



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA
HEXOSA 6-FOSFATO ISOMERASA (HPI),
ALDOLASA (ALDO), GLICERALDEHÍDO 3-
FOSFATO DESHIDROGENASA (GAPDH) Y
FOSFOGLICERATO CINASA RECOMBINANTES
DE *Entamoeba histolytica*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

ELIA RUSELY ENCALADA OREGÓN

TUTOR: DRA. EMMA SAAVEDRA LIRA

2006





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA
HEXOSA 6-FOSFATO ISOMERASA (HPI),
ALDOLASA (ALDO), GLICERALDEHÍDO 3-
FOSFATO DESHIDROGENASA (GAPDH) Y
FOSFOGLICERATO CINASA RECOMBINANTES
DE *Entamoeba histolytica*.

1. Datos del alumno

Encalada
Oregón
Elia Rusely
57 63 36 01
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
094244346

2. Datos del tutor

Dra
Emma
Saavedra
Lira

3. Datos del sinodal 1

Dr
José Salud
Rodríguez
Zavala

4. Datos del sinodal 2

M en I B B
Rosalinda
Tapia
López

5. Datos del sinodal 3

Dra
Laura
Kawasaki
Watanabe

6. Datos del sinodal 4

Dra
Alicia
Gamboa
de Buen

7. Datos del trabajo escrito

Caracterización bioquímica de la hexosa 6-fosfato isomerasa (HPI), aldolasa (ALDO), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y fosfoglicerato cinasa recombinantes de *Entamoeba histolytica*.
99 p
2006

AGRADECIMIENTOS

- A mis padres por todo el APOYO, AMOR Y CONFIANZA que siempre me han brindado. Porque han ensañado el valor de trabajar día con día sin olvidar a la familia. A ustedes que me brindaron todo lo que estuvo en sus manos.
iii Mil gracias !!! Esta tesis es parte de su gran esfuerzo.
iii LOS AMO !!!
- A mis hermanos: Nany por ser mi modelo de hermana mayor, Lara por siempre cuidar de mi, Yaz por que gracias a ti mi infancia fue muy feliz, a ti Isaúl gracias por el amor y confianza que me has brindado. A todos gracias por los momentos que hemos compartido.
- A la Dra. Emma Saavedra, el mas sincero agradecimiento por permitirme ser parte de este equipo de trabajo, por las enseñanzas, por la paciencia y el apoyo brindado no solo en el laboratorio.
- A el Dr. Rafael Moreno, gracias por el apoyo brindado, por las criticas y por el tiempo. GRACIAS
- A Fer por el inmenso amor, por la paciencia y por todo el apoyo brindado. Por las sonrisas y por que siempre he podido confiar en ti. Te amo.
- A mis grandes amigos que se que están conmigo aunque ya casi no los vea Vane, Mary, Elena, David, Eleazar, Miguel, Erika y Elizabeth. A los que siguen junto a mi: Isra gracias por tus consejos y por seguir compartiendo pequeños momento de nuestras vidas(TQM), a Perla, amiga gracias por las platicas y los cafés han sido de mucha ayuda.

A los maravillosos amigos que Cardiología me ha brindado: Luz, te quiero mucho y gracias por tu amistad, Jassito, gracias por tu confianza y por tu apoyo. Te quiero mucho, Érika, amiga, gracias por todo tu apoyo, aprendí muchas cosas de ti. Jimenita por todas las sonrisas, platicas, canciones, bailes, etc. que compartimos, eres una persona muy especial y valiosa, sabes que te quiero mucho y nunca cambies. A Alvaro por sus consejos y por todo el apoyo. A César (q.e.p.d.) aunque fue poco el

tiempo que compartimos, llegue a ¡¡¡quererte mucho!!!.
Te extraño. A Lalo, Marco, David, Karla, Sara, José, Oralia,
Dr. Silveira, Israel y Norma; espero no olvidar a alguien.
Muchas gracias a todos por hacer del departamento de
bioquímica un lugar agradable, a todos, saben que los
quiero mucho y a los que ya no están saben que los
extraño.

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	
I.1 Amibiasis	1
I.2 Ciclo vital de <i>Entamoeba histolytica</i> y las manifestaciones clínicas de la infección en seres humanos	2
I.3 Características subcelulares de <i>Entamoeba histolytica</i>	4
I.4 Metabolismo en general	5
I.5 Metabolismo de <i>Entamoeba histolytica</i>	7
I.6 Propiedades de la hexosa 6-fosfato isomerasa	10
I.6.1 Propiedades de la hexosa 6-fosfato isomerasa de <i>Entamoeba histolytica</i>	11
I.7 Propiedades de la aldolasa	11
I.7.1 Propiedades de la aldolasa de <i>Entamoeba histolytica</i>	14
I.8 Propiedades de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	15
I.8.1 Propiedades de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de <i>Entamoeba histolytica</i>	16
I.9 Propiedades de la fosfoglicerato cinasa	16
I.9.1 Propiedades de la fosfoglicerato cinasa de <i>Entamoeba histolytica</i>	18
II. JUSTIFICACIÓN	19
III. HIPÓTESIS	20
IV. OBJETIVOS	
IV. 1 Objetivo general	21
IV. 2 Objetivos particulares	21
V. ÁPENDICE	22

VI. METODOLOGÍA

VI. 1	Identificación de los genes	24
VI. 2	Diseño de oligonucleótidos	24
VI. 3	Extracción de DNA genómico de <i>E. histolytica</i>	27
VI. 4	Clonación de los genes	28
VI. 5	Electroforesis de ADN	29
VI. 6	Purificación del gen amplificado	30
VI. 7	Reacción de ligación	30
VI. 8	Obtención de células competentes por CaCl ₂	31
VI. 9	Transformación	32
VI. 10	Easy preps (Purificación del plásmido a pequeña escala)	33
VI. 11	Caracterización de los genes	33
VI. 12	Mini preps (Purificación del plásmido a mediana escala)	34
VI. 13	Corroboración de la identidad del gen	35
VI. 14	Sobre-expresión de las proteínas	35
VI. 14.1	Purificación de la proteína.	38
VI. 15	Almacenamiento de las proteínas recombinantes	39
VI. 16	Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS	39
VI. 17	Determinación del grado de pureza de las proteínas recombinantes	40
VI. 18	Cuantificación de proteínas	40
VI. 19	Determinación de parámetros cinéticos	41
VI. 20	Estructura cuaternaria	48

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VII. 1	Identificación de los genes en el banco de secuencias de <i>Entamoeba histolytica</i>	49
VII. 2	Amplificación de los genes	58
VII. 3	Sobre-expresión de las proteínas.	59
VII. 4	Purificación de las proteínas	63
VII. 5	Caracterización bioquímica	67
VII. 5. 1	Determinación del pH óptimo de las enzimas	67
VII. 5. 2	Estabilidad al almacenamiento	70

VII. 5. 3	Estructura oligomérica	73
VII. 5. 4	Caracterización cinética.	76
VII. 5. 5	Efecto de activadores	83
VIII.	DISCUSIÓN GENERAL	87
IX.	CONCLUSIONES	90
X.	PERSPECTIVAS	91
XI.	REFERENCIAS	92

RESUMEN

La glucólisis en *Entamoeba histolytica* es la principal vía de producción de ATP, ya que no hay evidencias de que este organismo lleve a cabo ciclo de Krebs, ni fosforilación oxidativa. En los años 70s se reportó la detección de las actividades de todas las enzimas de la vía metabólica. Sin embargo, existen pocos o nulos estudios bioquímicos de la mayoría de las enzimas, por lo que el objetivo de este trabajo es la caracterización bioquímica de la hexosa-6-fosfato isomerasa (HPI), aldolasa (ALDO), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y fosfoglicerato cinasa (PGK).

Los genes de HPI, ALDO, GAPDH y PGK se clonaron, se sobre-expresaron en *E. coli*, y se purificaron las cuatro proteínas. Se determinó tanto su estabilidad al almacenamiento, como su dependencia al pH y estructura oligomérica. Se determinaron los valores de las constantes cinéticas V_{max} y K_m para los diferentes sustratos de cada enzima. Los valores obtenidos se compararon con los valores para las enzimas homólogas en otros organismos, incluyendo las enzimas de humano, y se encuentran dentro de los intervalos reportados. Las principales diferencias con respecto a este último (hospedero) son: la EhALDO es de la clase II (metaloenzimas), por lo que se exploró la dependencia de metales para su actividad; la EhPGK es un orden de magnitud más afín por GDP que por ADP y es un dímero en lugar de monómero como la mayoría de las enzimas descritas. Las constantes cinéticas obtenidas a pH 7.0 indican que la EhALDO disminuye hasta en un orden de magnitud su velocidad y afinidad por su sustrato, por lo que esta enzima podría ser un punto de control del flujo glucolítico en el parásito.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Amibiasis

La amibiasis es la enfermedad humana causada por el parásito protista *Entamoeba histolytica* (Fig. 1). Este organismo puede vivir como comensal en el lumen del intestino grueso, sin embargo, en el estado patológico puede invadir la mucosa intestinal produciendo disentería y en estadios más avanzados de la enfermedad invade órganos distantes como el hígado, causando absceso hepático (Ravdin, 1988; Martínez-Palomo, 1982).

La incidencia de la enfermedad a nivel mundial es de 48 millones de casos anuales (<http://www.who.int/>) y es probable que la etapa invasiva produzca anualmente entre 40,000 y 110,000 muertes en el mundo. Por ello, la amibiasis ocupa, a nivel mundial, el tercer lugar como causa de muerte en la lista de las principales enfermedades parasitarias, después del paludismo y la esquistosomiasis (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000).

La amibiasis es considerada una enfermedad de la pobreza, de la educación y de la higiene. Todo se podría prevenir si hubiera los servicios suficientes, si todo mundo contara con drenajes adecuados, con agua potable, con higiene y educación para crear el hábito de lavarse las manos (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000).

Las formas potencialmente mortales de amibiasis son fundamentalmente el absceso hepático y la colitis fulminante. Se estima que del 2 al 10% de las personas con absceso hepático mueren; en cambio, la mortalidad por colitis amibiana grave, es hasta

del 70% del total de los casos (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000).

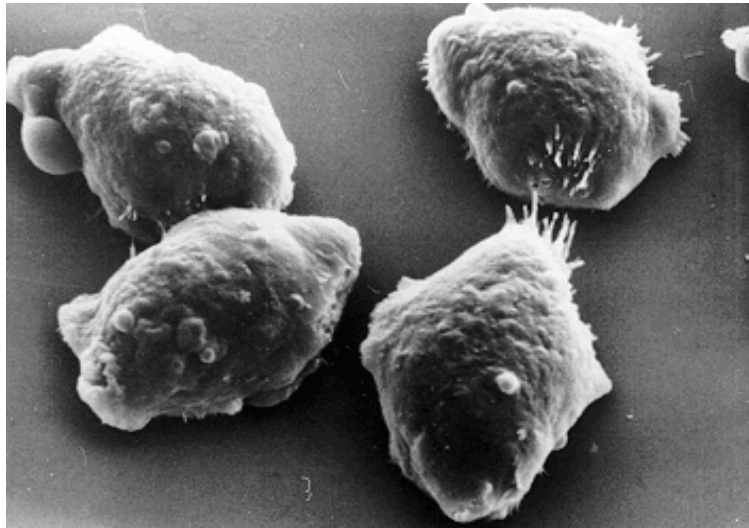


Fig. 1 Trofozoítos de *Entamoeba histolytica*.

Microscopía electrónica de barrido (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000).

I.2 Ciclo vital de *Entamoeba histolytica* y las manifestaciones clínicas de la infección en seres humanos

E. histolytica es un organismo unicelular que infecta principalmente a los seres humanos y a otros primates. Los mamíferos como perros y gatos pueden infectarse pero generalmente no vierten los quistes con sus heces, así, no contribuyen perceptiblemente a la transmisión (Ravdin, 1988).

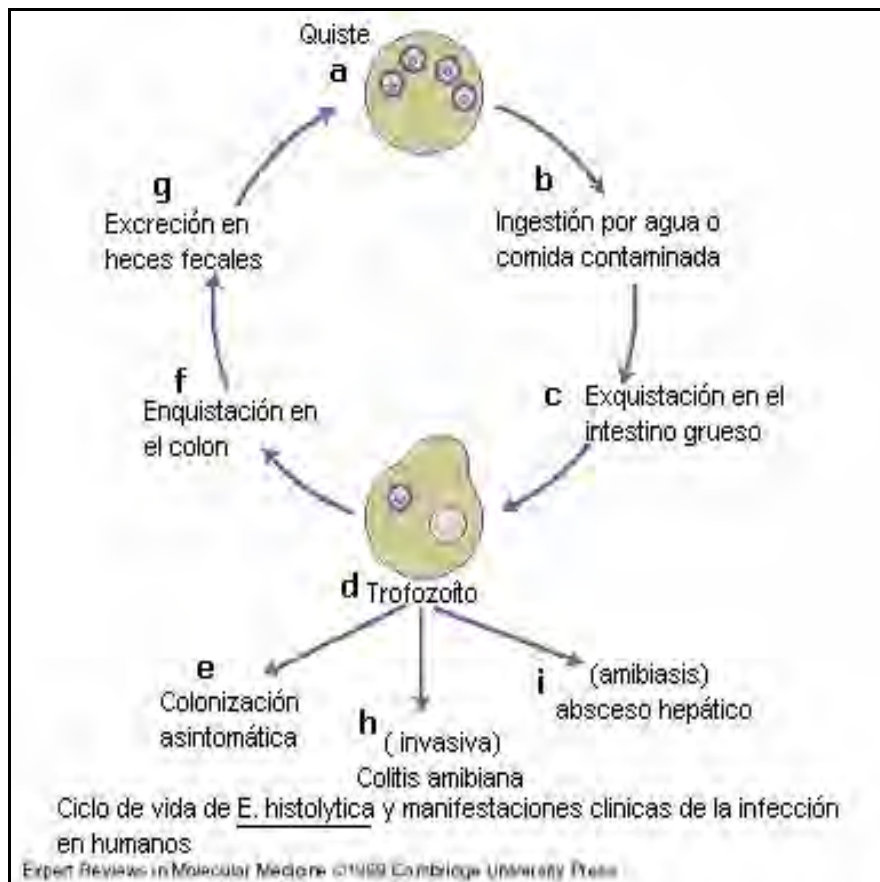


Fig. 2 Ciclo de vida de *E. histolytica*.

(Modificado de Huston, C. D.; Haque, R.; y Petri, G. A. Jr. 1999).

La figura 2 muestra el ciclo de vida de *E. histolytica*, el cual consiste de dos etapas: trofozoíto y quiste. Los quistes (a) con un tamaño de 10-15 μm de diámetro comúnmente contienen cuatro núcleos y se introducen al hospedero por la ingestión de alimento o agua contaminada con heces fecales (b). Durante la exquistación dentro del lumen del intestino grueso (c), la división nuclear es seguida por la división citoplásmica, dando lugar a ocho trofozoítos (d). Los trofozoítos, que miden de 10-50 μm de diámetro y contienen un solo núcleo con un cariosoma central, residen en el lumen del intestino ciego y del intestino grueso, donde se adhieren a la mucosa y a las capas epiteliales. Aproximadamente 90% de los individuos infectados con *E. histolytica* son colonizados asintómicamente (e).

La enquistación de los trofozoítos ocurre dentro del lumen del intestino ciego y del intestino grueso (f), dando como resultado la excreción de quistes en las heces (g) y la continuación del ciclo vital.

Alternativamente, los trofozoítos pueden invadir el epitelio del colon, causando colitis amibiana en aproximadamente el 10% de las personas infectadas por *E. histolytica* (h). La disentería amibiana ocurre gradualmente, generalmente con síntomas tales como dolor abdominal, tenesmo y diarrea, durante una a varias semanas, seguidas a menudo por pérdida del peso.

E. histolytica puede establecer infecciones persistentes extra-intestinales formando absceso hepático (i). El absceso hepático es la manifestación más común de amibiasis extraintestinal. Esta complicación es 10 veces más común en hombres que en mujeres. El paciente típico con absceso hepático es un varón entre 20-40 años con una historia de 1-2 semanas de dolor abdominal del cuadrante derecho superior y fiebre (Huston, *et al.*, 1999).

Se han realizado pocos estudios con el quiste ya que no existe una estrategia experimental para su obtención; por lo que la mayor parte de la información se refiere a la fase de trofozoíto.

I.3 Características subcelulares de *E. histolytica*

La característica más evidente observada en estudios de microscopía electrónica en trofozoítos de *E. histolytica* es la notable ausencia de organelos típicos de otros eucariontes como mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico rugoso y citoesqueleto microtubular. Sin embargo, en estudios recientes se ha reportado actividad de glicosidasas usualmente confinadas al aparato de Golgi (Zamarripa-Morales *et al.*, 1999), pero no se ha identificado

su localización en el parásito. Otros estudios recientes identificaron la presencia de una chaperona Hsp60 involucrada en el plegamiento de proteínas importadas a la mitocondria (Mai *et al*, 1999). En *E. histolytica* se identificó un organelo remanente de mitocondria al que se denominó "criptón" (Mai *et al*, 1999) o "mitosoma" (Tovar *et al.*, 1999). Sin embargo aún no se sabe la función de este reminiscente de mitocondria. Aparte del núcleo, las estructuras más evidentes son las vesículas.

La ausencia de mitocondrias funcionales y de las actividades del ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa tienen implicaciones importantes en la forma en que *E. histolytica* obtiene energía en forma de ATP para el trabajo celular.

I.4 Metabolismo en general

La energía es la capacidad para efectuar trabajo, resulta tan vital para la civilización moderna como para el microcosmos de una célula. Las células sintetizan constantemente sustancias nuevas, efectúan trabajo mecánico y producen calor (Baker y Allen. 1976)

Las células heterotróficas obtienen la energía necesaria a partir de la degradación (catabolismo) de moléculas nutrientes. Cuando dichas moléculas nutrientes se rompen, la energía liberada debe de ser canalizada en una dirección apropiada ya que si no es de inmediato capturada, se pierde en forma de calor y no es aprovechada por los procesos de la célula.

La energía se puede almacenar como enlaces fosfatos de alto contenido de energía. De esta manera, la energía disponible adopta una forma común para los procesos metabólicos que lleva a cabo la célula. En la mayoría de los seres vivos los enlaces de alto contenido de energía se encuentran bajo la forma del **trifosfato de adenosina (ATP)** (Fig.3) (Lehninger, *et al.* 1993).

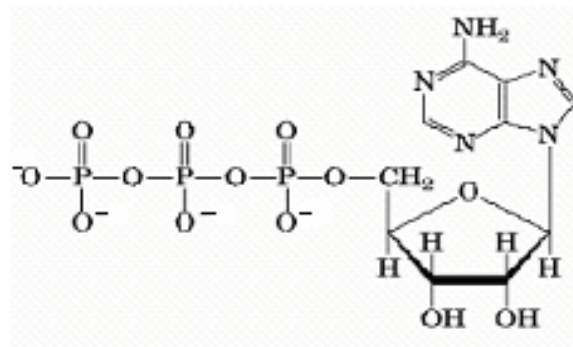


Fig.3 Estructura del trifosfato de adenosina (ATP)

Por otro lado, la glucosa (Fig.4), es una de las principales moléculas combustibles de la mayor parte de los organismos, es rica en energía y puede movilizarse rápidamente desde la reserva de glucógeno cuando se efectúan demandas rápidas de energía. La glucólisis es el proceso mediante el cual una molécula de glucosa se degrada a dos moléculas de piruvato. Parte de la energía liberada en la secuencia de reacciones de la glucólisis se conserva en forma de dos ATPs netos y en poder reductor en forma de 2 moléculas de NADH por molécula de glucosa consumida (Lehninger, 1993).

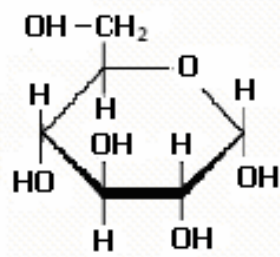


Fig.4 Estructura de la Glucosa

I.5 Metabolismo de *Entamoeba histolytica*

E. histolytica es un parásito que posee un metabolismo energético peculiar ya que no hay evidencias de que posea mitocondrias funcionales donde se lleve a cabo el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, por lo que gran parte del ATP que se produce en la célula proviene de la degradación de la glucosa a piruvato por la glucólisis (Reeves, 1984; McLaughlin y Aley 1985). La Fig. 5 esquematiza la degradación de glucosa hasta los productos finales (glucólisis).

Existen dos diferencias significativas que distinguen la glucólisis de este parásito de la vía en los seres humanos y primates que infecta: 1ra. la falta de una lactato deshidrogenasa (el lactato no es un producto final de la glucólisis, los productos finales son etanol, acetato y CO₂), y 2da. el uso del pirofosfato inorgánico (PPI) como donador alternativo de grupos fosfato a intermediarios en la vía de degradación de la glucosa (Saavedra-Lira y Pérez-Montfort, 1996)

El parásito posee una fosfofructocinasa dependiente de PPI (PPI-PFK) (Reeves *et al.*, 1974; Reeves, 1976) además de una ATP-PFK cuya actividad es el 10% de la PPI-PFK (Chi, *et al.* 2001). Otra enzima dependiente de PPI, es la piruvato fosfato dicinasa (PPDK) (Reeves, 1968), que cataliza una reacción equivalente a la piruvato

cinasa (PK) en mamíferos. El gen que codifica para la PPDK y la caracterización cinética de esta enzima ha sido reportado por nuestro grupo de trabajo (Saavedra-Lira *et al*, 1998). Además resultados de nuestro laboratorio han mostrado una actividad de piruvato cinasa (PK) en extractos amibianos que corresponde a un 10% de la actividad de la PPDK amibiana (Saavedra E, Olivos A, **Encalada R** y Moreno-Sánchez R, 2004).

El 95% de la glucosa catabolizada por la amiba es convertida a glucógeno, dióxido de carbono, etanol y acetato.

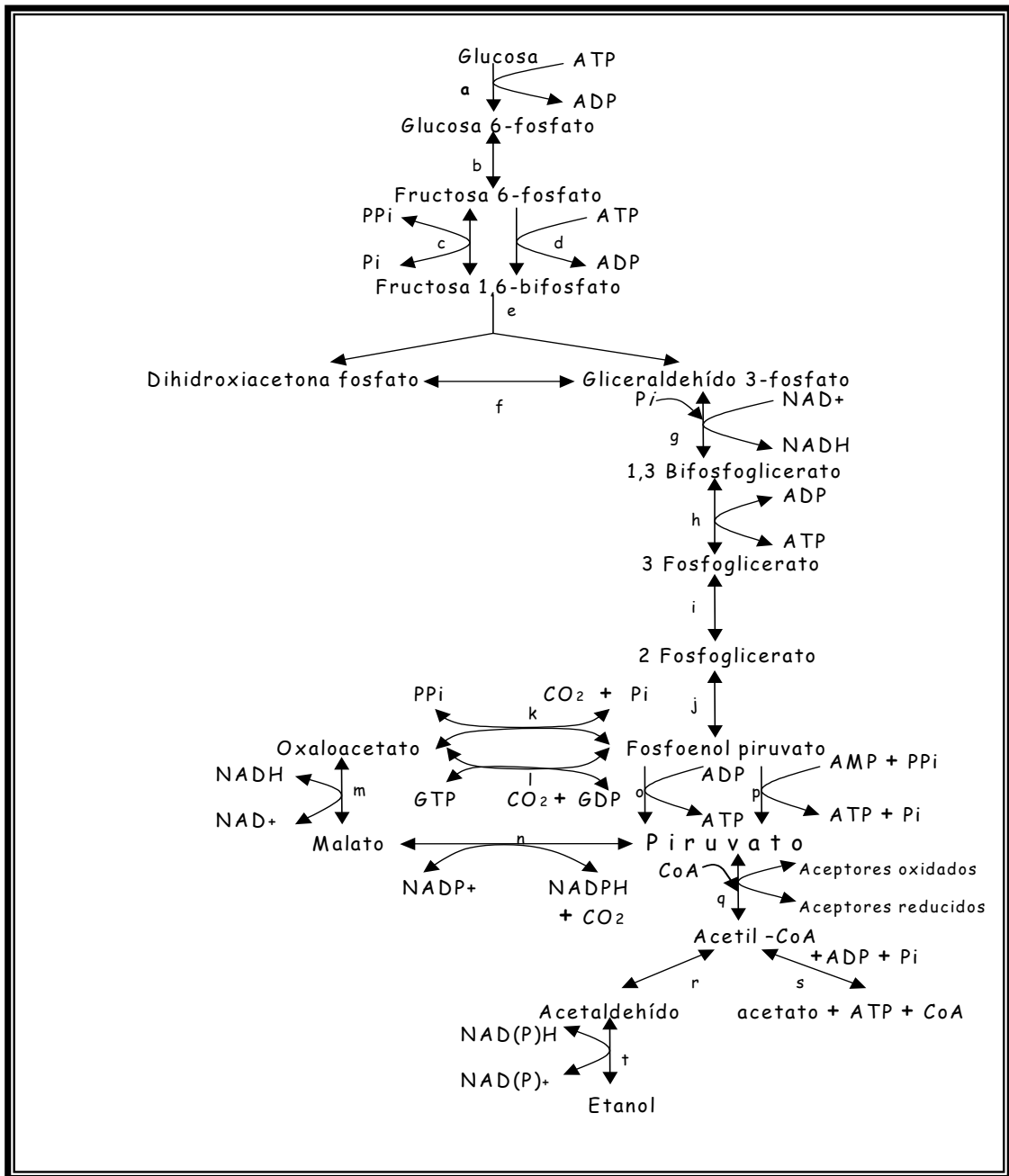


Fig. 5 Metabolismo de los carbohidratos en *E. histolytica*

(Modificado de Saavedra y Pérez Montfort, 1996).

a) hexocinasa; b) hexosa-6-fosfato isomerasa; c) PPI-fosfofructocinasa; d) ATP-fosfofructocinasa; e) aldolasa; f) triosa fosfato isomerasa; g) gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; h) fosfoglicerato cinasa; i) fosfoglicerato mutasa; j) enolasa; k) PEP carboxitransfosforilasa; l) PEP-carboxicinasa; m) malato deshidrogenasa; n) malato deshidrogenasa (descarboxilante); o) piruvato cinasa; p) piruvato fosfato dicinasa; q) piruvato-ferredoxina oxidoreductasa; r) acetaldehído deshidrogenasa; s) acetato tio-cinasa; t) alcohol deshidrogenasa

Las actividades de las diez enzimas de la vía glucolítica se detectaron en extractos amibianos tanto en cultivos monoaxénicos como en axénicos: hexocinasa (HK), hexosa fosfato isomerasa (HPI), PPI- fosfofructocinasa (PPI-PFK), aldolasa (ALDO), triosa fosfato isomerasa (TIM), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), fosfoglicerato cinasa (PGK), fosfoglicerato mutasa (PGM), enolasa (ENO), piruvato fosfato dicinasa (PPDK) (Reeves, 1974; Reeves, 1984).

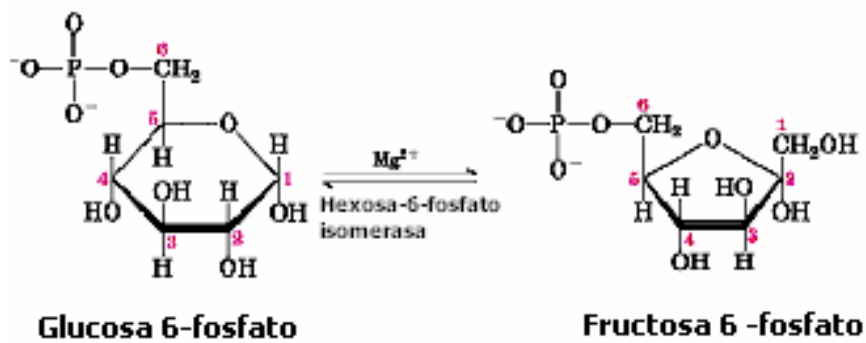
La caracterización de las enzimas glucolíticas amibianas se ha enfocado en la HK (Reeves, *et al.*, 1967; Kroschewski, *et al.*, 2000), PPI-PFK (Reeves, 1974; Deng, 1998) y PPDK (Reeves, 1968, Saavedra-Lira, *et al.*, 1998).

Sin embargo, no se ha estudiado cinéticamente a las enzimas HPI, ALDO y GAPDH y en el caso de la PGK existe una caracterización parcial (Reeves, 1974), por lo que nosotros estamos interesados en caracterizar cinética y estructuralmente a estas enzimas glucolíticas.

I.6 Propiedades de la hexosa 6-fosfato isomerasa

*Conversión de glucosa 6-fosfato en fructosa 6-fosfato.

La isomerización reversible de la glucosa 6-fosfato, una aldolasa, en fructosa 6-fosfato, una cetosa, está catalizada por la **hexosa 6-fosfato isomerasa (HPI)** (Fig. 6), que se ha aislado en forma pura del tejido muscular. Esta reacción implica un desplazamiento del oxígeno del carbonilo desde el átomo de carbono 1 al átomo de carbono 2.



$$\Delta G^{\circ} = +0,4 \text{ kcal/mol}$$

Fig. 6 Reacción enzimática de la HPI (Voet, *et al.*, 1999)

La reacción transcurre con facilidad en ambas direcciones, como puede predecirse de la pequeña variación de energía libre estándar. La HPI necesita de Mg^{2+} y es específica para la glucosa 6-fosfato (G6P) y la fructosa 6-fosfato (F6P) (Lehninger, 1993).

I.6.1 Propiedades de la HPI de *Entamoeba histolytica*

Únicamente se ha descrito la detección de la actividad en extractos de cepa monoxénica (Reeves, 1974).

I.7 Propiedades de la aldolasa

El rompimiento de la fructosa 1,6 bifosfato está catalizada por la **Aldolasa (ALDO)** (fig. 7). Esta es una enzima que se aísla con facilidad en forma cristalizada de los extractos de músculo de conejo. La reacción que cataliza es una condensación aldólica reversible. La fructosa 1,6-bifosfato (FBP), se escinde reversiblemente rindiendo dos fosfatos de triosa diferentes, el gliceraldehído 3-fosfato (G3P), una aldosa, y la dihidrooxicetona fosfato (DHAP), una cetosa (Lehninger, 1993).

Aunque la reacción de la aldolasa muestra una variación de energía libre estándar con valores positivos, en condiciones de pH y de concentración que existen en las células para esta reacción puede transcurrir fácilmente en ambas direcciones. Si transcurre en el sentido directo (sentido de la glucólisis) los productos de la reacción son eliminados con rapidez por la reacción de la GAPDH (Lehninger, 1993)

*Escisión de la fructosa 1,6-bifosfato (FBP)

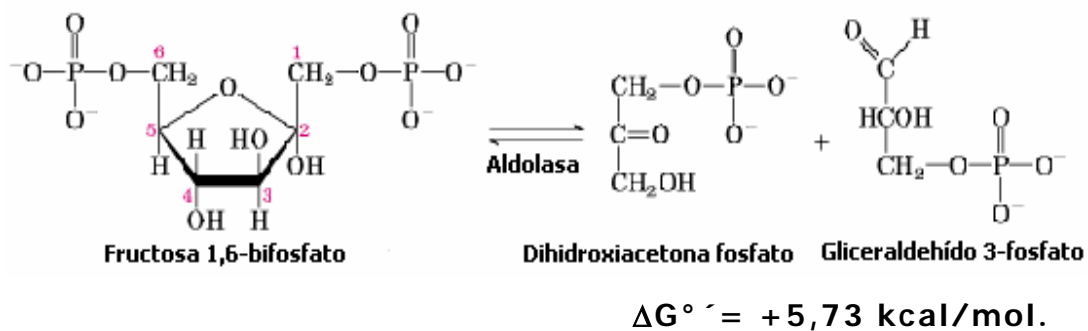


Fig. 7 Reacción enzimática de la ALDO (Voet, *et al.*, 1999)

Hay dos tipos de aldolasas que se clasifican de acuerdo a su mecanismo de estabilización del intermediario enolato (Horecker, *et al.*, 1972). La clase I se localiza principalmente en plantas y animales. La reacción tiene lugar del siguiente modo: El grupo carbonilo de la FBP reacciona con el grupo ϵ -amino de la Lys del sitio activo (Fig. 8), formando un catión imino, es decir una base de Schiff protonada. Posteriormente se rompe el enlace entre C3 y C4 de la FBP con formación de una enamina y liberación de G3P. La enamina se protona para formar un catión iminio, el cual se hidroliza con liberación de la DHAP y la regeneración de la enzima libre (Voet, *et al.*, 1999).

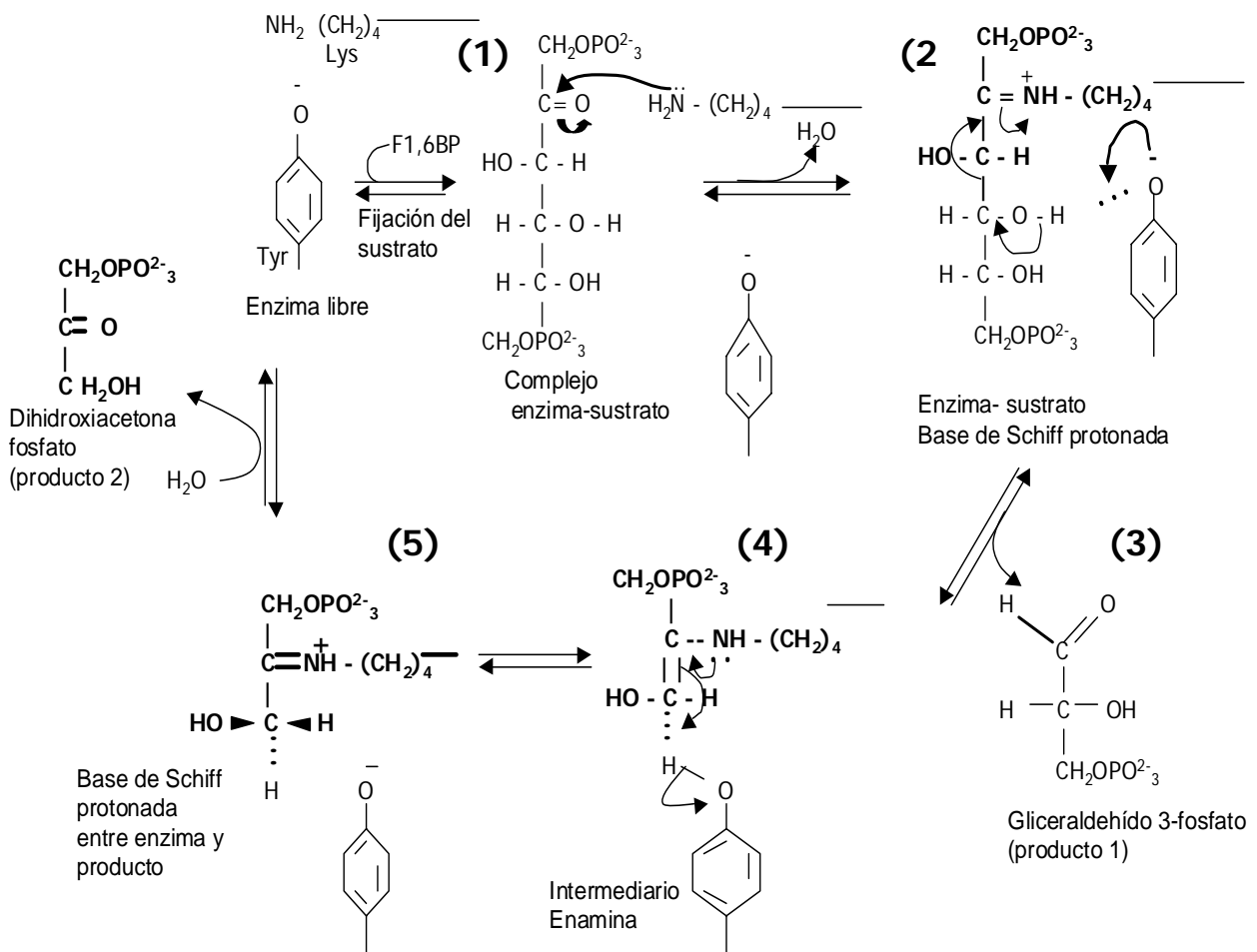


Fig. 8 Reacción enzimática de la Aldolasa clase I donde se observa la formación de la base de Schiff entre el residuo de Lys del sitio activo de la enzima y la fructosa 1,6-bifosfato de cadena abierta (1), la rotura aldólica, formación de un intermediario enamina entre la enzima y la DHAP (2), liberación de G3P (3) y finalmente hidrólisis de la base de Schiff (4), liberación de DHAP (5). (Voet, *et al.*, 1999).

La aldolasa clase II (Fig. 9), está presente en hongos, algas, algunas bacterias y protistas. No forman bases de Schiff con el sustrato, sin embargo, requieren de un catión divalente, usualmente Zn^{2+} o Fe^{2+} , que polarizan el oxígeno del carbonilo de la FBP para estabilizar el intermediario enolato de la reacción (Voet, *et al.*, 1999).

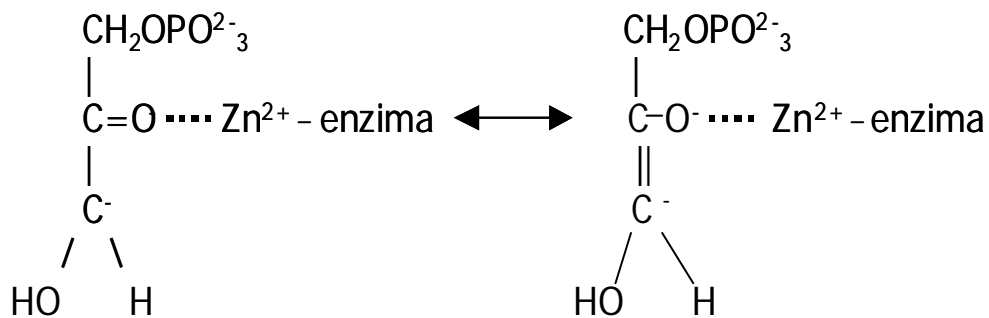


Fig. 9 Mecanismo de reacción de la Aldolasa tipo II, para estabilizar al intermediario enolato. (Voet, *et al.*, 1999)

I.7.1 Propiedades de la Aldolasa de *Entamoeba histolytica*

Se comprobaron algunos activadores e inhibidores de la aldolasa de extractos amibianos. Se observó una activación hasta en un 93% de la actividad inicial por la adición de 0.143 mM CoCl_2 , y una inactivación del 100% con 10 mM de EDTA, lo que sugirió que la aldolasa amibiana pertenecía a las enzimas que requieren metal para su actividad (Kalra *et al.* 1969). Sin embargo ya no hubo reportes posteriores que caracterizaran a esta enzima.

La ALDO de amiba está involucrada en la interconversión de hexosa a pentosa en una forma alterna de la vía de las pentosas fosfato para formar ribosa-5-fosfato para la síntesis de nucleótidos (Susskind, *et al.*, 1981).

I.8 Propiedades de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

La oxidación y fosforilación del gliceraldehído 3-fosfato (G3P) es catalizada por la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Fig. 10), que utiliza los co-sustratos NAD^+ y P_i . Esta reacción de oxidación del aldehído es una reacción exergónica que conduce a la síntesis de un acil-fosfato de "alta energía", el 1,3-bifosfoglicerato (1,3-BPG). El acil-fosfato es un compuesto con un alto potencial de transferencia del grupo fosforilo, el cual es posteriormente transferido a ADP en la primera reacción de fosforilación a nivel de sustrato de la glucólisis. La mayor parte de la energía libre de la oxidación del G3P se conserva en el grupo acil-fosfato de energía elevada (Lehninger, 1993).

El aceptor de hidrógeno en esta reacción es la coenzima NAD^+ que es la forma oxidada de la coenzima dinucleótido de adenina y de nicotinamida. La reducción del NAD^+ se produce por la transferencia enzimática de un ion hidruro ($:\text{H}^-$) desde el grupo aldehído del G3P a la posición 4 del anillo de nicotinamida del NAD^+ , conduciendo a su reducción en las posiciones del anillo 1 y 4, para dar lugar a la coenzima reducida NADH. El otro átomo de hidrógeno de la molécula del sustrato aparece en el medio en forma de H^+ .

El NADH formado en esta reacción debe oxidarse de nuevo a NAD^+ , de modo que pueda participar en la degradación de muchas moléculas de glucosa a piruvato. Como el NAD^+ sólo se encuentra en concentraciones limitadas en las células, la glucólisis se interrumpiría muy pronto por falta de NAD^+ . El P_i ataca al tioéster, formando el

acil-fosfato, 1,3-BPG, y regenerando la enzima libre. (Lehninger, 1993).

*Oxidación del gliceraldehído 3-fosfato a 1,3-bifosfoglicerato

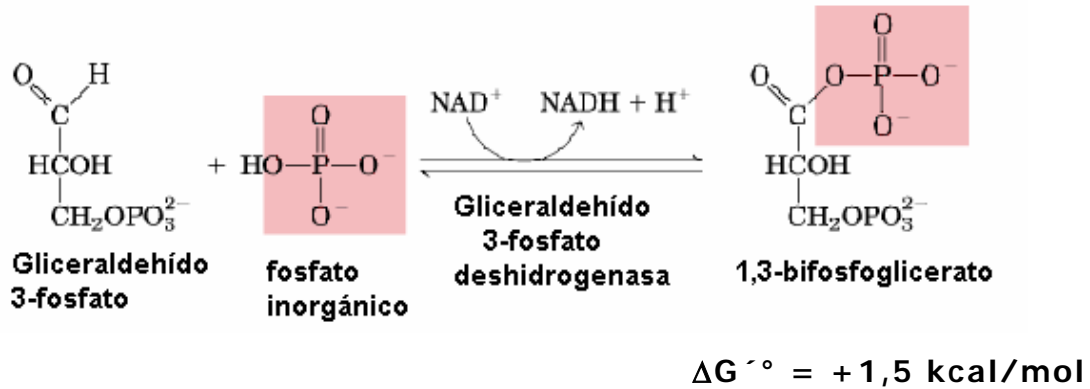


Fig. 10 Reacción enzimática de la GAPDH (Voet, *et al.*, 1999)

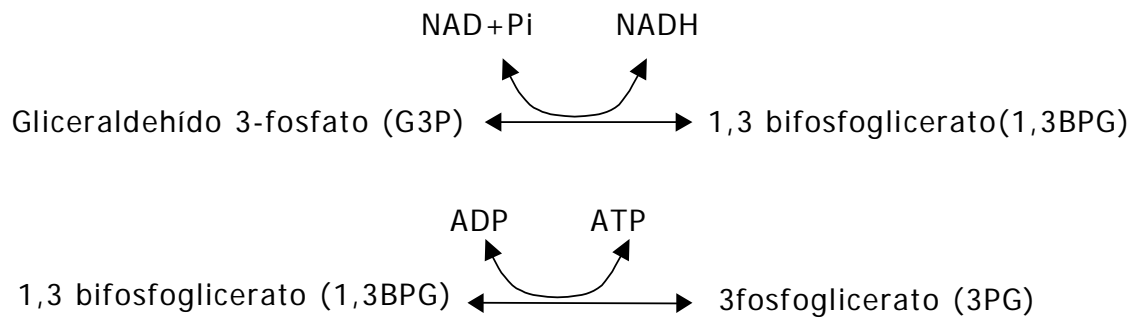
1.8.1 Propiedades de la Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de *Entamoeba histolytica*

Solo se ha reportado la detección de la actividad (Reeves, 1974) y una secuencia parcial del gen.

1.9 Propiedades de la fosfoglicerato cinasa

La enzima fosfoglicerato cinasa (PGK) (Fig. 11), transfiere el grupo fosfato de energía elevada desde el 1,3-bifosfoglicerato al ADP con lo que se forma el ATP y se libera 3-fosfoglicerato (Lehninger, 1993).

La reacción de la PGK y la precedente de la glucólisis catalizada por la GAPDH constituyen, conjuntamente, un proceso de acoplamiento de energía. Si se escriben las dos reacciones de nuevo se verá que el 1,3-bifosfoglicerato es el intermediario común.



Se forma en la primera reacción y su grupo acilfosfato se transfiere al ADP para formar ATP en la segunda reacción.

El resultado de estas dos ecuaciones, ambas reversibles en condiciones celulares, es que la energía liberada en la oxidación de un aldehído a grupo carboxilato se ha conservado por la formación acoplada del ATP a partir del ADP y del fosfato. La producción de ATP acoplada a una transformación enzimática de un "sustrato" es decir, un intermediario metabólico tal como el gliceraldehído 3-fosfato se define como una fosforilación a nivel de sustrato (Lehninger, 1993).

*Transferencia del fosfato desde el 1,3-bifosfoglicerato al ADP

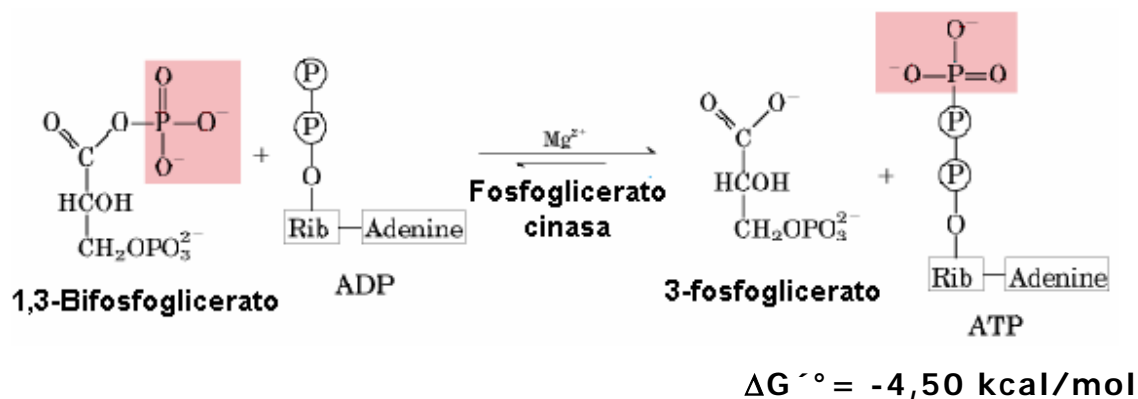


Fig. 11 Reacción enzimática de la PGK (Voet, *et al.*, 1999)

I.9.1 Propiedades de la fosfoglicerato cinasa de *Entamoeba histolytica*

La actividad de la PGK fue reportada por Bragg y Reeves en 1962. En 1974, Reeves reportó una actividad específica en extractos clarificados de amiba de 0.86 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$, mientras que la enzima parcialmente purificada presentó una actividad de 52 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$.

También reportaron las K_m s para los diferentes sustratos: GDP 0.3 mM; ADP 10 mM; GTP 0.25 mM, ATP 1.2 mM; 3-fosfoglicerato 0.4 mM. Como se puede observar, la PGK de *E. histolytica* muestra una mayor preferencia por los nucleótidos de guanina que por los de adenina (150 veces mayor por GDP que por ATP). Debido a esta característica, en la clasificación de enzimas la PGK de amiba se le asignó un número diferente (2.7.2.10) que el que se le asignó a la enzima dependiente de ADP (2.7.2.3).

II. JUSTIFICACIÓN

Entamoeba histolytica es responsable de miles de muertes por año a nivel mundial. La única terapia actual para el tratamiento de esta enfermedad es la administración de metronidazol y sus derivados; sin embargo, este tratamiento es eficiente solamente para casos leves y moderados de amibiasis. Entre el 40 a 60% de los pacientes tratados, se ha observado la permanencia del parásito en el intestino además de que existen reportes recientes en los que se describe la obtención *in vitro* de cepas resistentes al fármaco (Saavedra, *et al.*, 2005). Estas observaciones indican que es necesario el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento futuro de esta enfermedad.

E. histolytica es un parásito que principalmente obtiene su energía en forma de ATP a través de la glucólisis, por lo que las enzimas glucolíticas podrían ser un buen blanco terapéutico para afectar una vía metabólica esencial del parásito.

Sin embargo, como se ha revisado en los antecedentes, existe muy poca información sobre las enzimas de esta vía metabólica. Por lo que el objetivo principal de este trabajo de tesis es la de obtener información cinética y estructural sobre las enzimas glucolíticas amibianas de las cuales la información existente es escasa o no existe.

Estos estudios son pertinentes dentro del proyecto de investigación general de nuestro laboratorio en el que se está determinando cómo es que se controla el flujo glucolítico en el

parásito para identificar a las enzimas que tienen el mayor control del flujo y proponerlas como blancos terapéuticos.

III. HIPOTESIS GENERAL

Si la producción de energía en la amiba recae en la glucólisis y no se ha reportado algún tipo de regulación para la PPI-PFK y PPDK, la distribución del control del flujo glucolítico en el parásito debe ser diferente al que se presenta en otras células en donde el control del flujo de la vía reside en la ATP-PFK, PK y HK. Enzimas que presentan una baja eficiencia catalítica serán posibles puntos de control del flujo glucolítico.

La caracterización bioquímica de todas las enzimas de la vía es necesaria para estudiar la glucólisis desde el punto de vista del control metabólico.

La presente tesis forma parte del proyecto "Análisis del control metabólico de la glucólisis en *Entamoeba histolytica*" del laboratorio de la Dra. Emma Saavedra Lira.

IV. OBJETIVOS

IV. I Objetivo General

Caracterizar bioquímicamente a la HPI, ALDO, GAPDH y PGK recombinantes de *E. histolytica*, enzimas glucolíticas de las cuales se cuenta con poca o nula información.

IV. II Objetivos Particulares

- * Identificar los genes en el banco de secuencias del genoma de *E. histolytica*
- * Clonar los genes
- * Sobre-expresar las proteínas en un sistema bacteriano
- * Purificar las proteínas recombinantes
- * Caracterizar bioquímicamente a las enzimas
 - ✓ Determinar su estabilidad al almacenamiento
 - ✓ Determinar su estructura oligomérica
 - ✓ Determinar los parámetros cinéticos
 - ($V_{m\acute{a}x}$ y K_m para cada sustrato en la reacción directa (Fw) y reversa (Rw) a pH óptimo y fisiológico)
 - Determinar el efecto de activadores o inhibidores de la actividad enzimática

V. APENDICE

Buffer PBS

NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM
Ajustar pH a 7.4	

Medio de cultivo Luria Bertani (LB)

Líquido

NaCl	1.0%
Triptona	1.0%
Extracto de levadura	0.5%

Sólido

Adicionar agar bacteriológico	1.5%
-------------------------------------	------

Buffer TBE 0.5X

Tris	45 mM
Acido Bórico	45 mM
EDTA	1 mM

Buffer de carga p/gel de agarosa (Stop mix)

Azul de bromofenol	0.25%
Sacarosa	40%

Solución teñidora para geles

Etanol 95%	50%
Ácido acético glacial	10%
H ₂ O	40%
Azul brillante de Coomassie R250	2%

Solución desteñidora para geles

Metanol	50%
Ácido acético glacial	7.5%
H ₂ O	4.25%

Soluciones para cuantificar proteínas por Lowry (1951)

Solución "A"

Na ₂ CO ₃	2%
NaOH	0.4%
Tartrato de Na-K	0.16%
Dodecil sulfato de sodio	1%

Solución "B"

CuSO ₄	4%
-------------------------	----

Buffer mix p/ medir actividad enzimática

Imidazol	50 mM
Acetato	10 mM
MES	10 mM
Tris	10 mM

ABREVIATURAS

ALDO: aldolasa

AMP: monofosfato de adenosina

ATP: trifosfato de adenosina

CTAB: cetil-trimetil bromuro de amonio

DHAP: dihidroxiacetona fosfato

DNA: ácido desoxirribonucleico

EDTA: ácido etileno diamino tetra acético

FBP: fructosa-1,6-bifosfato

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

G3P: gliceraldehído-3-fosfato

GDP: difosfato de guanosina

His: histidina

HPI: hexosa-6-fosfato Isomerasa

IPTG: isopropiltiogalactósido

KDa: kilo Daltones

K_m : constante de Michaelis

K_{eq} : constante de equilibrio

mM: milimolar

μ M: micromolar

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PBS: buffer de fosfatos

PGK: fosfoglicerato cinasa

PP: precipitado

PPi: pirofosfato inorgánico

PPi-PFK: fosfofructocinasa dependiente de pirofosfato

PPDK: piruvato fosfato dicinasa

SDS: dodecil sulfato se sodio

SN: sobrenadante

TBE: buffer Tris, ácido bórico y EDTA

TCA: Ácido tri-cloroacético

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D galactopiranosido

V_{max}: velocidad máxima

VI. METODOLOGÍA

VI. 1 Identificación de los genes.

Se realizaron búsquedas en el banco de secuencias traducido del proyecto de secuenciación del genoma de *Entamoeba histolytica* en The Institute for Genomic Research (TIGR; www.tigr.org/+db/e2k1/ena1/) utilizando como sonda las secuencias de aminoácidos de las enzimas glucolíticas de otros organismos. La identidad de los genes localizados se comprobó mediante alineamientos usando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del servidor público PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). De esta manera se identificaron las secuencias de los genes que codifican para las proteínas estudiadas. Se determinaron los porcentajes de similitud e identidad de las secuencias de aminoácidos a través de un análisis tipo BLAST en el banco de proteínas, usando el motor BLAST.

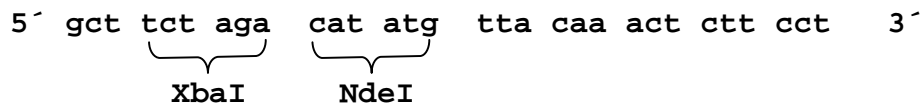
VI. 2 Diseño de oligonucleótidos

A partir de las secuencias de nucleótidos de los extremos 5´ y 3´ de los genes, se diseñaron oligonucleótidos que comprenden la secuencia codificante de los primeros 5-6 aminoácidos y de los últimos 4-5, para amplificar los genes por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos tenían sitios de corte para enzimas de restricción, lo que facilitó la subclonación de los genes en plásmidos. A continuación se muestra la secuencia de los oligonucleótidos.

* Hexosa-6-fosfato isomerasa

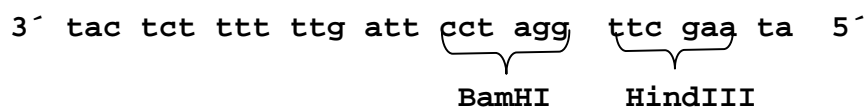
oligonucleótido directo

EhHPI Fw 1



Oligonucleótido reverso

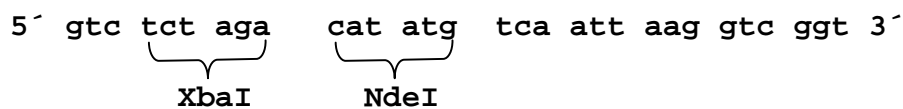
EhHPI Rw 1



* Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

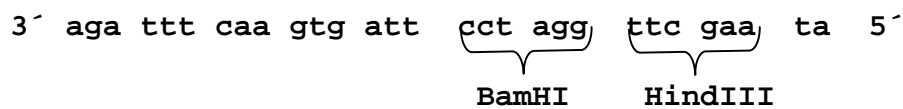
oligonucleótido directo

EhGAPDH Fw 1



Oligonucleótido reverso

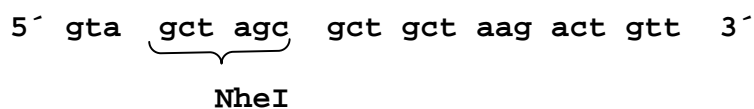
EhGAPDH Rw 1



* Aldolasa

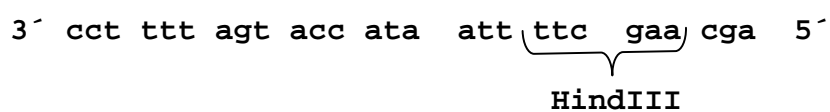
oligonucleótido directo

EhALDO Fw1



Oligonucleótido reverso

EhALDO Rw 1



* Fosfoglicerato cinasa

oligonucleótido directo

EhPGK Fw 1

5' gtc tct aga cat atg gga ttt act aaa 3'
XbaI NdeI

Oligonucleótido reverso

Eh PGK Rw 1

3' cta cta cga ctt att cct agg ttc gaa ta 5'
BamHI HindIII

VI. 3 Extracción de DNA genómico de *E. histolytica*

Trofozoítos de la cepa HMI:MSS se aislaron a partir de un absceso hepático amibiano inducido en hámster de acuerdo a técnicas establecidas (Saavedra *et al*, 2004). Brevemente, 7×10^5 trofozoítos se inoculan en 50 mL de medio TYI-S-33 (Diamond, 1978) y se incubaron por 72 hrs a 36.5°C. Las amibas se cosecharon por centrifugación a 2450 x g durante 5 min; posteriormente se lavaron dos veces con PBS pH 7.4 y se cosecharon.

Para purificar el DNA se siguió la metodología descrita en la página de Internet de *Entamoeba histolytica* (<http://homepages.lshhtm.ac.uk/entamoeba/dnaisoln.htm>).

El pellet celular se alicuoteó en volúmenes de 50 μ L a los que se les agregaron 250 μ L de buffer de lisis (0.25% SDS, 0.1 M EDTA pH 8.0). A dicho lisado se le agregó proteinasa K a una concentración final de 10 μ g/mL y se incubaron a 55°C durante una hora. Se agregó 0.9 mM de NaCl; se mezcló cuidadosamente y se agregó 1% de CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) previamente calentado a 55°C; se mezcló y se incubó a 65°C por 20min. El CTAB es un detergente catiónico que atrapa a los carbohidratos asociados al DNA en condiciones salinas. Posteriormente a temperatura ambiente se adicionó 1 vol. de cloroformo, se mezcló por inversión y se centrifugó a 4,200 x g durante 10 min en microcentrífuga para precipitar el complejo CTAB-polisacáridos y eliminarlo.

El sobrenadante, que contenía el DNA genómico, se transfirió a un nuevo tubo y se extrajo con 1 vol. de fenol-cloroformo (1:1) para eliminar impurezas (proteínas), se mezcló por inversión y se centrifugó a máxima velocidad en microcentrífuga. El sobrenadante se

extrajo 1 vez con cloroformo, se transfirió a otro tubo y se le agregaron dos volúmenes de etanol absoluto para precipitar el DNA, se mezcló por inversión y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a máxima velocidad durante 15 min. Se desechó el sobrenadante, y el precipitado (DNA) se lavó con 1 mL de etanol al 70%. Se centrifugó por 5 min y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente el DNA se resuspendió en 50 μ L de H₂O estéril.

VI. 4 Clonación de los genes

Los genes que codifican para las enzimas glucolíticas de nuestro interés se amplificaron por el método de *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*. A partir de los oligonucleótidos descritos anteriormente y utilizando como templado el ADN genómico de amiba. El PCR es un proceso cíclico mediante el cual se puede obtener un número ilimitado de copias de un gen blanco. Este consiste de tres pasos: *desnaturalización* del templado basándose en temperaturas altas (92°C), *alineamiento* de los oligonucleótidos a las hebras templado a temperaturas variables (37- 60°C) y *extensión* de las hebras complementarias 72°C, catalizada por una DNA polimerasa termoestable. Este ciclo se repite un número limitado de veces para incrementar la concentración preferencial de los genes de interés. A continuación se describe los componentes de la mezcla de reacción.

Concentración de reactivos para una reacción de PCR (50 µL)

10X Buffer 10mM Tris-HCl pH 8.3-8.8	1x
dNTPs	0.2 mM
MgCl ₂	1.5 mM
DMSO	1%
BSA	0.05 mg
Oligonucleotido 5´	200 ng
Oligonucleotido 3´	200 ng
ADN	~1 µg
Enzima	1 U

Condiciones

1 ciclo _____ 95°C 5 min.

40 ciclos { 95°C 1 min. (desnaturalización)
 { 42.5 – 57.5°C 1 min. (alineamiento)
 { 72°C 2 min. (extensión)

1 ciclo — 72°C 10 min.

VI. 5 Electroforesis de ADN

Los productos de PCR obtenidos se separaron en un gel de agarosa-TBE al 0.8% con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio y se separaron las muestras a 100 volts. Se utilizó marcador de peso molecular de ADN de 1Kb (Invitrogen). En este método, los productos obtenidos se separan de acuerdo a su peso molecular. Los fragmentos de DNA se observaron con ayuda de un transiluminador de luz ultravioleta (UV), ya que el bromuro de etidio se intercala entre las bases del ADN y éste fluoresce al irradiarse con luz UV.

VI. 6 Purificación del gen amplificado

El fragmento de DNA del tamaño esperado de acuerdo a la secuencia del gen, se cortó del gel y se purificó por la técnica de Gene clean según las instrucciones de los proveedores (Bio-101). La purificación se basa en agregar 450% NaI y 50% TBE modifier, en donde las altas concentraciones de las sales remueven el DNA del gel de agarosa para unirse al "glassmilk" (perlas de vidrio) a baja temperatura. Posteriormente se hicieron lavados a las perlas para eliminar impurezas con una solución con sales y etanol (New wash) y el ADN se eluyó de la resina en volúmenes pequeños de H₂O estéril.

VI. 7 Reacción de ligación

Una vez purificados los fragmentos, se ligaron al Vector pGEM-T easy (Promega), haciendo un combinado con Rapid ligation Buffer y T4-ADN ligasa (3 U/ μ l). El pGEM-T easy es un conveniente para clonar productos de PCR ya que el vector linearizado posee tres timinas en ambos extremos, mientras que la Taq polimerasa agrega adeninas en ambos extremos del producto de PCR amplificado, lo que permite el reconocimiento del fragmento con el vector. La reacción de ligación se lleva a cabo por una T4-ADN ligasa incubándose toda la noche a 4°C para obtener el mayor número de transformantes.

VI. 8 Obtención de células competentes por CaCl_2

Se prepararon células competentes de *Escherichia coli* para utilizarlas como hospedante de los plásmidos recombinantes.

En un cultivo de 5 mL de medio Luria-Bertani (Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989) sin antibiótico, se inoculó una colonia de bacterias *E. coli* de las cepas Top 10 (Invitrogen) o BL21 DE3pLysS (Novagen) y se crecieron toda la noche a 37°C.

Al siguiente día se inocularon 50 mL de medio LB con 500 μL del cultivo bacteriano y se incubaron a 37°C en agitación hasta que alcanzaron una absorbancia de 0.4-0.5 a 660nm (esto normalmente toma de 2-3 hrs). El cultivo se enfrió en hielo por 10 min. y se transfirió a tubos de 50 mL estériles. Las células se centrifugaron por 10 min. a 2450 x g a 4°C. El precipitado celular se resuspendió en 33 mL de CaCl_2 0.1M estéril, previamente enfriado a 4°C. Las células se incubaron por 1 hr en hielo, para posteriormente ser cosechadas por centrifugación durante 10 min a 2450 x g a 4°C. El precipitado se resuspendió en 2 mL de una solución estéril de CaCl_2 0.1 M con 17% glicerol y se alicuoteo en volúmenes de 100 μL en tubos eppendorf estériles, previamente enfriados en hielo para su almacenamiento a -70°C. Estas células ahora son permeables a la entrada del plásmido ajeno a ellas.

VI. 9 Transformación

La reacción de ligación se mezcló con 50 μ L de las células competentes y se incubó en hielo durante 1 hr. Posteriormente se les dio un choque térmico durante 2 min a 42°C. para que los poros de la membrana de la bacteria se abrieran y se permitiera la entrada del plásmido. Las células se incubaron en hielo por 5 min. para ser estabilizadas. Después se agregó 1 mL de medio LB sin antibiótico y se incubaron a 37°C 1 hr (para que las bacterias se recuperaran del choque térmico). Las células se cosecharon a 450 x g durante 5 min y se les agregó IPTG 0.5 mM y 80 μ g/mL X-gal y se plaquearon en medio LB sólido con 100 μ g/mL de ampicilina.

Las transformantes se seleccionaron por resistencia a ampicilina y por el color blanco de la colonia, ya que la clonación de un inserto en este vector interrumpe la secuencia codificante de la β -galactosidasa dando lugar a colonias blancas, mientras que en las colonias azules el inserto no se integró al plásmido y la β -galactosidasa rompe al sustrato cromógeno (X-gal) dando el color azul característico. Habiendo identificado las posibles colonias con los plásmidos que contenían el gen de interés, se realizó un cultivo con cada una de las colonias blancas seleccionadas para purificar DNA plasmídico.

VI. 10 Easy preps (Purificación del plásmido a pequeña escala)

Se realizaron cultivos de células *E. coli* transformadas en 3 mL de LB adicionado con 100 µg de ampicilina por mL y se incubaron durante toda la noche a 37°C en agitación. Las células se cosecharon por centrifugación a 450 x g durante 5 min. El precipitado bacteriano se resuspendió en 100 µL de buffer de lisis (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 15% sacarosa, 2 mg/mL de lizozima, 0.2 mg/mL RNAsa pancreática, 0.1 mg/mL BSA) y se incubó 5 min a temperatura ambiente, dejando actuar a los componentes para la lisis de las células. Posteriormente el lisado se hirvió por 1 min e inmediatamente después se incubó en hielo durante 1 min; esto permitió que las proteínas y el DNA genómico bacterianos se precipitaran. Posteriormente se centrifugó a máxima velocidad durante 15-20 min a temperatura ambiente (en microcentrifuga), y el sobrenadante que contenía los plásmidos se guardó a 4°C.

VI. 11 Caracterización de los genes

Mediante análisis de digestión con enzimas de restricción y secuenciación se comprobó la identidad de los genes que se amplificaron. La digestión del DNA se realizó con 0.5 U de cada enzima de restricción, buffer apropiado para cada enzima y 5-10 µL del plásmido (easy prep). Las digestiones se incubaron durante 1-2hrs a 37°C. Posteriormente, se corrieron 10 µL de la digestión más 5 µL de stop mix (ver ápendice) en un gel de agarosa-TBE al 0.8%, junto al marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen), para corroborar que los plásmidos recombinantes posean el gen y que sean del tamaño adecuado. De las colonias bacterianas seleccionadas se hicieron cultivos de 1.5 mL de medio LB

adicionado con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina y se incubaron durante toda la noche a 37°C con agitación para purificar el plásmido por el método de mini prep.

VI. 12 Mini preps (Purificación del plásmido a mediana escala)

Este método permitió la purificación del plásmido con un mayor grado de pureza. Las purificaciones se realizaron utilizando el Kit SV miniprep (Promega). El cultivo bacteriano se centrifugó durante 5min. a máxima velocidad, el precipitado se resuspendió con 250 μL de solución para resuspender, se agregaron 250 μL de solución de lisis y se mezcló muy bien. Posteriormente se agregó 10 μL de proteasa alcalina para eliminar proteínas celulares y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Se agregó 350 μL de solución neutralizante para detener la acción de la proteasa y de la solución de lisis; se centrifugó a máxima velocidad por 10 min en una microcentrífuga a temperatura ambiente.

El lisado obtenido se paso a través de un tubo-columna con una membrana que tiene afinidad por el DNA, por centrifugación a máxima velocidad durante 1 min. Se hicieron dos lavados al tubo-columna con solución la cual contenía etanol, para eliminar las impurezas del DNA. Finalmente el DNA se eluyó con 100 μL de H_2O en un tubo eppendorf y se almacenó a -20°C .

VI. 13 Corroboración de la identidad del gen

Los fragmentos de interés clonados en los plásmidos se enviaron para secuenciación automática por los oligonucleótidos SP6 y T7, en la unidad de **Biología Molecular** del **"Instituto de Fisiología Celular"** de la UNAM. La secuencia resultante se comparó con la secuencia de nucleótidos identificada para cada gen en el banco de secuencia de *E. histolytica*, para comparar que lo que se amplificó era el gen completo y que no poseía ninguna mutación, deleción o inserción introducida por el método de PCR.

VI. 14 Sobre-expresión de las proteínas

Una vez corroborada la identidad del gen amplificado, éste se clonó por digestión con las enzimas de restricción apropiadas en el vector de expresión pET28 (Novagen). El vector pET es un sistema muy eficaz para la clonación y expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. Los genes se clonaron fusionados a una secuencia que codifica para seis histidinas en su extremo amino terminal. Los plásmidos resultantes se emplearon para transformar células BL21 DE3pLysS, que permiten la sobre-expresión del gen blanco. Basado en el promotor T7 del genoma de la bacteria hospedero se introdujo un fragmento de DNA del fago T7 que incluye un promotor lac inducible por IPTG, el cual se encuentra unido al gen que codifica para la RNA polimerasa del fago T7. La síntesis de esta polimerasa se inicia con la adición de IPTG. La T7 RNA polimerasa se une al promotor T7 del plásmido recombinante pET, iniciando la transcripción del gen de interés (Fig.12).

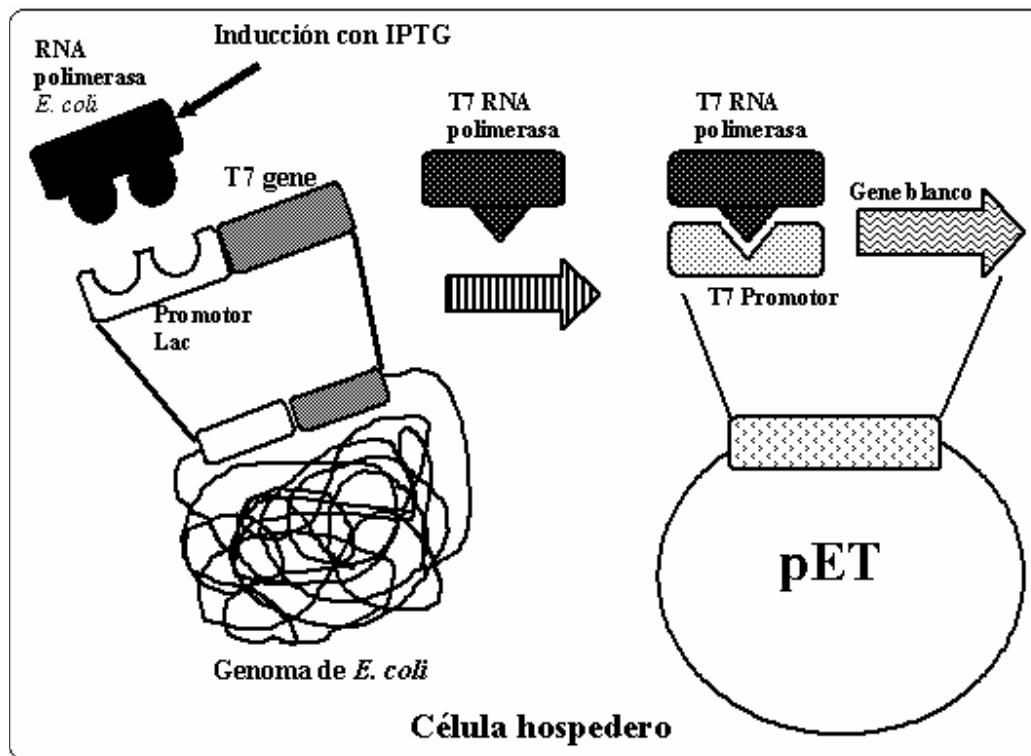


Fig. 12 "Vector pET" para sobre-expresar proteínas en un sistema bacteriano

Se prepararon cultivos líquidos de algunas de las colonias bacterianas de color blanco, en 3ml de medio LB adicionado con 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina y se incubaron a 37°C hasta alcanzar una $\text{O.D.}_{600\text{nm}} = 0.6$, posteriormente se indujo la expresión de los genes blanco con la adición de IPTG (isopropiltiogalactosido) a una concentración final de 0.4 mM. Los cultivos se dejaron incubando toda la noche a temperatura ambiente en agitación para que la proteína se sobre-expresara en forma soluble.

La sobre-expresión de las proteínas se monitoreó por electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS). Se seleccionaron algunas colonias bacterianas que para identificar en cual de ellas se obtenía una mayor sobre-expresión de

la proteína. Una vez identificada la colonia, se escalaron los cultivos de sobre-expresión a 50 mL de medio LB con kanamicina, siguiendo el protocolo de expresión anteriormente descrito. Posteriormente las células se cosecharon a 2450 x g por 10 min y el precipitado celular se resuspendió en 10mL de buffer de lisis que contenía 100 mM trietanolamina-HCl pH 7.4, 300 mM NaCl, 2 mM imidazol y una mezcla de inhibidores de proteasas libre de EDTA (Roche). En el caso de la ALDO y GAPDH se agregó al buffer de lisis 10 mM de β -mercaptoetanol.

Las células se lisaron por sonicación a 4°C (5 pulsos de 1 min a intervalos de 2 min). El lisado celular se centrifugó a 12,000 x g por 15 min. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y el precipitado se resuspendió en 2 mL de buffer de lisis. Alícuotas del sobrenadante y del precipitado se separaron en geles de PAGE- SDS al 12.5% para detectar si la proteína se sobre-expresó de manera soluble (sobrenadante), o si se localizó en el precipitado formando cuerpos de inclusión. Una vez establecido que la sobre-expresión de las proteínas se realizó preferentemente en forma soluble se procedió a la purificación.

VI. 14.1 Purificación de la proteína.

Se realizaron cultivos de 100 mL en medio LB de bacterias que sobre-expresan a las proteínas glucolíticas de nuestro interés, como se describió anteriormente.

Las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad por metales (cobalto) (TALON, Clontech).

El sobrenadante del sonicado de las bacterias que sobre-expresan las enzimas recombinantes, se agregó a 1 mL de resina acoplada a cobalto previamente equilibrada con buffer de lisis y se incubó en agitación por 20 min. Posteriormente, la mezcla (sobrenadante y resina), se centrifugó a 1 250 x g por 5 min para recuperar la resina y se desechó el sobrenadante (lo que no se pegó a la columna), del cual se tomó una alícuota para verificar que la proteína se encontrara pegada a la columna. La resina con la proteína unida se lavó tres veces con 10 mL de buffer de lisis que contenía una concentración de imidazol de 2 mM (lavado 1,2 y 3). Después se hizo un lavado con 10mL de buffer de lisis con una concentración de imidazol de 10mM (lavado 4), y finalmente la proteína se eluyó con 5 mL de buffer de lisis con una concentración final de imidazol de 100 mM y se recuperaron 5 fracciones de 1 mL de cada una de las proteínas purificadas.

VI. 15 Almacenamiento de las proteínas recombinantes.

Las proteínas recombinantes recién purificadas se almacenaron en diferentes alícuotas en presencia de glicerol a una concentración final de 50% a 4° C y -20°C y en 3.2 M de sulfato de amonio a 4°C. La estabilidad de las proteínas se determinó midiendo las actividades enzimáticas a diferentes intervalos de tiempo. De esta manera se pudo identificar la mejor condición de almacenaje.

VI. 16 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

Se utilizó el método de Laemmli (Laemmli, 1970) para separar proteínas de acuerdo a su peso molecular en condiciones desnaturizantes. Este método se basa en que el SDS desnaturiza a las proteínas y les confiere carga negativa, permitiendo de esta manera que migren hacia la carga positiva (ánodo) debido únicamente a su peso molecular. El SDS enmascara la carga intrínseca, de modo que las proteínas tratadas tienden a exhibir idénticas relaciones carga-masa y formas semejantes (Voet, 1999).

Se prepararon geles desnaturizantes de poliacrilamida-SDS al 12.5% (Gel separador: 12.5% de poliacrilamida, 25% de buffer de separación, 0.15% de persulfato de amonio, 0.06% de TEMED, gel concentrador: 25% de buffer concentrador, 17% de poliacrilamida, 0.15% de persulfato de amonio, 0.14% de TEMED). Las muestras de proteínas se mezclaron con buffer muestra (2x SDS Gel-loading buffer: 100 mM tris-HCl pH 6.8, 0.2% azul de bromofenol, 20% glicerol, 200 mM β -mercapto-etanol) y se hirvieron durante 5 min en baño maría. Las muestras se sometieron a electroforesis a 150 volts por 1hr. El gel se tiñó con azul de Coomassie (solución teñidora) y posteriormente se destiñó (ver la sección de buffers para la

composición de estas soluciones). El resultado se observó a través de luz blanca.

VI. 17 Determinación del grado de pureza de las proteínas recombinantes

A partir del gel PAGE-SDS desnaturalizante se determinó el grado de pureza de las proteínas purificadas mediante análisis densitométrico.

VI. 18 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), a partir de alícuotas de proteínas precipitadas con TCA a una concentración final del 13%, esto con el fin de eliminar la interferencia del imidazol en la cuantificación. Se tomaron aproximadamente 20 μL del sobrenadante del extracto bacteriano y 174 μL de la proteína purificada. Se precipitaron las muestras con TCA toda la noche a -20°C . Posteriormente se centrifugaron dos veces a 20,379 g durante 10min a 4°C , para eliminar el TCA. El precipitado se resuspendió en 100 μl de SDS 5% y se procedió a realizar la cuantificación de las proteínas.

Se realizó una curva patrón con albúmina de suero de bovino (BSA) con concentraciones de 0, 20, 40, 60 y 80 μg llevados a 100 μL con H_2O . Posteriormente a todas las muestras se les agregó 1 mL de mezcla (sol. A: sol. B 1:50, ver descripción de apéndice), se vortexeó y se incubó por 10 min. a temperatura ambiente. Después se agregó 100 μl del reactivo de Folin 1:2 y se incubó de 15 - 30 min a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia de cada muestra a 660 nm. Se construyó la curva patrón de absorbancia versus

concentración de BSA y se ajustó por regresión lineal. Las absorbancias obtenidas a partir de las muestras de las proteínas se interpolan a la absorbancia de la curva patrón para determinar la concentración de proteína de las enzimas purificadas.

VI. 19 Determinación de parámetros cinéticos

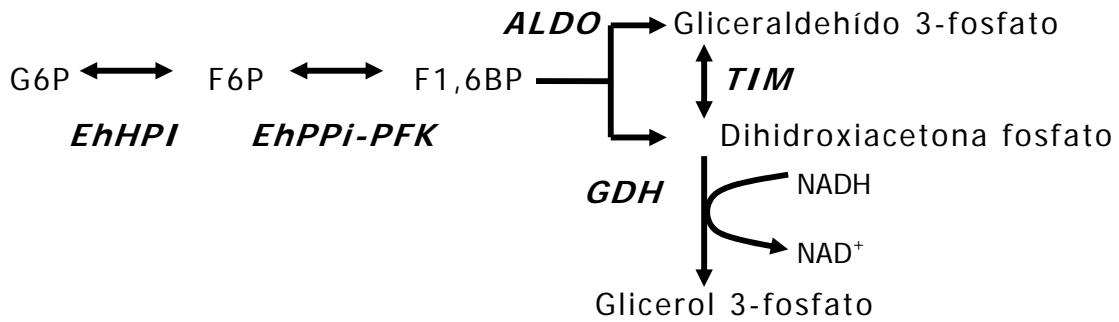
Una vez purificadas las proteínas se determinaron los parámetros cinéticos K_m y V_{max} con ensayos acoplados con otras enzimas comerciales utilizando metodologías estándares modificadas (Bergmeyer, 1983). En dirección directa (glucólisis) e indirecta (glucógenolisis), debido a que las cuatro enzimas son reversibles. (Fig. 5). La reducción de NAD^+ y $NADP^+$ o la oxidación de $NADH$ Se midió a 340nm en un espectrofotómetro. El buffer de incubación (buffer mix) es una mezcla de 50 mM imidazol, 10 mM de acetato, 10 mM MES, 10 mM Tris, el pH se ajustó como se indica para cada enzima. La reacción directa de EhPGK se midió en buffer de 50 mM de fosfato de potasio, 10 mM de acetato, 10 mM MES y 10 mM Tris.

La determinación de la dependencia al pH se realizó ajustando el buffer a intervalos de 0.25 – 0.5. Los parámetros cinéticos se determinaron a pH óptimo para cada enzima, así como a pH 6.0 y 7.0 debido a que existe un único reporte donde se menciona que el pH citosólico de *E. histolytica* es cercano al pH del medio de cultivo que es de 6.5 (Aley, *et al.* 1984). Las reacciones fueron iniciadas con la adición del sustrato específico para cada enzima. Los valores de K_m fueron calculados por la ecuación de inhibición por sustrato de Michaelis-Menten; usando el programa Microcal Origin.

A continuación se describen los componentes del medio para los ensayos enzimáticos.

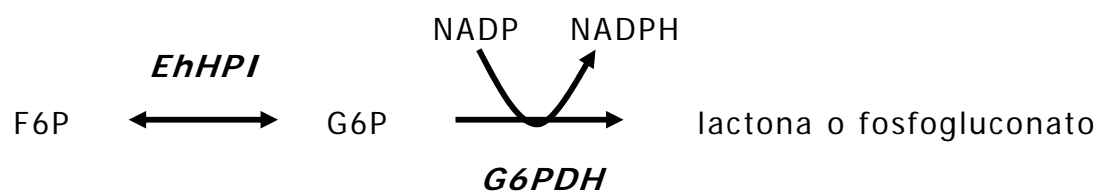
***Hexosa 6-fosfato isomerasa**

Reacción directa



Las condiciones del ensayo enzimático para la determinación de la *Vmax* y *Km* para los diferentes sustratos son: Buffer mix pH 6.0, 7.0 y 8.0, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0.15 mM NADH, 1 - 1.5 U PPI-PFK, 0.36 - 0.45 U Aldolasa (Roche), 1.5 - 3 U de α -glicerofosfato deshidrogenasa 4.5 - 9 U triosa fosfato isomerasa (mezcla TIM-GDH Roche), 1 mM PPI y glucosa 6-fosfato (G6P) variando la concentración entre 0.1 - 8 mM. La reacción se inició con la adición de 0.19 - 0.23 U de EhHPI.

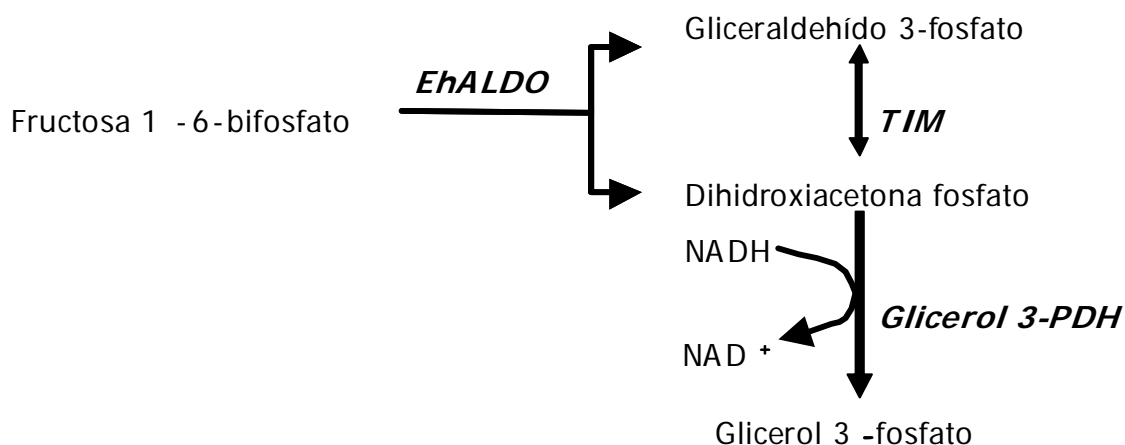
Reacción reversa



Buffer mix pH 6.0, 7.0 y 8.0, 5 mM MgCl_2 , 0.5 mM NADP^+ , 2 U glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH Roche), 5 mM fructosa 6-fosfato (F6P). La reacción se inició con la adición de 0.19 - 0.23 U EhHPI. Para determinar el valor de K_m por F6P se varió la concentración de este sustrato entre 0.1 - 8 mM.

***Aldolasa**

Reacción directa



Las condiciones del ensayo enzimático: Buffer mix pH 6.0 y 7.0, 0.15 mM NADH, con o sin 0.2 mM CoCl₂, 1.5 - 3 U α -glicerofosfato deshidrogenasa (α GPDH, Roche), 4.5 - 9 U triosa fosfato isomerasa (mezcla TIM-GDH, Roche) y 0.5 mM fructosa 1,6-bisfosfato (F1,6P₂). La reacción se inició con 0.044 - 0.2 U EhALDO. El valor de *Km* se determinó variando la concentración de F1,6P₂ entre 0.008 - 2 mM. El efecto de metales divalentes se determinó por ensayos cinéticos a pH 7.0 en presencia de 0.1 mM EDTA y variando las concentraciones de los metales divalentes

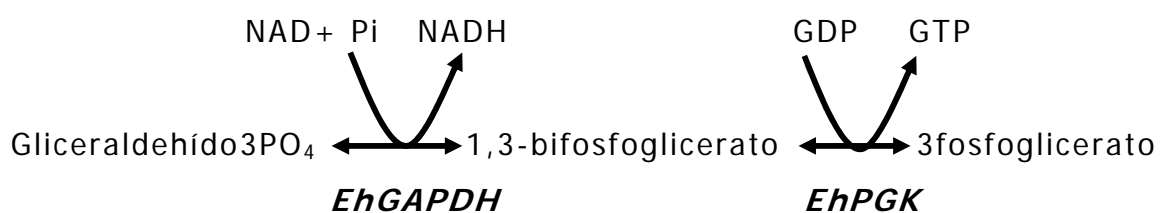
Reacción reversa

Buffer mix pH 6.0 y 7.0, 15 mM MgCl₂, 1 mM NADP⁺, 0.5 mM CoCl₂, 2 - 4 U G6PDH; 6 - 8 U EhHPI, 0.5 - 1 U EhPPi-PFK, 10 mM Pi, 2 mM dihidroxi-acetona fosfato (DHAP), 0.55 mM G3P y 0.044 - 0.2 U de EhALDO. La reacción se inició con la adición de G3P. Para determinar los valores de *K_m* por G3P y DHAP se varió la concentración de estos sustratos entre 0.009 - 2.7 mM y 0.05 - 3 mM respectivamente.

****Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa***

Reacción directa

Las condiciones del ensayo enzimático: Buffer mix pH 6.0, 7.0 y 8.0, 10 mM arsenato (AsO_4), 5 mM cisteína, 1 mM gliceraldehído 3-fosfato, 1 mM NAD^+ . La reacción se inició con 0.11 – 0.18 U de EhGAPDH. El valor de K_m se determinó variando la concentración de G3P entre 0.07 - 2.0 mM.

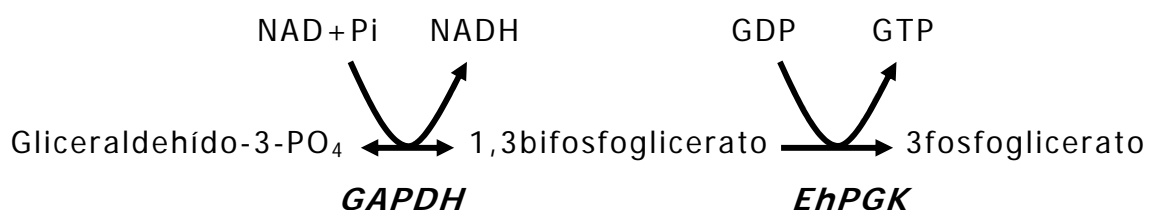


Reacción reversa

Buffer mix pH 6.0, 7.0 y 8.0, 5 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 0.15 mM NADH, 20 mM cisteína, 0.6 mM GTP, 2 - 4 U de EhPGK y 0.24 – 0.4 U EhGAPDH; se inició la reacción con 5 mM 3-fosfoglicerato. La concentración de 3PG usada para determinar el valor de K_m varió entre 0.1-10 mM; la concentración de 1,3 BPG presente en cada concentración de 3PG fue calculada usando la K_{eq} de 1320 para la reacción de la PGK.

***Fosfoglicerato cinasa**

Reacción directa



Buffer de 50 mM fosfato de potasio con 10 mM acetato, 10 mM MES y 10 mM Tris a pH 6.0 y 7.0; 5 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0.5 mM NAD^+ , 1.6 - 3.2 U GAPDH comercial, 0.1 - 0.15 U EhPGK, se agregó justo antes del ensayo 3 mM gliceraldehído 3-fosfato. La reacción se inició con la adición de 0.75 mM GDP. Para determinar el valor de K_m por G3P, la concentración del sustrato se varió entre 0.02 - 3.0 mM. La concentración de 1,3 BPG presente en cada concentración de G3P fue calculada usando una K_{eq} de 0.086. Para determinar el valor de K_m por los nucleótidos, la concentración de GDP se varió entre 0.02 y 2.0 mM y para ADP entre 0.1 y 6.0 mM.

PGK reacción reversa

Buffer mix pH 6.0 y 7.0; 5 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0.15 mM NADH, 1.6 - 3.2 U GAPDH comercial, 0.6 mM GTP, 0.03 - 0.04 U EhPGK, La reacción se inició con 2 mM 3-fosfoglicerato. Para determinar el valor de K_m por los sustratos se utilizaron los siguientes intervalos de concentración: 3PG 0.1 - 4.0 mM; GTP 0.05 - 1.0 mM y ATP 0.5 - 7.0 mM.

VI. 20 Estructura cuaternaria

El peso molecular de las enzimas recombinantes de *E. histolytica* se determinó por cromatografía de exclusión molecular usando un equipo de FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography, BioRad). Las enzimas (0.6 - 1.5 mg) fueron filtradas a través de una columna Sephacryl S-200 (56 x 1.7 cm) con flujo de 0.66mL/min en un buffer que contenía HEPES 10 mM a pH 7.0. Para la curva de calibración se utilizaron los siguientes marcadores de peso molecular (Amersham): azul dextrán (2×10^6 Da), ferritina de bazo de caballo (440 kDa), catalasa de hígado de bovino (232 kDa), aldolasa de músculo de conejo (158 kDa), albúmina de suero bovino (66 kDa), quimotripsinogeno A de páncreas de bovino (25 kDa), ribonucleasa A de páncreas de bovino (13.7 kDa) y vitamina B12 (1.7 kDa). El coeficiente de distribución (K_{av}) el cual se obtiene de la siguiente manera:

Ecuación 1

$$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$$

Donde:

V_e = volumen de elución de la proteína (volumen al cual sale la muestra)

V_o = volumen vacío (volumen de elución del azul dextran (59 mL))

V_t = volumen total (volumen total de la columna (127 mL)).

El volumen de elución se determinó midiendo el cambio la absorbancia a 280nm y la actividad enzimática de cada fracción.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parte de estos resultados están publicados en: Saavedra, E., **Encalada, R.**, Pineda, E., Jasso-Chávez, R. and Moreno-Sánchez R. (2005) Glycolysis in *Entamoeba histolytica*. Biochemical characterization of recombinant glycolytic enzymes and flux control analysis. *FEBS J* **272**, 1767-1783. (Anexo)

VII. 1 Identificación de los genes en el banco de secuencias de *Entamoeba histolytica*

Habiendo realizado la búsqueda en el banco de secuencias traducido del proyecto de secuenciación del genoma de amiba; utilizando como sonda las secuencias de aminoácidos de las enzimas glucolíticas de otros organismos; se logro identificar las secuencias de los genes que codifican para las proteínas a estudiar. La comparación de la secuencia de aminoácidos y los análisis filogenéticos para algunas de las enzimas de *E. histolytica* de nuestro interés ya han sido descritos: HPI (Henze, *et al.* 2001), ALDO (Sánchez, *et al.* 2002) y GAPDH (Henze, *et al.* 1995). Los porcentajes de similitud e identidad de estas enzimas amibianas, comparados con los de otros organismos se muestra en la tabla 1. La EhALDO se agrupa con las aldolasas clase II (metaloenzimas) en los análisis filogenéticos descritos por Sánchez (2002). Esta clase de enzimas requieren de un metal pesado (Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+}) como cofactor y se localizan en bacterias, hongos y algunos protozoarios; mientras que las aldolasas tipo I no requieren de este cofactor y están presentes en bacterias, protozoarios, animales y plantas (Horecker, 1972).

Tabla 1. Porcentajes de similitud e identidad de los genes que codifican para las enzimas glucolíticas de *E. histolytica* de nuestro interés*.

Enzima	Organismo	% identidad	% similitud
HPI	Humano	59	75
ALDO clase II	Bacterias, cianobacterias, protozoarios	60	80
GAPDH	Vertebrados, plantas	66	76 – 80
PGK	Bacterias, levaduras, vertebrados	46 -57	63 - 70

* Los datos fueron obtenidos a partir de la búsqueda blastp de la herramienta búsqueda del nombre del gen en la base de datos del genoma de *E. histolytica* (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/eha1/>). Las secuencias de las enzimas presentaron altos porcentajes de similitud e identidad cuando se compararon con otros grupos filogenéticos.

A continuación se muestra la secuencia completa de cada uno de los genes y la secuencia de aminoácidos correspondiente a cada enzima.

Secuencia de la Hexosa fosfato isomerasa.

>EhHPI

```

1   -ATGTTACCAACTCTTCCTGAATATAAAGCTCTTGAAGCAAAGTATGAACAAATGAAAACA-   60
    M L P T L P E Y K A L E A K Y E Q M K T
61  -TTTGTTATGAAAAGAAGCATTTAGTAAAGATCCAGAACGATTTAAAAAGTTTTCACTTCAA-   120
    F V M K E A F S K D P E R F K K F S L Q
121 -TTTGAAGATATTTTTGTAGATTATTCAAAGAACCTTATTGATGAAGAAACAATGAAACTT-   180
    F E D I F V D Y S K N L I D E E T M K L
181 -TTAATTAATTTATGTGAAGCAGTTCATTTAAAAGAAAAAATTGAAGCAGAATTTACAGGA-   240
    L I K L C E A V H L K E K I E A E F T G
241 -GTTAAAATTAATACTACAGAAAAAAGAGCAGTTCCTTCATACAGCACTTAGAAATAGAAGT-   300
    V K I N T T E K R A V L H T A L R N R S
301 -AATAATCCAGTACTTGTGGATGGAAAAGATGTTATGCCAGGTGTTAATGCAGTTCCTAAT-   360
    N N P V L V D G K D V M P G V N A V L N
361 -AAAATGGGAAAAATTTGCAGAAGGAGTAAGAAATGGAAGTATTAAGGATATACTGGTAAA-   420
    K M G K F A E G V R N G S I K G Y T G K
421 -GAATTTACAGACATTGTTAATATTGGAATTGGAGGAAGTGATCTTGGACCTGTTATGGTT-   480
    E F T D I V N I G I G G S D L G P V M V
481 -ACAGAAGCACTTAAATATTATCAACATGAACGATTAACACTTCATTATGTTTCAAATGTT-   540
    T E A L K Y Y Q H E R L T L H Y V S N V
541 -GATGGAACACATATGGTAGAAGCTTTAAAGAAATGTAATCCCGAAACTACACTTTTTGTT-   600
    D G T H M V E A L K K C N P E T T L F V
601 -ATTTGTTCAAAAACATTTACAACAGCTGAAACATTAATGAATGCACATTCTGCACGTA-   660
    I C S K T F T T A E T L M N A H S A R K
661 -TGGTTTGTAGAAAAAACAGGAAATGAAGAAGCAGTTTCAAAAACATTTTGTAGCAGTATCA-   720
    W F V E K T G N E E A V S K H F V A V S
721 -ACAAATGCAACAGAAGTTTCTAAATTTGGTATAAATACAGATAATATGTTTGAATTTTGG-   780
    T N A T E V S K F G I N T D N M F E F W
781 -GATTGGGTTGGAGGAAGATATTCACCTTGGAGTGCTATTGGATTGACTATTATGATTTCT-   840
    D W V G G R Y S L W S A I G L T I M I S
841 -ATTGGAGAACAAGGATTTCTTGATCTTCTTTCAGGAGCACATGCTATGGATAAACATTTT-   900
    I G E Q G F L D L L S G A H A M D K H F
901 -AGAAATACAGAATTTGCACATAATATCCAGTTATACTTGCTGTTCTTGGAGTATGGTAT-   960
    R N T E F A H N I P V I L A V L G V W Y
961 -AATAATTTATATCAAGCACAATCACATGCTATTCTCCATATGATCAATATCTTCATAGA-   1020
    N N L Y Q A Q S H A I L P Y D Q Y L H R
1021 -TTTGCTGCTTATTTCCAACAAGGAGATATGGAAAGTAATGGTAAAAGAATTACTAAAGAT-   1080
    F A A Y F Q Q G D M E S N G K R I T K D
1081 -GGAAAAGTAGTTAATTATACTACTGGTCCAATTATTTGGGGAGAACCAGGAACCTAATGGA-   1140
    G K V V N Y T T G P I I W G E P G T N G

```



```

1141 -CAACATGCATTTTATCAACTTCTTCATCAAGGAACTAAATTAATTCCAGCAGATTTTATT- 1200
      Q H A F Y Q L L H Q G T K L I P A D F I
1201 -ATTCCAGCAAATAGTTTAAATCCAATTGGAAAACATCATACTGTTCTTTTAGCTAATTTT- 1260
      I P A N S L N P I G K H H T V L L A N F
1261 -ATTGCACAAACAGAAGCATTAATGATGGGTAAAACCTGAAGAACAAGTTATTGGAGAATTA- 1320
      I A Q T E A L M M G K T E E Q V I G E L
1321 -AAAGCAACAGGTATGTCAGATGAACGTATTAAGAAGTCTTCCACATAAATTATCCCA- 1380
      K A T G M S D E R I K E L L P H K L F P
1381 -GGAAATAGACCAACTAATCTATTGTTTTTAAGAAAATGACACCATATGTACTTGGTTCA- 1440
      G N R P T N S I V F K K M T P Y V L G S
1441 -TTAATTGCTATGTATGAACATAAAATATTTGTTCAAGGATGTATTTGGAATGTTAATTCA- 1500
      L I A M Y E H K I F V Q G C I W N V N S
1501 -TTTGATCAATGGGGAGTTGAACTTGGAAAACAACCTTGCTAAAGCAGTTGAAAAAGATCTT- 1560
      F D Q W G V E L G K Q L A K A V E K D L
1561 -GAAGCAGAAGGTCTTGTTAATAAACATGATGGTTCTACAAGTGGACTTATTAATCTTGTT- 1620
      E A E G L V N K H D G S T S G L I N L V
1621 -AAAGATATGAGAAAAAAC - 1638
      K D M R K N *

```

La secuencia obtenida, constituyó el gen completo de EhHPI se corroboró la secuencia con las de enzimas homólogas en otros organismos, y posee las siguientes características: codifica para una proteína de 546 aa, el peso molecular calculado es de 61.3 kDa. Los porcentajes de similitud e identidad se muestran en la tabla 1.

Secuencia de la aldolasa

>EhAldolasa

```
1 - ATGGCTGCTAAGACTGTAACTATAAAGAAGCTTGGACTTTGTAATCACAAAGAAATGTTT - 60
    M A A K T V N Y K E L G L C N H K E M F
61 - GAACATGCTATTAAGGAGGATTTGCTGTTCCAGGTTTTAACTTCAATAACCTTGAACAA - 120
    E H A I K G G F A V P G F N F N N L E Q
121 - ATGCAAGCTATTATTCAAGCATGTACTGAAGCTAAATCACCAGTTATTCTTCAAGTATCA - 180
    M Q A I I Q A C T E A K S P V I L Q V S
181 - AAAGGAGCACGTGAATATGCTAATGCTACTCTTTTGAGAAATCTTGCTAAAGGAGCTGTT - 240
    K G A R E Y A N A T L L R N L A K G A V
241 - GAATATTCAAAAGAAATGATCCAGAACATAAAGGTGTTCCAATTTCACTTAACCTTGAC - 300
    E Y S K E I D P E H K G V P I S L N L D
301 - CATGGAGCTAACTTCCAAATTTGTAAAGAATGTGTAGATAACGGATTCTCTAATGTTATG - 360
    H G A N F Q I C K E C V D N G F S N V M
361 - ATTGATGGATCAGCACTTCCATATGAAGAGAATGTTAAATTAACAAAACAAGTTGTTGAA - 420
    I D G S A L P Y E E N V K L T K Q V V E
421 - TATGCACATAAAATTTGGAGTTACTGTTGAAGGAGAACTTGGAGTTCTTTCAGGAGTTGAA - 480
    Y A H K F G V T V E G E L G V L S G V E
481 - GATGATGTTGCAGCAGCAGAACATGTATTTACTGATCCAAAGGATGTTGAAGCATTGTT - 540
    D D V A A A E H V F T D P K D V E A F V
541 - AAAGACACAGGAGTAGATGCACCTTGCTATTTCAATTGGAACATCACATGGAGCATAACAA - 600
    K D T G V D A L A I S I G T S H G A Y K
601 - TTCAAACCAGGAATGCATCCAAGAATTAGACTTGATATTCTTCATGAAGTTGAAAAGAGA - 660
    F K P G M H P R I R L D I L H E V E K R
661 - ATTCCAGGATTCCCAATGTTCTTCATGGATCATCATCAGTTCCACAAGAATGGGTTGCT - 720
    I P G F P I V L H G S S S V P Q E W V A
721 - GTTATTAATCAATATGGAGGAAAATTAGAATCAGCTATTGGTATTCCAGAAGACCAAATT - 780
    V I N Q Y G G K L E S A I G I P E D Q I
781 - AGAGAAGCTGTAAAGAGTGCTGTCTGTAAAGTCAATATTGATTTCAGATGGTAGACTTGCT - 840
    R E A V K S A V C K V N I D S D G R L A
841 - ATGACAGGATCAATTAGAAGATATCTTGCAGAACATCCAAAGGACTTTGATCCAAGACAA - 900
    M T G S I R R Y L A E H P K D F D P R Q
901 - TATCTTGGACCAGCTAGACAAGCACTTAAGGAATTATACCTTCACAAGGTTTCAGACAAG - 960
    Y L G P A R Q A L K E L Y L H K V S D K
961 - GTTTTGAAGCTCAGCAGGAAAATCATGGTATTAA - 993
    V L N S A G K S W Y * X
```

Para el caso de la EhALDO se obtuvo la secuencia de nucleótidos y aminoácidos y se comparó con aldolasa de otros organismos con lo que se obtuvo que la enzima está completa. Así mismo, se identificó que es una aldolasa tipo II que requiere de metales divalentes para su actividad (metaloenzima). La secuencia codifica para 331 aa y corresponde a un P.M. de 36 kDa. Esta secuencia posee un 60% de identidad y 80% de similitud con respecto a las aldolasas clase II de bacteria, cianobacterias y protozoarios

Secuencia de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

>EHGAPDH

```
1 - ATGTCAATTAAGGTCGGTATTAATGGTTTTGGAAGAATTGGAAGACTCGTTGCTAGAGTC - 60
    M S I K V G I N G F G R I G R L V A R V
61 - GTTCTTGAAGAAAAGATTTTGAATTAGTTGCTATCAACGATCCATTCATGGATCCAAAA - 120
    V L E R K D F E L V A I N D P F M D P K
121 - TACATGGTTTTACTTATTAATAATGATACCGTCCACAGACAATTCGAAGGAACTGTTGAA - 180
    Y M V Y L L K Y D T V H R Q F E G T V E
181 - GCTGGAGAAAATGCCATTATTGTTAATGGACACAAGATTGTTGTCAAAGCTGAAAGAGAT - 240
    A G E N A I I V N G H K I V V K A E R D
241 - CCAGCTCAAATGGATGGGGAGCACTTGGAGTTGATTATGTTGTTGAATCAACAGGAGTT - 300
    P A Q I G W G A L G V D Y V V E S T G V
301 - TTCACTACTATTCCAAAGGCTGAAGCTCATATTAAGGGAGGAGCTAAGAAAGTTATTATT - 360
    F T T I P K A E A H I K G G A K K V I I
361 - TCAGCCCCATCTGCTGATGCACCAATGTTTGTGTTGGAGTTAACTGAGGCATACAAA - 420
    S A P S A D A P M F V V G V N T E A Y K
421 - CCAGAAATGAACATTATTTCAAATGCATCATGCACAACCAACTGCCTTGCACCACTTGCT - 480
    P E M N I I S N A S C T T N C L A P L A
481 - AAAGTTATTAACAATGAATTTGGAATTGTTGAAGTCTTATGACAACCTATTCATGCTACT - 540
    K V I N N E F G I V E G L M T T I H A T
541 - ACTGCTACTCAAAGACAGTTGATGGACCATCAGGAAAAGATTGGAGAGCTGGTAGATGT - 600
    T A T Q K T V D G P S G K D W R A G R C
601 - GCATGTGCTAACATTATCCAGCTAGCACTGGAGCAGCTAAAGCTGTTGAAAAAGTTATT - 660
    A C A N I I P A S T G A A K A V G K V I
661 - CCATCCCTTAATGGAAAACCTTACTGGTATGTCATTCAGAGTTGGAACCCCAGATGTTTCA - 720
    P S L N G K L T G M S F R V G T P D V S
721 - TGTGTTGATTTAACATGCAGACTTGAAAAAGAAGTAACTGTTGAATCAATTAAGCTGCT - 780
    C V D L T C R L E K E V T V E S I K A A
781 - ATTAAGAAAGCATCAGAAGGAGAAATGAAAGGAATTCTTGGATACTGAAGACCTTGTT - 840
    I K K A S E G E M K G I L G Y T E D L V
841 - GTATCATCAGACTTTGTCCATGATAACAGATCATCAATTTTCGATGCAGCTGCTACTATT - 900
    V S S D F V H D N R S S I F D A A A T I
901 - CTTTTGAACCCACACTTTGTTAAATTAGTTTCATGGTACGATAATGAATGGGGATATTCC - 960
    L L N P H F V K L V S W Y D N E W G Y S
961 - AACAGACTTGTGATCTTATCCAAATCATTCTAAAGTTCACTAA - 1005
    N R L V D L I Q I I S K V H *
```

En el caso de la GAPDH se muestra la secuencia de aminoácidos del gen completo que codifica para 334aa y un peso molecular de 36kDa. Se observa un porcentaje alto de similitud e identidad con la GAPDH de plantas y vertebrados (tabla 1.)

Secuencia de aminoácidos de la fosfoglicerato cinasa.

>EhPGK

```
1 - ATGGGATTTACTAAAAAGAGTCTTGATCAAATTGATGTTAAAGACAAAAGAGTCTTTATG - 60
    M G F T K K S L D Q I D V K D K R V F M
61 - AGAGTTGATTTTAAATGTTCCAATGGAAAAAGGAAAAATTACTAACACTAAAAGAATTGAT - 120
    R V D F N V P M E K G K I T N T K R I D
121 - GCTACTATTCCATCAATTCAATATTGCCTTGATCACGGATGTAAAGCTGTTGTTCTTGCC - 180
    A T I P S I Q Y C L D H G C K A V V L A
181 - TCACATCTTGGAAGACCAGATGGACATGTTGTTCCAGAACTTACTCTTAAACCAGTTGCT - 240
    S H L G R P D G H V V P E L T L K P V A
241 - GAAAAATTAGAAGAAATTCCTAAACATAAAGTTATTTTCTTAAATGACTGTGTGGTGAA - 300
    E K L E E I L K H K V I F L N D C V G E
301 - GAAGTTATTAAGGCTTGTGCTAACCCAGCTCCAGGAAGTGTTATCTTATTAGAAAATGTT - 360
    E V I K A C A N P A P G S V I L L E N V
361 - AGATTCCATCCAGAAGAAGAAGGATCATCAATTGTTGATGGAAAGAAAGTCAAAGCTGAC - 420
    R F H P E E E G S S I V D G K K V K A D
421 - CCAGAAAAGGTTAAAGAATTCAGAGAACAATTAATAACTAAACTTGGTGATGTTTATGTTAAT - 480
    P E K V K E F R E Q L T K L G D V Y V N
481 - GATGCATTTGGAACAGTTCACAGAGCACACTCTACTATGGTTGGTGTTAATTTAAGCCCA - 540
    D A F G T V H R A H S T M V G V N L S P
541 - AAGGTATCAGGATTCCTTGTCAAGAAAGAAGTGGATACTTTGCTAAAGCATTCGATCAT - 600
    K V S G F L V K K E L G Y F A K A F D H
601 - ATCAACAGACCATATCTTGAATCCTTGGAGGAGCTAAGGTTGCTGATAAAATCCCAATT - 660
    I N R P Y L G I L G G A K V A D K I P I
661 - ATTAACAACCTTCCTTGAAGGTTGATCAACTTATTATTTGTGGTGGTATGGCTTATACC - 720
    I N N F L E K V D Q L I I C G G M A Y T
721 - TTCCTTGCTGCTTCAAAGAATATGAAGATTGGTAAATCACTCTTTGATGCTTCAAAGGTT - 780
    F L A A S K N M K I G K S L           F D A S K V
781 - GAAATGTGTAAAGAAGTCTTGTGCTAAGGCTGAAGCTAAGAAAGTTGAAATTCCTTCTCCA - 840
    E M C K E L L A K A E A K K V E I L L P
841 - TTTGATTTTCGTTGCTTGTGATAAATTTGGAGAAGATGCTAACACTCAAATTTGACTCTT - 900
    F D F V A C D K F G E D A N T Q I C T L
901 - GAAGAAGGTATCCCAGAAGGATGGGAAGGTGTTGATTGTGGACCCAAGACTTCTGCTTTA - 960
    E E G I P E G W E G V D C G P K T S A L
961 - TGGAGAGAAAAAATTCCTGCTGCTAAAACAATTATGTGGAACGGACCATGTGGTGTCTTT - 1020
    W R E K I L A A K T I M W N G P C G V F
1021 - GAAATTGATAAATTCCTCAGCTGGAAGTAAAGCTCTTTGTGAAGCTGTTGCTGCTGCTACC - 1080
    E I D K F S A G T K A L C E A V A A A T
1081 - CAAGCTGGTGTGTTTGTACTATTGTTGGTGGTGGAGATACTCCAACAGCTCTTAAGAAATTC - 1140
    Q A G V L T I V G G G D T P T A L K K F
1141 - GGTCTTGACAAACAAGTCAGCCATATCTCAACTGGAGGAGGAGCATCACTTGAACCTTTTA - 1200
    G L D K Q V S H I S T G G G A S L E L L
1201 - CAAGGACTTCCACTTCCAGGTGTTGCTAACCTTGATGATGCTGAATAA - 1248
    Q G L P L P G V A N L D D A E * X
```

Se obtuvo la secuencia completa de aminoácidos de la enzima EhPGK (415aa), con un peso molecular de 44.9 kDa. La secuencia obtenida muestra poseer 63-70% de similitud y un 46-57% de identidad con sus homologas en otros organismos tan diversos como vertebrados, levaduras y bacterias (tabla 1).

VII. 2 Amplificación de los genes

Se amplificaron los genes que codifican para la HPI, ALDO, GAPDH y PGK de *E. histolytica* a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando como templado DNA genómico de *E. histolytica* y los oligonucleótidos descritos en la sección de métodos. La Fig. 13 muestra la electroforesis en gel al 0.8% de agarosa, en donde se observa el amplificado correspondiente para la HPI, ALDO, GAPDH y PGK amibianas

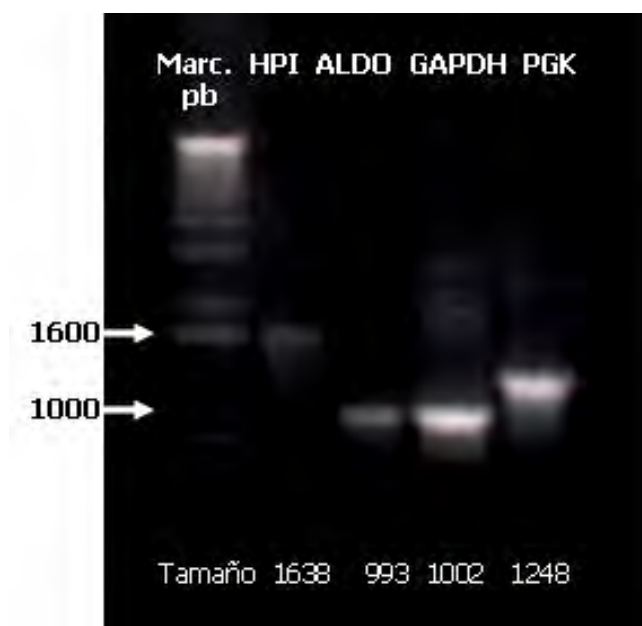


Fig. 13 Corrimiento de los diferentes productos amplificados por PCR.

El peso molecular de los productos de PCR coinciden en con el tamaño de los genes determinado a partir de la secuencia de proteínas homólogas.

Una vez obtenidos los genes, los productos de PCR se clonaron usando el vector pGEM T-easy (Promega, Madison, WI, USA) y ligados por una T4 DNA ligasa. Posteriormente se hizo una transformación en células Top 10. Habiendo obtenido un gran número de copias del plásmido se prosiguió a realizar la extracción del mismo y finalmente se realizó análisis con enzimas de restricción para corroborar el tamaño de inserto. Se secuenciaron los genes obtenidos y se compararon con la secuencia de amiba. No se encontraron modificaciones introducidas por el PCR.

VII. 3 Sobre-expresión de las proteínas.

Después de amplificar el gen completo de las diferentes enzimas glucolíticas y corroborar que no hubiera alguna mutación, los genes se clonaron en el vector pET28 del sistema de vectores pET (Fig. 12). Los plásmidos recombinantes se utilizaron para transformar bacterias *E. coli* de la cepa BL21 De3 pLysS que permiten la sobre-expresión de las proteínas.

Se seleccionaron algunas colonias bacterianas y se realizaron cultivos que se indujeron con 0.4 mM de IPTG para identificar las colonias que sobre-expresen la proteína. La Fig. 14 se presentan geles de PAGE-SDS donde se separaron a los diferentes cultivos bacterianos, se incluyó como control células BL21 DE3 pLysS sin plásmido para corroborar que la banda sobre-expresada sea la proteína de interés y no una banda perteneciente a una proteína de las bacterias (solo para la EhPGK).

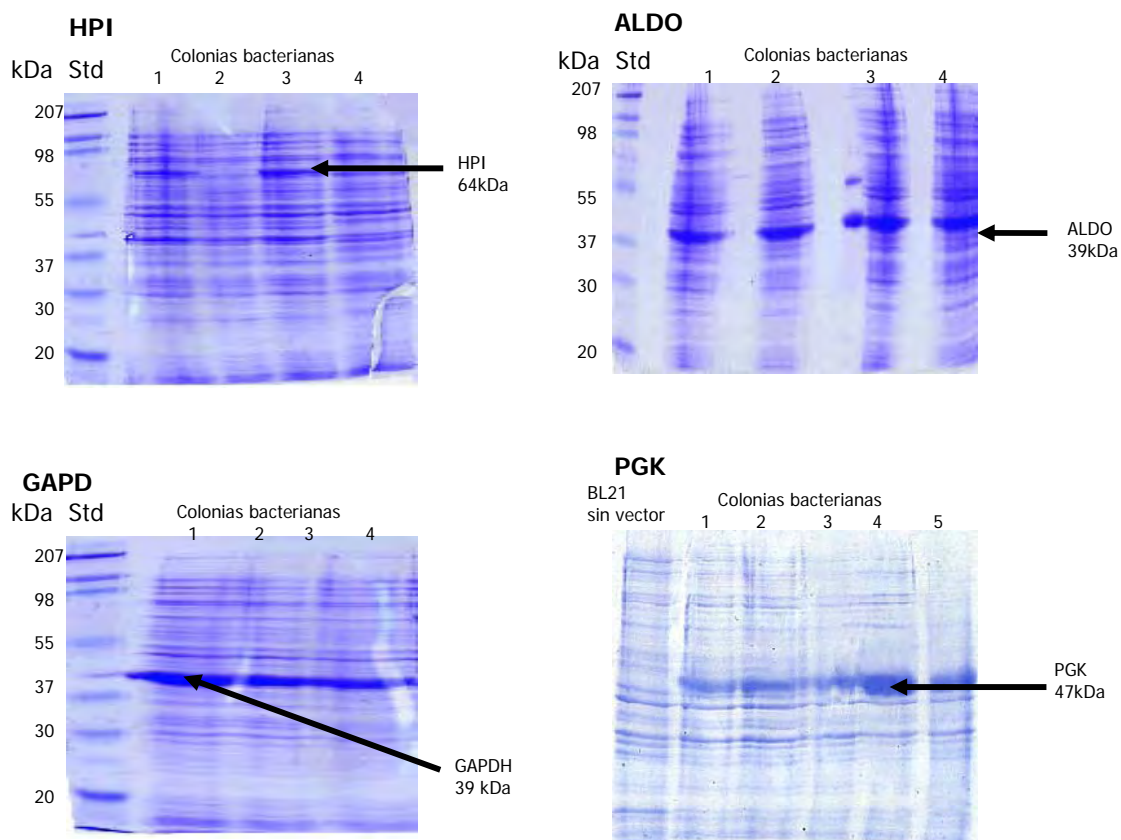


Fig. 14 Gel PAGE-SDS al 12.5%. Sobre-expresión de las proteínas en *E. coli*.

Una vez seleccionada una colonia, se ensayaron las condiciones en las que las proteínas se sobre-expresan de manera soluble (en el sobrenadante (SN)). Se ensayaron inducciones a 37°C y a temperatura ambiente durante toda la noche. Se observó que después de la inducción, el cultivo a temperatura ambiente muestra un incremento en la cantidad de proteína en forma soluble. La Fig. 15 muestra geles SDS-PAGE en los que se puede observar que las proteínas se sobre-expresan preferentemente en la fracción soluble (SN) de los lisados bacterianos y no de forma insoluble (precipitado (PP)), ya que esto indica que las proteínas se fueron a cuerpos de inclusión

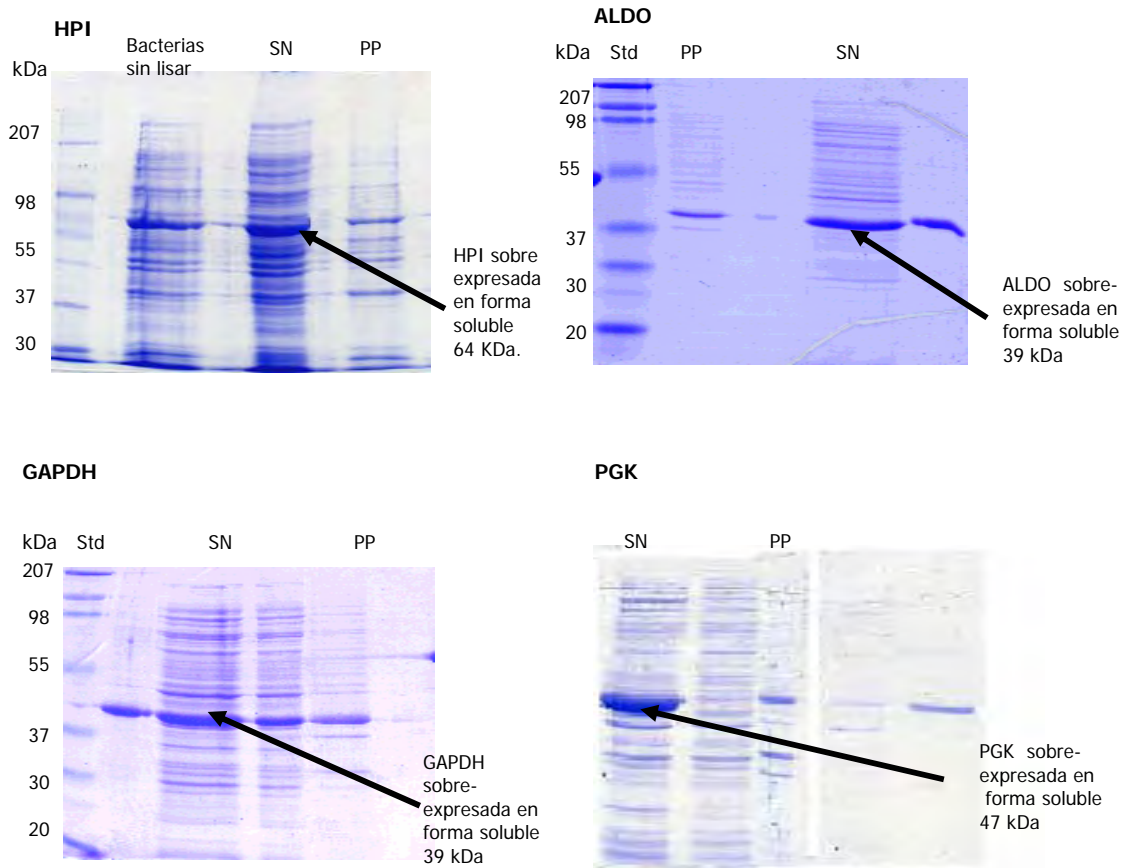


Fig. 15 Gel PAGE-SDS al 12.5%. Las proteínas se sobre-expresaron preferentemente en forma soluble (SN)

VII. 4 Purificación de las proteínas

La Fig. 16 muestra los geles SDS-PAGE, donde se observa la marcha de purificación para las enzimas glucolíticas de nuestro interés. Se observa que la proteína se localiza de manera soluble (en el sobrenadante del extracto clarificado), y que es muy poca la proteína que se encuentra degradada (en el precipitado del extracto clarificado), el carril del FT (Flow through), es una fracción de lo que no se logro pegar a la columna (durante la incubación), en el carril Lav. 1. se observa una fracción del lavado con buffer de lisis con 2 mM imidazol, el carril lav. 4 es una fracción del lavado de buffer de lisis con 10 mM imidazol, donde se puede observar una leve pérdida de proteína. Los siguientes carriles son una muestra de las fracciones de 1 mL de la proteína eluida de buffer de lisis con 100 mM imidazol. Estos geles permiten visualizar la calidad de la preparación de las proteínas purificadas. Para el caso de la ALDO solo se muestra el gel con las fracciones colectadas.

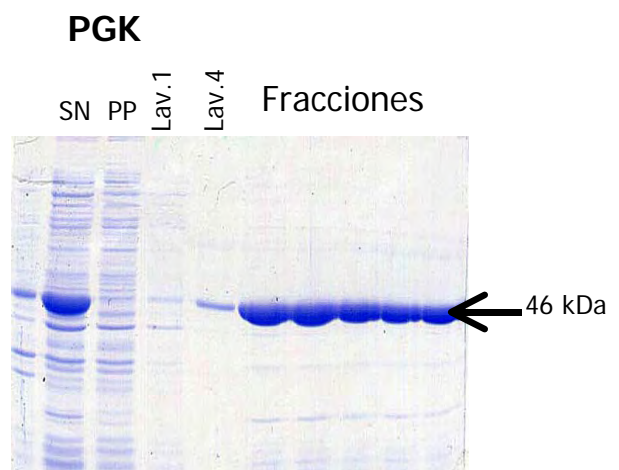
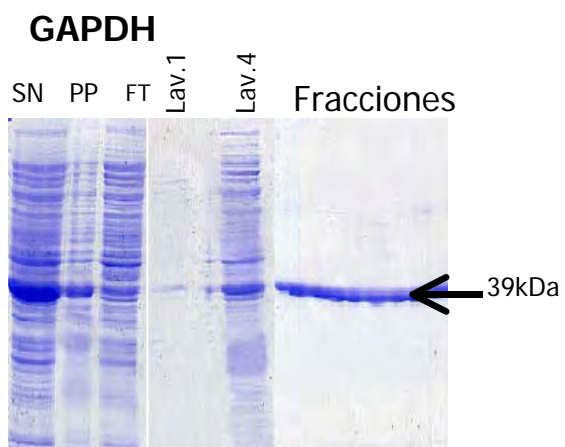
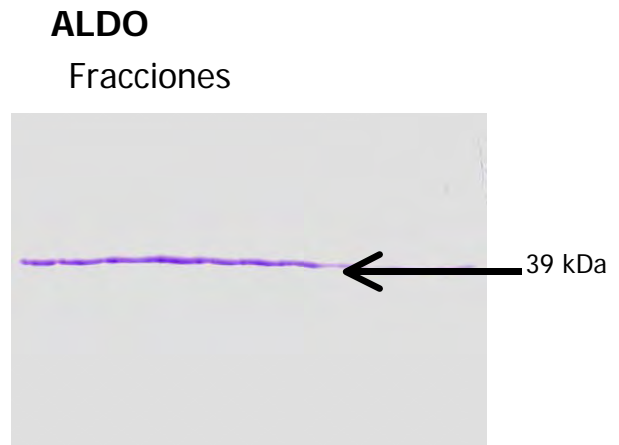
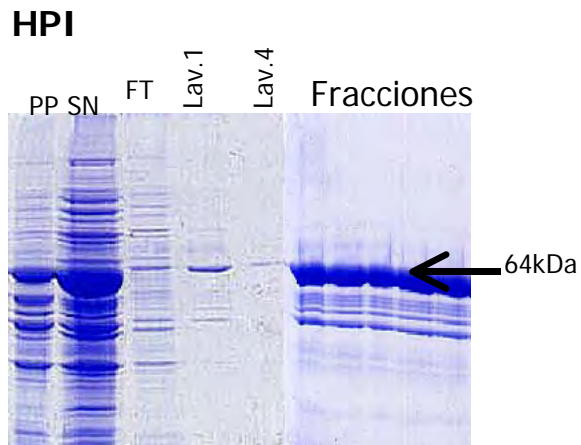


Fig. 16. Marcha de purificación de las cuatro proteínas glucolíticas amibianas

La pureza de las proteínas recombinantes se determinó por análisis densitométrico en un gel SDS-PAGE al 12.5% (Laemmli, 1970) con 8 μ g de cada proteína recombinante (Fig.17). A partir de este gel (Fig. 17), se corroboró el peso molecular de las proteínas purificadas a partir de un marcador de peso molecular. Se observa que las proteínas son mas grandes de lo que se había predicho a partir de la secuencia de aminoácidos obtenida para cada enzima HPI= 60.6 a 63.7 kDa., ALDO= 33.1 a 38.5 kDa., GAPDH= 36 a 38.5 kDa. y PGK= 44.9 a 47 kDa.; debido a la secuencia que codifica para la cola de histidinas en el extremo amino terminal.

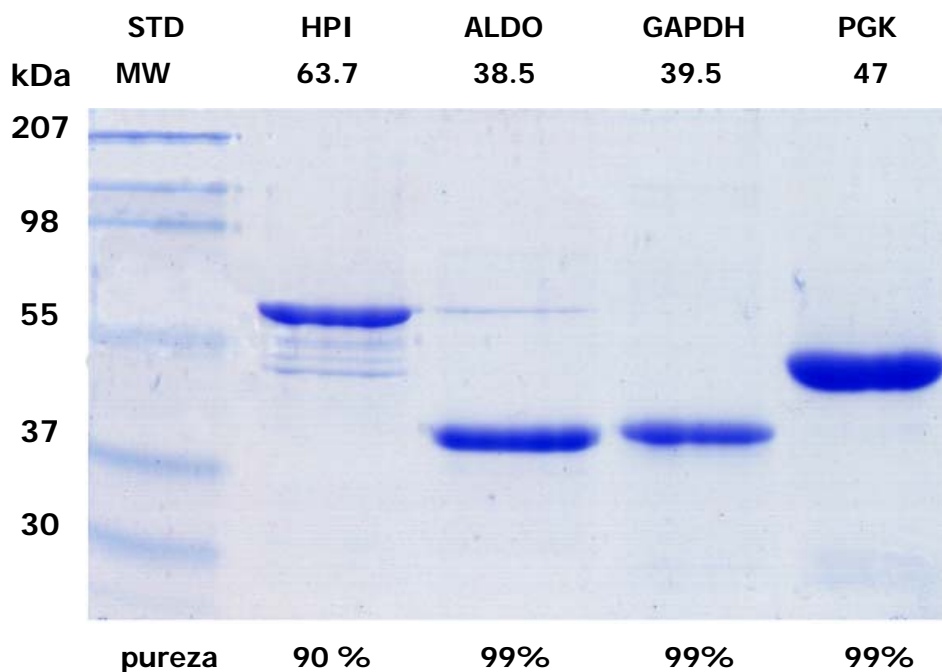


Fig. 17 Gel SDS-PAGE 12.5% con las cuatro enzimas purificadas.

La ALDO, GAPDH y PGK muestran alto grado de pureza (99%) mientras que la HPI muestra un porcentaje de pureza menor debido al triplete de bandas que se observa por debajo de la banda mayoritaria. Estas bandas probablemente no son proteínas contaminantes, sino productos de degradación de la HPI ya que cuando se realizó la electroforesis con las diferentes eluciones de la purificación se observó que dichas bandas mantenían la misma intensidad en todas las fracciones (ver Fig. 16); si estas bandas fueran contaminación se esperaría que disminuyeran a lo largo de la elución.

Posteriormente las proteínas purificadas se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) al 13% y se cuantificaron por el método de Folin (Lowry *et al.*, 1951). Obteniendo una concentración para las proteínas de alrededor de 0.3 y 0.4 mg/mL y un rendimiento de entre 3.0 y 4.0 mg., a partir de un cultivo de 100 mL de bacterias (Tabla 2), esto valores nos indican que las proteínas purificadas se encuentran diluidas.

Enzima	concentración mg/mL	Rendimiento mg
HPI	0.33	3.3
ALDO	0.38	3.8
GAPDH	0.27	2.7
PGK	0.31	3.1

Tabla 2. Concentración promedio y rendimiento total de las proteínas purificadas

VII. 5 Caracterización bioquímica

VII. 5. 1 Determinación del pH óptimo de las enzimas

Una vez obtenidas las proteínas purificadas, se procedió a la caracterización bioquímica de cada una de ellas en ambas direcciones (directa y reversa), mediante ensayos cinéticos acoplados con enzimas comerciales. Primero se determinó la dependencia de la actividad a diferentes pHs, para lo cual se realizaron curvas de titulación de pH contra actividad para cada enzima recombinante (Fig. 18 A, B.)

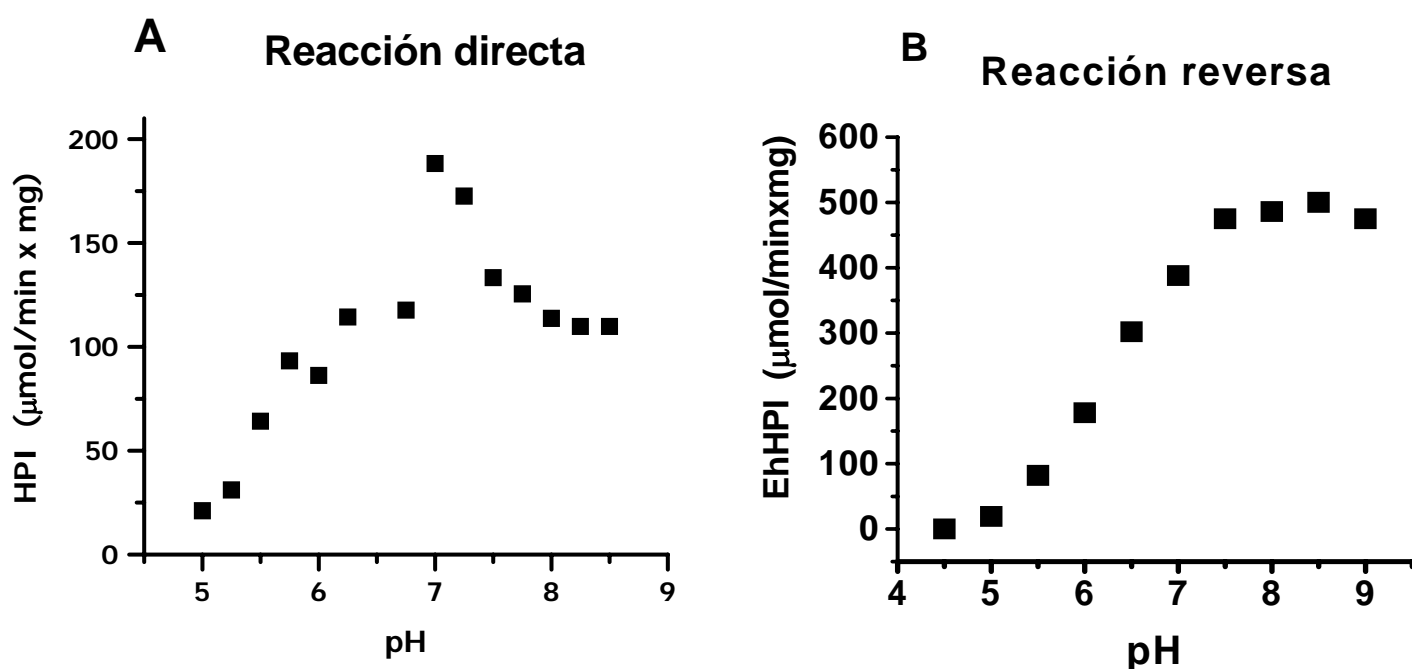


Fig 18. Actividad enzimática a diferentes pHs de la enzima EhHPI **A)** Reacción directa, **B)** Reacción reversa

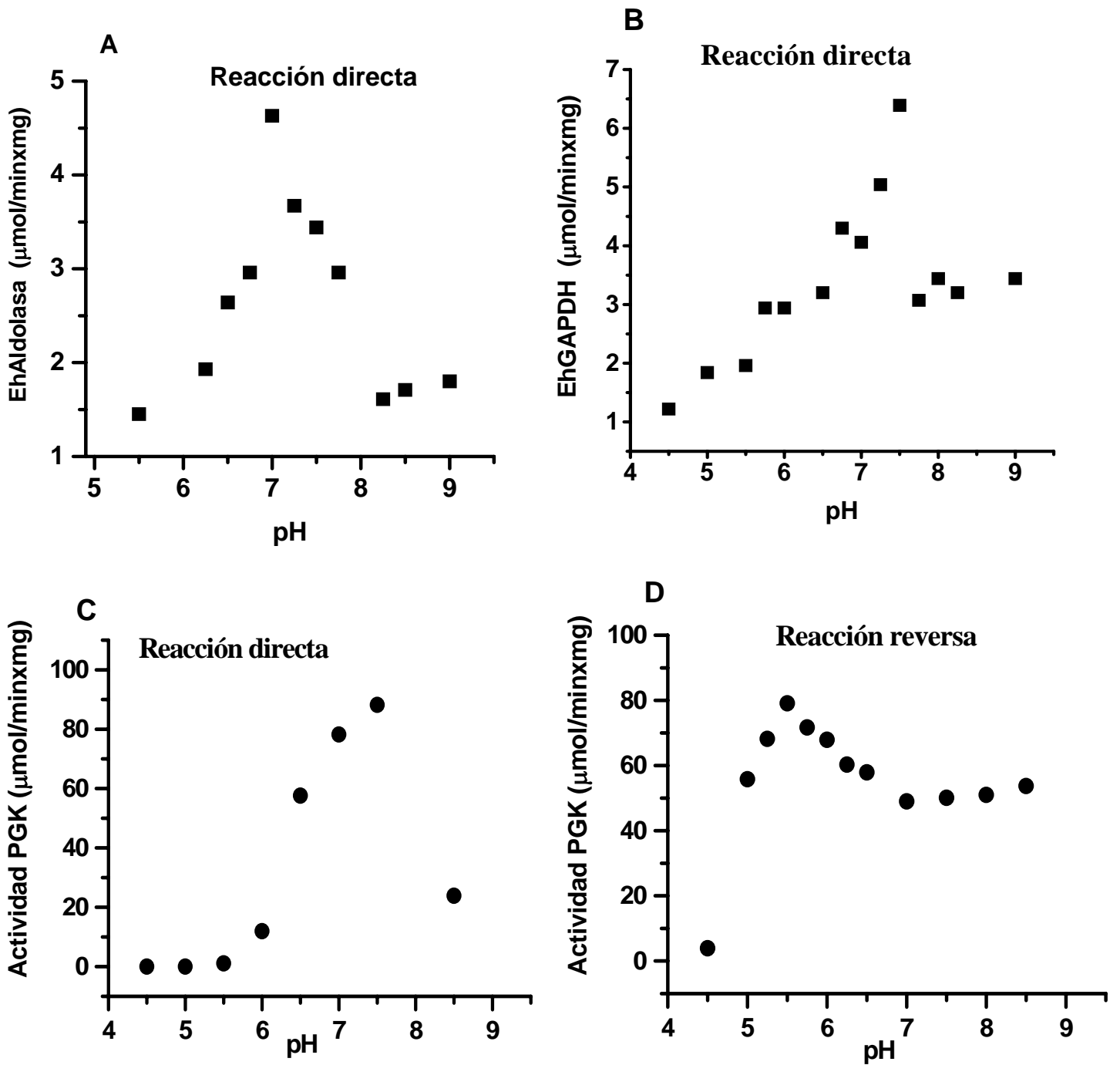


Fig. 19 Curvas de actividad enzimática a diferentes pHs. **A)** Enzima EhALDO reacción directa, **B)** EhGAPDH reacción directa, **C)** EhPGK dirección directa, **D)** EhPGK reacción reversa

La tabla 3 muestra los intervalos de pH donde se obtiene una actividad mayor al 95%.

Tabla 3. Intervalos de pH a los que las enzimas recombinantes de *E. histolytica* son mas activas

Enzima	Intervalo de pH óptimo	
	Reacción directa	Reacción reversa
HPI	6.5 - 8.0	7.5 - 9.0
ALDO	7.0 - 7.5	ND
GAPDH	7.3 - 7.6	5.8 - 6.7
PGK	7.3 - 7.6	5.5 ; 8.5*

ND, no determinado.

*La curva de pH muestra dos picos de actividad a pH 5.8 y 8.0

VII. 5. 2 Estabilidad al almacenamiento

Las proteínas purificadas fueron almacenadas en glicerol a una concentración final del 50% a 4°C y -20°C y en 3.2 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 4°C. Se determinó la actividad remanente de las fracciones para todas las enzimas (Fig. 20) a diferentes tiempos.

Para favorecer la estabilidad de la EhALDO se adicionó 2 mM DTT y 10 μM de F-1,6BP mientras que la GAPDH se almacenó en presencia de 2 mM DTT.

Cabe aclarar que la concentración de proteína a la cual se almacenaron las enzimas purificadas es baja (HPI 0.34mg/mL; ALDO 0.32 mg/mL; GAPDH 0.27 mg/mL y PGK 0.4 mg/mL), por lo que probablemente en soluciones más concentradas de proteína podría incrementarse su estabilidad, sin embargo esto no fue explorado.

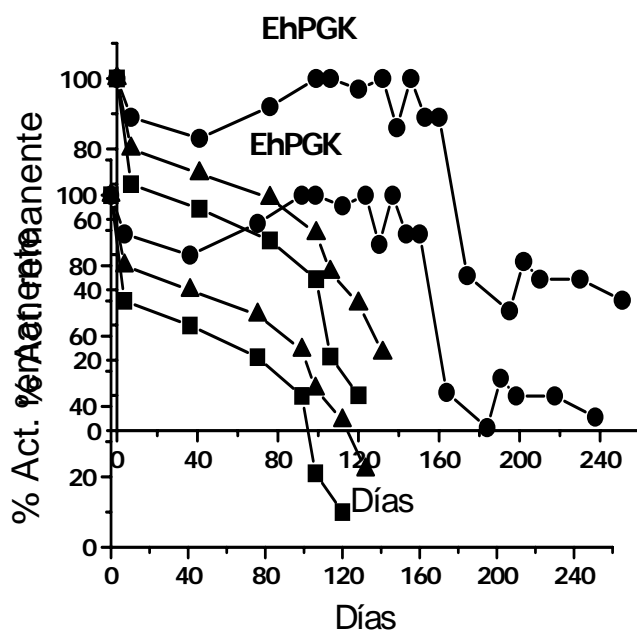
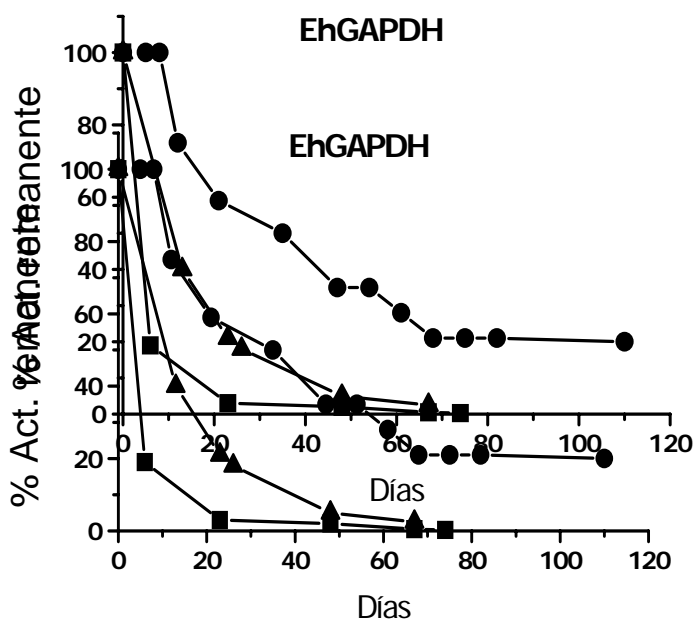
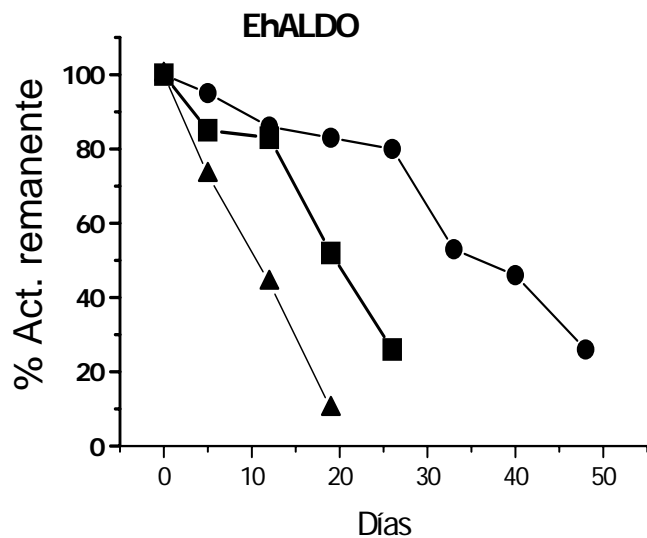
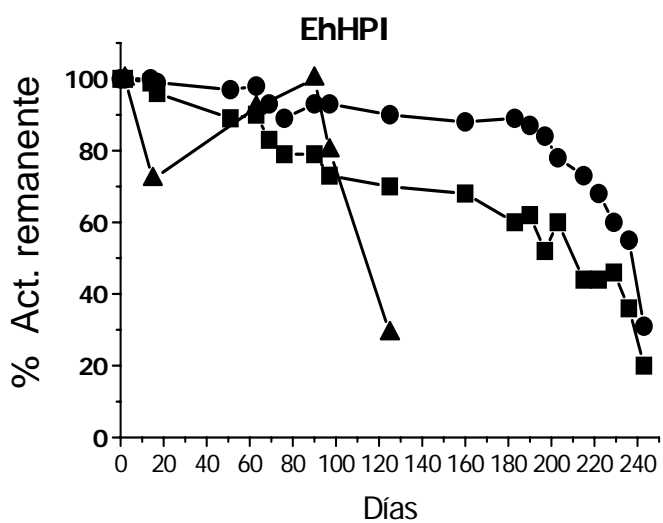


Fig. 20. Estabilidad de las enzimas almacenadas en una concentración final de 50% de glicerol a 4°C (■), -20°C (●) y en 3.2M de sulfato de amonio (▲).

Monitoreando la actividad de las proteínas por varios días se observó que las enzimas almacenadas en glicerol a una concentración final de 50% a 4°C y en 3.2 M de sulfato de amonio pierden el 50% de su actividad más rápido que las proteínas almacenadas en la concentración final de 50% de glicerol a -20°C. (ver Fig. 18). Por lo que esta última condición se estableció como la mejor forma para almacenar a las proteínas.

La figura 21 muestra la gráfica de decaimiento en la concentración final de 50% de glicerol a -20°C, para todas las enzimas. El tiempo en el que presentan el 50 % de su actividad inicial es el siguiente: HPI = 240 días, ALDO = 60 días, GAPDH = 30 días y PGK = 160 días; siendo las más estables la HPI y la PGK.

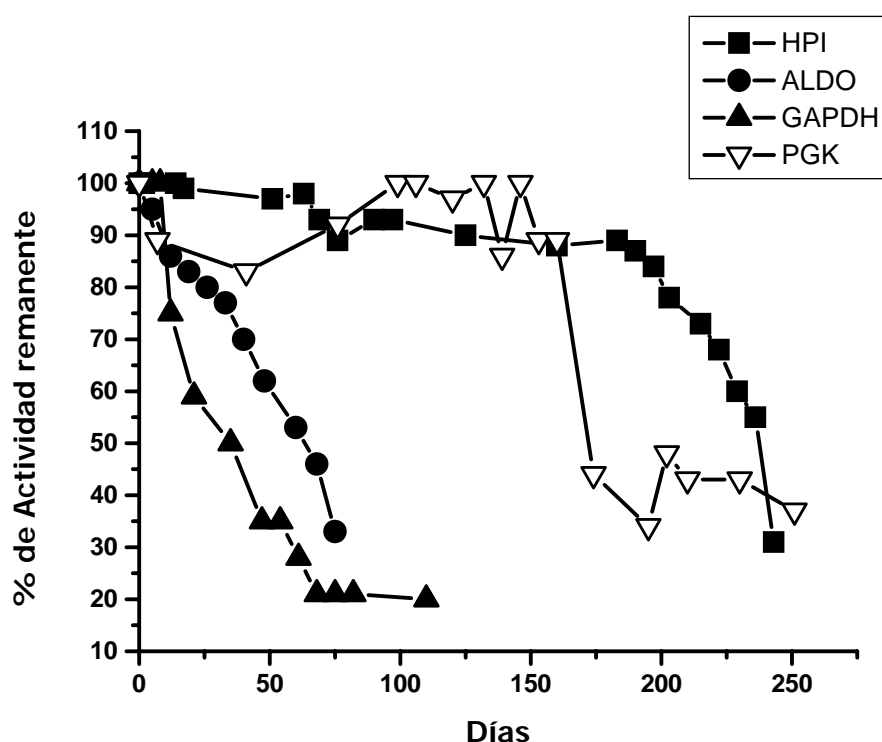


Fig. 21 Estabilidad de las proteínas almacenadas en 50% de glicerol a -20°C.

VII. 5. 3 Estructura oligomérica

La estructura cuaternaria de las enzimas recombinantes de *E. histolytica* se determinó por cromatografía de exclusión molecular. A través de una columna Sephacryl S-200. Se graficó el logaritmo del peso molecular de las diferentes proteínas marcadoras contra el coeficiente de distribución para obtener la curva patrón (Fig.22)

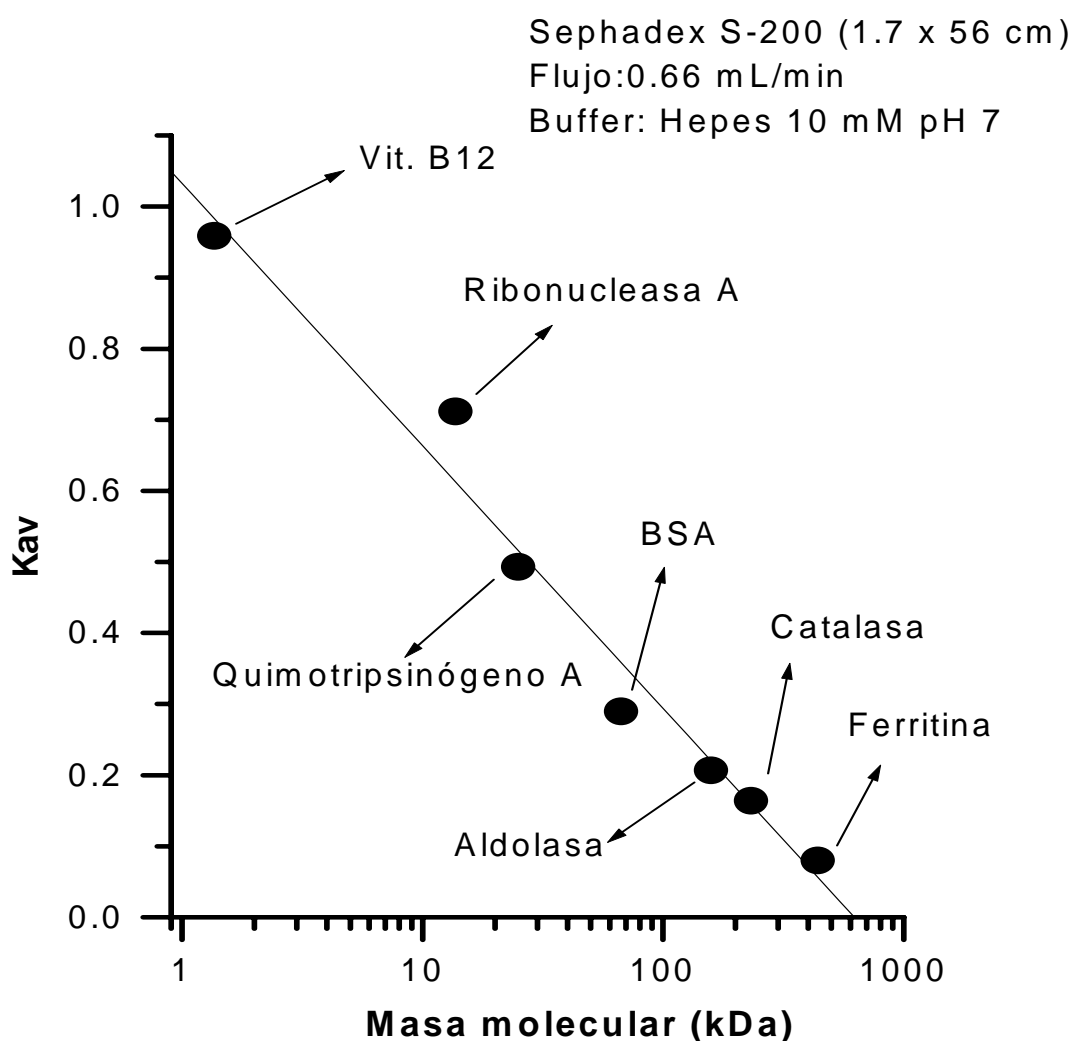


Fig. 22. Curva patrón para determinar el estado oligomérico de las enzimas amibianas.

Una vez obtenida la curva patrón se obtuvo el V_e (volumen de elusión) que sustituyendo los valores obtenidos en la **ecuación 1**, se pudo determinar el K_{av} (coeficiente de distribución), para cada enzima. Estos valores de K_{av} se interpolaron en la curva patrón para obtener el peso molecular de para cada proteína y su estado de oligomerización (Tabla 4 y Fig. 23)

Enzima	V_e (mL)	k_{va}	Peso molecular (kDa)	Estructura cuaternaria
HPI	81.3	0.327	81.6	Dímero
ALDO	76.2	0.253	89.8	Tetrámero
GAPDH	75.1	0.237	133.0	Tetrámero
PGK	80.5	0.316	143.0	Dímero

Tabla 4. Datos obtenidos a través de la exclusión molecular de las enzimas amibianas.

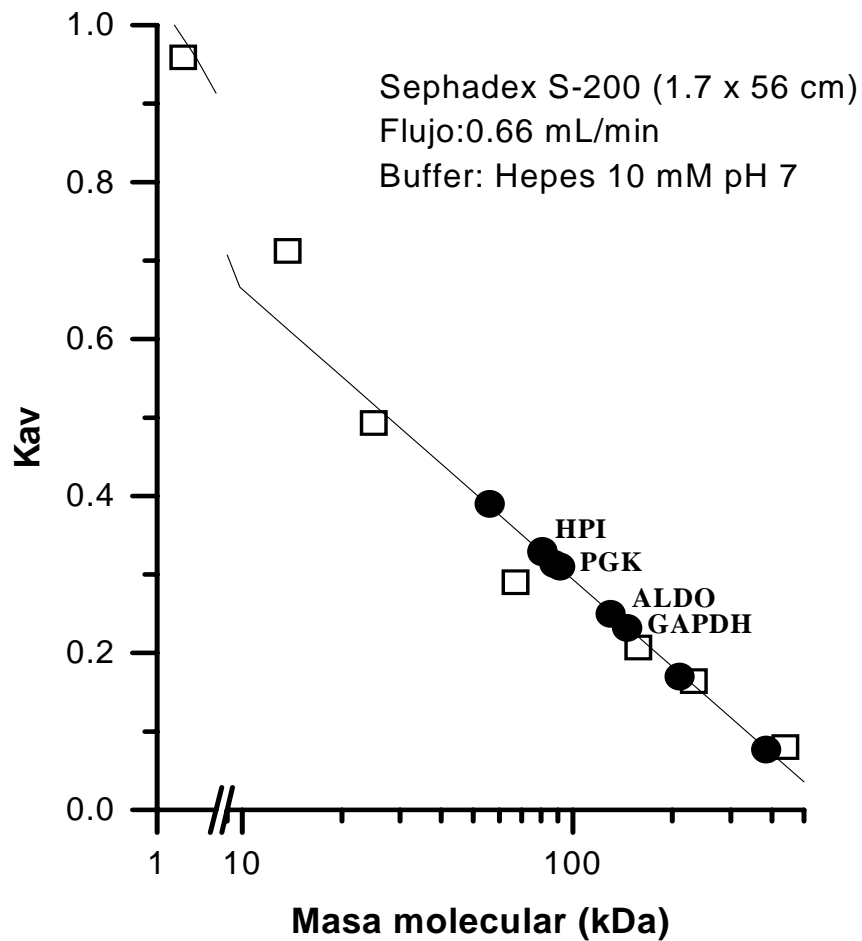


Fig. 23. Curva patrón en donde se interpolaron los valores de *K_{av}* obtenidos para cada enzima.

Las estructuras obtenidas se compararon con proteínas homólogas en la base de datos BRENDA (<http://www.brenda.uni-koeln.de>) demostrando que: EhHPI (dímero) y EhGAPDH (tetramero), presentan un estado oligomérico igual al que se reporta para estas enzimas en células de humano. EhALDO es un tetramero mientras que las aldolasas clase II reportadas en bacterias y cianobacterias son dímeros; solamente hay un reporte de una aldolasa tetramérica en la bacteria *Thermus aquaticus* (Sauve y Sygusch; 2001). La EhPGK muestra una estructura dimérica, a diferencia de casi todas las PGK

reportadas en la base de datos que muestran ser monoméricas, mientras que sólo hay un reporte de una PGK dimérica descrita para *Pyrococcus woesei* (Hess, *et al*; 1995).

VII. 5. 4 Caracterización cinética.

Una vez establecido el rango de pH óptimo de cada enzima, se determinaron las constantes cinéticas $V_{m\acute{a}x}$ y K_m por medio de la ecuación de inhibición por sustrato de Michaelis-Menten usando el programa Microcal Origin; en las reacciones directa y reversa, a pH óptimo y fisiológico (6.0 y 7.0). Gráficas representativas de este tipo de experimentos se muestran en la figura 24 A, B, C y D. Los valores determinados para todas las enzimas y metabolitos se muestran en las tablas 5 y 6.

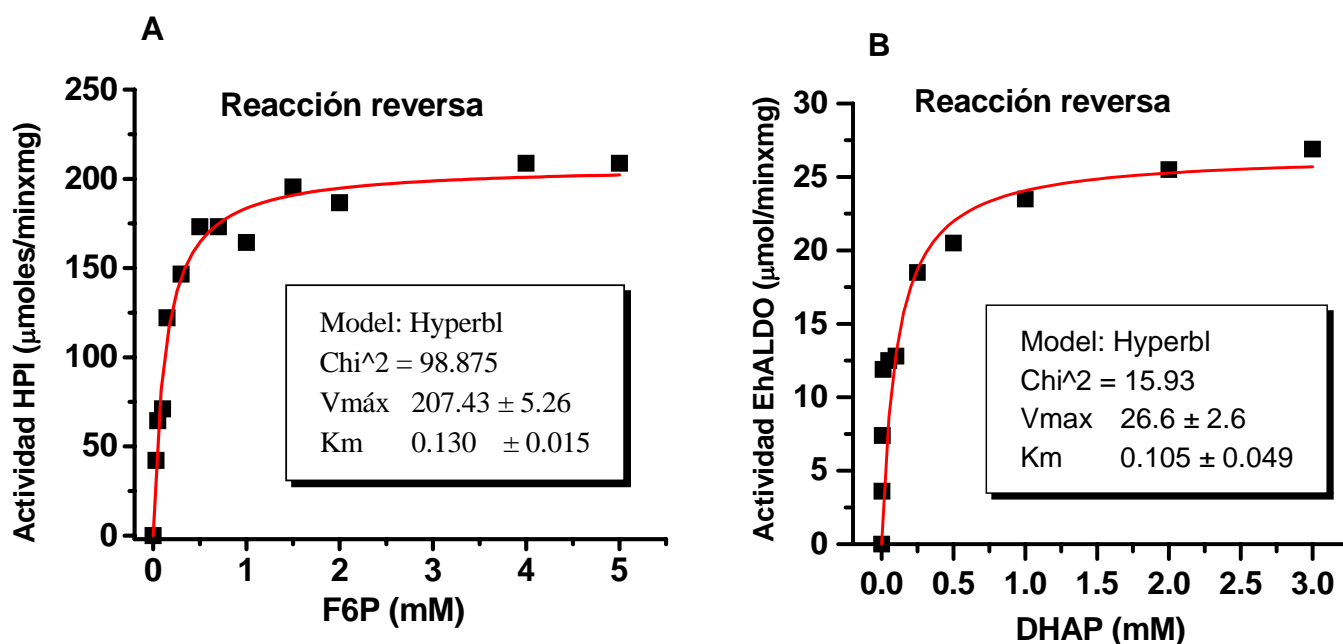


Fig. 24. **A)** Determinación de la K_m de la EhHPI por F6P. **B)** Determinación de la K_m de la EhALDO por DHAP.

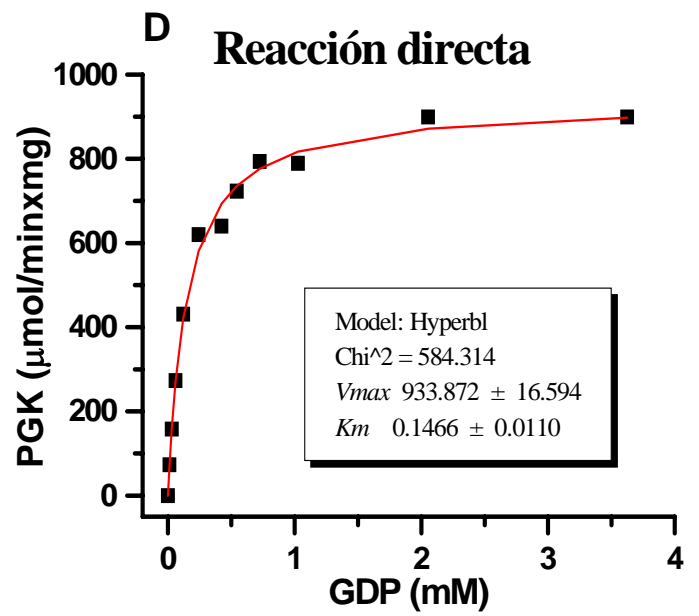
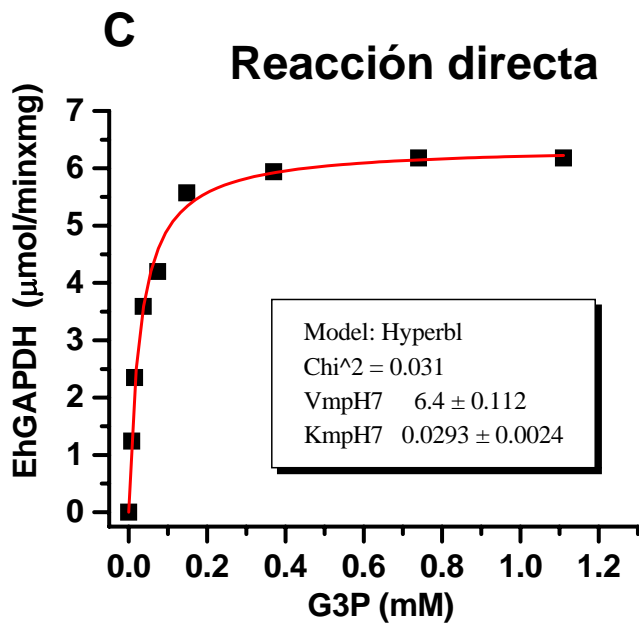


Fig. 24. C) Determinación de la K_m de la EhGAPDH por G3P. D) Determinación de la K_m de la EhPGK por GDP.

Tabla 5. Parámetros cinéticos de las enzimas para la reacción directa.

		<i>pH</i> 7.0	<i>pH</i> 6.0
HPI	V_{max}^a Km_{G6P}^b	$541 \pm 187 (3)^{*c}$ $0.66 \pm 0.21 (3)$	$392 \pm 125 (3)$ $0.61 (2)$
ALDO	$V_{max}(-Co^{2+})$ $V_{max}(+Co^{2+})$ $Km_{F1,6P2}$	$24 \pm 4 (3)^{**}$ $31 \pm 0.010 (3)$ $0.004 (2)$	$2.8 \pm 1.4 (3)$ $15 (2)$ $0.028 \pm 0.013 (4)$
GAPDH	V_{max} Km_{G3P}	$27 \pm 1 (3)^{**}$ $0.033 (2)$	$13 \pm 4 (3)$ $0.043 \pm 0.017 (3)$
PGK	V_{max} $Km_{1,3BPG}$ Km_{GDP} Km_{ADP}	$628 \pm 51 (6)^{**}$ $0.127 \pm 0.029 (3)$ $0.292 \pm 0.096 (5)$ $3.4 (1)$	$279 \pm 90 (6)$ $0.125 (2)$ $0.040 \pm 26 (3)$ $0.600 (1)$

^a V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg}$), ^b Km (mM). Los valores en los paréntesis indican el número de preparaciones de enzimas ensayadas. * pH óptimo 8.0; ** pH óptimo 7.0; ^c Los valores de V_{max} y Km_{G6P} a pH 8.0 (óptimo) son $608 \pm 107 (3)$ y $0.750 (2)$, respectivamente.

Tabla 6. Parámetros cinéticos de las enzimas para la reacción reversa.

		<i>pH 7.0</i>	<i>pH 6.0</i>
HPI	<i>Vmax</i> ^a	284 ± 91 (3) ^d	182 ± 32 (3)
	<i>Km</i> _{F6P} ^b	0.130 (1)	0.460 ± 0.03 (3)
ALDO	<i>Vmax</i>	29 (1) ^{*ND}	34 (2)
	<i>Km</i> _{G3P}	0.108 (1)	0.210 (2)
	<i>Km</i> _{DHAP}	0.105 (1)	0.264 (2)
GAPDH	<i>Vmax</i>	36 ± 9 (3)	40 ± 18 (3)
	<i>Km</i> _{3PG}	0.246 (2)	0.570 (2)
	<i>Km</i> _{1,3BPG}	0.010 (1)	0.016
PGK	<i>Vmax</i>	87 (2)	62 (2)
	<i>Km</i> _{3PG}	0.570 (2)	0.505 (2)
	<i>Km</i> _{GTP}	0.075 (2)	0.061 (3)
	<i>Km</i> _{ATP}	3.3 (1)	1.840 (1)

^{a, b} Unidades definidas igual a la Tabla 5. ND, no determinado

^dLos valores de *Vmax*. y *Km*_{F6P} a pH 8.0 (óptimo) son 620 ± 92 (4) y 0.480 ± 63 (3) respectivamente.

Los datos de las actividades enzimáticas pueden verse afectadas drásticamente por un cambio en el pH. Por ejemplo el valor de pH ácido puede modificar, en algún grado, las afinidades de las enzimas por sus sustratos y productos. Por lo que las propiedades cinéticas de las cuatro enzimas glucolíticas fueron determinadas bajo las mismas condiciones.

De acuerdo con el único reporte de Aley, 1984, el cual indica que el pH citosólico de *E. histolytica* podría ser similar al medio de cultivo (pH 6.5); decidimos medir las actividades cinéticas tanto a pH óptimo como pH 6.0 y 7.0 y a temperatura de 37 °C, temperatura a la cual se crecen a las amibas *in vitro* y a la cual se localizan en el hospedero, estos parámetros se consideran mas fisiológicos. Ya que los parámetros cinéticos reportados para algunas enzimas glucolíticas amibianas fueron determinados a valores de pH de 7.0 – 8.0 y a temperatura de 25 – 30 °C.

Los valores de V_{max} de las enzimas recombinantes en la reacción directa (glucólisis) (Tabla 5.), se encuentran dentro del rango de la actividad que se reporta frecuentemente para estas enzimas glucolíticas en otros organismos incluidas en la base de datos BRENDA (actividades en $U \cdot mg^{-1}$: ALDO, 2-20; GAPDH, 9-200; PGK, 600-700).

A pH 7.0 la EhALDO (en ausencia de metal divalente) presenta la menor actividad, seguida de la GAPDH (en ambas direcciones). En general las ALDO (clase I y II) son enzimas que muestran poca actividad en la vía glucolítica de los organismos; sin embargo ambas poseen una alta afinidad por su sustrato (Tabla 5 y 6). A pH 6.0 los valores de V_{max} para la EhHPI no muestran cambio (tomando en

cuenta la desviación estandar), sin embargo la actividad de la EhALDO, la EhGAPDH y la EhPGK decrecen entre 12 – 50% (El valor para la EhALDO es en ausencia de metales pesados).

En la reacción directa, las enzimas más susceptibles a los cambios de pH son la EhALDO con un decremento de hasta 8 veces en el valor de la K_m , cuando el pH se varió de 7.0 a 6.0, lo anterior en ausencia de cobalto (tabla 5). La EhALDO en presencia de 0.2 mM CoCl_2 , tiene un incremento del 50% en la V_{max} a pH 7.0 con respecto a la de pH 6.0.

Es de llamar la atención que aunque la ALDO y, en general las fructosa bifosfato aldolasas tienen los menores valores de actividad en la glucólisis (tabla 5), estas muestran, una gran afinidad por su sustrato fru(1,6) P_2 (amiba 4 μM ; otros organismos 1 – 10 μM) y son entre las enzimas glucolíticas, las más abundantes en las células por ejemplo; en músculo esquelético (Srivastava, 1987), y en *Trypanosoma brucei* (Misset, 1984).

Los valores de K_m por Fru(1,6) P_2 de la ALDO recombinante son iguales a los obtenidos en extractos amibianos. Por lo que la presencia de la etiqueta de 6 histidinas en las enzimas recombinantes no afectan los parámetros cinéticos.

La EhPGK muestra una mayor afinidad por GDP hasta en un orden de magnitud que por ADP (tabla 5), esto indica que la EhPGK preferentemente genera GTP sobre ATP. El GTP puede ser usado directamente para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos o para procesos de transducción de señales.

Además, la actividad de nucleosido difosforinas pueden fácilmente trasfosforilar al ADP utilizando GTP para producir ATP. En contraste, la EHPGK podría utilizar ADP solo si *in vivo*, la concentración de ADP es mayor que la de GDP.

El decremento en los valores de V_{max} en la PGK a pH 6.0 en comparación con pH 7.0 fue compensado por el incremento de 3 veces en la afinidad por su sustrato (GDP). Notablemente la EhALDO, mostro baja V_{max} a pH 6.0 acompañada por una gran afinidad por Fru(1,6)P₂, esto sugiere que esta enzima podría ser un sitio de control de la vía; cuando el citosol de la amiba se encuentre acidificado y el sustrato, metales pesados o la concentración de la enzima sean limitantes.

En la reacción reversa la enzima mas susceptible fue la HPI la cual mostró un decremento de alrededor de 30% en los valores de V_{max} , cuando el valor de pH varió de 7.0 a 6.0 (tabla 6.)

La EhPGK muestra valores de V_{max} menores que en la reacción directa, El valor de V_{max} de la GAPDH es al menos el doble que en la reacción directa. Los valores de EhHPI en la reacción reversa son similares a los reportados en el banco de datos de BRENDA, para HPIs de humano, ratón y espinaca (500 – 1000•mg⁻¹).

Los valores de K_m de los sustratos en la reacción directa y reversa de las cuatro enzimas recombinantes (tabla 5 y 6, respectivamente), se encuentran en el mismo orden de magnitud que los valores que se han reportado para las enzimas de *E. histolytica*.

VII. 5. 5 Efecto de activadores

Activación de EhALDO por metales

La secuencia de aminoácidos de la EhALDO indicó que tiene más similitud con las aldolasas tipo II que requieren un metal para su actividad (metaloenzima). Para determinar la dependencia por metales en la actividad de la ALDO, se hicieron ensayos con diversos metales (Zn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} y Mn^{2+}), los cuales son activadores de estas enzimas.

A pesar de que la preparación de EhALDO que se usó para este experimento era reciente, ésta tuvo baja actividad, debido a que la resina que se utilizó ya se había usado en purificaciones; por lo tanto concluimos que la proteína purificada va acarreado el cobalto de la resina y al usar resina nueva la actividad inicial de la enzima será mayor que en las preparaciones en las que la resina ya ha sido utilizada anteriormente.

En la Fig. 25. se muestran las gráficas donde se observa la activación de la enzima por los diferentes metales ensayados.

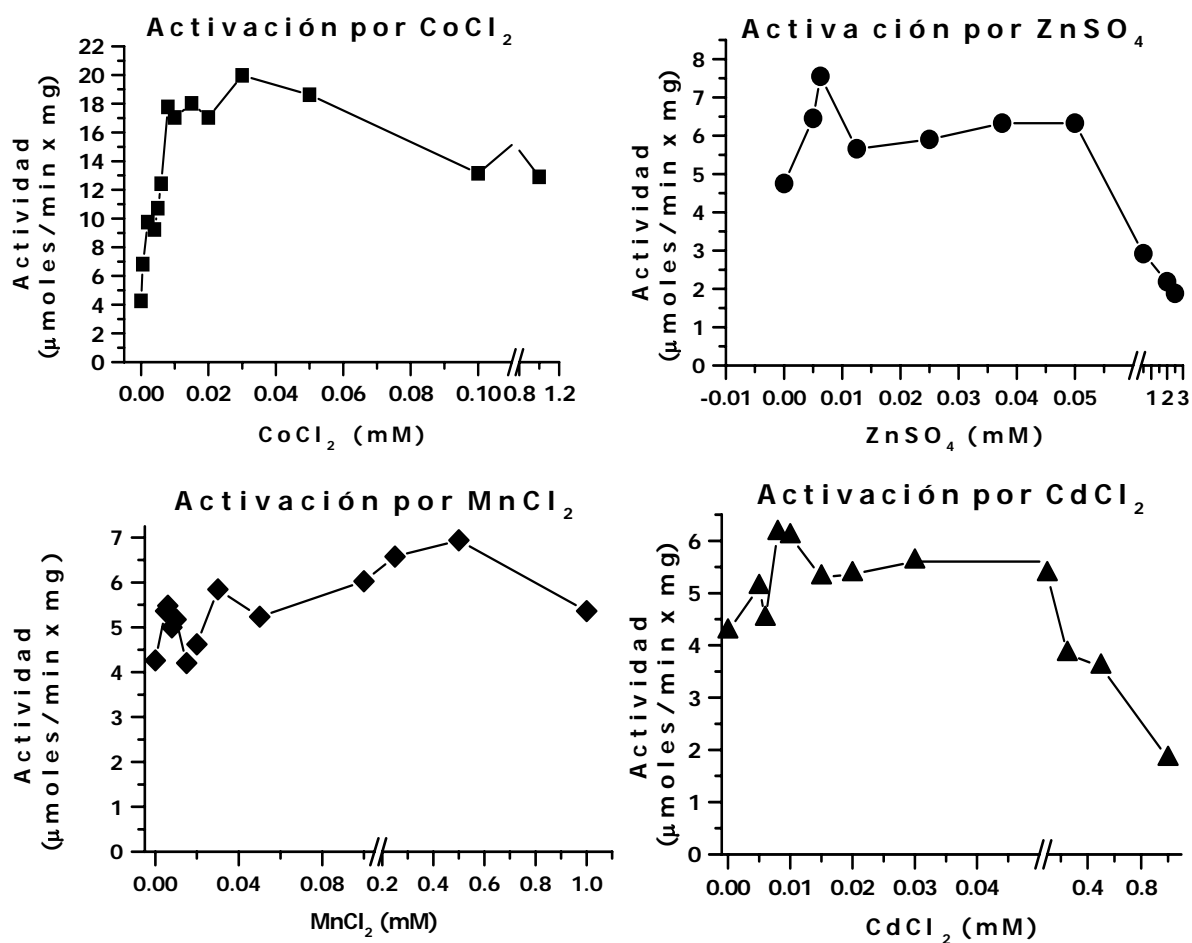


Fig. 25. Activación de la EhALDO por metales.

La Tabla 7 resume los valores a los cuales se incrementó la actividad de la enzima en presencia de las diferentes concentraciones de los metales.

	Actividad μmol/min x mg
Aldolasa (act. Inic.)	4.5
CoCl₂ 30 μM	20
ZnSO₄ 6 μM	7.6
MnCl₂ 0.5 mM	7.0
CdCl₂ 8 μM	6.2

Tabla 7. Concentración de diferentes metales a la cual se alcanza la mayor velocidad de la aldolasa.

La EhALDO (metaloenzima) mostró una mayor *V_{max}* cuando se utiliza cobalto (μM), y el manganeso es el menos potente debido a que necesita una concentración mayor (mM) para ver un cambio modesto en la actividad de la enzima.

Ya que la aldolasa es una metaloenzima y su actividad se ve incrementada en presencia de metales divalentes, al ser expuesta a un quelante como el EDTA, la actividad es inhibida. La Fig. 26 muestra la inhibición de la enzima por la adición de bajas concentraciones de EDTA. Cabe señalar que este experimento se realizó con una purificación diferente a la usada para los experimentos de activación por metales, por lo que se explica que las actividades iniciales sean diferentes. Esta disminución en la actividad no pudo ser revertida por la adición de metales (Dato no mostrado).

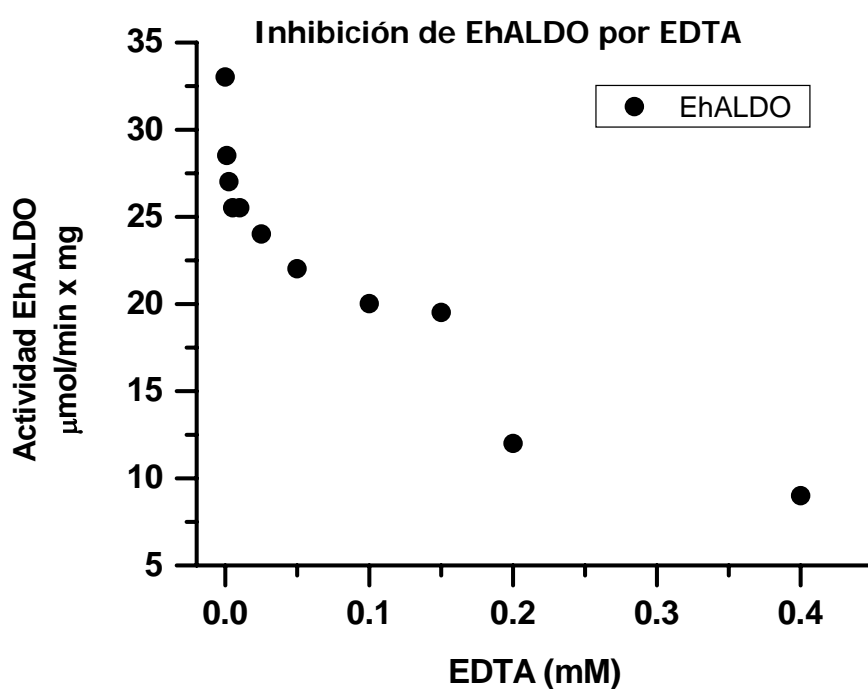


Fig. 26 Inhibición de EhALDO por EDTA

VIII. DISCUSIÓN GENERAL

Mediante alineamientos de las enzimas glucolíticas de otros organismos con la secuencia del genoma de *E. histolytica*, se logró identificar la secuencia completa que codifica para cada una de las enzimas de nuestro interés. A partir de DNA genómico, por la técnica de PCR se lograron amplificar los cuatro genes.

A partir del análisis de la secuencia de aminoácidos se determinó que las enzimas glucolíticas muestran un alto porcentaje de similitud e identidad con respecto a las mismas enzimas en otros organismos.

Se logró la clonación de los genes en *E. coli*, sin ningún tipo de mutación, corroborando la identidad de las proteínas con enzimas de restricción y por secuenciación.

La sobre-expresión de las proteínas recombinantes se realizó de manera exitosa en el sistema pET 28, obteniendo colonias que sobre-expresaban la proteína en gran cantidad de forma soluble, por lo que la purificación fue relativamente fácil (Fig. 17).

El análisis densitométrico de las proteínas mostró un grado de pureza de entre 90-99% (Fig. 17).

A diferencia de la EhHPI y la EhPGK, la EhALDO y la EhGAPDH mostraron un poco de dificultad para ser purificadas pero al adicionar 10 mM de β -mercaptoetanol se logró obtener proteínas más estables. Para almacenar a las proteínas recombinantes EhALDO y EhGAPDH se agregó 2 mM DTT a ambas y 10 μ M F1,6BP a la aldolasa, para favorecer la estabilidad.

La EhHPI mostró ser una enzima muy conservada y muy similar a las reportadas para otros organismos.

El análisis de secuenciación y la comparación de dicha secuencia con la de otros organismos indico que la EhALDO es una aldolasa clase II que requiere metal para su actividad y un dato importante es que la característica de esta enzima no se encuentra en la Aldolasa de humanos.

La enzima EhALDO es una enzima lenta en la dirección directa a los diferentes pHs, pero muy afín por la fructosa 1,6-bifosfato, sobre todo a pH= 6.0. Por lo que tal vez esta enzima es un punto de control, al presentar una baja velocidad pero muy afín a su sustrato.

Se comprobó la identidad de la EhALDO clase II (metaloenzima) y se demostró que el cobalto fue el mejor activador a una concentración de $30\mu\text{M}$. Esta concentración de Co^{2+} incrementa la velocidad inicial fue hasta en 4.5 veces mayor. También se comprobó que La EhALDO es inhibida a bajas concentraciones de quelante (EDTA), y que esta inhibición es irreversible por la adición de Co^{2+} .

La EhPGK muestra tener un alto porcentaje de similitud e identidad con enzimas homologas de grupos tan diversos como vertebrados, levaduras y bacterias. A pesar de este alto grado de conservación, se encontró que esta enzima es dimérica y no monomérica como las de la mayoría de los organismos. Además, la EhPGK posee mayor afinidad por GDP que por ADP hasta en un orden de magnitud, esto sugiere que la amiba tiene mayor concentración de GDP que ADP.

Los valores de V_{max} y K_m que se reportan en este trabajo se encuentran en el intervalo de actividad determinado para las mismas enzimas en otros organismos, por lo que el tratamiento que se les da a las proteínas recombinantes no afecta estos valores.

En cuanto a la estabilidad se observó una mayor permanencia de la actividad en las enzimas almacenadas en presencia de 50% glicerol a -20°C . Las proteínas más estables son la HPI y PGK con un tiempo de conservación de alrededor de 6 meses.

IX. CONCLUSIONES

Se obtuvieron los genes que codifican para las enzimas glucolíticas y se compararon con los (genes) de las enzimas reportadas en otros organismos, mostrando altos porcentajes de similitudes e identidad. Purificamos a las cuatro enzimas glucolíticas amibianas en forma pura y activas. Se calcularon los parámetros cinéticos de cada una de las proteínas recombinantes, se probaron algunos activadores para la EhALDO, observando que el cobalto es el que posee una mayor capacidad de activación. Para la EhHPI y EhGAPDH estas enzimas se encuentran dentro del rango de valores de velocidad máxima y constante de afinidad para los diferentes sustratos a lo que se reporta para estas enzimas en otros organismos, no poseen activadores o inhibidores. La EhPGK muestra mayor afinidad por los sustratos con bases nitrogenadas de guanina que por los de adenina hasta en un orden de magnitud, a demás de mostrar ser un dímero a diferencia de la mayoría de las PGKs reportadas. Esta enzima posee características que la hacen enzima características mas sobresalientes de este trabajo.

X. PERSPECTIVAS

Con los datos obtenidos para estas cuatro enzimas, se amplía la información sobre esta vía metabólica en *Entamoeba histolytica*. La información es valiosa para determinar como se podría estar controlando la glucólisis, esto mediante análisis de elasticidades y haciendo el modelaje por métodos de computadora. De esta forma se podría establecer otras estrategias para el diseño de nuevos tratamientos contra la amibiasis.

Habiendo determinado la diferencia de *K_m* de la EhPGK por los sustratos con bases nitrogenadas de guanina sobre los de adenina, estamos interesados en realizar un análisis estructural de la afinidad por GDP/ADP de la EhPGK, esto mediante mutagenesis dirigida hacia los posibles aminoácidos involucrados en la unión de la enzima con la base nitrogenada del sustrato.

XI. REFERENCIAS

- Aley, S. B., Cohn, Z. A., and Scott, W. A. (1984) **ENDOCYTOSIS IN *ENTAMOEBEA HISTOLYTICA* Evidence for a Unique Non-acidified Compartment.** J. Exp. Med. **160**, 724-737
- Baker, J. J. W., Allen G. E. (1976). **Materia, energía y vida.** (1974) Fondo Educativo interamericano
- Bergmeyer, H. U. (1983). **Methods of Enzymatic Analysis.** Verlag Chemie, Weinheim.
- Chi, A. S., Deng, Z., Albach, R. A. & Kemp, R. G. (2001) **The two phosphofructokinase gene products of *Entamoeba histolytica*.** J. Biol. Chem. **276**, 19974-19981.
- Deng, Z., Huang, M., Singh, K., Albach, R. A., Latshaw, S. P., Chang, K., and Kemp R. G. (1998) **Cloning and expression of the gene for the active PPI- dependent phosphofructokinase of *Entamoeba histolytica*.** Biochem. J. (1998) **329**: 659-664.
- Diamond, L. S., Harlow, D. R., and Cunnick, C. C. (1978) **A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*.** Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **72**, 432-432
- Dixon, M. and Webb, E. C. (1979) **Enzymes.** Academic Press, New York.

- Espinosa-Cantellano, M., and Martínez-Palomo, A. (2000). **Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease.** *Clinical Microbiology reviews.* **13**(2): 318-331.

- Henze, K., Bard, A., Wettern, M., Cerff, R. and Martin, W. (1995) **A nuclear gene of eubacterial origin in *Euglena gracilis* reflects cryptic endosymbioses during protist evolution.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**,9122-9126

- Henze, K., Horner, D. S., Suguri, S., Moore, D. V., Sanchez, L. B., Muller, M. and Embley, T. M. (2001) **Unique phylogenetic relationships of glucokinase and glucosephosphate isomerase of the amitochondriate eukaryotes *Giardia intestinalis*, *Spironucleus barkhanus* and *Trichomonas vaginalis*.** *Gene* **281**,123-131

- Hess, D., Krüger, K., Knappik, A., Palm, P. & Hensel, R. (1995) **Dimeric 3-phosphoglycerate kinases from hyperthermophilic Archaea.** *Eur. J. Biochem.* **233**,227-237.

- Horecker, B. L., Tsolas, O. and Lai, C.Y. (1972) Aldolases. **In *The Enzymes*** (Boyer, P.D., ed) vol. VII, pp. 213- 258, Academic Press, New York.

- Huston, C. D., Haque, R., Petri, W. A. Jr. (1999). **Molecular-based diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection.** *Expert Rev Mol Med.* Mar **22**;1999:1-11

- Kalra, I. S., Dutta, G. P., and Mohan Rao V. K. (1969). ***Entamoeba histolytica*: effect of metal ions, metal binders, therapeutics,**

antibiotics, and inhibitors on Aldolase activity. Exp. Paras. **24**, 26-31

- Kroschewski, H., Ortner, S., Steipe, B., Scheiner, O., Wiedermann, G., and Duchene, M. (2000). **Differences in substrate specificity and kinetic properties of the recombinant hexokinases HXK1 and HXK2 from *Entamoeba histolytica*.** Mol. Biochem. Parasitol. **105**; 71-80

- Laemmli, U.K. (1970) **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* **227**, 680-685.

- Lehninger, A., Nelson, D.L., Cox, M. M. (1993) **Principles of Biochemistry.** Worth Publishers, New York P.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951) **Protein measurements with the Folin phenol reagent.** *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.

- Mai, Z., Ghosh, S., Frisardi, M., Rosenthal, B., Rogers, R. and Samuelson, J. (1999) **Hsp60 is targeted to a Cryptic mitochondrion-derived organelle ("Crypton") in the microaerophilic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*.** Mol. Cell Biol **19**:2198-2205.

- Martínez-Palomo, A. (1982). **The biology of *Entamoeba histolytica*.** Wiley, Inglaterra.

- Misset, O. and Opperdoes, F. R. (1984) **Simultaneous purification of hexokinase, class-I fructose-biphosphate aldolase, triosephosphate isomerase and phosphoglycerate kinase from *Trypanosoma brucei***. Eur. J. biochem. **144**, 475-483

- McLaughlin, J. and Aley, S. (1985). **The biochemistry and functional morphology of the *Entamoeba***. J. Protozool. **32**(2):221-240.

- Ravdin, J. I. (1988). Pathogenesis of amebiasis: an overview. En: Ravdin, J. I. (ed). **Amebiasis Human infection by *Entamoeba histolytica***. John Wiley, Nueva York. 166-176

- Reeves, R. E., Montalvo, F., and Sillero, A. (1967). **Glucokinase from *Entamoeba histolytica* and Related Organisms**. Biochemistry **6**, 1752-1760.

- Reeves, R. E. (1968) **A New enzyme with the glycolytic function of pyruvate Kinase** J. Biol. Chem. **243**,3202-3204

- Reeves, R. E. (1974). **Glycolytic enzymes in *E. histolytica***. Arch Inv. Med. **5**, 411-414

- Reeves, R. E. (1984). **Metabolism of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903**. Adv: Parasitol. **23**:105-142.

- Reeves, R. E. & South, D. J. (1974). **Phosphoglycerate kinase (GTP). An enzyme from *Entamoeba histolytica* selective for guanine nucleotides**. Biochem. Biophys. Res. Comm. **58**, 1053-1057

- Reeves, R. E., Serrano, R. and South, D. J, (1976).
6-Phosphofructokinase (pyrophosphate). J. Biol. Chem. **251**, 2958-2962.

- Reeves, R. E., South, D. J., Blytt, H. J. and Warren, L. G. (1974).
Pyrophosphate: D-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase. J. Biol. Chem. **249**, 7737-7741.

- Saavedra-Lira, E. y R. Pérez-Montfort. (1996). **Energy production in *Entamoeba histolytica*: New perspectives in rational drug design**. Arch. Med. Res. **27**(3):257-264.

- Saavedra-Lira, E., Ramírez-Silva, L., and Pérez-Montfort, R. (1998) **Expression and characterization of recombinant pyruvate phosphate dikinase from *Entamoeba histolytica*** Biochim. Biophys. Acta. **1382**, 47-54.

- Saavedra-Lira, E., Olivos, A., Encalada, R., and Moreno-Sánchez, R. (2004) ***Entamoeba histolytica*: kinetic and molecular evidence of a previously unidentified pyruvate kinase** Exp. Parasitol. **106**: 11-21.

- Saavedra, E., Encalada, R., Pineda, E., Jasso-Chávez, R. and Moreno-Sánchez R. (2005) **Glycolysis in *Entamoeba histolytica* revisited: biochemical characterization of recombinant glycolytic enzymes and flux control analysis**. FEBS J. **272**; 1767-1783

- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. (1989). **Molecular cloning: a laboratory manual cloning: a laboratory manual**, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

- Sánchez, L. B., Horner, D. S., Moore, D. V., Henze, K., Embley, T. M. and Muller, M. (2002) **Fructose-1,6-biphosphate aldolases in amitochondriate protists constitute a single protein subfamily with eubacterial relationships**. *Gene* 295,51-59

- Sauve, V. & Sygusch, J. (2001) **Molecular cloning, expression, purification, and characterization of fructose-1,6-bisphosphate aldolase from *Thermus aquaticus***. *Protein Expr. Purif.* **21**,293-302.

- Srivastava, D. K. and Bernhard, S. A. (1987) **Biophysical chemistry of metabolic reaction sequences in concentrated enzyme solution and in the cell**. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **16**, 175-204

- Susskind, B. M., Warren, L.G. and Reeves, R. E. (1982) **A pathway for the interconversion of hexose and pentose in the parasitic amoeba *Entamoeba histolytica*** **204**. 191-196

- Tovar, J., Fischer, A., Clark, G. C. (1999) **The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondriate parasite *Entamoeba histolytica***. *Mol. Microbiol.* **32**:1013-1021.

- Voet, D., Voet, J. G. and Pratt, C. W. **Fundamentals of Biochemistry**. (1999) John Wiley & Sons, New York, NY. Capítulo 14.

- Zamarripa–Morales S., Villa-Castro, J. C., Calvo-Méndez, C. (1999) ***Entamoeba histolytica*: identification and properties of membrane-bound and soluble alpha-glucosidases.** Exp Parasitol. **93**: 109-115.

Glycolysis in *Entamoeba histolytica*

Biochemical characterization of recombinant glycolytic enzymes and flux control analysis

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

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

Keywords

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

Correspondence

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

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

doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04610.x

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

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

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

Abbreviations

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

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

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

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

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

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

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

Results

Protein sequence analysis

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

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

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

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

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

Gene cloning, overexpression and purification of recombinant glycolytic enzymes

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

Biochemical properties of amoebal glycolytic enzymes

Storage stability

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

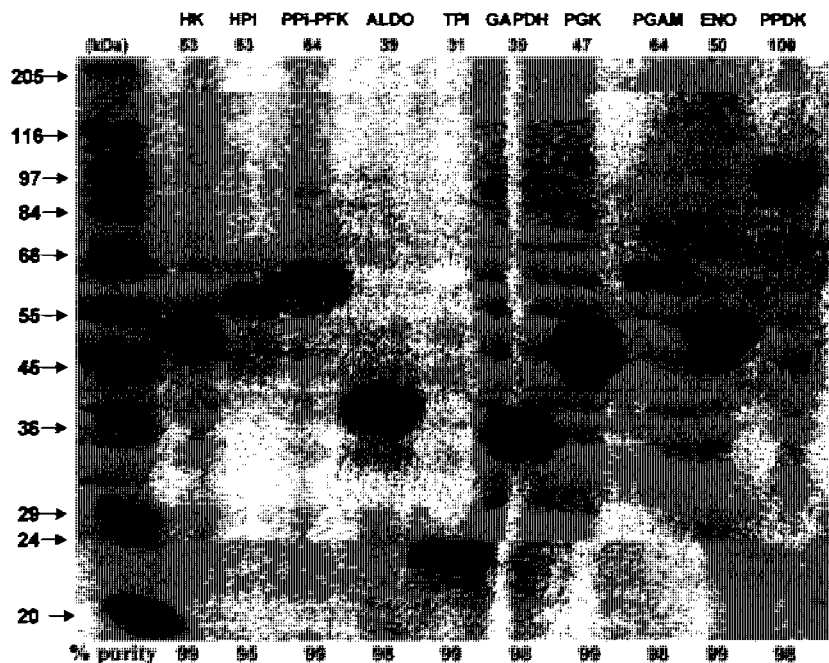


Fig. 1. SDS/PAGE showing the 10 recombinant purified *Entamoeba histolytica* glycolytic enzymes. The enzyme molecular mass indicated corresponds to that of the His₆-tailed protein plus the recognition peptide for thrombin cleavage digestion. The percentage purity was determined by densitometric analysis.

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

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

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

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

pH dependency

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

Quaternary structure

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

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

Kinetic characterization

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Modulators

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

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

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

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

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

Comparison of the catalytic efficiencies for amoebal glycolytic enzymes

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

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

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

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

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

$$C_i = \frac{k_2 \left(\frac{V_f}{K_i} - \frac{V_r}{K_p} \right)_i^{-1} (1 + K_{\text{eq}i}) \prod_{j=i+1}^n K_{\text{eq}j}}{1 + k_2 \sum_{k=1}^n \left(\frac{V_f}{K_i} - \frac{V_r}{K_p} \right)_k^{-1} (1 + K_{\text{eq}k}) \prod_{j=k+1}^n K_{\text{eq}j}}$$

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

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

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

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

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

In vitro reconstruction of the final stages of amoebal glycolysis

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

Table 5. k_{cat} and catalytic efficiency parameters at optimal and physiological pH values of *Entamoeba histolytica* glycolytic enzymes in the forward reaction. 1,3BPG, 1,3-bisphosphoglycerate; 2PG, 2-phosphoglycerate; 3PG, 3-phosphoglycerate; ALDO class II, fructose-1,6-bisphosphate aldolase class II; ENO, enolase; Fru(1,6)P₂, fructose-1,6-bisphosphate; Fru6P, fructose-6-phosphate; G3P, glyceraldehyde-3-phosphate; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Glc6P, glucose-6-phosphate; GrnP, dihydroxyacetone phosphate; HK, hexokinase; HPI, hexose-6-phosphate isomerase; PGAM, phosphoglycerate mutase; PGK, phosphoglycerate kinase; PPDK, pyruvate phosphate dikinase; PPI, inorganic pyrophosphate; PPI-PFK, inorganic pyrophosphate-dependent phosphofructokinase; TPI, triosephosphate isomerase.

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

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

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

Table 6. k_{cat} and catalytic efficiency parameters at optimal and physiological pH values of *Entamoeba histolytica* glycolytic enzymes in the reverse reaction. ND, not determined. 1,3BPG, 1,3-bisphosphoglycerate; 2PG, 2-phosphoglycerate; 3PG, 3-phosphoglycerate; ALDO class II, fructose-1,6-bisphosphate aldolase class II; ENO, enolase; Fru(1,6)P₂, fructose-1,6-bisphosphate; Fru6P, fructose-6-phosphate; G3P, glyceraldehyde-3-phosphate; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GrmP, dihydroxyacetone phosphate; HK, hexokinase; HPI, hexose-6-phosphate isomerase; PGAM, phosphoglycerate mutase; PGK, phosphoglycerate kinase; PPK, pyruvate phosphate dikinase; PPI, inorganic pyrophosphate; PPI-PFK, pyrophosphate-dependent phosphofruktokinase; TPI, triosephosphate isomerase.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

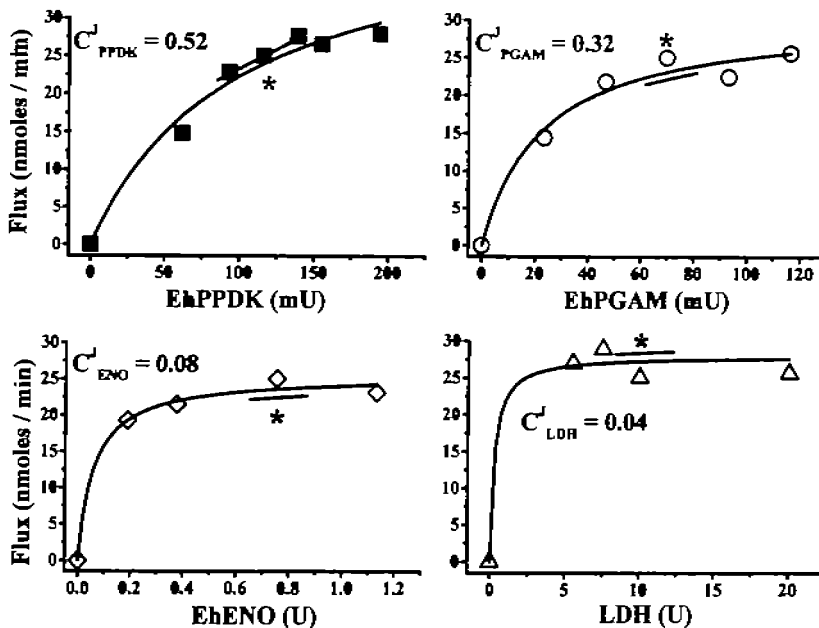


Fig. 2. Effect of enzyme concentration on flux through the final stages of *Entamoeba histolytica* glycolysis in a reconstructed system at pH 7.0. The assay conditions are described in the Experimental procedures. When varying the concentration of one enzyme, the concentration and activity of the others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

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

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

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

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

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

Discussion

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

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

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

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

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

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

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

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

Experimental procedures

Database screening

Genomic searches were initially made in the TIGR *E. histolytica* genome database (<http://www.tigr.org/tdb/e2kl/eha1/>) using, as queries, amino-acid sequences of glycolytic enzymes from several sources, mostly bacteria and protozoa. Alignments were made by using the CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) and the BLAST search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) tools. In addition, gene name searches were made in the annotated release (28 January 2003) of the amoebal genome sequence project. The 10 glycolytic enzymes studied in this work were found in the database.

Gene cloning

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

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

Overexpression and purification of recombinant enzymes

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

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

Molecular sizing

The native molecular weight of the *E. histolytica* recombinant glycolytic enzymes was determined by molecular exclusion chromatography using Fast Performance Liquid Chromatography equipment (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The enzymes (0.6–1.5 mg) were filtered through a column (56 × 1.7 cm) packed with Sephacryl S-200 previously equilibrated with 10 mM Hepes, pH 7.0. The column was calibrated with the following molecular mass standards (Amersham, Piscataway, NJ, USA): blue dextran (2×10^6 Da), horse spleen ferritin (440 kDa), bovine liver catalase (232 kDa), rabbit muscle aldolase (158 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), bovine pancreas chymotrypsinogen A (25 kDa), bovine pancreas ribonuclease A

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

Kinetic assays

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

Optimal kinetic assay conditions at 37 °C

EhHK Forward

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

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

EhHPI Forward

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

EhHPI Reverse

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

EhPPI-PFK Forward

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

EhPPI-PFK Reverse

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

EhALDO Forward

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

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

EhALDO Reverse

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

EhTPI Forward

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

EhTPI Reverse

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

EhGAPDH Forward

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

EhGAPDH Reverse

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

EhPGK Forward

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

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

EhPGK Reverse

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

EhPGAM Forward

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

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

EhPGAM Reverse

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

EhENO Forward

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

EhENO Reverse

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

EhPPDK Forward

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

EhPPDK Reverse

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

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

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

Acknowledgements

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

References

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

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

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

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

Encalada Oregon Elia Rusely
correo electronico: mis:ga2000@hotmail.com
09424434-G
tel. 5763-36-01