

T  
1148

 XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION  
ARCHIVO HISTORICO

123982



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**UNIDAD XOCHIMILCO**  
**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**“MECANISMO DE ENDOCITOSIS DE TRANSFERRINA HUMANA EN  
Entamoeba histolytica”**

**TESIS**  
**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**PRESENTA:**

**BIOL. MAGDA ELIZABETH REYES LÓPEZ**

**JURADO**

**CODIRECTORA: DRA. MIREYA DE LA GARZA**  
**CODIRECTORA: DRA. JULIA PÉREZ RAMOS**  
**ASESOR: DR. SAÚL VILLA TREVIÑO**  
**SINODAL: DRA. MARIA DEL CARMEN RAMÍREZ MEDELES**  
**SINODAL: DR. JOSE DE JESÚS SERRANO LUNA**

**MÉXICO**

**FEBRERO, 2011**

*El doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de excelencia del CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-2093.*

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Cuajimalpa, Iztapalapa y Xochimilco aprobó la Tesis que presentó:

BIOL. MAGDA ELIZABETH REYES LÓPEZ  
Matrícula 206383848

JURADO

Codirectora: Dra. Mireya de la Garza

Codirectora: Dra. Julia Pérez Ramos

Asesor: Dr. Saúl Villa Treviño

Sinodal: Dra. María del Carmen Ramírez Medeles

Sinodal: Dr. José de Jesús Serrano Luna

Por la Comisión Dra. María Jesús Ferrara Guerrero

The image shows five handwritten signatures in black ink, each corresponding to a name listed in the text to the left. The signatures are written in a cursive style. From top to bottom, they correspond to: Mireya de la Garza, Julia Pérez Ramos, Saúl Villa Treviño, María del Carmen Ramírez Medeles, and José de Jesús Serrano Luna. The signature for María Jesús Ferrara Guerrero is not clearly visible as it is partially obscured by the signature above it.

**Este trabajo se realizó en el laboratorio 52 del Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, bajo la dirección de la Dra. Mireya de la Garza y de la Dra. Julia Pérez Ramos y con la asesoría del Dr. Saúl Villa Treviño.**

*A Astrid y Axel*

•

***“Derrota sería perder el entusiasmo”***

*Anónimo*

***“Lo maravilloso de aprender algo es que nadie puede  
arrebatarlo”***

*B.B. King*

**AGRADECIMIENTOS:**

*Al Dr. Saúl Villa Treviño por motivarme a realizar este proyecto*

*A la Dra. Mireya de La Garza y compañeros del laboratorio, en especial a la M en C. Carolina Piña Vázquez por su ayuda para la discusión de los resultados así como para el diseño de los experimentos*

*A los Doctores María del Carmen Medeles y Jose de Jesús Serrano Luna por sus valiosos comentarios*

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>4</b>
<i>Entamoeba histolytica</i> .....	7
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>12</b>
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>13</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>14</b>
<b>OBJETIVO.....</b>	<b>15</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>15</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
<i>Cultivo</i> .....	16
	*
<b>1. Identificación de las diferentes estructuras vesiculares presentes en <i>Entamoeba histolytica</i>, que participan en la endocitosis de holotransferrina.....</b>	<b>16</b>
1.1. Efecto de inhibidores de endocitosis en la internalización de holotransferrina en <i>Entamoeba histolytica</i> .....	16
1.2. Localización de clatrina y su probable interacción con holotransferrina en <i>Entamoebahistolytica</i> .....	17
1.3. Identificación de vesículas de la vía endosomal/lisosomal en <i>Entamoeba histolytica</i> , usando anticuerpos dirigidos contra proteínas relacionadas en otras células eucariontes.....	18
1.4. Inmunomarcaje de los compartimentos endocíticos en <i>Entamoeba histolytica</i> para microscopía confocal.....	19

<b>2. Aislamiento e identificación de la proteína que une holotransferrina de <i>Entamoeba histolytica</i> (<i>EhTfbp</i>).....</b>	<b>21</b>
2.1. Purificación de la proteína de unión de holotransferrina de <i>Entamoeba histolytica</i> , <i>EhTfbp</i> .....	21
2.2. Espectrometría de masas.....	21
2.3. Reacción cruzada entre la proteína de unión a holotransferrina, <i>EhTfbp</i> y la acetaldéhidol/alcohol deshidrogenasa 2, <i>EhADH2</i> , ambas de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	22
2.4. Efecto de anticuerpos anti-acetaldehidol/alcohol deshidrogenasa 2 de <i>Entamoeba histolytica</i> , anti- <i>EhADH2</i> , en la internalización de la holotransferrina.....	23
2.5. Afinidad de unión de holotransferrina humana por la <i>EhTfbp</i> . Efecto de la temperatura y la concentración de holotransferrina en células vivas y fijadas en la internalización de esta proteína...	
2.6. Localización de clatrina, <i>EhADH2</i> , <i>EhTfbp</i> y holotransferrina en <i>Entamoeba histolytica</i> .....	24
<b>3. Identificación de la familia de receptores a la que pertenece la proteína de unión de la holotransferrina de <i>Entamoeba histolytica</i>, <i>EhTfbp</i>.....</b>	<b>24</b>
3.1. Curvas de viabilidad y de crecimiento de <i>Entamoeba histolytica</i> con genisteína.....	24
3.2. Efecto de la genisteína en la internalización de la holotransferrina....	25
<b>4. Reconocimiento de algunas proteínas que pudieran participar en la transducción de señales inducida por la unión del ligando a la <i>EhTfbp</i>.....</b>	<b>25</b>
4.1. Identificación de las proteínas fosforiladas durante la internalización de holotransferrina y su relación con MAP cinasas.....	25

**5. Identificación de proteasas capaces de degradar holotransferrina en *Entamoeba histolytica*..... 26**

**5.1. Electroforesis en geles de sustrato..... 26**

**RESULTADOS..... 28**

**1. Identificación de estructuras vesiculares y proteínas relacionadas con la internalización de la holotransferrina..... 28**

1.1.1. Estructuras vesiculares identificadas ..... 28

• 1.1.2. Tráfico y entrega de holotransferrina a los endosomas tempranos y tardíos y a los lisosomas ..... 30

1.1.3. Inhibidores de la endocitosis dependiente de clatrina evitan la internalización de holotransferrina ..... 32

1.1.4. Clatrina participa en la internalización de holotransferrina en *Entamoeba histolytica* ..... 35

**2. Purificación e identificación de la proteína de unión para holotransferrina de *Entamoeba histolytica*, *EhTfbp* ..... 38**

2.1.1. Purificación de *EhTfbp* ..... 38

2.1.2. Identificación de la *EhTfbp* por espectrometría de masas ..... 40

2.1.3. Reacción cruzada entre *EhTfbp* y *EhADH2* usando anticuerpos

2.1.4. Inhibición de la endocitosis de Transferrina por la saturación de los sitios de unión con el anticuerpo anti-*EhADH2* ..... 43

2.1.5. Afinidad de la unión de *EhTfbp* por su ligando y efecto de la

temperatura y de la concentración de holotransferrina .....	45
2.1.6. Localización de <i>EhADH2</i> y su relación con clatrina y holotransferrina .....	49
<b>3. <i>EhTfbp</i> con actividad tipo tirosín-cinasa .....</b>	<b>51</b>
3.1.1. Curva de crecimiento en presencia de genisteína.....	51
3.1.2. Inhibición de la internalización de holotransferrina en presencia de genisteína .....	52
<b>4. Participación de <i>EhTfbp</i> en la transducción de señales para la endocitosis de holotransferrina .....</b>	<b>55</b>
4.1.1. Identificación de las proteínas fosforiladas y su relación con las MAPK.....	55
<b>5. Identificación de proteasas específicas de transferrina humana... 57</b>	
5.1.1. Electroforesis en geles de substrato.....	57
<b><i>DISCUSIÓN</i> .....</b>	<b>59</b>
<b><i>PERSPECTIVAS</i> .....</b>	<b>71</b>
<b><i>BIBLIOGRAFÍA</i> .....</b>	<b>72</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	9
Fig. 2. Detección en <i>E. histolytica</i> de proteínas similares a endosomas tempranos, EEA1, tardíos MPR, y lisosomas LAMP-1 y LAMP-2 por inmuno-transferencia .....	29
Fig. 3. Distribución de las proteínas marcadoras de endosomas tempranos, EEA1, tardíos MPR, y lisosomas LAMP-1 y LAMP-2 en <i>E. histolytica</i> , en presencia y ausencia de la holoTf-FITC..	31
Fig. 4. Efecto de los inhibidores de endocitosis en la internalización de la holotransferrina .....	34
Fig. 5. Co-localización de clatrina y holotransferrina .....	37
Fig. 6. Purificación de la proteína que une transferrina de <i>E. histolytica</i> (EhTfbp) con el anti-RTf humano .....	39
Fig. 7. Reconocimiento cruzado de las proteínas amibianas EhTfbp y EhADH2 .....	42
Fig. 8. Inhibición de la endocitosis de holoTf-FITC por el anticuerpo anti-EhADH2 .....	44
Fig. 9. Internalización de holoTf dependiente de su concentración y de la temperatura en <i>E. histolytica</i> .....	47
Fig. 10. Internalización de holoTf en amibas fijadas (muertas) en comparación con amibas vivas incubadas con holoTf-FITC a diferentes temperaturas .....	48
Fig. 11. EhADH2 no interacciona con clatrina durante la endocitosis de holoTf en microscopía confocal .....	50
Fig. 12. Curvas de viabilidad y de crecimiento de los trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	52
Fig. 13. Efecto de genisteína en la internalización de transferrina.	54
Fig. 14. Proteína total de <i>E. histolytica</i> incubada con holotransferrina a 0, 15, 30 y 45 min .....	56
Fig. 15. Proteasas amibianas que degradan holoTf en geles co-polimerizados con esta proteína .....	58

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
Acetil-CoA	acetil coenzima A
ADH	alcohol deshidrogenasa
ALDH	aldehído deshidrogenasa
Anti- <i>Eh</i> ADH2	anticuerpo anti- receptor de transferrina de humano
Anti-RTf	anticuerpo anti receptor de transferrina humana
AP-2	proteína adaptadora 2
apoTf	transferrina sin hierro unido
apoTf-FITC	transferrina sin hierro unido acoplado a isotiocianato de fluoresceína
CHAPS	3-(3-colamidopropil)dimetilamonio-propanosulfonato
CY5	Cy-dye N-hydroxyl-succinimide ester
DTT	ditiotreitól
EEA1	antígeno 1 de los endosomas tempranos
EGTA	ácido etilenglicol-bis (2-amino-etil-éter)-N,N,N',N',-tetra-acético
<i>Eh</i> Tfbp	proteína de unión de transferrina de <i>E. histolytica</i>
<i>Eh</i> ADH2	acetaldehído alcohol deshirogenasa de <i>Entamoeba histolytica</i>
Fe	símbolo químico del elemento hierro.
FITC	isotiocianato de fluoresceína
GAPDH	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GPI	glicosil-fosfatidil-inositol
holoTf	holotransferrina, transferrina con 1 ó 2 átomos de hierro
holoTf-FITC	holotransferrina acoplada a isotiocianato de fluoresceína
holoLf	hololactoferrina. Lactoferrina saturada de hierro
holoLf-FITC	hololactoferrina acoplada a isotiocianato de fluoresceína
MAPK/ERK	proteín-cinasa activada por mitógenos
MPR	Receptor de manosa 6-fosfato de endosomas tardíos
NAD	nicotinamida adenina dinucleótido

NEM	N-etil-maleimida
LAMP1 y LAMP2	proteína de unión a lisosoma 1 y 2
Lf	lactoferrina en presencia de SDS
PHMB	p-hidroxi-mercuri-benzoato
PI-3K	fosfatidil inositol-3-fosfato
PK	Protein cinasas
PMSF	fenil-metil-sulfonil fluoruro
PT	fosfotirosina
Tbp1	proteína procarionte 1 de unión a transferina
Tbp2	proteína procarionte 2 de unión a transferina
RTf	Receptor de Tf humana
RTf2	Receptor de Tf humana soluble
TRITC	isotiocanota de tetrametilrodamina
TRK	Receptores tirosin-cinasa
VSG	glicoproteína variable de superficie

## RESUMEN

La transferrina es una glicoproteína extracelular presente en el suero, capaz de unir dos átomos de hierro. La endocitosis de esta proteína como fuente de hierro puede ser de gran importancia para la sobrevivencia del protozoario parásito *Entamoeba histolytica* durante la infección del cuerpo humano. El estudio de las rutas intracelulares de holoTf se realizó usando la microscopía confocal por búsqueda con láser y anticuerpos heterólogos contra los componentes de endosomas tempranos, tardíos y lisosomas. La proteína férrica sigue la ruta endosoma/lisosomal. Las proteínas marcadoras de endosomas y lisosomas se identificaron en extractos de proteína total de la ameba usando estos anticuerpos. El éxito como parásito de un organismo primitivo como *E. histolytica* puede deberse parcialmente a la habilidad de usar el hierro dentro del hospedero, elemento vital para la ameba.

*Entamoeba histolytica* es capaz de utilizar holoTf como única fuente de hierro in vitro. El mecanismo desarrollado por este parásito para obtener el hierro es a través de la endocitosis en vesículas cubiertas de clatrina. Una proteína que une holoTf (*EhTfbp*) se purificó usando un anticuerpo monoclonal anti-Receptor de Tf de humano. *EhTfbp* se identificó por espectrometría de masas como la acetaldéhidol/alcohol deshidrogenasa-2 (*EhADH2*), una enzima dependiente de hierro; *EhTfbp* y *EhADH2* unen holoTf y son reconocidas por los anticuerpos anti-RTf y anti-*EhADH2* indicando que se trata de la misma proteína. La endocitosis de holoTf puede estar regulada por la actividad de tirosin-cinasa que lleva a la señalización para el crecimiento del parásito cuando coloniza e invade la mucosa intestinal e hígado de su hospedero, al llevar la señalización hacia crecimiento y proliferación.

## ABSTRACT

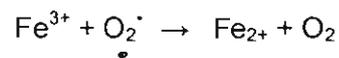
Transferrin is an extracellular glycoprotein present in serum capable of binding two ferric-iron atoms. The endocytosis of this protein as iron source may be important for the survival of the parasitic protozoan *Entamoeba histolytica* during the infection of the human body. A study of the intracellular routes of holoTf was performed using confocal laser-scanning microscopy and heterologous antibodies against typical components of early endosomes, late endosomes, and lysosomes. The ferric protein followed the endosomal-lysosomal route. Distinctive proteins of endosomes and lysosomes were identified in amoeba extracts by immunoblotting techniques using these antibodies. The success as a parasite of a primitive organism such as *E. histolytica* may partially be due to its ability to use several iron sources inside the host, a vital element for amoeba.

*Entamoeba histolytica* is a parasitic protozoan able to use holoTf as a sole iron source in vitro. The mechanism developed by this parasite to scavenge iron is through clathrin coated vesicles endocytosis. An amoebic holoTf binding protein (*EhTfbp*) was purified by using an anti-human transferrin receptor (TfR) monoclonal antibody. *EhTfbp* was identified by mass spectrometry as the acetaldehyde/alcohol dehydrogenase-2 (*EhADH2*), an iron-dependent enzyme; both *EhTfbp* and *EhADH2* bound holoTf, and were recognized by the anti-human TfR and anti-*EhADH2* antibodies indicating that they correspond to the same protein. The holoTf endocytosis could be regulated by tyrosine-kinase signalling to the parasite growth when it colonises and invades the intestinal mucosa and liver.

## INTRODUCCIÓN

El hierro (Fe) es el cuarto metal más abundante en la corteza terrestre, representa casi el 5%. La mayoría de los organismos aerobios, desde bacterias hasta seres humanos, necesitan del Fe para sobrevivir, ya que es indispensable para sus funciones celulares, tales como el transporte de electrones en la cadena respiratoria y el metabolismo de energía, síntesis de proteínas, así como en el control del crecimiento celular, mediado por la enzima ribonucleótido reductasa, que cataliza la transformación de ribonucleótidos a desoxi-ribonucleótidos que llevan a la síntesis de ADN.

Sin embargo, a concentraciones muy altas el Fe es un peligroso pro-oxidante, al producirse iones superóxido y radicales hidroxilo, mediante la reacción de Fenton:



Los radicales libres atacan toda clase de macromoléculas, produciendo la peroxidación de lípidos, daño al ADN y a proteínas, despolimerización de polisacáridos, inactivación de enzimas y otras actividades citotóxicas (Halliwell y Gutteridge, 2007; Weinberg, 2009).

El papel fundamental del Fe en el metabolismo celular y su potencial toxicidad al generar radicales libres provocando daños irreversibles implica que el metabolismo de este metal debe ser un proceso altamente regulado (Qian y Tang, 1993; Andrews 2000; Weinberg, 2009). Aun pequeñas variaciones en el metabolismo del Fe dan lugar a la falta o al exceso del mismo y ambas situaciones tienen consecuencias dañinas para el organismo (Halliwell y Gutteridge, 2007).

En mamíferos el Fe está unido a proteínas, dejando sólo una concentración extremadamente baja de Fe libre ( $10^{-18}$  M). La mayor parte de los iones de Fe se encuentra almacenada intracelularmente en la ferritina o formando parte de la hemoglobina, que es la proteína con Fe más abundante

en la naturaleza, pues el Fe se utiliza para acarrear el oxígeno. Extracelularmente se le puede encontrar en la proteína lactoferrina (Lf), que se localiza en secreciones externas como saliva, lágrimas y leche y también dentro de neutrófilos y monocitos donde está presente en altas concentraciones. En el suero está presente la proteína transferrina (Tf), con el Fe unido con alta afinidad (aproximadamente con una constante de asociación de  $10^{-36}$  M).

En células eucariontes, por ejemplo las de mamífero, la Tf une dos átomos de  $\text{Fe}^{3+}$  por cada molécula que tiene una masa molecular de 80 kDa. Es una glicoproteína mayormente sintetizada en el hígado. La Tf férrica se une a su receptor específico presente en la membrana citoplásmica. El complejo holoTf-receptor de transferrina (RTf) es endocitado en vesículas cubiertas de clatrina (Gutierrez y Wessling-Resnick, 1996) y llevado a endosomas donde el Fe es liberado, ya que debe atravesar la bicapa lipídica endosomal para ser utilizado en las vías metabólicas celulares. La Tf sin Fe (apoTf), junto con su receptor, es llevada a la superficie para iniciar un nuevo ciclo de internalización una vez que vuelva a unir Fe.

La mayoría de los receptores son glicoproteínas transmembranales cuya función es comunicar la información externa hacia el interior de la célula. El RTf juega un papel muy importante en el control de la internalización del Fe para las funciones celulares específicas. Consiste de dos subunidades idénticas de 90 kDa cada una, organizadas en tres dominios: extracelular, transmembranal e intracelular.

Estudios recientes demuestran que en la endocitosis de holoTf a través de receptor, la actividad de proteína-quinasa juega un papel muy importante, pues es necesario que al unirse el ligando del receptor se favorezca la dimerización y la autofosforilación para que se lleve a cabo la endocitosis, característica principal del receptor tirosín-quinasa (RTK) clase II (Kuivinen et al., 1993; Malorni et al., 1998; Testa, 2002). De manera tal que la actividad de tirosín-quinasa modula la velocidad de entrada del receptor de holoTf en los procesos de internalización.

La endocitosis del receptor de Tf incluye varios pasos, en primer término la formación de las vesículas de clatrina a nivel de la membrana

citoplásmica a través del reclutamiento de la proteína adaptadora 2 (AP-2), después la interacción de esta proteína con secuencias señal de endocitosis presentes en las regiones citoplásmicas de los receptores de Tf y finalmente el complejo Tf-RTf es endocitado en vesículas cubiertas de clatrina.

La función de Tf y Lf como agentes antimicrobianos es ampliamente conocida (Weinberg, 2009) debido a la facilidad de mantenerse parcialmente saturadas, haciendo que la concentración de Fe libre sea extremadamente baja (Richardson and Ponka, 1997).

En todos los ecosistemas biológicos la unión del Fe a las proteínas es tan fuerte que los organismos parásitos no son capaces de obtener la cantidad suficiente de este elemento para mantener su crecimiento. Esta característica de inmunidad innata protege el estado saludable del huésped de la mayoría de los agresores microbianos dependientes de Fe. Durante una infección, los agentes microbianos enfrentan severas limitaciones de Fe impuestas por el huésped, pues el nivel de saturación de la Tf que normalmente es del 30%, baja a sólo 5 ó 10% haciendo que sea más difícil para los patógenos obtener el Fe (Weinberg, 1996).

La capacidad de adquirir Fe por los parásitos dentro del huésped se ha asociado con su virulencia en varios sistemas (Weinberg, 1978; Cornelissen y Sparling, 1994; Gray-Owen y Schryver, 1996; Weinberg, 1999). Esto se explica porque a pesar de la ausencia virtual de Fe, los organismos patógenos son capaces de multiplicarse exitosamente, ya que han desarrollado mecanismos para adquirir el Fe de las proteínas del huésped.

## ANTECEDENTES

Desde 1966, se conoce que las bacterias dañinas como *Staphylococcus aureus*, necesitan Fe del huésped para su crecimiento y producción de energía. A través de la evolución constante, estos invasores desarrollaron varias formas para obtener el Fe, así como también el huésped creó mecanismos para mantener el Fe fuera del alcance de los invasores.

El mecanismo de captación de Fe más directo utilizado por las bacterias patógenas es a través del rompimiento de holoTf, holoLf y hemoglobina por proteasas, destruyendo el sitio de unión del Fe y liberando este elemento.

Otra forma de obtención del Fe es el llamado sistema de transporte de Fe de alta afinidad, que consiste en la producción de compuestos quelantes de Fe de bajo peso molecular llamados sideróforos, que son capaces de quitar el Fe a la holoTf, holoLf o a otros compuestos con hierro, con una constante de asociación de  $10^{-52}$  M y después llevarlo a la célula bacteriana.

El tercer mecanismo por el cual un microorganismo puede obtener el Fe, involucra la entrada del patógeno a las células del huésped para forzarlas a obtener mayor cantidad de Fe, que posteriormente servirá para el crecimiento del invasor.

Un cuarto mecanismo de adquisición es a través de la interacción directa entre receptores específicos sobre la superficie celular bacteriana y la glicoproteína del huésped, holoTf u holoLf, para quitarles el Fe unido a ellas (Testa, 2002; Weinberg, 2003).

Este último mecanismo es utilizado por bacterias patógenas que se multiplican exitosamente en los fluidos corporales. Los géneros mayormente estudiados son *Haemophilus* (Holland et al, 1996; Charland et al., 1995; Jarosik et al., 1995) y *Neisseria* (Genco y Desai, 1996). En estos organismos el proceso de utilización de la holoTf es dependiente de energía y no requiere que la holoTf sea internalizada propiamente. Este proceso está mediado por

dos complejos, formados cada uno por dos proteínas localizadas en la superficie celular, Tbp1 de 95-100 kDa, la cual es transmembranal y Tbp2, de 65 – 85 kDa, una proteína presente en la superficie (Gray-Owen y Schryvers, 1996; Genco y Desai, 1996; Holland et al., 1996; Gorringer et al., 1995; Cornelissen, 1994; Testa, 2002).

Las especies de los géneros mencionados presentan una total especificidad por la holoTf de su huésped, ya que no pueden desarrollarse en un medio con falta de holoTf o en presencia de holoTf de otro origen; además el complejo proteico bacteriano tiene un alto potencial antigénico cuando se ha probado con sueros de organismos infectados, por lo que actualmente se evalúa la posibilidad de utilizar este sistema de proteínas de unión a holoTf en la producción de vacunas, esto es particularmente relevante para *N. meningitidis* (Ferreiros et al., 1994).

Este mecanismo descrito en *Neisseria* se ha encontrado en otros organismos como por ejemplo: *Actinobacillus suis* (Bahrani et al., 2003), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Bog et al., 2001), *Staphylococcus aureus* (Taylor y Heinrichs, 2002), *Staphylococcus epidermidis* (Modeen et al., 1998) y *Moraxella catarrhalis* (Aebi et al., 1996), entre otros.

La obtención del Fe por los protozoarios parásitos no ha sido muy estudiada. Hasta el momento los parásitos más estudiados son *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*, en donde no se han encontrado sideróforos, sin embargo, presentan una proteína específica para la unión e internalización de la holoTf. Primero se observó que el exceso o la falta de Fe afectan la patogenicidad y el crecimiento del parásito dentro de los macrófagos peritoneales. Posteriormente se encontró que durante el estadio de amastigote extracelular en el torrente sanguíneo del huésped el parásito presenta un receptor para holoTf (RTf). Este receptor está constituido por un heterodímero de proteínas presentes en cantidades equimolares, codificadas por los genes ESAG6 y ESAG7. Estos genes están asociados al sitio de expresión telomérico de los genes de la glicoproteína variable de superficie (VSG), la cual es muy importante en los tripanosomas para escapar del sistema inmune del huésped.

El receptor para holoTf se forma de la siguiente manera: ESAG7 codifica para una proteína intracelular de 42 kDa que permanece adherida a la superficie del tripanosoma a través de la unión con la subunidad codificada por ESAG6, que es una proteína de 52 kDa asociada a la superficie celular a través del glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), presente en la región C-terminal. La secuencia de aminoácidos de estas proteínas es casi idéntica, sólo varían en que ESAG7 carece del dominio GPI (Bitter et al., 1998; Steverding, 2000).

Cada tripanosoma posee 3,000 sitios de unión para holoTf, localizados selectivamente a nivel de la bolsa flagelar, región de la membrana que utiliza el parásito para concentrar los nutrientes. En *T. brucei* al unirse la holoTf a su receptor, el complejo se internaliza y se transporta hacia endosomas tempranos y tardíos, para luego dirigirse hacia los lisosomas, donde la Tf es probablemente degradada proteolíticamente para obtener el Fe y también utilizar a la Tf como fuente de aminoácidos (Borst et al. 1996; Salmon et al 1997; Steverding, 2000).

Los productos de degradación son liberados de la célula mientras que el Fe permanece asociado a ella. El receptor es reciclado a la membrana de la bolsa flagelar, listo para reiniciar otro ciclo de unión de holoTf (Mauël, 1996; Salmon et al., 1997; Steverding, 2000).

Hay cerca de 20 genes de glicoproteínas variables de superficie en *T. brucei* cada uno de ellos con una copia de ESAG6 y ESAG7 por lo que este parásito puede producir 20 receptores de holoTf diferentes, aunque sólo uno es activo cada vez. El significado biológico de esta variabilidad en el receptor de holoTf es que el parásito ha desarrollado múltiples versiones alternativas de dicho receptor para aumentar su capacidad de infectar varios huéspedes (Bitter et al, 1998; Morgan, 2001; Gerrits, 2002). Estas pequeñas diferencias en la secuencia de los diferentes receptores tienen efecto en la afinidad con que pueden unir la holoTf de diferentes especies de mamíferos y en su capacidad para crecer en ellos.

La obtención de Fe de la holoTf a través del RTf también se ha observado en otros protozoarios como *Leishmania infantum*, *Leishmania chagasi* y *Leishmania donovani*. En este último parásito se sabe que el RTf pesa 70 kDa y a diferencia de lo observado en *Trypanosoma* no forma dímeros,

pero una holoTf con alta afinidad. Algunas especies de *Leishmania* pueden utilizar hemina y lactoferrina como fuentes de Fe alternas, lo que les permite sobrevivir en diferentes ambientes dentro de sus huéspedes, tanto mamíferos como insectos (Wilson, 1994; Wilson, 2002).

El protozooario parásito intracelular *Plasmodium falciparum*, aunque se encuentra dentro de los eritrocitos, no utiliza el Fe de la hemoglobina, sino que utiliza la holoTf de su huésped a través de un mecanismo muy interesante. El parásito sintetiza sus receptores y de alguna manera los lleva a la superficie de los glóbulos rojos infectados, los cuales en estado maduro no presentan un RTf. Posteriormente, el receptor junto con la holoTf es internalizado hacia el interior del parásito (Rodríguez y Jungery, 1986; Haldar et al., 1986; Surolia y Misquith, 1996).

### ***Entamoeba histolytica* (Shaudinn 1903)**

*Entamoeba histolytica* es el protozooario parásito del intestino grueso del hombre causante de la enfermedad denominada amibiasis. Por su morbilidad y mortalidad se le considera un problema de salud pública, dado que la prevalencia a nivel mundial es del 10%, alcanzando un 50 a 80% en países con poco desarrollo y zonas tropicales (Sánchez y Mújica, 2009). Es la causa de 50 millones de casos de colitis amibiana y absceso hepático, que producen 100,000 muertes por año, la mortalidad es del 0.1 – 0.25% (Haque et al., 2003; Huston, 2004; Marion y Guillén 2006; Sánchez y Mújica, 2009).

La amibiasis extraintestinal está concentrada en pocos lugares del mundo, como México, Sudamérica, sur de Asia, sudeste y oeste de África. En México presenta una incidencia de 498.5 casos por cada 100,000 habitantes. Siendo el Estado de Tabasco el de mayor prevalencia con 1,457.2 casos por cada 100,000 habitantes, seguido de Oaxaca con 1,278.0, Campeche con 1,187.0 y Guerrero con 1,149.7 (Sánchez y Mújica, 2009).

Al igual que la mayoría de los organismos vivos, este protozooario necesita obtener hierro (Diamond et al., 1978b; Serrano-Luna, 1998a) para llevar a cabo funciones tan importantes como la síntesis de ADN.

Los trofozoítos de *E. histolytica* se multiplican extracelularmente en el intestino del huésped (Fig. 1), donde fagocita bacterias que residen en el colon, células del sistema inmune y eritrocitos, esta es su principal característica de virulencia (Tsutsumi, 1992). Posteriormente puede invadir el tejido conectivo para llegar al torrente sanguíneo donde su sobrevivencia depende de la entrada de solutos y macromoléculas del huésped. Finalmente viaja hacia algún otro órgano blanco como hígado o pulmón, donde puede establecer la infección. En este proceso, *E. histolytica* se encuentra en contacto con diferentes moléculas del huésped que contienen hierro. Debido a eso, este parásito ha desarrollado diferentes mecanismos para obtener el Fe de las proteínas del huésped que puede ir encontrando en su recorrido, tales como hemoglobina, en los eritrocitos fagocitados (Serrano-Luna et al., 1998b), holo-lactoferrina, en la mucosa intestinal (León-Sicairos et al., 2005), ferritina, en el hígado (López-Soto, 2009) y holo-transferrina en el torrente sanguíneo (Reyes-López et al., 2001).

Para el establecimiento de la infección y por tanto de la virulencia y la patogénesis del parásito, es muy importante que lleve a cabo la fagocitosis de bacterias y eritrocitos. En este proceso participan receptores específicos que reconocen los ligandos en la superficie de los trofozoítos, que activan y regulan a su vez este mecanismo, así como el tráfico vesicular y la degradación de proteínas (Okada, 2005; Mitra, 2006). También las proteínas del citoesqueleto, tienen un papel muy importante en la virulencia (Marion, 2005).

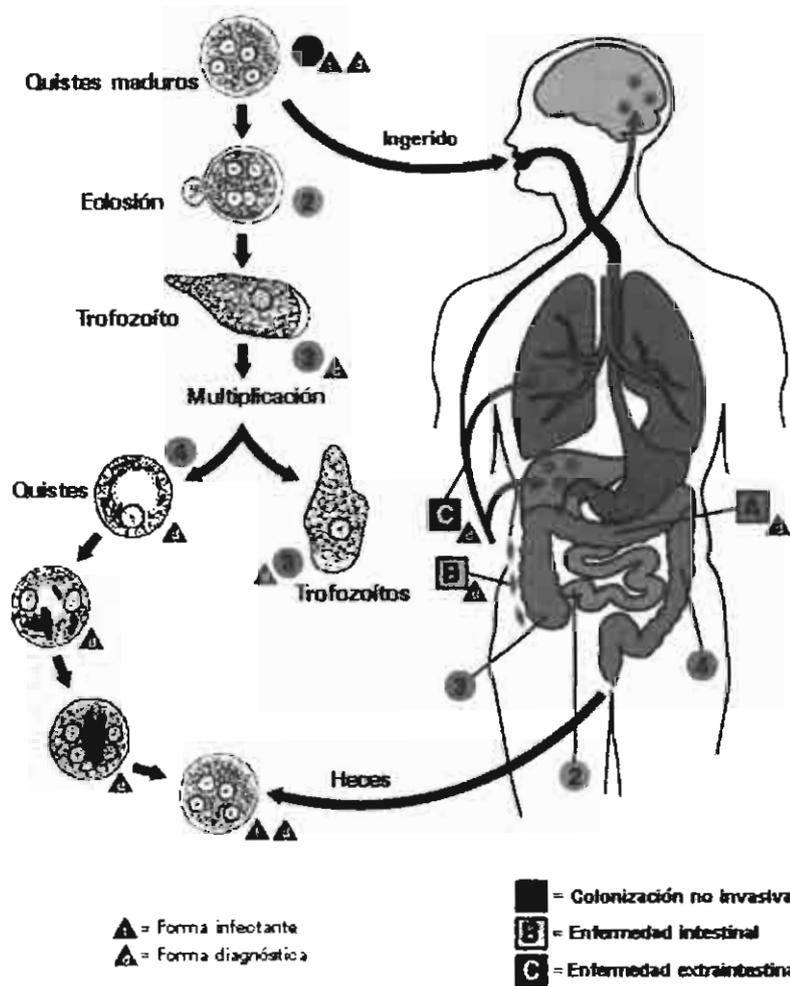


Fig. 1. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*.

Otro proceso del parásito también muy importante para llevar a cabo la invasión del huésped es la exocitosis de enzimas hidrolíticas y de las proteínas que intervienen en la formación del ameboporo, que participan en la patogénesis (Mirelman, 1987; Ravdin, 1995; Gosh et al., 1999; Welter et al., 2002; Bracha, 2002; Maning-Cela et al., 2003).

La importancia de las actividades exocíticas y fagocíticas de los trofozoítos de *E. histolytica* es innegable, pues éstas le confieren la capacidad para enfrentar diversos microambientes en el proceso invasivo. De la misma manera, la endocitosis de macromoléculas es otro aspecto muy importante para la amiba. Partiendo del hecho de que en las células de mamíferos a través de la endocitosis se llevan a cabo varias tareas biológicas básicas, en donde destaca la obtención de nutrientes, indispensables para cualquier organismo (Robibaro, 2001), es lógico pensar que la endocitosis de nutrientes es también un mecanismo biológico crucial en este parásito. Por medio de la endocitosis este parásito obtiene moléculas del huésped, que le van a permitir multiplicarse y colonizarlo. HoloTf es una proteína que le permite utilizar el Fe del huésped, por lo que resulta necesario el estudio de sus mecanismos de internalización y utilización.

Hasta el momento no se conocen la morfología y la dinámica de los compartimentos endosomales en este protozoario. Se ha encontrado que en la vía secretoria los compartimentos vesiculares son muy similares a los de las células eucarióticas, por lo que se puede asumir que en la endocitosis podría estar sucediendo lo mismo y encontrarse cierta homología. Varias proteínas muy conservadas en eucariontes que participan activamente en el proceso endocítico se han descrito en las amibas, como es el caso de la clatrina, proteína de recubrimiento vesicular (Tovar et al., 2000; López-Soto et al., 2009) y las proteínas Rab de reconocimiento entre las vesículas (Gosh et al., 1999; Temesvari et al., 1999; Batista et al., 2000; Juárez et al., 2001; Welter et al., 2002; McGugan y Temesvari, 2003; Marion et al., 2005).

En un trabajo previo, nosotros encontramos que *E. histolytica* es capaz de crecer en un medio con holoTf como única fuente de Fe (Reyes-López et al., 2001). Para obtener el Fe de la holoTf el trofozoíto posee una proteína para unir holoTf (*EhTfbp*), formada por dos monómeros de 70 kDa

cada uno. Estas proteínas que unen holoTf fueron identificadas en su forma dimérica por un anticuerpo monoclonal dirigido contra el RTf humano. Dichas proteínas se encuentran localizadas en la membrana citoplásmica del trofozoito donde se une la holoTf cuando las amibas son incubadas con esta proteína formando el complejo transferrina-proteína de unión a transferrina (Tf-EhTfbp) (Reyes-López et al., 2001).

Por microscopía confocal observamos la internalización de este complejo en los primeros 15 min de incubación. Posteriormente, a los 30 min el complejo empieza a disociarse, por lo que se pueden observar vesículas con Tf, o con la proteína de unión únicamente y vesículas con el complejo (Reyes-López et al., 2001). Es necesario realizar más estudios para poder conocer el proceso de obtención de Fe dentro de la célula, una vez que la holoTf es internalizada y la probable degradación y utilización de la misma. Por otro lado, sus requerimientos de Fe, se puede estudiar el potencial terapéutico de la utilización de quelantes de Fe o de la regulación de la concentración de Fe externo.

El estudio de la internalización de la holoTf, al ser ésta una proteína con la que los trofozoitos de *E. histolytica* tienen contacto en el huésped, puede ser muy útil para poder identificar las estructuras vesiculares involucradas en la endocitosis y degradación de diferentes proteínas. Por otro lado, al conocer el o los receptores amibianos involucrados en el reconocimiento de proteínas del huésped como la holoTf, se puede investigar si presentan potencial antigénico para ver su utilidad en la producción de vacunas o para el diagnóstico de la amibiasis.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La endocitosis es un proceso muy importante para el crecimiento del parásito y para establecer la infección, pues le confiere la capacidad de obtener y utilizar nutrientes indispensables como el hierro. La utilización de las proteínas del huésped para este fin, se considera una característica asociada a la virulencia y favorece la patogénesis.

Debido a esto es necesario conocer la proteína involucrada en el reconocimiento e internalización de la holoTf, el proceso de endocitosis, las estructuras vesiculares que participan, los eventos de señalización desencadenados por el receptor y la participación de proteasas en este parásito de gran importancia en salud pública.

Este trabajo aumentará el conocimiento sobre la enfermedad y la relación entre el huésped y el parásito, conocimiento que servirá en un futuro para la probable aplicación con fines terapéuticos, de diagnóstico o de prevención.

## JUSTIFICACIÓN

El proceso de endocitosis es muy importante para la obtención de nutrientes y el crecimiento de *Entamoeba histolytica* durante el establecimiento de la infección. Por tanto, se requiere conocer este proceso y saber la secuencia de eventos relacionados con la internalización de la holotransferrina para la obtención del hierro. Lo que permitirá entender mejor la patogénesis del parásito y la relación de este proceso con su virulencia.

## HIPÓTESIS

En *Entamoeba histolytica* la holotransferrina es internalizada por un proceso endocítico semejante al descrito en células eucariontes superiores, en el que podrían estar participando la clatrina y un receptor o proteína de unión. Este proceso de endocitosis podría ser dependiente de tirosín-cinasa (TRK), que requeriría de que el receptor sea fosforilado para producir la señal para la internalización del ligando. La transferrina internalizada sería transportada por el sistema vesicular para obtener el Fe y posteriormente sería degradada por el parásito.

## OBJETIVO

Conocer el mecanismo de endocitosis de la holotransferrina humana en el parásito *Entamoeba histolytica*, así como algunas de las proteínas y estructuras vesiculares que participan en este proceso celular.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- I. Identificar las diferentes estructuras vesiculares presentes en *Entamoeba histolytica* que participan en la endocitosis de holoTf.
- II. Aislar e identificar la proteína amibiana que une holoTf (*EhTfbp*).
- III. Determinar si la proteína de unión a transferrina de *E. histolytica* (*EhTfbp*) es un receptor del tipo tirosín-cinasa.
- IV. Identificar otras proteínas que pudieran participar en la transducción de señales inducida por la unión del ligando a la proteína de unión (*EhTfbp*).
- V. Determinar si las proteasas de *E. histolytica* son capaces de degradar la transferrina humana.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Cultivo

Los trofozoítos de *Entamoeba histolytica* cepa HM-1:IMSS se cultivaron axénicamente en medio BI-S-33 (Dibico, México) (Diamond et al. 1978a) suplementado con 16% (v/v) de suero de ternera previamente descomplementado (Microlab, México). Los cultivos se mantuvieron en tubos de 12 ml con tapa de rosca a 37 °C durante 48 h. Después de este tiempo las amibas se pusieron en un baño de hielo durante 10 min para que se despegaran del vidrio y se centrifugó a 500 x g por 5 min. Las amibas se incubaron en medio sin suero por 6 h y antes de iniciar el experimento se lavaron con PBS. Se utilizaron epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* como parásito control para el estudio de las proteínas lisosomales; los epimastigotes se cultivaron en medio LIT, conteniendo 10% (v/v) de suero fetal bovino (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), suplementado con 25 mg/l de hemina (Sigma) at 27 °C. Las proteínas holoTf y holo-Lf son de origen humano y se compraron a Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, USA).

### **1. Identificación de las diferentes estructuras vesiculares presentes en *Entamoeba histolytica* que participan en la endocitosis de holotransferrina**

#### **1.1. Efecto de inhibidores de endocitosis en la internalización de holotransferrina en *Entamoeba histolytica***

Para determinar el tipo de endocitosis por el que la holoTf es internalizada en *E. histolytica*, se utilizaron varios inhibidores específicos como sacarosa y difosfato de cloroquina, utilizados para inhibir la vía de endocitosis dependiente de una proteína de unión y de clatrina; filipina, inhibidor de la vía de endocitosis a través de caveola; colchicina para despolimerizar

microtúbulos; citocalasina D, que inhibe la polimerización de los filamentos de actina y wortmanina inhibidor de inositol 3-fosfato.

Primero se estableció la concentración máxima del inhibidor para usarse sin afectar la viabilidad de los trofozoítos. La viabilidad se midió con el colorante vital azul de tripano (0.45% concentración final) y se observó bajo microscopía de luz en la cámara de Neubauer.

Un número de amibas fijo ( $1 \times 10^6$  células/ml) se incubó por 30 min a 37 °C con varias concentraciones de los inhibidores: sacarosa al 1-10%; difosfato de cloroquina 0.5-100 mM; filipina 0.1-10  $\mu$ M; colchicina 1-2  $\mu$ M; citocalasina D 10  $\mu$ M y wortmanina 50-300  $\mu$ M. Posteriormente, se adicionó medio fresco con holoTf marcada con isotiocianato de fluoresceína (holoTf-FITC), preparada como está reportado en Reyes-López et al. (2001), a una concentración constante de 1.15  $\mu$ M y la misma concentración de los inhibidores probados y se incubaron las células por otros 30 min. Terminado el tiempo de incubación las amibas se fijaron con paraformaldehído al 2% (concentración final) durante 30 min, se lavaron y se prepararon para su análisis en el citómetro de flujo (FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Para la observación en microscopía confocal de los trofozoítos tratados con los inhibidores se siguió la misma metodología descrita arriba, excepto que en este caso se dejaron adherir a los portaobjetos durante 15 min a 37 °C antes de adicionar los inhibidores y la holoTf-FITC. Posteriormente, las amibas se fijaron, se lavaron, se montaron en el cubreobjetos con Vectashield y se examinaron usando el microscopio confocal Leica TCS-SP2.

## 1.2. Localización de clatrina y su probable interacción con holotransferrina en *Entamoeba histolytica*

Para observar la localización de la proteína clatrina dentro de la célula, los trofozoítos se crecieron durante 48 h en medio de cultivo. Posteriormente se transfirieron a medio basal sin suero y se mantuvieron así por 6 h, se enfriaron en hielo por 10 min y se centrifugaron durante 5 min. Se fijaron con

paraformaldehído al 2% por 30 min, se permeabilizaron con Triton-X100 al 0.5% durante 10 min y se incubaron con el anticuerpo anti-clatrina de cerebro de bovino (Cat. No. C8034, diluido 1:50) por 1 h a 37 °C. Luego, se adicionó el anticuerpo secundario anti-conejo IgG acoplado a isotiocianato de tetrametil-rodamina (TRITC) (1:50) y se incubaron las células por 2 h. Las amibas se montaron en los portaobjetos con Vectashield y se examinaron usando el microscopio confocal. Se incluyó como control negativo el anticuerpo secundario para probar la especificidad de la reacción.

Una vez localizadas las estructuras endocíticas que contienen clatrina y para saber si estas estructuras están involucradas con la internalización de holoTf, los trofozoítos ( $2 \times 10^5$ ) se incubaron por diferentes periodos de tiempo con holoTf-FITC 1.15  $\mu$ M. Los trofozoítos se fijaron y permeabilizaron para la reacción con el anticuerpo anti-clatrina como se mencionó arriba, para enseguida ser observados en el microscopio confocal.

### 1.3. Identificación de vesículas de la vía endosomal/lisosomal en *Entamoeba histolytica*, usando anticuerpos dirigidos contra proteínas relacionadas en otras células eucariontes

Para saber si *Entamoeba histolytica* presenta las vesículas observadas en células eucariontes como endosomas tempranos, tardíos y lisosomas, los trofozoítos cultivados durante 48 h se transfirieron a medio basal sin suero y se incubaron durante 6 h más. Posteriormente, se enfriaron en hielo por 10 min y se centrifugaron 5 min. Se obtuvieron las proteínas totales de los trofozoítos en presencia de una mezcla de inhibidores que contenía: p-hidroxi-mercuri-benzoato (PHMB), fenil-metil-sulfonil fluoruro (PMSF), ácido etilenglicol-bis (2-amino-etil-éter)-N,N,N',N',-tetra-acético (EGTA) y N-etil-maleimida (NEM). Las proteínas se separaron (40  $\mu$ g por pozo) en electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Las proteínas amibianas obtenidas se transfirieron (400 mA, 1 h) a membranas de nitrocelulosa usando amortiguador de transferencia que contenía: tris 25 mM, glicina 192 mM, 20% de metanol y 0.4% de CHAPS. La

membrana se bloqueó por 1 h con TBS-Tween-leche descremada al 4% (Tris-salina amortiguada: Tris 100 mM, NaCl al 0.9% y Tween-20 al 0.1%).

Cuatro membranas en estas condiciones se incubaron con cada uno de los siguientes anticuerpos: anti-antígeno 1 de endosomas tempranos (EEA1) (Affinity Bioreagents, Cat. No. PA1-063, 1:40), para detectar estas vesículas; para endosomas tardíos, se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-receptor de manosa 6-fosfato de bovino (MPR) (Affinity Bioreagents, Cat. No. MA1-066, diluido 1:40) y para lisosomas se usó el anticuerpo anti-proteína-1 asociada a la membrana de lisosomas de humano (LAMP-1) (Pharmigen, Cat. No. 34201A, diluido 1:80). También se utilizó el anticuerpo anti-proteína-2 asociada a la membrana de lisosomas de rata (LAMP-2) (Zymed, cat no. 51-2200, diluido 1:100), en las mismas condiciones de incubación.

El color se reveló con 3'-3 diamino-bencidina o con luminol para quimioluminiscencia. Se utilizó como control positivo la proteína total de *Trypanosoma cruzi*, por su cercanía con *T. brucei* donde se ha reportado la presencia de proteínas relacionadas con el lisosoma (Brickman y Balber, 1994; Alexander et al., 1995; Tazeh y Bangs, 2007). El cultivo de *T. cruzi* fue donado por el Dr. José Luis Rosales, del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Cinvestav-IPN. La proteína total se obtuvo del mismo modo que para *E. histolytica*.

#### 1.4. Inmunomarcaje de los compartimentos endocíticos en *Entamoeba histolytica* para microscopía confocal

Las mismas proteínas identificadas en los extractos proteicos se utilizaron para localizarse dentro de la amiba por microscopía confocal. Los trofozoitos ajustados a un número de  $2 \times 10^5$  células/ml fueron adheridos a los portaobjetos, se fijaron con paraformaldehído al 2% por 30 min y se permeabilizaron con Triton-X100 al 0.5% durante 10 min. Luego se incubaron con los anticuerpos anti-EEA1, MPR, o LAMP-1, descritos arriba, durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, las amibas se lavaron y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes: anti-conejo acoplado a CY5 (Cy-

dye N-hydroxyl-succinimide ester), anti-ratón-CY5 o anti-conejo-TRITC (1:50) y se incubaron por 2 h. Se montaron con Vectashield y se examinaron en el microscopio confocal.

Para probar si la holoTf internalizada puede localizarse junto a las proteínas típicas de los diferentes tipos vesiculares, las amibas se adhirieron a los portaobjetos y se incubaron a diferentes tiempos con holoTf-FITC 1.15  $\mu$ M a 37 °C. Luego se fijaron, se permeabilizaron y se incubaron con los mismos anticuerpos mencionados anteriormente, por 1 h a 37 °C y posteriormente se adicionaron los anticuerpos secundarios acoplados a TRITC o CY5 para detectar las vesículas; las muestras se lavaron y se prepararon como se describió anteriormente. Se incluyó un control negativo con la presencia de únicamente el anticuerpo secundario.

## **2. Aislamiento e identificación de la proteína que une holotransferrina de *Entamoeba histolytica* (EhTfbp)**

### **2.1. Purificación de la proteína de unión de holotransferrina de *Entamoeba histolytica*, EhTfbp**

Las amibas cultivadas durante 48 h se incubaron por 6 h más en medio basal sin suero. Posteriormente se enfriaron en hielo, se centrifugaron por 5 min a 500 x g y se resuspendieron en una mezcla de inhibidores descrita anteriormente: pHMB, NEM, PMSF y EDTA con tritón X-100 al 1% en Hepes 50 mM, de pH 7. Las amibas se rompieron con 5 ciclos de congelación y descongelación. Se cuantificó la concentración de proteína por el método de Bradford (1976), se hicieron muestras alícuotas de 500  $\mu$ g de proteína y se les adicionó 5  $\mu$ g del anticuerpo monoclonal anti-Receptor de Transferrina humano clona H68.4 (Zymed, cat. 13-6800).

La mezcla se incubó en agitación toda la noche a 4°C, posteriormente se adicionaron 15  $\mu$ l de proteína A acoplada a Sefarosa y se incubó nuevamente a 4°C. Se lavó con Tris-HCl 50 mM de pH 7.5, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 al 1%, desoxicolato de sodio al 0.5% con inhibidores, se

centrifugó 20 s a 12,000 x g. Se lavó nuevamente con el mismo amortiguador anterior pero con NaCl 500 mM y con desoxicolato de sodio al 0.05% y se centrifugó. Finalmente, se volvió a lavar con este amortiguador sin NaCl y se centrifugó. El inmunoprecipitado se corrió en electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10% después de hervir la muestra durante 5 min en presencia de 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol.

Para probar si la proteína purificada conservó la capacidad de unir holoTf, se corrió en electroforesis y se transfirió a membrana de nitrocelulosa. Después de bloquearse, se adicionaron 100  $\mu$ g/ml de holoTf y se incubó toda la noche a 4°C en agitación. La membrana se lavó 2 veces y se incubó con el anticuerpo anti-Tf humana (diluído 1:100) por 2 h a 37°C y luego se lavó y se incubó con el anticuerpo secundario peroxidado anti-conejo. Posteriormente, se reveló con 3-3' diamino-bencidina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La banda de proteína inmunoprecipitada obtenida en gel teñido con azul de Coomassie se cortó para su análisis posterior por espectrometría de masas.

## 2.2. Espectrometría de masas

Para identificar la proteína inmunoprecipitada con el anticuerpo anti-receptor de transferrina humana, la banda obtenida en la electroforesis se cortó del gel, se destiñó con acetonitrilo al 50% en bicarbonato de amonio 2.5 mM, con dos cambios de 2 h cada uno, hasta que el pedacito de gel se observó blanco-transparente. Luego se deshidrató con acetonitrilo puro, se hicieron dos cambios de 10 min cada uno.

Posteriormente se trató la proteína con DTT 15 mM y se dejó en estas condiciones reductoras por 30 min. Esta solución se cambió por iodoacetamida 100 mM para producir la alquilación, lo que se hizo por 30 min protegido de la luz. Se extrajo esta solución y se adicionó acetonitrilo para deshidratar por 5 min. Se removió nuevamente esta solución y se hidrató con bicarbonato de amonio 50 mM, incubándola por 10 min. Se repitió nuevamente la deshidratación y se secó al vacío.

La digestión con tripsina se llevó a cabo incubando durante 30 min en hielo y agitando esporádicamente. Pasado este tiempo se quitó el sobrenadante, se adicionó bicarbonato de amonio 5 mM y se incubó toda la noche a 37°C. Después de esto se adicionó bicarbonato de amonio 5 mM, se incubó por 10 min y se agitó para después centrifugar por 30 seg. Se colectó el sobrenadante transfiriéndolo a un tubo nuevo.

Al pedacito de gel sobrante se le adicionó amortiguador de extracción, el cual contenía acetonitrilo, agua desionizada y ácido fórmico, con el que se incubó 10 min y se centrifugó para colectar el sobrenadante. Esto se hizo dos veces, transfiriendo el sobrenadante al tubo utilizado anteriormente.

Se redujo el volumen hasta 10 µl por evaporación en vacío y se adicionaron 10 µl de ácido acético al 1% para inyección en el espectrómetro de masas con una jeringa Hamilton.

### 2.3. Reacción cruzada entre la proteína de unión a holotransferrina, *EhTfbp* y la acetaldeshidrogenasa 2, *EhADH2*, ambas de *Entamoeba histolytica*

Para continuar con la identificación de la *EhTfbp* como *EhADH2*, se hizo un experimento de reacción cruzada con la *EhADH2* purificada y un anticuerpo anti-*EhADH2* (donados por la Dra. Eva Ávila, Instituto de Biología Experimental, Universidad de Guanajuato). Las proteínas *EhTfbp* y *EhADH2* se corrieron en SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, se bloqueó con PBS-Tween-leche descremada (1 h, a temperatura ambiente). La proteína *EhTfbp* se incubó con el anti-*EhADH2* (1:1000) y la proteína *EhADH2* con anti-*EhADH2* y con el anti-RTf humana (1:500), durante 18 h a 4°C. Se hicieron dos lavados de 10 min cada uno y se adicionó el anticuerpo secundario (anti-ratón o anti-conejo peroxidado). Se incubó por 2 h a temperatura ambiente y se reveló por quimioluminiscencia.

Para confirmar el resultado obtenido en el experimento anterior, la proteína purificada *EhADH2* se corrió en geles de 2-dimensiones. El isoelectroenfoco o primera dimensión se llevó a cabo en el sistema IPG-Phor System (Invitrogen) en tiras de pH 6 – 9. La segunda dimensión en SDS-PAGE

al 10%. Dos geles iguales se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con anti-RTf humana (1:500) y anti-*EhADH2* (1:1000), durante 18 hrs a 4°C. Se lavó 2 veces con PBS, se adicionaron los anticuerpos secundarios respectivos y se incubaron 2 h más a temperatura ambiente. Se reveló por quimioluminiscencia.

#### 2.4. Efecto de los anticuerpos anti-acetaldehído/alcohol deshidrogenasa 2 de *Entamoeba histolytica* (anti-*EhADH2*), en la internalización de la holotransferrina

Para saber si los anticuerpos dirigidos contra la *EhADH2* pueden tener un efecto en la internalización de la holoTf, las amibas cultivadas durante 48 h se lavaron, se ajustaron a  $1 \times 10^5$  células/ml en PBS y se incubaron durante 15 min a 37°C con el anti-*EhADH2* a diferentes diluciones: 1:1, 1:10, 1:100 y 1:1000. Posteriormente se adicionaron 100 µg/ml (1.15 µM) de holoTf-FITC y se incubaron por 15 min más a 37°C.

Las amibas se lavaron con PBS y se fijaron por 30 min a temperatura ambiente con paraformaldehído al 2%. Lo mismo se hizo utilizando Lactoferrina-FITC (Lf-FITC) con el anti-*EhADH2* diluido 1:1000 y 1:1. Las amibas se lavaron dos veces con PBS y se prepararon para citometría de flujo.

#### 2.5. Afinidad de unión de holotransferrina humana por la *EhTfbp*. Efecto de la temperatura y la concentración de holotransferrina en células vivas y fijadas en la internalización de esta proteína

Para conocer con qué afinidad se une la holoTf a la *EhTfbp* y qué efecto tiene la baja temperatura en la unión e internalización de la proteína, por la saturación de los sitios de unión, los trofozoítos cultivados durante 48 h de crecimiento se enfriaron en hielo, se lavaron y ajustaron a  $5 \times 10^5$  células/ml en PBS, para incubarse a diferentes concentraciones de holoTf-FITC desde 11.5 fM hasta 115 µM, por 10 min a 37 y a 4°C. Se lavaron con PBS y se fijaron por

30 min con paraformaldehído al 2%. Se lavaron 2 veces con PBS y se analizaron por citometría de flujo.

Para ver si la holoTf puede ser internalizada en células fijadas independientemente de la actividad de una proteína de unión, las amibas se fijaron 30 min con paraformaldehído antes de incubarse con las diferentes concentraciones de holoTf. Posteriormente se trataron de la misma manera y se analizaron por citometría de flujo.

## 2.6. Localización de clatrina, *EhADH2*, *EhTfbp* y holotransferrina en *Entamoeba histolytica*

Para saber si en amibas completas interaccionan clatrina, *EhADH2* y *EhTfbp* en algún momento de la internalización de holotransferrina, un número total de  $2 \times 10^5$  trofozoítos de *E. histolytica* se incubó por diferentes tiempos (0, 2, 5, 10, 15 y 30 min) con holoTf-FITC (115 nM) en medio sin suero. Las muestras se fijaron con paraformaldehído al 2%, durante 30 min, se permeabilizaron con Triton-X100 al 0.5% por 10 min y se incubaron con los diferentes anticuerpos descritos: anti-clatrina, anti-*EhADH2* y anti-*EhTfbp* (diluidos 1:50), adicionados separadamente, por 1 h a 37°C.

Después de lavar, se adicionaron los anticuerpos secundarios anti-conejo o anti-ratón según fuera necesario, acoplados a TRITC y se incubaron por 2 h. Las muestras se lavaron y se montaron con Vectashield en los portaobjetos para observarse en el microscopio confocal.

### 3. Identificación de la familia de receptores a la que pertenece la proteína de unión a holotransferrina de *Entamoeba histolytica*, *EhTfbp*

#### 3.1. Curvas de viabilidad y de crecimiento de *Entamoeba histolytica* con genisteína

El receptor de transferrina humana es del tipo tirosin-cinasa, TRK, pues necesita de fosforilarse en la tirosina para transferir la señal de internalización (Vieira et al., 1996). Para saber si el *EhTfbp* presenta algún o algunos sitios de fosforilación, los cultivos de 48 h de *E. histolytica* se enfriaron y se colectaron por centrifugación, se lavaron 2 veces con PBS, se ajustaron a  $2 \times 10^5$  amibas en 200  $\mu$ l de PBS y se adicionaron diferentes concentraciones de genisteína (Braga y Souza, 2006; Raynal et al., 2007), inhibidor de la fosforilación: 1, 2, 3, 3.7, 11, 20, 37, 111 y 370  $\mu$ M y se incubaron 30 min a 37°C, se cambió PBS nuevo adicionando nuevamente genisteína a la misma concentración que la anterior; se incubó nuevamente por 30 min a 37°C. Terminado el tiempo se adicionó azul de tripano y se contaron las amibas en la cámara de Neubauer.

La viabilidad de los parásitos tratados fue evaluada también por morfología, movilidad y apariencia ultra-estructural.

#### 3.2. Efecto de la genisteína en la internalización de la holotransferrina

Para estudiar el efecto de la genisteína en la internalización de la holoTf se realizó el mismo experimento anterior a una concentración de genisteína de 1, 2, 3, 3.7, 11 y 20  $\mu$ M, en presencia de 100  $\mu$ g/ml de holoTf-FITC. La marca de fluorescencia en el interior de la célula se cuantificó por citometría de flujo y se observó su distribución por microscopía confocal.

#### **4. Reconocimiento de algunas proteínas que pudieran participar en la transducción de señales inducida por la unión del ligando a la EhTfbp**

##### **4.1. Identificación de las proteínas fosforiladas durante la internalización de holoTf y su relación con MAP cinasas**

Para saber si la internalización de la holoTf produce la fosforilación de alguna proteína y esto hacia otros eventos de señalización hacia la vía de crecimiento con la fosforilación de las MAP cinasas, los trofozoitos cultivados por 48 h se enfriaron, se centrifugaron y se incubaron con holoTf durante 30 seg, 1 min, 5, 10, 15, 30 y 45 min y 30 min en presencia de genisteína con y sin holoTf. Al terminar el tiempo de incubación se lavaron las amibas y se obtuvo la proteína total con coctel de inhibidores.

Las proteínas se separaron por PAGE-SDS al 10% y 8%, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, las cuales se incubaron con un anticuerpo anti-fosfotirosina y anti-MAP cinasa, respectivamente, usados a una dilución 1:1000 e incubados toda la noche a 4°C. Utilizamos como control la fosforilación de FAK en presencia de forbol 12, 13-dibutirato. Después se incubó con los anticuerpos secundarios peroxidados correspondientes durante 2 h a temperatura ambiente y se reveló con diaminobencidina o quimioluminiscencia.

#### **5. Identificación de proteasas capaces de degradar holotransferrina humana en *Entamoeba histolytica***

##### **5.1. Electroforesis en geles de substrato**

Para evaluar la presencia de proteasas en *E. histolytica* capaces de degradar a la holoTf humana, seguimos el método de degradación de substrato en gel descrita anteriormente (Serrano et al. 1996). Las amibas cultivadas por 48 h se transfirieron a medio basal sin suero y se incubaron durante 6 h en medio con hierro y sin hierro, se enfriaron en hielo por 10 min y

se centrifugaron por 5 min; la pastilla celular y el sobrenadante se colectaron por separado.

Las células se rompieron por agitación fuerte a 4°C en amortiguador de muestra 2X (Laemmli, 1970) sin inhibidores, ni  $\beta$ -mercaptoetanol. El mismo método se siguió para el sobrenadante después de precipitar las proteínas con 2-propanol (1:1) antes de adicionar el amortiguador de muestra 2X de Laemmli (Laemmli, 1970).

Después de preparar los geles con SDS al 12% usando 0.1% de holoTf humana como sustrato, 10  $\mu$ g de la proteína total de amiba ó 40  $\mu$ g del sobrenadante del medio de cultivo precipitado fueron colocados en el gel. Se llevó a cabo la electroforesis durante 3 h a 100 V a 4°C y se incubó 1 h en Triton X-100 al 2.5% por 1 h. Posteriormente, los geles se incubaron en amortiguador de activación proteolítica (Tris-HCl 1 mM de pH 7.0 y  $\text{CaCl}_2$  10 mM). Los geles se tiñeron con azul de Coomassie para su observación.

Para caracterizar el tipo de proteasas amibianas capaces de degradar la holoTf humana, los geles se incubaron en el amortiguador de activación con alguno de los inhibidores de proteasas: PHMB 50 mM, PMSF 50 mM, o EGTA 125 mM (Serrano-Luna et al, 1998b).

## RESULTADOS

### 1. Identificación de estructuras vesiculares y proteínas relacionadas con la internalización de la holotransferrina

#### 1.1.1. Inhibidores de la endocitosis dependiente de clatrina evitan la internalización de holotransferrina

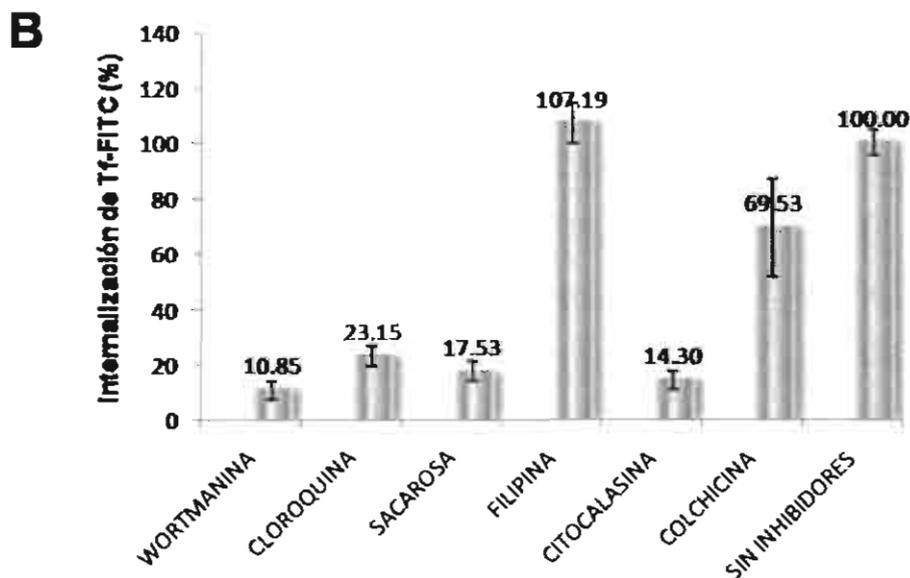
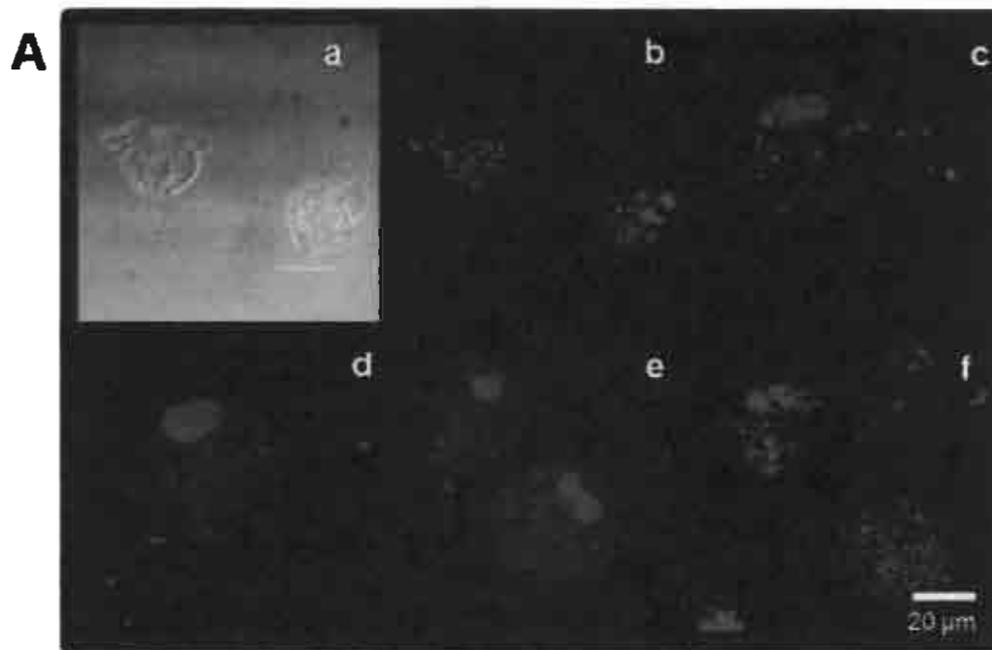
Para saber a través de que vía endocítica es internalizada la holoTf en *E. histolytica*, las amibas se trataron con diferentes inhibidores específicos de cada una de las diferentes vías de endocitosis. La cantidad de holoTf-FITC internalizada se cuantificó por citometría y microscopía confocal (Fig. 2).

Cuando las amibas se incubaron con wortmanina (50  $\mu$ M), inhibidor de la mayoría de las rutas endocíticas en las que participa PI3-K, se afectó la endocitosis de holoTf en un 91%. Lo mismo se observó con inhibidores específicos de la endocitosis dependiente de clatrina, como cloroquina (50 mM) y sacarosa (5%), que bloquearon la entrada de holoTf en un 80% y 85%, respectivamente.

Por el contrario, filipina (10  $\mu$ M), una droga usada para desestructurar las caveolas al secuestrar el colesterol, no afectó la internalización de holoTf.

Las drogas que afectan la estructura del citoesqueleto tales como colchicina (2  $\mu$ M) y citocalasina D (10  $\mu$ M), inhibieron la endocitosis de holoTf en un 30 y 85%, respectivamente.

Estos resultados indican que la internalización de holotransferrina en *E. histolytica* es a través de un proceso de endocitosis dependiente de vesículas cubiertas de clatrina y de una molécula de unión, proceso en el que participan los microfilamentos de actina del citoesqueleto.



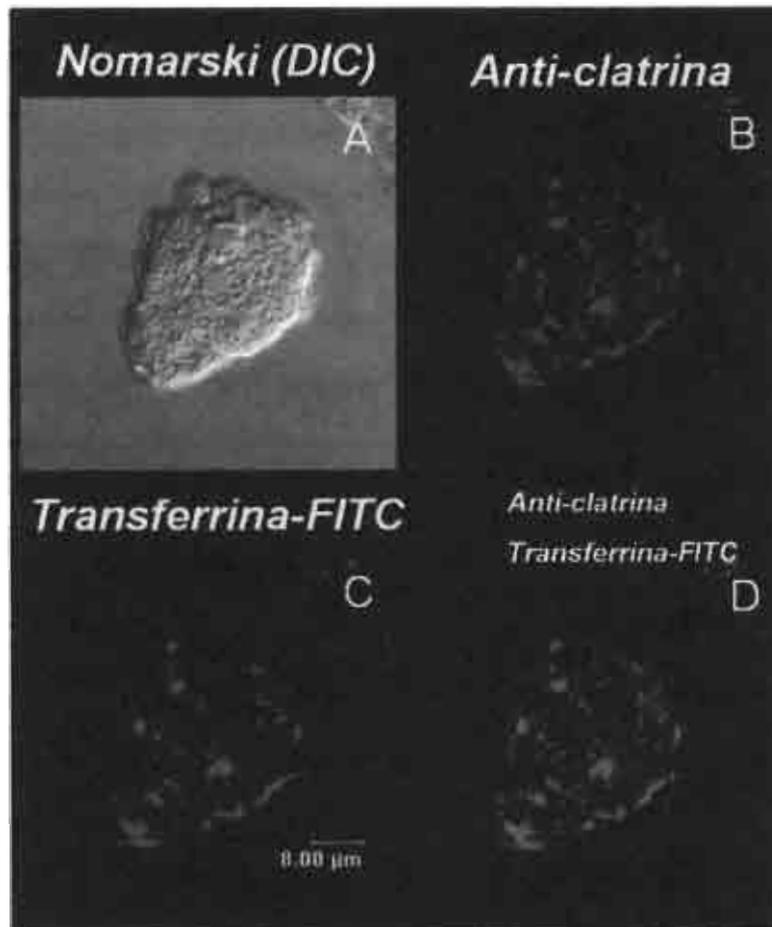
**Fig. 2.** Efecto de los inhibidores de endocitosis en la internalización de holotransferrina. Los trofozoítos ( $10^6$ ) se incubaron con inhibidores y luego con holoTf-FITC  $1.15 \mu\text{M}$ ; después se trataron para observarse en el microscopio confocal (A) y analizarse en citometría (B). (a, b) HoloTf sin inhibidores. (c) Cloroquina  $50 \text{ mM}$ . (d) Sacarosa al  $5\%$ . (e) Wortmannina  $50 \mu\text{M}$ . (f) Filipina  $10 \mu\text{M}$ . Las mismas concentraciones de los inhibidores se usaron tanto para microscopía confocal como para citometría de flujo.

### 1.1.2. Clatrina participa en la internalización de holotransferrina en *Entamoeba histolytica*

Para confirmar que holoTf se endocita a través de vesículas cubiertas de clatrina en *E. histolytica*, se utilizó un anticuerpo anti-clatrina de cerebro de bovino para observar esta proteína en microscopía confocal co-localizando con holoTf.

Los resultados muestran al anticuerpo anti-clatrina reconociendo vesículas principalmente sobre la membrana celular (Fig. 3b, rojo). Al inicio del proceso de internalización de holoTf-FITC (1-3 min), esta proteína (Fig. 3c, verde) se encontró co-localizando con las regiones ricas en clatrina (Fig. 3d, amarillo).

En los periodos de incubación largos (15-45 min), holoTf-FITC y clatrina se encontraron en una distribución diferente sin mostrar co-localización (datos no mostrados). Para probar la especificidad de la reacción, el control negativo utilizado fue el anticuerpo secundario (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que holoTf es internalizada en vesículas recubiertas de clatrina.



**Fig. 3. Co-localización de clatrina y holotransferrina.** Las amibas fueron incubadas en presencia de holoTf-FITC de 1 a 3 min (C, en color verde). Se fijaron, se permeabilizaron y se incubaron con el anticuerpo anti-clatrina (B, en color rojo). La co-localización se observa en D, en color amarillo.

### 1.1.3. Estructuras vesiculares identificadas

Para saber si durante la internalización de holoTf participan estructuras del sistema endosoma/lisosomal en *E. histolytica*, se obtuvieron las proteínas de este parásito, se separaron en electroforesis y después se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Se incubaron con anticuerpos contra endosomas tempranos (anti-EEA1), endosomas tardíos (anti-MPR) y lisosomas (anti-LAMP1 y anti-LAMP2). Los resultados se muestran en la Fig. 4.

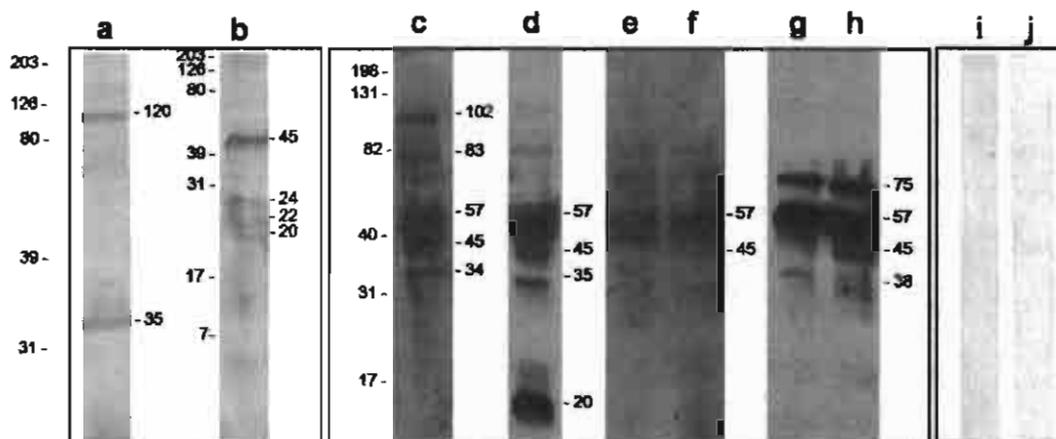
Con el anticuerpo anti-EEA1 se identificaron dos bandas, una de 120 y otra de 35 kDa (Fig. 4, carril a); con el anti-MPR, se observaron cuatro bandas de 45, 24, 22 y 20 kDa (Fig. 4, carril b) y con los anticuerpos anti-LAMP1 y anti-LAMP2, se encontraron bandas de 102, 83, 57, 45 y 34 kDa; y de 57, 45, 35 y 20 kDa (Fig. 4, carril c y d), respectivamente.

Para validar el reconocimiento del anticuerpo utilizamos las proteínas totales de *Trypanosoma cruzi* cepas Y y Brennen, que guardan cierta similitud con las LAMP reportadas en *T. brucei* (glicoproteína (gp) 75, gp42 y gp32 kDa) (Alexander et al. 2002).

Las proteínas totales de *T. cruzi* cepa Y (Fig. 4, carriles e y g) y de la cepa Brennen (Fig. 4, carriles f y h) se incubaron con anti-LAMP1 (Fig. 4, e y f) y anti-LAMP2 (Fig. 4, carriles g y h). El anticuerpo anti-LAMP1 reconoció dos bandas, una de 57 y otra 46 kDa, en ambas cepas y el anti-LAMP2 cuatro bandas de 75, 57, 45 y 38 kDa, en ambas cepas también. Los controles con los anticuerpos secundarios anti-ratón y anti-conejo se muestran en la Fig. 4, carriles i y j. Estos resultados muestran la presencia de proteínas relacionadas con lisosomas en *T. cruzi* y *E. histolytica*, que tienen una masa molecular similar a las encontradas en *T. brucei* utilizando otra metodología. Las proteínas lisosomales encontradas en estos organismos pueden estar compartiendo epítomos con las LAMP típicas de células superiores, pues la reconocen los anticuerpos heterólogos contra estas proteínas provenientes de seres humanos y bovinos.

Esto nos permite inferir que los anticuerpos anti-EEA1 y anti-MPR pueden estar reconociendo las proteínas relacionadas con las presentes en células superiores. En mamíferos estas proteínas presentan masas

moleculares muy diferentes a las encontradas en los parásitos (EEA1, 162 kDa; MPR, 300 kDa y LAMP1, 96 kDa), pero pueden estar compartiendo regiones importantes para la función que reconocen los anticuerpos.



**Fig. 4.** Detección en *E. histolytica* de proteínas similares a EEA1, MPR, LAMP-1 y LAMP-2 por inmuno-transferencia. La proteína total se separó por SDS-PAGE. La membrana se incubó con: (a) anti-EEA1 de humano; (b) anti-MPR de bovino; (c) anti-LAMP-1 de humano; (d) anti-LAMP-2 de rata; (e, g) *T. cruzi* cepa Y; (f, h) cepa Brennen; (e y f) anti-LAMP1; (g y h) anti-LAMP2. (i, j) Proteína total de *E. histolytica* incubada sin anticuerpo primario. Revelado con 3'-3'-diamino-bencidina o quimioluminiscencia.

#### 1.1.4. Tráfico y entrega de holotransferrina a endosomas tempranos y tardíos y a lisosomas

Para ver si se podían relacionar las proteínas reconocidas por los anticuerpos anti-EEA1, anti-MPR y anti-LAMP1 con una función en las estructuras vesiculares de la amiba, se hizo el seguimiento de la internalización de la holoTf en microscopía confocal, incubando también con los anticuerpos a diferentes tiempos durante todo el proceso de endocitosis. El patrón de distribución de las proteínas reconocidas por los diferentes anticuerpos varió de acuerdo a la presencia de holoTf-FITC y al tiempo de internalización de la misma (Fig. 5).

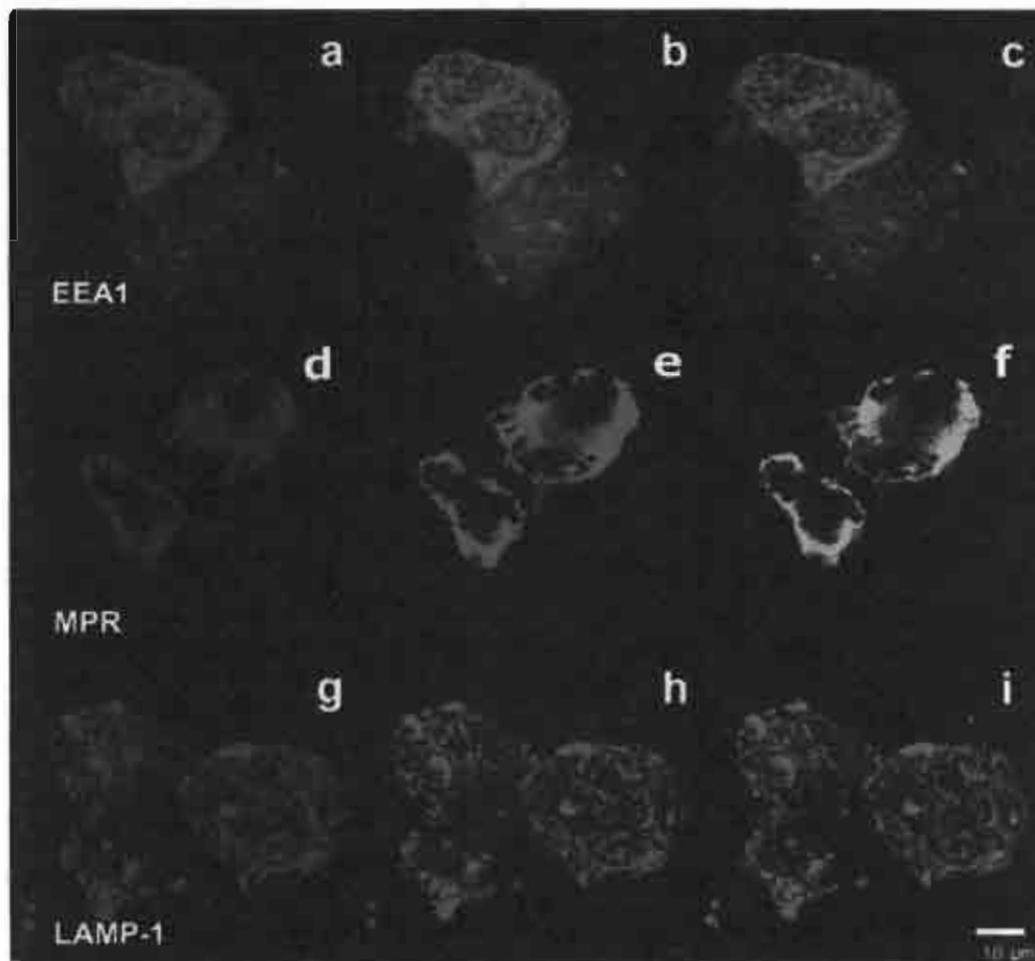
Primeramente, se estableció la localización de las proteínas reconocidas en la inmuno-transferencia en ausencia de holoTf. El anticuerpo anti-EEA1 detectó una proteína en estructuras vesiculares dentro de la amiba (Fig. 5a, rojo); el anti-MPR reconoció redes y algunas estructuras vesiculares de diferentes tamaños dentro de los trofozoítos (Fig. 5b, azul). El anticuerpo anti-LAMP-1 se unió a una proteína presente en vesículas (Fig. 5g, rojo). Estos resultados sugieren la presencia de estructuras vesiculares semejantes en composición a las vesículas encontradas en la ruta endo-lisosomal de células eucariotas.

Para ver si el tráfico de la holoTf-FITC involucra las diferentes estructuras vesiculares reconocidas por los anticuerpos dirigidos contra estas estructuras, los trofozoítos se incubaron a diferentes tiempos con holoTf y luego se fijaron para incubarse con los anticuerpos.

La holoTf-FITC se internalizó rápidamente, con sólo 5 min de incubación (Fig. 5b, verde), y se observó localizando en el mismo sitio que el anti-EEA1 (Fig. 5c, amarillo). A los 2 ó 10 min, no se observó co-localización entre estas proteínas (datos no mostrados). Después de 20 min de iniciar la endocitosis de la holoTf-FITC (Fig. 5e, verde), la fluorescencia se observó dentro de las estructuras reconocidas con el anticuerpo anti-MPR como endosomas tardíos. En color blanco o azul cielo sobre la membrana y dentro de las amibas (Fig. 5f) la misma distribución se observó a los 15-25 min

(resultados no mostrados). Finalmente, la holoTf-FITC (Fig. 5h, verde) se observó dentro de estructuras semejantes a lisosomas pues fueron reconocidas por el anti-LAMP1 a los 30 min (Fig. 5i, amarillo); esta co-localización no se encontró a intervalos de tiempo cortos (5-20 min, resultados no mostrados).

Estos datos sugieren que *E. histolytica* posee proteínas con epítomos semejantes a EEA1, MPR, y LAMP-1, las cuales son proteínas típicas de células superiores y que pueden estar desarrollando la misma función, pues durante la internalización de la holoTf co-localizan con ella y varía su distribución. Del mismo modo, los resultados muestran que la holoTf viaja a través de la ruta endosoma/lisosomal en *E. histolytica*.



**Fig. 5.** Distribución de las proteínas marcadoras de endosomas tempranos, tardíos y lisosomas en *E. histolytica*, en presencia y ausencia de holoTf-FITC. Incubación de 5 min con Tf, (a) Endosomas tempranos con anti-EEA1; (b) localización de Tf-FITC; (c), co-localización. Incubación 15 min, (d) Endosomas tardíos, anti-MPR; (e), Tf-FITC; (f) co-localización de ambos. Incubación 30 min, (g) Lisosomas, anti-LAMP1; (h) Tf-FITC; (i) co-localización.

## 2. Purificación e identificación de la proteína de unión para holo-transferrina de *Entamoeba histolytica*, *EhTfbp*

### 2.1.1. Purificación de *EhTfbp*

La purificación de *EhTfbp* se llevó a cabo por inmuno-precipitación con el anticuerpo monoclonal anti-receptor de Tf humana H68.4 (anti-RTf). La proteína purificada mostró una masa molecular de 95 kDa en electroforesis. Para evaluar si la proteína purificada presentaba la capacidad de unir holoTf, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, la cual se incubó con holoTf. Posteriormente se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-Tf humana y se reveló con 3,3'-diamino-bencidina. Los resultados se muestran en la Fig. 6.

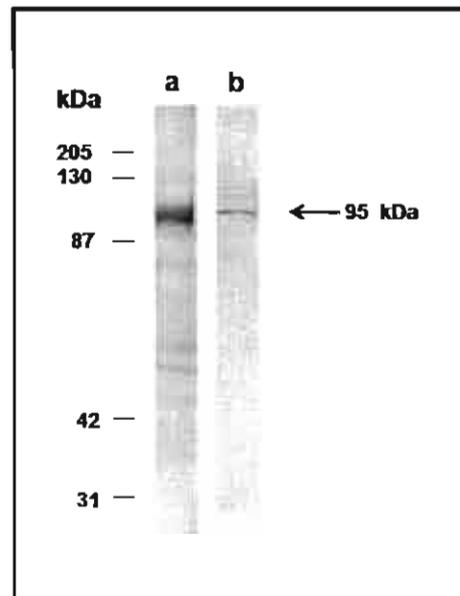


Fig 6. Purificación de la proteína que une holoTf de *E. histolytica* (*EhTfbp*) por inmuno-precipitación con el anti-RTf humana. a) PAGE-SDS, tinción de Coomassie, b) Transferencia del inmuno-precipitado a nitrocelulosa, la membrana se incubó con holoTf y posteriormente con un anticuerpo anti-Tf. Revelado con 3,3'-diamino-bencidina.

### 2.1.2. Identificación de la *EhTfbp* por espectrometría de masas

La proteína obtenida en la inmuno-precipitación y purificada por electroforesis se cortó del gel y se analizó en espectrometría de masas.

Después de buscar en las bases de datos con el software Protein Pilot, se identificaron dos péptidos con secuencias TRNPIVFSFHPSALK y KIFIVSDRM, en dos experimentos independientes, con un 99% de similitud con la proteína Acetaldehído alcohol/deshidrogenasa2 de *Entamoeba histolytica*, la cual ha sido descrita y estudiada anteriormente por varios grupos (Yang, 1994; Bruchhaus & Tannich, 1994; Avila et al., 2002) (ADH2\_ENTHI con número de acceso Q24803).

### 2.1.3. Reacción cruzada entre *EhTfbp* y *EhADH2* usando anticuerpos

Para continuar con la caracterización de la *EhTfbp* como *EhADH2*, se utilizó esta segunda proteína purificada y un anticuerpo anti-*EhADH2*, ambos donados por la Dra. E. Ávila (2002), quien ha estudiado esta proteína. Ambas proteínas se corrieron en SDS-PAGE, mostrando similar masa molecular en la tinción de Coomassie (Fig. 7A, carriles 1 y 4).

Después de transferir *EhTfbp* a la membrana de nitrocelulosa, se observó la capacidad de unir holoTf, incubándose en presencia de esta proteína peroxidada (Fig. 7A, carril 2).

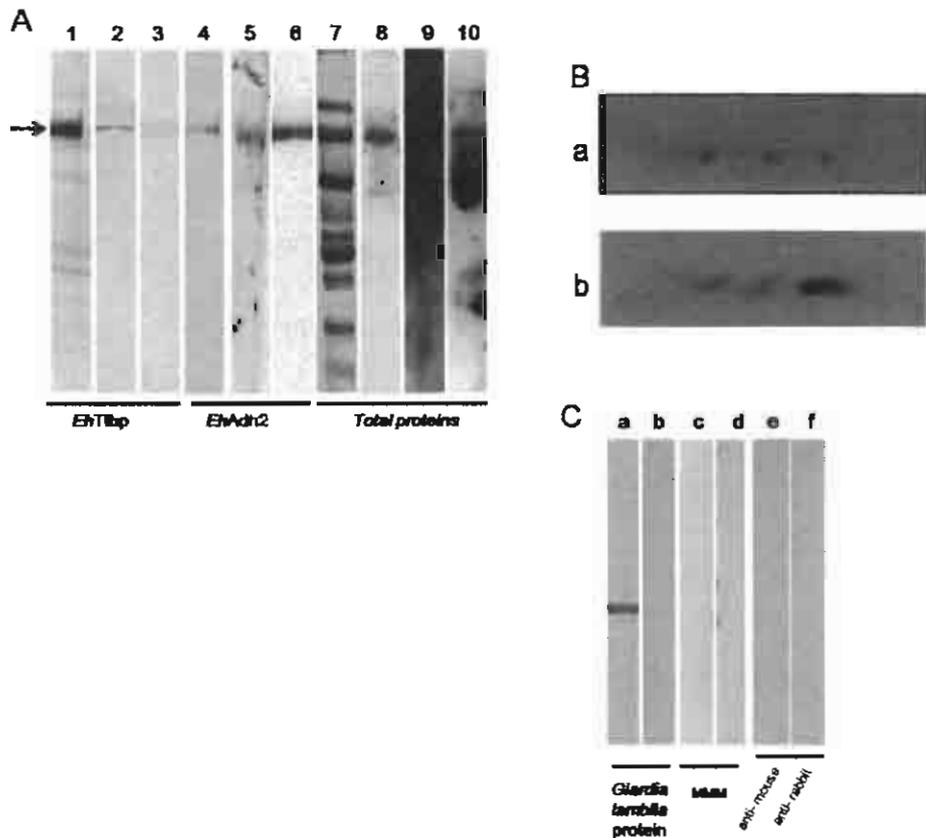
Posteriormente, ambas proteínas, *EhTfbp* y *EhADH2*, fueron reconocidas por el anticuerpo anti-*EhADH2* (Fig. 7A, carriles 3 y 5, respectivamente). *EhADH2* fue reconocida también por el anti-RTf humana (Fig. 7A, carril 6).

Para determinar la especificidad de los anticuerpos por la banda de 95 kDa, las proteínas totales de la amiba se separaron en electroforesis y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Fig. 7A, carril 7). Estas se incubaron con los anticuerpos, ya sea con el anticuerpo anti-RTf humana, con el anti-*EhADH2* o con holoTf biotinilada.

Como sucedió al utilizar las proteínas puras, en las proteínas totales se observó una banda principal de 95 kDa reconocida por ambos anticuerpos y se observó unida la holoTf biotinilada a la *EhADH2* (Fig. 7A, carriles 8, 9 y 10).

Para verificar la especificidad de los anticuerpos, se utilizó una proteína de *Giardia lamblia* no relacionada con la internalización de la holoTf (Fig. 7C, carril a), la cual no fue reconocida por el anticuerpo anti-RTf humana (Fig. 7C, carril b). Otras proteínas no relacionadas usadas como controles negativos fueron los marcadores de masa molecular (Fig. 7C, carriles c y d); ninguna de estas proteínas fue reconocida por los anticuerpos. Los controles negativos correspondientes a la incubación únicamente con los anticuerpos secundarios se muestran en la Fig. 7C, carriles e y f.

Estos resultados indican que las proteínas *EhTfbp* y *EhADH2* son la misma o comparten epítomos similares. Para confirmarlo, la proteína *EhADH2* purificada se separó en geles de 2-dimensiones. Se obtuvieron tres isoformas (Fig. 7B, a), con puntos isoeléctricos de 6.6, 6.5 y 6.3. Las isoformas fueron reconocidas por el anti-RTf humano (Fig. 7B, b). La isoforma con pI de 6.6 mostró mayor afinidad por el anticuerpo anti-RTf. Estos resultados apoyan los anteriores y confirman el hecho de que se trata de la misma proteína o que presentan una alta homología estructural.



**Fig. 7. Reconocimiento cruzado de las proteínas amibiomas *EhTfbp* y *EhADH2*. Panel A) carriles 1, 2 y 3, *EhTfbp* purificada: 1, tinción de Coomassie; 2, overlay con holoTf-HRP; 3, anti-*EhADH2*; Panel A) carriles 4, 5, y 6, *EhADH2* purificada: 4, tinción de Coomassie; 5, anti-*EhADH2*; 6, anti-RTf humano. Panel A) carriles 7-10, proteína total de *Entamoeba histolytica*: 7) tinción de Coomassie; 8, anti-*EhADH2*; 9, anti-RTf humano; 10, HoloTf-biotinilada. Panel B) electroforesis en dos dimensiones de la proteína *EhADH2* (a), tinción de Coomassie; (b) incubada con el anti-RTf humano. Panel C) proteína no relacionada de *Giardina lamblia* (a) tinción de Coomassie, (b) Anti- RTf humano; (c, d) marcadores de peso molecular: (c) con anti-RTf humano y (d) con anti-*EhADH2*; (e y f), Proteínas totales de amiba con solo los anticuerpos secundarios y revelados con quimioluminiscencia.**

#### 2.1.4. Inhibición de la endocitosis de holotransferrina por saturación de los sitios de unión con el anticuerpo anti-*EhADH2*

Para demostrar que la *EhADH2* participa en la internalización de holoTf se utilizó el anticuerpo anti-*EhADH2* para inhibir el sitio de unión a holoTf.

Para esto, las amibas se incubaron con el anticuerpo a diferentes concentraciones y posteriormente se pusieron en presencia de holoTf, apoTf y holoLf en citometría para cuantificar su internalización por la cantidad de fluorescencia. Los resultados se muestran en la Fig 8.

El anticuerpo anti-*EhADH2* inhibió la internalización de holoTf hasta un 90% cuando el anticuerpo se encontraba a mayor concentración. Pero no mostró ningún efecto en la entrada de hololactoferrina (holoLf), una proteína semejante a la holoTf que se internaliza en vesículas de caveola en *Entamoeba histolytica* y cuya endocitosis no es afectada por holoTf (León-Sicairos et al., 2005). Debido a que holoLf es captada por la amiba a través de un diferente tipo de endocitosis y con otra proteína de unión diferente a la de holoTf, su internalización no se ve afectada cuando se incuba con el anticuerpo contra *EhADH2*. La cantidad de holoTf-FITC internalizada varió dependiendo de la concentración del anticuerpo, por lo tanto el anticuerpo se está uniendo al sitio de reconocimiento de holoTf y bloquea la unión para su internalización. Estos resultados nos indican que el anticuerpo anti-*EhADH2* se une a *EhTfbp* y evita el reconocimiento de holoTf. Además confirman que *EhADH2* y *EhTfbp* son la misma proteína que une holoTf y que participa en la internalización de holoTf.

En este mismo experimento se comprobó que la apoTf, proteína libre de Fe, no se internaliza (Reyes-López, 2001) y probablemente se debe a que la proteína de unión es sensible a la presencia de Fe en esta proteína. Además se muestra que el anticuerpo no tiene ningún efecto cuando se incuba con esta proteína sin hierro y por lo tanto está ejerciendo su actividad bloqueadora específicamente con la holoTf. Es importante hacer notar que un 10% de holoTf continua entrando en forma independiente de una proteína de unión (Welter et al., 2006).

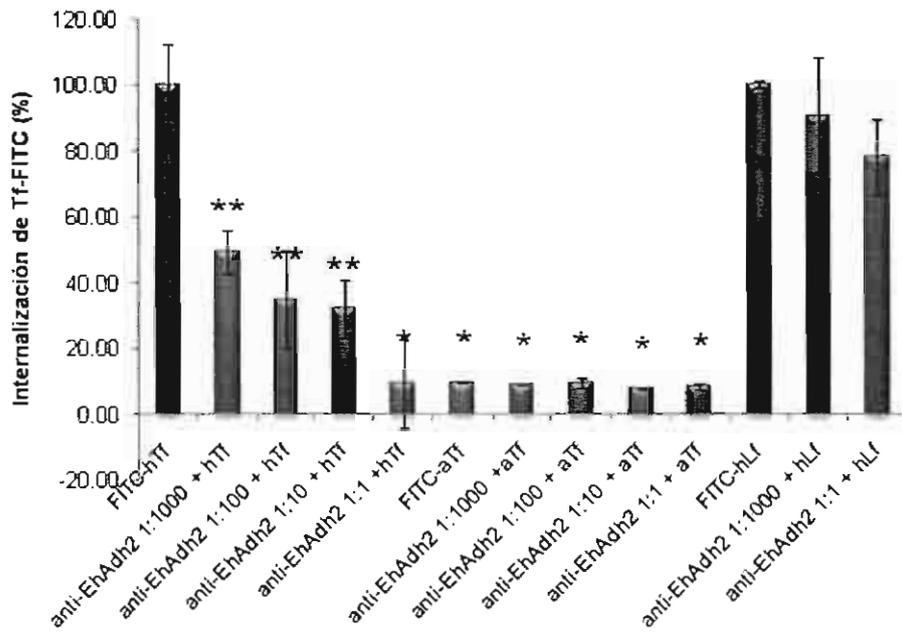


Fig. 8. Inhibición de la endocitosis de holoTf-FITC por el anticuerpo anti-*EhADH2*. Las amibas se incubaron primero con el anti-*EhADH2* por 15 min y después con holoTf-FITC, apoTf-FITC u holoLf-FITC durante otros 15 min de interacción, luego se fijaron y se analizaron por citometría de flujo. \*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.05$ , comparado con holoTf.

### 2.1.5. Afinidad de la unión de *EhTfbp* por su ligando y efecto de la temperatura y de la concentración de holotransferrina

Para confirmar que la internalización de holoTf se lleva a cabo por medio de una proteína presente en la membrana se hicieron experimentos de saturación a la temperatura normal de crecimiento y a 4°C.

Los trofozoitos se incubaron a baja temperatura para intentar saturar los sitios de unión disponibles y evitar la internalización del ligando. Los resultados en la Fig. 9A muestran la cinética para holoTf a 37°C donde la internalización es constante en las concentraciones más bajas hasta 11.5 nM, concentración en la que se alcanza la saturación. La afinidad por la transferrina es de  $1.81 \times 10^{-9}$  M. A esta temperatura las moléculas de la membrana citoplásmica están en constante recambio, así que las *EhTfbp* nuevas están activamente uniéndose y endocitando el ligando.

Diferente a lo obtenido a baja temperatura, donde no hay internalización, no se están llevando a cabo los procesos endocíticos con el recambio de membrana y los sitios de unión, pueden tampoco estar saturados.

A concentraciones muy altas de holoTf la internalización se llevó a cabo de manera independiente de la proteína de unión, pues no se observó saturación a temperaturas altas o bajas (datos no mostrados).

Cuando se incubaron los trofozoitos a una concentración fija de holoTf, en una cinética de endocitosis respecto al tiempo, la internalización aumentó rápidamente y fue gradual hasta alcanzar la saturación, observándose el mismo efecto de menor endocitosis a baja temperatura.

Cuando se utilizaron amibas fijadas con paraformaldehído, para inhibir completamente la endocitosis de la holoTf (Fig. 10), se alcanzó la saturación a la misma concentración observada en las células vivas mantenidas a 37°C. Esto comprueba la participación de la proteína de unión a holoTf, *EhTfbp*.

A las concentraciones más altas utilizadas de holoTf, esta proteína entra constantemente sin control. Probablemente el paraformaldehído produce la permeabilización de la membrana por lo que la holoTf puede entrar a la amiba sin alcanzar la saturación. Esto sugiere que el proceso de internalización

está perfectamente regulado, pues en amibas muertas la internalización continúa hasta el equilibrio.

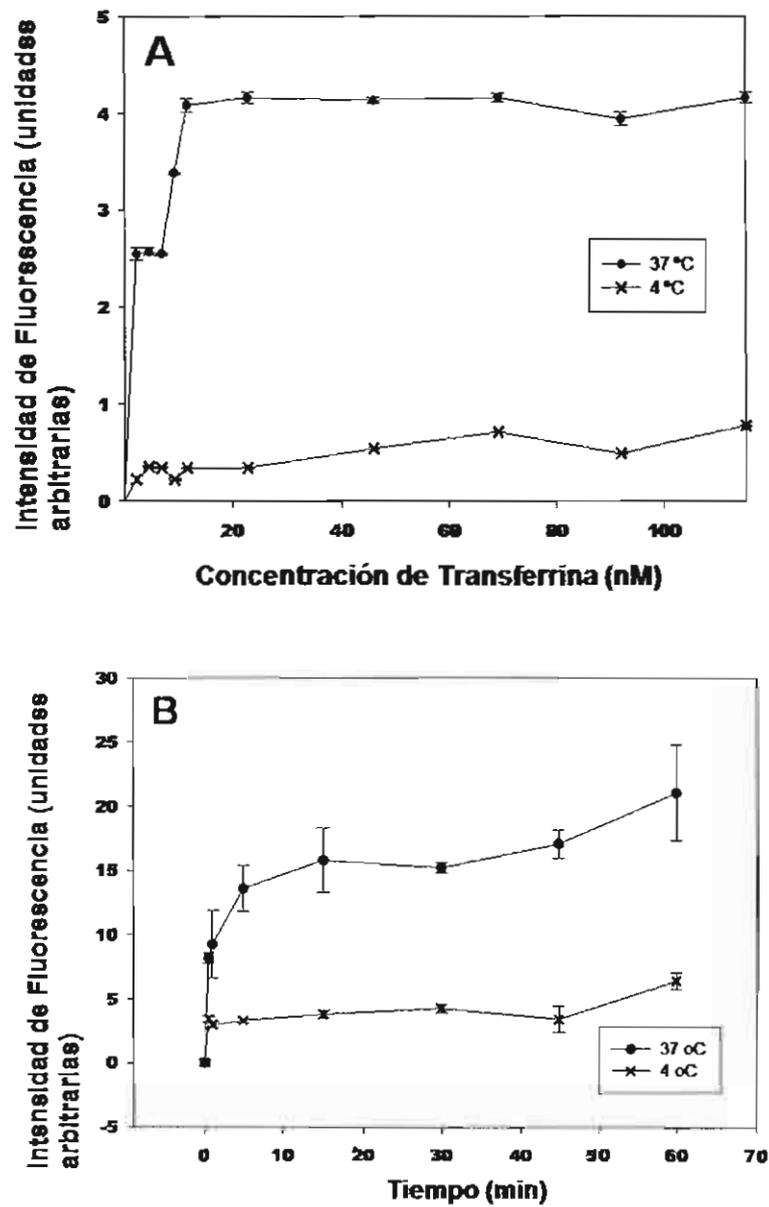
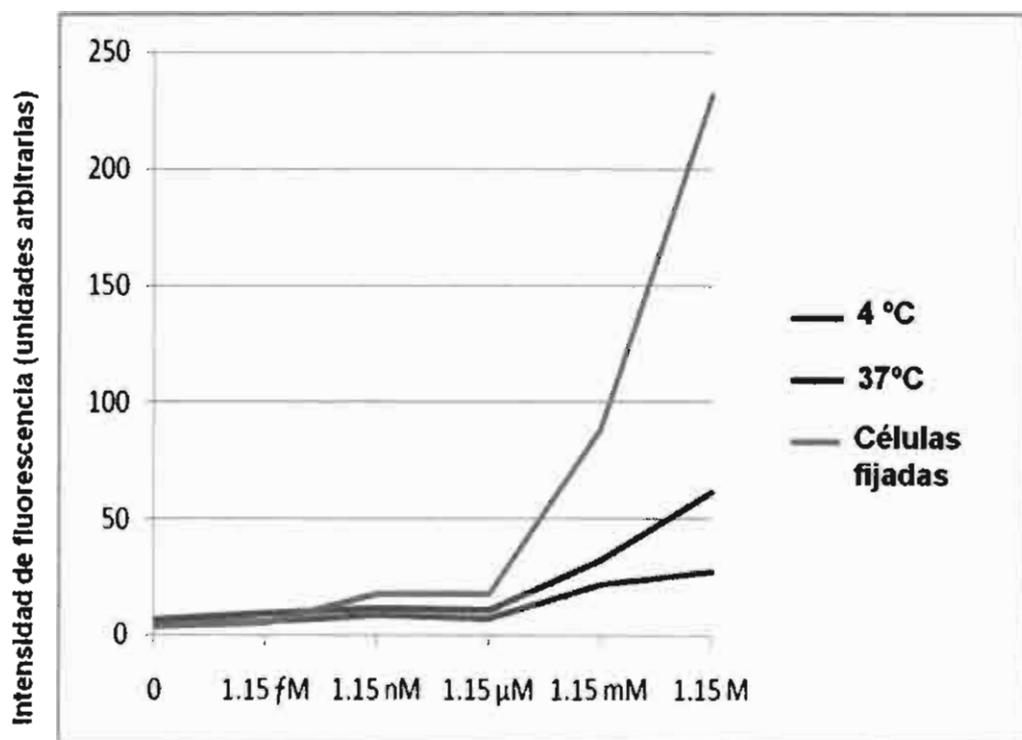


Fig. 9. Internalización de holoTf dependiente de su concentración y de la temperatura en *E. histolytica*. Los trofozoitos se incubaron con: A, holoTf-FITC a diferentes concentraciones; B, con holoTf-FITC (1.15  $\mu$ M). Posteriormente se fijaron, lavaron y prepararon para su análisis en citometría de flujo.



**Fig. 10.** Internalización de holoTf en amibas fijadas (muertas) en comparación con amibas vivas incubadas con holoTf-FITC a diferentes temperaturas.

### 2.1.6. Localización de *EhADH2* y su relación con clatrina y transferrina

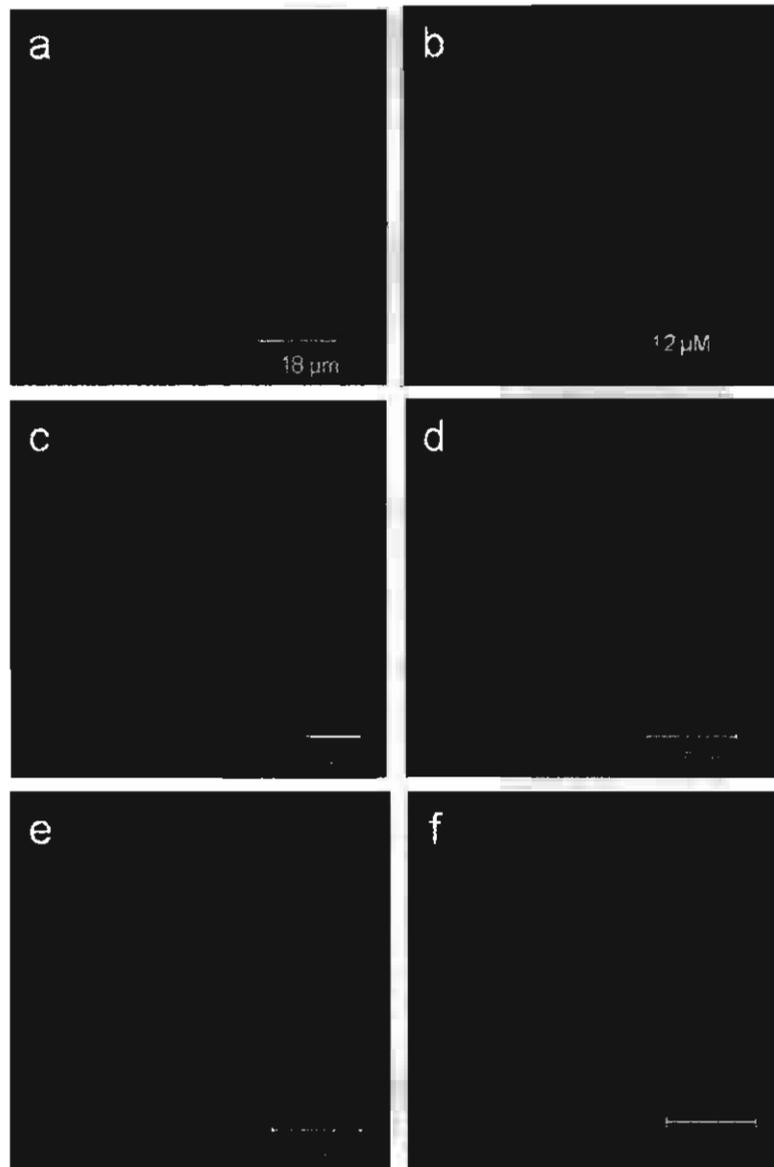
Para saber si la proteína *EhADH2* interacciona con vesículas cubiertas de clatrina, las amibas primero se incubaron con holoTf-FITC a diferentes tiempos, a 37 °C permitiendo su internalización.

Primeramente, los trofozoítos en ausencia de holoTf se incubaron con anti-*EhADH2* (Fig. 11a, rojo), para conocer la distribución de la *EhADH2*. El patrón de distribución se observó homogéneo en toda la amiba, en citoplasma y membrana plasmática.

Una vez observada la distribución de esta proteína, los trofozoítos se incubaron con holoTf para permitir su internalización. Posteriormente, a diferentes tiempos se fijaron y se incubaron con los anticuerpos anti-*EhADH2* (Fig.11b, rojo) y anti-clatrina (Fig. 11b, verde).

Los resultados muestran que la *EhADH2* interacciona con holoTf, sin involucrar a clatrina a ninguno de los tiempos probados. *EhADH2* presenta la misma distribución que en ausencia de holoTf y clatrina se observó en estructuras vesiculares en el citoplasma de la amiba. Los resultados se muestran en la Fig. 11 (c-f). Como ya se había demostrado antes, los anticuerpos anti-*EhADH2* bloquearon la internalización de holoTf-FITC (Fig. 11d), comparado con amibas que no se incubaron con ellos (Fig.11c).

Para probar si holoTf-FITC y apoTf-FITC comparten el sitio de unión en la membrana amibiana los trofozoítos se incubaron con el anti-*EhADH2* y luego con estas proteínas. Cuando las amibas se incubaron con apoTf se observó muy poca internalización (Fig.11e) y no hubo interacción con la enzima marcada con el anticuerpo anti-*EhADH2* (Fig. 11f).



**Fig. 11. *EhADH2* no interacciona con clatrina durante la endocitosis de holoTf en microscopía confocal. Las amibas se incubaron con: (a) anti-*EhADH2*; (b) anti-*EhADH2* y anti-clatrina; (c) Amibas con holoTf-FITC; (d) Amibas con anti-*EhADH2* y luego con holoTf-FITC. (e) Amibas con apoTf-FITC. (f) amibas con anti-*EhADH2* y después con apoTf-FITC. Los trofozoitos se fijaron e incubaron con el anticuerpo secundario acoplado con rodamina y se montaron para observarse en microscopía confocal.**

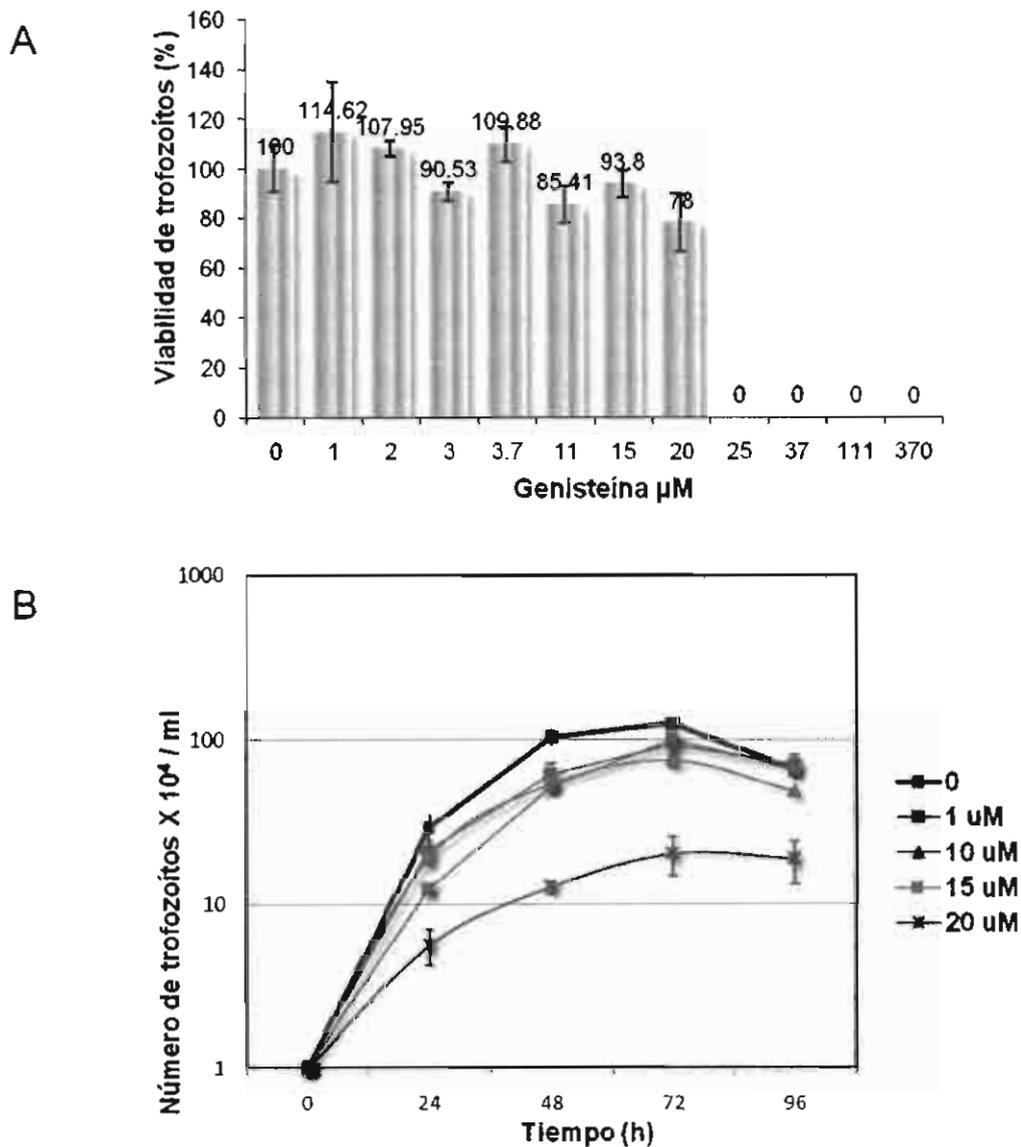
### 3. *EhTfbp* con actividad tipo tirosín-cinasa

#### 3.1.1. Curva de crecimiento en presencia de genisteína

Para determinar si *EhTfbp* tiene la capacidad de despertar una señal para la internalización una vez que el ligando es reconocido, como es el caso del receptor de Tf típico de células eucariontes superiores (receptor tipoTRK), se utilizó la genisteína, compuesto inhibidor de la fosforilación de proteínas (PKs) específicas de tirosina.

Primero se probaron diferentes concentraciones de genisteína para encontrar la concentración adecuada que no afectara la viabilidad de los trofozoítos y así poder observar el efecto del inhibidor. Los resultados se muestran en la Fig. 12A, donde se observa la viabilidad constante en las amibas hasta 15  $\mu\text{M}$  de genisteína. Arriba de esta concentración (20  $\mu\text{M}$ ) se observa una disminución de la viabilidad y a 25  $\mu\text{M}$  la viabilidad es del 0%.

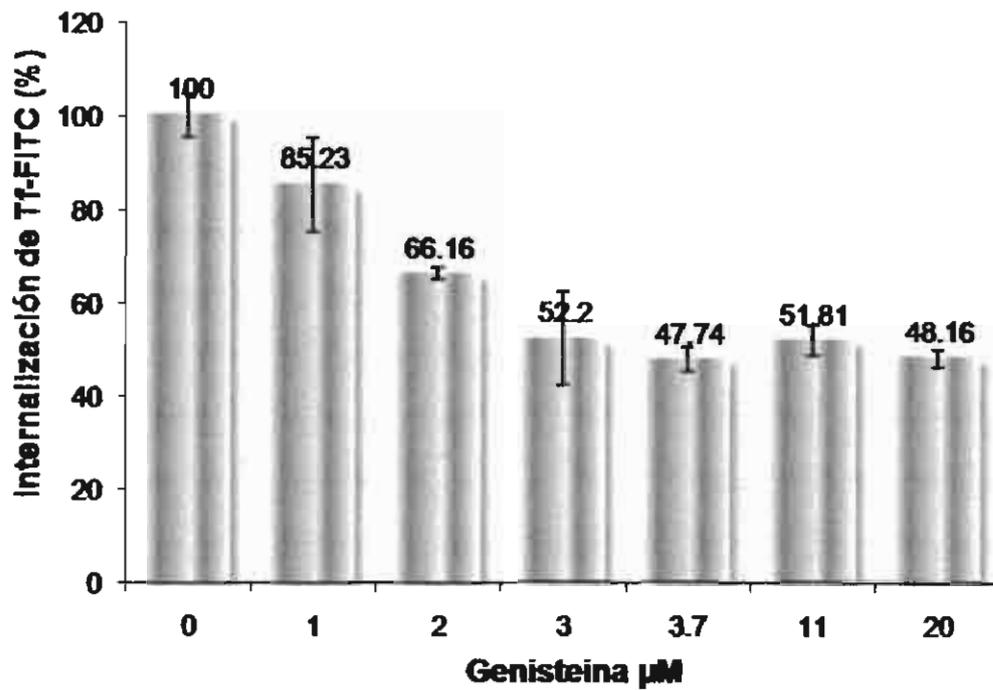
Para evaluar el efecto de la genisteína en el crecimiento amibiano se realizó una cinética de crecimiento a las concentraciones que no afectaron la viabilidad (Fig. 12B). En estas condiciones las amibas presentaron un crecimiento muy similar al control, excepto cuando se usó la concentración de 20  $\mu\text{M}$ , donde disminuyó el crecimiento casi un 50%. Por tanto, se utilizaron las concentraciones que no afectaron la viabilidad o el crecimiento en los experimentos siguientes, con amibas en presencia de holoTf-FITC.



**Fig. 12. Curvas de viabilidad y de crecimiento de los trofozoitos de *E. histolytica* en presencia de genisteína. (A), Los trofozoitos se incubaron en diferentes concentraciones de genisteína por 30 min y se midió la viabilidad con azul de tripano. (B), Para medir el crecimiento, los trofozoitos se incubaron con genisteína y se contó el número de células cada 24 h.**

### 3.1.2. Inhibición de la internalización de holotransferrina en presencia de genisteína

Posteriormente se midió la internalización de holoTf-FITC en presencia de genisteína a las concentraciones establecidas en el punto anterior con viabilidad mayor al 80%. Los resultados se muestran en la Fig. 13, donde la entrada de holoTf se ve afectada de acuerdo a la concentración utilizada de genisteína, en las concentraciones entre 1 y 3  $\mu\text{M}$ . Posteriormente, en las concentraciones de 3.7 y 20  $\mu\text{M}$  la inhibición ya no es dependiente de la concentración y se mantiene constante. El mayor efecto inhibitorio es en 3.7  $\mu\text{M}$  de genisteína. Por tanto, *EhTfbp* requiere de fosforilarse para despertar la señalización hacia alguna vía específica que permita la internalización de holoTf. Debido a que el inhibidor de la fosforilación afecta el crecimiento de la amiba, esto puede indicar que el sentido en el que va la señalización es hacia el crecimiento y la proliferación celular.



**Fig 13. Efecto de la genisteína en la internalización de holotransferrina. Los trofozoítos se incubaron a diferentes concentraciones de genisteína y con holoTf-FITC durante 30 min.**

#### 4. Participación de la *EhTfbp* en la transducción de señales para la endocitosis de holotransferrina

##### 4.1.1. Identificación de las proteínas fosforiladas y su relación con MAP-kinasas

El receptor de transferrina en eucariontes superiores requiere de autofosforilarse para que holoTf sea internalizada. Para saber si en *E. histolytica* la Tfbp o cualquier otra proteína relacionada se puede fosforilar e inducir la internalización, los trofozoítos de *E. histolytica* se incubaron a diferentes tiempos con holoTf. Se obtuvieron las proteínas totales, se separaron en electroforesis y la transferencia se incubó con el anticuerpo anti-fosfotirosina y anti-MAPK.

En los extractos incubados a diferentes tiempos con holoTf se observó la fosforilación de una proteína de 95 kDa (Fig. 14a); que aumentó con respecto al tiempo de incubación con holoTf, comparadas con el control sin holoTf. En las amibas incubadas en presencia de genisteína se observó de disminución en la fosforilación.

Para saber si la señalización se dirige hacia la vía de crecimiento y proliferación de ERK/MAPK, se utilizó el anticuerpo anti-MAPK, que reconoce la proteína que lleva la señal de la membrana citoplásmica al núcleo. Se encontró una proteína de 42 kDa (Fig. 14b), se observó un incremento en la proteína reconocida con ERK/MAPK, por lo que podemos decir que hay una relación con la internalización de holoTf. Utilizamos la fosforilación de FAK para comparar con la proteína de unión de transferrina, donde mostramos que la fosforilación de tirosina se produce de acuerdo a la presencia o ausencia del inductor forbol 12, 13-dibutirato.

Es necesario explorar la señalización hacia otras vías de crecimiento y proliferación para lograr dilucidar la vía de señalización implicada en la internalización de holoTf.

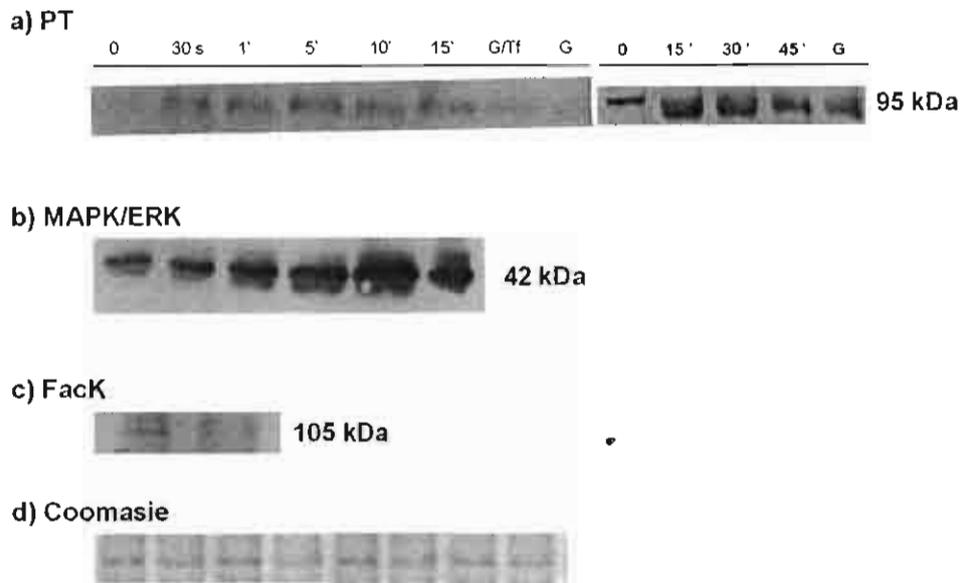


Fig. 14. Proteína total de *E. histolytica* incubada con holotf a 0, 30 seg, 1, 5, 10, 15, 30 y 45 min. (G), trofozoitos incubados 30 min con genisteína 400  $\mu$ M antes de incubarse con holoTf. Posteriormente se obtuvo la proteína total y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, las cuales se pusieron en contacto con los anticuerpos a) PT, anti-fosfotirosina; b) MAPK/ERK, anti-Map cinasa, c) control de fosforilación con amibas activadas con PDB y revelada con anti-Fack. d) Control de carga.

## 5. Identificación de proteasas específicas de holotransferrina humana

### 5.1.1. Electroforesis en geles de sustrato

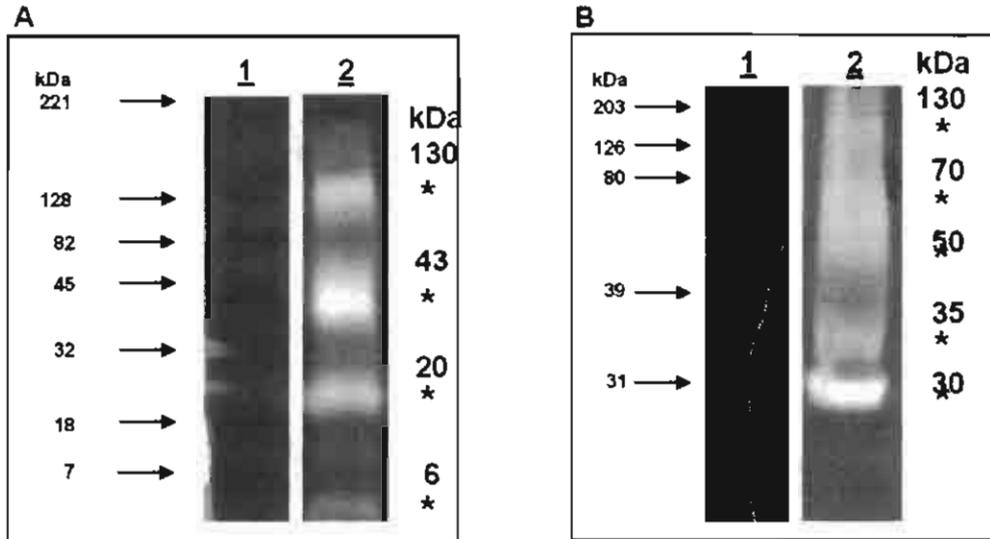
Para saber si la ameba tiene proteasas internas o secretadas al medio que degraden holoTf humana se obtuvo la proteína total de los trofozoítos cultivados y las proteínas secretadas al medio de cultivo durante su crecimiento en medio de cultivo en concentración de hierro normal y en falta de hierro. Estas proteínas se separaron en geles co-polimerizados con holoTf.

Los resultados en presencia y ausencia de hierro no mostraron ninguna diferencia, en ambos casos se observaron cuatro proteasas en el extracto de proteína total de los trofozoítos, que son capaces de degradar holoTf humana (Fig. 15A carril 2), y en el sobrenadante del medio de cultivo se precipitaron cinco diferentes actividades con la misma capacidad de degradar holoTf (Fig. 15B carril 4).

En la proteína total de la ameba las bandas de degradación observadas mostraron masas moleculares de 130, 43, 20 y 6 kDa (Fig. 15A carril 2). Las actividades observadas secretadas al medio de cultivo son de 130, 70, 50, 35 y 30 kDa (Fig. 15B carril 4).

Como se ha descrito que la actividad proteolítica mayoritaria de *E. histolytica* pertenece al tipo de cisteín-proteasas (Que et al., 2002), se utilizó PHMB, un inhibidor de cisteín-proteasas, en el amortiguador de activación de los geles de sustrato. En estas condiciones, las bandas de actividad proteolítica disminuyeron y en algunos casos no pudo observarse la banda de degradación (datos no mostrados).

Estos resultados sugieren la presencia de varias actividades del tipo cisteín-proteasas. Además, sugieren que los trofozoítos de *E. histolytica* son capaces de degradar holoTf a través de proteasas secretadas al medio, lo que indicaría la presencia de otro mecanismo de adquisición de hierro; así como también la presencia de proteasas que la degradan en el interior de la ameba y la relación que guarda su actividad con la ausencia o presencia de Fe y la actividad de la *EhTfbp*.



**Fig. 15. Proteasas amibianas que degradan holoTf en geles co-polimerizados con esta proteína: A) proteína total de *E. histolytica*, carril 1) marcadores de masa molecular; carril 2) bandas de degradación. B) Proteínas precipitadas del sobrenadante del medio de cultivo, carril 1) marcadores de masa molecular; carril 2) bandas de degradación.**

## DISCUSIÓN

Los trofozoítos de *Entamoeba histolytica* requieren de hierro para su multiplicación dentro del ser humano. La endocitosis de holoTf para obtener este elemento puede ser un proceso importante durante la colonización e invasión del huésped. En este trabajo se obtuvo información relevante para establecer el mecanismo de endocitosis de holoTf y la participación de algunas de las proteínas relacionadas con este proceso.

La endocitosis es un mecanismo muy conservado en células superiores y recientemente se ha visto que también lo es en protozoarios (Hernández et al., 2007; Morgan et al., 2001; Robibaro et al., 2001). La endocitosis a través de vesículas cubiertas de clatrina ha sido descrita en *E. histolytica* para ferritina por nuestro grupo de trabajo; ferritina es una proteína con un elevado contenido férrico y que reside mayormente en hígado y bazo (López-Soto et al., 2009). Varias proteínas involucradas en la endocitosis, como las Rab GTPasas, también se han encontrado conservadas en este protozoario (Juárez et al., 2001; Romero-Díaz et al., 2007; Temesvari et al., 1999; Welter et al., 2002).

De acuerdo con nuestros resultados, al usar diferentes inhibidores de endocitosis en microscopía confocal y citometría de flujo, la internalización de holoTf se lleva a cabo en vesículas cubiertas de clatrina. Cuando se incubaron las amibas con wortmanina, un inhibidor de la actividad de fosfatidil-inositol-3-cinasa (PI3-K), se evitó la entrada de holoTf en un 90%. Se sabe que PI3-K participa en varios eventos vitales en *E. histolytica*, como fagocitosis (Gosh & Samuelson, 1997; Marion et al., 2005; Nakada-Tsukui et al., 2009) y pinocitosis (Batista & de Souza, 2004); también PI3-K participa en exocitosis en *Entamoeba invadens* (Gosh et al., 1999). En otros estudios usando LY294002 como inhibidor específico de PI3-K, se demostró la participación de esta cinasa en la micropinocitosis (Meza & Clarke, 2004).

Todos estos trabajos demuestran que PI3-K participa en varios pasos del proceso endocítico en *E. histolytica*, por lo que podemos confirmar que la

internalización de la holoTf es un proceso de endocitosis en el que participa, entre otras proteínas, la PI3-K.

En cuanto a la cloroquina, este anti-parasitario ha sido empleado como un inhibidor específico de endocitosis dependiente de clatrina en otras células. En *E. histolytica* la cloroquina inhibió la internalización de holoTf en casi un 80%. Sin embargo, no nos fue posible inhibirla completamente a mayores concentraciones de cloroquina o utilizando mezclas de 2 ó más inhibidores.

Este resultado, junto con el obtenido con wortmanina, sugiere que holoTf entra al trofozoito principalmente por endocitosis dependiente de clatrina y probablemente la incapacidad de inhibir la vía por completo se debe a que holoTf puede ingresar también a la célula por otra vía, como por ejemplo fase fluida, aunque en menor proporción. Estos resultados concuerdan con lo reportado recientemente para la internalización de holoTf por esta segunda vía en *E. histolytica* (Welter et al., 2006).

No es excepcional que holoTf entre a través de varias vías, esta situación también se ha observado en hepatocitos de rata, donde se encontró una vía dependiente y otra independiente de receptor (Quian y Tang, 1995; Richardson y Ponka, 1997). Además, *E. histolytica* es un protozooario parásito que requiere más de 40  $\mu\text{M}$  de hierro (Serrano-Luna et al., 1998b), para poder desarrollarse en los cultivos in vitro y, seguramente, requiere también una gran cantidad de hierro para su multiplicación in vivo, por lo que el tener varias vías de ingreso de holoTf a la célula le permite tener más opciones para capturar hierro.

Otro inhibidor utilizado fue la sacarosa, carbohidrato que evita el proceso de endocitosis a través de vesículas de clatrina y que se ha utilizado para estudiar la endocitosis mediada por receptor (Daukas y Zigmond, 1985) y la formación de la vesícula cubierta de clatrina (Heuser y Anderson, 1989). En los trofozoítos, la sacarosa inhibió la entrada de holoTf aproximadamente en 85% (Fig. 2.). Este resultado indica que holoTf ingresa principalmente a través de la unión a un receptor y confirma que es mediante vesículas cubiertas de clatrina.

La endocitosis de holoTf disminuyó en un 87% en amibas tratadas con citocalasina D. En los procesos de endocitosis los microfilamentos de actina

son de crucial importancia para la formación y el movimiento de las vesículas. La conexión entre la endocitosis mediada por receptor y el citoesqueleto de actina durante la formación y despegado de la membrana plasmática de las vesículas recién formadas está muy documentada en otras células (Neuhaus et al., 2002; Qualmann et al., 2000; Slepnev y de Camilli, 2000). En *E. histolytica* la actina se ha relacionado con los procesos de fagocitosis (Marion et al., 2005), endocitosis en fase fluida (Sahoo et al., 2004), exocitosis (Ravdin et al., 1988), eritrofagocitosis (de la Garza et al., 1989; Marion et al., 2005) y macropinocitosis (Meza & Clarke, 2004).

Por el contrario, los microtúbulos parecen no estar involucrados en la endocitosis de holoTf en las amibas, pues ésta no se vio afectada cuando se incubaron en presencia de colchicina. Sin embargo, se ha encontrado que los microtúbulos participan en la endocitosis de holoTf en células endoteliales sinusoidales, en donde las vesículas dependientes de clatrina están organizadas por medio de los microtúbulos (Falkowska et al., 2007). En las amibas se han estudiado los microtúbulos en cuanto a su participación en la división celular pero no se han podido relacionar en el movimiento de vesículas (Chávez-Munguía et al., 2006).

Para corroborar que clatrina está relacionada con la endocitosis de holoTf se usó un anticuerpo heterólogo contra clatrina, junto con holoTf-FITC, en microscopía confocal. Ambas, holoTf y clatrina mostraron un patrón de distribución similar en vesículas, co-localizando a los 2 ó 3 min después de iniciarse la incubación con holoTf. Este resultado verifica que holoTf se internaliza en estructuras vesiculares cubiertas con clatrina.

Como sucede para otros organismos, el tráfico vesicular de proteínas endocitadas es crucial para la patogénesis de *E. histolytica*, en la digestión de componentes del huésped y la secreción de enzimas hidrolíticas y proteínas formadoras de poros (Ravdin et al. 1986; Ghosh et al. 1999). En el caso de holoTf, al igual que con otras proteínas con hierro, los trofozoítos podrían endocitarla y transportarla a través de vesículas con distinto grado de maduración, para finalmente degradarse en su totalidad en los lisosomas y así ser usada como fuente de hierro y de aminoácidos.

Para saber si holoTf viaja a través de endosomas y lisosomas, se utilizaron anticuerpos comerciales dirigidos contra proteínas marcadoras de vesículas en células de mamífero. El anticuerpo anti-EEA1 de humano se preparó contra un péptido sintético derivado de una región conservada C-terminal del antígeno 1 de endosomas tempranos; este anticuerpo detecta EEA1 en vesículas celulares de ser humano, ratón, hámster, perro y rata (hoja de datos Affinity BioReagents Cat. PA1-063A). El anticuerpo anti-MPR de bovino identifica al receptor de manosa-6-fosfato humano, de rata y de mono y se ha usado para el reconocimiento de este receptor típico de endosomas tardíos (Hoja de datos Affinity BioReagents Cat. PA1-063A). Los anticuerpos anti-LAMP-1 se han usado para identificar esta proteína asociada a lisosomas en humano, ratón y rata (Hoja de datos, Pharmigen, Cat. No. 34201A). El anticuerpo anti-LAMP-2 de rata está dirigido contra un péptido sintético de la región C-terminal de la proteína (Cuervo et al., 1998). En un trabajo previo nuestro grupo detectó al marcador lisosomal LAMP-2 participando en la endocitosis de ferritina en trofozoítos de *E. histolytica* (López-Soto et al., 2009).

Estos anticuerpos heterólogos reconocieron varias de las proteínas totales de la amiba, cuando éstas se separaron por electroforesis y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa. El anticuerpo anti-EEA1 detectó en *E. histolytica* dos bandas, una de 120 y otra de 35 kDa; en células humanas, reconoce una banda de aproximadamente 160 kDa. No se han reportado proteínas similares a EEA1 en otros protozoarios.

El anticuerpo anti-MPR reconoció cuatro bandas de 45, 24, 22 y 20 kDa en los extractos de *E. histolytica*. Una proteína similar a MPR se encontró en *E. histolytica* por análisis de péptidos con espectrometría de masas (Okada et al. 2006). De igual manera, se han reportado varias proteínas semejantes a MPR en otras células eucariotas, que varían en la masa molecular desde 300 a 46 kDa en mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces, moluscos, insectos y gusanos (Akasaki et al. 1991; Nadimpalli y von Figura, 2002; Amancha et al. 2007).

En cuanto a las proteínas LAMP, se han encontrado con masas moleculares desde 60 hasta 120 kDa en células de aves, anfibios y mamíferos; algunas de ellas presentan diferente masa molecular dependiendo del tejido en

el que se encuentren. Las variaciones se deben a que estas proteínas presentan diferentes grados de glicosilación, pues los mRNAs corresponden a proteínas de la misma masa molecular (Akasaki et al. 1991). Una proteína semejante a LAMP, denominada p67, se purificó de *T. brucei* (Brickman and Balber, 1993; 1994a; 1994b); esta proteína está relacionada con lisosomas y, además de que muestra una estructura muy semejante a las LAMPs de vertebrados (Alexander et al, 2002) y de que se encontró alrededor de holoTf fluorescente endocitada por el parásito (Alexander et al, 2002; Tazeh y Bangs, 2007), la proteína p67 tiene el tamaño de la proteína desglicosilada. Normalmente p67 se sintetiza en el retículo endoplásmico como glicofomas gp100 y gp150. Estas llegan a los compartimentos lisosomales donde ocurre la proteólisis generando fragmentos glicosilados gp75, gp42 y gp32 (Alexander et al, 2002).

La proteína p67 de *T. cruzi* muestra una identidad del 48% con la región C-terminal de la misma proteína en *T. brucei*. El dominio citoplásmico de la región C-terminal es muy importante porque transduce las diferentes señales lisosomales (Alexander et al. 2002; Tazeh y Bangs, 2007). La homología observada entre *T. cruzi* y *T. brucei* nos llevó a utilizar a *T. cruzi* para comprobar que los anticuerpos anti-LAMP-1 y anti-LAMP-2 reconocen esas proteínas con masa molecular semejante.

Cuando utilizamos estos dos anticuerpos para buscar LAMPs en *T. cruzi* y *E. histolytica* en inmuno-transferencia, el anti-LAMP-1 detectó cinco bandas de 102, 83, 57, 45 y 34 kDa en amiba y dos bandas en *T. cruzi* de 57 y 45 kDa. Con el anti-LAMP-2 se reconocieron proteínas similares excepto en las dos bandas más grandes y la más pequeña de amiba (57, 45, 35 y 20 kDa) y en *T. cruzi* reconoció sólo cuatro bandas de 75, 57, 45 y 38 kDa.

En *T. cruzi* y *E. histolytica* las bandas de 57, 45 y 38 kDa pueden corresponder a la proteína nuclear p67 y a la glicofoma gp75 de *T. brucei*, respectivamente. Estos resultados muestran moléculas semejantes a LAMP presentes en *E. histolytica* que pueden ser similares a las de *T. cruzi* y que son reconocidas por los anticuerpos anti-LAMP. Sólo al purificar y secuenciar estas

proteínas se podrá definir la similitud estructural, bioquímica y funcional que guardan estas proteínas entre sí.

A excepción de la MPR, las otras proteínas no se han encontrado en el genoma de *E. histolytica*, lo que sugiere que se trata de proteínas diferentes en secuencia, pero que podrían ser semejantes en estructura; lo que puede determinar su función y con qué proteínas interacciona. La diferencia en la masa molecular observada en las proteínas de la vía endo-lisosomal en *E. histolytica* es algo que se presenta en todos los organismos hasta ahora estudiados con estas proteínas.

Una forma de poder iniciar el estudio de la función podría ser utilizar la internalización de la holoTf para observar la distribución a través del tiempo de estas proteínas reconocidas por los anticuerpos correspondientes. Igualmente se podrá conocer su función a través del estudio de las mutantes dañadas en estas proteínas.

Una vez que los trofozoítos entraron en contacto con holoTf, ésta se observó en las estructuras de clatrina (2 min). Rápidamente se observó co-localización (5 min) con la proteína que reconoce el anticuerpo anti-EEA1, que corresponde a endosomas tempranos. Después, la holoTf podría haber perdido uno de los iones férricos en endosomas tempranos, los cuales tienen el pH adecuado para ello, y se encontró co-localizando con el anti-MPR o en estructuras semejantes a endosomas tardíos. Finalmente, a los 30 min la Tf, probablemente en su forma apo y parcialmente degradada, se encontró en los lisosomas reconocidos por anti-LAMP-1. Es importante hacer notar que antes y después de los tiempos indicados no se observó la co-localización entre los anticuerpos y la holoTf.

Estos resultados colocan a holoTf en la vía endo-lisosomal, indicando que las amibas presentan estructuras vesiculares similares a las de las células superiores (Eskelinen, 2005; 2006). La endocitosis de holoTf se ha estudiado ampliamente en los tripanosomas africanos. En ellos se observó que Tf y las proteínas lisosomales co-localizaron después de la separación de su receptor en los endosomas, donde la Tf es digerida (Alexander et al. 2002; Tazeh y Bangs 2007; Peck et al. 2008; Grab et al. 1992; Soares et al. 1992; Steverding et al. 1995). Quizá, el tráfico de las proteínas con hierro a través de la ruta

ácida es necesario para obtener el hierro y para la dieta durante la vida parasítica de manera que estos protozoarios utilizan el hierro y la proteína para sobrevivir dentro del huésped.

Por otra parte, se purificó una de las proteínas que unen holoTf (*EhTf*) con masa de 95 kDa y se le identificó por espectrometría de masas como la enzima glicolítica acetaldehído/alcohol deshidrogenasa2 (*EhADH2*). Esta es una enzima bifuncional con actividad de aldehído deshidrogenasa (ALDH) y alcohol deshidrogenasa (ADH); su función es convertir la glucosa a acetaldehído y etanol, con el piruvato y acetil-CoA como intermediarios (Yang et al, 1994; Bruchhaus y Tannich, 1994). Esta enzima se ha purificado y estudiado por varios grupos de investigación (Bruchhaus y Tannich 1994; Yang et al, 1994; Flores et al, 1996; Espinosa et al, 2001; Ávila et al, 2002; Espinosa et al, 2004; Chen et al, 2004) y se ha encontrado que tiene la capacidad de unirse a las proteínas de la matriz extracelular y es indispensable para el crecimiento de la amiba (Espinosa, 2001). Interesantemente, se ha encontrado evidencia de su origen bacteriano como resultado de una transferencia horizontal del gen (Rosenthal et al, 1997; Field et al, 2000).

A pesar de que las amibas presentan otras dos enzimas con actividad de alcohol deshidrogenasa, éstas no son capaces de realizar la actividad de la *EhADH2*. Esta enzima ejerce su actividad sobre alcoholes lineales, además de requerir como cofactores NAD y  $Fe^{2+}$  y el tipo de enzimas al que pertenece forma una familia recientemente descrita como multifuncional, presente en bacterias Gram (-) y Gram (+) y en el protozoario parásito intestinal *Giardia lamblia* (Espinosa, 2001).

Posiblemente por la necesidad de obtener hierro, *E. histolytica* desarrolló el uso de esta enzima para unir holoTf e internalizarla, aprovechando el requerimiento de hierro de la enzima. Evidencia de esto se encuentra en otros organismos como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* (Pancholi y Fischetti, 1992; Modun y Williams, 1999) y *T. brucei* (Tanaka et al 2004), los cuales interesantemente, presentan otra enzima glicolítica para unir holoTf o lactoferrina (Lf), la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Los tripanosomas presentan dos isoformas de la GAPDH, una citoplásmica y otra presente en la membrana celular, con la capacidad, al igual que la *EhADH2*, de unir a las proteínas de matriz extracelular, como fibronectina, y otras proteínas aparentemente no relacionadas con su función, como lisozima, miosina y actina (Pancholi y Fischetti, 1992), además de funcionar como receptores de holoTf o Lf (Modun y Williams, 1999). Se ha propuesto que la actividad de GAPDH es necesaria para liberar el hierro unido a holoTf por un mecanismo desconocido hasta el momento.

Utilizando a la enzima *EhADH2* purificada y anticuerpos generados contra ella pudimos comprobar que *EhADH2* y *EhTfbp* son la misma proteína. Ambas son reconocidas por los anticuerpos anti-RTf humano y anti-*EhADH2*; además de que conservan la capacidad de unir holoTf. Este resultado lo confirma la observación de que al incubar las amibas en presencia del anti-*EhADH2* y después con holoTf, la internalización se inhibe en gran parte. El anticuerpo bloquea el sitio de unión para holoTf.

Sin embargo, este mismo anticuerpo no tiene efecto en la entrada de holoLf, una proteína relacionada con holoTf que se endocita por la vía de caveola (León-Sicairos et al 2005). Por otro lado, este anticuerpo tampoco tuvo efecto alguno en la falta de unión y de internalización de la Tf sin hierro (apoTf).

La proteína amibiana de unión a holoTf mostró una alta afinidad, de  $1.81 \times 10^{-9}$  M por el ligando, en el orden 1.15 nM. A 37°C la unión y endocitosis de holoTf fue muy rápida y continuó de esta manera hasta alcanzar la saturación. Sin embargo, cuando se incubaron las amibas con holoTf a 4 °C la endocitosis del ligando no se llevó a cabo debido a la saturación de los sitios de unión y a que éstos no se internalizan a baja temperatura. Este mismo fenómeno se ha reportado anteriormente en células de mamífero, e incluso se observó que la unión de holoTf es reversible a bajas temperaturas (Dautry-Varsat et al., 1983).

Esto confirma que la endocitosis de holoTf en *E. histolytica* es un proceso regulado, que depende de la temperatura y de la concentración del ligando y también, que es continua y saturable. Sin embargo, cuando la endocitosis se estudió a altas concentraciones de holoTf se observó también el proceso de internalización independiente del receptor. Esto va de acuerdo a lo

reportado por Welter et al. (2006), quienes no obtienen saturación cuando usan concentraciones muy altas de holoTf (en el intervalo milimolar).

Estos resultados, junto con la alta afinidad por holoTf (1.15 nM), comprueban la presencia de una proteína de unión para holoTf en este parásito. En bacterias, la afinidad observada por holoTf es muy baja ( $0.7 \times 10^{-7}$  o  $4 \times 10^{-7}$  M) (Pintor et al., 1993) y en el protozoario *T. cruzi* la afinidad es de cerca de  $2.8 \times 10^{-6}$  M (Testa, 2002). Comparativamente, la amiba tiene una alta afinidad por holoTf, lo que sugiere que el parásito es muy eficiente para obtener el hierro de esta proteína.

HoloTf se internaliza en vesículas cubiertas de clatrina y es transportada a la ruta endolisosomal. Sin embargo, *EhTfbp* reconocida con el anticuerpo anti-*EhADH2* no interaccionó con clatrina. Sólo se pudo observar al inicio de la internalización la co-localización entre holoTf y el anti-*EhADH2*, de manera que holoTf interacciona con su proteína de unión *EhTfbp* muy rápidamente. La relación entre *EhADH2* y la unión de holoTf puede explicarse por su contenido de hierro, debido a que la secuencia probable de *EhADH2* no presenta algún sitio de unión a holoTf. Cuando incubamos con apoTf, es decir, la forma no férrica de la Tf, no hubo interacción, como se había reportado anteriormente (Reyes-López, 2001). Esto indica dos cosas, primero que la amiba es capaz de discriminar entre holo y apoTf, probablemente a través de *EhTfbp*, la cual necesita hierro para su actividad y segundo, que holoTf requiere de unirse a otra proteína o receptor para entonces internalizarse en las vesículas cubiertas de clatrina. Este mecanismo se ha propuesto anteriormente para la GAPDH estafilococal que es capaz de quitar el hierro a holoTf (Modun y Williams, 1999).

La fosforilación del receptor del Tf (RTf) en mamíferos al unir a la Tf son tipos específico de receptor que al unirse a su ligando, se favorece la activación de otras proteínas que llevan a respuestas celulares específicas que permiten la proliferación celular y el crecimiento (Vieira et al., 1996).

La señalización, el metabolismo, la diferenciación, la proliferación y en otros procesos celulares son regulados por proteín-cinasas (PKs) (Braga y de Souza, 2006).

La fosforilación de tirosina y de histidina se ha documentado en protozoarios parásitos, pero no se sabe qué PK lleva a cabo esta fosforilación. Las PKs conocidas en protozoarios parásitos pueden agruparse en las mismas familias de PKs de eucariontes superiores estudiadas extensivamente. Sin embargo, poco se conoce acerca de su función en los parásitos pero, por la secuencia de cambios en la fosforilación de proteínas durante el ciclo de vida, se sugiere que estas enzimas tienen un papel importante en la virulencia, diferenciación y división celular (Braga y de Souza, 2006).

En *T. brucei* se encontró una tirosín-cinasa involucrada en la proliferación o regulación de crecimiento, que puede estar actuando en la regulación de un factor de crecimiento y en la transducción de señales en este protozoario (Braga y de Souza, 2006). Varias PKs de protozoarios parásitos se han probado como blanco de fármacos, dado que algunos inhibidores de PKs han mostrado tener efectos anti-proliferativos en protozoarios.

En *Entamoeba histolytica* se han reportado varias PK de la familia de cinasas transmembranales de gran importancia en el crecimiento y fagocitosis (Buss et al., 2010).

Debido a que holoTf puede estar presente en microdominios de la membrana celular recubiertos de clatrina y especializados en la concentración de receptores y señalización celular durante su internalización en los trofozoítos, decidimos estudiar si se lleva a cabo la fosforilación del receptor durante la interacción de las amibas con holoTf; que a su vez activaría alguna vía de señalización como MAP-cinasas que tienen un importante papel en el crecimiento celular.

La genisteína que se ha utilizado para entender el papel fisiológico de la fosforilación de tirosina, tuvo un efecto inhibitorio en el crecimiento y la proliferación a la concentración de 20  $\mu$ M. En presencia de holoTf se inhibió la internalización hasta un 48%. Por otro lado, en las proteínas totales se observó que la fosforilación de *EhTfbp* varía con respecto al tiempo de incubación con holoTf. Sin embargo, en presencia de genisteína se observó la disminución de la fosforilación.

La internalización de holoTf puede participar en la señalización intracelular puesto que se internaliza en vesículas recubiertas de clatrina, sitios

de la membrana de gran importancia en la transducción de señales y *EhTfbp* fosforilada puede desencadenar una respuesta celular que se inicia con la internalización.

En gran cantidad de receptores se ha reportado que la señalización lleva hacia la activación de MAPK/ERK, "Mitogen-activated protein cinasa" (Calzolari et al., 2006) que lleva la señal de la superficie celular al núcleo y entre ellos la respuesta generada por el receptor de Transferrina 2, (RTf2), en células de mamífero. Se propone que la función de señalización la lleva a cabo el RTf2 específicamente, a diferencia de RTf1 que parece no generar la misma señal.

Para esto, los trofozoítos de *E. histolytica* se incubaron a diferentes tiempos con holoTf y se incubaron con el anticuerpo anti-MAPK. Se pudo observar una banda de 42 kDa cuya intensidad varió de acuerdo al tiempo de incubación con holoTf.

Es necesario realizar más estudios para asegurar que *EhTfbp* se fosforila y para identificar a las proteínas con las que está relacionada para que se lleve a cabo este proceso.

Por otro lado, debido a que se localizó el anticuerpo anti-LAMP junto con holoTf en lisosomas y a que éstos contienen gran cantidad de proteasas, decidimos utilizar el método de degradación de sustrato en gel (Serrano et al. 1998a) para evaluar la presencia de proteasas.

Se encontraron por lo menos cuatro bandas de degradación de holoTf en la proteína amibiana total y cinco en el sobrenadante del medio de cultivo, todas del tipo cisteín-proteasas. Será necesario demostrar la especificidad de estas proteasas por la holoTf, así como la presencia de éstas en los lisosomas para afirmar que holoTf es degradada en estas estructuras. Además, es necesario también estudiar el mecanismo de obtención del hierro intracelular una vez que la holoTf es internalizada y transportada en el tráfico endo/lisosomal.

Por último, la presencia de proteasas en el medio de cultivo puede ser evidencia de que *E. histolytica* tiene otro mecanismo de obtención del hierro a partir de holoTf, hasta ahora no descrito en este parásito.

En conclusión, *E. histolytica* es un protozooario parásito que presenta las rutas endocíticas y de tráfico vesicular típicos de células superiores, las cuales las usa de manera regulada para endocitar nutrientes y proteínas del huésped. Estos procesos los lleva a cabo ya sea con el fin de adquirir nutrientes, para la obtención del hierro o para otras funciones.

La endocitosis amibiana de las moléculas del huésped con propósito de nutrición no se ha estudiado. El estudio de la captura y tráfico vesicular de las proteínas con hierro del huésped en *E. histolytica* se puede contribuir al mejor entendimiento de la biología celular y la fisiología del parásito. Esta información puede ser útil para el diseño de nuevas estrategias de ataque contra *E. histolytica*, bloqueando las proteínas blanco o los genes involucrados en la adquisición y/o el tráfico de las proteínas que contienen hierro.

---

## PERSPECTIVAS

1. Estudiar el papel de la proteína acetaldehído-alcohol deshidrogenasa (*EhADH2*) en la unión de la holoTf y en la obtención del hierro.
2. Caracterizar bioquímicamente a *EhADH2* para poder conocer sus propiedades como receptor y su interacción directa con otras proteínas que contienen hierro.
3. Continuar con el estudio de la señalización despertada por la endocitosis de la holoTf.
4. Determinar el potencial antigénico de *EhADH2*, probando si sueros de pacientes con amibiasis presentan anticuerpos contra ella, ya sea para poder considerar su uso dentro de una vacuna o para ser utilizada como blanco terapéutico.
5. Purificar las proteínas vesiculares de *Entamoeba histolytica* que interaccionan con la holoTf durante su internalización y su identificación por espectrometría de masas o secuenciación.
6. Estudiar la especificidad de las proteasas presentes, su relación en la obtención del hierro y la participación en la obtención del hierro extracelular una vez que son liberadas al medio.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Akasaki, K., Yamaguchi, Y., Furuno, K., and Tsuji, H. 1991. Purification, some properties and tissue distribution of a major lysosome-associated membrane glycoprotein (r-Lamp-2) of rat liver. *J. Biochem.* 110: 922-927.
2. Alexander, D.L., Schwartz, K.J., Balber, A.E., Bangs, J.D. 2002. Developmentally regulating trafficking of the lysosomal membrane protein p67 in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* 115:3253-3263.
3. Amancha, P.K., Koduru, S., Nadimpalli, S.K. 2007. Biochemical and functional characterization of cation dependent (Mr 46,000) goat mannose 6-phosphate receptor. *Glycoconj J* 24:221-229.
4. Andrews, N. C. 2000. Iron homeostasis: Insights from genetics to animal models. *Nat Rev Genet* 1:208-217.
5. Avila, E., Martínez-Alcaráz, E., Barbosa-Sabanero, G., Rivera-Baron, E., Arias-Negrete, S., Zazueta-Sandoval, R. 2002. Subcellular localization of the NAD<sup>+</sup>-dependent alcohol dehydrogenase in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *J Parasitol* 88(2): 217-222.
6. Bahrami, F., Ekins, A., Niven, D.F. 2003. Iron acquisition by *Actinobacillus suis*: identification and characterization of transferrin receptor proteins and encoding genes. *Vet Microbiol Jun* 24; 94(1):79-92.
7. Batista, E.J., de Menezes Feitosa, L.F., de Souza, W. 2000. The endocytic pathway in *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Res Nov*; 86(11):881-90
8. Batista, E. J., Souza, W. 2004. Involvement of protein kinases on the process of erythrophagocytosis by *Entamoeba histolytica*. *Cell Biol Int* 28, 243–248.
9. Bitter, W., Gerrits, H., Kieft, R., Borst, P. 1998. The role of transferrin-receptor variation in the host range of *Trypanosoma brucei*. *Nature*. Jan 29; 391(6666):499-502.
10. Bøg Y.S., Andresen L.O., Bastholm L., Elling F., Angen O., Heegaard P.M. 2001. The transferrin receptor of *Actinobacillus*

- pleuropneumoniae*: quantitation of expression and structural characterization using a peptide-specific monoclonal antibody. *Vet Microbiol.* Jul 3; 81(1):51-64.
11. Borst, P., Rudenko, G., Taylor, M., Blundell, P., Van Leeuwen, F., Bitter, W., Cross, M. y McCulloch, R. 1996. Antigenic variation in *Trypanosomes*. *Archives of Medical Research* 27:379-388.
  12. Bracha, R., Chayen, A., Rosenberg, I., Warren, L.G., Mirelman, D. 1987. Isolation and partial characterization of the hexokinase isoenzymes from pathogenic and non-pathogenic strains of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol Sep*; 25(2):203-12.
  13. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
  14. Braga, M.V., de Souza, W. 2006. Effects of protein kinase and phosphatidylinositol-3 kinase inhibitors on growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett Mar*; 256(2):209-16.
  15. Brickman, M.J., Balber, A.E. 1993. *Trypanosoma brucei rhodesiense*: membrane glycoproteins localized primarily in endosomes and lysosomes of bloodstream forms. *Exp Parasitol* 76:329-344.
  16. Brickman, M.J., Balber, A.E. 1994a. *Trypanosoma brucei brucei* and *Trypanosoma brucei gambiense*: Stumpy bloodstream forms express more CB1 epitope in endosomes and lysosomes than slender forms. *J Euk Microbiol* 41:533-536.
  17. Brickman, M.J., Balber, A.E. 1994b. Transport of a lysosomal membrane glycoprotein from the Golgi to endosomes and lysosomes via the cell surface in African trypanosomes. *J Cell Sci* 107:3191-3200
  18. Bruchhaus, I., Tannich, E. 1994. Purification and molecular characterization of the NAD<sup>+</sup>-dependent acetaldehyde/alcohol dehydrogenase from *Entamoeba histolytica*. *Biochem J.* 303:743-748.
  19. Buss, S.N., Hamano, S., Vidrich, A., Evans, C., Zhang, Y., Crasta, O.R., Sobral, B.W., Gilchrist, C. A., Petri, W.A. Jr. 2010. Members of

- the *Entamoeba histolytica* transmembrane kinase family play non-redundant roles in growth and phagocytosis. *Int. J. for Parasitol.* 40: 833-843.
20. Calzolari, A., Raggi, C., Deaglio, S., Sposi, N., Stafsnes, M., Fecchi, K., Parolini, I., Malavasi, F., Peschle, C., Sargiacomo, M. y Testa, U. 2006. HoloRTf2 localizes in lipid raft domains and is released in exosomes to activate signal transduction along the MAPK pathway. *J. Cell Sci.* 119:21, 4486-4498
21. Charland, N., D'Silva, C.G., Dumont, R.A., Niven, D.F. 1995. Contact-dependent acquisition of transferrin-bound iron by two strains of *Haemophilus parasuis*. *Can J Microbiol.* Jan; 41(1):70-4.
22. Chávez-Munguía B, Tsutsumi V, Martínez-Palomo A. 2006. *Entamoeba histolytica*: ultrastructure of the chromosomes and the mitotic spindle. *Exp Parasitol.* Nov; 114(3):235-9. Epub 2006 Apr 24.
23. Chen, M., Li, E. y Stanley, S. Jr. 2004. Structural analysis of the acetaldehyde dehydrogenase activity of *Entamoeba histolytica* alcohol dehydrogenase 2 (*EhADH2*), a member of the ADHE enzyme family. *Mol. Biochem. Parasitol.* 137:201-205.
24. Cornelissen, C.N., Sparling, P.F. 1994. Iron piracy: acquisition of transferrin-bound iron by bacterial pathogens. *Mol Microbiol* Dec; 14(5):843-50.
25. Cuervo, A.M., Hu, W., Lim, B., Dice, J.F. 1998. IκB is a substrate for selective pathway of lysosomal proteolysis. *Mol. Biol. Cell.* 9: 1195-2010.
26. Daukas, G., Zigmond, S. 1985. Inhibition of receptor-mediated but not fluid-phase endocytosis in polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol* 101, 1673–1679.
27. Dautry-Varsat, A., Ciechanover, A., Lodish, H. F. 1983. pH and recycling of transferrin during receptor mediated endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:2258-2262.
28. de la Garza, M., Gallegos, B., Meza, I. 1989. Characterization of a cytochalasin D-resistant mutant of *Entamoeba histolytica*. *J Protozool* Nov-Dec; 36(6):556-60.

29. Diamond, L., Harlow, D., Cunnick, C. 1978a. A new medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans. Roy. Soc. Med. Hyg.* 72: 431-432.
30. Diamond, L.S., Harlow, D.R., Phillips, B.R., Keites, D.B. 1978b. *Entamoeba histolytica* – iron and nutritional immunity. *Arch. Invest. Med. (Méx)* 9(Suppl. 1): 327-338.
31. Eskelinen, E.L. 2005. Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy* Apr; 1(1):1-10.
32. Eskelinen, E.L. 2006. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Aspects Med.* Oct-Dec; 27(5-6):495-502.
33. Espinosa, E., Clark, D., Stanley, S. Jr. 2004. *Entamoeba histolytica* alcohol dehydrogenase 2 (*EhADH2*) as a target for anti-amebic agents. *J Antimicrob Chem* 54: 56-59.
34. Espinosa, E., Van, L., Zhang, Z., Foster, L., Clark, D., Li, E., Stanley, S. L. Jr. 2001. The bifunctional *Entamoeba histolytica* alcohol dehydrogenase 2 (*EhADH2*) protein is necessary for amoebic growth and survival and requires an intact C-terminal domain for Both alcohol dehydrogenase and acetaldehyde dehydrogenase activity. *J Biol Chem* 276:23, 20136-210143.
35. Falkowska-Hansen, B., Falkowski, M., Metharom, P., Kronic, D., Goerd, S. 2007. Clathrin-coated vesicles form a unique net-like structure in liver sinusoidal endothelial cells by assembling along undisrupted microtubules. *Exp Cell Res* 15, 1745–1757
36. Ferreirós C.M., Ferrón L., Criado M.T. 1994. In vivo human immune response to transferrin-binding protein 2 and other iron-regulated proteins of *Neisseria meningitidis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* Jan; 8(1):63-8.
37. Field, J., Rosenthal, B., Samuelson, J. 2000. Early lateral transfer of genes encoding malic enzyme, acetyl-CoA synthetase and alcohol dehydrogenases from anaerobic prokaryotes to *Entamoeba histolytica*. *Mol. Microbiol* 38(3):446-455.

38. Flores, B., Stanley, S. Jr., Yong, T., Ali, M., Yang, W., Diedrich, D., Torian, B. 1996. Surface localization, regulation and biologic properties of the 96 kDa alcohol/aldehyde dehydrogenase (*EhADH2*) of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* 173:226-231.
39. Genco, C. A., Desai, P. J. 1996. Iron acquisition in the pathogenic *Neisseria*. *Trends Microbiol* 4: 179–184.
40. Gerrits, H., Mussmann, R., Bitter, W., Kieft, R., Borst, P. 2002. The physiological significance of transferrin receptor variations in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* Feb;119(2):237-47.
41. Gorringe, A.R., Borrow, R., Fox, A.J., Robinson, A. 1995. Human antibody response to meningococcal transferrin binding proteins: evidence for vaccine potential. *Vaccine*. Sep; 13(13):1207-12.
42. Gosh, S. K., Field, J., Frisardi, M., Rosenthal, B., Mai, Z., Rogers, R. & Samuelson, J. 1999. Chitinase secretion by encysting *Entamoeba histolytica* trophozoites: Localization of secretory vesicles, endoplasmic reticulum, and Golgi apparatus. *Infect Immun* 67:3073–3081.
43. Gosh, S. K., Samuelson, J. 1997. Involvement of p21<sup>racA</sup>, phosphoinositide 3-kinase, and vacuolar ATPase in phagocytosis of bacteria and erythrocytes by *Entamoeba histolytica*: suggestive evidence for coincidental evolution of amebic invasiveness. *Infect Immun* 65, 4243–4249.
44. Grab, D.J., Wells, C.W., Shaw, M.K., Webster, P., Russo, D.C. 1992. Endocytosed transferrin in African trypanosomes is delivered to lysosomes and may not be recycled. *Eur J Cell Biol* Dec; 59(2):398-404.
45. Gray-Owen, S. D., Schyvers, A.B. 1996. Bacterial transferrin and lactoferrin receptors. *Trends in Microbiology* 4(5):185-191.
46. Gutierrez D., Wessling-Resnick, M. 1996. Molecular mechanisms of iron transport. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 6:1-14.
47. Haldar, K., Henderson, C.L., Cross, G.A. 1986. Identification of the parasite transferrin receptor of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and its acylation via 1,2-diacyl-sn-glycerol. *Proc Natl Acad Sci U S A* Nov; 83(22):8565-9.

48. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 2007. Free radicals in biology and medicine. Fourth edition. Oxford University Press Inc. New York.
49. Haque, R., Mondal, D., Kirkpatrick, B.D., Akther, S., Farr, B.M., Sack, R.B., Petri, W.A. Jr. 2003. Epidemiologic and clinical characteristics of acute diarrhea with emphasis on *Entamoeba histolytica* infections in preschool children in an urban slum of Dhaka, Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg* Oct; 69(4):398-405.
50. Hernández, Y., Castillo, C., Roychowdhury, S., Hehl, A., Aley, S., Das, S. 2007. Clathrin-dependent pathways and the cytoskeleton network are involved in ceramide endocytosis by a parasitic protozoan, *Giardia lamblia*. *Int J Parasitol* 37:21-32.
51. Heuser, J. E., Anderson, R. G. 1989. Hypertonic media inhibit receptor mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J Cell Biol* 108: 389–400.
52. Holland, J., Parsons, T.R., Hasan, A.A., Cook, S.M., Stevenson, P., Griffiths, E., Williams, P. 1996. Conservation and antigenic cross-reactivity of the transferrin-binding proteins of *Haemophilus influenzae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Neisseria meningitidis*. *Microbiology* Dec; 142(Pt 12):3505-13.
53. Huston, C.D. 2004. Parasite and host contributions to the pathogenesis of amebic colitis. *Trends Parasitol* Jan; 20(1):23-6.
54. Jarosik, G.P., Maciver, I., Hansen, E.J. 1995. Utilization of transferrin-bound iron by *Haemophilus influenzae* requires an intact tonB gene. *Infect Immun* Feb; 63(2):710-3.
55. Juárez, P., Sánchez-López R., Stock, R. P., Olvera, A., Ramos, M. A., Alagón, A. 2001. Characterization of the Ehrab8 gene, a marker of the late stages of the secretory pathway of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 116: 223–228.
56. Kuivinen, E., Hoffman, B.L., Hoffman, P.A., Carlin, C.R. 1993. Structurally related class I and class II receptor protein tyrosine kinases are down-regulated by the same E3 protein coded for human group C adenoviruses. *J.Cell Biol.* 120(5): 1271-1279.

57. Leon-Sicairos, N., Reyes-López, M., Canizalez-Román, A., Bermúdez-Cruz, R.M., Serrano-Luna, J., Arroyo, R., de la Garza, M. 2005. Human holo-lactoferrin: endocytosis and use as an iron source by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Microbiology* 151 (Pt 12):3859-3871.
58. López-Soto, L.F., González-Robles, A., Salazar-Villatoro, L., León-Sicairos, N., Piña-Vázquez, C., Pérez, E., de la Garza, M. 2009. *Entamoeba histolytica* uses ferritin as an iron source and internalises this protein by means of clathrin-coated vesicles. *Int J Parasitol* 39:417-426
59. McGugan, G.C. Jr, Temesvari, L.A. 2003. Characterization of a Rab11-like GTPase, EhRab11, of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* Jul; 129(2):137-46.
60. Malorni, W., Testa, U., Rainaldi, G., Tritarelli, E., Peschle, C. 1998. Oxidative stress leads to a rapid alteration of transferrin receptor intravesicular trafficking. *Exp Cell Res* May 25; 241(1):102-16.
61. Manning-Cela, R., Marquez, C., Franco, E., Talamas-Rohana, P., Meza, I. 2003. BFA-sensitive and insensitive exocytic pathways in *Entamoeba histolytica* trophozoites: their relationship to pathogenesis. *Cell Microbiol* Dec; 5(12):921-32.
62. Mauël J. 1996. Intracellular survival of protozoan parasites with special reference to *Leishmania spp.*, *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. *Adv Parasitol* 38:1-51.
63. Marion, S., Laurent, C., Guillén, N. 2005. Signalization and cytoskeleton activity through myosin IB during the early steps of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*: a proteomic approach. *Cell Microbiol* 7:1504–1518.
64. Marion, S., Guillén, N. 2006. Genomic and proteomic approaches highlight phagocytosis of living and apoptotic human cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Int J Parasitol*. Feb; 36(2):131-9. Epub 2005 Nov 28.
65. Meza, I., Clarke, M. 2004. Dynamics of endocytic traffic of *Entamoeba histolytica* revealed by confocal microscopy and flow cytometry. *Cell Mot Cytoskeleton* 59: 215–226.

66. Modun, B. y Williams, P. (1999) The staphylococcal transferrin-binding protein is a cell wall glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase. *Infect. Immun* 67(3): 1086-1092.
67. Morgan, G.W., Allen, C.L., Jeffries, T.R., Hollinshead, M., Field, M.C. 2001. Developmental and morphological regulation of clathrin-mediated endocytosis in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* 114 (Pt 14):2605-2615.
68. Mirelman, D. 1987. Ameba-bacterium relationship in amebiasis. *Microbiol Rev Jun*; 51(2):272-84.
69. Mitra, A.P., Datar, R.H., Cote, R.J. 2006. Molecular pathways in invasive bladder cancer: new insights into mechanisms, progression, and target identification. *J Clin Oncol Dec 10*; 24(35):5552-64.
70. Nadimpalli, S.K., von Figura, K. 2002. Identification of the putative mannose 6-phosphate receptor (MPR 46) protein in the invertebrate mollusc. *Bioscience Rep* 22:513-521.
71. Nakada-Tsukui, K., Okada, H., Mitra, B. N., Nozaki, T. 2009. Phosphatidylinositol-phosphates mediate cytoskeleton reorganization during phagocytosis via a unique modular protein consisting of RhoGEF/DH and FYVE domains in the parasitic protozoan *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol* 11:1471–1491.
72. Neuhaus, E. M., Almers, W., Soldati, T. 2002. Morphology and dynamics of the endocytic pathway in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Biol Cell* 13: 1390–1407.
73. Okada, M., Huston, C., Oue, M., Mann, B., Petri, W. Jr., Kita, K., Nozaki, T. 2006. Kinetics and strain variations of phagosome proteins of *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. *Mol Biochem Parasitol* 145:171-183.
74. Pancoholi, V., Fischetti, V. 1992. A major surface protein on group A *Streptococci* is glyceraldehydes-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *J Exp Med* 176: 415-426.
75. Peck, R.F., Shiflett, A.M., Schwartz, K.J., McCann, A., Hajduk, S.L., Bangs, J.D. 2008. The LAMP-like protein p67 plays an essential role in

- the lysosome of African trypanosomes. *Mol Microbiol* May; 68(4):933-46.
76. Pintor M., Ferreirós C.M., Criado M.T. 1993. Characterization of the transferrin-iron uptake system in *Neisseria meningitidis*. *FEMS Microbiol Lett.* Sep 1; 112(2):159-65.
77. Qian, Z. M., Tang, P. L. 1995. Mechanism of iron uptake by mammalian cells. *Biochem Biophys Acta* 1269: 205-214.
78. Qualmann, B., Kessels, M. M., Kelly, R. B. 2000. Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 150: F111–F116.
79. Que, X., Brinen, L.S., Perkins, P., Herdman, S., Hirata, K., Torian, B.E., Rubin, H., McKerrow, J.H., Reed, S.L. 2002. Cysteine proteinases from distinct cellular compartments are recruited to phagocytic vesicles by *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol.* Jan; 119(1):23-32.
80. Ravdin, J.I., Schlesinger, P.H., Murphy, C.F., Gluzman, I.Y., Krogstad, D.J. 1986. Acid intracellular vesicles and the cytolysis of mammalian target cells by *Entamoeba histolytica* trophozoites. *J Protozool* Nov; 33(4):478-86.
81. Ravdin, J.I., Murphy, C. F., Schlesinger, P. H. 1988. The cellular regulation of vesicle exocytosis by *Entamoeba histolytica*. *J Protozool* 35: 159–163.
82. Reyes-López, M. Serrano-Luna, J., Negrete, E. León-Sicairos, N. Guerrero, A.L., de la Garza, M. 2001. *Entamoeba histolytica*: transferrin binding proteins. *Experimental Parasitology* 99: 132-140.
83. Richardson, D., Ponka P. 1997. The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta* 1331: 1–40.
84. Robibaro, B., Hope, H.C., Yang, M., Coppens, I., Ngô, H. M., Stedman, T. T., Pprotka, K., Joiner, K. A. 2001. Endocytosis in different lifestyles of protozoan parasitism: role in nutrient uptake with special reference to *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 31: 1343–1353.

85. Rodríguez, M.H., Jungery, M. 1986. A protein on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes functions as a transferrin receptor. *Nature* Nov 27-Dec 3; 324(6095):388-91.
86. Romero-Díaz, M., Gómez, C., López-Reyes, I., Martínez, M.B., Orozco, E., Rodríguez, M.A. 2007. Structural and functional analysis of the *Entamoeba histolytica* EhrabB gene promoter. *BMC Mol Biol* Sep 20; 8:82.
87. Rosenthal, B., Mai, Z., Caplivsky, D., Ghosh, S., de la Vega, H., Graf, T., Samuelson, J. 1997. Evidence for the bacterial origin of genes encoding fermentation enzymes of the amitochondriate protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J Bact* 179(11): 3736-3745.
88. Sahoo, N., Labruyère, E., Bhattacharya, S., Sen, P., Guillén, N., Bhattacharya, A. 2004. Calcium binding protein 1 of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* interacts with actin and is involved in cytoskeleton dynamics. *J Cell Sci* 117: 3625–3634.
89. Salmon, D., Hanocq-Quevertier, J., Paturiaux-Hanocq, F., Pays, A., Tebabi, P., Nolan, D., Michel, A., Pays, E. 1997. Characterization of the ligand-binding site of the transferrin receptor in *Trypanosoma brucei* demonstrates a structural relationship with the N-terminal domain of the variant surface glycoprotein. *The EMBO Journal* 16: 7272-7278.
90. Sánchez, G.M., Mújica, V.Y. 2009. Panorama epidemiológico de la amibiasis intestinal en México. 2003 – 2008. *Epidemiología, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica* 49(26) :1-4.
91. Serrano, J.J., de la Garza, M., Reyes, M., León, G., Tovar, R., Muñoz, M.K. 1996. *Entamoeba histolytica*: proteinase secretion induced by collagen type I is dependent on cytoskeleton integrity. *Parasitol Res*; 82(3):200-5.
92. Serrano-Luna, J., Negrete, E., Reyes, M., de la Garza, M. 1998a. *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS: hemoglobin-degrading neutral cysteine proteases. *Exp Parasitol* May; 89(1):71-7.
93. Serrano-Luna, J., Arzola, J., Reyes-López, M., de la Garza, M. 1998b. Iron and *Entamoeba histolytica* HM-1:IMSS. In *Proceedings of the 9th*

- Internacional Congress of of parasitology. Mokuhari Chiba, Japan, pp 827-830. Bologna, Italy: Morduzzi Ed.
94. Slepnev, V. I., De Camilli, P. 2000. Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nat Rev* 1, 161–172.
  95. Soares, M.J., Souto-Padrón, T., De Souza, W. 1992. Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Sci* May; 102 ( Pt 1):157-67.
  96. Steverding, D., Stierhof, Y.D., Fuchs, H., Tauber, R., Overath, P. 1995. Transferrin-binding protein complex is the receptor for transferrin uptake in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol* Dec; 131(5):1173-82.
  97. Steverding, D. 2000. The transferrin receptor of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology International* 48, 191-198.
  98. Surolia, N., Misquith, S. 1996. Cell surface receptor directed targeting of toxin to human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *FEBS Lett* Oct 28; 396(1):57-61.
  99. Tanaka, T., Abe, Y. Inoue, N., Kim, W., Kumura, H., Nagasawa, H., Igarashi, I., Shimazaki, K. 2004. The detection of bovine lactoferrina binding protein on *Trypanosoma brucei*. *J Vet Med Sci* 66(6):619-625.
  100. Taylor, J.M., Heinrichs, D.E. 2002. Transferrin binding in *Staphylococcus aureus*: involvement of a cell wall-anchored protein. *Mol Microbiol* 43: 1603–1614.
  101. Tazeh, N.N., Bangs, J.D. 2007. Multiple motifs regulate trafficking of the LAMP-like protein p67 in the ancient eukaryote *Trypanosoma brucei*. *Traffic* Aug; 8(8):1007-17. Epub 2007 May 22.
  102. Testa, U. 2002. Transferrin. In: *Proteins of iron metabolism*, pp. 143-247, Edited by U. Testa. Boca Raton, FL: CRC Press.
  103. Temesvari, L.A., Harris, E.N., Stanley, S.L.Jr., Cardelli, J.A. 1999. Early and late endosomal compartments of *Entamoeba histolytica* are enriched in cysteine proteases, acid phosphatase and several Ras-related Rab GTPases. *Mol Biochem Parasitol* 103:225-241
  104. Tovar, R., Murguía-López, M. L., Muñoz, M. L. 2000. Immunolocalization of clathrin during electron-dense granule secretion in *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* 31: S143–S144.

105. Tsutsumi, V., Ramírez-Rosales, A., Lanz-Mendoza, H., Shibayama, M., Chávez, B., Rangel-López, E., Martínez-Palomo, A. 1992. *Entamoeba histolytica*: erythrophagocytosis, collagenolysis, and liver abscess production as virulence markers. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* Mar-Apr; 86(2):170-2.
106. Weinberg, E. D. 2009. Iron availability and infection. *Biochim Biophys Acta* 1790: 600–605.
107. Weinberg, E.D. 2003. Iron chelation in chemotherapy. *Adv Appl Microbiol* 52:187-208.
108. Weinberg, E.D. 1999. Development of clinical methods of iron deprivation for suppression of neoplastic and infectious diseases. *Cancer Invest* 17(7):507-13.
109. Weinberg, E.D. 1996. Iron withholding: a defense against viral infections. *Biometals.* Oct; 9(4):393-9.
110. Weinberg, E.D. 1978. Iron and infection. *Microbiol Rev* Mar; 42(1):45-66.
111. Welter, B., Laughlin, R. C., Temesvari, L. A. 2002. Characterization of a Rab7-like GTPase, EhRab7: a marker for the early stages of endocytosis in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 121: 254–264.
112. Welter, B. H., Powell, R. R., Laughlin, R. C., McGugan, G. C., Bonner, M., King, A., Temesvari, L. A. 2006. *Entamoeba histolytica*: Comparison of the role of receptors and filamentous actin among various endocytic processes. *Exp Parasitol* 113: 91–99.
113. Wilson, C.M. 1994. Respiratory distress caused by parasites. *Pediatr Ann* Aug; 23(8):443-6.
114. Wilson, M.E., Lucchina, L.C. 2001. Photo quiz. Healthy student with a papule. New World cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis* Sep 15; 33(6):816, 899-900.
115. Vieira, A.V., Lamaze, C., Schmid, S. 1996. Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. *Science* 274:2086-2089.

116. Yang, W. Li, E., Kairong, T., Stanley, S.L.Jr. 1994. *Entamoeba histolytica* has an alcohol dehydrogenase homologous to the multifunctional ADHE gene product of *Escherichia coli*. *Mol Biochem Parasitol* 64:253-260.

## Acetaldehyde/alcohol dehydrogenase-2 (*EhADH2*) and clathrin are involved in internalization of human transferrin by *Entamoeba histolytica*

Magda Reyes-López,<sup>1</sup> Rosa María Bermúdez-Cruz,<sup>2</sup> Eva E. Avila<sup>3</sup> and Mireya de la Garza<sup>4</sup>

### Correspondence

Mireya de la Garza

mireya@cell.cinvestav.mx

<sup>1</sup>Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana, Apdo Postal 23-181, México, DF 04960, Mexico

<sup>2</sup>Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Apdo 14-740, México DF 07000, Mexico

<sup>3</sup>Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Colonia Noria Alta, Guanajuato, Gto, 36000, Mexico

<sup>4</sup>Departamento de Biología Celular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Apdo 14-740, México DF 07000, Mexico

Transferrin (Tf) is a host glycoprotein capable of binding two ferric-iron ions to become holotransferrin (holoTf), which transports iron in to all cells. *Entamoeba histolytica* is a parasitic protozoan able to use holoTf as a sole iron source *in vitro*. The mechanism by which this parasite scavenges iron from holoTf is unknown. An *E. histolytica* holoTf-binding protein (*EhTfbp*) was purified by using an anti-human transferrin receptor (TfR) monoclonal antibody. *EhTfbp* was identified by MS/MS analysis and database searches as *E. histolytica* acetaldehyde/alcohol dehydrogenase-2 (*EhADH2*), an iron-dependent enzyme. Both *EhTfbp* and *EhADH2* bound holoTf and were recognized by the anti-human TfR antibody, indicating that they correspond to the same protein. It was found that the amoebae internalized holoTf through clathrin-coated pits, suggesting that holoTf endocytosis could be important for the parasite during colonization and invasion of the intestinal mucosa and liver.

Received 26 March 2010

Revised 13 August 2010

Accepted 15 September 2010

## INTRODUCTION

Iron is a vital element for nearly all living organisms but it is bound to proteins to prevent tissue damage by oxygen free-radical formation. In mammals, iron is an enzyme cofactor and forms part of haemoproteins. In addition, iron is sequestered by proteins such as the iron-transporter transferrin (Tf) in serum and the iron-withholding defence lactoferrin (Lf) in mucosae. Thus, the free ionic-iron concentration ( $\sim 10^{-18}$  M) is far too low to sustain the growth of pathogens (Bullen *et al.*, 1978).

Bacterial pathogens have developed several mechanisms for obtaining host iron; one of these is the use of receptors that can bind iron-containing proteins, such as holoTf, holoLf, and haemoglobin, with very high host specificity (Weinberg, 2009). In Gram-negative bacteria, receptors for holoTf

generally consist of two iron-regulated outer-membrane proteins, termed TbpA and TbpB (Genco & Desai, 1996), and iron is removed from its receptor in an energy-dependent process. A transferrin-binding protein A (TbpA, also known as IsdA), has been reported in *Staphylococcus aureus* strain RN6390 (Maresso & Schneewind, 2006; Mazmanian *et al.*, 2003; Taylor & Heinrichs, 2002). Homologues of the *isd* gene are also found in Gram-positive bacilli (Bierne *et al.*, 2004; Gat *et al.*, 2008; Maresso & Schneewind, 2006). These pathogens have several elaborate mechanisms for iron sequestration.

Furthermore, it has been reported that *S. aureus* strain BB and *Staphylococcus epidermidis* strain 138 utilize the enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Gap or Tpn) to bind holoTf (Modun & Williams, 1999). Interestingly, the parasite *Trypanosoma brucei* also makes use of GAPDH for holoLf binding rather than for holoTf binding (Tanaka *et al.*, 2004). Enzymes that bind holoTf have not previously been described in parasitic protozoa.

Iron uptake in mammalian cells is initiated by the binding of holoTf to the TfR on the cell surface. Then, via clathrin-coated pits, the Tf-TfR complex becomes trapped within

Abbreviations: Ab, antibody; *EhADH2*, *Entamoeba histolytica* acetaldehyde/alcohol dehydrogenase-2; *EhTfbp*, *Entamoeba histolytica* holoTf-binding protein; ECM, extracellular matrix; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HRP, horseradish peroxidase; holoTf, holotransferrin; Lf, lactoferrin; Tf, transferrin; TfR, transferrin receptor; TRITC, tetramethylrhodamine isothiocyanate.

endocytic vesicles, which are rapidly acidified, and the iron is removed from holoTf and transported across the endosomal membrane into the cytosol. Apotransferrin (apoTf, Tf without iron) is thus formed and, still bound to the TfR, is sorted into exocytic vesicles that fuse with the plasma membrane. The complex is then exposed to the extracellular pH, where apoTf has a very low affinity for the TfR and is thus dissociated from it, ready for another cycle of iron capture and endocytosis (Dautry-Varsat *et al.*, 1983; Thorstensen & Romslo, 1990).

The presence of clathrin has been demonstrated in several protozoa (Corrèa *et al.*, 2007; Hernandez *et al.*, 2007; Morgan *et al.*, 2001; Robibaro *et al.*, 2001) and also in *Entamoeba histolytica* (León-Sicairos *et al.*, 2005; López-Soto *et al.*, 2009a). The gene encoding the clathrin protein has been identified in the *E. histolytica* genome (Loftus *et al.*, 2005). Clathrin vesicles in protozoa seem to play a crucial role in the acquisition of nutrients. HoloTf endocytosis has been reported as a clathrin-independent but cholesterol-dependent process in *Trypanosoma cruzi* (Corrèa *et al.* 2008). However, in its relatives *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma congolense* holoTf enters by receptor-mediated endocytosis in clathrin-coated vesicles (Grab *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 2000; Merschjohann & Steverding, 2006; Natesan *et al.*, 2007). The transferrin binding-protein (Tfbp) is encoded by two expression-site-associated genes, ESAG 6 and ESAG 7. The Tf-Tfbp complex is internalized and transported to lysosomes where Tf is proteolytically degraded (Maier & Steverding, 1996).

*E. histolytica* causes amoebiasis, a disease characterized by dysentery and abscesses in the large intestine and liver. Amoebiasis affects the human population worldwide, mainly in developing countries. This parasite requires about 100 µM iron for growth; thus it has developed mechanisms to scavenge iron, for example through the removal of iron from Hb, holoTf, holoLf and ferritin (León-Sicairos *et al.*, 2005; López-Soto *et al.*, 2009a, b; Reyes-López *et al.*, 2001; Serrano-Luna *et al.*, 1998). Previously, we reported the detection of *E. histolytica* holoTf-binding proteins (EhTfbp) in extracts from *E. histolytica* trophozoites cultured *in vitro*; they were detected using the anti-human transferrin receptor B3/25 mAb. This mAb co-localized with FITC-holoTf on the amoeba membrane and also in the cytoplasm, as observed by confocal laser-scanning microscopy (Reyes-López *et al.*, 2001). In this work we suggest that *E. histolytica* possesses at least two ways to internalize holoTf: one via a specific binding protein, EhTfbp, reported here, and another via a receptor-independent process (Welter *et al.*, 2006). It is suggested that, due to its absolute requirement for the iron, the parasite must obtain iron through multiple mechanisms. Our data demonstrate the involvement of the *E. histolytica* acetaldehyde/alcohol dehydrogenase-2 (EhADH2) enzyme and clathrin-coated vesicles in the binding and internalization of human holoTf. To our knowledge ADH2 has not been previously found to be involved in holoTf binding in either bacteria or protozoa.

## METHODS

**Cultures.** Trophozoites of *E. histolytica* strain HM-1:JMSS were grown axenically in BI-S-33 medium (Dibico) (Diamond *et al.*, 1978a) supplemented with 16% (v/v) heat-inactivated bovine serum (MicroLab). Cultures were grown in glass screw-cap tubes at 37 °C for 48 h and incubated for 6 h in medium without serum before starting the experiments. Tubes were placed in an ice bath for 10 min and the amoebae were harvested by centrifugation at 500 g for 5 min and washed once with PBS. Iron-saturated human transferrin was purchased from Sigma-Aldrich. Cell viability was determined by the exclusion of trypan-blue dye by live cells when observed under a light microscope in a Neubauer chamber.

**Purification of EhTfbp by immunoprecipitation with an anti-human TfR mAb.** Amoebae were suspended in 50 mM HEPES (pH 7) containing an inhibitor cocktail (10 mM *p*-hydroxymercurybenzoate, 3 mM *N*-ethylmaleimide, 1 mM PMSF, 30 mM EDTA) and disrupted by five cycles of freezing and thawing before total protein concentration quantification (Bradford, 1976). Next, 5 µg anti-human TfR mAb H68.4 (Zymed, catalogue no. 13-6800) was added to 500 µg amoebic protein. The mixture was incubated overnight at 4 °C, after which 15 µl Sepharose-coupled protein A was added, followed by further incubation. The precipitate was washed with a buffer containing 50 mM Tris/HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% NP-40 and 0.5% sodium deoxycholate (SD), and the inhibitor cocktail, centrifuged for 20 s at 12 000 g) and washed again with the above buffer. It was then centrifuged and washed again with the same buffer but without NaCl, centrifuged, boiled for 5 min with 5% β-mercaptoethanol and separated by 10% SDS-PAGE.

To test whether the precipitated EhTfbp was still able to bind holoTf, it was electro-transferred (1.5 h, 400 mA) to a nitrocellulose membrane (Towbin *et al.*, 1979), which was blocked for 1 h with 5% non-fat milk in PBS with 0.05% Tween 20 (pH 7.4), incubated overnight at 4 °C with 115 nM HRP-holoTf and washed twice with PBS. The reaction was detected either with 3,3'-diaminobenzidine and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or by chemiluminescence.

**Mass spectrometry.** To identify the amoebic protein that was able to bind holoTf and could be recognized by the anti-human TfR, the band obtained was excised from the gel and digested *in situ* with trypsin. The digestion products were extracted from the gel fragments and analysed by MS/MS in Qtrap 3200 equipment.

**Cross-reaction between EhTfbp and EhADH2.** EhADH2 was purified and a rabbit antiserum was prepared against the 95 kDa protein band excised from the gel (Avila *et al.*, 2002). To determine whether the purified EhADH2 and the immunoprecipitated EhTfbp were the same protein, they were separated by 10% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane blocked with PBS-T-milk for 1 h at room temperature (RT). EhTfbp and EhADH2 proteins were incubated overnight at 4 °C with anti-EhADH2 Ab (1:1000) and anti-human TfR H68.4 mAb (1:100). Total amoebic protein, molecular mass markers (Bio-Rad) and a purified non-related protein of *Giardia lamblia* were used as controls. Secondary HRP-anti-rabbit and HRP-anti-mouse Abs were then added and incubated for 2 h at RT. The reaction was detected by chemiluminescence.

The cross-reaction between EhADH2 and EhTfbp was also studied by 2D gel electrophoresis. EhADH2 was first resolved by IEF in a pH 6-9 strip, using the I-PG-Phor System (Invitrogen). The 2D electrophoresis was performed using 10% SDS-PAGE. The gel was transferred to a nitrocellulose membrane and incubated with the anti-human TfR mAb (1:1000) overnight at 4 °C. The membrane was washed and incubated for 2 h at RT with a secondary anti-mouse Ab, and the reaction was revealed by chemiluminescence.

## Participation of EhADH2 in the holoTf binding/internalization

**Confocal microscopy.** Amoebae ( $10^4$ ) were incubated for 30 min at 37 °C with anti-EhADH2 Ab (1:100), washed and then incubated with FITC-holoTf (115 nM) for 1, 2, 5, 10, 15, 20 or 30 min. Next, they were fixed for 30 min with 2% paraformaldehyde and incubated with tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC)-anti-rabbit Ab for 1 h. The same experiment was repeated but incubating first with FITC-holoTf and then with anti-EhADH2 Ab. Samples were mounted in Vectashield medium on glass slides and examined with a Leica TCS-SP2 confocal laser-scanning microscope, observing between 10 and 20 optical sections from each cell.

**Flow cytometry.** Amoebae ( $2 \times 10^5$ ) were incubated at 37 °C (allowing holoTf binding and endocytosis to take place) or 4 °C (avoiding endocytosis) with 115 nM FITC-holoTf for 0.5, 1, 5, 15, 30, 45 or 60 min. After incubation, each sample was washed twice, fixed, washed again and suspended in 500 µl PBS for scanning in a FACSort flow cytometer (Becton Dickinson).

To study the effect of holoTf concentration on its internalization, amoebae were incubated with different concentrations of FITC-holoTf (1.15 fM–115 µM) for 30 min at 37 °C or at 4 °C. They were then treated for scanning in the flow cytometer.

To determine whether EhADH2 participates in the binding of holoTf to the cell, trophozoite cultures were adjusted to  $10^6$  cells ml<sup>-1</sup> in PBS containing different dilutions of the anti-EhADH2 Ab (1:1, 1:10, 1:100, and 1:1000) and incubated for 15 min at 37 °C. FITC-holoTf (115 nM) was added to each tube and incubated for additional 15 min. The amoebae were washed, fixed and then suspended in 500 µl PBS for scanning in the flow cytometer. The fluorescence data obtained were compared with those of tests using FITC-apoTf (iron-lacking Tf) and with FITC-holoTf.

**Localization of clathrin, EhADH2 and holoTf in E. histolytica.** Trophozoite cultures ( $2 \times 10^5$  cells) were incubated for 0, 2, 5, 10, 15 or 30 min with FITC-holoTf (1.15 µM) in medium without serum. Samples were fixed, permeabilized (0.5% Triton X-100, 10 min), and incubated for 1 h at 37 °C with an anti-bovine brain clathrin Ab (Sigma, cat. no. C8034, 1:50). Then, TRITC-anti-rabbit IgG was added and incubated for 2 h. Samples were washed and examined by confocal microscopy. A negative control with only the secondary Ab was included to test the specificity of the reaction.

A similar experiment was performed using anti-EhADH2 Ab to observe EhADH2 alongside clathrin during holoTf internalization. In addition, the anti-human TfR Ab was used in cells incubated with holoTf and stained for clathrin.

**Effect of endocytosis inhibitors on holoTf internalization.** First, the maximal concentration of inhibitor that would not affect cell viability was determined. Amoebae ( $10^6$ ) were incubated for 30 min at 37 °C with the following inhibitors: 1–10% sucrose; 0.5–100 mM chloroquine diphosphate; 0.1–10 µM filipin; 1–2 µM colchicine; 10 µM cytochalasin D; and 50–300 µM wortmannin. Fresh medium containing 1.15 µM FITC-holoTf along with the inhibitor to be tested was added, and the amoebae were incubated for another 30 min. The samples were fixed, washed and prepared for scanning by flow cytometry.

For confocal microscopy the same treatment was employed but with the amoebae being placed onto glass slides and allowed to adhere at 37 °C for 15 min before treatment with inhibitors and FITC-holoTf. The samples were then fixed, washed and prepared with Vectashield. Between ten and twenty optical sections were observed from each cell.

## RESULTS

### Purification of EhTfbp and its identification by mass spectrometry

A polypeptide of 95 kDa was the main protein precipitated from amoeba extracts with the anti-TfR H68.4 mAb (Fig. 1a, lane 1); this polypeptide was still able to bind HRP-holoTf (Fig. 1a, lane 2). When the polypeptide was analysed by MS/MS, and after searching in public databases with ProteinPilot software, two peptides, TRNPVFSFHPSALK and KIFIVSDRM, were identified with 99% confidence in two independent experiments. The two peptides belong to EhADH2 (ADH2\_ENTH1 with accession number Q24803) previously described by Yang *et al.*, (1994), Bruchhaus & Tannich, (1994) and Avila *et al.*, (2002).

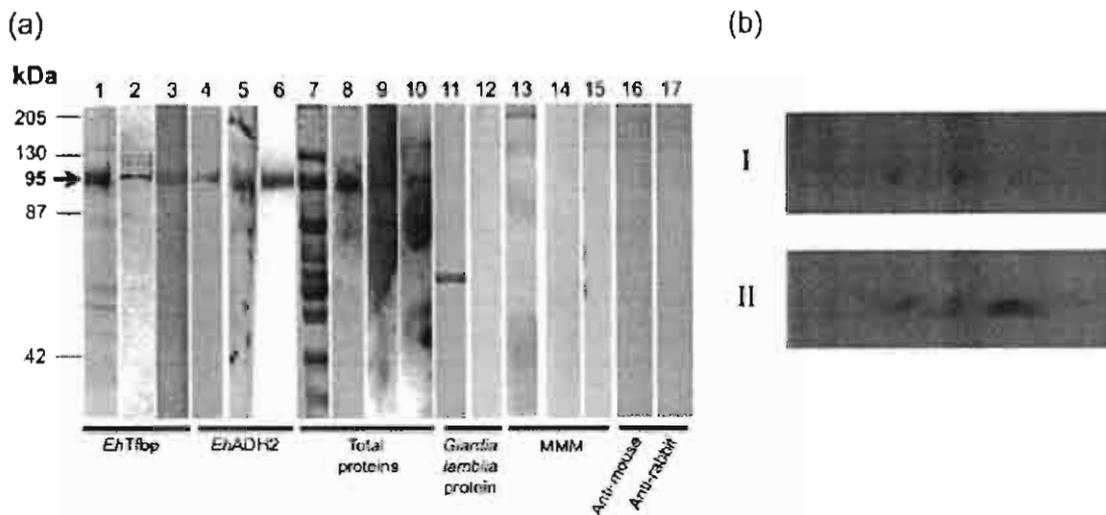
### Cross-reaction between EhTfbp and EhADH2

Since the MS analyses of EhTfbp revealed a high identity with EhADH2, the latter protein was purified and an anti-EhADH2 Ab was used to find out whether EhTfbp and EhADH2 are related. Both proteins showed the same molecular mass by SDS-PAGE (Fig. 1a, lanes 1 and 4, respectively) and were recognized by the anti-EhADH2 Ab (Fig. 1a, lanes 3 and 5, respectively). EhADH2 was also recognized by the anti-human TfR mAb (Fig. 1a, lane 6). To determine whether other non-related proteins are detected by these antibodies, amoebic total protein extracts (Fig. 1a, lane 7), were analysed. A main band of 95 kDa was recognized by the anti-EhADH2 Ab and the anti-human TfR mAb, and it also bound biotinylated holoTf (Fig. 1a, lanes 8, 9 and 10, respectively), which was observed by using the purified proteins. A protein from *Giardia lamblia* that is not involved in Tf internalization (Fig. 1a, lanes 11 and 12) and non-related molecular mass marker proteins (Fig. 1a, lanes 13–15) were used as controls; none of them were recognized by the anti-human TfR mAb (Fig. 1a, lanes 12–15). These results suggest that EhTfbp and EhADH2 are either similar or strongly related. When trophozoites were incubated without iron or in the presence of holoTf, the 95 kDa protein was still observed and in a similar quantity, suggesting constitutive expression of EhTfbp (data not shown).

To rule out any non-specific signal during 1D gel electrophoresis, an IEF experiment was performed with the purified EhADH2. Three different isoforms with pIs of 6.6, 6.52 and 6.32 were obtained (Fig. 1b, I), which were recognized by the anti-TfR mAb (Fig. 1b, II). The third isoform displayed a higher affinity to the anti-TfR mAb than the others. This result is consistent with the results of the previous cross-reactions, suggesting that the proteins are either the same or at least share high similarity.

### EhADH2 is involved in the binding/internalization of human holoTf by E. histolytica

**Confocal microscopy.** The EhADH2 protein was localized by using the anti-EhADH2 Ab. In permeabilized amoebae,



**Fig. 1.** (a) Cross-reaction between *EhTfbp* and *EhADH2*. Lanes 1–3: *EhTfbp*, 95 kDa polypeptide immunoprecipitated by using an anti-human TfR mAb. 1, Coomassie blue staining; 2, overlay with HRP-holoTf; 3, Western blot with anti-*EhADH2* Ab. Lanes 4–6: purified *EhADH2*. 4, Coomassie blue staining; 5, Western blot with anti-*EhADH2* Ab; 6, Western blot with anti-human TfR mAb. Lanes 7–10: *E. histolytica* total protein. 7, Coomassie blue staining; 8, Western blot with anti-*EhADH2* Ab; 9, Western blot with anti-human TfR mAb; 10, overlay with biotinylated holoTf. Lanes 11 and 12: a non-related protein purified from *Giardia lamblia*. 11, Coomassie blue staining; 12, Western blot with anti-human TfR mAb. Lanes 13–15: molecular mass markers (MMM). 13, Coomassie blue staining; 14, Western blot with anti-human TfR mAb; 15, Western blot with anti-*EhADH2* Ab. Lanes 16 and 17: Western blot of *E. histolytica* total protein only with the secondary Ab. 16, HRP-anti-mouse IgG; 17, HRP-anti-rabbit IgG. (b) 2D gel electrophoresis of *EhADH2*. (I) *EhADH2* isoforms stained with Coomassie blue after being separated in the first dimension by IEF (pH 8–9) and in the second dimension by 10% SDS-PAGE. (II) Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane and incubated with anti-human TfR mAb. They were then incubated with a secondary HRP-anti-mouse Ab and revealed by chemiluminescence.

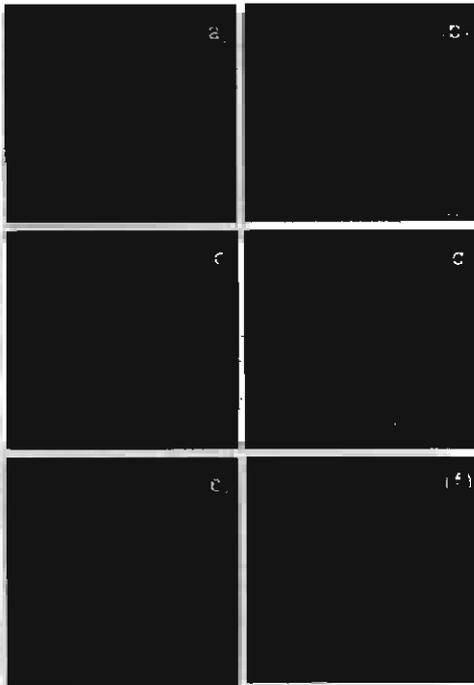
*EhADH2* was shown to be distributed in the cell membrane and in the cytoplasm (Fig. 2a, red), as was reported by Flores *et al.*, (1996) and Avila *et al.*, (2002). In non-permeabilized amoebae, *EhADH2* was observed to be bound only on the cell membrane (Fig. 2b). To determine whether *EhADH2* participates in the binding/internalization of holoTf, amoebae were incubated with or without anti-*EhADH2* Ab in the presence of FITC-holoTf, and observed over time. Fig. 2(c) shows holoTf in vesicles (green). When amoebae were first incubated with anti-*EhADH2* Ab (Fig. 2d), the holoTf internalization and Ab recognition was diminished, demonstrated by few green vesicles and a very low red signal, respectively. This colocalization was probably due to a small fraction of holoTf still being bound to *EhADH2* (Fig. 2d). This result suggests that the anti-*EhADH2* Ab blocked the binding/internalization of holoTf. Interestingly, under these conditions, a small amount of holoTf seemed to diffuse into the cytoplasm, suggesting that it was internalized independent of a binding protein, perhaps by fluid-phase endocytosis. A similar blocking of internalization was observed when amoebae were incubated with FITC-holoTf and then with anti-*EhADH2* Ab (not shown). However, when amoebae were incubated with anti-human TfR mAb and then with holoTf, the blocking effect was not observed (not shown).

Importantly, FITC-apoTf was neither bound nor internalized by amoebae without (Fig. 2e) or with (Fig. 2f) anti-*EhADH2* Ab, suggesting that the presence of iron is necessary for this interaction.

**Flow cytometry.** HoloTf binding/internalization in *E. histolytica* was evaluated by incubation with FITC-holoTf at 37 and 4 °C (Fig. 3a). At 37 °C, amoebae showed rapid and continued endocytosis of holoTf, and by -15 min of incubation saturation levels were reached. At 4 °C, however, very low fluorescence was detected at all stages of incubation due to the lack of internalization. This implies that entry of holoTf is regulated and, at temperatures allowing internalization, eventually limited by the presence of a Tfhp on the cell surface, rather than being internalized passively or via an alternative mechanism.

#### Effect of holoTf concentration on its binding/internalization

Amoebae were incubated with different concentrations of FITC-holoTf to evaluate the effect on holoTf binding/internalization. At 37 °C, holoTf was regularly internalized up to 11.5 nM, at which point the amoebae achieved saturation; however, at 4 °C the holoTf internalization was



**Fig. 2.** Immunolocalization of *EhADH2* by confocal microscopy. Amoebae were incubated with anti-*EhADH2* Ab. (a) Permeabilized and (b) non-permeabilized amoebae. (c) Amoebae incubated with FITC-holoTf. (d) Amoebae incubated with anti *EhADH2* Ab and then with FITC-holoTf. (e) Amoebae incubated with FITC-apoTf. (f) Amoebae incubated with anti-*EhADH2* Ab and then with FITC-apoTf. Trophozoites were fixed and incubated with TRITC-anti-rabbit IgG.

reduced and saturation of the cell-membrane binding sites was reached at very low holoTf concentration (Fig. 3b). Furthermore, at higher holoTf concentrations, internalization seems to be independent of a Tfbp because no

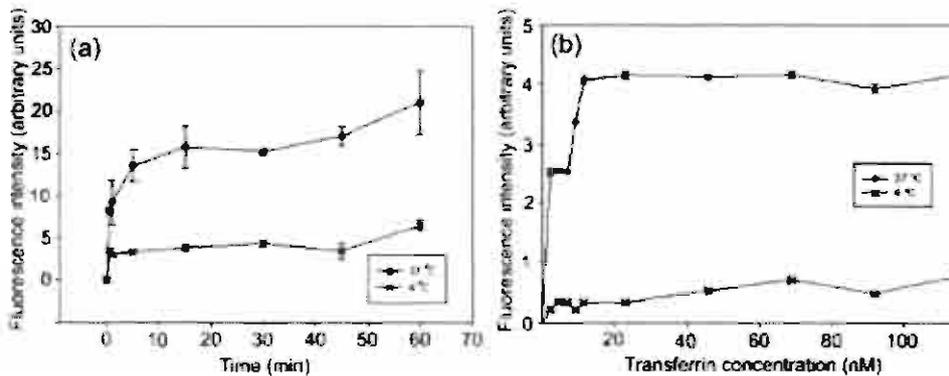
saturation effect was observed at either temperature (not shown).

To determine the presence of a Tfbp, holoTf binding/internalization was quantified in trophozoites incubated with different dilutions of anti-*EhADH2* Ab and then with FITC-holoTf (Fig. 4). The fluorescence obtained was compared with that of FITC-apoTf and with FITC-holoLf (a protein that *E. histolytica* binds and internalizes by a filipin-inhibitable mechanism) (León-Sicairos *et al.*, 2005). The anti-*EhADH2* Ab blocked the holoTf binding/internalization, confirming that this enzyme participates specifically in holoTf recognition. In contrast, holoLf internalization was not inhibited by the anti-*EhADH2* Ab, even at high concentration (1:1 dilution). In addition, apoTf showed almost no binding to the amoebae, suggesting that iron is a requisite for the binding process; this verifies the results obtained by confocal microscopy.

**Clathrin participates in the internalization of holoTf by *E. histolytica***

To find out whether the protein clathrin is involved in holoTf internalization in *E. histolytica*, we used an anti-bovine brain clathrin Ab. This Ab recognized clathrin vesicles mainly on the cell-surface membrane (Fig. 5b, red). At the beginning of the holoTf entry process, FITC-holoTf (Fig. 5c, green) co-localized with clathrin-coated vesicles (Fig. 5d, yellow). After longer periods of time (15–45 min), holoTf and clathrin were found to be separately localized (not shown). To test the specificity of the reaction, a negative control with only the secondary Ab was included (not shown). This result suggests that holoTf is endocytosed via clathrin-coated pits.

To investigate whether *EhADH2* interacts with clathrin vesicles, the amoebae were incubated with non-labelled holoTf for 2 min at 37 °C, fixed and treated with anti-*EhADH2* Ab (Fig. 5e, red) and after that with the



**Fig. 3.** Binding and internalization of holoTf reaches saturation, and is temperature, time, and concentration-dependent in *E. histolytica*. Amoebae ( $2 \times 10^5$  cells) were incubated with FITC-holoTf (115 nM) for the indicated times (a) and with the indicated concentration of FITC-holoTf (b). They were then fixed, washed, and analysed by flow cytometry.

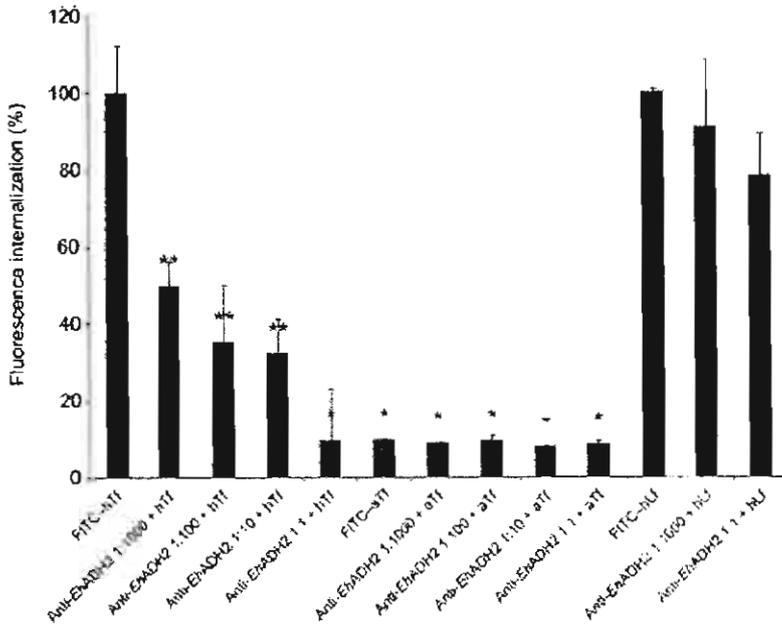


Fig. 4. Effect of anti-EhADH2 Ab on the binding/internalization of holoTf. Amoebae were incubated with anti-EhADH2 Ab for 15 min and then with FITC-holoTf (hTf), FITC-apoTf (aTf) or FITC-holoLf (hLf) for 15 min. Fluorescence was then quantified by flow cytometry. \*  $P \leq 0.001$ ; \*\*  $P \leq 0.05$ , compared with holoTf.

anti-clathrin Ab (Fig. 5f, green). We did not observe colocalization of clathrin and the enzyme; while EhADH2 was observed on the cytoplasmic membrane, clathrin was distributed throughout the cytoplasm.

**Inhibitors of clathrin-coated vesicle endocytosis block the internalization of holoTf**

The inhibitor wortmannin affected holoTf endocytosis considerably (91% inhibition) (Fig. 6a, V). Specific inhibitors of clathrin-dependent endocytosis, chloroquine and sucrose (Fig. 6a, III and IV, respectively), blocked the entry of holoTf into the amoebae by 80–85%. In contrast, filipin (Fig. 6a, VI) did not affect Tf internalization.

Cytochalasin D, which affects the integrity of the actin cytoskeleton, inhibited the holoTf endocytosis by 85% (Fig. 6b). However, colchicine had a minor effect (30% inhibition). These results indicate that one route of access for holoTf is clathrin- and actin-dependent. Therefore, this parasite increases its ability to endocytose holoTf by constitutively expressing clathrin in coated pits.

**DISCUSSION**

*E. histolytica* trophozoites depend on host iron for their growth. Given the diverse habitats it occupies in the human body during the course of infection, it would be

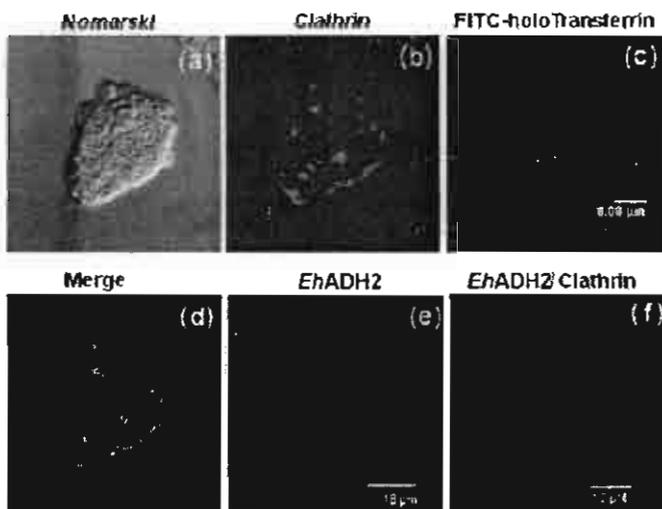
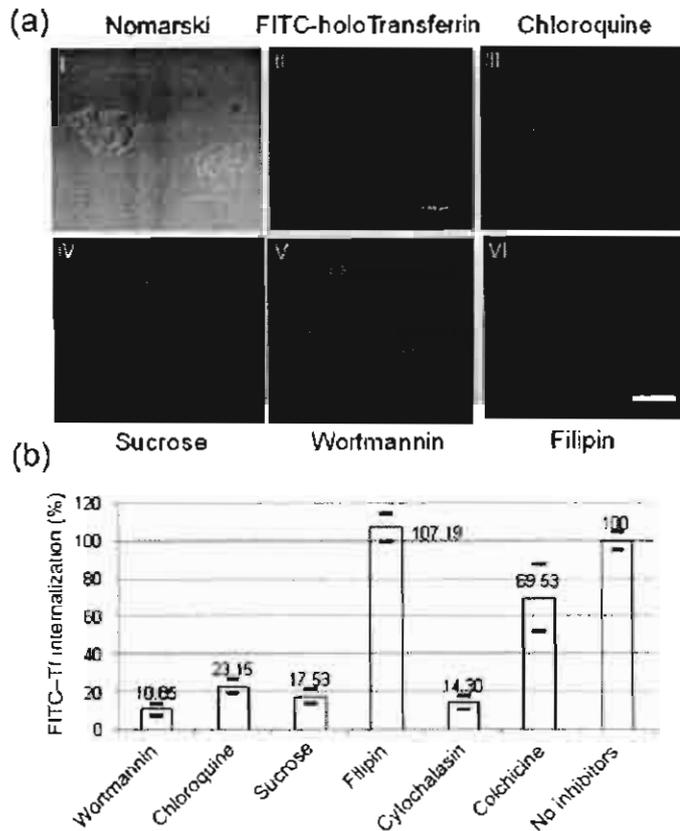


Fig. 5. Participation of clathrin in holoTf endocytosis in *E. histolytica*. Amoebae were incubated with 1.15  $\mu$ M FITC-holoTf for different times. Samples were incubated with a rabbit anti-bovine brain clathrin antibody and then TRITC-anti-rabbit IgG was added. (a) Differential interference contrast microscopy (Nomarski) of amoebae. (b) Amoebae with anti-clathrin Ab. (c) Amoebae with FITC-holoTf. (d) Co-localization of both anti-clathrin Ab and FITC-holoTf (yellow) at 1 min of incubation. (e) Amoebae with anti-EhADH2 Ab. (f) Amoebae with anti-EhADH2 Ab and anti-clathrin Ab.



**Fig. 6.** Effect of endocytosis inhibitors on holoTf internalization. Amoebae ( $10^8$  cells) were incubated with inhibitors and then with  $1.15 \mu\text{M}$  FITC-holoTf plus inhibitors; they were then prepared for both confocal microscopy and flow cytometry. (a) Confocal microscopy. I and II, HoloTf without inhibitors; III,  $50 \text{ mM}$  chloroquine; IV,  $5\%$  sucrose; V,  $50 \mu\text{M}$  wortmannin; VI,  $10 \mu\text{M}$  filipin. The same concentration of inhibitors was used for both confocal microscopy and flow cytometry analysis (b).

advantageous for the parasite to possess several mechanisms that can acquire iron from multiple sources, including holoTf. The physiological role of Tf-iron in amoebiasis has not yet been elucidated. Patients suffering hepatic abscesses show lower iron levels and a lower percentage of Tf saturation in serum than healthy controls. Thus, the host reacts by inducing a hypoferraemic state, a protective response similar to that of bacterial infections (Diamond *et al.*, 1978b). For amoebae, holoTf could be important during the invasive process because this parasite crosses the natural barriers of the intestine and spreads into other organs via the blood vessels.

We previously reported an amoebic protein recognized by the anti-human TfR mAb B3/25, which was prepared against the TfR extracellular region (Reyes-López *et al.*, 2001). This mAb was discontinued by the supplier, so the H68A mAb, which recognizes TfR cytoplasmic residues, was used instead. This mAb detected a  $96 \text{ kDa}$  protein in the amoebae that binds holoTf. The EHTfp was purified and identified by mass spectrometry as EhADH2. Given that two EHTfp peptides were  $99\%$  identical to EhADH2 (results were obtained in two independent experiments), and that there is no significant similarity between the EhADH2 amino acid sequence and that predicted for the human TfR site, recognition by the anti-TfR mAb could only be explained by certain structural similarities.

The growth and survival of *E. histolytica* trophozoites depend absolutely on EhADH2; it is used by amoebae to obtain energy through glucose fermentation and converts acetyl-CoA into ethanol. EhADH2 has been purified and studied by several groups (Avila *et al.*, 2002; Bruchhaus & Tannich, 1994; Chen *et al.*, 2004; Espinosa *et al.*, 2001, 2004, 2009; Flores *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1994) and has the ability to bind to extracellular matrix (ECM) proteins. Interestingly, it is a typical cytoplasmic enzyme, although it is also found in the cell membrane. Due to its requirement for iron, it has been proposed that iron chelators could be used as anti-amoebics (Espinosa *et al.*, 2009).

EhADH2 shares a striking sequence similarity with several acetaldehyde dehydrogenase (ADH) enzymes of prokaryotic origin that possess both ADH and alcohol dehydrogenase (ALDH) activities, such as the *Clostridium acetobutylicum* alcohol/aldehyde dehydrogenase (AAD) and the *Escherichia coli* and *Lactococcus lactis* ADH enzymes. This similarity suggested an analogous functional organization in the amoebic enzyme (Bruchhaus & Tannich, 1994) and its essential character was demonstrated by lack of growth in its absence as well as by an ALDH activity dependent on an intact ADH activity (Espinosa *et al.* 2001). The fact that the predicted amino acid sequences of EhADH2 and *E. coli* ADHE are  $48\%$  identical (Yang *et al.*, 1994), and that the EhADH2 gene

displays a 90% AT bias in its third codon position – a feature characteristic of *Entamoeba* spp. – indicates that this protein may have been derived from a common prokaryotic ancestor and acquired by horizontal gene transfer (Andersson *et al.*, 2006) coupled with vertical evolution (mutational rate tied with natural selection) within *Entamoeba* spp. (Paz-y-Miño & Espinosa, 2010). The identification of the *EhADH2* protein as a member of the ADHE-like family provides evidence for similar enzymic mechanisms in the fermentation pathway in the gut inhabited by anaerobic protozoa and bacteria, as was reported for other enzymes of the glycolytic pathway (Reeves *et al.*, 1977).

In this work, we found that the *EhTfbp* shares epitopes with *EhADH2*. In addition, *EhADH2*-bound holoTf and its three isoforms (which were also purified and identified by mass spectrometry, not shown), were recognized by the anti-human TfR mAb. The binding of *EhADH2* to holoTf could be explained by the iron content since the predicted sequence of *EhADH2* does not have a binding site for holoTf. ApoTf was not bound by the *E. histolytica* trophozoites; this demonstrates that amoebae can discriminate between Tfs containing and not containing iron, perhaps through *EhADH2*, which needs iron for its activity. In a similar way, it was suggested that the staphylococcal GAPDH participates in holoTf binding by removing iron (Modun & Williams, 1999). In *Trichomonas vaginalis* GAPDH is upregulated in iron-depleted conditions (Lama *et al.*, 2009), suggesting that it could utilize the enzyme with the purpose of sequestering iron. In *E. histolytica*, *EhADH2* would be acting as a receptor for obtaining iron and as a binding protein for ECM components. Other glycolytic enzymes have also been shown to have several functions, such as enolase, which regulates the activity of cytosine 5-methyltransferase 2 (Dnmt2), an enzyme that catalyses DNA and tRNA methylation in *E. histolytica* (Tovy *et al.*, 2010). This multi-functionality could confer additional advantages for tissue invasion.

At 37 °C, holoTf binding and endocytosis was initially extremely fast and remained continuous until 15 min, at which point saturation was reached; at this temperature, amoebic cytoplasmic-membrane molecules are in constant turnover, and the new Tfbs are actively binding and endocytosing the ligand. This effect, observed by confocal microscopy (Reyes-López *et al.*, 2001), suggests that the Tfbp and an endocytosis mechanism could be involved in regulating the uptake and utilization of holoTf by trophozoites. Since the holoTf binding/internalization was continuous and also saturable, dependent on time, temperature and holoTf concentration, our results support the hypothesis that the process of endocytosis is Tfbp- or receptor-dependent. However, when the endocytic process was followed using higher holoTf concentrations, it was also Tfbp-independent. This result is in agreement with Welter *et al.* (2006), who did not obtain saturation when using concentrations of holoTf in the micromolar range.

This result, together with the the protein's apparent high affinity for holoTf ( $1.81 \times 10^{-9}$  M), suggests that the process involves a Tfbp in the parasite. In addition, amoebae showed two affinity constants for holoTf (1.1 and 5.7 nM), perhaps due to the presence of two Tfbs or a single protein with two affinities. In bacteria, the affinity for holoTf was reported to be lower ( $0.7 \times 10^{-7}$  or  $4 \times 10^{-7}$  M) (Pintor *et al.*, 1993), and in the protozoan *T. cruzi* the affinity was even smaller (about  $2.8 \times 10^{-6}$  M) (Testa, 2002). The comparatively high affinity of amoebae for holoTf suggests that the parasite has a greater ability to bind human holoTf to obtain iron.

Since at 37 °C both the binding and endocytosis mechanisms are active, we also performed incubations at 4 °C in order to only detect the binding. At this low temperature there is no membrane turnover, even in *E. histolytica*, which normally has an extremely active endocytic process (Bailey *et al.*, 1985; Gitler & Mirelman, 1986; Meza & Clarke, 2004). Trophozoites showed very low fluorescence, probably due to the saturation of a specific *EhTfbp*, and because they did not internalize holoTf at 4 °C.

When amoebae were incubated with anti-*EhADH2* Ab, the binding/internalization of holoTf was inhibited. This effect can be explained by the anti-*EhADH2* Ab and holoTf sharing a binding site on *EhTfbp*; alternatively, steric hindrance is also possible. This result suggests that *EhADH2* participates in the binding of holoTf to the cell. HoloLf (a protein that shares 60% identity with holoTf) does not share the *EhTfbp*, because the anti-*EhADH2* Ab blocked only the holoTf binding, showing that this enzyme binds holoTf specifically. Consistent with this, in a previous study we reported that holoLf binding was not blocked by holoTf in amoebae (León-Sicairos *et al.*, 2005). The anti-human TfR mAb also did not block holoTf binding to *EhTfbp*. This suggests that the TfR mAb requires a different holoTf binding site from that of the *EhTfbp*.

Endocytosis is a broadly conserved mechanism in cells of higher organisms and protozoa (Hernandez *et al.*, 2007; Morgan *et al.*, 2001; Robibaro *et al.*, 2001). Endocytosis of ferritin through clathrin-coated vesicles has been described in *E. histolytica* (López-Soto *et al.*, 2009a). Caveolin-like protein is present in amoebae and is apparently involved in holoLf endocytosis (León-Sicairos *et al.*, 2005). Other proteins implicated in endocytosis, such as Rab GTPases, have been found in amoebae (Juárez *et al.*, 2001; Romero-Díaz *et al.*, 2007; Temesvari *et al.*, 1999; Welter *et al.*, 2002). As we found that the uptake of holoTf was likely to be dependent on a receptor, we studied the holoTf endocytosis mechanism by using a number of inhibitors. Wortmannin, which inhibits phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) activity, inhibited holoTf internalization by about 90%. Since PI3K contributes to various endocytosis mechanisms in *E. histolytica*, such as phagocytosis (Ghosh & Samuelson, 1997; Marion *et al.*, 2005; Nakada-Tsukui *et al.*, 2009), pinocytosis (Batista & de Souza, 2004) and

macropinocytosis (Meza & Clarke, 2004), the high level of inhibition observed in holoTf internalization suggests that holoTf could be internalized through several pathways.

To test whether holoTf is endocytosed via clathrin-coated vesicles, chloroquine, a specific inhibitor of this kind of endocytosis, which prevents the separation of nascent clathrin-coated pits from the plasma membrane, was used; it gave ~80% inhibition. Sucrose, which specifically prevents receptor-mediated uptake in polymorphonuclear leukocytes (Daukas & Zigmund, 1985) and inhibits clathrin-coated pit formation (Heuser & Anderson, 1989), diminished holoTf internalization by 85% in *E. histolytica*. This result together with that of the wortmannin experiment suggests that holoTf mainly enters via the clathrin route and relies to a lesser extent on other mechanisms. Recently, it was reported that holoTf could be internalized by fluid-phase endocytosis in *E. histolytica* (Welter *et al.*, 2006). Similarly, in rat hepatocytes, it was found that holoTf is endocytosed by two pathways (Qian & Tang, 1995; Richardson & Ponka, 1997).

HoloTf endocytosis decreased by about 87% in amoebae treated with cytochalasin D, suggesting that microfilaments are crucially important for the endocytosis of this ligand. The connection between receptor-mediated endocytosis and the actin cytoskeleton during the formation and detachment of newly formed coated pits from the plasma membrane has been observed in other cells (Neuhaus *et al.*, 2002; Qualmann *et al.*, 2000; Slepnev & De Camilli, 2000). In *E. histolytica*, actin has been implicated in phagocytosis (Marion *et al.*, 2005), fluid-phase endocytosis (Sahoo *et al.*, 2004), vesicle exocytosis (Ravdin *et al.*, 1988), erythrophagocytosis (de la Garza *et al.*, 1989; Marion *et al.*, 2005) and macropinocytosis (Meza & Clarke, 2004). However, microtubules do not seem to be involved in holoTf endocytosis as a high colchicine concentration had no effect on this process. Nevertheless, microtubules participate in holoTf endocytosis in liver sinusoidal endothelial cells, in which clathrin-dependent vesicles are organized by microtubules (Falkowska-Hansen *et al.*, 2007).

To obtain further evidence for the involvement of clathrin in holoTf endocytosis, a heterologous anti-clathrin Ab was used. Both holoTf and clathrin co-localized at 2–3 min after internalization was started. Hence, holoTf is internalized inside structures containing clathrin, which can then travel through the endocytic route. To see if EhTfbp is internalized with holoTf as a complex inside the clathrin-structures, amoebae supplied with holoTf were incubated with anti-EhADH2 and anti-clathrin Abs. The results revealed that EhTfbp did not co-localize with clathrin in amoebae incubated with holoTf at any time tested. Perhaps holoTf interacts rapidly with EhTfbp because even at shorter times the blocking effect could be observed. It is also possible that holoTf might bind to EhTfbp and then to another protein or receptor before being internalized in clathrin-coated vesicles.

In conclusion, our findings, together with those reported for holoTf use in *E. histolytica*, show the following. (1) Iron

is important for amoebic growth and enzymic activities in this parasite. (2) Trophozoites bind, internalize and use holoTf as an iron source but do not bind or internalize apoTf, perhaps due to its lack of iron. (3) The EhTfbp is recognized by two different anti-human TfR mAbs, the B3/25 mAb, which forms a complex with holoTf that is then internalized, and the H.68.4 mAb, which was observed co-localizing with holoTf only at the amoebic surface. (4) The protein recognized by the H.68.4 mAb corresponds to the EhADH2 enzyme, which is essential for the survival of amoebae and uses iron as a cofactor, indispensable for structural and functional stability. (5) HoloTf is bound with a high affinity by amoebae and this binding is not blocked by apoTf or holoLf, suggesting the presence of a specific EhTfbp. (6) Amoebae can also bind holoTf with low affinity. (7) HoloTf internalization is time-, temperature- and concentration-dependent. Finally, (8) although fluid phase endocytosis may also participate in this process, holoTf internalization is carried out mainly through the endocytosis of clathrin-coated vesicles. We propose that *E. histolytica* obtains iron from holoTf through a specific and elaborate pathway that could involve several proteins, including the EhADH2 enzyme, which discriminates between ferric and non-ferric Tf. Additionally, another protein could be necessary to internalize holoTf in clathrin-coated vesicles.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Mr Esteban Molina for his technical assistance. This research was supported by CONACyT, México (grant no. 60102).

## REFERENCES

- Andersson, J. O., Hirt, R. P., Foster, P. G. & Roger, A. J. (2006). Evolution of four gene families with patchy phylogenetic distributions: influx of genes into protist genomes. *BMC Evol Biol* 6, 27.
- Avila, E. E., Martínez-Alcaráz, E., Barbosa-Sabanero, G., Rivera-Baron, E., Arias-Negrete, S. & Zazueta-Sandoval, R. (2002). Subcellular localization of the NAD<sup>+</sup> dependent alcohol dehydrogenase in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *J Parasitol* 88, 217–222.
- Balley, G. B., Day, D. B. & Gasque, J. W. (1985). Rapid polymerization of *Entamoeba histolytica* actin induced by interaction with target cells. *J Exp Med* 162, 546–558.
- Baústa, E. J. & de Souza, W. (2004). Involvement of protein kinases on the process of erythrophagocytosis by *Entamoeba histolytica*. *Cell Biol Int* 28, 243–248.
- Bierne, H., Garandeau, C., Pucciarelli, M. G., Sabet, C., Newton, S., Garcia-del Portillo, F., Cossart, P. & Charbit, A. (2004). Sortase B, a new class of sortase in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* 186, 1972–1982.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248–254.
- Bruchhaus, I. & Tannich, E. (1994). Purification and molecular characterization of the NAD<sup>+</sup>-dependent acetaldehyde/alcohol dehydrogenase from *Entamoeba histolytica*. *Biochem J* 303, 743–748.

- Bullen, J. J., Rogers, H. I. & Griffiths, E. (1978). Role of iron in bacterial infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 80, 1–35.
- Chen, M., Li, E. & Stanley, S., Jr (2004). Structural analysis of the acetaldehyde dehydrogenase activity of *Entamoeba histolytica* alcohol dehydrogenase 2 (EhADH2), a member of the ADHE enzyme family. *Mol Biochem Parasitol* 137, 201–205.
- Corrêa, J. R., Atella, G. C., Menna-Barrato, R. S. & Soares, M. J. (2007). Clathrin in *Trypanosoma cruzi*: in silico gene identification, isolation, and localization of protein expression sites. *J Eukaryot Microbiol* 54, 297–302.
- Corrêa, J. R., Atella, G. C., Batista, M. M. & Soares, M. J. (2008). Transferrin uptake in *Trypanosoma cruzi* is impaired by interference on cytosome-associated cytoskeleton elements and stability of membrane cholesterol but not by the obstruction of clathrin-dependent endocytosis. *Exp Parasitol* 119, 58–66.
- Daukas, G. & Zigmond, S. (1985). Inhibition of receptor-mediated but not fluid-phase endocytosis in polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol* 101, 1673–1679.
- Dautry-Varsat, A., Ciechanover, A. & Lodish, H. (1983). pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 2258–2262.
- de la Garza, M., Gallegos, B. & Meza, I. (1989). Characterization of a cytochalasin D-resistant mutant of *Entamoeba histolytica*. *J Protozool* 36, 556–560.
- Diamond, L. S., Harlow, D. R. & Cunnick, C. C. (1978a). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 72, 431–432.
- Diamond, L. S., Harlow, D. R., Phillips, B. P. & Keister, D. B. (1978b). *Entamoeba histolytica*: iron and nutritional immunity. *Arch Invest Med (Mex)* 9, 329–338.
- Espinosa, A., Yen, L., Zhang, Z., Foster, L., Clark, D., Li, E. & Stanley, S. L., Jr (2001). The bifunctional *Entamoeba histolytica* alcohol dehydrogenase 2 (EhADH2) protein is necessary for amoebic growth and survival and requires an intact C-terminal domain for both alcohol dehydrogenase and acetaldehyde dehydrogenase activity. *J Biol Chem* 276, 20136–20143.
- Espinosa, A., Clark, D. & Stanley, S., Jr (2004). *Entamoeba histolytica* alcohol dehydrogenase 2 (EhADH2) as a target for anti-amoebic agents. *J Antimicrob Chemother* 54, 56–59.
- Espinosa, A., Pedrizet, G., Paz-Y-Miño, C. G., Lanfranchi, R. & Phay, M. (2009). Effects of iron depletion on *Entamoeba histolytica* alcohol dehydrogenase 2 (EhADH2) and trophozoite growth: implications for anti-amoebic therapy. *J Antimicrob Chemother* 63, 675–678.
- Falkowska-Hansen, B., Falkowski, M., Metharom, P., Kronic, D. & Goerdts, S. (2007). Clathrin-coated vesicles form a unique net-like structure in liver sinusoidal endothelial cells by assembling along undisturbed microtubules. *Exp Cell Res* 313, 1745–1757.
- Flores, B. M., Stanley, S., Jr, Yong, T., Ali, M., Yang, W., Diedrich, D. & Torlan, B. (1996). Surface localization, regulation and biologic properties of the 86 kDa alcohol/aldehyde dehydrogenase (EhADH2) of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* 173, 226–231.
- Gat, O., Zaide, G., Inbar, I., Grosfeld, H., Chitlani, T., Levy, H. & Shafferman, A. (2008). Characterization of *Bacillus anthracis* iron-regulated surface determinant (Isd) proteins containing NEAT domains. *Mol Microbiol* 70, 983–999.
- Genco, C. A. & Desai, P. I. (1996). Iron acquisition in the pathogenic *Neisseria*. *Trends Microbiol* 4, 179–184.
- Ghosh, S. K. & Samuelson, J. (1997). Involvement of p21<sup>ras</sup>, phosphoinositide 3-kinase, and vacuolar ATPase in phagocytosis of bacteria and erythrocytes by *Entamoeba histolytica*: suggestive evidence for coincidental evolution of amoebic invasiveness. *Infect Immun* 65, 4243–4249.
- Gitler, C. & Mirelman, D. (1986). Factors contributing to the pathogenic behaviour of *Entamoeba histolytica*. *Amu Rev Microbiol* 40, 237–261.
- Grab, D. J., Wells, C. W., Shaw, M. K., Webster, P. & Russo, D. C. (1992). Endocytosed transferrin in African trypanosomes is delivered to lysosomes and may not be recycled. *Eur J Cell Biol* 59, 398–404.
- Hernandez, Y., Castillo, C., Roychowdhury, S., Hehd, A., Aley, S. B. & Desc, S. (2007). Clathrin-dependent pathways and the cytoskeleton network are involved in ceramide endocytosis by a parasitic protozoan, *Giardia lamblia*. *Int J Parasitol* 37, 21–32.
- Heuser, J. E. & Anderson, R. G. (1989). Hypertonic media inhibit receptor mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J Cell Biol* 108, 389–400.
- Juárez, P., Sánchez-López, R., Stock, R. P., Olvera, A., Ramos, M. A. & Alagón, A. (2001). Characterization of the Ehral8 gene, a marker of the late stages of the secretory pathway of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 116, 223–228.
- Lama, A., Kucknoor, A., Mundodi, V. & Alderete, J. (2009). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a surface-associated, fibronectin-binding protein of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 77, 2703–2711.
- León-Sicairos, N., Reyes-López, M., Canizales-Roman, A., Bermúdez-Cruz, R. M., Serrano-Luna, J., Arroyo, R. & de la Garza, M. (2005). Human holo-lactoferrin: endocytosis and use as an iron source by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Microbiology* 151, 3859–3871.
- Liu, J., Qiao, X., Du, D. & Lee, M. G. (2000). Receptor-mediated endocytosis in the procyclic form of *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* 275, 12032–12040.
- Loftus, B., Anderson, I., Davies, R., Alsmark, U. C., Samuelson, J., Amedeo, P., Roncaglia, P., Berriman, M., Hirt, R. P. & other authors (2005). The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* 433, 865–868.
- López-Soto, F., González-Robles, A., Salazar-Villatoro, L., León-Sicairos, N., Piña-Vázquez, C., Pérez, E. & de la Garza, M. (2009a). *Entamoeba histolytica* uses ferritin as an iron source and internalises this protein by means of clathrin-coated vesicles. *Int J Parasitol* 39, 417–426.
- López-Soto, F., León-Sicairos, N., Reyes-López, M., Serrano-Luna, J., Ordez-Pichardo, C., Piña-Vázquez, C., Ortiz-Estrada, G. & de la Garza, M. (2009b). Use and endocytosis of iron-containing proteins by *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect Genet Evol* 9, 1038–1050.
- Maier, A. & Steverding, D. (1996). Low affinity of *Trypanosoma brucei* transferrin receptor to apo-transferrin at pH 5 explains the fate of the ligand during endocytosis. *FEBS Lett* 396, 87–89.
- Maresso, A. W. & Schneewind, O. (2006). Iron acquisition and transport in *Staphylococcus aureus*. *Biomaterials* 19, 193–203.
- Marion, S., Laurent, C. & Guillen, N. (2005). Signalization and cytoskeleton activity through myosin IB during the early steps of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*: a proteomic approach. *Cell Microbiol* 7, 1504–1518.
- Mazmanian, S. K., Skaar, E. P., Gaspar, A. H., Humayun, M., Gorinck, P., Jalenska, J., Joachmiak, A., Missiakas, D. M. & Schneewind, O. (2003). Passage of heme-iron across the envelope of *Staphylococcus aureus*. *Science* 299, 906–909.
- Merschjohann, K. & Steverding, D. (2006). *In vitro* growth inhibition of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma congolense* by iron chelators. *Kinetoplastid Biol Dis* 5, 3.
- Meza, I. & Clarke, M. (2004). Dynamics of endocytic traffic of *Entamoeba histolytica* revealed by confocal microscopy and flow cytometry. *Cell Motil Cytoskeleton* 59, 215–226.

- Modun, B. & Williams, P. (1999). The staphylococcal transferrin-binding protein is a cell wall glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Infect Immun* 67, 1086–1092.
- Morgan, G. W., Allen, C. L., Jeffries, T. R., Hollinshead, M. & Field, M. C. (2001). Developmental and morphological regulation of clathrin-mediated endocytosis in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* 114, 2605–2615.
- Nakada-Tsukul, K., Okada, H., Mitra, B. N. & Nozaki, T. (2009). Phosphatidylinositol-phosphates mediate cytoskeleton reorganization during phagocytosis via a unique modular protein consisting of RhoGEF/DH and FYVE domains in the parasitic protozoan *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol* 11, 1471–1491.
- Natesan, S. K., Peacock, L., Matthews, K., Gibson, W. & Field, M. C. (2007). Activation of endocytosis as an adaptation to the mammalian host by trypanosomes. *Eukaryot Cell* 6, 2029–2037.
- Neuhaus, E. M., Almers, W. & Soldati, T. (2002). Morphology and dynamics of the endocytic pathway in *Dicystostelium discoideum*. *Mol Biol Cell* 13, 1390–1407.
- Paz-y-Miño, C. G. & Espinosa, A. (2010). Integrating horizontal gene transfer and common descent to depict evolution and contrast it with "Common Design". *J Eukaryot Microbiol* 57, 11–18.
- Pintor, M., Ferreiro, C. M. & Criado, M. T. (1993). Characterization of the transferrin-iron uptake system in *Neisseria meningitidis*. *FEMS Microbiol Lett* 112, 159–165.
- Qian, Z. M. & Tang, P. L. (1995). Mechanisms of iron uptake by mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1269, 205–214.
- Qualmann, B., Kessels, M. M. & Kelly, R. B. (2000). Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 150, F111–F116.
- Ravdin, J. I., Murphy, C. F. & Schlesinger, P. H. (1988). The cellular regulation of vesicle exocytosis by *Entamoeba histolytica*. *J Protozool* 35, 159–163.
- Reeves, R. E., Warren, L. G., Susskind, B. & Lo, H. (1977). An energy conserving pyruvate to acetate pathway in *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem* 252, 726–731.
- Reyes-López, M., Serrano-Luna, J. J., Negrete-Abascal, E., León-Salcros, N., Guerrero-Barrera, A. L. & de la Garza, M. (2001). *Entamoeba histolytica*: transferrin binding proteins. *Exp Parasitol* 99, 132–140.
- Richardson, D. R. & Ponka, P. (1997). The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta* 1331, 1–40.
- Robilbaro, B., Hope, H. C., Yang, M., Coppens, I., Ngò, H. M., Stedman, T. T., Pprotka, K. & Joiner, K. A. (2001). Endocytosis in different lifestyles of protozoan parasitism: role in nutrient uptake with special reference to *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 31, 1343–1353.
- Romero-Díaz, M., Gómez, C., López-Reyes, I., Martínez, M., Orozco, E. & Rodríguez, M. (2007). Structural and functional analysis of the *Entamoeba histolytica* EhrahB gene promoter. *BMC Mol Biol* 8, 82.
- Sahoo, N., Labruyère, E., Bhattacharya, S., Sen, P., Guillén, N. & Bhattacharya, A. (2004). Calcium binding protein 1 of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* interacts with actin and is involved in cytoskeleton dynamics. *J Cell Sci* 117, 3625–3634.
- Serrano-Luna, J. J., Negrete, E., Reyes-López, M. & de la Garza, M. (1998). *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS: haemoglobin-degrading neutral cysteine proteases. *Exp Parasitol* 89, 71–77.
- Slepnev, V. I. & De Camilli, P. (2000). Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nat Rev Neurosci* 1, 161–172.
- Tanaka, T., Abe, Y., Inoue, N., Kim, W., Kumura, H., Nagasawa, H., Igarashi, I. & Shimazaki, K. (2004). The detection of bovine lactoferrin binding protein on *Trypanosoma brucei*. *J Vet Med Sci* 66, 619–625.
- Taylor, J. M. & Heinrichs, D. E. (2002). Transferrin binding in *Staphylococcus aureus*: involvement of a cell wall-anchored protein. *Mol Microbiol* 43, 1603–1614.
- Temesvári, L. A., Harris, D. N., Stanley, S. L. & Cardelli, J. (1999). Early and late endosomal compartments of *Entamoeba histolytica* are enriched in cysteine proteases, acid phosphatase and several Ras-related Rab-GTPases. *Mol Biochem Parasitol* 103, 225–241.
- Testa, U. (2002). Transferrin. In *Proteins of Iron Metabolism*, pp. 143–247. Edited by U. Testa. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Thorstensen, K. & Romslo, I. (1990). The role of transferrin in the mechanism of cellular iron uptake. *Biochem J* 271, 1–9.
- Tov, A., Tov, R. S., Gaentzsch, R., Helm, M. & Ankr, S. (2010). A new nuclear function of the *Entamoeba histolytica* glycolytic enzyme enolase: the metabolic regulation of cytosine 5 methyltransferase 2 (Dnmt2) activity. *PLoS Pathog* 6, e1000775.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitro-cellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350–4354.
- Weinberg, E. D. (2009). Iron availability and infection. *Biochim Biophys Acta* 1790, 600–605.
- Welter, B. H., Laughlin, R. C. & Temesvári, L. A. (2002). Characterization of a Rab7-like GTPase, EhRab7: a marker for the early stages of endocytosis in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 121, 254–264.
- Welter, B. H., Powell, R. R., Laughlin, R. C., McGugan, G. C., Bonner, M., King, A. & Temesvári, L. A. (2006). *Entamoeba histolytica*: comparison of the role of receptors and filamentous actin among various endocytic processes. *Exp Parasitol* 113, 91–99.
- Yang, W., Li, E., Kairong, T. & Stanley, S. L., Jr (1994). *Entamoeba histolytica* has an alcohol dehydrogenase homologous to the multi-functional adhE gene product of *Escherichia coli*. *Mol Biochem Parasitol* 64, 253–260.

Edited by: L. Knoll