



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

“REGULACIÓN DE LA FOSFOFRUCTOCINASA DE
Debaryomyces hansenii”

T E S I S :
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA
P R E S E N T A :
ANGEL EMMANUEL VILLANUEVA CHIMAL

DIRECTOR DE TESIS:
DR. ANTONIO PEÑA DÍAZ



MÉXICO D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional Autónoma de México
FACULTAD DE MEDICINA

LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA
COORDINACIÓN

DR. ENRIQUE LUIS GRAUE WIECHERS
DIRECTOR
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
PRESENTE.

Por este conducto le informamos que la tesis titulada "Regulación de la fosfofructocinasa de *Debaryomyces hansenii*" que presenta el alumno ANGEL EMMANUEL VILLANUEVA CHIMAL con número de cuenta 302852512 cumple los requisitos establecidos en el Plan de Estudios de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. Por lo tanto, los suscritos miembros del Jurado, otorgamos nuestro voto aprobatorio para que sea presentada en examen oral.

Dr. Salvador Uribe Carbajal

Dr. Antonio Peña Díaz

Dr. Juan Pablo Parro Vazquez

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco

Dra. María Cristina Fernández Mejía

Reconocimientos

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 306-orientado del departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular, bajo la asesoría del Dr. Antonio Peña Díaz.

Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico como ayudante de investigador S.N.I. nivel 3.

Al instituto de Investigaciones Biomédicas, Instituto de Fisiología Celular, Facultad de Química y Facultad de Medicina de la UNAM.

A todos los profesores que participaron en mi formación académica.

A Cynthia Lima, Azucena Ayala y Rosendo Villaseñor por su ayuda en todos los trámites de la licenciatura.

Agradecimientos

Al Dr. Antonio Peña Díaz por haberme aceptado como miembro de su laboratorio, compartir sus experiencias y conocimiento durante estos años, brindarme su confianza y dejarme una marca muy grande en mi formación profesional.

A los miembros del jurado por su revisión crítica y comentarios a esta tesis.

A todas las personas de quienes he aprendido y cuyas enseñanzas han sido muy útiles hasta hoy en día.

Al Dr. Roberto Coria por permitirme hacer los experimentos de biología molecular en su laboratorio y enseñarme que las levaduras son lo máximo.

A los doctores Alicia González y Gabriel del Río por su generosidad al facilitarme materiales y reactivos.

Al Dr. Juan Pablo Pardo por su ayuda en la realización de este trabajo.

A mis padres Martha Chimal y Miguel Villanueva por darme la vida, educarme, consentirme, cuidarme, apoyarme, tolerarme, quererme y estar siempre en todo momento para mí.

A mi familia: mi abuelita Herlinda, mi hermana Tatiana, mis primos Job, Eluzaid, Sharon, Diana y Cinthia, mis tías y tíos Herlinda, Cristina, Josué, Rocio y Tirso por su apoyo, cariño y atenciones que me han brindado durante todo este tiempo.

A Andrea por su paciencia, estar siempre a mi lado, compartir grandes momentos y brindarme su cariño.

A la familia Esquivel Chávez: Alfredo, Clara y Alfredo Jr. por todas las atenciones, ayuda y apoyo que me han brindado.

Al 306-ote: Norma, Martha, Daniela, Christian, Carlos y René por su amistad, la alegría de trabajar juntos en el laboratorio, su confianza, crítica, enseñanzas y ayuda.

A Paco por su amistad e iniciarme en la vida como Biomédico.

Al 302-ote: Laurita, Miriam, Nancy, Edith, Luis, Eunice y Maricela por su amistad, ayuda, generosidad, enseñanzas, bromas, discusiones, comidas, invitaciones y fiestas.

A la unidad de Biología Molecular del IFC: Laura, Lupita y Mine por su amistad.

A Ruth, Chayo, Gaby, Cristhian, Poncho, Ana, Peter, José fer, Armando, Julio, Diego y el Wiffy, por su gran y valiosa amistad que hasta el momento ha perdurado.

A Jonatan por ser mi competencia, primo, compañero y gran amigo.

A mis compañeros y amigos de la licenciatura: Layla, Raúl, Paulette, Aurora, Natalia y Brenda por los buenos y malos momentos de la licenciatura.

A mi alma mater la Universidad Nacional Autónoma de México.

Dedico este trabajo con mucho cariño para:

Martha Chimal

Miguel Angel Villanueva

Herlinda Sánchez

Tatiana Villanueva

Andrea Esquivel

Índice

Abreviaturas.....	8
Resumen.....	9
Introducción.....	10
Enzimas.....	12
Termodinámica.....	13
Las leyes de la termodinámica.....	14
Los seres vivos y la termodinámica.....	14
La termodinámica en el metabolismo.....	15
Glucólisis.....	16
Control glucolítico.....	17
Fosfofructocinasa.....	18
<i>Debaryomyces hansenii</i>	20
Justificación.....	23
Objetivos.....	24
Objetivo General.....	24
Objetivos Particulares.....	24
Metodología.....	25
Cepas, medios y condiciones de cultivo.....	25
Actividades enzimáticas.....	25
Ajuste de curvas.....	27

Análisis <i>in silico</i>	27
Amplificación de las subunidades alfa y beta de la PFK de <i>D. hansenii</i>	27
Northern Blot.....	28
Resultados.....	30
Genes y subunidades de la fosfofructocinasa de <i>D. hansenii</i>	30
Actividades enzimáticas.....	31
Amplificación de las subunidades alfa y beta de la PFK de <i>D. hansenii</i>	44
Expresión de las subunidades alfa y beta de la PFK de <i>D. hansenii</i>	44
Alineamiento múltiple T-Coffee.....	46
Discusión.....	50
Conclusiones.....	53
Perspectivas.....	54
Bibliografía.....	55

Abreviaturas

ADN.....	Ácido desoxirribonucleico
ADP.....	Adenosin 5'-difosfato
ALD.....	Alcohol deshidrogenasa
AMP.....	Adenosin 5'-trifosfato
ARN.....	Ácido ribonucleico
ATP.....	Adenosin 5'-trifosfato
CTP.....	Citosin 5'-trifosfato
GDH.....	Glicerofosfato deshidrogenasa
ITP.....	Inosina 5'-trifosfato
KDa.....	Kilodaltones
Kpb.....	Kilo pares de bases
NAD ⁺ /NADH.....	Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato y su forma reducida
Mb.....	Mega pares de bases
PCR.....	Reacción de la cadena de la polimerasa
PFK/PFKs.....	Fosfofructocinasa(s)
PFK1.....	Gen de la subunidad alfa de la PFK
PFK2.....	Gen de la subunidad beta de la PFK
Pi.....	Fosfato inorgánico
TIM.....	Triosa fosfato isomerasa
UTP.....	Uracil 5'-trifosfato

Resumen

Al comparar la respiración y fermentación de *Debaryomyces hansenii* con las de *Saccharomyces cerevisiae*, se encontró que el consumo de glucosa, fermentación y respiración son menores en *D. hansenii*. Los niveles de los intermediarios glucolíticos y actividades enzimáticas indican que el paso limitante está dado por la actividad de la fosfofructocinasa (ATP: D-fructosa-6-fosfato 1-fosfotransferasa, E.C. 2.7.1.11) (Sánchez *et al.*, 2006). Esta enzima representa un punto clave en la vía glucolítica y cataliza la transferencia irreversible del fosfato terminal del ATP al grupo hidroxilo del carbono 1 de la fructosa-6-fosfato para producir fructosa-1,6-bisfosfato.

Su actividad se regula en forma positiva o negativa. Los mecanismos involucrados en esta regulación incluyen cambios conformacionales, asociación de subunidades, ionización de los residuos de aminoácidos y modificaciones postraduccionales. Estas características moleculares, así como la regulación por varios mecanismos y moléculas efectoras, dependen del origen de la enzima.

Se encontraron dos genes en *D. hansenii* que codifican para la subunidad alfa y beta de la PFK. Se observó que ambos genes se expresan en diferentes condiciones experimentales.

El alineamiento múltiple entre las secuencias de aminoácidos de las subunidades alfa y beta de la PFK de diferentes ascomicetos mostró que los dominios catalíticos y alostéricos están conservados en la estructura primaria de las proteínas de *D. hansenii*.

La actividad de esta enzima se midió en extractos celulares y exhibió características cinéticas atípicas. Se inhibió por citrato y no por Mg^{2+} -ATP, cuyo efecto generó una curva hiperbólica. Los metabolitos fructosa-2,6-bisfosfato y AMP actuaron como moduladores alostéricos positivos de la PFK de *D. hansenii*.

“When a thing is new, people say ‘It is not true’. Later, when the true becomes obvious people said ‘Any way, it is not important’, and when the importance could not be denied, people said ‘Any way, it is not new’.”

William James.

Introducción

Los primeros aspectos de la bioquímica fueron estudiados previamente al siglo XX, usualmente como resultado de la atención de problemas enfocados en la medicina o la agricultura.

Un ejemplo particular son los estudios del francés Antoine Lavoisier, padre de la química moderna, sobre la respiración en el periodo de 1779-1784. Lavoisier concluyó que la respiración no es más que una combustión lenta del carbón y el hidrógeno, similar a la que ocurre en una lámpara de gas o en un candelabro, y desde este punto de vista, los animales que respiran son verdaderos cuerpos de combustión que se queman y consumen a sí mismos.

Estos descubrimientos iniciaron extensas investigaciones en el campo de la energía metabólica, y como resultado, se establecieron los valores calorimétricos por gramo de carbohidratos, lípidos y proteínas a principio del siglo XIX.

Durante el mismo periodo, el proceso de la fermentación fue reconocido por el zoólogo Theodor Schwann como de origen biológico. Schwann describió a las levaduras como “plantas” capaces de convertir el azúcar en alcohol y dióxido de carbono. Muchos de los destacados químicos de ese momento, incluyendo a Berzelius, Wöhler y Liebig, consideraban a las levaduras como seres sin vida y que la fermentación era sólo causada por el oxígeno. En un ataque desafortunado a los descubrimientos clásicos de Schwann, Liebig y Wöhler intentaron ridiculizarlo sugiriendo que las levaduras “tenían una nariz succionadora por donde devoraban el azúcar y que un río de alcohol fluía por su ano al mismo tiempo que el dióxido de carbono burbujecía por sus enormes órganos genitales” (Mahler *et al.*, 1961).

Las investigaciones sobre la fermentación las continuaron algunos científicos importantes, entre ellos el padre de la microbiología, Louis Pasteur, quien identificó diferentes organismos que llevaban a cabo varios tipos de fermentaciones, en las que destacan la alcohólica y la butírica, esta última causada por organismos que crecen en ausencia de oxígeno. De esta manera Pasteur introdujo los conceptos de organismos aerobios y anaerobios, y sus fermentaciones asociadas.

Inicialmente, la incapacidad de reproducir la mayoría de las reacciones bioquímicas en el laboratorio llevó a pensar a los investigadores de esa época, como Pasteur, que los sistemas vivos estaban dotados de una "fuerza vital", inseparable de la estructura de las células vivas, que les permitía evadir las leyes de la naturaleza que gobernaban a la materia inanimada. Sin embargo, otros investigadores, como Justus von Liebig, argumentaban que los procesos biológicos eran causados por la acción de sustancias que se conocían como "fermentos".

Posteriormente, los experimentos del alemán Eduard Buchner en 1897, cambiaron esta manera de pensar ya que mostró que el azúcar no sólo puede ser convertido en etanol por las levaduras, sino también por extractos celulares libres de ellas. También mostró que además de la fermentación, la respiración, la síntesis de sustancias proteicas, grasas, carbohidratos y muchas otras reacciones similares que caracterizan a las células vivas, pueden realizarse en el tubo de ensaye sin su cooperación, bajo las mismas leyes y principios de procesos químicos ordinarios.

Esta observación de la fermentación en extractos celulares permitió la subsecuente identificación de las reacciones individuales que participan en los procesos generales y la caracterización de las enzimas que catalizan cada una de estas reacciones en laboratorios como los de Harden, Krebs, Embden y Meyernhof, por mencionar algunos. De esta manera el vitalismo fue perdiendo poder y surgió una nueva era, en la que se trata de dar explicaciones físico-químicas a lo que conocemos como vida.

Además, las contribuciones de James Summer, padre de la enzimología, estimularon un gran interés por la estructura y propiedades bioquímicas de las proteínas al descubrir en 1926 que los biocatalizadores, las enzimas, eran proteínas; al cristalizar la ureasa del frijol.

Por último, en este periodo Haldane escribió el tratado *Enzymes*, donde sugirió que las interacciones mediante enlaces débiles entre las enzimas y sus sustratos podrían ser la base para catalizar la reacción. Muchas de estas entidades fueron aisladas, purificadas y sus reacciones asociadas fueron estudiadas cinéticamente.

Una de las principales conclusiones derivadas de los trabajos de esta época es el de la unidad básica de la bioquímica. Aunque cada especie exhiba características bioquímicas individuales, estas poseen asombrosas similitudes, en la manera de que, diferentes formas de vida logran hacer tareas íntimamente relacionadas de diversas maneras.

Enzimas

El nombre de enzima (del griego *en*: dentro de + *zymos*: levadura) fue acuñado por Frederick W. Kühnen en 1878 para enfatizar que había algo ahí dentro de las levaduras que catalizaba las reacciones de fermentación.

Las enzimas presentan propiedades importantes, entre las que destacan: incrementar la velocidad de una reacción de 10^6 a 10^{12} veces en comparación a la no catalizada, disminuir la energía de activación necesaria para que un sustrato se transforme en un producto, no modificar el equilibrio de la reacción, regular su actividad en respuesta a la concentración de moléculas o de modificaciones en su estructura, presentar alta especificidad para un sustrato en particular y una alta selectividad en la formación de un producto (Voet *et al.*, 2006).

Con la excepción de un grupo pequeño de moléculas catalíticas de ARN, todas las enzimas son proteínas. Su actividad catalítica depende de la integridad de su conformación nativa, esto es, si una enzima se desnaturaliza o disocia en las subunidades que la comprenden, suele perder su actividad. Mientras que si se hidroliza en los aminoácidos que la constituyen, su actividad catalítica se destruye totalmente.

Las enzimas, como otras proteínas, tienen pesos moleculares que oscilan entre los 12,000 a más de 1 millón de daltones. Unas requieren de componentes químicos adicionales llamados cofactores, entre los que destacan los iones inorgánicos como el Fe^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} ;

o de moléculas orgánicas denominadas coenzima. Algunas enzimas requieren de ambos, una coenzima y de uno o varios iones metálicos para ejercer su actividad.

A las coenzimas o iones metálicos que están fuertemente unidos a las enzimas se les llama grupos prostéticos, mientras que, estructuralmente se denomina holoenzima a la enzima que tiene unida a sus coenzimas o iones metálicos y apoenzima o apoproteína sólo a la parte proteica.

Algunas enzimas son modificadas covalentemente por fosforilación, glucosilación y otros procesos que están involucrados en la regulación de la actividad catalítica (Nelson *et al.*, 2005).

Termodinámica

Todos los procesos que ocurren en el universo, incluyendo a los que ocurren dentro de los organismos vivos, están sujetos a una serie de leyes que sorprendentemente de ninguna forma pueden ser violadas, estas son las leyes de la termodinámica.

La termodinámica es la rama de la ciencia que estudia a la energía y sus transformaciones; también define lo que puede o no pasar espontáneamente. En la termodinámica se define a un sistema como una parte del universo que es de estudio o interés: por ejemplo, una reacción o un organismo, y el resto del universo se conoce como los alrededores. Del mismo modo se conoce a los procesos o reacciones espontáneas como aquellos que ocurren sin la necesidad de introducir energía adicional al sistema. Estas reacciones por sí solas liberan energía a medida que van llegando al equilibrio y teóricamente, la energía generada puede ser aprovechada para hacer trabajo. Aunque en todas las reacciones espontáneas la energía libre se conserva, algo se pierde; este algo es la capacidad o potencial de hacer más trabajo (Segel 1976).

Las leyes de la termodinámica

La primera ley de la termodinámica establece que la energía (U) no puede ser creada ni destruida y que en un proceso dado, una forma de energía puede ser convertida en otra, pero la energía del sistema más la energía de los alrededores permanece constante.

La segunda ley de la termodinámica establece que todos los procesos que ocurren de forma natural avanzan en una dirección que lleva a un incremento en la entropía, el cual está muy cerca del equilibrio. Por ejemplo, las grandes pirámides de Egipto algún día se convertirán en granos de arena, pero los granos de arena nunca espontáneamente se ensamblarán para formar una nueva pirámide.

Una afirmación más completa de la segunda ley de la termodinámica toma en cuenta la unidireccionalidad de los procesos espontáneos, la caída de la energía libre e introduce el concepto de entropía. La entropía (S), que constantemente aumenta en el universo, es una medida de la aleatoriedad o desorden en un sistema. Un sistema más desordenado, aleatorio o caótico presenta una mayor entropía, mientras que, es menor en un sistema más organizado, ordenado o altamente estructurado. Un incremento en la entropía representa una pérdida en la organización, y por lo tanto una pérdida en el potencial para hacer trabajo. De este modo, sólo la energía no aleatoria u organizada es útil para hacer trabajo, por ejemplo el calor es el reflejo del movimiento molecular aleatorio, mientras que el trabajo se asocia con movimiento organizado.

La tercera ley de la termodinámica establece que a la temperatura del cero absoluto ($0\text{ }^{\circ}\text{K}$), donde todo movimiento aleatorio cesa, la entropía de un cristal perfecto de cada substancia es cero; esto es, todos los átomos están altamente ordenados (Segel 1976).

Los seres vivos y la termodinámica

Si la dirección espontánea del orden es cuesta abajo, surge la siguiente pregunta: ¿cómo podemos explicar la biosíntesis de complejos, macromoléculas altamente organizadas o la existencia de células vivas?

Debido a que ninguna de las leyes de la termodinámica ha sido violada, de igual forma que no se violó ninguna ley para construir las pirámides de los granos de arena, la tendencia natural de la materia y la energía en un sistema dado para ir cuesta abajo puede contrarrestarse introduciendo energía al sistema; esto es, aplicando trabajo en el sistema. La energía total, esto es, la energía del sistema más la energía de los alrededores, permanece constante. Pero la entropía total, aquella del sistema más la de sus alrededores, aumenta. Por otra parte, la entropía de sólo el sistema que recibe la energía puede incrementar, bajar, o permanecer constante.

En general, las células toman la materia prima con un alto grado de entropía del ambiente y ordenan estos materiales con un grado menor de entropía a expensas del ambiente, logrando así suministros de energía química con estados de entropía bajos que puede aprovechar en el anabolismo de moléculas necesarias para mantenerla con vida (Voet *et al.*, 2006; Segel 1976).

La termodinámica en el metabolismo

Los principios termodinámicos subyacentes a la interconversión de la energía (1era. ley), y a la direccionalidad de las reacciones (2da. ley) son muy importantes para entender las bases del metabolismo y su control. De hecho, las rutas metabólicas son ejemplos de sistemas termodinámicos abiertos, que se caracterizan por un constante intercambio de materia y energía con sus alrededores.

Tres tipos de reacciones juegan un papel muy importante en una vía metabólica, no sólo para mantener el estado estacionario, sino también permitiendo el cambio de flujo de un estado estacionario a otro. Estas reacciones son: cercanas al equilibrio (*near-equilibrium*), fuera del equilibrio (*non-equilibrium*), y generadoras de flujo (*flux-generating*), siendo las últimas un caso especial de las reacciones fuera del equilibrio (Nelson *et al.*, 2005; Voet *et al.*, 2006).

Las reacciones fuera del equilibrio en ruta metabólica en general se asocian con enzimas que tienen baja actividad en comparación con las actividades de otras enzimas de la vía. A

la inversa, una reacción es considerada cercana al equilibrio si su actividad catalítica es grande en relación con la actividad de otras enzimas en la vía.

La relevancia metabólica para las reacciones cercanas al equilibrio, en las que las concentraciones de sustratos y productos son similares a los valores de las concentraciones en el equilibrio (el ΔG es cercano a 0), consiste en permitir el cambio de sentido en una ruta metabólica de manera más fácil, mientras que para las reacciones fuera del equilibrio, en las que las concentraciones de productos y sustratos son mucho menores que los valores de las constantes de equilibrio (el ΔG es grande y negativo), es proveer direccionalidad en una ruta metabólica. La mayor ventaja de las reacciones fuera del equilibrio en el control metabólico es que el flujo a través de ellas puede ser controlado por factores alostéricos que pueden pertenecer o no a la vía; debido a esto son consideradas como sitios clave de retroalimentación en una ruta metabólica (Segel 1976).

Entonces una vía metabólica no es sólo una serie de reacciones interconectadas, sino que posee una estructura termodinámica y cinética importante.

Glucólisis

En la glucólisis (del Griego *glykos*: dulce + *lysis*: degradación) una molécula de glucosa es degradada en una serie de diez reacciones enzimáticas para formar dos moléculas de tres carbonos. A lo largo de este proceso algo de la energía liberada por la degradación de la glucosa se conserva en forma de ATP y NADH (Figura 1 y 13).

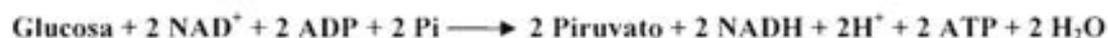


Figura 1. Reacción simplificada de la vía glucolítica.

Esta vía fue completamente descrita en levaduras por Otto Warbug y Euler-Chelpin, y en el músculo por Gustav Embden, Otto Meyerhof y Jacob Parnas en 1940. La glucólisis es la vía central del catabolismo de la glucosa y la ruta metabólica con el mayor flujo de moléculas de carbono en la mayoría de las células. Juega un papel muy importante en el

metabolismo energético de los organismos vivos debido a que provee una porción significativa de la energía libre utilizada y preparara a la glucosa y otros compuestos que entran en diferentes puntos de la vía para futuras degradaciones oxidativas.

Todas las enzimas glucolíticas están localizadas en el citoplasma, se pueden asociar entre ellas y/o con otras estructuras celulares donde la demanda de energía es elevada.

La glucólisis se puede dividir en dos fases: En la primera fase o fase de inversión, debido a que se consumen dos moléculas de ATP, la glucosa es fosforilada en el carbono 6 y degradada en 4 pasos enzimáticos a gliceraldehído-3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato, siendo esta última cetozúcar convertido en otra molécula de gliceraldehído-3-fosfato con ayuda de la triosa fosfato isomerasa. En la fase de ganancia o segunda fase, las dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato formadas son convertidas a dos moléculas de piruvato, junto con la generación de 4 moléculas de ATP y 2 de NADH en cinco reacciones subsecuentes.

Control glucolítico

Bajo condiciones del estadio estacionario la glucólisis opera continuamente dentro de las células, aunque el flujo glucolítico puede cambiar dependiendo de las necesidades energéticas. Sólo tres de las diez reacciones de la glucólisis operan fuera del equilibrio. Estas son catalizadas por la hexocinasa, la fosfofructocinasa y la piruvato cinasa. Entre sus funciones está el proveer direccionalidad a la vía. Estas tres reacciones son candidatas para puntos de control en el flujo glucolítico. Dependiendo del tipo de célula, la regulación por diferentes moléculas efectoras sobre la actividad catalítica de la hexocinasa, fosfofructocinasa y piruvato cinasa puede variar. Las siete reacciones restantes operan cercanas al equilibrio y son muy sensibles a cambios en la concentración de intermediarios glucolíticos, lo que permite el cambio de sentido de la vía de una manera más rápida y fácil.

Fosfofructocinasa

La fosfofructocinasa (ATP: D-fructosa-6-fosfato 1-fosfotransferasa, E.C. 2.7.1.11) representa un punto clave en la vía glucolítica. Cataliza la transferencia irreversible del fosfato γ terminal del complejo Mg^{2+} -ATP al grupo hidroxilo (OH) del carbono 1 de la fructosa-6-fosfato, para producir fructosa-1,6-bisfosfato (Figura 4) (Kemp 1975; Hofmann 1976). Esta enzima también puede utilizar la D-Tagatosa-6-fosfato y la Sedoheptulosa-7-fosfato como aceptores del grupo fosfato, y al UTP, CTP e ITP como donadores del grupo fosfato. Es además el primer paso comprometido en la glucólisis ya que la glucosa 6-fosfato y la fructosa-6-fosfato tienen otros posibles destinos pero la fructosa-1,6-bisfosfato sólo entra a esta vía.

Su actividad es regulada por una complicada serie de mecanismos en forma positiva (activándola) o negativa (inhibiéndola) (Kee *et al.*, 1972; Hofmann *et al.*, 1982).

La aparente gran variedad de mecanismos involucrados en esta regulación incluyen cambios conformacionales (ocasionados por activadores o inhibidores), asociación de subunidades, ionización de residuos de aminoácidos (pH) (Aaronson *et al.*, 1972; Hesterberg *et al.*, 1982; Chaffotte *et al.*, 1984) y modificaciones postraduccionales (Ej. fosforilación) (Uyeda *et al.*, 1978; Kitajima *et al.*, 1983; Luther *et al.*, 1986). Estas características moleculares, así como la regulación por varios mecanismos y moléculas efectoras dependen del origen de la enzima (Kotlarz *et al.*, 1981; Bär *et al.*, 1997; Paricharttanaku *et al.*, 2005).

Algunas bacterias, protistas y probablemente la mayoría de las plantas tienen una fosfofructocinasa que usa el sustrato pirofosfato (PPi) y no el complejo Mg^{2+} -ATP, como donador de fosfatos en la síntesis de fructosa-1,6-bisfosfato (Nelson *et al.*, 2005).

La forma activa de la enzima difiere entre organismos, hay reportes que se sugieren que las PFKs de los mamíferos y de organismos procariontes como *E. coli* o *Bacillus stearothermophilus* son tetraméricas, constituidas de cuatro subunidades idénticas, con pesos moleculares de alrededor de 150 K Da para los procariontes (Blangy 1968; Hudson *et*

al., 1979) y de 300 a 500 K Da para los mamíferos (Mansour *et al.*, 1966; Kono *et al.*, 1974; Trujillo *et al.*, 1977).

Por otro lado, la PFK de *S. cerevisiae*, como la de los eritrocitos humanos está constituida por dos diferentes tipos de subunidades, la alfa y la beta (Tamaki *et al.*, 1975; Karadsheh *et al.*, 1977), que difieren en su movilidad electroforética, propiedades inmunológicas, composición de aminoácidos y propiedades funcionales (Herrman *et al.*, 1973; Kopperschläger *et al.*, 1977; Tijane *et al.*, 1982). En contraste con otras PFKS, la enzima de *S. cerevisiae* y algunas otras levaduras como *K. lactis* no es un tetrámero, sino que tiene una estructura octamérica compuesta de cuatro subunidades alfa y cuatro subunidades beta, codificadas por los genes PFK1 y PFK2, respectivamente (Kopperschläger *et al.*, 1976; Heinisch 1986). Debe mencionarse que la nomenclatura de las subunidades de la PFK de *S. cerevisiae* está invertida en los trabajos de Lobo y Maitra (Lobo *et al.*, 1982).

Las cepas de *S. cerevisiae* que tengan eliminado uno de los genes que codifican para la PFK aún fermentan glucosa y son capaces de crecer en esta fuente de carbono, mientras que las cepas que carecen de ambos genes (*pfk1/pfk2*) son glucosa negativas (Lobo *et al.*, 1982; Rodicio *et al.*, 2000).

Los análisis bioquímicos indican que la subunidad beta contiene sitios de unión para el sustrato fructosa-6-fosfato y por lo tanto confieren a la enzima la actividad catalítica, mientras que la subunidad alfa confiere la capacidad regulatoria (Ej. inhibición por ATP) (Tijame *et al.*, 1980; Lobo *et al.*, 1982). Por otro lado, diferentes estudios señalan que ambas subunidades tienen un sitio de unión para fructosa-6-fosfato y dos sitios de unión para ATP. Uno de estos lugares de unión para el ATP parece estar relacionado con el sitio activo de la enzima y el otro con el sitio alostérico (inhibitorio) (Nissler *et al.*, 1977; Arvanitidis 1994).

Las propiedades cinéticas de la PFK de *S. cerevisiae* dependen de una amplia variedad de metabolitos; el ATP actúa como sustrato e inhibidor alostérico, mientras que el AMP y la fructosa-2,6-bisfosfato revierten esta inhibición (Mavis *et al.*, 1970; Hers *et al.*, 1982). Esta compleja regulación puede ser suprimida por una mutación puntual en cada una de las subunidades (Rodicio *et al.*, 2000).

Debaryomyces hansenii

Debaryomyces (Torulaspora) hansenii es una levadura, eurihalina crio-osmo tolerante, capaz de acumular y tolerar altas concentraciones de Na^+ cuando es incubada o crecida en presencia de este ion (Prista *et al.*, 1997). A diferencia de *S. cerevisiae*, cuyo crecimiento se limita a medios de cultivo que contienen menos de 1.7 M de NaCl, *D. hansenii* puede crecer en presencia de NaCl 4 M (Ratledge *et al.*, 1990). Puede metabolizar ácido láctico y cítrico, debido a esta propiedad se utiliza en la industria para la elaboración de quesos y embutidos (Rankine 1964). Además, es la especie de levadura más común encontrada en salmueras y alimentos en descomposición (Adler 1986; Fleet 1990; Larsson *et al.*, 1990).

Su forma es esférica o corta elipsoidal (Figura 2). La mayoría de las cepas de *D. hansenii* parecen ser haploides, reproduciéndose de forma vegetativa por gemación multilateral. La reproducción sexual se da con baja frecuencia por conjugación isogamética o heterogamética, en la cual se conjugan la célula madre con la hija o dos células con diferente forma o tamaño, respectivamente. Esta unión forma un diploide transitorio seguido de una división meiótica y la aparición de una a cuatro ascosporas. (Kreger-van Rij *et al.*, 1975).

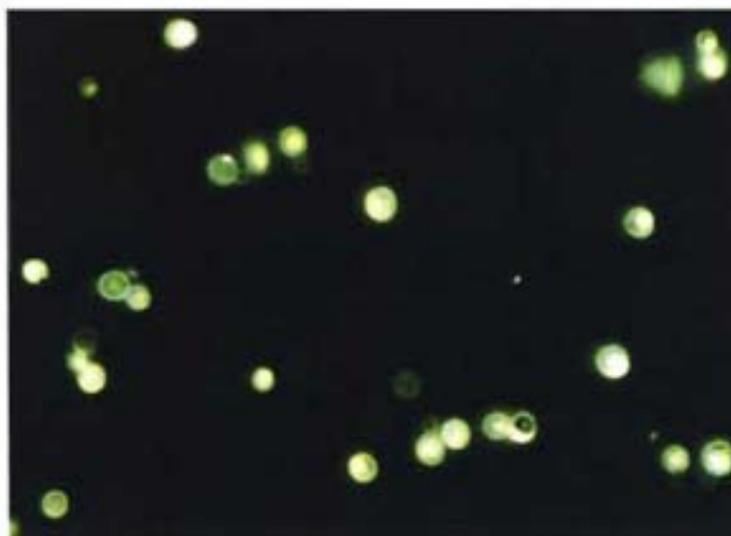


Figura 2. Micrografía óptica de *Debaryomyces hansenii* vista a un aumento de 40x.

La capacidad de *D. hansenii* de sintetizar, acumular y almacenar grandes cantidades de lípidos permite clasificarla en un grupo de microorganismos denominados oleaginosos. Se ha propuesto una definición bioquímica de microorganismos oleaginosos para levaduras, hongos filamentosos y algas eucariontes en la que se destaca la presencia de la citrato liasa (E.C. 2.3.3.8). Esta enzima genera en el citoplasma acetil-CoA, sustrato clave en la biosíntesis de ácidos grasos, a partir de citrato (Ratledge 2002).

De acuerdo con la presente taxonomía, se distinguen dos variedades de *D. hansenii* con diferentes propiedades, *D. hansenii var fabryi* y *D. hansenii var hansenii*, siendo la primera la menos común y poco caracterizada (Petersen *et al.*, 2004).

D. hansenii es una de las 14 especies de levadura diferentes a *S. cerevisiae* que conforman el proyecto Génolevures (Genomic Exploration Of The Hemiascomycetous Yeast). Su genoma está completamente secuenciado, tiene un tamaño total de 12.2 Mb, sin contar el ADN mitocondrial, y está compuesto de 7 cromosomas (A-G) que oscilan entre 1.25 y 2.33 Mb. Entre las levaduras, *D. hansenii* parece poseer la mayor capacidad codificadora, con una cantidad de 6906 secuencias codificantes (CDS), lo que representa el 79.2% de su genoma. Filogenéticamente está más emparentada con levaduras de los géneros *Candida sp.* y *Pichia sp.* (Figura 3). Esta levadura, como otras especies relacionadas (Ej. *Candida albicans*), presenta un código génico no canónico, en el cual los codones CTG son codificados como serinas en lugar de leucinas (1; Ohama *et al.*, 1993).

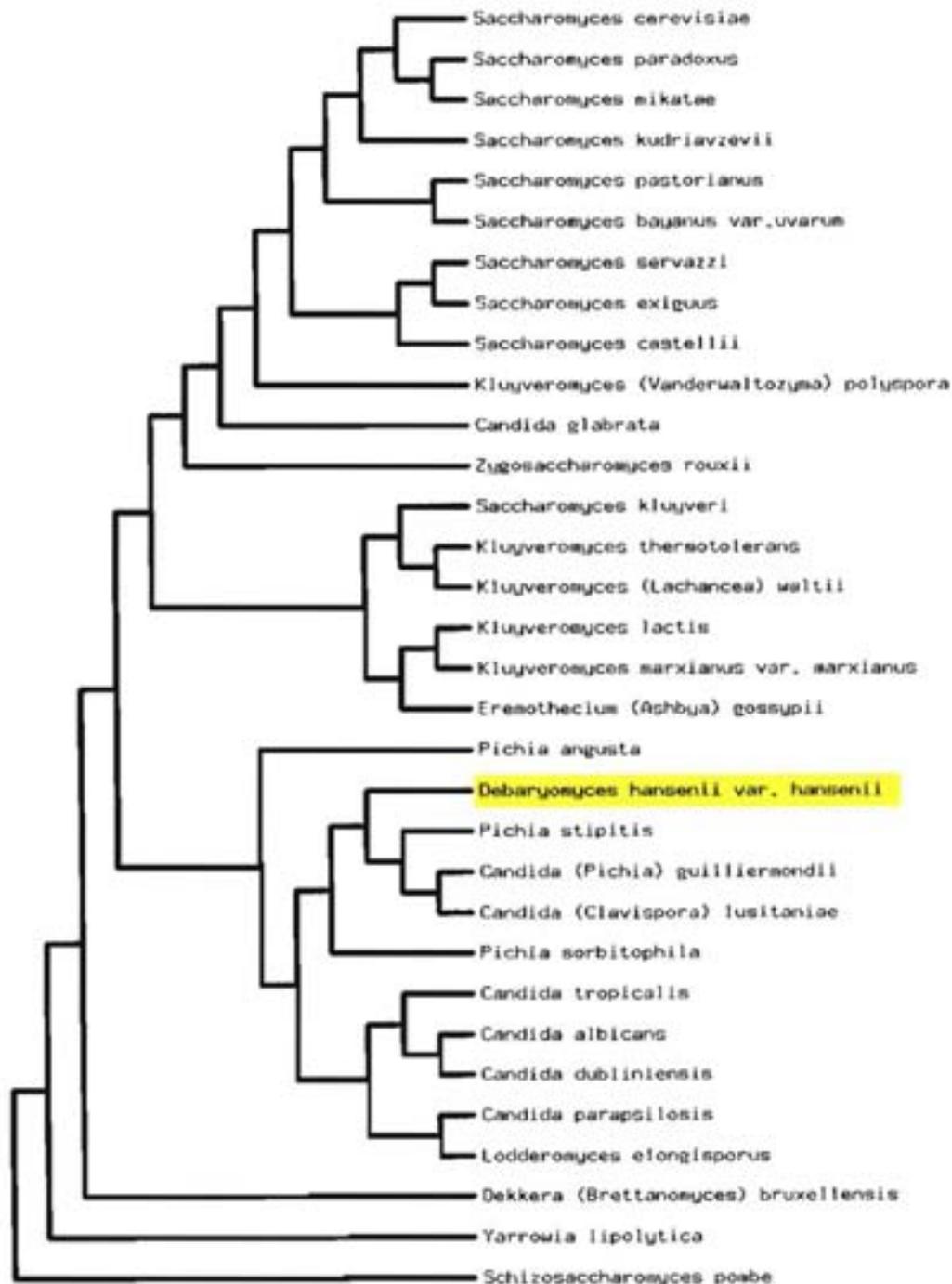


Figura 3. Árbol filogenético de diferentes ascomicetos (1).

Justificación

D. hansenii presenta menor consumo de glucosa, fermentación y respiración en comparación a lo que ocurre en *S. cerevisiae*.

Los niveles de los intermediarios glucolíticos después de agregar glucosa y las actividades enzimáticas de los componentes de esta vía indican que al menos uno de los pasos limitantes en *D. hansenii* está dado por la actividad de la fosfofructocinasa (Sánchez *et al.*, 2006).

Además, la presencia de sales durante el crecimiento de *D. hansenii* resulta en un incremento en la producción de etanol (Calahorra *et al.*, 2009).

Dada la relativa lejanía taxonómica entre *D. hansenii* y *S. cerevisiae*, consideramos importante profundizar sobre las características de regulación de la PFK por su papel limitante en la glucólisis.

Objetivo General

- Caracterizar la regulación de la fosfofructocinasa de *D. hansenii*.

Objetivos Particulares

- Identificar los genes que codifican para la fosfofructocinasa de *D. hansenii* en la base de datos.
- Determinar el comportamiento cinético de esta enzima en extractos celulares de levaduras crecidas en medios con distintas concentraciones de sal y ver su dependencia a diferentes metabolitos.
- Caracterizar la regulación de la vía glucolítica de *D. hansenii* a este nivel enzimático.
- Definir si los genes de la PFK se expresan en *D. hansenii*.
- Hacer una comparación entre las secuencias de aminoácidos de otras PFKs y determinar si existen dominios catalíticos y alostéricos conservados.

Metodología

Cepas, medios y condiciones de cultivo

D. hansenii (Y7426) y *S. cerevisiae* (BY4741) se mantuvieron en cajas de YPD (1% extracto de levadura, 2% glucosa, 2% bacto peptona y 2% agar), resemebrándolas cada 15 días.

Para la obtención de extractos celulares se inoculó 1000 ml de medio YPD ó YPD suplementado con NaCl, a las concentraciones indicadas en los pies de figura, en matraces de 2 litros.

D. hansenii y *S. cerevisiae* fueron crecidas por 42 y 24 horas, respectivamente, a 30 °C con agitación continua a 250 rpm.

Actividades enzimáticas

Después de crecer las cepas por los tiempos indicados, la biomasa obtenida fue centrifugada y lavada dos veces con 250 ml de agua desionizada. Se centrifugó por última vez y el paquete celular se resuspendió a una concentración final de un gramo de células por mililitro (1g/ml) de buffer MOPS-Na⁺-HCl 10 mM pH 7.0, al que se agregó un cocktail de inhibidores de proteasas.

Los extractos celulares se obtuvieron rompiendo las células por un método mecánico. En una cámara Bead Beater se colocó el mismo volumen de células con buffer y perlas de vidrio de 0.45 mm. Se dieron 5 pulsos de 25 segundos cada uno en intervalos de 5 min mientras la cámara era enfriada constantemente con hielo.

Después de romper las células se separó el líquido de las perlas de vidrio con ayuda de una micropipeta. Para separar el extracto del resto de las células que permanecieron íntegras y algunos componentes citoplasmáticos se centrifugó por 10 min a 7000 rpm en un rotor SS34 Sorvall con refrigeración. El sobrenadante fue congelado y almacenado a -70 °C por no más de 2 semanas. El contenido proteico de los extractos celulares fue medido por el método de Biuret.

La actividad de la fosfofructocinasa en los extractos celulares fue medida en una mezcla que contenía como concentración final una mezcla de: buffer Tris-HCl 56.0 mM pH 7.6 (tris-hidroximetilaminometano ajustado a pH 7.6 con HCl), $MgSO_4$ 5.0 mM (excepto en la figura 12 símbolos \blacklozenge y \blacktriangledown donde se utilizó $MgSO_4$ 50.0 mM); $(NH_4)_2SO_4$ 10 mM; 2-mercaptoetanol 5.6 mM; fructosa-6-fosfato 2.47 mM; NADH 0.44 mM; 0.5 mg/ml de extractos celulares; 100 μ l de una mezcla de enzimas que contenía 50 U de glicerofosfato deshidrogenasa, 300 U de triosa fosfato isomerasa, y 29.4 U de aldolasa en 1ml de buffer 56 mM Tris-HCl pH 7.6 con 5 mg/ml de albúmina (modificado de Stellwagen and Wilgus, 1975; Sánchez et al., 2006) y las concentraciones indicadas de Mg^{2+} -ATP, ITP, AMP, Citrato y fructosa-2,6-bisfosfato en las figuras.

Para evaluar el efecto de moduladores alostéricos de la PFK de *D. hansenii*, se utilizó una concentración fija de Mg^{2+} -ATP 3.0 mM en los ensayos, con diferentes concentraciones de AMP o fructosa-2,6-bisfosfato. Mientras que, para evaluar el efecto del citrato en la PFK de *D. hansenii* o *S. cerevisiae* se utilizó Mg^{2+} -ATP 1.7 mM e ITP 1.67 mM, respectivamente.

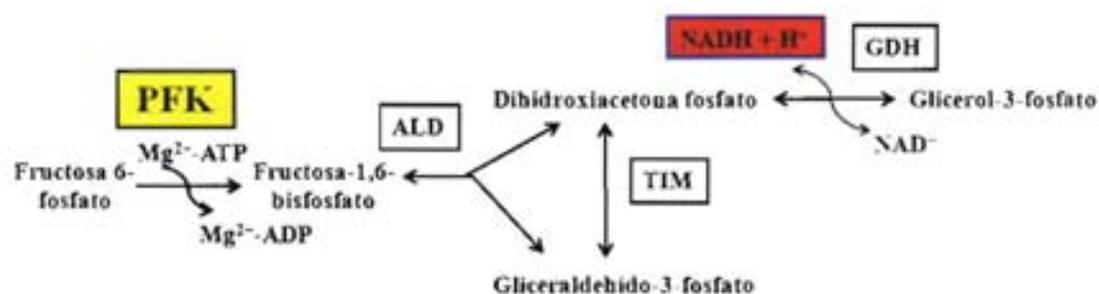


Figura 4. Ensayo acoplado a la oxidación de NADH para medir la actividad de la fosfofructocinasa (PFK) en extractos celulares. Las enzimas accesorias son aldolasa (ALD), triosa fosfato isomerasa (TIM) y glicerofosfato deshidrogenasa (GDH).

Todos los ensayos fueron realizados en un espectrofotómetro Amnco DW-2a, modernizado por Olis, en el modo split con un compartimento termoestable a 25 °C con agitación continua. El volumen final siempre fue de 2.0 ml y las reacciones se comenzaron 20

segundos después de iniciar el experimento al adicionar fructosa-6-fosfato en la mezcla. El cambio en la absorbencia del NADH a 340 nm fue seguido en el tiempo (Figura 4). De los trazos obtenidos se calcularon las pendientes ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$) de la región lineal y se convirtieron a velocidades enzimáticas.

Ajuste de curvas

Para modelar el comportamiento establecido por ambas enzimas y obtener algunos parámetros cinéticos, se ajustaron las actividades de la PFK de *D. hansenii* y *S. cerevisiae* en cada condición experimental a modelos cinéticos adecuados utilizando el programa SigmaPlot 10.0.

Análisis in silico

La búsqueda de genes probables que codifican para la fosfofructocinasa de *D. hansenii* se realizó en la base de datos Génolevures (<http://www.genolevures.org/>) introduciendo la palabra clave *phosphofructokinase* en el buscador.

Los porcentajes de identidad y similitud entre la secuencia de aminoácidos para la cual codifican los genes de *D. hansenii* con las subunidades alfa y beta que componen la fosfofructocinasa de diferentes levaduras fueron calculados mediante el software *blastp* disponible en esta página.

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas candidatas de *D. hansenii* junto con las subunidades alfa y beta que componen a la PFK de diferentes levaduras se obtuvieron en la base de datos ExPASy Proteomics Server (<http://www.expasy.ch/>) en formato fasta, para introducir las en un alineamiento múltiple T-Coffee (<http://www.igs.cnrs-mrs.fr/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi>) e identificar dominios conservados.

Amplificación de las subunidades alfa y beta de la PFK de *D. hansenii*

Se diseñaron oligonucleótidos específicos con sitios de restricción únicos (Tabla 1), con los cuales se amplificaron las regiones codificantes con sus terminadores (Figura 5), de la subunidad alfa y beta de la PFK de *D. hansenii* a partir de ADN genómico. Por métodos de biología molecular tradicionales los productos de PCR fueron clonados en el plásmido

pCR2.1 de invitrogen, sometidos a un análisis de restricción, secuenciación y subclonados en el plásmido de expresión para la levadura *S. cerevisiae* pYes.

Tabla 1

Secuencia de oligonucleótidos utilizados para amplificar la región codificante con su terminador, de la subunidad alfa y beta de la fosfofructocinasa de *D. hansenii*. ■ codón de inicio, ■ codón de paro, ■ sitios de restricción.

Subunidad	Oligo Fow	Oligo Rev
Alfa	5'-AATAGAATAAGGTACCGATGC CTATTC	5'-AGGACAATTTGGATCCAGGGTGG ATCA
Beta	5'-AGTCACTTAGCGGCCGCTAAA CAAACAAGATG	5'-CTTCATGAAGTACTCGAGAGAAT TATT

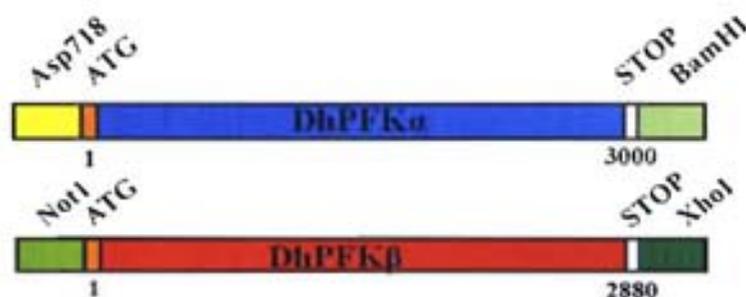


Figura 5. Estructura de los productos amplificados por PCR de la subunidad alfa y beta de la fosfofructocinasa de *D.hansenii*.

Northern Blot

Para determinar la expresión de las subunidades alfa y beta de la PFK de *D. hansenii* en diferentes condiciones experimentales, se extrajo ARN total de esta levadura crecida en YPD ó YPD suplementado con NaCl. El ARN obtenido fue separado por electroforesis, transferido y fijado a una membrana de nitrocelulosa. Se utilizó como sonda el producto de

la digestión de los plásmidos pYes-DHPFK1 y pYes-DHPFK2 que contienen a la subunidad alfa y beta, respectivamente, con la enzima de restricción EcoRI. Los fragmentos de 623 y 508 pares de bases liberados (Figura 15) se purificaron y marcaron con fosfato radiactivo. Como control se utilizaron los plásmidos pYes-DHPFK1 y pYes-DHPFK2 sin digerir.

Resultados

Genes y subunidades de la fosfofructocinasa de *D. hansenii*

Se buscó en la base de datos Génolevures (<http://www.genolevures.org/>), e identificamos dos posibles genes que codifican las subunidades de la fosfofructocinasa de *D. hansenii*. Los genes encontrados tienen el código de acceso DEHA2D10186g y DEHA2G20768g; se localizan en los cromosomas D y G, y codifican para una proteína de 993 y 943 aminoácidos con pesos moleculares de 109.7 y 103.7 KDa, respectivamente.

Mediante un análisis *in silico* ([blastp](#)), comparando los aminoácidos que codifican los genes candidatos de *D. hansenii* y el de las subunidades alfa y beta que componen la PFK de diferentes levaduras (Tabla 2), se determinó que el gen DEHA2D10186g codifica para la subunidad beta (DHPFK2), y que el gen DEHA2G20768g codifica para la subunidad alfa (DHPFK1) por sus respectivos porcentajes de identidad y similitud. La única subunidad de la PFK de *Y. lipolytica* presentó una relación intermedia, en los porcentajes de identidad y similitud, entre las dos proteínas candidatas de *D. hansenii*.

Además, se observó que al comparar las subunidades de la PFK de *D. hansenii* entre ellas, mostraron diferencias en estos porcentajes (Tabla 2), lo que nos indicó la presencia de dos proteínas con diferente secuencia de aminoácidos y posibles dominios conservados que pudieran conformar a la PFK en esta levadura.

Tabla 2

Porcentajes de identidad y similitud entre los aminoácidos de los genes DEHA2D10186g y DEHA2G20768g con respecto a las subunidades alfa (α) y beta (β) de la fosfofructocinasa de *S. cerevisiae* (Sc), *C. albicans* (Ca), *K. lactis* (Kl), *Y. lipolitica* (Yl) y *D.hansenii* (Dh).

	Sc α	Sc β	Ca α	Ca β	Kl α	Kl β	Yl	Dh α	Dh β	%
DEHA0G22088g	58	46	63	46	57	47	50	100	50	Identidad
	74	65	80	65	73	66	65	100	70	Similitud
	2	5	3	6	3	3	8	0	2	Gaps
DEHA0D11132g	52	62	47	70	52	61	54	50	100	Identidad
	69	76	67	84	70	75	70	70	100	Similitud
	3	1	2	0	2	2	4	2	0	Gaps

Actividades enzimáticas

Se estudió el comportamiento de la actividad de la fosfofructocinasa a diferentes concentraciones de Mg^{2+} -ATP en extractos celulares de *D. hansenii*, crecida en diferentes concentraciones de sal, y de *S. cerevisiae*, como control, para comparar algunos parámetros cinéticos.

Al aumentar las concentraciones de Mg^{2+} -ATP en los experimentos (Figura 6), la actividad de la fosfofructocinasa de *D. hansenii* presentó un comportamiento hiperbólico en los extractos celulares obtenidos de los diferentes medios de cultivo, indicando que en estas condiciones no existía la inhibición de la PFK de *D. hansenii* con respecto a este metabolito y que el Mg^{2+} -ATP sólo era utilizado como sustrato. Por otra parte, la PFK de *S. cerevisiae* presentó el patrón esperado de inhibición en su actividad al aumentar las concentraciones de Mg^{2+} -ATP, como ya se había descrito en otros trabajos (Kopperschläger *et al.*, 1976; Hofmann., 1976).

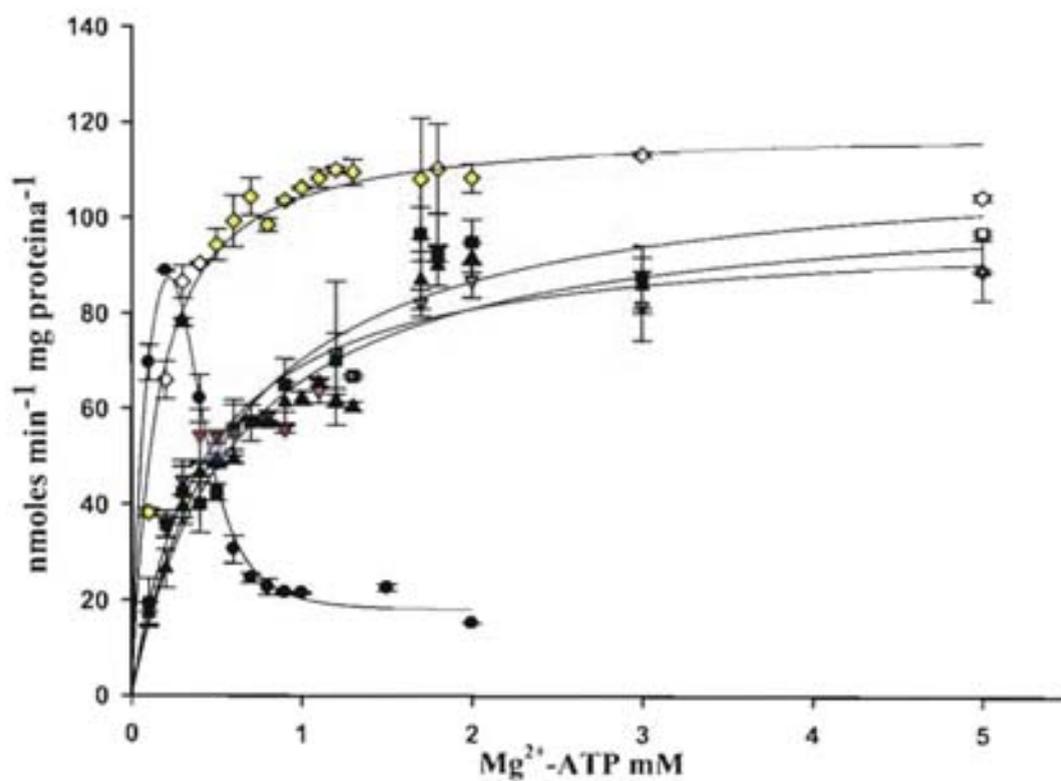


Figura 6. Actividad de la fosfofructocinasa de *D. hansenii* y *S. cerevisiae* a diferentes concentraciones de Mg²⁺-ATP. Extractos celulares de *S. cerevisiae* crecida en ● YPD y *D. hansenii* crecida en ▲ YPD, ▼ YPD con 0.1 M de NaCl, ■ YPD con 0.5 M de NaCl y ◆ YPD con 1.0 M de NaCl.

Tabla 3

Parámetros cinéticos de la actividad de la fosfofructocinasa de *D. hansenii* y *S. cerevisiae* a diferentes concentraciones de Mg^{2+} -ATP. Extractos celulares de *S. cerevisiae* crecida en ● YPD y *D. hansenii* crecida en ▲ YPD, ▼ YPD con 0.1 M de NaCl, ■ YPD con 0.5 M de NaCl y ◆ YPD con 1.0 M de NaCl.

	Vmax (nmoles min ⁻¹ mg protein ⁻¹)	Km (mM)	Ki (mM)	n
●	129.70 ± 24.63	0.08 ± 0.0393	0.0237 ± 0.0098	3.83 ± 0.7
▲	105.50 ± 5.89	0.60 ± 0.0974	-----	1
▼	97.93 ± 4.93	0.40 ± 0.0712	-----	1
■	113.00 ± 7.19	0.60 ± 0.1174	-----	1
◆	119.20 ± 2.37	0.14 ± 0.0143	-----	1

El modelo utilizado para ajustar el comportamiento de la actividad de la PFK de *D. hansenii* a diferentes concentraciones de Mg^{2+} -ATP (Tabla 3) fue el de una curva Michaeliana (Ecuación 1), en donde Vmax es la máxima velocidad de la enzima con respecto al sustrato Mg^{2+} -ATP y Km es la concentración de sustrato a la cual la velocidad inicial (V_0) es la mitad de la velocidad máxima.

Ecuación 1

$$V_0 = \frac{V_{max} \times [Mg^{2+}\text{-ATP}]}{K_m + [Mg^{2+}\text{-ATP}]}$$

El comportamiento de la actividad de la PFK de *S. cerevisiae* a diferentes concentraciones de Mg^{2+} -ATP se ajustó a un modelo de inhibición no competitivo (Ecuación 2), en donde Vmax es la máxima velocidad de la enzima con respecto al sustrato Mg^{2+} -ATP, Km es la concentración de sustrato a la cual la velocidad inicial (V_0) es la mitad de la velocidad máxima, Ki es la concentración del inhibidor a la cual la velocidad inicial (V_0) es la mitad de la velocidad máxima y n es un coeficiente cuyo valor indica la presencia o ausencia de

cooperatividad. Si n es igual a uno no hay cooperatividad, pero si n es mayor o menor a uno existe cooperatividad positiva o negativa, respectivamente.

Ecuación 2

$$V_0 = \frac{V_{\max} \times [Mg^{2+}\text{-ATP}] \times (1 + ((\beta \times [Mg^{2+}\text{-ATP}]^n) / K_i))}{K_m + [Mg^{2+}\text{-ATP}] ((1 + [Mg^{2+}\text{-ATP}]^n) / K_i)}$$

Los datos obtenidos al variar las concentraciones de $Mg^{2+}\text{-ATP}$ se corroboraron utilizando una concentración saturante de ITP (1.9 mM) (Figura 7). El ITP es un análogo del ATP que no tiene actividad regulatoria sobre las PFKs, ya que sólo actúa como donador de grupos fosfatos. Se compararon las concentraciones de $Mg^{2+}\text{-ATP}$ en las cuales se obtienen los valores de V_{\max} (Figura 6 y Tabla 3) con las actividades enzimáticas medidas en presencia de ITP 1.9 mM, observándose que la V_{\max} de la enzima de *D. hansenii* a altas concentraciones de $Mg^{2+}\text{-ATP}$ fue similar a la que presentó con ITP 1.9 mM, mientras que para *S. cerevisiae* la actividad de la enzima en presencia de ITP 1.9 mM fue similar a la V_{\max} que presentó a concentraciones bajas de $Mg^{2+}\text{-ATP}$. Demostrándose así que el ATP no tuvo ninguna función regulatoria en la enzima de *D. hansenii* y que solo actuó como donador de grupos fosfato.

Es importante señalar que la actividad de la PFK de *D. hansenii* presentó valores de V_{\max} similares en los extractos obtenidos de los diferentes medios de cultivo al aumentar las concentraciones de $Mg^{2+}\text{-ATP}$. Por otro lado, la K_m mostró una modificación en la afinidad por el sustrato $Mg^{2+}\text{-ATP}$, únicamente en los extractos celulares obtenidos a 1M de NaCl, mientras que en el resto de las condiciones presentó valores parecidos (Tabla 3 y Figura 6).

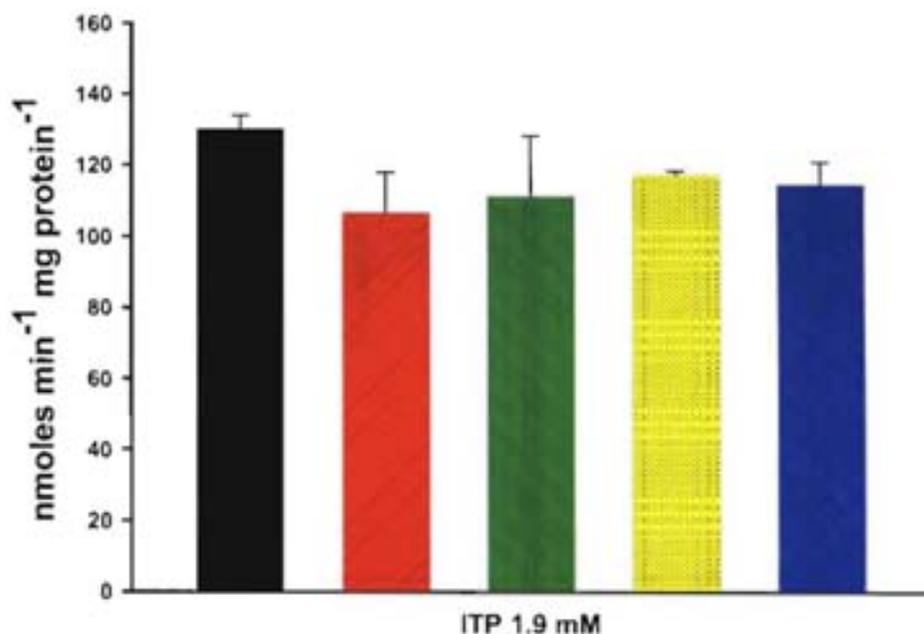


Figura 7. Actividad de la fosfofructocinasa de *D. hansenii* y *S. cerevisiae* con ITP 1.9 mM. Extractos celulares de *S. cerevisiae* crecida en ■ YPD y *D. hansenii* crecida en ■ YPD, ■ YPD con 0.1 M de NaCl, ■ YPD con 0.5 M de NaCl y ■ YPD con 1.0 M de NaCl.

Continuando con la identificación de moléculas que pudieran afectar la actividad de la PFK de *D. hansenii*, se evaluó el comportamiento de esta enzima a una concentración fija de Mg^{2+} -ATP 3.0 mM con diferentes concentraciones de AMP (Figura 8) y fructosa-2,6-bisfosfato (Figura 9). Ambos metabolitos presentaron un patrón de activación para la PFK de *D. hansenii*, aún con la actividad a su velocidad máxima (V_{max}). La fructosa-2,6-bisfosfato resultó ser el activador más potente, al requerir concentraciones micromolares para activar a la enzima, en comparación con las concentraciones milimolares del AMP.

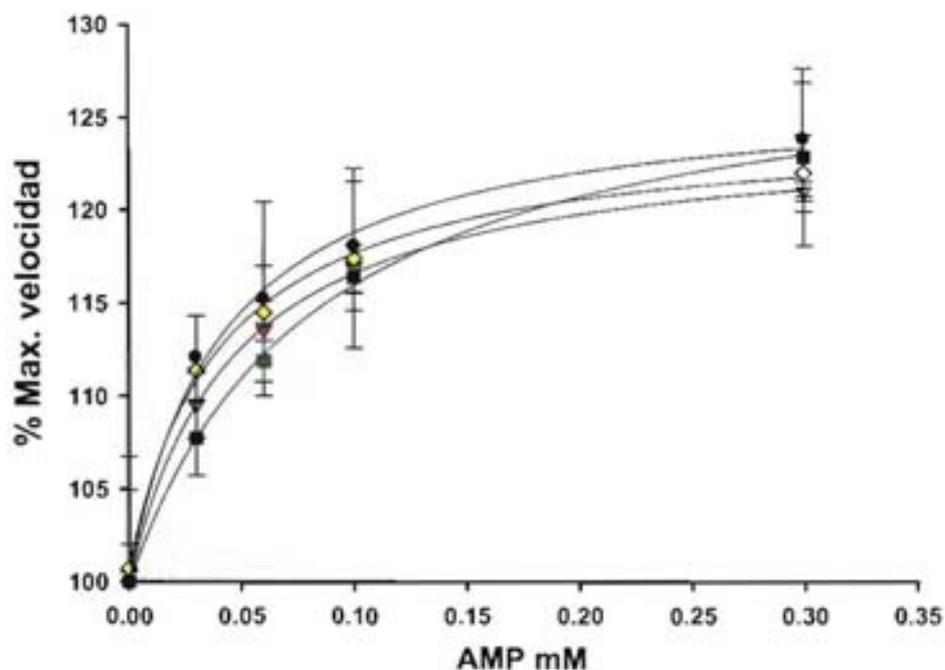


Figura 8. Actividad de la fosfofructocinasa de *D. hansenii* a diferentes concentraciones de AMP y una concentración fija de Mg^{2+} -ATP 3.0 mM. Extractos celulares de *D. hansenii* crecida en ● YPD, ▼ YPD con 0.1 M de NaCl, ■ YPD con 0.5 M de NaCl y ◆ YPD con 1.0 M de NaCl.

Tabla 4

Parámetros cinéticos de la actividad de la fosfofructocinasa de *D. hansenii* a diferentes concentraciones de AMP y una concentración fija de Mg^{2+} -ATP 3.0 mM. Extractos celulares de *D. hansenii* crecida en ● YPD, ▼ YPD con 0.1 M de NaCl, ■ YPD con 0.5 M de NaCl y ◆ YPD con 1.0 M de NaCl.

	Vmax (% Max. velocidad)	Km (mM)
●	126.41 ± 1.627	0.041 ± 0.008
▼	124.38 ± 0.378	0.046 ± 0.002
■	129.42 ± 7.193	0.083 ± 0.007
◆	123.82 ± 0.950	0.042 ± 0.005

El modelo utilizado para ajustar el comportamiento de la actividad de la PFK de *D. hansenii* a diferentes concentraciones de AMP (Tabla 4) fue el de una curva hiperbólica (Ecuación 3), en donde la V_{max} es la máxima velocidad de la enzima con respecto a una concentración fija del sustrato Mg^{2+} -ATP 3.0 mM y una concentración elevada de AMP; la K_m es la concentración de sustrato a la cual la velocidad inicial (V_0) es la mitad de la velocidad máxima y 100% es la actividad máxima de la enzima alcanzada a 3.0 mM de Mg^{2+} -ATP en ausencia de AMP.

Ecuación 3

$$V_0 = \frac{100 * V_{max} * [Mg^{2+}\text{-ATP}]}{K_m + [Mg^{2+}\text{-ATP}]}$$

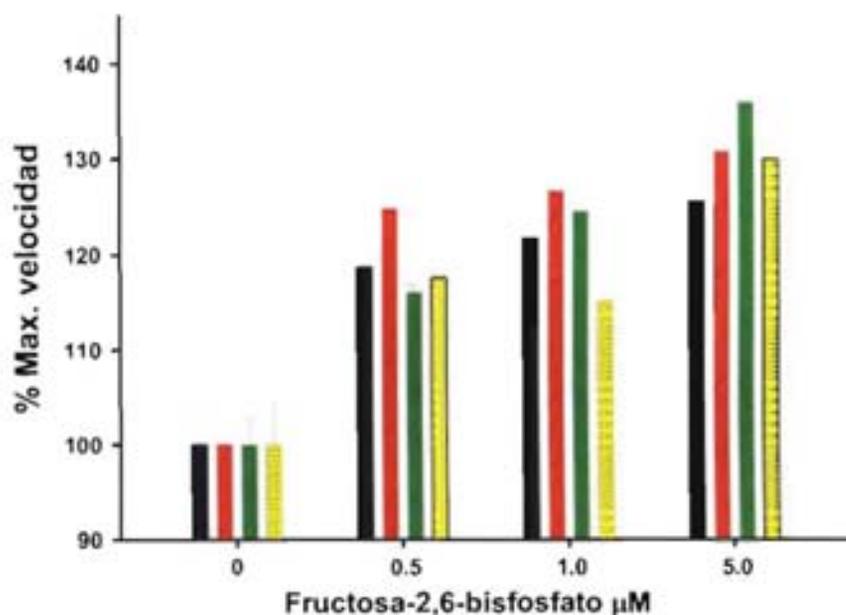


Figura 9. Actividad de la fosfofructocinasa de *D. hansenii* a diferentes concentraciones de fructosa-2,6-bisfosfato y una concentración fija de Mg^{2+} -ATP 3.0m M. Extractos celulares de *D. hansenii* crecida en ■ YPD, ■ YPD con 0.1 M de NaCl, ■ YPD con 0.5 M de NaCl y ■ YPD con 1.0 M de NaCl.

Por último se evaluó el comportamiento de la PFK a diferentes concentraciones de citrato manteniendo una concentración fija de Mg^{2+} -ATP 1.7 mM en extractos celulares de *D. hansenii* crecida en YPD o YPD suplementado con NaCl (Figura 10, 11 y 12) y una concentración fija de ITP 1.67 mM para los ensayos de *S. cerevisiae* crecida en YPD (Figura 11 y 12). Al aumentar las concentraciones de citrato se observó un patrón de inhibición para ambas PFK.

El modelo utilizado para ajustar el comportamiento de la actividad de la PFK de *D. hansenii* y *S. cerevisiae* a diferentes concentraciones de citrato (Tabla 5, 6 y 7) fue el de inhibición simple (Ecuación 4), en donde 100% es la actividad máxima de la enzima alcanzada a 1.7 mM de Mg^{2+} -ATP y 1.67 mM de ITP sin citrato para *D. hansenii* y *S. cerevisiae*, respectivamente, K_i es la concentración del inhibidor a la cual la velocidad inicial (V_0) es la mitad de la velocidad máxima, y n es cooperatividad.

$$\text{Ecuación 4}$$
$$V_0 = \frac{100}{(1 + \text{Citrato}^n) / K_i^n}$$

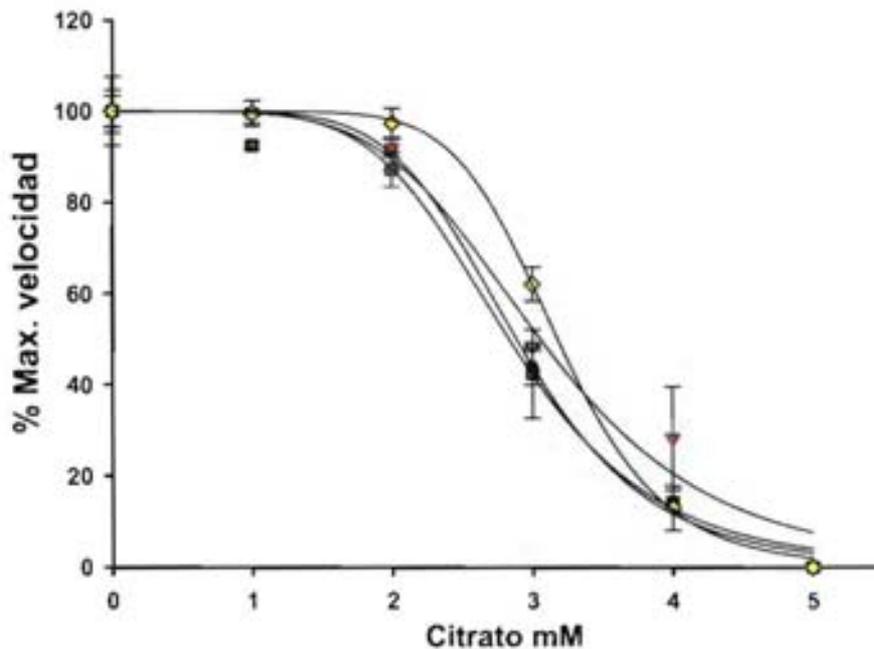


Figura 10. Actividad de la fosfofructocinasa de *D. hansenii* a diferentes concentraciones de citrato y una concentración fija de Mg^{2+} -ATP 1.7 mM. Extractos celulares de *D. hansenii* crecida en ● YPD, ▼ YPD con 0.1 M de NaCl, ■ YPD con 0.5 M de NaCl y ◆ YPD con 1.0 M de NaCl.

Tabla 5

Parámetros cinéticos de la actividad de la fosfofructocinasa de *D. hansenii* a diferentes concentraciones de citrato y una concentración fija de Mg^{2+} -ATP 1.7 mM. Extractos celulares de *D. hansenii* crecida en ● YPD, ▼ YPD con 0.1 M de NaCl, ■ YPD con 0.5 M de NaCl y ◆ YPD con 1.0 M de NaCl.

	Ki (mM)	n
●	2.887 ± 0.0319	6.19 ± 0.38
▼	3.056 ± 0.1128	5.04 ± 0.86
■	2.834 ± 0.0761	5.56 ± 0.72
◆	3.179 ± 0.0166	8.50 ± 0.37

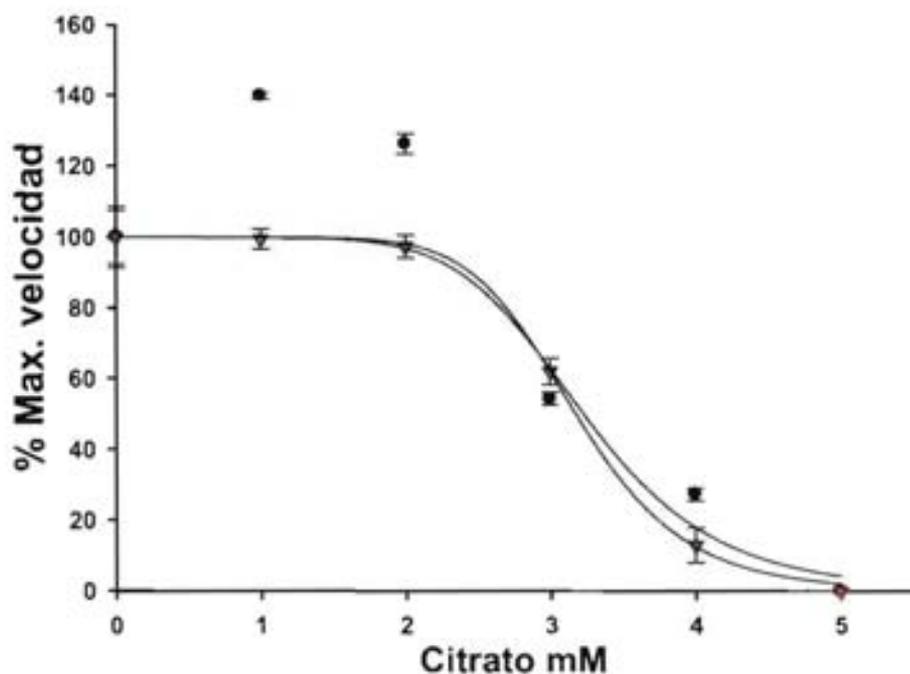


Figura 11. Comportamiento de la actividad de la fosfofructocinasa de *D. hansenii* y *S. cerevisiae* a diferentes concentraciones de citrato y una concentración fija de Mg^{2+} -ATP 1.7 mM o ITP 1.67 mM, respectivamente. Extractos celulares de \blacktriangledown *D. hansenii* y \bullet *S. cerevisiae* crecidas en YPD.

Tabla 6

Parámetros cinéticos de la actividad de la fosfofructocinasa de *D. hansenii* a diferentes concentraciones de citrato y una concentración fija de Mg^{2+} -ATP 1.7 mM o ITP 1.67 mM.

Extractos celulares de \blacktriangledown *D. hansenii* y \bullet *S. cerevisiae* crecidas en YPD.

	Ki (mM)	n
\bullet	3.233 ± 0.4159	7.139 ± 6.04
\blacktriangledown	2.887 ± 0.0319	6.196 ± 0.38

Se sabe que los ácidos orgánicos a altas concentraciones quelan iones metálicos. Para evaluar si la inhibición por citrato de la PFK de ambas levaduras tenía un efecto alostérico sobre la actividad enzimática y no era producto de la pérdida en la disponibilidad de iones Mg^{2+} , requeridos como cofactores en la catálisis de la PFK, se midieron las actividades en extractos celulares de ambas levaduras con 5 o 50 mM de $MgSO_4$ (Figura 12). Se observó que el patrón de inhibición de los ensayos para ambas enzimas se mantuvo constante en las dos condiciones de $MgSO_4$ al variar las concentraciones de citrato (Tabla 7). Comprobando de esta manera que el citrato ejerció un efecto inhibitorio sobre la actividad la PFK de ambas levaduras.

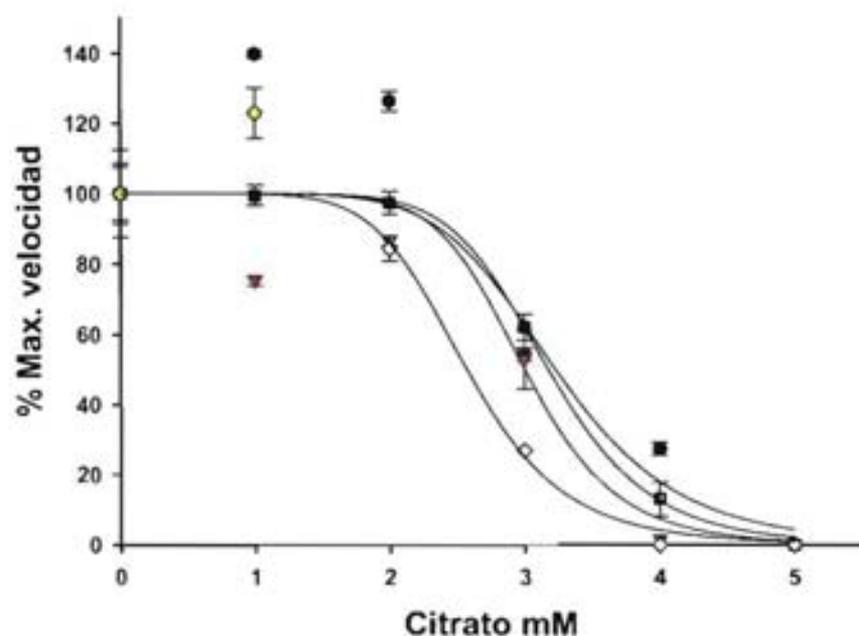


Figura 12. Comportamiento de la actividad de la fosfofructocinasa de *D. hansenii* y *S. cerevisiae* a diferentes concentraciones de citrato y magnesio. Extractos celulares de *D. hansenii* con 5 mM o 50 mM de $MgSO_4$ y una concentración fija de Mg^{2+} -ATP 1.7 mM, y *S. cerevisiae* con 5 mM o 50 mM de $MgSO_4$ y una concentración fija de ITP 1.67 mM, crecidas en YPD.

Tabla 7

Parámetros cinéticos de la actividad de la fosfofructocinasa de *D. hansenii* a diferentes concentraciones de citrato y magnesio. Extractos celulares de *D. hansenii* con ■ 5 mM o ◆ 50 mM de Mg^{2+} y una concentración fija de Mg^{2+} -ATP 1.7 mM, y *S. cerevisiae* con ● 5 mM o ▼ 50 mM Mg^{2+} y una concentración de ITP 1.67 mM, crecidas en YPD.

	Ki (mM)	n
●	3.232 ± 0.415	7.13 ± 6.04
▼	3.003 ± 0.182	8.88 ± 6.22
■	3.179 ± 0.016	8.50 ± 0.37
◆	2.575 ± 0.019	7.16 ± 2.64

De los experimentos previamente realizados se generó un esquema, señalando las moléculas que regulan la actividad de la PFK de *D. hansenii* (Figura 13). El AMP y la fructosa-2,6-bisfosfato actuaron como activadores alostéricos, mientras que, el citrato funcionó como inhibidor. El Mg^{2+} -ATP sólo fue utilizado como sustrato, ya que no se observó el papel inhibitorio reportado en otros organismos sobre la actividad de la PFK.

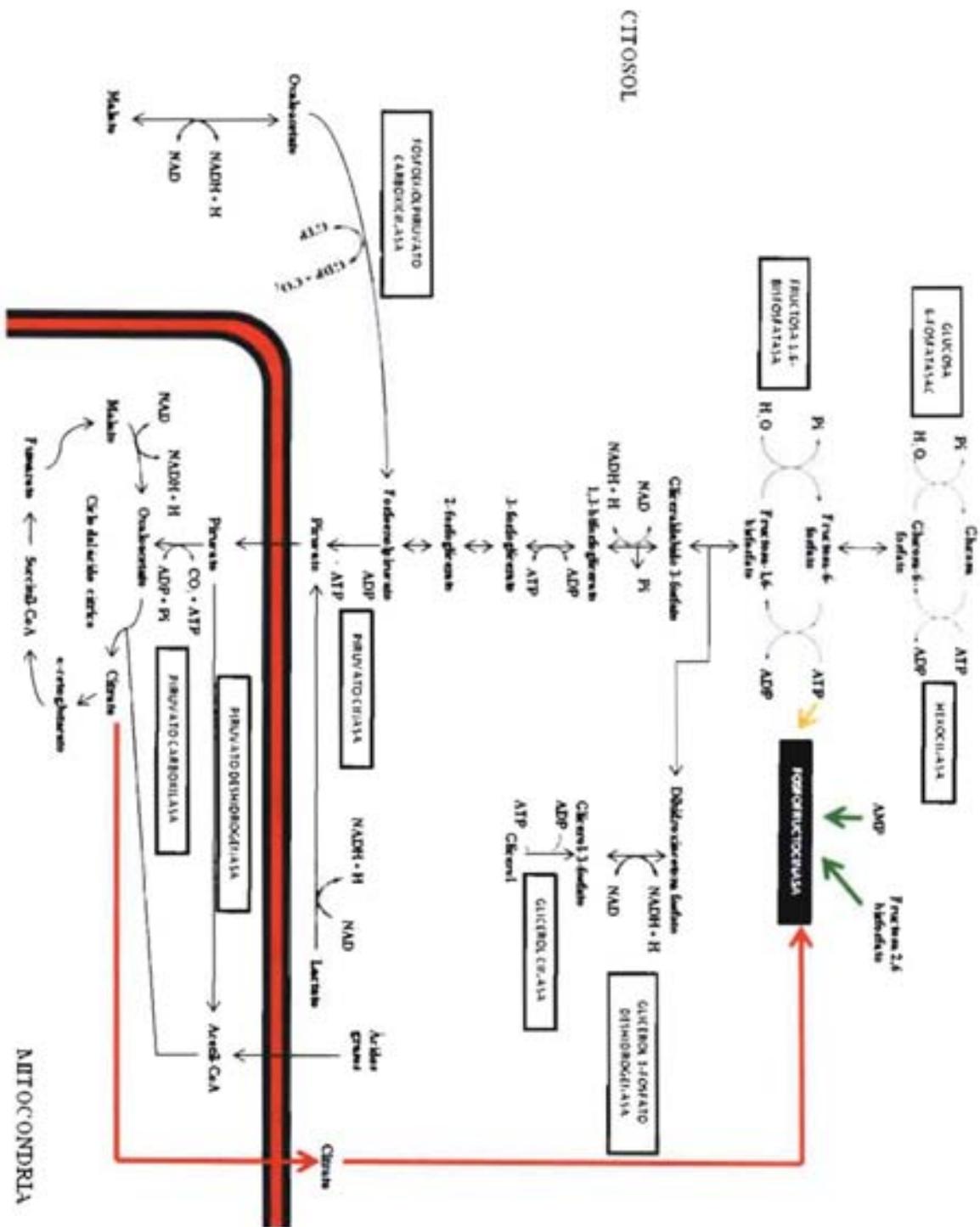


Figura 13. Regulación de la fosfofructocinasa de *D. hansenii* por diferentes moléculas efectoras.

Amplificación de las subunidades alfa y beta de la PFK de *D. hansenii*

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar la región codificante con su terminador de la subunidad alfa y beta de la PFK de *D. hansenii*. El tamaño del producto de PCR esperado para las subunidades alfa y beta fue de 2900 y 3030 pares de bases, respectivamente (Figura 14). Las bandas obtenidas con estos pesos moleculares fueron purificadas y clonadas en el vector pCR2.1 de invitrogen. Los plásmidos con la subunidad alfa o beta fueron analizados con ensayos de restricción y por secuenciación automática. Una vez determinada la integridad de la secuencia de cada uno de los genes se subclonaron en el plásmido de expresión inducible por galactosa pYes. Los vectores generados a partir de estas construcciones fueron pYes-DHPFK1 y pYes-DHPFK2.

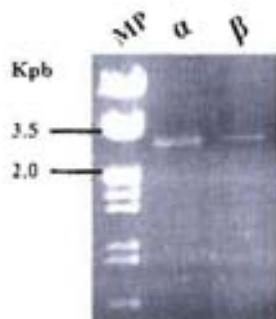


Figura 14. Producto de PCR de la región codificante con su terminador de la subunidad alfa (α) y beta (β) de la PFK de *D. hansenii*.

Expresión de las subunidades alfa y beta de la PFK de *D.hansenii*.

Se extrajo ARN total de *D. hansenii* crecida en YPD o YPD suplementado con NaCl para evaluar si los dos genes candidatos de la PFK se expresaban en esta levadura (Figura 16 y 17). Se utilizó como sonda el producto de la digestión con la enzima de restricción EcoRI de los plásmidos pYes-DHPFK1 y pYes-DHPFK2 que contienen a la subunidad alfa y beta, respectivamente (Figura 15).

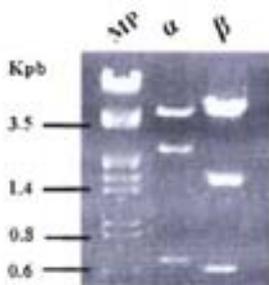


Figura 15. Patrón de restricción establecido con la enzima EcoRI de los plásmidos pYes-DHPFK1 (α) y pYes-DHPFK2 (β).

Se observó que los genes que codifican para las subunidades alfa y beta de la PFK de *D. hansenii* se expresaron en todas las condiciones de crecimiento (Figura 16 y 17).

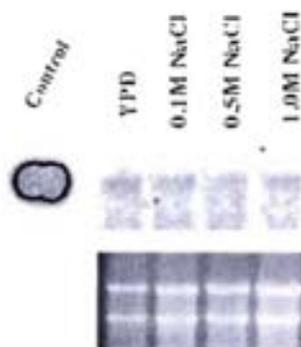


Figura 16. Northern Blot de la subunidad alfa de la PFK de *D. hansenii*. ARN obtenidos de células crecidas en YPD y YPD con NaCl

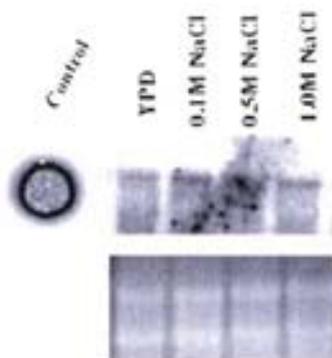


Figura 17. Northern Blot de la subunidad beta de la PFK de *D. hansenii*. ARN obtenidos de células crecidas en YPD y YPD con NaCl.

Alineamiento múltiple T-Coffee

Se realizó un alineamiento múltiple T-Coffee entre las secuencias de aminoácidos de las proteínas candidatas de *D. hansenii* junto con las subunidades alfa y beta que componen a la PFK de diferentes levaduras. Se marcaron los dominios catalíticos y alostéricos, utilizando como referencia los propuestos para la única subunidad de *Y. lipolytica* (Flores CL *et al.*, 2005). Se observó que la subunidad alfa y beta de la PFK de *D. hansenii* conservan estos dominios junto con las demás proteínas de los diferentes ascomicetos (Figura 18) y nos confirmó que los dos genes candidatos de *D. hansenii* codifican para las subunidades de la PFK.

Además, se observó una modificación en el primer dominio de inhibición por ATP de un residuo de arginina (R) por uno de fenilalanina (F) (R204F) en la subunidad beta (DHPFK2 ó trjQ6BSB2) de *D. hansenii*.

Fru6 6-P **ATP(inhibición)**
 ↓ ↓
 ts|Q48874
 ts|Q48882
 ep|P14941
 ep|P14942
 ep|P59440
 ep|O94201
 ep|O94200
 ep|O93215
 ep|O93214

cons

ADP/AMP
 ↓ ↓
 ts|Q48874
 ts|Q48882
 ep|P14941
 ep|P14942
 ep|P59440
 ep|O94201
 ep|O94200
 ep|O93215
 ep|O93214

cons

Fru6 1,6-P/Fru6 2,6-P **ATP(inhibición)**
 ↓ ↓ ↓
 ts|Q48874
 ts|Q48882
 ep|P14941
 ep|P14942
 ep|P59440
 ep|O94201
 ep|O94200
 ep|O93215
 ep|O93214

cons

Fru6 6-P Fru6 1,6-P/Fru6 2,6-P **ATP(inhibición)** **Fru6 1,6-P/Fru6 2,6-P**
 ↓ ↓ ↓ ↓ ↓
 ts|Q48874
 ts|Q48882
 ep|P14941
 ep|P14942
 ep|P59440
 ep|O94201
 ep|O94200
 ep|O93215
 ep|O93214

cons

Fru6 6-P Fru6 1,6-P/Fru6 2,6-P
 ↓ ↓ ↓
 ts|Q48874
 ts|Q48882
 ep|P14941
 ep|P14942
 ep|P59440
 ep|O94201
 ep|O94200
 ep|O93215
 ep|O93214

cons

ATP(inhibición) **ATP(inhibición)** **ATP(inhibición)**
 ↓ ↓ ↓ ↓ ↓
 ts|Q48874
 ts|Q48882
 ep|P14941
 ep|P14942
 ep|P59440
 ep|O94201
 ep|O94200
 ep|O93215
 ep|O93214

cons

Figura 18. Alineamiento múltiple entre las secuencias de aminoácidos de las subunidades alfa y beta que componen a la PFK de diferentes levaduras. Los dominios alostéricos y catalíticos fueron marcados usando como referencia los propuestos para la única subunidad de *Y. lipolytica* (sp|P59680). Subunidad alfa y beta de *D. hansenii* (tr|Q6BH76, tr|Q6BSB2), *S. cerevisiae* (sp|P16861, sp|P16862), *K. lactis* (sp|Q03215, sp|Q03216) y *C. albicans* (sp|O94201, sp|O94200).

Discusión

La fosfofructocinasa cataliza una de las tres reacciones de la glucólisis que operan fuera del equilibrio. Debido a esta propiedad, la reacción que cataliza puede ser un punto de control en el flujo de la vía. La aparente gran variedad de mecanismos involucrados en esta regulación incluyen cambios conformacionales, asociación de subunidades, ionización de la cadena de aminoácidos (Aaronson *et al.*, 1972; Hesterberg *et al.*, 1982; Chaffotte *et al.*, 1984) y modificaciones postraduccionales (Uyeda *et al.*, 1978; Kitajima *et al.*, 1983; Luther *et al.*, 1986). Dependiendo del tipo de célula, la regulación por diferentes moléculas efectoras sobre la actividad catalítica de la PFK puede variar.

Al menos uno de los pasos limitantes de la glucólisis en *D. hansenii* está dado por la actividad de la fosfofructocinasa. Esta aseveración proviene de los valores observados en los intermediarios glucolíticos después de agregar un pulso de glucosa y de que su actividad comparada con las de otras enzimas de la vía, es de las más bajas (Sánchez *et al.*, 2006).

Al igual que en otras levaduras, se encontró que *D. hansenii* posee dos genes que codifican para las subunidades alfa y beta de la PFK. Se observó que estos genes se expresan bajo diferentes condiciones de crecimiento. Dado que la PFK de *S. cerevisiae* y algunas otras levaduras como *K. lactis* tiene una estructura heterooctamérica compuesta de cuatro subunidades alfa y cuatro subunidades beta, es posible que las subunidades de *D. hansenii* se asocien entre ellas y formen un complejo multiproteico.

Las propiedades cinéticas de la PFK de *S. cerevisiae* dependen de una amplia variedad de metabolitos; el ATP actúa como sustrato e inhibidor alostérico, mientras que el AMP y la fructosa-2,6-bisfosfato revierten esta inhibición (Mavis *et al.*, 1970; Hers *et al.*, 1982). Se observó que las características cinéticas encontradas para la PFK de *D. hansenii* fueron atípicas. Se inhibió por citrato y no por Mg^{2+} -ATP, cuyo efecto generó una curva hiperbólica. El comportamiento establecido por el complejo Mg^{2+} -ATP sobre la actividad de la PFK de *D. hansenii* se confirmó comparando las actividades de esta enzima medidas en presencia de ITP 1.9 mM con las concentraciones de Mg^{2+} -ATP en las cuales se obtienen los valores de V_{max} , observándose que la V_{max} de la enzima de *D. hansenii* a

altas concentraciones de Mg^{2+} -ATP fue similar a la que presentó con ITP 1.9 mM, mientras que para *S. cerevisiae* la actividad de la enzima en presencia de ITP 1.9 mM fue similar a la V_{max} que presentó a concentraciones bajas de Mg^{2+} -ATP. Demostrándose así que el ATP no tuvo ninguna función regulatoria en la enzima de *D. hansenii* y que solo actuó como donador de grupos fosfato. Además, los metabolitos fructosa-2,6-bisfosfato y AMP actuaron como moduladores alostéricos positivos de la PFK de *D. hansenii*, ya que al incrementar sus concentraciones estimulan la actividad de la enzima aún en condiciones saturantes de Mg^{2+} -ATP. Por otro lado, la capacidad de *D. hansenii* de sintetizar, acumular y almacenar grandes cantidades de lípidos hace que el citrato pueda convertirse en un fuerte inhibidor de la PFK.

Es importante señalar que la actividad de la PFK de *D. hansenii* presentó valores de V_{max} similares en los extractos obtenidos de los diferentes medios de cultivo al aumentar las concentraciones de Mg^{2+} -ATP. Por otro lado, la K_m mostró una modificación en la afinidad por el sustrato Mg^{2+} -ATP, únicamente en los extractos celulares obtenidos a 1M de NaCl, mientras que en el resto de las condiciones presentó valores parecidos. Este cambio en la afinidad por el sustrato Mg^{2+} -ATP podría estar relacionado con el incremento en la producción de etanol cuando se crece a *D. hansenii* en presencia de sales (Calahorra *et al.*, 2009).

El alineamiento múltiple entre las secuencias de aminoácidos de las subunidades alfa y beta que componen la PFK en diferentes hongos mostró que los dominios alostéricos y catalíticos de las proteínas de *D. hansenii* están conservados. Esto nos confirmó que los dos genes candidatos de *D. hansenii* codifican para las subunidades de la PFK. Una de las posibles maneras de explicar el efecto no inhibitorio del Mg^{2+} -ATP sobre la actividad de la PFK de *D. hansenii* podría deberse a una modificación en el primer dominio de inhibición por ATP de un residuo de arginina (R) por uno de fenilalanina (F) (R204F) en la subunidad beta (DHPFK2 ó **tr|Q6BSB2**). Este cambio podría impedir la entrada del Mg^{2+} -ATP al sitio alostérico y de esta manera bloquear el efecto inhibitorio. Otra idea que proponemos se refiere a la modificación postraduccional de la enzima.

Parece claro que la PFK es una enzima limitante en la glucólisis pero no es posible atribuirle una regulación total de la vía, ya que hay muchos factores involucrados en este fenómeno. Para esto se tendría que estudiar las nueve enzimas restantes, los transportadores involucrados, determinar qué otras enzimas participan en el flujo y buscar otras moléculas que regulan la actividad de la hexocinasa, fosfofructocinasa y piruvato cinasa.

Conclusiones

- *D. hansenii* posee dos genes que codifican para la subunidad alfa y beta de la fosfofructocinasa.
- Ambos genes se expresan en diferentes condiciones de crecimiento.
- La PFK de *D. hansenii* es inhibida por citrato y no por Mg^{2+} -ATP, cuyo efecto genera una curva hiperbólica.
- Los valores de V_{max} permanecieron constantes en los extractos de *D.hansenii* crecida en YPD o YPD suplementado con NaCl. Mientras que la K_m mostró una modificación en la afinidad por el substrato Mg^{2+} -ATP, solamente en los extractos celulares obtenidos a 1M de NaCl.
- El AMP y la fructosa-2,6-bisfosfato actúan como moduladores alostéricos positivos.
- Los dominios catalíticos y alostéricos están altamente conservados en las subunidades alfa y beta de la PFK de *D.hansenii*.

Perspectivas

- Obtener una cepa de *S. cerevisiae* que contenga interrupciones en los dos genes que codifican para la fosfofructocinasa.
- Expresar por separado o simultáneamente los genes de la subunidad alfa y beta de la PFK de *D. hansenii* en la mutante doble de *S. cerevisiae*.
- Medir en estas mutantes la producción de etanol y formación de NADH.
- Establecer si existe una heterooligomerización de las subunidades alfa y beta de la PFK de *D. hansenii*.

Bibliografía

- Aaronson RP, Frieden C. 1972. Rabbit muscle phosphofructokinase: studies on the polymerization. *JBC*. **247**:7502-9.
- Adler L. 1986. Physiological and biochemical characterization of the yeast *Debaryomyces hansenii* in relation to salinity. In Moss ST. The biology of marine fungi. Cambridge University Press, New York.
- Arvanitidis A and Heinisch JJ. 1994. Studies on the function of yeast phosphofructokinase subunits by in vitro mutagenesis. *J Biol Chem*. **269**:8911-8.
- Bär J, Schellenberger W, Kopperschläger G. 1997. Purification and characterization of phosphofructokinase from yeast *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*. **13**:1309-17.
- Blangy D. 1968. Phosphofructokinase from *E. coli*. Evidence for a tetrameric structure of the enzyme. *FEBS Lett*. **2**:109-111.
- Calahorra M, Sánchez NS, Peña A. 2009. Activation of fermentation by salts in *Debaryomyces hansenii*. *Yeast*. **23**:361-374.
- Chaffotte AF, Laurent M, Tijane MN, Tardieu A, Roucoux C, Seydoux F, Yon JM. 1984. Studies on the structure of yeast phosphofructokinase. *Biochimie*. **66**:49-58.
- Cerniglia CE, Crow SA. 1981. Metabolism of aromatic hydrocarbons by yeasts. *Arch Microbiol*. **129**:9-13.
- Fleet GH. 1990. Yeasts in dairy products. *J Appl Bacteriol*. **68**:199-211.
- Gadd GM, Edwards SW. 1986. Heavy-metal-induced flavin production by *Debaryomyces hansenii* and possible connection with iron metabolism. *Trans Br Mycol Soc*. **87**:131-140.
- Heinisch J. 1986. Isolation and characterization of the two structural genes coding for phosphofructokinase in yeast. *Mol Gen Genet*. **202**:75-82.
- Hermann K, Diezel W, Kopperschläger G, Hofmann E. 1973. Immunological evidence for non-identical subunits in yeast phosphofructokinase. *FEBS Lett*. **36**:190-192.

- Hers HG, Van Schaftingen E. 1982. Fructose 2,6-bisphosphate 2 years after its discovery. *Biochem J.* **206**:1-12.
- Hesterberg LK, Lee JC. 1982. Self-association of rabbit muscle phosphofructokinase: effects of ligands. *Biochemistry.* **21**:216-22.
- Hofmann E. 1976. The significance of phosphofructokinase to the regulation of carbohydrate metabolism. *Rev Physiol Biochem Pharm.* **75**:1-68.
- Hofmann E, Kopperschläger G. 1982. Phosphofructokinase from yeast. *Methods in enzymology.* **90**:49-60.
- Hudson F, Hengartner H, Kolb E, Harris JL. 1979. The primary structure of phosphofructokinase from *B. steurothermophilus*. *Proc. 12th FEBS Symp.* **52**:341.
- Karadsheh NS, Uyeda K, Oliver RM. 1977. Studies on structure of human erythrocytes phosphofructokinase. *JBC.* **252**:3515-24.
- Kee A, Griffin CC. 1972. Kinetic studies of rabbit muscle phosphofructokinase. *Arch Biochem Biophys.* **149**:361-368.
- Kemp RG. 1975. Phosphofructokinase from rabbit skeletal muscle. *Methods Enzymol.* **42**:71-77.
- Kitajima S, Sakakibara R, Uyeda K. 1983. Significance of phosphorylation of phosphofructokinase. *JBC.* **258**:13292-8.
- Kreger-van Rij NJ, Veenhuis M. 1975. Electron microscopy of ascus formation in the yeast *Debaryomyces hansenii*. *J Gen Microbiol.* **89**: 256-264.
- Kotlarz D, Bue H. 1981. Regulatory properties of phosphofructokinase from *E. coli*. *Eur J. Biochem.* **117**:569-574.
- Kono N, Uyeda K. 1974. Chicken liver phosphofructokinase. 3. Kinetics and allosteric properties. *JBC.* **249**:1490-6.
- Kopperschläger G, Bär J, Nissler K, Hofman E. 1977. Physicochemical parameters and subunit composition of yeast phosphofructokinase. *Eur J Biochem.* **81**:317-25.

- Kopperschläger G, Usbeck E, Hofman E. 1977. Studies on the oligomeric structure of yeast phosphofructo-kinase by means of cross-linking dimidoesters. *Biochem Biophys Res Commun.* **71**:371-378.
- Larsson C, Morales C, Gustafsson L, Adler L. 1990. Osmo-regulation of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* grown in a chemostat at different salinities. *J Bacteriol.* **172**:1769-1774.
- Luther MA, Lee JC. 1986. The role of phosphorylation in the interaction of the rabbit muscle phosphofructokinase with F-actin. *JBC.* **261**:1753-9
- Lobo Z, Maitra PK. 1982. Aparticulate phosphofructokinase from yeast. *FEBS.* **137**:279-282.
- Lobo Z, Maitra PK. 1982. Genetic evidence for distinct catalytic and regulatory subunits in yeast phosphofructokinase. *FEBS lett.* **139**:93-6.
- Mahler HR, Cordes EH. 1961. Biological Chemistry. USA. Harper & Row.
- Mansour TE, Wakid N, Sprouse HM. 1966. Studies on heart phosphofructokinase. Purification, crystallization and properties of sheep heart phosphofructokinase. *JBC.* **241**:1512-21.
- Mavis RD, Stellwagen E. 1970. The role of cations in yeast phosphofructokinase catalysis. *J Biol Chem.* **245**: 674-80.
- Nelson DL, Cox MM. 2005. Principles of biochemistry. USA. Fourth edition. Freeman.
- Nissler K, Kessler W, Schellenberger W, Hofmann E. 1977. Binding of fructose-6-phosphate to phosphofructokinase from yeast. *Biochem Biophys Res Commun.* **79**:973-978.
- Ohama T, Susuki T, Mori M, Osawa S, Ueda t, Watanabe K, Nakase T. 1993. Non-universal decoding of the leucine codon CUG in several *Candida* species. *Nucleic Acids Res.* **21**:4039-4045.
- Paricharttanakul NM, Ye S, Meneffe AL, Javid-Majd F, Sacchettini JC, Reinhart GD. 2005. Kinetic and structural characterization of phosphofructokinase from *Loctobucillus bulgaricus*. *Biochemistry.* **44**:15280-6.

- Prista C, Almagro A, Loureiro-Dias MC, Ramos J. 1997. Physiological basis for the high tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Appl Environ Microbiol.* **63**:4005-9.
- Petersen KM, Jespersen L. 2004. Genetic diversity of the species *Debaryomyces hansenii* and the use of chromosome polymorphism for typing of strains isolated from surface ripened cheeses. *J Appl Microbiol* **97**: 205-213.
- Rankine BC. 1964. Hydrogen sulphide production by yeast. *J Sci Food Agric.* **15**:872-877.
- Ratledge C. 2002. Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Biochem Soc Trans* **30**:1047-1050.
- Reuter R, Eschrich K, Schellenberger W, Hofmann E. 1979. Kinetic modelling of yeast phosphofructokinase. *Acta Biol Med Ger.* **38**:1067-79.
- Rodicio R, Strauß A, Heinisch JJ. 2000. Single point mutation in either gene encoding the subunits of the heterooctameric yeast phosphofructokinase abolishes allosteric inhibition by ATP. *JBC.* **275**:40952-60.
- Sánchez NS, Calahorra M, Gonzáles Hernández JC, Peña A. 2006 .Glycolytic sequence and respiration of *Debaryomyces hansenii* as compared to *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **23**:361-374.
- Segel I. 1976. Biochemical calculations. USA. Second edition. Wiley.
- Tamaki N, Hess B. 1975. Purification and properties of phosphofructokinase (E.C. 2.7.1.11) of *Saccharomyces carlbergensis*. *Hoppe Seyler's Z. Physiol Chem.* **356**:399-415.
- Tijane MN, Chaffotte AF, Seydoux FJ, Roucouc, Laurent M. 1980. Sulfhydryl groups of yeast phosphofructokinase-specific localization on beta subunits of fructose 6-phosphate binding sites as demonstrated by a differential chemical labeling study. *JBC.* **255**:10188-93.
- Tijane MN, Chaffotte AF, Yon JM, Laurent M. 1982. Separation and chemical differentiation of alpha and beta subunits in yeast phosphofructokinase. *FEBS lett.* **148**: 267-70.

- Trujillo JL, Deal WC. 1977. Pig liver phosphofructokinase: asymmetry properties, proof and rapid association-dissociation equilibria, and effect of temperature and concentration on the equilibria. *Biochemistry*. **16**:3098-104.
- Uyeda K, Miyatake A, Luby LJ, Richards EG. 1978. Isolation and characterization of muscle phosphofructokinase with varying degrees of phosphorylation. *JBC*. **253**:8319-27.
- Mahler HR, Cordes EH. 1961. *Biological Chemistry*. USA. Harper & Row.
- Voet D, Voet JG, Pratt CW. 2006. *Fundamentals of Biochemistry*. USA. Second edition. Wiley.

Sitios web

1. <http://www.genolevures.org/>
2. <http://www.expasy.ch/>
3. http://www.igs.cnrs-mrs.fr/Tcoffee/tcoffee_cgi/index.cgi