggested. The text was carefully edited. The major concern of the referee regarding the interpretation of several product inhibition studies is answered below:



The enzyme is complex and undergoes large conformational changes during the catalytic cycle. Therefore, it is likely that P_{Pi} (B or C in the scheme above) and ATP (R) may react with other enzyme forms. For example, it is possible that ATP can react with F, as well as AMP can react with E. In fact, recent experiments in our lab showed that AMP (B or C) alone protects the enzyme against thermal inactivation raising the possibility of the following reaction $E + AMP \leftrightarrow E^{AMP}$. The same explanation may apply to Pi (Q). We did not want to include all of these possible interactions in the EhPPDK kinetic mechanism because the kinetic scheme becomes extremely complicated. Our goal was to support one kinetic mechanism among several possibilities. This is stated on p. 18 lines 17-20.

... p. 14, l. 1-2: **“This is counter intuitive. If Pi binds only to E-ATP then in initial velocity steady state studies in the absence of ATP, no inhibition is predicted. If the reaction at that point is random, then the formation of E-Pi can take place and therefore inhibition. With these fundamental concerns, please clarify the conclusions raised in this paper.”**

Certainly, in a rapid equilibrium enzyme, no Pi inhibition is expected in the absence of added ATP. However, a different behavior is expected for an enzyme that follows a steady state mechanism. As shown in Segel's book, (Segel, I. (1975). *Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*. John Wiley & Sons, Inc. USA), the rate equation of an enzyme with a uni uni bi bi ping pong mechanism (see scheme below) shows the denominator with isolated terms in Q (which in our case corresponds to Pi). This indicates that even in the absence of R (ATP in our reaction), Q may inhibit the reaction. The reason underlying this unexpected result is that in a steady state kinetic mechanism there is a finite amount of ER (given by the distribution equations) that can react with the product Q.



In contrast, when the reaction achieves rapid equilibrium, then the concentration of ER is zero in the absence of added R, and hence, there is no interaction between Q and ER and no inhibition. If inhibition by Q is observed in a rapid equilibrium system, then there must be interaction of Q with other enzyme forms but not with ER. Due to the similar structure of Pi and P₂i (C in the above scheme), the most probable target structure is FB. However, at saturating concentrations of C, inhibition by Q should not be observed since Q and C compete for FB. Therefore, our experiments showed that inhibition by Pi at saturating concentrations of A, B and C was consistent with a steady state mechanism, but not with either random or ordered rapid equilibrium mechanisms.

... p. 14, last 2 lines & p. 15, l. 1-2: ...

The ATP inhibition against AMP was re-evaluated by using higher ATP concentrations (2 mM). In these conditions, ATP behaved as a noncompetitive inhibitor against AMP. This observation supports the proposed kinetic model. In consequence, the text on the summary, p. 14 lines 10-16, and Table II were modified to include these new data.

Fecha: Mon, 30 Aug 2004 13:18:36 -0600
De: ["Dr. Ruy Perez Montfort" <ruy@ifc.unam.mx>](mailto:ruy@ifc.unam.mx)
Para: [Marcela Varela Gomez <mvarela@ifc.unam.mx>](mailto:mvarela@ifc.unam.mx)
Responder-a: ruy@ifc.unam.mx
Asunto: From the JBC re: Manuscript M4:01697

-----OriginalMessage-----

Subject: From the JBC re: Manuscript M4:01697
Date: Mon, 30 Aug 2004 13:53:46 -0400
From: ycoleman@asbmb.faseb.org
To: ruy@ifc.unam.mx

M4:01697

Dear Dr. Perez-Montfort:

The revised version of your manuscript entitled "Kinetic Mechanism and Metabolic Role of Pyruvate Phosphate Dikinase from *Entamoeba histolytica*" has been reviewed again by the same Reviewing Editor who evaluated the first version. The Reviewing Editor found this version to be much improved, more comprehensible and the results more credible. Nearly all the questions raised in the first review were clearly addressed in a positive manner and the Reviewing Editor was pleased with your attention to detail in this draft.

However, there are still several concerns with this manuscript. Primarily there is a concern regarding the proper use of significant figures. Please pay close attention to the presentation of your quantitative data and make sure it adequately reflects the sensitivity of your measurements. Most of the other criticisms are editorial in nature. Please carefully evaluate the comments of our Reviewing Editor, modify your manuscript and return it to me (via our JBC website). I will attempt to expedite re-review and provide you with a prompt editorial decision. When you return to the Journal with a revised manuscript, please provide me with detailed listing of changes made from the original...

Sincerely yours,
Richard W. Hanson
for the Editorial Board
RWH/yc

Comments for author:

The paper that has been resubmitted by Dr. Perez-Montfort and coworkers has been significantly revised, edited and additional information added in response to the initial review. The result is that this version is considerably improved and strengthened. This presentation is much more comprehensible. This family of enzymes is indeed quite complex as first reflected by initial work from Dr. H. Wood's lab. Subsequent work helps in our understanding of this important enzyme. There are still some corrections and clarifications necessary in this version of the paper...

...**Table II:** If inhibition is assayed with Pi at higher concentrations of PPi versus AMP is UC inhibition observed? Analogously, if inhibition by pyr against PPi is measured at higher AMP would this also induce UC effects? These are interesting, potentially revealing experiments to be considered...

Richard W. Hanson, Ph.D.
Department of Biochemistry
Case Western Reserve University
Cleveland, OH 44106

9th September 2004.

Dear Dr. Hanson:

...“Table II: If inhibition is assayed with Pi at... These are interesting, potentially revealing experiments to be considered.”

We considered the experiments that you suggested and we determined the inhibition pattern of Pi against AMP at saturating concentrations of PPI. It was determined that the mixed type inhibition at unsaturating concentrations of AMP was not observed at saturating ones where the pattern was UC (Figure 1) as you pointed out based on the kinetic mechanism proposed for EhPPDK in our work.

About the product inhibition of Pyr against PPI at saturating AMP concentrations, we did not obtain a UC inhibition that could be predicted from the scheme of the kinetic mechanism proposed. It was found a competitive one. We deduced a velocity equation based on a lightly modified kinetic mechanism proposed for EhPPDK in our work (Scheme III of Varela-Gómez *et al.* work). The only modification consists to assume that the Pyr-EP-AMP complex is formed only by the Pyr addition to the EP-AMP complex. This assumption was necessary to make simpler equation as possible, to reduce terms and to predict more accurately the inhibition patterns. If we considered the formation of Pyr-EP-AMP complex also by the binding of AMP to Pyr-EP complex, the resulting equation contains quadratic terms that complicate a lot the analysis. From this equation we deduced that Pyr should be a competitive inhibitor against PPI assuming saturating concentrations of AMP. This predicted pattern corresponded to that determined experimentally (Figure 2). It is very relevant to mention that the predicted pattern for this inhibition is very different if we consider the equation 3a of our work that corresponded to a Uni Uni (ping pong) Bi Bi ordered mechanism. This equation does not consider the Pyr-EP-AMP dead-end complex so the inhibition pattern is completely different. According to this equation, at saturating concentrations of AMP should not exist Pyr inhibition against PPI. Because experimentally we observed inhibition, we have determined the other velocity equation considering the dead end complex. These data are other evidences to strongly support the kinetic mechanism that we are proposing to EhPPDK (Scheme III of the work).

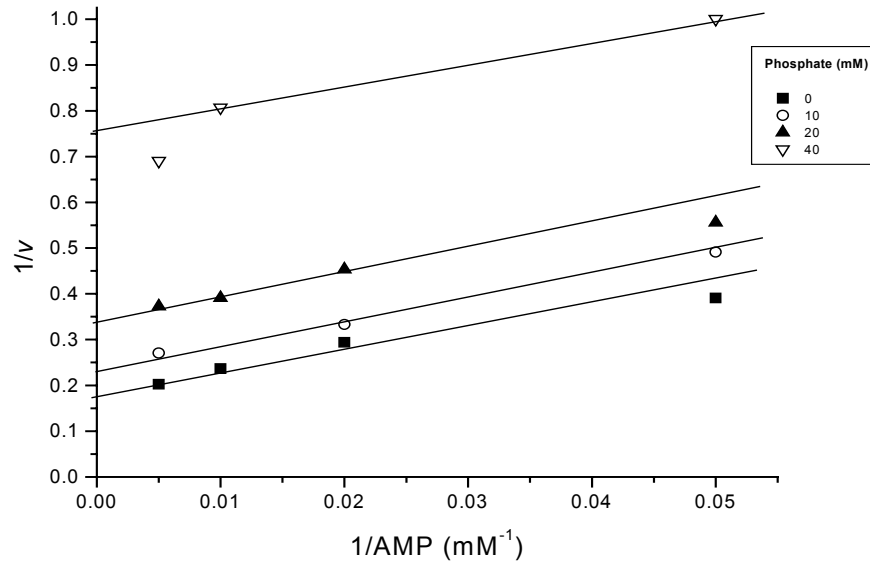


Figure 1. Uncompetitive inhibition pattern of phosphate against AMP at saturating concentration of P_{Pi} (1mM; K_m = 0.1 mM). At each phosphate concentration the free Mg²⁺ concentration was 7mM.

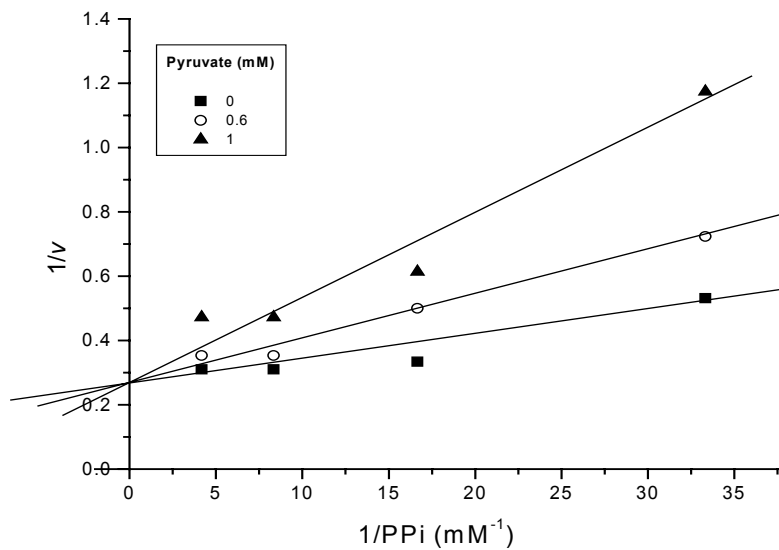


Figure 2. The competitive inhibition pattern obtained varying P_{Pi} concentrations at different pyruvate concentrations and AMP saturating (0.6 mM; K_m= 0.02 mM).

Hasta aquí terminan los resultados adicionales no mostrados en el artículo Varela-Gómez *et al.*, 2004 con respecto al mecanismo cinético; el siguiente

apartado muestra los resultados adicionales referentes a la determinación del papel metabólico.

IV. B. Papel metabólico

IV. B. 2. Determinación del volumen intracelular de *E. histolytica*.

IV. B. 2. a. Citometría.

Estos experimentos se realizaron para determinar de manera indirecta el volumen de las células de *E. histolytica*. Se obtuvo el tamaño de los trofozoítos tomando como referencia las señales de citometría de esferas de tamaño conocido. La citometría de flujo utiliza los principios de dispersión de la luz, excitación y emisión de luz por moléculas fluorocrómicas, con lo que se generan datos multiparamétricos de células y partículas que se encuentran en el intervalo de tamaño de 0.5 a 40 μm de diámetro (http://www.biology.berkeley.edu/crl/flow_cytometry_basic.html). Este tipo de técnica se diseñó para el análisis cuantitativo de las propiedades físicas de las células o partículas seleccionadas (<http://www.rudbeck.uu.se/cellanalys/flow.html>).

En la citometría de flujo las células se dirigen hacia una fuente de luz láser mediante un flujo hidrodinámico en una capa de amortiguador fisiológico (por ejemplo, amortiguador de fosfatos: PBS). Cuando las células atraviesan la fuente de luz, ésta se dispersa y las moléculas fluorescentes presentes se excitan, con lo que alcanzan un nivel energético mayor que provoca la emisión de luz con propiedades espectrales específicas y propias de la molécula fluorescente. Esta luz dispersada y la fluorescencia emitida por las células o partículas se convierte

posteriormente en pulsos eléctricos que son procesados por amplificadores y finalmente convertidos en datos que pueden ser graficados (http://www.biology.berkeley.edu/crl/flow_cytometry_basic.html), como los que se muestran en la figura 10. Los gráficos de las figuras 10A y 10B son histogramas de un solo parámetro en los que se muestra en el eje “x” la intensidad de la señal detectada y en “y” el número de eventos, es decir el número de células contadas (Núñez, 2001).

Así, los eventos con fluorescencia específica más intensa se encuentran recorridos a la derecha sobre el eje de las “x” y hacia la izquierda se encuentran las células que emiten menor señal de fluorescencia. Las figuras 10A y 10B muestran dos histogramas con diferentes escalas de una muestra de trofozoítos de amiba. Se observa una dispersión muy grande en la población de trofozoítos, y esto es más evidente en la figura en la que se grafica la intensidad de fluorescencia en escala logarítmica (Fig. 10B) que en la que se utiliza la escala lineal (Fig. 10A). Esto se debe a que con la escala logarítmica se amplifican las regiones de los extremos de la población, es decir de los sesgos.

Los datos de las figuras 10A y 10B también se analizaron en histogramas de dos parámetros, en los que se representan dos mediciones de fluorescencia diferentes, tales como la dispersión frontal (FSC-H) en “x” y la dispersión lateral (SSC-H) en “y”. En este tipo de gráficos, los datos se ven como nubes de datos (Fig. 10C y D). Cada punto corresponde a un solo evento, es decir, representa la medida de los parámetros obtenidos de manera individual para cada célula. Esta es una de las principales ventajas de la citometría de flujo, ya que permite medir la fluorescencia de cada célula o partícula, a diferencia de la espectrofotometría, en

la cual se determina la absorción y transmisión de luz de un conjunto de moléculas(http://www.biology.berkeley.edu/crl/flow_cytometry_basic.html).

Se puede observar que existe una gran dispersión de los datos con respecto a la fluorescencia emitida por cada célula. Por eso se observa una nube de puntos sin una tendencia clara, con puntos dispersos en toda la escala de cada uno de los ejes. Se observó el mismo comportamiento al graficar con escala lineal (fig. 10C) o con escala logarítmica (fig. 10D). Esta gran dispersión indica que la población de amibas no es homogénea con respecto al tamaño de las células y posiblemente al estado de crecimiento o división celular, ya que se obtuvieron de cultivos en fase estacionaria. Estos primeros experimentos se realizaron con trofozoítos procesados a temperatura ambiente, lo cual pudo favorecer la gran variedad de tamaños y forma de la población de amibas. Para tratar de homogeneizar a la población de trofozoítos, estos se procesaron en hielo seco para producir una forma esférica de las células en lugar de la ameboide irregular. Para mantener esta forma se fijaron con formol y así fue como se obtuvieron los datos de citometría mostrados en la figura 11. Mediante este tratamiento con frío se logró obtener una población de células mucho más homogénea, como se observa en los histogramas de uno y dos parámetros, con escala lineal de la figura 11A. Estos datos son más confiables, por lo que se pueden interpolar con los datos de una curva estándar construida con partículas esféricas de diámetro conocido. Los gráficos de las figuras 11B y 11C se obtuvieron con partículas de 6 y 9.62 μm , respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre los histogramas de un solo parámetro de las partículas esféricas, por lo que no se

pudo obtener el diámetro de los trofozoítos esféricos y, en consecuencia, el volumen de estas células. En los gráficos de la Figura 11B se observa que hay una población muy homogénea de partículas de 6 μm , ya que la mayoría se encuentra agrupada muy cerca de la intersección entre los ejes, con un valor promedio de 99 de dispersión frontal (FSC-H), que en citometría representa el tamaño de las partículas o células. Solamente se observan unos cuantos puntos dispersos que alcanzan valores mayores sobre el eje de las equis. Por otra parte, en el caso de las partículas de 9.6 μm (fig. 11C) se observó una mayor dispersión de los datos del eje equis en comparación con las partículas más pequeñas. Además, no se observó una diferencia significativa entre los valores promedio de dispersión frontal de estas partículas. Al obtener los datos de citometría para las partículas más grandes, de 20 y 65 μm , se obtuvo el gráfico de la figura 11D, en el que se ve claramente que no existe ninguna diferencia importante con respecto a los datos de las partículas más pequeñas. Las partículas de tamaño estándar utilizadas en este tipo de experimentos estaban seguramente degradadas, de ahí que no se encontró diferencia significativa entre ellas, a pesar de su diferencia de tamaño. Debido a que los resultados de estos experimentos no fueron claros, se utilizó otro enfoque para determinar el volumen de los trofozoítos.

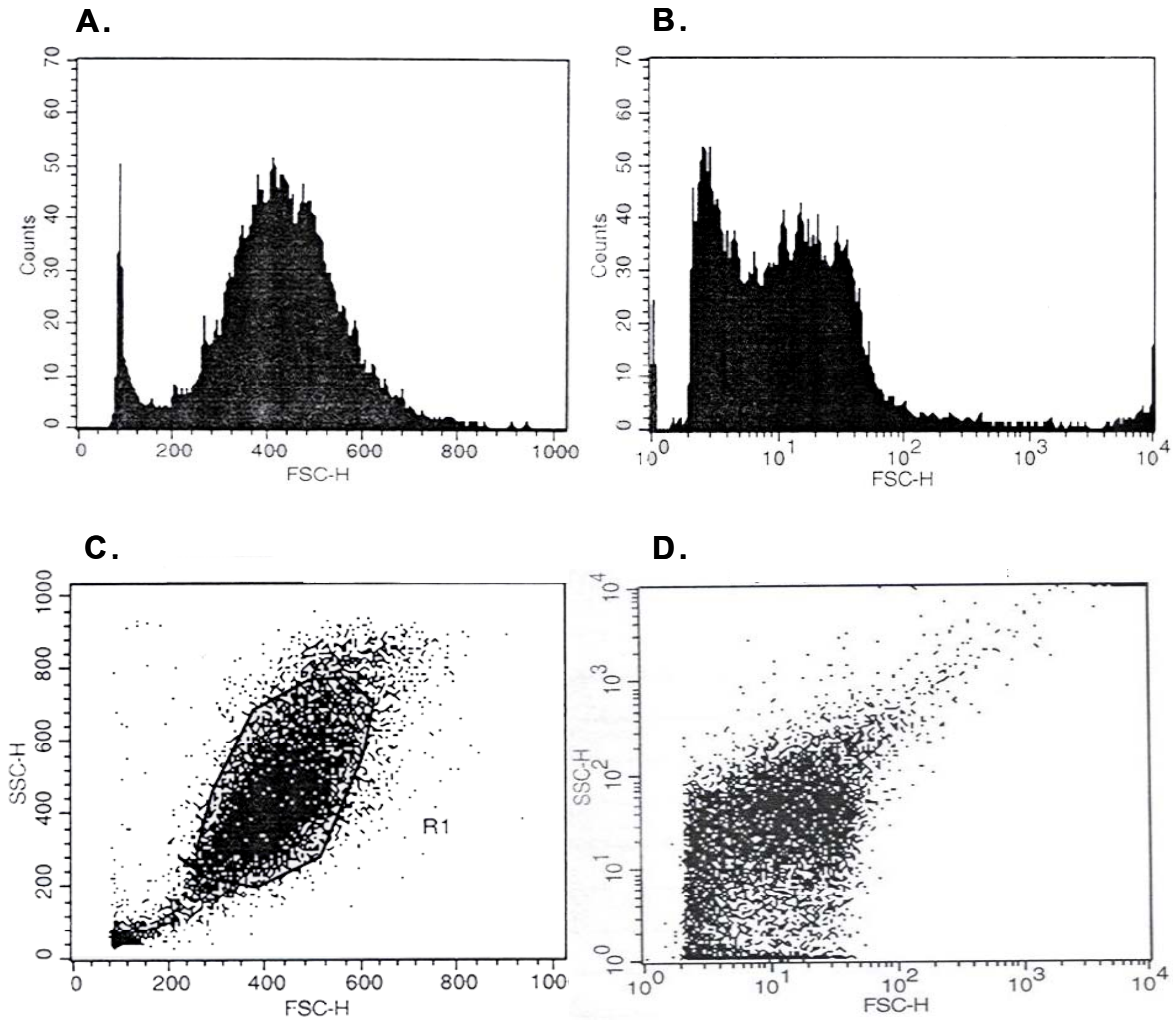


Figura 10. Diferentes histogramas de datos de citometría de flujo de trofozoítos de ameba. **A.** histograma de un parámetro con escala lineal, **B.** histograma de un parámetro con escala logarítmica, **C.** histograma de dos parámetros con escala lineal, **D.** histograma de dos parámetros con escala logarítmica.

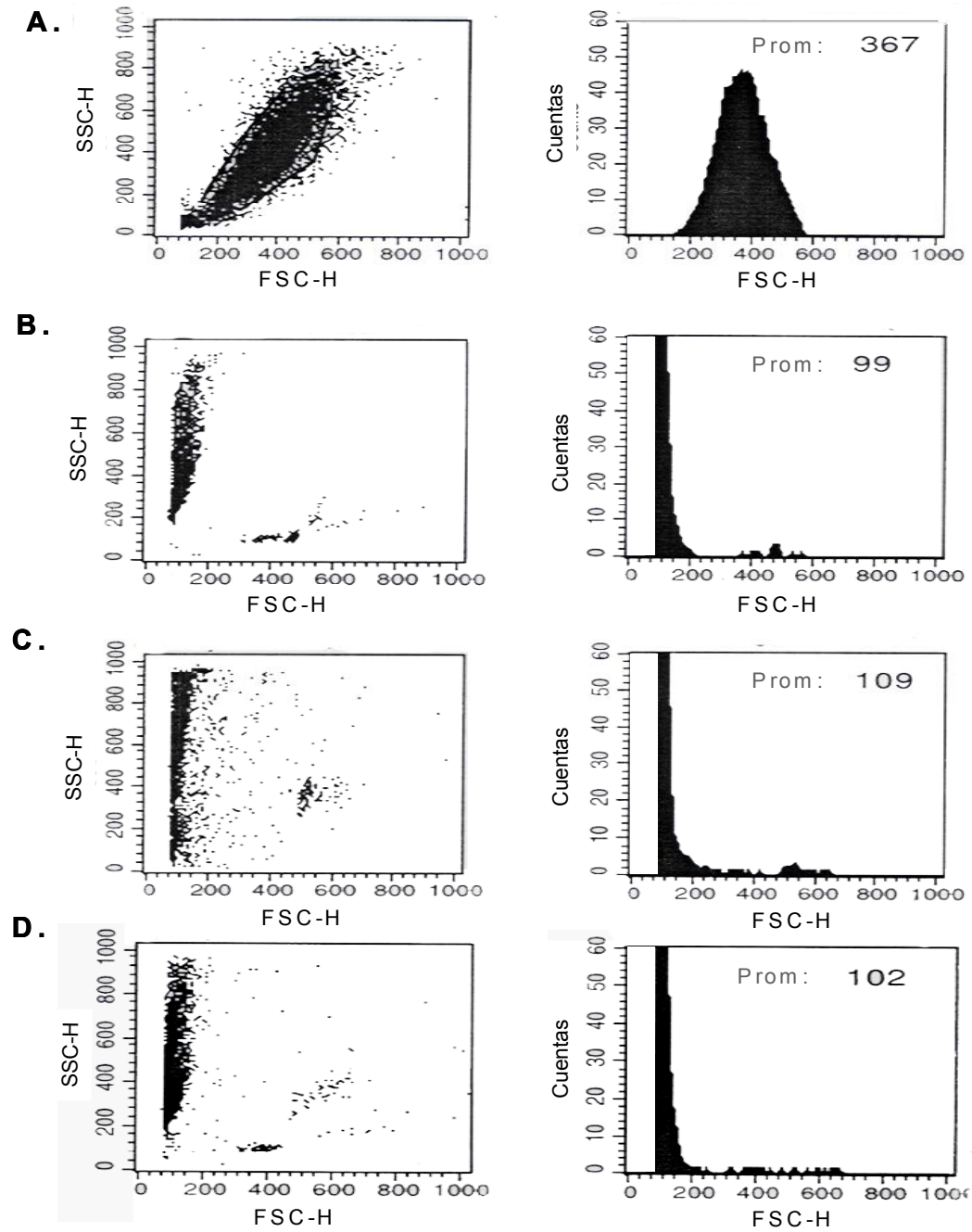


Figura 11. Gráficos de dos (izquierda) y un parámetro (derecha) de los experimentos de citometría de trofozoitos de *E. histolytica* fijados en formol y procesados en frío (A), de partículas esféricas de 6 μm de diámetro (B), de 9.6 μm (C) y de 60 μm de diámetro (D). FSC-H : Dispersión frontal, SSC-H : Dispersión lateral, Prom.: promedio.

IV. B. 2. b. Determinación con inulina radiactiva.

Para determinar el volumen intracelular con esta técnica, se utilizó una capa de una combinación de silicones de diferentes densidades ($\delta = 0.997 \text{ g/cm}^3$) para separar a los trofozoítos, ya que estos no atravesaban la capa de bromododecano debido a su mayor densidad ($\delta = 1.038 \text{ g/cm}^3$). con respecto a la de las células. En estos experimentos agua tritiada se distribuye dentro de las células debido al rápido intercambio del agua entre el interior y exterior de las células. Cuando los trofozoítos se centrifugan y llegan a la capa inferior compuesta por PCA, se rompen las membranas y así se cuantifica el agua tritiada que en su mayoría venía del interior de las células. Asimismo, para no sobreestimar el volumen celular, se cuantificó el agua radiactiva de la capa de hidratación que rodea a los trofozoítos y que permanece a pesar de la centrifugación a través de la capa hidrofóbica de silicón. Por tanto, se incubaron las células con inulina marcada y su presencia en la capa de PCA corresponde al agua tritiada que queda fuera de los trofozoítos. La inulina es un polisacárido muy grande que no atraviesa la membrana plasmática, por lo que las cuentas de la inulina corresponden a las moléculas de la capa de hidratación que rodea a los trofozoítos. Sin embargo, de las aproximadamente 60,000 cpm de [^3H]-inulina, casi todas estaban en la capa de PCA. Lo que se esperaba es que el número de cuentas radiactivas de la inulina fuera menor que el del agua tritiada, debido a que el volumen intracelular es mayor que la capa de hidratación de los trofozoítos. Esto provocó que la cuantificación del volumen intracelular fuera poco confiable ($4.1 \mu\text{L}/10^7$ células; $n=2$).

Los trofozoítos de *E. histolytica* tienen una alta velocidad fagocítica y pinocítica y probablemente la elevada cantidad de inulina en la fracción de PCA se debió a que ésta fue introducida a la célula a través de endocitosis. Una posibilidad para evitar este problema sería hacer estos experimentos a temperaturas bajas, para disminuir la velocidad de fagocitosis. Sin embargo, a esta temperatura, también se corre el riesgo de obtener valores poco precisos o no confiables del volumen intracelular, ya que a bajas temperaturas los trofozoítos cambian su apariencia amorfa por una esférica y aparentemente disminuyen su volumen. Otra posibilidad que se planteó fue utilizar algún inhibidor del citoesqueleto como el nocodazole para inhibir la fagocitosis. El nocodazole es un agente antimicrotúbulo, utilizado como droga antitumorigénica, que inhibe la polimerización de la β -tubulina al unirse a un residuo de arginina que es clave para la polimerización de esta proteína. La efectividad de este compuesto se obtuvo cuantificando el número de eritrocitos fagocitados por las células control y las tratadas con nocodazole. Sin embargo, no hubo diferencia significativa en el número de eritrocitos fagocitados ni en la velocidad de fagocitosis entre los trofozoítos control y los tratados con nocodazole. Aún a pesar de que se utilizó cinco veces más la cantidad de nocodazole recomendada para otro tipo de células (fibroblastos).

Los trofozoítos de amiba tienen tamaños muy diversos que pueden ir desde 10 μm hasta 70 μm (Martínez-Palomo, 1982), por lo que la variación y la dificultad en la cuantificación del volumen intracelular puede estar asociada no solo al tipo de técnica utilizada sino también a la dispersión de tamaños que hay en una

población de amibas. La técnica del agua tritiada y de la inulina se utilizó previamente para determinar el volumen de *Euglena gracilis* cepa Z y de sus mitocondrias (Avilés *et al.*, 2003). En este trabajo se reportó el volumen intracelular de células de *E gracilis* Z control ($2.4 \pm 0.4 \mu\text{L}/10^7$ células) y de células expuestas a 0.1 mM de cadmio ($6.3 \pm 1.7 \mu\text{L}/10^7$ células). De acuerdo con los datos de los trofozoítos de amiba, el volumen de estas células es mayor al de las células control de *E. gracilis*, lo cual coincide con que las amibas son células más grandes que las *E. gracilis*. Sin embargo, estos dos tipos de células tienen formas completamente diferentes que seguramente también determinan el volumen celular.

Es por eso que para el cálculo de la concentración de metabolitos reportados en Varela-Gómez *et al.*, 2004 se consideró más adecuado utilizar el volumen de células amorfas de gran tamaño, como los macrófagos alveolares de bovino, con un volumen intracelular de $13 \mu\text{L}/10^7$ células (Scorneaux *et al.*, 1999). El volumen de estas células se determinó utilizando $^3\text{H}_2\text{O}$ y [^{14}C]-carboxi-inulina junto con tilmicosina (Scorneaux *et al.*, 1999). La tilmicosina es un antibiótico con el que se incubó a las células durante 4 horas y que las células endocitan, lo cual permite tener un tercer parámetro para obtener un valor confiable del volumen intracelular. Este antibiótico sólo entra a la célula por endocitosis, así que su cuantificación permitió determinar el volumen intracelular considerando la tasa de este proceso.

IV. B. 3. Determinación de metabolitos en extractos ácidos de trofozoítos de *Entamoeba histolytica*.

Los ensayos fluorométricos utilizando la reacción de MK acoplada con PYK y LDH no permitieron determinar la concentración de AMP en los extractos ácidos de *E. histolytica*. En la figura 12A se observa el trazo fluorométrico para determinar AMP con el ensayo de MK. Se observa una disminución en la fluorescencia del NADH al agregar LDH, lo cual se debe al piruvato presente en el extracto; también se observa una disminución al agregar PK como consecuencia del ADP presente en el extracto (figura 12A). Este tipo de ensayo no se utilizó para determinar la concentración de piruvato ni la de ADP, ya que las condiciones de la mezcla de reacción son las óptimas para la MK pero no para las enzimas acoplantes (PK y LDH). Al agregar la MK se esperaba que la fluorescencia también disminuyera, debido a la reacción del AMP del extracto con el ATP, en presencia de las enzimas acopladoras y la MK. Sin embargo, la adición de MK no tuvo ningún efecto sobre la concentración del NADH presente en la mezcla de reacción. El ensayo de la MK también se limitó porque el ATP utilizado en la mezcla de reacción contenía por lo menos 10% de ADP contaminante, el cual es además producto de la reacción y en consecuencia inhibe la velocidad de la catálisis del AMP y ATP a ADP.

Para determinar la concentración de AMP se utilizó el ensayo de la PPDK. Como se observa en la figura 12B, el trazo fluorométrico mostró una disminución importante en la fluorescencia del NADH al añadir la PPDK, debido a la presencia de AMP en los extractos ácidos de trofozoítos de amiba. Este mismo ensayo lo usó Reeves en 1974 para determinar las concentraciones de PEP y PPi (Reeves

et al., 1974). En el ensayo con la EhPPDK (fig. 12B) no se observó la misma actividad basal de LDH, como en el caso del ensayo con MK (fig. 12A) debido a que las condiciones experimentales, principalmente el pH, favorecen mucho más la actividad de la LDH (pH óptimo 8) en el ensayo de MK (pH 7.8) que en el de la EhPPDK (pH 6.3). Las figuras 12C y 12D son trazos representativos de la cuantificación de ATP y PEP en extractos ácidos de trofozoítos de amiba. Las concentraciones de estos y los demás sustratos se reportaron en el artículo de Varela-Gómez *et al.*, 2004 y que se incluye en esta tesis.

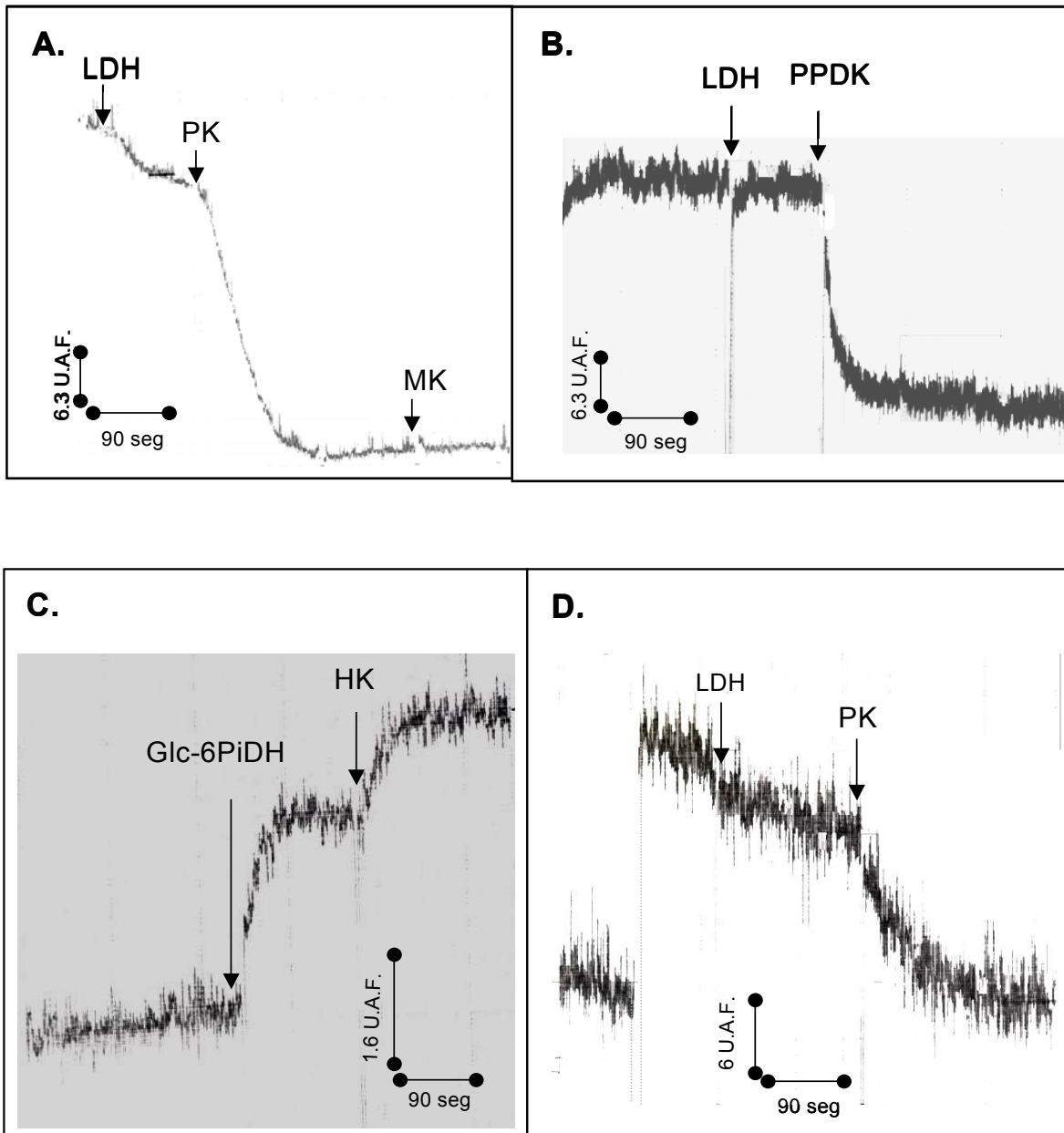


Figura 12. Espectros fluorométricos representativos de los experimentos para determinar AMP mediante la actividad de miocinasa: MK (A), AMP mediante la actividad de EhPPDK (B), ATP mediante la actividad de la hexocinasa (HK) acoplada a glucosa 6-Pi deshidrogenasa: Glc-6PiDH (C) y PEP con la reacción de la piruvato cinasa (PK) acoplada a la lactato deshidrogenasa: LDH (D).

IV. B. 4. Consumo de protones de la reacción catalizada por la EhPPDK.

Los experimentos con piranina permitieron determinar el consumo de protones durante la reacción de la síntesis de ATP por EhPPDK. La piranina es un indicador fluorescente soluble en agua y muy sensible a cambios de pH, sobretodo en el intervalo cercano a su pK_a de 7.2 (Agostiano *et al.*, 2004). Primero se determinó que 3 μ M de piranina no afectaba la actividad de la enzima (Figura 13A). El siguiente experimento control consistió en determinar el cambio de fluorescencia al aumentar la concentración de proteína (Figura 13B) y, de esta manera, establecer una relación entre la fluorescencia debida al consumo de protones durante la reacción y la observada al agregar la proteína. Al aumentar la concentración de proteína en el ensayo, la fluorescencia de la piranina también se incrementó, debido muy probablemente a que la enzima provee de un ambiente hidrofóbico, favoreciendo un rendimiento cuántico mayor del indicador. En un trabajo en el que se determinó el cambio de pH producido por el centro de reacción durante el fotociclo de *Rhodobacter sphaeroides*, se sugirió que al utilizar piranina como sonda, la concentración de proteína debería ser la más baja posible para evitar artificios en los trazos experimentales (Agostiano *et al.*, 2004).

Para determinar el consumo de protones de la reacción de la EhPPDK se utilizaron 8.6 μ g de proteína desde el inicio del trazo, para tomar en cuenta el cambio de fluorescencia de la piranina en presencia de la enzima. En la figura 13B la concentración de 8.6 μ g corresponde a al punto intermedio de la gráfica. A pesar de que se utilizaron concentraciones más bajas para construir este gráfico, éstas no se usaron para determinar el consumo de protones debido a que la

actividad de la enzima no era suficientemente alta. La reacción de la EhPPDK se iniciaba con cualquiera de los sustratos una vez que se agregaba la proteína y se obtenía una línea basal inicial. Cuando la fluorescencia se estabilizaba, se agregaba una cantidad conocida de ácido clorhídrico para determinar el número de protones que participan en la reacción (recuadro figura 13B). La síntesis de ATP catalizada por la EhPPDK consume protones, lo cual es evidente en el trazo representativo mostrado en el trazo de la figura 13B. Se observa que la fluorescencia de la piranina se incrementa al iniciarse la reacción y disminuye al agregar ácido clorhídrico. Esto indica que la fluorescencia de la piranina disminuye cuando el medio se acidifica, y aumenta cuando se basicifica. Esta evidencia permitió comprobar que en la síntesis de ATP se consumen protones, tal como lo había señalado Reeves *et al.* (1968).

De este tipo de experimentos se cuantificaron 1.7 ± 0.1 $\mu\text{moles H}^+$ / $1 \mu\text{mol}$ de ATP sintetizado, lo cual coincide con lo reportado por Reeves (Reeves *et al.*, 1968). Es importante hacer notar que estos experimentos se realizaron con 0.5 mM de imidazol para mantener una baja capacidad amortiguadora y evidenciar el cambio de pH. Aún más importante, los experimentos se llevaron a cabo a pH 6.3. Esto es relevante debido a que la piranina es un buen indicador fluorescente de pH en el intervalo de 6.8-7.8, cercano a su pKa. En este intervalo de pH, la dependencia entre la intensidad de emisión y la concentración de protones es lineal, por lo que se puede calcular el número de protones que participan en la reacción a partir del cambio en la fluorescencia (Agostiano *et al.*, 2004). El pH experimental que se utilizó en estos experimentos está fuera de este intervalo de

pH y no se determinó el tipo de dependencia entre el pH y la intensidad de fluorescencia de la piranina a pH 6.3. Aunque el valor que se determinó en este trabajo coincide con el previamente determinado por procedimientos experimentales diferentes (Reeves *et al.*, 1968), sería conveniente estudiar la dependencia lineal entre señal de fluorescencia y el pH bajo las condiciones experimentales ensayadas para la EhPPDK.

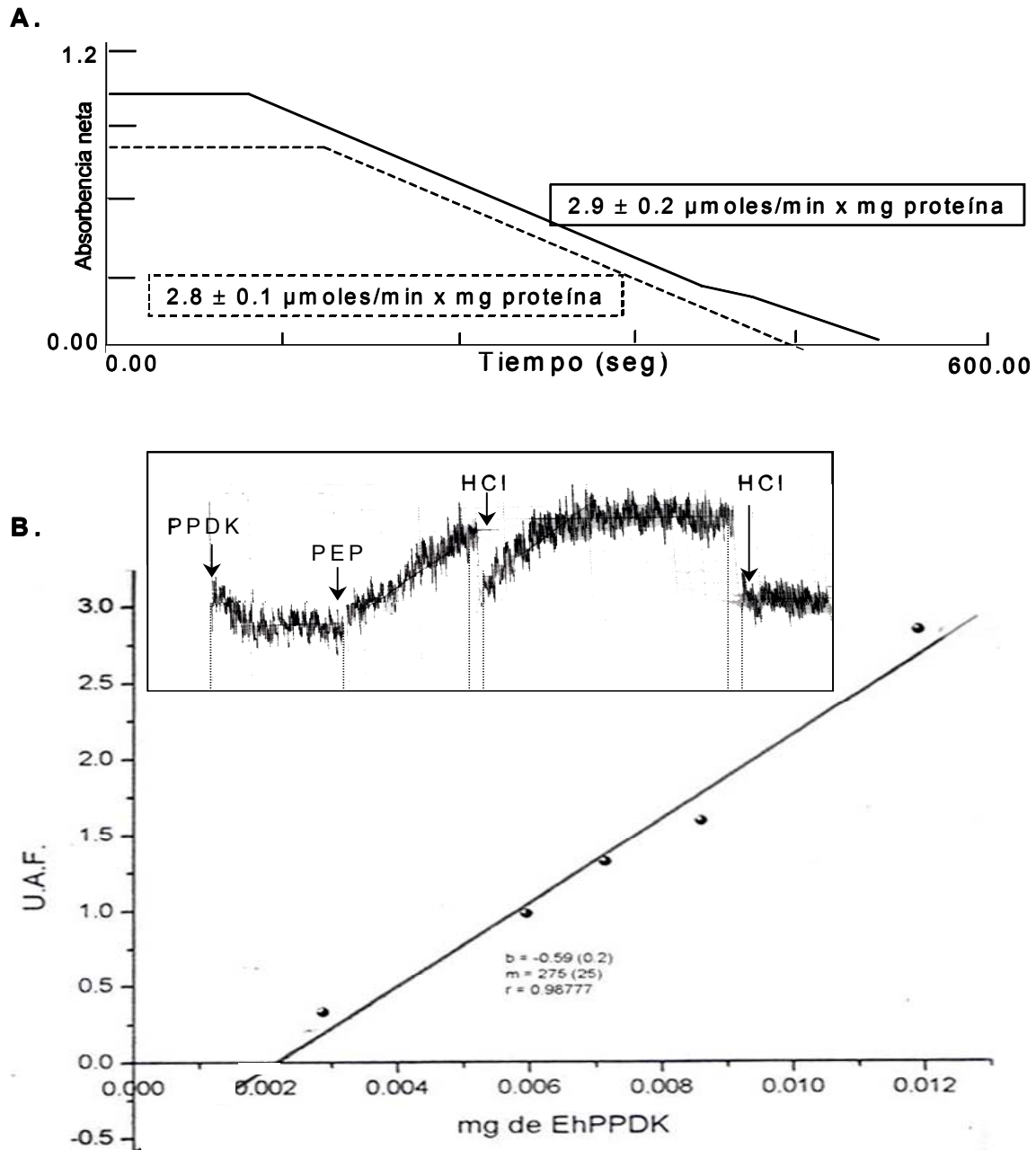


Figura 13. Experimento control en el que se determinó que $3 \mu\text{M}$ de piranina no tuvo ningún efecto sobre la actividad de la EhPPDK (A) y gráfico de concentración de proteína contra fluorescencia (B). En el inciso B también se observa como recuadro, un trazo representativo de los experimentos con piranina para determinar el consumo de protones de la reacción catalizada por la EhPPDK.

V. DISCUSIÓN GENERAL.

El mecanismo cinético de la EhPPDK coincidió mucho más con el mecanismo de la CsPPDK y la PPDK de plantas C_4 que con el de la PsPPDK. Estas enzimas pertenecen a diferentes especies y en consecuencia tienen diferente papel metabólico, dependiendo de las necesidades y condiciones de cada organismo. Sin embargo, en todos los casos la reacción que cataliza la PPDK es la misma y a pesar de ello, se han reportado dos mecanismos cinéticos diferentes.

El mecanismo Hexa (Uni) de la PPDK de *P. shermanii* se planteó con base en experimentos de velocidad inicial, en los cuales todos los patrones gráficos fueron paralelos, los patrones de inhibición por producto entre AMP/ATP, PPI/Pi y Pir/PEP fueron competitivos (Milner y Wood, 1976) y las reacciones de intercambio entre cada uno de los sustratos y sus productos fue independiente de la presencia del otro sustrato (Evans y Wood, 1968). Por tanto, el mecanismo de la PsPPDK se lleva a cabo a través de tres reacciones parciales en lugar de dos, como se ha demostrado para las CsPPDK y C_4 PPDK. Además se sugirió que la PsPPDK tiene tres sitios catalíticamente independientes uno para cada par de moléculas involucradas en las reacciones parciales (AMP/ATP, PPI/Pi y PEP/Pir), con lo que se explican los patrones competitivos de inhibición por producto (Wang *et al.*, 1988).

En el caso del mecanismo de la PPDK de plantas se determinó que el intercambio entre AMP/ATP se incrementaba en presencia de Pi+PPI ($2.3 \mu\text{moles ml}^{-1} 4\text{min}^{-1}$ a pH 7), pero alcanzaba el máximo al agregar PEP además de Pi y PPI

(9.1 $\mu\text{moles ml}^{-1} 4\text{min}^{-1}$, Jenkins y Hatch, 1985). Lo que se esperaba era que el intercambio [^{14}C]AMP-ATP no se diera en ausencia de Pi y PPi, en concordancia con un mecanismo Uni Uni Bi Bi ping pong, pero se encontró que había una actividad de intercambio en los experimentos control (0.38 $\mu\text{moles ml}^{-1} 4\text{min}^{-1}$). Esto se interpretó como una posible contaminación de Pi y PPi y no como una posibilidad de que se llevaran a cabo tres reacciones parciales, debido a que los patrones de inhibición por producto para la reacción entre AMP y PPi apoyaban el mecanismo Bi Bi Uni Uni y no el reportado para PsPPDK (Jenkins y Hatch, 1985).

El patrón de inhibición entre Pir y PEP para C₄PPDK (Jenkins y Hatch, 1985) no coincidió con el obtenido en esta tesis para el mecanismo Uni Uni Bi Bi ping pong y este patrón de inhibición no fue reportado para el mecanismo cinético de la CsPPDK (Wang *et al.*, 1988). Estas diferencias respecto a los patrones de inhibición entre EhPPDK y C₄PPDK, así como las diferencias entre los mecanismos cinéticos reportados para la PPDK pueden deberse a diferencias estructurales entre ellas. El mecanismo de tres reacciones parciales se propuso para una enzima con tres sitios catalíticos separados e independientes; a la fecha, esta hipótesis no se ha comprobado, ya que no se ha determinado la estructura cristalográfica de esta proteína. En el caso de la CsPPDK, los datos de velocidad inicial, inhibición por producto, intercambio isotópico, formación de complejos sin salida con sustratos alternos, resonancia magnética nuclear y la estructura cristalográfica de la enzima silvestre (Herzberg *et al.*, 1996) demostraron que el mecanismo es Uni Uni Bi Bi ping pong (Wang *et al.*, 1988; Thrall *et al.*, 1993).

La estructura cristalográfica de la CsPPDK (ver figura 15 del anexo 2) reveló dos sitios distantes de unión a sustrato, uno para ATP/AMP y Pi/PPi (dominio N-terminal) y el segundo para Pir/PEP (dominio C-terminal). Estos sitios están separados por 45 Å y entre ellos está el dominio que contiene a la histidina catalítica (Herzberg *et al.*, 1996). Se determinaron los residuos de aminoácidos que participan en la unión del fosfato (McGuire M *et al.*, 1998), ATP (Ye D *et al.*, 2001) y PEP (Herzberg *et al.*, 2002). Es posible que los residuos de aminoácidos que participan en la unión del Mg^{2+} -PEP no sean exactamente los mismos que participen en la unión de piruvato. El sitio de unión de piruvato se determinó a partir de la estructura de la proteína cristalizada con el fosfonopiruvato, un inhibidor análogo al PEP (Herzberg *et al.*, 2002). Los residuos que intervienen en la unión del sustrato y del producto pueden ser diferentes, por lo que es probable que en enzimas diferentes, como PsPPDK y CsPPDK, también exista este tipo de diferencias que pueden ser la causa de que los patrones de inhibición por producto no coincidan, aunque se trate del mismo mecanismo cinético (EhPPDK y C₄PPDK). Pero sobretodo algunos cambios estructurales pueden ser los responsables de la existencia de dos mecanismos cinéticos para PPDK.

El grado de identidad entre las secuencias de aminoácidos de la EhPPDK y la CsPPDK y la PPDK de maíz es de 51% y 48%, respectivamente (Saavedra-Lira y Pérez-Montfort, 1994). Este porcentaje de identidad indica que la secuencia de aminoácidos de las tres proteínas mantiene un número significativo de residuos conservados (Saavedra-Lira y Pérez-Montfort, 1994). En consecuencia, se puede sugerir que la estructura tridimensional de estas tres proteínas es muy parecida, como se observa en la estructura hipotética de la enzima de amiba que se obtuvo

utilizando como modelo la de CsPPDK con el programa computacional Swissmodel (ver figura 15 en anexo 2). Este gran parecido estructural apoya que compartan el mismo mecanismo cinético (Uni Uni Bi Bi ping pong), pero también, la estructura hipotética de la PPDK de *Propionibacterium acnes* es muy parecida (ver figura 15 en anexo 2). Sin embargo, en las secuencias de aminoácidos de estas tres enzimas hay algunas diferencias en los aminoácidos que conforman los sitios de unión de los sustratos, así como en otro tipo de residuos que dan lugar a asas más largas en el dominio central como se observa en la estructura de la EhPPDK (figura 15 anexo 2) aunque los residuos específicos que participan en la unión de los sustratos se conservan (figura 16 del anexo 2).

No sólo para la PPDK se conocen mecanismos cinéticos diferentes. Hay otras enzimas que catalizan una misma reacción pero a través de diferentes mecanismos cinéticos. Por ejemplo, la fosfofructocinasa dependiente de PPI (PPI-PFK) de *G. lamblia* tiene un mecanismo cinético Bi Bi ordenado para ambos sentidos de la reacción (Phillips y Li, 1995). En este mecanismo el PPI es el primer sustrato en unirse y el Pi el último producto en liberarse. Sin embargo, las PPI-PFKs de *E. histolytica*, frijol mungo y *Propionibacterium freudenreichii* tienen un mecanismo cinético al azar en equilibrio rápido (Phillips y Li, 1995). La 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSP) sintasa de *Streptococcus pneumoniae* cataliza la fosforilación de EPSP a partir de PEP mediante un mecanismo al azar, que no coincide con los reportados para la misma enzima de otros organismos (Du *et al.*, 2000). Con todo lo expuesto anteriormente, parece claro que a pesar de que varias enzimas catalizan una reacción mediante el mismo mecanismo químico, no necesariamente lo harán a través del mismo mecanismo cinético.

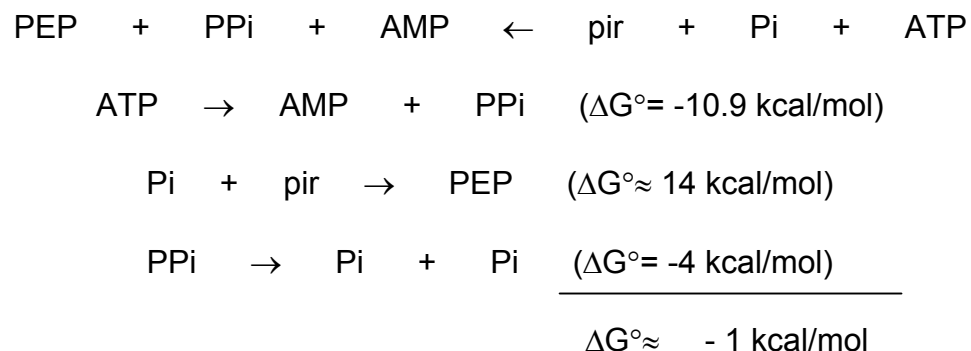
Las enzimas como la PPK, la α -glucano: agua dicinasa (GWD) y la piruvato: agua dicinasa bacteriana (PPS) comparten los dominios de unión de nucleótido y el de la fosfohistidina catalítica (Mikkelsen *et al.*, 2004). En los tres casos las dicinasas transfieren un grupo fosfato del ATP al α -glucano (GWD) o al piruvato (PPS y PPK) mediante la formación de un intermediario fosforilado de la enzima (Mikkelsen *et al.*, 2004). El árbol filogenético construido a partir del análisis de los dominios de unión a nucleótido de varias GWDs, PPSs y PPKs sugirió que estas dicinasas tienen un origen común (Mikkelsen *et al.*, 2004). De acuerdo con este análisis, la familia GWD se originó después de la divergencia del reino Plantae, la familia PPS sólo se encuentra en bacterias y arqueas, la PPK es la más ampliamente distribuida entre los phyla, incluyendo eucariontes (plantas y protistas parásitos) y procariontes (Mikkelsen *et al.*, 2004). A pesar de que estas dicinasas tienen un origen común y comparten los dominios de unión a nucleótido y el de la histidina catalítica y que catalizan la fosforilación de sus sustratos mediante un mecanismo químico casi idéntico, no comparten el mismo mecanismo cinético.

En muchos casos se ha propuesto el estudio de los mecanismos cinéticos de diferentes enzimas con el fin de diseñar fármacos en contra de determinados organismos. Algunos de estos estudios se han sugerido para enzimas de múltiples protistas parásitos (Byington *et al.*, 1997; Bruchhaus *et al.*, 1996; Saavedra-Lira, 1997; Garzón *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2000), bacterias patógenas (Du *et al.*, 2000) y hasta cucarachas (Brown y Grossman, 2004). Para determinar si alguna enzima es un buen blanco terapéutico es necesario estudiar

el papel de la enzima y su importancia en la regulación de la vía metabólica en la que participa. Para la EhPPDK sólo se había sugerido su participación en la glicólisis de la amiba en el sentido de la síntesis de ATP; sin embargo, de acuerdo con los datos presentados en esta tesis, termodinámicamente se favorece la síntesis de PEP catalizada por la EhPPDK en condiciones cercanas a las fisiológicas. Esto no indica que la EhPPDK no catalice la síntesis de ATP *in vivo*, ya que existen casos como la formación de oxaloacetato a partir de malato que no está favorecida termodinámicamente y sin embargo se lleva a cabo porque de lo contrario no habría ciclo de Krebs. La reacción que cataliza la PPDK, como la de todas las enzimas, es reversible y el sentido de la reacción depende del pH, las concentraciones de sustratos y productos y las reacciones a las que está acoplada la reacción. Por eso dependiendo del organismo la PPDK trabaja en sentido gluconeogénico (PEP) o glucolítico (ATP). La dirección que se favorece termodinámicamente en condiciones estándar (25°C y pH 7) es la síntesis de ATP (≈ -3 kcal/mol), por lo que se le denomina reacción “de ida” (Fw: forward) y la síntesis de PEP es la “reversa” (Mehl *et al.*, 1994).

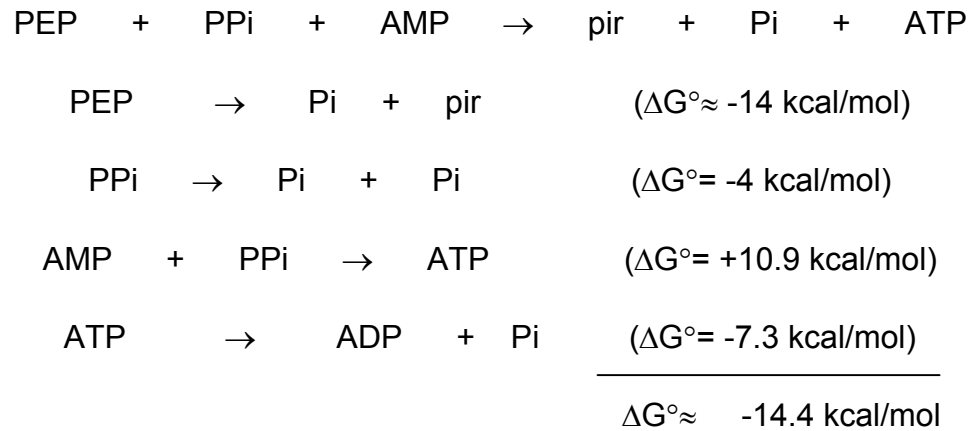
Las dicinasas de las que se habló en párrafos anteriores, con las que la PPDK comparte similitud estructural y un mecanismo de reacción muy similar, coinciden en la fosforilación de una histidina catalítica que, de acuerdo con estudios realizados con la CsPPDK y la enzima I de *E. coli*, tiene un ΔG° de hidrólisis (≈ -14 kcal/mol) muy parecido al del enlace enol fosfato de alta energía del PEP (≈ -14.7 kcal/mol). El ΔG de hidrólisis del ATP es aproximadamente 6 kcal/mol menor que la energía del enlace fosfoamidato de la enzima pirofosforilada

(E-PP). Esta barrera energética la supera la CsPPDK a través de la fuerte unión del AMP, que permanece unido a la enzima pirofosforilada hasta que el PPI se forma e incluso hasta que se libera (Mehl *et al.*, 1994). Con esto se sugiere que la enzima utiliza la unión diferencial del AMP a EPP y EP para proporcionar al piruvato un donador fosforilo de alta energía (Mehl *et al.*, 1994). En las plantas C₄ la reacción de síntesis de PEP, catalizada por la PPDK, está acoplada a pirofosfatasas y miocinasas, lo cual favorece termodinámicamente la reacción reversa. El balance de energías de estas reacciones se muestra a continuación, junto con los valores de ΔG° de las reacciones participantes.



En el caso de la EhPPDK, la reacción reversa no está acoplada a pirofosfatasas debido a que no hay evidencias experimentales de este tipo de enzimas citosólicas, así que esto complica la explicación de que la enzima cataliza con preferencia la síntesis de PEP y no la de ATP. Además, analizando la termodinámica de la reacción en sentido de la síntesis de ATP, considerando la

hidrólisis de ATP, se encuentra que en condiciones estándar ésta reacción es termodinámicamente más favorecida que la síntesis de PEP.



Cabe señalar que las concentraciones de los sustratos y productos que se determinaron en los extractos ácidos de trofozoítos (Varela-Gómez *et al.*, 2004) no se obtuvieron a partir de células en un estado estacionario establecido al alimentar una vía específica, como la glucólisis, en donde es probable que la PPDK participe de manera importante. Y esto debe tomarse en cuenta, porque las concentraciones de los metabolitos se modifican de acuerdo al estado estacionario de las células. La variación en las concentraciones de los sustratos y productos puede ser determinante para modificar el sentido de la reacción catalizada por la EhPPDK. La enzima de amiba es capaz de sintetizar ATP *in vivo* en los trofozoítos de *E. histolytica* y una de las posibilidades es que se modifiquen las concentraciones de los metabolitos.

En la amiba hay un consumo notable de ATP debido a la alta tasa de fagocitosis y pinocitosis de estos parásitos y a la actividad de ATPasas de tipo vacuolar (V-ATPasas) que se encargan de hidrolizar el ATP para acidificar el

interior de ciertas vacuolas (Nelson, 1992). Se reportó una H⁺-ATPasa vacuolar que se inhibe por bafilomicina A para *E. histolytica* (Yi y Samuelson, 1994) y también una Ca²⁺-ATPasa vacuolar que tiene homología con la enzima de acidocalcisomas de *Toxoplasma gondii* y *Trypanosoma cruzi* (Luo et al., 2001).

No se conoce mucho acerca de la bioquímica de las enzimas de amiba y tampoco hay reportes sobre los parámetros cinéticos de estas enzimas. Así que es necesario estudiar con mucho más detalle aspectos como la participación de ATPasas vacuolares en la concentración de ATP y determinar la concentración de los metabolitos relacionados con la PDK bajo un estado estacionario en presencia de glucosa para tener un dato mucho más confiable del valor de $\Delta G_{in vivo}$ de la reacción catalizada por la EhPPDK. También es necesario estudiar el papel que juega cada una de las enzimas para controlar la vía metabólica a la que pertenecen y así proponer los mejores blancos terapéuticos y construir modelos matemáticos. Para construir un modelo confiable es necesario conocer el mecanismo cinético de las enzimas de la vía y sus principales características cinéticas. Además, el mecanismo cinético es útil para el diseño de fármacos ya que mediante éste se pueden determinar diferentes blancos dentro del mismo mecanismo cinético, ya que las diferentes formas de la enzima pueden tener diferentes afinidades por cada sustrato y en consecuencia por alguna molécula análoga a estos que inhiba la actividad de esta enzima.

VI. CONCLUSIONES.

El mecanismo cinético de la EhPPDK se lleva a cabo mediante dos reacciones parciales. Es de tipo Uni (PEP) Uni (Pir) Bi (AMP/PPi) Bi (Pi/ATP) ping pong no clásico, como el que se reportó para las PPDKs de *Clostridium symbiosum* y de maíz. Pero a diferencia de estos, para el mecanismo de la EhPPDK incluye la formación de un complejo sin salida ternario entre el AMP, la enzima fosforilada y el piruvato (Esquema 3 de Varela-Gómez *et al.*, 2004). Los experimentos de inactivación térmica también sugirieron la formación de complejos entre la enzima libre y el AMP y el PPi. La formación de estos complejos no se consideró en el mecanismo cinético de la EhPPDK para no complicar más la ecuación. El tipo de inhibición no competitivo del GMP respecto al AMP también es una evidencia que apoya la formación de estos complejos sin salida con la enzima libre. Por otra parte, la formación del complejo entre la enzima libre y el PPi se apoya de manera indirecta en los resultados de pirofosforilación radiactiva del ensayo control (7%).

En condiciones cercanas a las fisiológicas, la reacción reversa de la PPDK es la que se favorece termodinámicamente, de acuerdo al valor de ΔG ; sin embargo, es necesario hacer un estudio mucho más completo para determinar la participación de la EhPPDK en el metabolismo glicolítico de la amiba.

Los datos obtenidos en este trabajo respecto al mecanismo cinético y el papel metabólico de la EhPPDK constituyen una parte de la investigación bioquímica básica que se puede utilizar en un futuro para el diseño de fármacos en contra de *E. histolytica*.

VII. PERSPECTIVAS.

Aunque el mecanismo cinético de la CsPPDK y la EhPPDK es del mismo tipo, se encontraron algunas diferencias, sobretodo respecto a los patrones de inhibición por producto y a los patrones de inhibición con los análogos de los sustratos (AMPS y PNP). En la discusión se expuso ampliamente la posibilidad de que estas diferencias se deben a cambios estructurales entre estas enzimas, por lo que sería interesante obtener la estructura cristalográfica de la EhPPDK y compararla con la de la CsPPDK y la de *Trypanosoma brucei*. También puede ser interesante la construcción de EhPPDKs mutantes para determinar los residuos de aminoácidos que participan directamente en la unión de cada uno de los sustratos.

De acuerdo con los patrones de inhibición por producto entre el ATP y el PEP (no competitivo), se sugirió que el mecanismo de la EhPPDK podría ser Uni Uni Bi Bi ping pong no clásico, como el reportado para la CsPPDK, o que el mecanismo fuera de tipo *iso*. En este trabajo no se comprobó que el patrón no competitivo se debiera a un mecanismo *iso*, por lo que sería interesante hacer experimentos de pre-estado estacionario para determinar la velocidad de cada uno de los pasos del mecanismo cinético y de esta manera determinar el paso que controla la reacción.

Los experimentos para determinar el papel metabólico de la enzima se hicieron a 37 °C y pH de 6.3, condiciones cercanas a las fisiológicas. Sin embargo, no se conoce con precisión el pH intracelular de los trofozoítos de amiba, por lo que sería necesario determinarlo mediante el uso de sondas fluorescentes sensibles al pH. Aunque la interpretación de los resultados podría

complicarse porque en el citosol de la amiba hay una gran cantidad de vacuolas de muy diversa composición. También habría que estudiar el metabolismo energético de la amiba, ya que en general se conoce muy poco respecto al metabolismo de este parásito. Otro aspecto sumamente importante es la determinación del volumen intracelular de los trofozoítos para no subestimar o sobreestimar las concentraciones de los metabolitos. Estos experimentos podrían hacerse también con inulina marcada y agua tritiada, pero disminuyendo la velocidad de endocitosis con inhibidores del citoesqueleto, como la colchicina.

Los datos estructurales, cinéticos de pre-estado estacionario y estado estacionario, el conocimiento del papel de la EhPPDK en los trofozoítos, así como su importancia en el control de la glucólisis, son elementos importantes e indispensables para el diseño de un fármaco en contra de este protista parásito.

VIII. REFERENCIAS

1. Agostiano A, Mavelli F, Milano F, Giotta L, Trotta M, Nagyl L y Maroti P. 2004. pH-sensitive fluorescent dye as probe for proton uptake in photosynthetic reaction centres. *Bioelectrochemistry* 63: 125-128.
2. Avilés C, Loza-Tavera H, Terry N y Moreno-Sánchez R. 2003. Mercury pretreatment selects an enhanced cadmium accumulating phenotype in *Euglena gracilis*. *Arch Microbiol* 180: 1-10.
3. Bersanetti PA, Andrade MC, Casarini DE, Juliano MA, Nchinda AT, Sturrock ED, Juliano L y Carmona AK. 2004. Positional scanning combinatorial libraries of fluorescence resonance energy transfer peptides for defining substrate specificity of the angiotensin I-converting enzyme. *Biochemistry* 43: 15729-36.
4. Bringaud F; Baltz D y Baltz T. 1998. Functional and molecular characterization of a glycosomal PPI-dependent enzyme in trypanosomatids: Pyruvate, phosphate dikinase. *Proc Natl Acad Sci*. 95: 7963-7968.
5. Brown AE y Grossman SH. 2004. The mechanism and modes of inhibition of arginine kinase from the cockroach (*Periplaneta americana*). *Arch Insect Biochem Physiol*. 57: 166-77.
6. Bruchhaus I, Jacobs T, Denart M y Tannich E. 1996. Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase of *Entamoeba histolytica*: molecular, cloning, recombinant expression and inhibition by pyrophosphate analogues. *Biochem J*. 316: 57-63.
7. Byington C, Dunbrack R, Whitby F, Cohen F y Agabian N. 1997. *Entamoeba histolytica*: Computer Assisted Modeling of Phosphofructokinase for the Prediction of Broad-Spectrum Antiparasitic Agents. *Exp Parasitol*. 87: 194-202.

8. Cleland, W.W. 1963. The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. III. Prediction of initial velocity and inhibition patterns by inspection. *Biochim Biophys Acta*. 67: 188-196 **En** : Friedman, C.H. (Ed). 1981. *Enzymes*. Hutchinson Ross Publishing Company. Estados Unidos. pp. 490-498.
9. Cleland, WW. Steady State Kinetics. **En**: Boyer P.D. (Ed). 1970. *The Enzymes Vol. 2* Academic Press, Estados Unidos. pp. 1-65.
10. Cornish-Bowden, A. 1995. *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. Portland Press Ltd. Inglaterra. pp.129-158.
11. Diamondstone, T y Litwack G. 1963. Kinetic studies on tyrosine- α -ketoglutarate transaminase. Order of addition of substrates and mode of interactions of thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine. *J Biol Chem*. 238: 3859-3868.
12. Du W, Wallis NG y Payne DJ. 2000. The kinetic mechanism of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from a gram-positive pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *J Enzyme Inhib*. 15: 571-81.
13. Faria TQ, Limo JC, Bastos M, Macanita AL y Santos H. 2004. Protein stabilization by osmolytes from hyperthermophiles: effect of mannosylglycerate on the thermal unfolding of recombinant nuclease A from *Staphylococcus aureus* studied by picosecond time-resolved fluorescence and calorimetry. *J Biol Chem*. 279: 48680-91.
14. Ferguson RA y Storey KB. 1991. Citrate synthase from rainbow trout heart: regulation by pH, temperature and metabolite levels. *Can J Zool*. 69: 3020-3027.

15. Garzón LR, Caldera A, Mirelles Mde N, de Castro SL, Docampo R, Meints GA, Oldfield E y Urbina JA. 2004. Selective in vitro effects of the farnesyl pyrophosphate synthase inhibitor risedronate on *Trypanosoma cruzi*. *Int J Antimicrob Agents* 23: 273-85.
16. Granjeiro PA, Cavagis AD, de Campos Leite L, Ferreira CV, Granjeiro JM y Aoyama H. 2004. The thermal stability of a castor bean seed acid phosphatase. *Mol Cell Biochem.* 206: 11-15.
17. Guengerich, F P, Krauser, J A, Johnson W W. 2004. Rate-Limiting Steps in Oxidations Catalyzed by Rabbit Cytochrome P450 1A2. *Biochemistry* 43: 10775-10788.
18. Herzberg O, Chen CCH, Kapadia G, McGuire M, Carrol LJ, Noh SJ y Dunaway-Mariano D. 1996. Swivelling-domain mechanism for enzymatic phosphotransfer between remote reaction sites. *Proc Natl Acad Sci.* 93: 2652-2657.
19. Herzberg O, Chen CCH, Liu S, Tempczyk A, Howard A, Wei M, Ye D y Dunaway-Mariano D. 2002. Pyruvate site of pyruvate phosphate dikinase: crystal structure of the enzyme-phosphonopyruvate complex, a mutant analysis. *Biochemistry* 41: 780-787.
20. Jenkins CLD y Hatch MD. 1985. Properties and reaction mechanism of C₄ leaf pyruvate, Pi dikinase. *Arch Biochem Biophys.* 239: 53-62.
21. Kaur G y Lohia A. 2004. Inhibition of gene expression with double strand RNA interference in *Entamoeba histolytica*. *Biochem Biophys Res Commun.* 320: 118-22.

-
-
22. Litwack G y Cleland W W. 1968. Studies on the tyrosine aminotransferase mechanism. *Biochemistry* 7: 2072-2079.
23. Luo S, Vieira M, Graves J, Zhong L y Moreno SNJ. 2001. A plasma membrane-type Ca²⁺-ATPase co-localizes with a vacuolar H⁺-pyrophosphatase to acidocalcisomes of *Toxoplasma gondii*. *EMBO J.* 20: 55-64.
24. Martínez-Palomo A. 1982. The Biology of *Entamoeba histolytica*. John Wiley & Sons. Inglaterra : pp. 161.
25. McGuire M, Huang K, Kapadia G, Herzberg O y Dunaway-Mariano D. 1998. Location of the phosphate binding site within *Clostridium symbiosum* pyruvate phosphate dikinase. *Biochemistry* 37: 13463-13474.
26. McLaughlin J y Aley S. 1985. The biochemistry and functional morphology of the *Entamoeba*. *J Protozool.* 32: 221-239.
27. Mikkelsen R, Baunsgaard L y Bennow A. 2004. Functional characterization of α -glucan,water dikinase the starch phosphorylating enzyme. *Biochem J.* 377: 525-532.
28. Mehl A, Xu Y y Dunaway-Mariano D. 1994. Energetics of pyruvate phosphate dikinase catalysis. *Biochemistry* 33: 1093-1102.
29. Milner Y. y Wood H. 1976. Steady State and Exchange Kinetics of Pyruvate, Phosphate Dikinase from *Propionibacterium shermanii*. *J Biol Chem.* 251: 7920-7928.
30. Mou TC, Gille A, Fancy DA, Seifert R y Sprang SR. 2004. Structural basis for the inhibition of mammalian membrane adenylyl cyclase by Mant-GTP. *J Biol Chem.* *En prensa*.

-
-
31. Nelson N. 1992. The vacuolar H⁺-ATPase – one of the most fundamental ion pumps in nature. *J Exp Biol.* 172: 19-27.
 32. Northrop, DB. 1969. Transcarboxylase. VI. KINETIC ANALYSIS OF THE REACTION MECHANISM. *J Biol Chem.* 244: 5808-5819.
 33. Northrop, DB y Wood HG. 1969. Transcarboxylase. VII. EXCHANGE REACTIONS AND KINETICS OF OXALATE INHIBITION. *J Biol Chem.* 244: 5820-5827.
 34. Núñez R. 2001. *Flow Cytometry for Research Scientists: Principles and applications.* Wymondham, Norfolk, U.K.: Horizon Press. 110 pp.
 - Phillips NF y Li Z. 1995. Kinetic mechanism of pyrophosphate-dependent phosphofructokinase from *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol.* 73: 43-51.
 35. Puckett LG, Dikici E, Lai S, Madou M, Bachas LG y Daunert S. 2004. Investigation into the applicability of the centrifugal microfluidics platform for the development of protein-ligand binding assays incorporating enhanced green fluorescent protein as a fluorescent reporter. *Anal Chem.* 76: 7263-8.
 36. Ravanal MC, Goldie H y Cardemil E. 2003. Thermal stability of phosphoenolpyruvate carboxykinases from *Escherichia coli*, *Trypanosoma brucei* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Protein Chem.* 22:311-5.
 37. Reeves ER. 1968. A New Enzyme with the Glycolytic Function of Pyruvate Kinase. *J Biol Chem.* 243: 3202-3204.
 38. Reeves RE, Menzies, RA y Hsu DS. 1968. The Pyruvate-Phosphate Dikinase Reaction. *J Biol Chem.* 243: 5486-5491
 39. Reeves ER. 1974. Studies on the intracellular concentrations of glycolytic intermediates in *E. histolytica*. *Arch Inv Med.* 5: 331-336.

-
-
40. Rodríguez C, Scott D, Bailey B, De Souza W, Benchimol M, Moreno B, Urbina J, Oldfield E y Moreno S. 2000. Vacuolar proton pyrophosphatase activity and pyrophosphate (PPi) in *Toxoplasma gondii* as posible chemotherapeutic targets. *Biochem J.* 349: 737-745.
41. Saavedra E, Olivos A, Encalada R, y Moreno-Sánchez R. 2004. *Entamoeba histolytica*: kinetic and molecular evidence of a previously unidentified pyruvate kinase. *Exp Parasitol.* 106: 11-21.
42. Saavedra E, Encalada R, Pineda E, Jasso-Chávez R y Moreno-Sánchez R. 2005. Glicólisis in *Entamoeba histolytica*. Biochemical characterization of recombinant glycolytic enzymes and flux control analysis. *FEBS J* 272: 1767-1783.
43. Saavedra-Lira E. y Pérez-Montfort R. 1994. Cloning and séquense determination of the gene coding for the pyruvate phosphate dikinase of *Entamoeba histolytica*. *Gene.* 142: 249-251.
44. Saavedra-Lira E. y Pérez-Montfort R. 1996. Energy production in *Entamoeba histolytica*: new perspectives in rational drug design. *Arch Med Res.* 27: 257-64.
45. Saavedra-Lira E. 1997. Caracterización bioquímica de la piruvato fosfato dicinasa recombinante de *Entamoeba histolytica*. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. 41 pp.
46. Scorneaux B, y Shryock TR. 1999. The determination of the cellular volume of avian, porcine and bovine phagocytes and bovine mammary epithelial cells and its relationship to uptake of tilmicosin. *J Vet Pharmacol Ther.* 22: 6-12

-
-
47. Segel, I. 1975. Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. John Wiley & Sons, Inc. Estados Unidos. pp. 846-883.
48. Takeuchi T, Weinbach EC y Diamond LS. 1977. *Entamoeba histolytica*: localization and characterization of phosphoglucomutase, uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase, and glycogen synthase. Exp Parasitol. 43:115-21.
49. Thrall SH, Mehl AF, Carroll LJ, Dunaway-Mariano D. 1993. Characterization of the covalent enzyme intermediates formed during pyruvate phosphate dikinase catalysis. Biochemistry 32: 1803-9.
50. Tovar-Méndez A, Myernyk A J, Randall D D. 2003. Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity in plant cells. Eur J Biochem. 270: 1043-1049.
51. Ullu E, Tschudi C y Chakraborty T. 2004. RNA interference in protozoan parasites. Cell Microbiol. 6: 509-519.
52. Upcroft P y Upcroft J. 2001. Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the Anaerobic Protozoa. Clin Microbiol Rev. 14: 150-164.
53. Valenzuela-Soto EM y Muñoz-Clares R. 1993. Betaine-aldehyde dehydrogenase from leaves of *Amaranthus hypocondriacus* L. exhibits an Iso Ordered Bi Bi steady state mechanism. J Biol Chem. 268: 23818-23824.
54. Varela-Gómez M. 2000. Mecanismo cinético de la reacción catalizada por la piruvato fosfato dicinasa de *Entamoeba histolytica*. Tesis de Licenciatura. UNAM, México, D.F: pp. 81.
55. Varela-Gómez M. 2000. Problema Bioquímico. Cinética Enzimática. BEB. 19: 112, 114-115.

56. Varela-Gómez M. 2003. Estructura, cinética y papel de la piruvato fosfato dicianasa: una enzima blanco para el diseño de fármacos y clave en la fotosíntesis C4. REB. 22: 11-18.
57. Varela-Gómez M. 2003. Problema Bioquímico. Cinética Enzimática: Inhibición por producto. REB. 22: 155, 158-160.
58. Varela-Gómez M, Moreno-Sánchez R, Pardo JP y Pérez-Montfort R. 2004. Kinetic mechanism and metabolic role of Pyruvate Phosphate Dikinase from *Entamoeba histolytica*. J Biol Chem. 279: 54124-30.
59. Varela-Gómez M. 2005. Problema Bioquímico. REB. 23. *En prensa*.
60. Varon R, García-Sevilla F, García-Moreno M, García-Canovas F, Peyro R, y Duggleby RG. 1997. CABIOS 13: 159-167.
61. Wang H C, Ciskanik L, Dunaway-Mariano D, von der Saal W y Villafranca J J. 1988. Investigations or the partial Reactions Catalyzed by Pyruvate Phosphate Dikinase. Biochemistry 27: 625-633.
62. Wang X, Deng Z y Kemp RG. 1998. An essential methionine residue involved in substrate binding by phosphofructokinases. Biochem Biophys Res Comm. 250: 466-468.
63. Wei M, Li Z, Ye D, Herzberg O y Dunaway-Mariano D. 2000. Identification of domain-domain docking sites within *Clostridium symbiosum* pyruvate phosphate dikinase by aminoacid replacemenr. J Biol Chem. 275: 41156-41165.
64. Wei M, Dongmei Y y Dunaway-Mariano D. 2001. Investigation of the role of the domain linkers in separate site catalysis by *Clostridium symbiosum* pyruvate phosphate dikinase. Biochemistry 40: 13466-13473.

65. Weinbach CE. Metabolism of *Entamoeba histolytica* En: Ravdin IJ. 1988. Amebiasis: Human Infection by *Entamoeba histolytica*. John Wiley & sons. Canadá: 69-78.
66. Wilson, J E. 2003. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. J Exp Biol. 206: 2049-2057.
67. Yi Y y Samuelson J. 1994. Primary structure of the *Entamoeba histolytica* gene (Ehvma1) encoding the catalytic peptide of a putative vacuolar membrane proton-transporting ATPase (V-ATPase). Mol Biochem Parasitol. 66: 165-169.
68. SJ, Jiang SS, Hsiao YY, Van RC, Pan YJ y Pan RL. 2004. Thermoinactivation analysis of vacuolar H(+) pyrophosphatase. Biochim Biophys Acta 1656: 88-95.
69. http://www.biology.berkeley.edu/crl/flow_cytometry_basic.html
70. http://www.ocean.stanford.edu/bomc/chem/lecture_16.pdf
70. bis. <http://www.rudbeck.uu.se/cellanalys/flow.html>

REFERENCIAS CONSULTADAS PARA EL APARTADO:

“I.B. Algunos ejemplos”

Mecanismo AL AZAR

71. Abbott JJ, Ford JL y Phillips MA. 2002. Substrate binding determinants of *Trypanosoma brucei* gamma-glutamylcysteine synthetase. Biochemistry 41: 2471-50.
72. Andi B, West AH y Cook PF. 2004. Kinetic mechanism of histidine-tagged homocitrate synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemistry 43: 11790-5.

-
-
73. Argyrou A y Blanchard JS. 2004. Kinetic and chemical mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate isomeroreductase. *Biochemistry* 43: 4375-84.
74. Armstrong S y Merrill AR. 2004. Toward the elucidation of the catalytic mechanism of the mono-ADP-ribosyltransferase activity of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Biochemistry* 43: 183-94.
75. Bao J y Ryu DD. 2005. Biosynthesis reaction mechanism and kinetics of deoxynucleoside triphosphates, dATP and dGTP. *Biotechnol Bioeng.* 89: 485-91.
76. Borra MT, Langer MR, Slama JT y Denu JM. Substrate specificity and kinetic mechanism of the Sir2 family of NAD⁺-dependent histone/protein deacetylases. *Biochemistry* 2004. 43: 9877-87.
77. Bovee ML, Pierce MA y Francklyn CS. 2003. Induced fit and kinetic mechanism of adenylation catalyzed by *Escherichia coli* threonyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* 42: 15102-15113.
78. Brown AE y Grossman SH. 2004. The mechanism and modes of inhibition of arginine kinase from the cockroach (*Periplaneta americana*). *Arch Insect Biochem Physiol.* 57: 166-77.
79. Carvajal N, Orellana MS, Salas M, Enriquez P, Alarcon R, Uribe E y Lopez V. 2004. Kinetic studies and site-directed mutagenesis of *Escherichia coli* agmatinase. A role for Glu274 in binding and correct positioning of the substrate guanidinium group. *Arch Biochem Biophys.* 430:185-90.
80. Clare PM, Poorman RA, Kelley LC, Watenpaugh KD, Bannow CA y Leach KL. 2001. The cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5 act by a random anticooperative kinetic mechanism. *J Biol Chem.* 276: 48292-48299.

-
-
81. Deans NL, Allison RD y Purich DL. 1992. Steady-state kinetic mechanism of bovine brain tubulin:tyrosine ligase. *Biochem J.* 286: 243-51.
82. Freist W y Sternbach H. 1998. Tyrosyl-tRNA synthetase from baker's yeast. Order of substrate addition, discrimination of 20 amino acids in aminoacylation of tRNA^{Tyr}-C-C-A and tRNA^{Tyr}-C-C-A(3'NH₂). *Eur J Biochem.* 177: 425-33
83. Hindson VJ y Shaw WV. 2003. Random-order ternary complex reaction mechanism of serine acetyltransferase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 42: 3113-3119.
84. Jabalquinto AM y Cardemil E. 1993. The kinetic mechanism of yeast phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Biochim Biophys Acta.* 1161(1): 85-90.
85. Jez JM y Cahoon RE. Kinetic mechanism of glutathione synthetase from *Arabidopsis thaliana*. 2004. *J Biol Chem.* 279: 42726-31.
86. Jez JM, Cahoon RE y Chen S. 2004. *Arabidopsis thaliana* glutamate-cysteine ligase: functional properties, kinetic mechanism, and regulation of activity. *J Biol Chem.* 279: 33463-70.
87. Johnson WV y Anderson PM. 1987. Bicarbonate is a recycling substrate for cyanase. *J Biol Chem.* 262: 9021-5.
88. Krenitsky TA. 1976. Uridine phosphorylase from *Escherichia coli*. Kinetic properties and mechanism. *Biochim Biophys Acta* 429: 352-8.
89. Kiefer PM Jr. y Copley SD. 2002. Characterization of the initial steps in the reductive dehalogenation catalyzed by tetrachlorohydroquinone dehalogenase. *Biochemistry* 41: 1315-22.

-
-
90. Koenig K, Menge U, Kiess M, Wray V y Flohe L. 1997. Convenient isolation and kinetic mechanism of glutathionylspermidine synthetase from *Crithidia fasciculata*. J Biol Chem. 272: 11908-15.
91. Krungkrai SR, Aoki S, Palacpac NM, Sato D, Mitamura T, Krungkrai J y Horii T. 2004. Human malaria parasite orotate phosphoribosyltransferase: functional expression, characterization of kinetic reaction mechanism and inhibition profile. Mol Biochem Parasitol. 134: 245-55.
92. Lai Z, Ferry KV, Diamond MA, Wee KE, Kim YB, Ma J, Yang T, Benfield PA, Copeland RA y Auger KR. 2001. Human mdm2 mediates multiple mono-ubiquitination of p53 by a mechanism requiring enzyme isomerization. J Biol Chem. 276: 31357-67.
93. Lee HJ, Chiou SH y Chang GG. 1992. Biochemical characterization and kinetic analysis of duck delta-crystallin with endogenous argininosuccinate lyase activity. Biochem J. 283: 597-603.
94. Lee LV, Gerratana B y Cleland WW. 2001. Substrate specificity and kinetic mechanism of *Escherichia coli* ribulokinase. Arch Biochem Biophys. 296: 219-224.
95. Leskovac V, Trivic S, Pericin D y Kandrac J. 2004. A general method for the analysis of random bisubstrate enzyme mechanisms. J Ind Microbiol Biotechnol. 31: 155-60.
96. Lewis AS y Glantz MD. 1976. Bovine brain purine-nucleoside phosphorylase purification, characterization, and catalytic mechanism. Biochemistry 15: 4451-7.
97. Malygin EG, Zinoviev VV, Evdokimov AA, Lindstrom WM Jr, Reich NO y Hattman S. 2003. DNA (cytosine-N4-) and -(adenine-N6-)-methyltransferases

have different kinetic mechanisms but the same reaction route. A comparison of M.BamHI and T4 Dam. J Biol Chem. 278: 15713-9.

98. Marcinkeviciene J, Jiang W, Kopcho LM, Locke G, Luo Y y Copeland RA. 2001. Enoyl-ACP reductase (FabI) of *Haemophilus influenzae*: steady-state kinetic mechanism and inhibition by triclosan and hexachlorophene. Arch Biochem Biophys. 390: 101-108.

99. Martin G, Moglich A, Keller W y Double S. 2004. Biochemical and structural insights into substrate binding and catalytic mechanism of mammalian poly(A) polymerase. J Mol Biol. 341: 911-25.

100. Munagala N, Wang CC. 2002. The purine nucleoside phosphorylase from *Trichomonas vaginalis* is a homologue of the bacterial enzyme. Biochemistry 41: 10382-9.

101. Nakanishi K, Kimura Y, Matsuno R. 1986. Kinetics and equilibrium of enzymatic synthesis of peptides in aqueous/organic biphasic systems. Thermolysin-catalyzed synthesis of N-(benzyloxycarbonyl)-L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester. Eur J Biochem. 161: 541-9.

102. Nukui M, Taylor KB, McPherson DT, Shigenaga MK, Jedrzejewski MJ. 2003. The function of hydrophobic residues in the catalytic cleft of *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase. Kinetic characterization of mutant enzyme forms. J Biol Chem. 278: 3079-88.

103. Osborne JC Jr, Stanley SJ y Moss J. 1985. Kinetic mechanisms of two NAD:arginine ADP-ribosyltransferases: the soluble, salt-stimulated transferase from turkey erythrocytes and cholera toxin, a toxin from *Vibrio cholerae*. Biochemistry 24: 5235-40.

-
-
104. Park YS, Sweitzer TD, Dixon JE y Kent C. 1993. Expression, Purification, and characterization of CTP: Glycerol-3-phosphate cytidyltransferase from *Bacillus subtilis*. J Biol Chem. 268: 16648-16654.
105. Parkin DW. 1996. Purine-specific nucleoside N-ribohydrolase from *Trypanosoma brucei brucei*. Purification, specificity, and kinetic mechanism. J Biol Chem. 271: 21713-9.
106. Patnaik D, Chin HG, Esteve PO, Benner J, Jacobsen SE y Pradhan S. Substrate specificity and kinetic mechanism of mammalian G9a histone H3 methyltransferase. 2004. J Biol Chem. 279: 53248-58.
107. Pilloff D, Dabovic K, Romanowski MJ, Bonanno JB, Doherty M, Burley SK y Leyh TS. 2003. The kinetic mechanism of phosphomevalonate kinase. J Biol Chem. 278:4510-5.
108. Pope AJ, Lapointe J, Mensah L, Benson N, Brown MJB y Moore KJ. 1998. Characterization of isoleucyl-tRNA synthetase from *Staphylococcus aureus*. I: Kinetic mechanism of the substrate activation reaction studied by transient and steady-state techniques. J Biol Chem. 273: 31680-31690.
109. Preugschat F, Averett DR, Clarke BE y Porter DJ. 1996. A steady-state and pre-steady-state kinetic analysis of the NTPase activity associated with the hepatitis C virus NS3 helicase domain. J Biol Chem. 271: 24449-57.
110. Raushel FM y Nygaard R. 1983. Kinetic mechanism of bovine liver argininosuccinate lyase. Arch Biochem Biophys. 221: 143-7.
111. Rippert P, Matringe M. 2002. Purification and kinetic analysis of the two recombinant arogenate dehydrogenase isoforms of *Arabidopsis thaliana*. Eur J Biochem. 269: 4753-61.

-
-
112. Sorokova NV, Kulminskaya AA, Eneiskaya EV, Shabalin KA, Uffimtcev AV, Povelainen M, Miasnikov AN y Neustroev KN. 2005. Synthesis of arabinitol 1-phosphate and its use for characterization of arabinitol-phosphate dehydrogenase. *Carbohydr Res.* 340: 539-546.
113. Shepherd M, Reid JD y Hunter CN. 2003. Purification and kinetic characterization of the magnesium protoporphyrin IX methyltransferase from *Synechocystis* PCC6803. *Biochem J.* 371: 351-60.
114. Sumegi B y Alkonyi I. 1983. Elementary steps in the reaction of the pyruvate dehydrogenase complex from pig heart. Kinetics of thiamine diphosphate binding to the complex. *Eur J Biochem.* 136: 347-53.
115. Trivic S y Leskovac V. 1994. Kinetic mechanism of yeast alcohol dehydrogenase activity with secondary alcohols and ketones. *Indian J Biochem Biophys.* 31: 387-91.
116. Umejiego NN, Li C, Riera T, Hedstrom L y Striepen B. 2004. *Cryptosporidium parvum* IMP dehydrogenase: identification of functional, structural, and dynamic properties that can be exploited for drug design. *J Biol Chem.* 279 : 40320-7.
117. Vakiani E, Luz JG y Buck J. 1998. Substrate specificity and kinetic mechanism of the insect sulfotransferase retinol dehydratase. *J Biol Chem.* 273: 35381-7.
118. Waas WF y Dalby KN. 2002. Transient protein-protein interactions and a random-ordered kinetic mechanism for the phosphorylation of a transcription factor by extracellular-regulated protein kinase 2. *J Biol Chem.* 277: 12532-40.

119. Wang X-T, Au SWN, Lam VMS y Engel PC. 2002. Recombinant human glucose-6-phosphate dehydrogenase. Evidence for a rapid-equilibrium random-order mechanism. *Eur J Biochem.* 269: 3417-3424.
120. Wu H, Zheng Y y Wang ZX. 2003. Evaluation of the catalytic mechanism of the p21-activated protein kinase PAK2. *Biochemistry* 42: 1129-39.

Mecanismo ORDENADO

121. Adolph HW, Zwart P, Meijers R, Hubatsch I, Kiefer M, Lamzin V, Cedergren-Zeppezauer E. 2000. Structural basis for substrate specificity differences of horse liver alcohol dehydrogenase isozymes. *Biochemistry* 39: 12885-97.
122. Armstrong S y Merrill AR. 2004. Toward the elucidation of the catalytic mechanism of the mono-ADP-ribosyltransferase activity of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Biochemistry* 43: 183-94.
123. Aitken SM, Kim DH y Kirsch JF. 2003. *Escherichia coli* cystathionine gamma-synthase does not obey ping pong kinetics. Novel continuous assays for the elimination and substitution reactions. *Biochemistry* 42: 11297-306.
124. Bachmann BO y Townsend CA. 2000. Kinetic mechanism of the β -lactam synthetase of *Streptomyces clavuligerus*. *Biochemistry* 39: 11187-11193.
125. Bjornson KP, Hsieh J, Amaratunga M y Lohman TM. 1998. Kinetic mechanism for the sequential binding of two single-stranded oligodeoxynucleotides to the *Escherichia coli* Rep helicase dimer. *Biochemistry* 37: 891-9.

126. Bosma T, Pikkemaat MG, Kingma J, Dijk J y Janssen DB. 2003. Steady-state and pre-steady-state análisis of halopropane conversión by a rhodococcus haloalkane dehalogenase. *Biochemistry* 42: 8047-53.
127. Bryce V. Plapp, Jennifer L. Mitchell and Kristine B. Berst. 2001. Mouse alcohol dehydrogenase 4: kinetic mechanism, substrate specificity and simulation of effects of ethanol on retinoid metabolism. *Chem Biol Interact.* 130-132: 445-56.
128. Chou CF, Lai CL, Chang YC, Duester G y Yin SJ. 2002. Kinetic mechanism of human class IV alcohol dehydrogenase functioning as retinal dehydrogenase. *J Biol Chem.* 277: 25209-16.
129. Diamondstone TI y Litwack G. 1963. Kinetic studies on tyrosine- α -ketoglutarate transaminase. Order of addition of substrates and mode of interactions of thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine. *J Biol Chem.* 238: 3859-68.
130. Digits JA, Pyun HJ, Coates RM y Casey PJ. 2002. Stereospecificity and kinetic mechanism of human prenylcysteine lyase, an unusual thioether oxidase. *J Biol Chem.* 277: 41086-93.
131. Dumitru RV y Ragsdale SW. 2004. Mechanism of 4-(beta-D-ribofuranosyl)aminobenzene 5'-phosphate synthase, a key enzyme in the methanopterin biosynthetic pathway. *J Biol Chem.* 279: 39389-95.
132. Emanuele JJ Jr. Jin H, Yanchunas J Jr. y Villafranca JJ. 1997. Evaluation of the kinetic mechanism of *Escherichia coli* uridine diphosphate-N-acetylmuramate: L-alanine ligase. *Biochemistry* 36: 7264-71.

-
-
133. Eubanks LM y Poulter CD. 2003. *Rhodobacter capsulatus* 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase: steady-state kinetics and substrate binding. *Biochemistry* 42: 1140-9.
134. Evdokimov AA, Zinoviev VV, Malygin EG, Schlagman L y Hattman S. 2002. Bacteriophage T4 Dam DNA-[N6-adenine]methyltransferase. *J Biol Chem.* 277: 279-286.
135. Fresquet V, Thoden JB, Holden HM, Raushel FM. 2004. Kinetic mechanism of asparagine synthetase from *Vibrio cholerae*. *Bioorg Chem.* 32: 63-75.
136. Frieden C. 1959. Glutamic dehydrogenase. III. The order of substrate addition in the enzymatic reaction. *J Biol Chem.* 234:2891-96.
137. Gross JW, Hegeman AD, Vestling MM y Frey PA. 2000. Characterization of enzymatic processes by rapid mix-quench mass spectrometry: the case of dTDP-glucose 4,6-dehydratase. *Biochemistry* 39: 13633-40.
138. Herbert D, Price LJ, Alban C, Dehaye L, Job D, Cole DJ, Pallett KE y Harwood JL. 1996. Kinetic studies on two isoforms of acetyl-CoA carboxylase from maize leaves. *Biochem J.* 318: 997-1006.
139. Hindson VJ y Shaw WV. 2003. Random-order ternary complex reaction mechanism of serine acetyltransferase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 42: 3113-3119.
140. Jiang P, Peliska JA y Ninfa AJ. 1998. Enzymological characterization of the signal-transducing uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme (EC 2.7.7.59) of *Escherichia coli* and its interaction with the PII protein. *Biochemistry* 37: 12782-94.

141. Karsten WE. 1997. Dihydropicolinate synthase from *Escherichia coli*: pH dependent changes in the kinetic mechanism and kinetic mechanism of allosteric inhibition by L-lysine. *Biochemistry* 36: 1730-9.
142. Karthikeyan S, Zhou Q, Osterman AL, Zhang H. 2003. Ligand binding-induced conformational changes in riboflavin kinase: structural basis for the ordered mechanism. *Biochemistry* 42: 12532-8.
143. Kohen A, Jacob A y Baasov T. 1992. Mechanistic studies of 3-deoxy-D-manno-2-octulosonate-8-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem.* 208: 443-9.
144. Kowalczyk TH, Horn PJ, Pan W-H y Phillips NFB. 1996. Initial rate and equilibrium isotope exchange studies on the ATP-dependent activity of polyphosphate glucokinase from *Propionibacterium shermanii*. *Biochemistry* 35: 6777-6785.
145. Lian DJ, Li L, Xu GJ. 1996. Purification and Kinetic Studies of Yeast Alcohol Dehydrogenase I. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*. 28: 396-403.
146. Ma YZ y Taylor EW. 1997. Kinetic mechanism of a monomeric kinesin construct. *J Biol Chem.* 272: 717-23.
147. Mallick S, Harris BG, Cook PF. 1991. Kinetic mechanism of NAD:malic enzyme from *Ascaris suum* in the direction of reductive carboxylation. *J Biol Chem.* 266: 2732-8.
148. Monasterio O, Cardenas ML. 2003. Kinetic studies of rat liver hexokinase D ('glucokinase') in non-co-operative conditions show an ordered mechanism with MgADP as the last product to be released. *Biochem J.* 371: 29-38.

-
-
149. Moritz B, Striegel K, de Graaf AA, y Moritz HS. 2000. Kinetic properties of the glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases from *Corynebacterium glutamicum* and their application for predicting pentose phosphate pathway flux in vivo. *Eur J Biochem.* 267: 3442-52.
150. Nuiry II, Hermes JD, Weiss PM, Chen CY y Cook PF. 1984. Kinetic mechanism and location of rate-determining steps for aspartase from *Hafnia alvei*. *Biochemistry* 23: 5168-75.
151. Plancarte A, Rendón JL y Landa A. 2004. Purification, characterization and kinetic properties of the *Taenia solium* glutathione S-transferase isoform 26.5kDa. *Parasitol Res.* 93: 137-144.
152. Phillips NFB y Li Z. 1995. Kinetic mechanism of pyrophosphate-dependent phosphofruktokinase from *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol.* 73: 43-51.
153. Poch MT, Qin W y Caperelli CA. 1998. The human trifunctional enzyme of the novo purine biosíntesis: heterologous expression, purification, and preliminary characterization. *Protein Expr Purif.* 12: 17-24.
154. Pope AJ, Lapointe J, Mensah L, Benson N, Brown MJB y Moore KJ. 1998. Characterization of isoleucyl-tRNA synthetase from *Staphylococcus aureus*. I: Kinetic mechanism of the substrate activation reaction studied by transient and steady-state techniques. *J Biol Chem.* 273: 31680-31690.
155. Poyner RR, Cleland WW y Reed GH. 2001. Role of metal ions in catalysis by enolase: an ordered kinetic mechanism for a single substrate enzyme. *Biochemistry* 40: 8009-17.

-
-
156. Ranaldi F, Van P y Giachetti E. 2003. Enzyme catalysis in microgravity: steady-state kinetic analysis of the isocitrate lyase reaction. *Biophys Chem.* 103: 169-177.
157. Russell TR, Demeler B y Tu SC. 2004. Kinetic mechanism and quaternary structure of *Aminobacter aminovorans* NADH:flavin oxidoreductase: an unusual flavin reductase with bound flavin. *Biochemistry* 43: 1580-90.
158. Schindler JF, Godbey A, Hood WF, Bolten SL, Broadus RM, Kasten TP, Cassely AJ, Hirsch JL, Merwood MA, Nagy MA, Fok KF, Saabye MJ, Morgan HM, Compton RP, Mourey RJ, Wittwer AJ y Monahan JB. 2002. Examination of the kinetic mechanism of mitogen-activated protein kinase activated protein kinase-2. *Biochim Biophys Acta.* 1598: 88-97.
159. Shim H y Raushel FM. 2000. Self-assembly of the binuclear metal center of phosphotriesterase. *Biochemistry* 39: 7357-64.
160. Stromberg P, Svensson S, Berst KB, Plapp BV, Hoog JO. 2004. Enzymatic mechanism of low-activity mouse alcohol dehydrogenase 2. *Biochemistry* 43: 1323-8.
161. Tang L, Lutje Spelberg JH, Fraaije MW y Janssen DB. 2003. Kinetic mechanism and enantioselectivity of halohydrin dehalogenase from *Agrobacterium radiobacter*. *Biochemistry* 42: 5378-86.
162. Thomas-Wohlever J y Lee I. 2002. Kinetic characterization of the peptidase activity of *Escherichia coli* Lon reveals the mechanistic similarities in ATP-dependent hydrolysis of peptide and protein substrates. *Biochemistry* 41: 9418-25.

163. Timson DJ y Reece RJ. 2002. Kinetic analysis of yeast galactokinase: implications for transcriptional activation of the GAL genes. *Biochimie*: 265-272.
164. Ueda S, Oda M, Imamura S, Ohnishi M. 2004. Kinetic study of the enzymatic cycling reaction conducted with 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase in the presence of excessive thio-NAD(+) and NADH. *Anal Biochem*. 332: 84-9.
165. Umejiego NN, Li C, Riera T, Hedstrom L y Striepen B. 2004. *Cryptosporidium parvum* IMP dehydrogenase: identification of functional, structural, and dynamic properties that can be exploited for drug design. *J Biol Chem*. 279: 40320-7.
166. Wang X-T, Au SWN, Lam VMS y Engel PC. 2002. Recombinant human glucose-6-phosphate dehydrogenase. Evidence for a rapid-equilibrium random-order mechanism. *Eur J Biochem*. 269: 3417-3424.
167. Yin S-J, Chou C-F, Lai C-L, Lee S-L y Han C-L. 2003. Human class IV alcohol dehydrogenase: kinetic mechanism, functional roles and medical relevance. *Chem Biol Interact*: 219-227.
168. Yin SJ, Chou CF, Lai CL, Lee SL y Han CL. 2003. Human class IV alcohol dehydrogenase: kinetic mechanism, functional roles and medical relevance. *Chem Biol Interact*. 143-144: 219-27.
169. Zheng R y Blanchard JS. 2000. Kinetic and mechanistic analysis of the *E. coli* panE-encoded ketopantoate reductase. *Biochemistry* 39: 3708-3717.
170. Zuccotti S, Zanardi D, Rosano C, Sturla L, Tonetti M y Bolognesi M. 2001. Kinetic and crystallographic analyses support a sequential-ordered bi bi catalytic

mechanism for *Escherichia coli* glucose-1-phosphate thymidyltransferase. J Mol Biol. 313: 831-43.

Mecanismo PING PONG

171. Abbadi A, Brummel M, Schutt BS, Slabaugh MB, Schuch R y Spener F. 2000. Reaction mechanism of recombinant 3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein synthase III from *Cuphea wrightii* embryo, a fatty acid synthase II condensing enzyme. Biochem J. 345: 153-60.

172. Agrawal N, Lesley SA, Kuhn P y Kohen A. 2004. Mechanistic studies of a flavin-dependent thymidylate synthase. Biochemistry 43: 10295-301.

173. Aitken SM, Kim DH y Kirsch JF. 2003. *Escherichia coli* cystathionine gamma-synthase does not obey ping pong kinetics. Novel continuous assays for the elimination and substitution reactions. Biochemistry 42: 11297-306.

174. Alber BE, Colangelo CM, Dong J, Stalhandske CM, Baird TT, Tu C, Fierke CA, Silverman DN, Scott RA, y Ferry JG. 1999. Kinetic and spectroscopic characterization of the gamma-carbonic anhydrase from the metanoarcheon *Methanosarcina thermophila*. Biochemistry 38: 13119-28.

175. Apell HJ. 2004. How do P-type ATPases transport ions?. Bioelectrochemistry 63: 149-56.

176. Awang R, Basri M, Ahmad S y Salleh AB. 2004. Lipase-catalyzed sterification of palm-based 9,10-dihydroxystearic acid and 1-octanol in hexane: A kinetic study.. Biotechnol Lett. 26: 11-4.

177. Bellelli A, Cavallo S, Nicolini L, Cervelli M, Bianchi M, Mariottini P, Zelli M y Federico R. 2004. Mouse spermine oxidase: a model of the catalytic cycle and its

inhibition by N,N1-bis(2,3-butadienyl)-1,4-butanediamine. *Biochem Biophys Res Comm.* 322: 1-8.

178. Born TL y Blanchard JS. 1999. Enzyme-catalyzed acylation of homoserine: mechanistic characterization of the *Escherichia coli* metA-encoded homoserine transsuccinylase. *Biochemistry* 38: 14416-23.

179. Bousquet-Dubouch MP, Graber M, Sousa N, Lamare S y Legoy MD. 2001. Alcoholysis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in a gas/solid system obeys a Ping Pong Bi Bi mechanism with competitive inhibition by the alcohol substrate and water. *Biochim Biophys Acta* 1550: 90-9.

180. Bun-Ya M, Maebuchi M, Hashimoto T, Yokota S y Kamiryo T. 1997. A second isoform of 3-ketoacyl-CoA thiolase found in *Caenorhabditis elegans*, which is similar to sterol carrier protein x but lacks the sequence of sterol carrier protein 2. *Eur J Biochem.* 245: 252-9.

181. Clausen T, Wahl MC, Messerschmidt A, Huber R, Fuhrmann JC, Laber B, Streber W y Steegborn C. 1999. Cloning, purification and characterization of cystathionine-synthase from *Nicotiana tabacum*. *J Biol Chem.* 380: 1237-42.

182. Dhalla AM, Yanchunas J Jr, Ho HT, Falk PJ, Villafranca JJ y Robertson JG. 1995. Steady-state kinetic mechanism of *Escherichia coli* UDP-N-acetylenolpyruvylglucosamine reductase. *Biochemistry* 34: 5390-402.

183. Dreier J, Li Q, Khosla C. 2001. Malonyl-CoA:ACP transacylase from *Streptomyces coelicolor* has two alternative catalytically active nucleophiles. *Biochemistry* 40: 12407-11.

-
-
184. Elleby B, Chirica LC, Tu C, Zeppezauer M, Lindskog S. 2001. Characterization of carbonic anhydrase from *Neisseria gonorrhoeae*. Eur J Biochem. 268: 1613-9.
185. Emanuele JJ y Fitzpatrick PF. 1995. Mechanistic studies of the flavoprotein tryptophan 2-monooxygenase. 1. Kinetic mechanism. Biochemistry 34: 3710-5.
186. Fresquet V, Thoden JB, Holden HM, Raushel FM. 2004. Kinetic mechanism of asparagine synthetase from *Vibrio cholerae*. Bioorg Chem. 32:63-75.
187. Geerlof A, Rakels JJ, Straathof AJ, Heijnen JJ, Jongenjan JA y Duine JA. 1994. Description of the kinetic mechanism and the enantioselectivity of quinohaemoprotein ethanol dehydrogenase from *Comamonas testosteroni* in the oxidation of alcohols and aldehydes. Eur J Biochem. 226: 537-46.
188. Grabner GK y Switzer RL. 2003. Kinetic studies of the uracil phosphoribosyltransferase reaction catalyzed by the *Bacillus subtilis* pyrimidine attenuation regulatory protein PyrR. J Biol Chem. 278: 6921-7.
189. Gu W, Zhao G, Eddy C y Jensen RA. 1995. Imidazole acetol phosphate aminotransferase in *Zymomonas mobilis*: molecular genetic, biochemical, and evolutionary analysis. J Bacteriol. 177: 1576-84.
190. Hedl M, Sutherlin A, Wilding EI, Mazzulla M, McDevitt D, Lane P, Burgner JW 2nd, Lehnbeuter KR, Stauffacher CV, Gwynn MN, Rodwell VW. 2002. *Enterococcus faecalis* acetoacetyl-coenzyme A thiolase/3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, a dual-function protein of isopentenyl diphosphate biosynthesis. J Bacteriol. 184: 2116-22.
191. Hernández L, Arrieta J, Menéndez C, Vázquez R, Coego A, Suárez V, Selman G, Petit-Glatron MF y Chambert R. 1995. Isolation and enzymic

properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *Biochem J.* 309: 113-8.

192. Hisanaga Y, Ago H, Nakagawa H, Hamada K, Ida K, Yamamoto M, Hori T, Arai Y, Sugahara M, Kuramitsu S, Yokoyama S y Miyano M. 2004. Structural basis of the substrate-specific two-step catalysis of long chain fatty acyl-CoA synthetase dimer. *J Biol Chem.* 279:31717-26.

193. Horswill AR, Escalante-Semerena JC. 2002. Characterization of the propionyl-CoA synthetase (PrpE) enzyme of *Salmonella enterica*: residue Lys592 is required for propionyl-AMP synthesis. *Biochemistry* 41: 2379-87.

194. Huang X, Aulabaugh A, Ding W, Kapoor B, Alksne L, Tabei K y Ellestad G. 2003. Kinetic mechanism of *Staphylococcus aureus* sortase SrtA. *Biochemistry* 42: 11307-15.

195. Janse van Rensburg L, Schabort JC. 1984. Rhodanese from *Cercopithecus aethiops* (vervet monkey) liver. II. Aspects of enzyme kinetics and mechanism of action. *Int J Biochem.* 16: 547-51.

196. Karsten WE. 1997. Dihydropicolinate synthase from *Escherichia coli*: pH dependent changes in the kinetic mechanism and kinetic mechanism of allosteric inhibition by L-lysine. *Biochemistry* 36: 1730-9.

197. Kelley M y Vessey DA. 1994. Determination of the mechanism of reaction for bile acid: CoA ligase. *Biochem J.* 304: 945-9.

198. Kirchner U, Westphal AH, Muller R y van Berkel WJ. 2003. Phenol hydroxylase from *Bacillus thermoglucosidarius* A7, a two-protein component monooxygenase with a dual role for FAD. *J Biol Chem.* 278: 47545-53.

-
-
199. Koder RL, Miller AF. 1998. Steady-state kinetic mechanism, stereospecificity, substrate and inhibitor specificity of *Enterobacter cloacae* nitroreductase. *Biochim Biophys Acta* 1387: 395-405.
200. Koroljova-Skorobogat'ko OV, Stepanova EV, Gavrilova VP, Morozova OV, Lubimova NV, Dzchafarova AN, Jaropolov AI y Makower A. 1998. Purification and characterization of the constitutive form of laccase from the basidiomycete *Coriolus hirsutus* and effect of inducers on laccase synthesis. *Biotechnol Appl Biochem.* 28: 47-54.
201. Kwiek JJ, Haystead TA y Rudolph J. 2004. Kinetic mechanism of quinone oxidoreductase 2 and its inhibition by the antimalarial quinolines. *Biochemistry* 43: 4538-47.
202. Lian G, Ding L, Chen M, Liu L, Zhao D, Ni J. 2001. A selenium-containing catalytic antibody with Type I deiodinase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 283: 1007-12.
203. Litwack G y Cleland WW. 1968. Studies on the tyrosine aminotransferase mechanism. *Biochemistry* 7: 2072-2079.
204. Mikkelsen R, Baunsgaard L, Blennow A. 2004. Functional characterization of alpha-glucan,water dikinase, the starch phosphorylating enzyme. *Biochem J.* 377: 525-32.
205. Mino K, Yamanoue T, Sakiyama T, Eisaki N, Matsuyama A, Nakanishi K. 2000. Effects of bienzyme complex formation of cysteine synthetase from *Escherichia coli* on some properties and kinetics. *Biosci Biotechnol Biochem.* 64: 1628-40.

206. Nakanishi M, Yatome C, Ishida N, Kitade Y. 2001. Putative ACP phosphodiesterase gene (*acpD*) encodes an azoreductase. *J Biol Chem.* 276: 46394-9.
207. Northrop DB. 1969. Transcarboxylase. Kinetic analysis of the reaction mechanism. *J Biol Chem.* 244 : 5808-5819.
208. Patel MP y Blanchard JS. 1999. Expression, purification, and characterization of *Mycobacterium tuberculosis* mycothione reductase. *Biochemistry* 38: 11827-33.
209. Peterbauer T, Mach L, Mucha J, Richter A. 2002. Functional expression of a cDNA encoding pea (*Pisum sativum* L.) raffinose synthase, partial purification of the enzyme from maturing seeds, and steady-state kinetic analysis of raffinose synthesis. *Planta* 215: 839-46.
210. Plowman KM y Cleland WW. 1967. Purification and kinetic studies of the citrate cleavage enzyme. *J Biol Chem.* 242: 4239-4247.
211. Prinz H, Lavie A, Scheiding AJ, Spangenberg O y Konrad M. 1999. Binding of nucleotides to guanylate kinase, p21(ras), and nucleoside-diphosphate kinase studied by nano-electrospray mass spectrometry. *J Biol Chem.* 274: 35337-42.
212. Rabeh WM y Cook PF. 2004. Structure and mechanism of O-acetylserine sulfhydrylase. *J Biol Chem.* 279: 26803-6.
213. Rudolph FB, Purich DL y Fromm HJ. 1968. Coenzyme A-linked aldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 243: 5539-5545.
214. Sarkar D, Ghosh I y Datta S. 2004. Biochemical characterization of *Plasmodium falciparum* hypoxanthine-guanine-xanthine

phosphorybosyltransferase: role of histidine residue in substrate selectivity. *Mol Biochem Parasitol.* 137: 267-76.

215. Sayed AA y Williams DL. 2004. Biochemical characterization of 2-Cys peroxiredoxins from *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem.* 279: 26159-66.

216. Schmid HC, Rassadina V, Oster U, Schoch S y Rudiger W. 2002. Pre-loading of chlorophyll synthetase with tetraprenyl diphosphate is an obligatory step in chlorophyll biosynthesis. *J Biol Chem.* 383: 1769-78.

217. Sem DS y Kasper CB. 1995. Effect of ionic strength on the kinetic mechanism and relative rate limitation of steps in the model NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase reaction with cytochrome c. *Biochemistry* 34: 12768-74.

218. Seravalli J, Kumar M, Lu WP y Ragsdale SW. 1995. Mechanism of CO oxidation by carbon monoxide dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum* and its inhibition by anions. *Biochemistry* 34: 7879-88.

219. Smith GD, Harrison R y Eisinger R. 1996. Determination of half-reaction equilibrium in a ping-pong enzyme mechanism. *Neurochem Res.* 21: 1061-4.

220. Tesson AR, Soper TS, Ciustea M y Richards NGJ. 2003. Revisiting the steady-state kinetic mechanism of glutamine-dependent asparagine synthetase from *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys.* 413: 23-31.

221. van der Veen BA, van Alebeek GJ, Uitdehaag JC, Dijkstra BW y Dijkhuizen L. 2000. The three transglycosylation reactions catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* (strain 251) proceed by different kinetic mechanisms. *Eur J Biochem.* 267: 658-65.

222. Vandende CS, Vlasschaert M y Seah SY. 2004. Functional characterization of an aminotransferase required for pyoverdine siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 186: 5596-602.
223. Wilkinson SR, Meyer DJ, Kelly JM. 2000. Biochemical characterization of a trypanosome enzyme with glutathione-dependent peroxidase activity. Biochem J. 352: 755-61.
224. Woehl EU, Tai CH, Dunn MF y Cook PF. 1996. Formation of the alpha-aminoacrylate immediate limits the overall reaction catalyzed by O-acetylserine sulfhydrylase. Biochemistry 35: 4776-83.
225. Wolthers KR, Schimerlik MI. 2001. Reaction of neuronal nitric-oxide synthase with 2,6-dichloroindolphenol and cytochrome c3+: influence of the electron acceptor and binding of Ca2+-activated calmodulin on the kinetic mechanism. Biochemistry 40: 4722-37.
226. Yei D, Wei M, McGuire M, Huang K, Kapadia G, Herzberg O, Martin BM y Dunaway-Mariano D. 2001. Investigation of the catalytic site within the ATP-grasp domain of *Clostridium symbiosum* pyruvate phosphate dikinase. J Biol Chem. 276: 37630-37639.
227. Zarnt G, Schrader T, Andreesen JR. 2001. Catalytic and molecular properties of the quinohemoprotein tetrahydrofurfuryl alcohol dehydrogenase from *Ralstonia eutropha* strain Bo. J Bacteriol. 183: 1954-60.
228. Zheng R, Blanchard JS. 2001. Steady-state and pre-steady-state kinetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* pantothenate synthetase. Biochemistry 40: 12904-12.

ANEXO 1

Los gráficos de dobles recíprocos son la herramienta diagnóstica más utilizada para determinar patrones de velocidad inicial y de inhibición. Estos se construyen graficando el inverso de la concentración de sustrato en “x” contra el inverso de la velocidad en “y”. Cuando los datos reales que obedecen a una línea hiperbólica (Michaelis-Menten) son graficados en dobles recíprocos, se obtiene una línea recta que corresponde a la ecuación $\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V}$ como se demuestra a continuación.

$$1. v = \frac{V [S]}{K_m + [S]}$$

aplicando inversos a ambos lados de la ecuación...

$$2. \frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{V[S]}$$

rearrreglando...

$$3. \frac{1}{v} = \frac{K_m}{V[S]} + \frac{[S]}{V[S]}$$

finalmente...

$$4. \left(\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V} \right) = y = mx + b$$

$$\text{donde... } y = \frac{1}{v}; m = \frac{K_m}{V}; x = \frac{1}{[S]}; b = \frac{1}{V}$$

Este mismo tratamiento lineal se puede hacer para cualquier ecuación de velocidad, por ejemplo de los diferentes mecanismos cinéticos o de los diferentes inhibidores y para cada uno de ellos se obtendrá una ecuación lineal particular. Por ejemplo, analicemos la ecuación de un mecanismo bi bi ping pong:

$$v = \frac{V[A][B]}{K_A[B] + K_B[A] + [A][B]} \quad (\text{ver tabla II})$$

dividir entre [B] para dejar [A] como variable dependiente

$$v = \frac{\frac{V}{1 + \frac{K_B}{[B]}} [A]}{\frac{K_A}{1 + \frac{K_B}{[B]}} + [A]}$$

$$v = \frac{V_{app} [A]}{K_{A_{app}} + [A]}$$

de esta ecuación se obtiene la siguiente de dobles recíprocos

$$\frac{1}{v} = \frac{K_{A_{app}}}{V_{app}} \frac{1}{[A]} + \frac{1}{V_{app}}$$

si analizamos la pendiente, encontramos que

$$m = \frac{K_{A_{app}}}{V_{app}} = \frac{K_A}{V}$$

por lo que la pendiente en los gráficos de dobles recíprocos de un mecanismo ping pong, no cambia al aumentar la concentración del cosustrato B y se obtienen líneas paralelas. El lector puede analizar de igual forma el resto de los mecanismos cinéticos y los patrones de inhibición para comprender que a cada uno de ellos le corresponde un patrón gráfico particular.

ANEXO 2

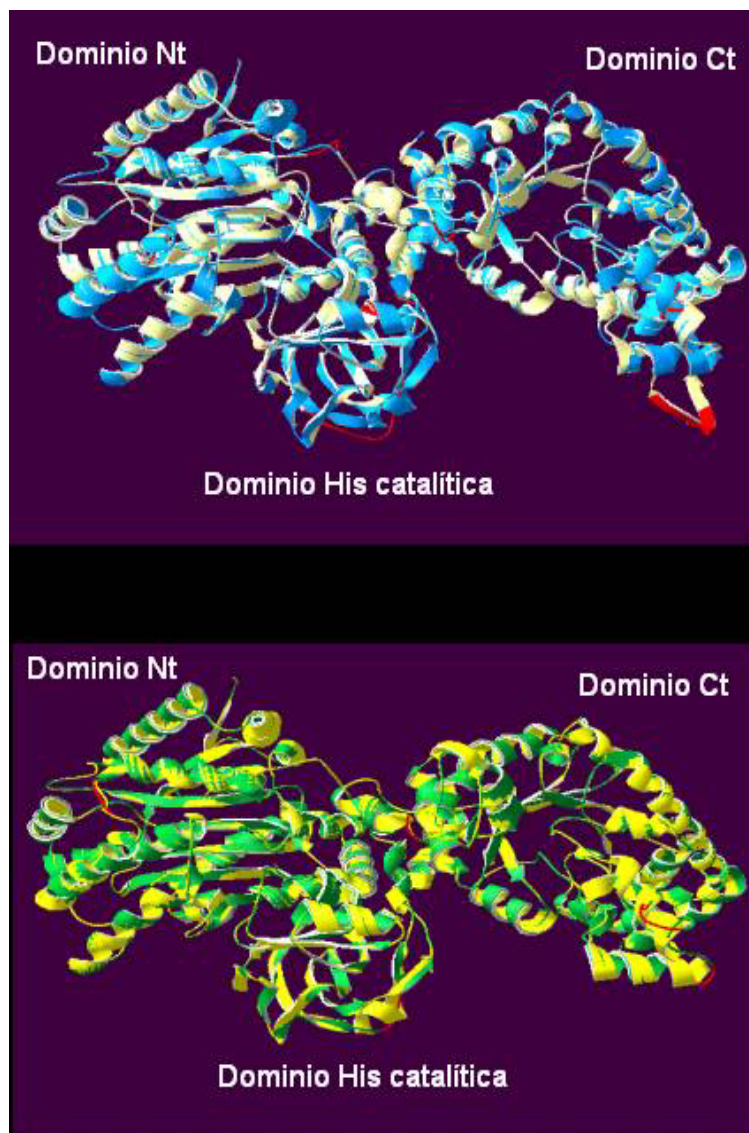


Figura 15. Estructuras cristalográficas modeladas para las secuencias de aminoácidos de la EhPPDK (recuadro superior) y la PPDK de *Propionibacterium acnes* (recuadro inferior), tomando como estructura base una de las reportadas para la CsPPDK (Herzberg *et al.*,1988). La estructura de la EhPPDK en color amarillo contrasta con la de CsPPDK en color azul y se observa en rojo las diferencias principales entre estas dos estructuras. En el recuadro inferior, la estructura de CsPPDK está en amarillo y en verde la PPDK de *P. acnes*. Ct: carboxilo terminal; Nt: amino terminal.

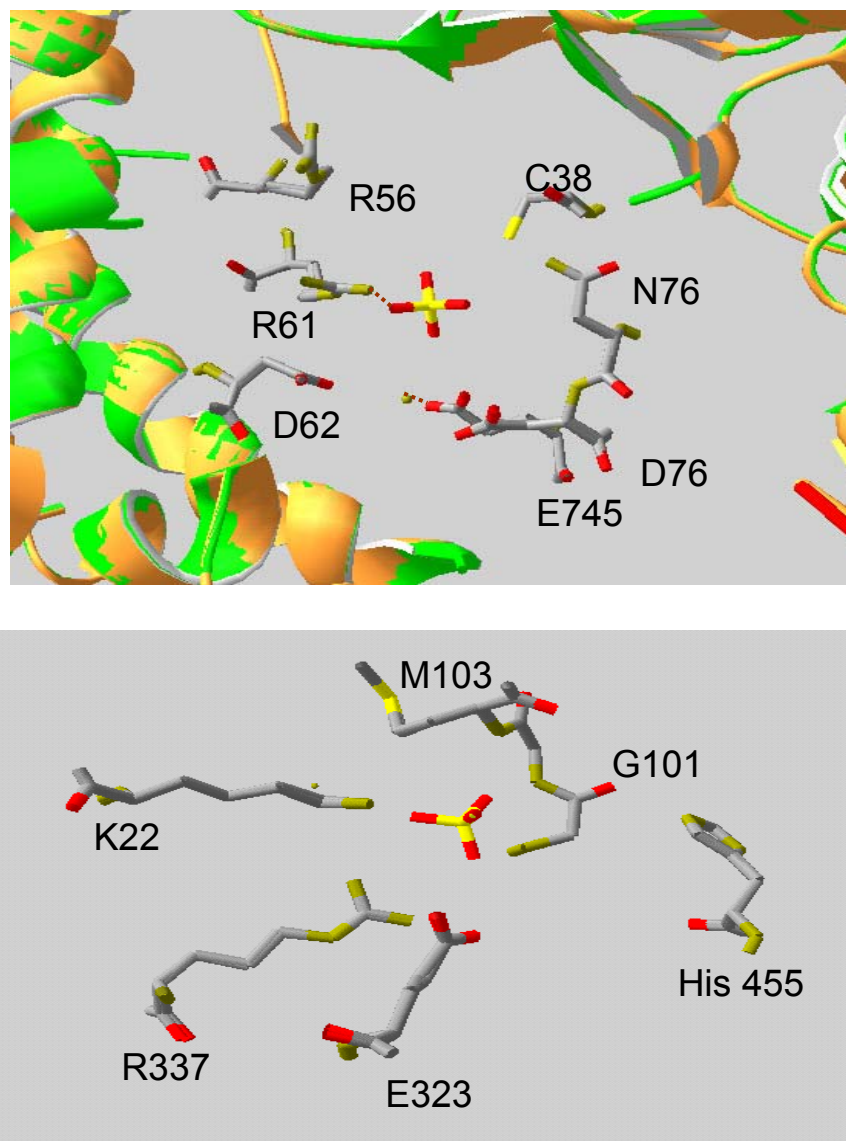


Figura 16. Aminoácidos que participan en la unión del PEP y piruvato en el dominio carboxilo terminal (recuadro superior) y en la del ATP/AMP y Pi/PPi en el dominio amino terminal (recuadro inferior). Las figuras se obtuvieron de los modelajes de la figura 15 y la numeración de los aminoácidos corresponde a la secuencia de la CsPPDK. Estos cristales se obtuvieron en sulfato de amonio, en cada caso se encontró una molécula de sulfato dentro de los sitios de unión (Herzberg *et al*, 1988). Los aminoácidos de posición equivalente en la EhPPDK se sobrepusieron y coincidieron plenamente con la posición de los mostrados.