



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EN *Saccharomyces cerevisiae*, LAS ENZIMAS DE LA GLUCÓLISIS SON ESTABILIZADAS AL ASOCIARSE CON ACTINA FILAMENTOSA.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

DANIELA ARAIZA OLIVERA TORO

TUTOR PRINCIPAL

DR. SALVADOR URIBE CARVAJAL

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

COMITÉ TUTOR

DR. ANTONIO PEÑA DÍAZ

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

DR. JOSÉ DE JESÚS GARCÍA TREJO

INSTITUTO DE QUÍMICA

MÉXICO, D. F. MARZO, 2014



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.

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis se realizó bajo la asesoría del Dr. Salvador Uribe Carvajal en el laboratorio 305-ote, Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

El jurado del examen estuvo constituido por:

Presidente: Dra. Victoria Chagoya De Sánchez, Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Secretario: Dr. Ismael Bustos Jaimes, Facultad de Medicina, UNAM

Vocal: Dr. Abraham Landa Piedra, Facultad de Medicina, UNAM

Vocal: Dr. Eleazar Martínez Barajas, Facultad de Química, UNAM

Vocal: Dr. Rolando Hernández Muñoz, Instituto de Fisiología Celular, UNAM

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de este trabajo estuvo formado por:

Dr. Salvador Uribe Carvajal, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Dr. Antonio Peña Díaz, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Dr. José de Jesús García Trejo, Instituto de Química, UNAM.

El comité tutorial ampliado estuvo integrado por:

Dra. Xochitl Pérez Martínez, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Dr. Abraham Landa Piedra, Facultad de Medicina, UNAM.

El jurado del examen de candidatura estuvo integrado por:

Dr. Antonio Peña Díaz, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Dr. Diego González Halphen, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco, Facultad de Medicina, UNAM.

Dra. Georgina Garza-Ramos Martínez, Facultad de Medicina, UNAM.

Dr. José Pedraza Chaverri, Facultad de Química, UNAM.

Dra. Bertha González Pedrajo, Instituto de Fisiología Celular, UNAM,

Se reconoce la colaboración, asesoría y asistencia de la Dra. Natalia Chiquete Félix del laboratorio 305-ote, Instituto de Fisiología Celular.

Se reconoce el apoyo de Ramón Méndez Franco, Auxiliar de laboratorio, Instituto de Fisiología Celular UNAM; María del Rocío Romualdo Martínez, Asistente ejecutivo, Instituto de Fisiología Celular, UNAM; Leticia García Gutiérrez, Asistente de procesos, Programa en Ciencias Bioquímicas, UNAM; Adelina González Pérez, Asistente de procesos, Programa en Ciencias Bioquímicas, UNAM; Sara Noguera Solano, Secretario ejecutivo, Coordinación de enseñanza, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

El sustentante gozó de una beca para realizar los estudios de doctorado otorgado por el CONACyT (207427) y una beca de la DGAPA-UNAM para la realización de la tesis.

El proyecto fue financiado por el CONACyT (79989) y por la DGAPA-UNAM (IN202612).

## Abreviaturas

<b>Abreviación</b>	<b>Significado</b>
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ALD	Aldolasa
ATH	Trehalasa ácida
CD	Citocalasina D
ENO	Enolasa
EtOH	Etanol
F-actina	Actina filamentosa
G-actina	Actina globular
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GPI	Glucosa fosfato isomerasa
HXK	Hexocinasa
LDH	Lactato deshidrogenasa
NTH	Trehalasa neutra
P	Faloidina
PFK	Fosfofructo cinasa
PGAM	Fosfoglicerato mutasa
PGK	Fosfoglicerato cinasa
PK	Piruvato cinasa
SLO	Estreptolisina O
STRE	Elemento de respuesta al estrés
TPI	Triosa fosfato isomerasa
TPS	Trehalosa 6-P sintetasa/fosfatasa
VDAC	Canal aniónico dependiente de voltaje

## CONTENIDO

1.	Resumen	9
2.	Abstract	10
3.	Introducción	11
3.1	Saturación celular	11
3.1.1	Asociación enzimática	11
3.1.2	Metabolones: Complejos enzimáticos que canalizan sustratos	13
3.2	El citoesqueleto: Una red dinámica	16
3.3	El metabolón utiliza al citoesqueleto como andamio	19
3.4	Los solutos compatibles protegen las estructuras celulares durante el estrés	22
3.4.1	Generalidades de los solutos compatibles	23
3.4.1.1	Trehalosa	24
3.4.2	Posibles mecanismos de estabilización	25
3.4.3	Efecto de los solutos compatibles sobre la actividad de enzimas	26
3.4.3.1	Protección por solutos compatibles	27
3.4.3.2	Inhibición de enzimas aisladas	28
3.4.4	Síntesis y degradación de solutos compatibles	32
3.5	La asociación enzimática resulta en la protección contra la inhibición	36
4.	Hipótesis	39
5.	Objetivos	39
5.1	General	39
5.2	Particulares	39

6.	Metodología	40
6.1	Materiales	40
6.2	Anticuerpos	40
6.3	Células y extractos citoplásmicos de levadura	41
6.4	Purificación de actina de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por medio de cromatografía de afinidad	43
6.5	Aislamiento de proteínas asociadas a aldolasa (ALD) y DNasa I por cromatografía de afinidad	44
6.6	Inmunoprecipitación	45
6.7	Electroforesis y Western Blot	46
6.8	Tinción con plata	46
6.9	Densitometría	47
6.10	Actividad de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)	47
6.11	Actividad de ALD	47
6.12	Actividad de fosfoglicerato cinasa (PGK)	48
6.13	Producción de etanol (EtOH) a partir de glucosa	48
6.14	Análisis cinético de la fermentación	49
7.	Resultados	51
7.1	En extractos citoplásmicos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , las enzimas de la glucólisis se asocian entre ellas y con actina	51
7.2	La forma polimérica de actina (F-actina) pero no el monómero, se une a las enzimas glucolíticas	55
7.3	La asociación enzimática se intensifica por la F-actina	57
7.4	La F-actina aumenta el efecto protector de la PGK y ALD contra la inhibición mediada por trehalosa de la GAPDH	60



7.5	La F-actina protege a la vía glucolítica completa contra la inhibición mediada por trehalosa	63
7.6	En complejo con F-actina, las enzimas son protegidas contra la inhibición de sus anticuerpos	76
8.	Discusión	81
8.1	Las enzimas de una vía pueden anclarse al citoesqueleto	81
8.2	La asociación enzima/actina protege y estabiliza la vía glucolítica	84
9.	Conclusiones	89
10.	Bibliografía	90
11.	Anexo	100
11.1	Reacciones enzimáticas	100
11.1.1	Reacción catalizada por la GAPDH	100
11.1.2	Reacción catalizada por la ALD	100
11.1.3	Reacción catalizada por la PGK	100

## 1. RESUMEN

En *Saccharomyces cerevisiae* la vía glucolítica consta de once enzimas que catalizan la conversión de glucosa en 2 moléculas de etanol y 2 de CO<sub>2</sub>. En el citoplasma, esta vía sería poco eficiente si dependiera de la difusión de enzimas y sustratos [1]. Se propone la existencia de un complejo glucolítico multienzimático [2]. Dicho complejo utiliza al citoesqueleto para estabilizar la interacción de diferentes enzimas [3]. En este trabajo analizamos el papel estabilizador de la actina filamentosa (F-actina) sobre un posible metabolón glucolítico [4]. Los ensayos se llevaron a cabo en mezclas de enzimas aisladas con actina, extractos citoplásmicos y células permeabilizadas de levadura. La polimerización de actina se promovió con faloidina o se inhibió con citocalasina D o latrunculina. Observamos que el estado polimérico o filamentoso de la actina pero no el monomérico o globular, estabiliza tanto la interacción de la mezcla de enzimas glucolíticas aisladas como la glucólisis completa, dando lugar a un incremento importante en la actividad fermentativa. Al parecer la asociación de las enzimas glucolíticas y la actina genera complejos resistentes, ya sea a la inhibición dada por la viscosidad promovida por trehalosa o a la inactivación por anticuerpos específicos contra enzimas. Esto nos lleva a proponer que el metabolón glucolítico de *S. cerevisiae* se ensambla y asocia junto con la F-actina. En este complejo se optimiza la fermentación y las enzimas se protegen parcialmente contra la inhibición dada por la viscosidad o por anticuerpos.

## 2. ABSTRACT

In the *Saccharomyces cerevisiae* glycolytic pathway, eleven enzymes catalyze the stepwise conversion of glucose to 2 molecules of ethanol plus 2 of CO<sub>2</sub>. In the highly crowded cytoplasm, this pathway would be very inefficient if it were dependent on substrate/enzyme diffusion. Therefore, the existence of a multienzymatic complex where glucose is processed has been suggested, i.e. there is a highly efficient, functional glycolytic metabolon. However, the interaction of isolated enzymes in mixture is too weak to detect the complexes. A cytoskeleton scaffold has been proposed to stabilize this complex. Here, the role of filamentous actin (F-actin) in the stabilization of a glycolytic metabolon is reported. Experiments were performed in isolated-enzyme mixtures, in cytoplasmic extracts and in permeabilized yeast cells. Polymerization of actin was promoted with phalloidin or inhibited with cytochalasin D or latrunculin. F-actin, but not the monomeric G-actin, stabilized the interaction of both isolated glycolytic-pathway enzyme mixtures and of the whole fermentation pathway, leading to higher activity. Furthermore, in presence of F-actin, fermentation was resistant to inhibition, either by the viscosity promoted by the disaccharide trehalose or by covalent inactivation due to specific antibodies. In *S. cerevisiae* the glycolytic-pathway enzymes seem to form an F-actin-stabilized complex where fermentation is enhanced and enzymes are protected against inhibition.

### **3. INTRODUCCIÓN**

#### **3.1 Saturación celular**

El citoplasma no debería ser considerado como un compartimento líquido que contiene enzimas y partículas. Por el contrario, se ha demostrado un alto grado de organización donde diferentes estructuras lipídicas y proteicas se asocian entre ellas y con otras moléculas. La saturación citoplásmica mediada por proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos y pequeños solutos [1, 5] promueve la interacción proteína-proteína, proteína-membrana, proteína-ácidos nucleicos, proteína-polisacáridos [5, 6], que permite el control de distintos procesos biológicos [7]. Los estudios clásicos descritos por Green [8], Clegg [9] y Fulton [10] han sugerido que las enzimas no se encuentran dispersas en el citoplasma. Se propone que las enzimas se localizan en sitios específicos donde se asocian entre sí y con el citoesqueleto, siendo éste una red trabecular de proteínas fibrosas que microcompartimentaliza el citoplasma [11].

##### **3.1.1 Asociación enzimática**

Se ha encontrado evidencia tanto física como química de la asociación entre las enzimas consecutivas de la vía glucolítica. Dicha interacción proteína-proteína se da a concentraciones proteicas relativamente elevadas presentes en el citosol [2, 12]. El acoplamiento entre dos enzimas se ha estudiado cinéticamente tanto en la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) con la aldolasa (ALD) [13], así como en la GAPDH con la fosfoglicerato cinasa (PGK) [14], dando lugar a complejos que optimizan el funcionamiento de esas enzimas. El significado fisiológico de estos datos ha sido cuestionado, ya que se observó que la tasa de

formación de 3-fosfoglicerato por medio de la PGK no se afectaba ni por el exceso de NADH ni por la GAPDH [15]. Por otro lado, se demostró que la disociación del 1,3-bisfosfoglicerato (1,3-bPG) de la PGK es una reacción intrínseca igualmente rápida que la del complejo formado por la PGK y la GAPDH [16]. Esto se tomó como evidencia de que la transferencia directa de metabolitos entre enzimas no había sido demostrada de manera convincente, por lo menos en las enzimas de la glucólisis hasta el momento [15].

Muchos grupos han tratado de demostrar por medio de métodos fisicoquímicos la existencia de asociación entre la PGK y la GAPDH [17-20]. Los estudios cinéticos han mostrado el acoplamiento entre PGK y GAPDH libres mediante cambios cinéticos de la reacción acoplada catalizada por el complejo bienzimático, lo que sugiere canalización del 1,3-bPG que va del sitio catalítico de la PGK a la GAPDH [21]. Por otro lado, se demostró que la catálisis se lleva a cabo cuando una subunidad del tetrámero de GAPDH exhibe su sitio activo y se acopla a la PGK por medio de un mecanismo de flip-flop [22]. Lo que sucede es que el sustrato se une a una de las subunidades del dímero funcional acelerando la catálisis de la siguiente subunidad [17]. Esto indica que la cooperatividad entre las subunidades es parte integral de la catálisis de la GAPDH al unirse a la PGK, lo que constituye un mecanismo de regulación en el funcionamiento enzimático [17]. Por medio del estudio de masas moleculares, se ha visto la interacción entre PGK y GAPDH en presencia y ausencia de cada una de ellas [18]. Cuando la PGK (monómero de 48 kDa) y la GAPDH (homotetrámero de 145 kDa) están juntas en una solución 1:1 de cada una de las enzimas, se puede observar por filtración en

gel y en una columna de Sephadex G-150, una proteína de 82 kDa formada por el monómero de PGK y una subunidad de la GAPDH [18]. Esta unión también se pudo comprobar por medio de microscopía electrónica, en la que el complejo PGK-GAPDH se formaba dependiendo del estado funcional de ambas enzimas [20].

### **3.1.2 Metabolones: Complejos enzimáticos que canalizan sustratos**

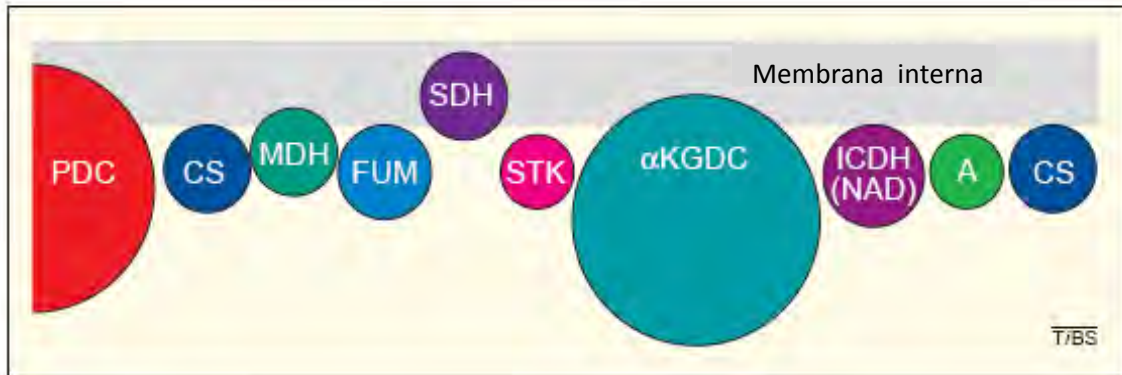
Una vez asociadas, las proteínas de una vía específica pueden catalizar una serie de reacciones consecutivas, dando lugar así a complejos multienzimáticos conocidos como metabolones [8, 23]. En los metabolones, los intermediarios son canalizados; es decir, las enzimas catalizan reacciones consecutivas en donde los intermediarios se transfieren directamente al sitio activo de la siguiente enzima sin difundir al medio [1, 2, 24-26] hasta obtener el producto final [27, 28]. Se sugirió que este comportamiento catalítico es único de los complejos enzimáticos debido a la organización estructural [1]. La canalización requiere de interacciones estables de los complejos multienzimáticos [1, 2, 7, 26, 27, 29]. La estabilidad de los metabolones se facilita por la compartimentalización de la célula en diferentes organelos y estructuras [30].

La asociación enzimática modifica la estructura, función y propiedades regulatorias [1]. Es así que existen una serie de ventajas inherentes a los metabolones [30] como: 1) Incremento la eficiencia catalítica. Esto se debe a la canalización de un sustrato desde el sitio activo de una enzima directamente al sitio activo de la siguiente. Se define como cooperatividad de sitios activos contiguos y abate el tiempo en el que el intermediario va de un sitio a otro [30].

2) Optimización de las constantes cinéticas por la canalización, ya que no hay dilución de los intermediarios en la fase acuosa. 3) Los intermediarios lábiles o tóxicos son descartados de los metabolones [31]. 4) Los inhibidores son excluidos del sitio activo de las enzimas. 5) La coordinación y el control de las enzimas en una vía metabólica aumenta. 6) Finalmente, los metabolones alternativos favorecen diferentes vías. Al parecer muchos metabolones son transitorios, brindando la posibilidad del cambio rápido de algunos elementos, permitiendo con esto que el metabolismo sea redirigido [30].

La naturaleza dinámica de la interacción enzima-enzima [32] probablemente regula el flujo de las reacciones y la canalización de sustratos a través de una vía específica [1, 2, 7]. Diferentes grupos han descrito dichos metabolones en el complejo de cisteína sintasa, el ciclo de Calvin, la vía fenilpropanoide de plantas [30], el ciclo de la urea en hepatocitos de rata [33], el ciclo de citrato en hígado de porcino [34] y en las glucólisis de músculo esquelético de conejo y de fibroblastos de ratón [35, 36]. En fibroblastos de ratón y en plantas [36, 37], se ha observado que la asociación de una enzima con otras enzimas específicas da lugar a una canalización que en ocasiones es muy lábil [38]. Algunos organismos como los tripanosomas, muestran enzimas glucolíticas contenidas en pequeños organelos conocidos como glucosomas, donde la canalización es altamente eficiente [39]. Las células tumorales también producen agregados que contienen enzimas glucolíticas [40]. La interacción entre organelos como el retículo endoplásmico y la mitocondria también se han descrito [41-43]. Esta asociación/disociación se ha observado también en ribosomas de reticulocitos de conejo [44], así como en el

canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) de neuronas de ratón [45]. En la membrana mitocondrial de hígado de rata se observó la unión de complejos enzimáticos del ciclo de Krebs (Fig. 1), siendo éste el primer metabolón descrito [2].



**Figura 1. Representación esquemática de la interacción de las enzimas del ciclo de Krebs (TCA) entre ellas y con la membrana interna mitocondrial.** Abreviaturas: A, aconitasa; CS, citrato sintasa; FUM, fumarasa; ICDH (NAD), isocitrato deshidrogenasa;  $\alpha$ KGDC, complejo  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa; MDH, malato deshidrogenasa; PDC, complejo piruvato deshidrogenasa; SDH, succinato deshidrogenasa; STK, succinato tiocinasa, modificado de Srere [46].

Las interacciones específicas entre las enzimas de las vías metabólicas resultan en la modificación de sus propiedades cinéticas [47] y en la relación entre productos y sustratos, por lo que se sugiere que las enzimas se encuentran formando complejos entre ellas o unidas a otras estructuras celulares [7, 48]. Una serie de estudios indican que las enzimas glucolíticas se encuentran ancladas a estructuras específicas y esta microcompartimentalización puede resultar en enriquecimiento de metabolitos [49]. Por ejemplo, el adenosín trifosfato (ATP) requerido para la contracción del músculo esquelético puede producirse de



manera más eficiente cuando las enzimas glucolíticas se anclan al sarcómero [48]. En la fosforilación oxidativa, los complejos multienzimáticos parecen estar asociados en supercomplejos y eventualmente dan como resultado cadenas respiratorias que controlan la canalización de electrones y el bombeo de protones [50]. Se ha propuesto que estos supercomplejos constituyen un mecanismo importante para la producción de ATP [50-52]. La mitocondria es al mismo tiempo fuente de energía e inductor de la muerte de la célula. Las funciones de la mitocondria están reguladas por la interacción con otros organelos y con proteínas citoplásmicas [53]. Proteínas del citoesqueleto como la actina y la tubulina, dirigen a la mitocondria hacia sitios específicos dentro de la célula [54] y controlan el acoplamiento de la fosforilación al interactuar con la porina mitocondrial [55-58]. Además de las proteínas del citoesqueleto, las enzimas glucolíticas como la hexocinasa (HXK) se unen a la mitocondria en los mamíferos [59], levadura y plantas [60], regulando la producción de energía de la mitocondria, así como la inducción de la muerte celular programada [59, 61, 62]. Todos los datos anteriores sugieren que la célula está muy organizada [12] y que el citoesqueleto juega un papel importante [3, 47, 63].

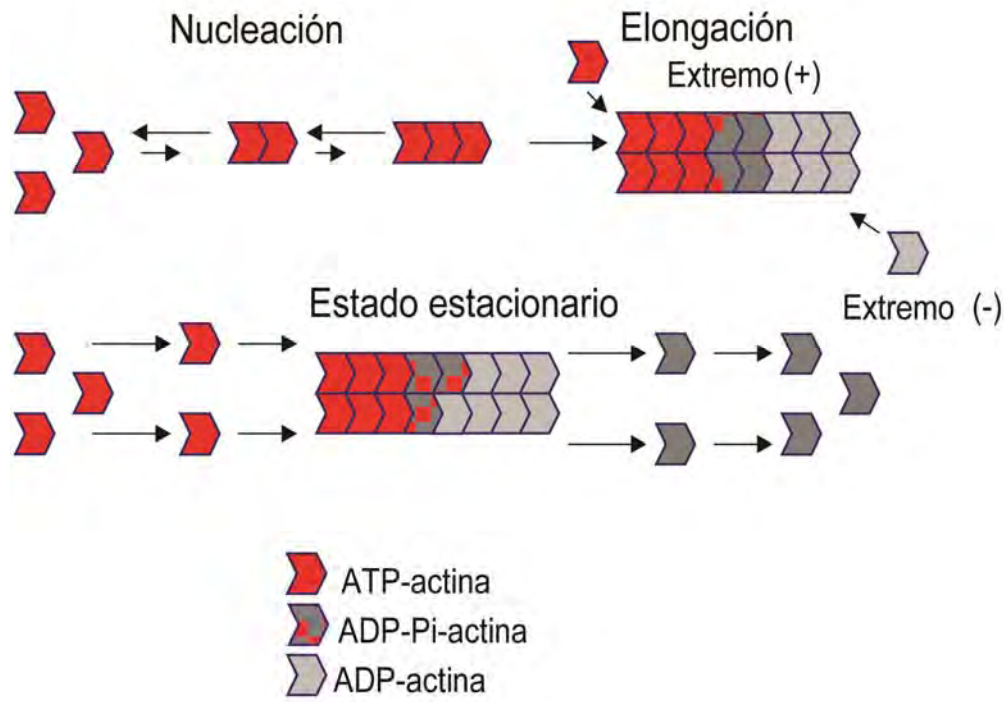
### **3.2 El citoesqueleto: Una red dinámica**

La morfología en la célula eucarionte es generada por una red fibrosa de proteínas citoplásmicas conocida como citoesqueleto que comprende microtúbulos (tubulina), microfilamentos (actina) y filamentos intermedios (queratina, vimentina, laminina, etc.) [64]. Estas fibras son muy dinámicas, encontrándose ya sea en un

estado globular/monomérico (G), o uno filamentoso/polimérico (F) [65, 66]. El citoesqueleto sufre un remodelamiento constante dependiendo de: 1) Los diversos procesos celulares como la morfogénesis, citocinesis [67], endocitosis [68], tráfico vesicular [69], polarización, motilidad, adhesión [70] o el ciclo celular [71], y 2) las necesidades de la célula.

Uno de los componentes principales del citoesqueleto es la actina que es una proteína altamente conservada en las células eucariontes. Tal y como mencionamos anteriormente es una proteína dinámica que puede interconvertirse mediante procesos bien controlados en monómero (G-actina) o como filamento/polímero (F-actina). Los monómeros polares de actina se polimerizan cabeza-cola para dar lugar a filamentos polares. Los filamentos de actina están constituidos por una doble hélice de monómeros ensamblados de 8 nm de diámetro con un extremo (+) y otro (-). La polimerización espontánea de los monómeros de actina ocurre en tres pasos: nucleación, elongación y mantenimiento. La nucleación es un proceso muy lento que consiste en la formación de un dímero seguida de la adición de un tercer monómero dando lugar a un trímero. La adición consecutiva de monómeros se convierte en una reacción termodinámicamente favorable por lo que la elongación se vuelve eficaz, mucho más rápida en el extremo (+) que en el (-). Durante la fase de mantenimiento no hay crecimiento neto del filamento y la concentración de ATP-G-actina se mantiene estacionaria. Después de la incorporación al filamento, se hidroliza el ATP unido a G-actina. El ADP y Pi permanecen unidos de forma no covalente a la actina y posteriormente el Pi se libera lentamente. En consecuencia los filamentos

elongados contienen: un extremo (+) rico en ATP-actina, un centro que contiene ADP-Pi-actina y el extremo (-) formado por ADP actina [72] (Fig. 2).



**Figura 2. Polimerización de actina.** Durante la nucleación los monómeros de actina se agregan para formar un trímero. Posteriormente en la elongación, los filamentos de actina crecen activamente en ambos extremos. El crecimiento se detiene en la fase de mantenimiento, también conocida como fase estacionaria. (Modificado de Kustermans y cols. [72] )

Muchas proteínas unidas a actina regulan su polimerización. La profilina es una proteína de unión de los monómeros de actina y el complejo Arp 2/3 son proteínas de la nucleación; CapZ y gelsolina regulan la longitud del filamento de actina y la familia cofilina/ADP cortan la F-actina y aceleran la despolimerización [72]. Sin embargo, las funciones de las proteínas pueden variar; en *Dictyostelium*, CapZ previene la elongación del filamento e incrementa la concentración de actina

despolimerizada; en contraste, en la levadura, la misma proteína previene la despolimerización y aumenta la concentración de F-actina [73]. El citoesqueleto puede ser remodelado rápidamente por pequeñas RhoGTPasas (Rho, Rac y Cdc42), que actúan en respuesta a estímulos extracelulares [72]. Existen compuestos naturales exógenos que pueden modificar la dinámica de la actina [72].

La actina además de estar relacionada con una serie de funciones celulares que incluyen contractilidad, citocinesis, mantenimiento de la estructura celular, movilidad celular y localización de organelos; probablemente también promueva la compartimentalización de la vía glucolítica. Se ha observado que las enzimas glucolíticas junto con la actina colocalizan dentro de las células musculares [74].

### **3.3 El metabolón utiliza al citoesqueleto como andamio**

El citoplasma de las células eucariontes está sostenido por el citoesqueleto, que es una red de proteínas estructurales que da forma a la célula y que cuenta con sitios específicos para la unión de diferentes enzimas. Estos sitios han sido identificados en la actina filamentosa (F-actina) [74-76], microtúbulos [77-79] y en el dominio citoplásmico de la banda 3 del eritrocito, que es además un intercambiador aniónico [80]. La unión de las enzimas glucolíticas con actina ha sido sugerida por simulaciones [74], mientras que la unión con microtúbulos [77-79] y la banda 3 del eritrocito han sido analizadas por ensayos *in-vitro* donde se observa inhibición de la actividad de las enzimas [80]. Es probable que la asociación de las enzimas con cualquier elemento del citoesqueleto estabilice los metabolones.

En cuanto a las membranas de eritrocitos, se ha observado que la interacción GAPDH, ALD y fosfofructo cinasa (PFK) con la banda 3 por medio de una secuencia ácida en el extremo amino terminal es de gran afinidad [81]. Bajo condiciones fisiológicas, la unión de las enzimas glucolíticas a la banda 3, da como resultado la inhibición del flujo glucolítico [80].

La asociación de las enzimas glucolíticas con los microtúbulos regula el metabolismo energético [47, 48, 78] a nivel de algunas enzimas como la piruvato cinasa (PK), PFK [82] y la enolasa (ENO) [48]. La interacción de las enzimas entre sí y con el citoesqueleto, confiere mayor estabilidad a la actividad enzimática y a toda la vía [47, 78, 79]. Ese es el caso de la PFK y la ALD, donde la inactivación mediada por la dilución de la PFK se detiene cuando se agrega ALD. Si la PFK está asociada con microtúbulos, aún pierde su actividad al diluirse, sin embargo, en estas condiciones recupera la actividad perdida al añadir ALD [77, 83].

En la levadura, se ha descrito la asociación del citoesqueleto con algunas enzimas de la glucólisis [74, 84]. Se ha observado también que diferentes elementos del citoesqueleto del eritrocito o fibroblastos de mamíferos se asocian con las enzimas de la glucólisis [8, 27, 36, 85, 86]. La asociación del citoesqueleto con diferentes proteínas es muy dinámica, respondiendo a los estímulos y condiciones metabólicas [65, 66].

La asociación citoesqueleto/enzimas puede modificar la cinética [33-36]. Se ha observado que la F-actina estimula a la ALD [87], PFK [88] y la fosforilasa cinasa [39] de músculo de conejo. En el caso de la GAPDH la F-actina, pero no

la G-actina, tiene efecto sobre la actividad [89, 90]. Muchas de las enzimas de la glucólisis se unen a actina tanto *in vivo* como *in vitro* [75, 91, 92].

En extractos de tejido muscular en suspensión con sacarosa, proteínas como la F-actina, miosina, troponina y tropomiosina se asocian con enzimas glucolíticas [93]. La interacción enzima/actina se encuentra regulada por fuerza iónica [74]. La asociación de las enzimas glucolíticas con actina ha sido objeto de controversia, sin embargo, la interacción se ha modelado matemáticamente tomando en cuenta la fuerza iónica y la concentración proteica. Los resultados sugieren que bajo condiciones fisiológicas, sólo un pequeño porcentaje de triosa fosfato isomerasa (TPI), GAPDH, PGK y lactato deshidrogenasa (LDH) se asocian con la F-actina [93]. En cuanto a la unión de enzimas glucolíticas con actina también se ha observado que ALD, GAPDH, PK, glucosa fosfato isomerasa (GPI) y LDH se asocian directamente con el filamento. Sin embargo otras enzimas glucolíticas como la TPI y la fosfoglicerato mutasa (PGAM) se unen indirectamente a través de interacciones con otras enzimas. Dichos complejos enzima-enzima-actina también son conocidos como interacciones de "piggy-backing". Algunas de las enzimas que interactúan directamente con actina, como la ALD y GAPDH, compiten por los sitios de unión a ésta [74, 75].

Al parecer la dinámica proteica es importante para las interacciones. Por dinámica Browniana (BD) se ha sugerido que la F-actina de músculo de conejo presenta una afinidad diferente por la ALD [94, 95] y la GAPDH [96]. Se demostró que la actina de músculo esquelético de conejo se une fuertemente a ALD y GAPDH [89, 97] pero débilmente con otras enzimas [98]. Algunos metabolitos

como el ATP y el ADP modulan la interacción de las enzimas, dando como resultado la canalización de sustratos [95].

Un efecto poco explorado de la asociación de enzimas con el citoesqueleto es la modulación de la dinámica de polimerización de la actina. Se ha observado que la ALD juega un papel importante sobre este efecto [99, 100]. Un descubrimiento importante es el que factores de crecimiento tales como el PGF y el EGF intensifican la interacción GAPDH/citoesqueleto, incrementando posiblemente la migración de queratinocitos [101]. Al parecer GAPDH participa en los procesos dinámicos del citoesqueleto como la endocitosis, la fusión membranal, el transporte vesicular y el transporte nuclear [102].

Toda esta evidencia apoya la existencia de un metabolón glucolítico unido al citoesqueleto.

### **3.4 Los solutos compatibles protegen las estructuras celulares durante el estrés.**

Los solutos compatibles se definen como moléculas pequeñas que durante el estrés alcanzan altas concentraciones dentro de la célula sin afectar las funciones metabólicas [103]. Principalmente son polioles, carbohidratos, metilaminas, aminoácidos y derivados de éstos. Los solutos compatibles típicamente constan de grupos químicos que interactúan con la superficie de las proteínas. De hecho algunos autores proponen llamarlos como “chaperones químicos o farmacológicos” ya que estabilizan las estructuras nativas [104, 105].

### 3.4.1 Generalidades de los solutos compatibles

Hay células que frecuentemente se ven expuestas a distintas situaciones de estrés como aumento de la temperatura, congelamiento, deshidratación, ayuno, químicos y estrés abiótico tanto oxidativo como osmótico; por tal motivo, emplean diferentes mecanismos para sobrevivir [106-108]. Algunos de estos mecanismos consisten en acumular moléculas orgánicas pequeñas, como derivados de carbohidratos y de aminoácidos que estabilizan la conformación nativa de las proteínas y protegen a la célula [109-111].

Estos compuestos llamados solutos compatibles pueden ser acumulados en altas concentraciones sin afectar el metabolismo o la actividad enzimática. Entre ellos encontramos: 1) aminoácidos como glicina; alanina; prolina; glutamato; N-acetil- $\beta$ -lisina; glicina-betaína, un termoprotector de *B. subtilis* [112]; ectoína, que en los microorganismos halófilos confiere resistencia a estrés salino y de temperatura [113], 2) monosacáridos como la glucosa, 3) disacáridos como la trehalosa que protege a la célula contra daño ambiental (calor, congelación, desecación y anoxia) y limitaciones nutricionales [114, 115] en bacteria, levadura, hongos, plantas e invertebrados; sacarosa, 4) derivados de carbohidratos como el glucosilglicerol y 5) péptidos pequeños que se acumulan en bacterias heterotróficas y fototróficas [111, 116]. Los polioles como el glicerol, que se acumula en levadura bajo condiciones de alta presión osmótica [117] o que previene la inactivación de enzimas termolábiles [111] y el arabinitol, son los solutos compatibles más acumulados en levadura y hongos, mientras que los derivados de carbohidratos como el glucosilglicerol, galactosilglicerol y



manosilglicerol, y los polioles se acumulan más en algas [116]. Todas estas moléculas se acumulan en el citoplasma durante el estrés y se eliminan en cuanto este desaparece [118, 119].

Los solutos compatibles protegen la actividad y estructura de una serie de proteínas aisladas y de membranas, probablemente por una combinación de diversos mecanismos que incluyen tanto la interacción directa de las moléculas de agua con la superficie de la proteína como la interacción preferencial con el soluto [115, 120]. Es así que la alta viscosidad promovida por el soluto compatible, inhibe cambios estructurales en las proteínas [121, 122].

#### **3.4.1.1 Trehalosa**

Entre los solutos compatibles encontramos a la  $\alpha,\alpha$ -trehalosa ( $\alpha$ -D-glucopiranosil- $\alpha$ -D- glucopiranosido), que aparentemente es uno de los mejores estabilizadores y protectores [121]. La trehalosa es un disacárido no reductor formado por dos moléculas de glucosa unidas en el carbono 1 que diferentes organismos sintetizan y acumulan para sobrevivir al estrés ambiental tales como la temperatura extrema, salinidad y deshidratación [110, 123]. Al acumularse, la trehalosa alcanza alrededor del 20% del peso seco de la célula. Sirve como fuente de carbono durante periodos de inanición o bien, como protector a cambios de temperatura, deshidratación o químicos. Se localiza en el citosol, y en las vacuolas en menor grado [124]. La máxima concentración encontrada *in vivo* es ligeramente superior a 0.5 M [106, 125, 126]. Por eso, algunas enzimas que requieren de concentraciones mayores para ser protegidas contra la

desnaturalización, como la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa de la levadura, pueden no ser protegidas *in situ* [106]. En el ámbito biotecnológico, la trehalosa es uno de los mejores estabilizadores proteicos conocido [127, 128].

### **3.4.2 Posibles mecanismos de estabilización**

Timasheff y colaboradores sugieren que los carbohidratos estabilizan la estructura plegada de las proteínas en solución mediante una interacción indirecta, fenómeno conocido como hidratación preferencial de las proteínas [120]. Se postula que en un sistema trifásico que consiste en agua, proteína y cosolvente (un disacárido), el cosolvente estabiliza a la proteína al excluirse del agua circundante que compone la capa de solvatación de la proteína [120, 123]. Como resultado, la proteína está preferentemente hidratada; en este caso, la capa de solvatación y el volumen aparente disminuyen, lo que da lugar a una conformación más estable [120, 121, 123]. Se ha observado que la trehalosa estabiliza a la RNAsa A por el incremento de la tensión superficial dada por el medio, lo que lleva a la hidratación preferencial de la proteína [129]. La interacción de las moléculas del cosolvente con esta proteína y otras como la lisozima, el citocromo c y el  $\alpha$ -quimotripsinógeno, depende de las propiedades fisicoquímicas de la proteína y del cosolvente, por lo que el efecto estabilizador varía [121]. La estabilización depende de un balance entre las interacciones de las proteínas en estado nativo y desnaturalizado junto con las moléculas de cosolvente. Aunque la naturaleza de las proteínas contribuye a la interacción proteína-cosolvente, se ha observado que la trehalosa es un excelente estabilizador ya que forma puentes de hidrogeno por

medio del grupo hidroxilo con las moléculas de agua, además tiene la capacidad para modificar la capa de solvatación de las proteínas [121, 123].

Para tratar de entender el mecanismo de estabilización proteica mediado por un soluto compatible se han estudiado algunas enzimas como la pirofosfatasa de levadura, sometida a inactivación térmica y la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa inactivada por cloruro de guanidina, en el que el soluto compatible promueve el fenómeno de hidratación preferencial, evitando con esto la inactivación de las enzimas [123]. En la fosfoglucosa isomerasa de *S. cerevisina*, la glutamato deshidrogenasa de bovino y la endonucleasa de *E. coli* también se ha observado que el soluto compatible, trehalosa, a concentraciones fisiológicas aumenta la estabilidad de las enzimas ante la inactivación térmica [106].

### **3.4.3 Efecto de los solutos compatibles sobre la actividad de enzimas**

La síntesis de solutos compatibles y su acumulación se desencadena por condiciones extremas, dando como resultado la estabilización de proteínas y aumento de la supervivencia. Las proteínas pueden encontrarse desplegadas, parcialmente plegadas o en su estado nativo [130]. En la ausencia de estrés, las altas concentraciones del soluto compatible inhiben el crecimiento, el metabolismo y la división celular [131]. En *S. cerevisiae*, las mutantes deficientes de trehalasa sometidas a calor o estrés salino acumulan grandes cantidades de trehalosa y sobreviven. Sin embargo, cuando la condición de estrés finaliza, estas mutantes son incapaces de crecer o mantener su actividad metabólica [132]

### 3.4.3.1 Protección por solutos compatibles

Cuando la *S. cerevisiae* se expone a choque térmico, acumula solutos compatibles, lo cual puede deberse ya sea a que la síntesis aumenta o a que la degradación disminuye [108]. Efectos similares se observan cuando la levadura se deshidrata; bajo esta condición, el soluto compatible (trehalosa) puede alcanzar hasta el 35% del peso seco de la célula, lo que es importante para la capacidad de sobrevivir a la desecación [123]. Se puede sugerir que existe una correlación entre la acumulación de solutos compatibles y la termotolerancia.

En *E. coli*, la síntesis del soluto está involucrada en la termotolerancia durante la fase estacionaria [133]. La aclimatación del nemátodo *S. carpocapsae* a ambientes calientes o fríos aumenta la tolerancia al calor (40 °C por 8 h) y al congelamiento (-20 °C por 4 h); el aumento en resistencia correlaciona con el aumento en los niveles de trehalosa [134] y en algunas plantas como la planta de la resurrección *Selaginella lepidophylla* se ha visto una importante acumulación de trehalosa durante la deshidratación [135].

En el laboratorio se evaluó el papel protector sobre la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa aislada de la membrana plasmática de la levadura *Kluyveromyces lactis* [136]. Se observó que la H<sup>+</sup>-ATPasa es protegida durante la liofilización y además evita la termoinactivación hasta 40 °C. En este trabajo analizaron los efectos de la acumulación de solutos compatibles observados en la levadura tanto *in vivo* como en la enzima aislada.

### 3.4.3.2 Inhibición de enzimas aisladas

Bajo condiciones de estrés, los solutos compatibles modifican las propiedades fisicoquímicas del citoplasma. Sin embargo, se ha estudiado poco el efecto de la alta viscosidad generada por las concentraciones molares de solutos compatibles sobre la actividad enzimática. La trehalosa y otros polioles protegen a las proteínas de la desnaturalización térmica por medio de interacciones indirectas [137]. Por lo tanto, el mecanismo de estabilización debe ser resultado de la modificación de las propiedades fisicoquímicas del medio acuoso.

Los grandes cambios conformacionales en las proteínas involucran el desplazamiento físico de moléculas de disolvente asociadas y solutos. La resistencia al movimiento o desplazamiento de las moléculas de disolvente es un proceso de fricción. La teoría de Kramer proporciona las bases matemáticas para entender y analizar reacciones a viscosidad elevada [136]. La aplicación de la teoría de Kramer a las proteínas muestra que los movimientos involucrados en el plegamiento o en la asociación enzima-sustrato deben ser altamente sensibles a la viscosidad [122, 138, 139].

Algunos estudios muestran que la viscosidad citoplásmica en levadura es de 2 Centipoise (cP) a 30°C [140]. Las determinaciones *in vitro* de soluciones 0.6 M de trehalosa indican un equivalente de 1.5 cP a 30°C (Tabla 1). Por lo tanto se puede inferir que al tener una concentración de trehalosa de 0.6 M en el citoplasma de levadura, la viscosidad se encontrará entre 2.5-3.5 cP.

**Tabla 1. Viscosidad de la trehalosa a diferentes concentraciones y temperaturas.**

TREHALOSA (M)	0.2	0.4	0.5	0.6	0.8
TEMP (°C)	VISCOSIDAD (cP)				
20	1.35	1.59	1.81	2.04	2.58
25	1.20	1.37	1.51	1.74	2.20
30	1.08	1.18	1.33	1.50	1.91
35	0.94	1.03	1.18	1.31	1.67
40	0.86	0.94	1.04	1.13	1.49
45	0.75	0.81	0.90	1.04	1.31

Datos modificados de [126].

En la H<sup>+</sup>ATPasa de membrana plasmática de la levadura *Kluyveromyces lactis*, cuya catálisis depende de grandes movimientos conformacionales, se ha demostrado la inhibición de la enzima con diferentes concentraciones de trehalosa [126]. La constante de velocidad para la reacción de la ATPasa es inversamente proporcional a la viscosidad de la solución, a mayor viscosidad menor la velocidad de reacción en la catálisis [126]. Notablemente, cuando la temperatura se eleva la inhibición desaparece, lo que concuerda con el hecho que la viscosidad disminuye cuando la temperatura aumenta (Tabla 1).

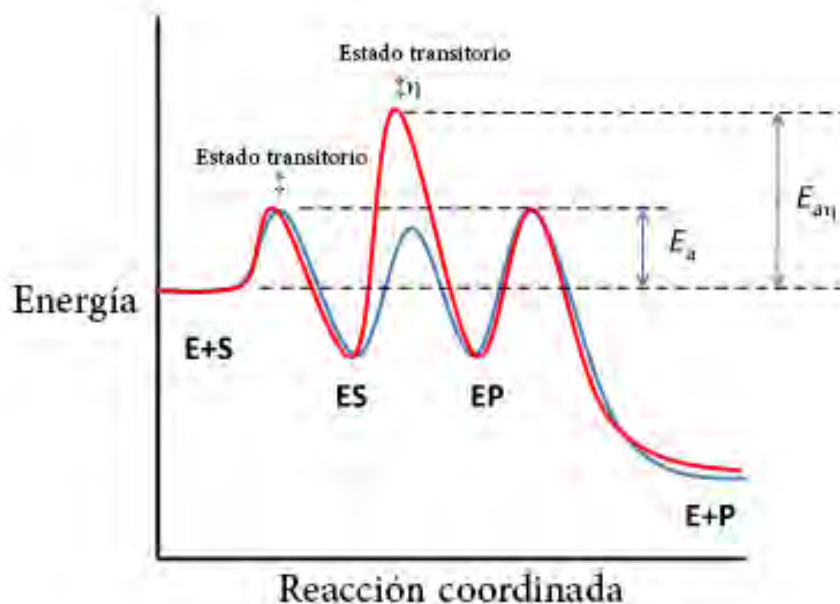
Resultados similares se han obtenido con la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa y la Na<sup>+</sup>-ATPasa en presencia de polietilenglicol (PEG) y glicerol [141]. En la glucosa oxidasa se ha demostrado que el aumento de la concentración de trehalosa inhibe la actividad. Esto probablemente se deba a que se promueve un estado muy

compacto de la proteína, relacionado directamente con el aumento de viscosidad del medio [142].

Muchas enzimas se inhiben por viscosidad. La glutatión reductasa es inhibida por trehalosa (a 25°C, 70% de inhibición con 1.5 M de trehalosa), sin embargo dicha inhibición desaparece a 40°C [143]. La pirofosfatasa y la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa inhibidas por trehalosa también muestran una dependencia por temperatura [143].

La aminoglucosido-nucleotidil-transferasa se inhibe por glicerol dependiendo de la temperatura [144]. La hialuronidasa de *Streptococcus equisimilis* es inhibida tanto por PEG, etilenglicol, glicerol o sacarosa [145]. A altas viscosidades (mayores de 4 cP) diferentes carbohidratos inhiben la lisozima de huevo [146].

Estudios detallados acerca de los componentes estructurales proteicos demuestran que para la  $\beta$ -lactamasa, el cambio conformacional es una limitante de la constante de velocidad. Por lo tanto, la velocidad para la catálisis muestra una gran inhibición por la viscosidad del medio [147]. La H<sup>+</sup>ATPasa de membrana plasmática es una enzima que fluctúa entre dos conformaciones estructurales (E1 $\leftrightarrow$ E2) durante la catálisis. El dominio N (de unión a nucleótidos) rota 73° hacia el sitio de fosforilación para liberar el ATP hacia el sitio [148]. En ambos casos, el paso limitante de velocidad son los cambios conformacionales, que parecen estar inhibidos por la viscosidad (Fig. 3)



**Figura 3. Comparación de una reacción enzimática con viscosidad normal y viscosidad elevada (h).** Cuando un proceso de difusión proteica está presente en el ciclo catalítico, éste se convierte en la limitante de velocidad cuando la viscosidad es elevada. Por lo tanto la energía de activación general ( $E_a$ ) aumenta. Modificado de Kuhlbrandt [148].

Por tanto, contrario al efecto protector, también se ha demostrado, por lo menos *in vitro*, que algunos solutos compatibles como la trehalosa y el glicerol inhiben algunas enzimas [108, 149]. Se ha demostrado que las enzimas que sufren grandes cambios conformacionales durante la actividad catalítica [106], son inhibidas por la viscosidad generada por los solutos compatibles [108, 122, 126]. La consecuencia de la inhibición de diferentes enzimas es el funcionamiento metabólico inadecuado. Además, se ha propuesto que diversas enzimas son



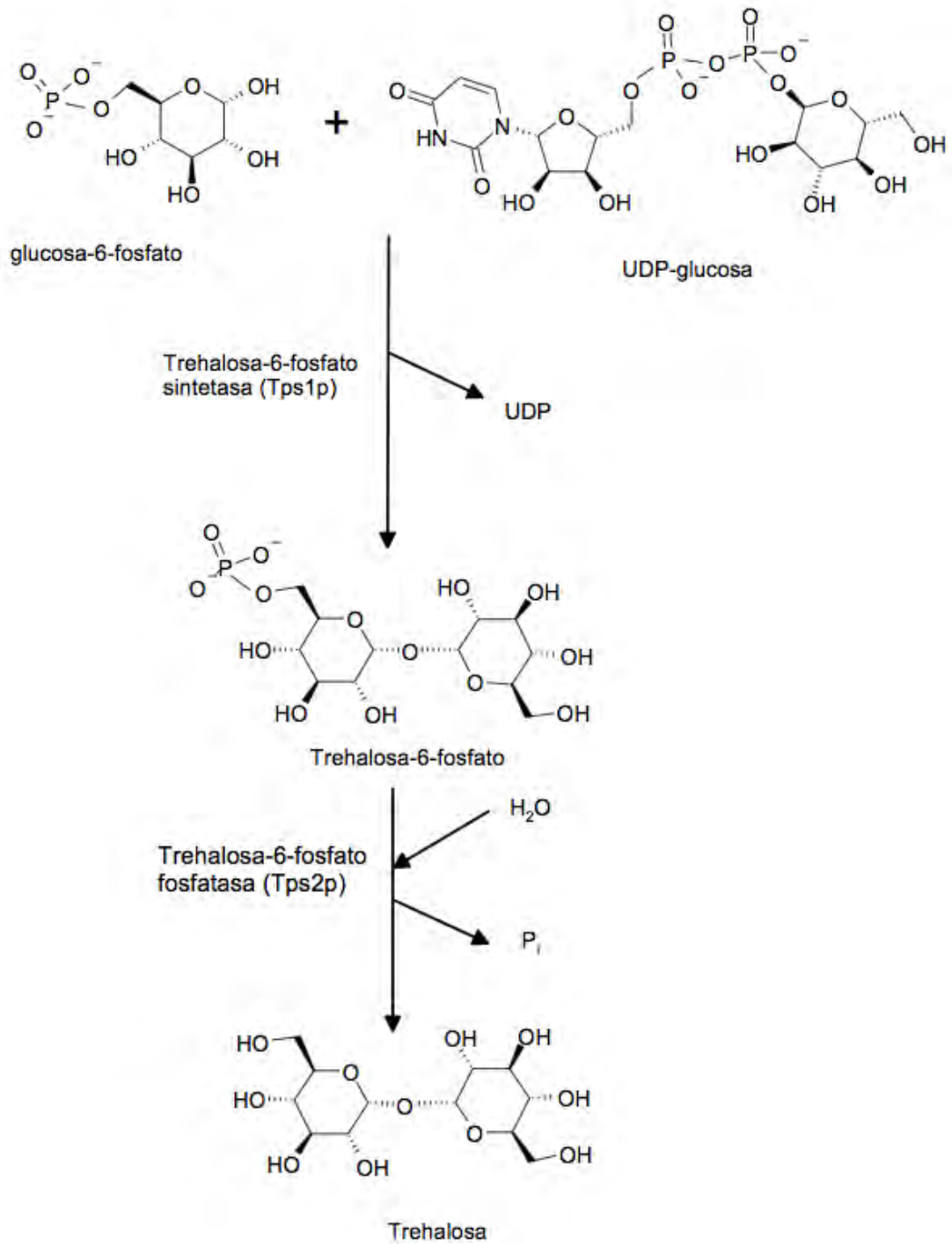
inhibidas al hacerse rígidas, debiéndose a que los solutos compatibles las estabilizan en sus estados más compactos [108, 126, 141].

Todo esto sugiere que una vez pasado el estrés, probablemente la alta viscosidad producida por la trehalosa obliga a la célula a eliminar rápidamente el soluto compatible [150], requiriéndose la degradación rápida del disacárido para la recuperación de la función [143]. Si este mecanismo falla, se observa una disminución en el crecimiento [131].

#### **3.4.4 Síntesis y degradación de solutos compatibles**

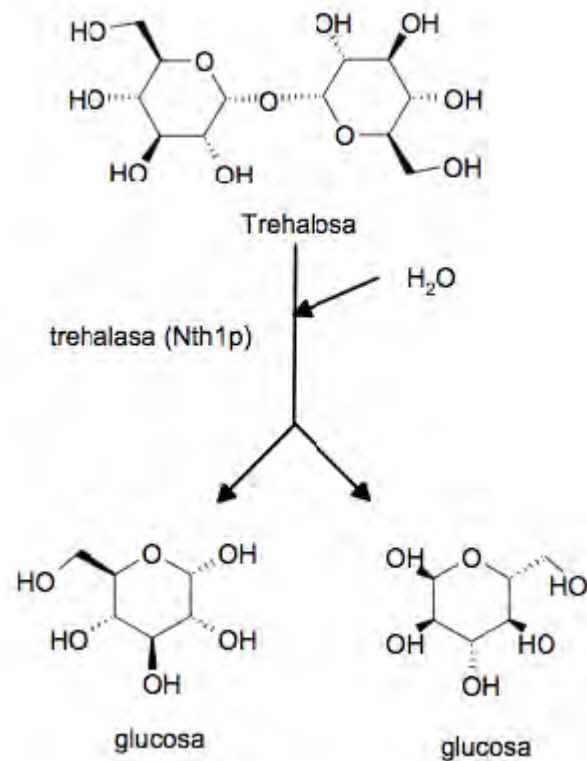
El control de los niveles de trehalosa es muy importante durante las diferentes fases de crecimiento y desarrollo celular, ya que permite que las células sobrevivan en condiciones de estrés. Los niveles intracelulares son resultado del balance entre la síntesis y la degradación enzimática [151]. En el caso de la levadura, la síntesis de trehalosa se produce por el complejo multienzimático trehalosa 6-sintetasa/fosfatasa (TPS) que está formado por 4 genes: TPS1 y TPS2 que codifican para la trehalosa-6-fosfato sintasa y la trehalosa-6-fosfato fosfatasa, respectivamente, mientras que la TPS3 y TSL1 codifican para las subunidades reguladoras del complejo TPS. La trehalosa se sintetiza en dos pasos: el primero catalizado por Tps1p, condensa la glucosa 6-fosfato con la UDP-glucosa para formar la trehalosa 6-fosfato y el segundo catalizado por la Tps2p lleva a cabo la hidrólisis del grupo fosfato para formar la trehalosa (Fig. 4). La síntesis está regulada por la proteína cinasa dependiente de AMPc que fosforila a la Tps3p y Tsl1p. La expresión de los genes TPS1, TPS2, TPS3 y TSL1 se induce por el

aumento de temperatura [152]. Esta inducción se lleva a cabo por la unión de los factores de transcripción Msn2p y Msn4p a la secuencia STRE (Stress Responsive Element) ubicado en el promotor de dichos genes.



**Figura 4. Síntesis de trehalosa** Se lleva a cabo por el complejo TPS en dos pasos. En el primero la Tps1p condensa la glucosa 6-fosfato con la UDP-glucosa para formar trehalosa 6-fosfato. En el segundo la Tps2p hidroliza a la trehalosa 6-fosfato en trehalosa y  $P_i$ .

La hidrólisis de la trehalosa a glucosa se lleva a cabo por medio de dos enzimas, una citoplásmica o trehalasa neutra, codificada por NTH1 y otra vacuolar o trehalasa ácida codificada por ATH1 [153]. La trehalasa neutra es responsable de la hidrólisis y eliminación intracelular de la trehalosa, y se encuentra regulada por fosforilación llevada a cabo por una proteína cinasa dependiente de AMPc (Fig. 5). La trehalasa ácida es esencial para la asimilación de la trehalosa y parece estar involucrada en la utilización de trehalosa como fuente de carbono [154-157].



**Figura 5. Hidrólisis de trehalosa** La trehalasa neutra (Nth1p) hidroliza la trehalosa a dos moléculas de glucosa. Esta reacción también es llevada a cabo en el citoplasma por la Nth2p y en la vacuola por la trehalasa ácida (Ath1p).

En condiciones de estrés los niveles de las proteínas que sintetizan trehalosa aumentan; sin embargo, cuando éste concluye la trehalasa, proteína encargada de degradar al disacárido, aumenta de manera importante [106, 108, 158]. Se ha encontrado que las cepas mutantes incapaces de degradar la trehalosa [108, 131, 159] no pueden reanudar su metabolismo cuando desaparece la situación de estrés, a menos que la trehalosa sea eliminada.

La célula mantiene una alta tasa de flujo en las vías metabólicas importantes aún durante el estrés, abasteciendo la energía y metabolitos necesarios para que la célula sobreviva [107, 160]. Los mecanismos que la célula utiliza para evadir la inhibición mediada por la trehalosa en las vías metabólicas clave son desconocidos hasta ahora. Una posibilidad aun sin explorar es que la asociación de enzimas sea la que prevenga la inhibición. A continuación describimos los datos que se tienen sobre la asociación de las enzimas en la célula.

### **3.5 La asociación enzimática resulta en la protección contra la inhibición**

La inhibición mediada por solutos compatibles parece no afectar de manera uniforme a todas las enzimas. De hecho ante diferentes condiciones de estrés, tales como la acumulación de solutos compatibles, parece que las vías catabólicas resisten la inhibición mediada por estas condiciones, proporcionando así la energía necesaria para la supervivencia [107, 160]. Nosotros hemos observado en el extracto citoplásmico de levadura que los solutos compatibles inhiben más

la actividad de las enzimas aisladas que la vía glucolítica completa [4]. En contraste se ha observado que el anabolismo disminuye durante el estrés [131]. Los mecanismos de resistencia a la inhibición generados por las enzimas catabólicas son objeto de estudio [77, 161].

Se ha analizado el efecto de los solutos compatibles (trehalosa) sobre la actividad de enzimas glucolíticas de levadura tales como la GAPDH, HXK, ALD y PGK. Estas enzimas se evaluaron de manera individual o en mezclas [4]. Algunas enzimas como GAPDH y HXK se inhibieron por trehalosa, mientras que otras como ALD y PGK fueron resistentes. Esto pudiera deberse a que GAPDH y HXK son enzimas más flexibles que ALD y PGK. De manera interesante, observamos que al mezclar enzimas sensibles con las resistentes había cierta protección hacia las enzimas sensibles. Esto condujo al análisis de la vía glucolítica completa, donde la inhibición de la actividad fue mínima con respecto a las enzimas aisladas [4]. Es así, que se decidió explorar el posible mecanismo que genera dicho efecto; es decir, analizar por qué algunas vías metabólicas como la glucólisis son resistentes a la inhibición mediada por viscosidad promovida por solutos compatibles, a pesar de tener enzimas sensibles a dicha condición.

El efecto protector fue específico para enzimas consecutivas de la misma vía, ya que observamos por ejemplo que la GAPDH no se protegió ni por HXK, albúmina o LDH. Esta protección al parecer es específica ya que la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, una enzima de la vía de las pentosas, no fue protegida por la ALD contra la inhibición mediada por trehalosa.

Tal parece que en los complejos, las enzimas más flexibles que son más sensibles a la viscosidad [122], se estabilizan por la unión con las enzimas resistentes que son más rígidas y menos móviles, dando lugar a complejos resistentes a la viscosidad.

Se propone que la asociación de enzimas favorece un estado plegado más estable en el cual se eliminan conformaciones no productivas [162].

Esta asociación probablemente se establezca por elementos del citoesqueleto como la tubulina [77, 78] o F-actina [3, 74].

La levadura es un modelo ideal para estudiar el papel del citoesqueleto en la regulación del metabolismo [69]. En *Saccharomyces cerevisiae*, se ha mostrado que tanto la GAPDH como la HXK, que son enzimas altamente sensibles a la viscosidad, se vuelven resistentes al mezclarse con la ALD o la PGK; sin embargo, dichos complejos son difíciles de detectar [4]. En este trabajo demostramos que en *S. cerevisiae*, la interacción de las enzimas de la vía glucolítica se estabiliza por la F-actina, pero no por la G-actina. En el complejo F-actina/enzimas, se observa una mayor eficiencia en la fermentación, así como resistencia a la inhibición promovida por el incremento en la viscosidad o por diferentes anticuerpos. La protección de la F-actina sobre la vía glucolítica exhibe un comportamiento cinético predicho para complejos multienzimáticos [163, 164], sugiriendo la existencia de un metabolón glucolítico funcional [165].

#### **4. HIPÓTESIS**

Si existe asociación de las enzimas glucolíticas con elementos del citoesqueleto de la levadura, esta asociación debe modificar algunas propiedades conformacionales y funcionales de las enzimas involucradas.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

Observar la asociación de las enzimas de la glucólisis con elementos del citoesqueleto como la actina, así como el efecto de estas asociaciones sobre la actividad enzimática.

##### **5.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Identificar enzimas glucolíticas asociadas con F-actina.
- Analizar la actividad glucolítica por enzimas asociadas con F-actina.
- Evaluar si la asociación con F-actina estabiliza y confiere mayor resistencia a la vía glucolítica ante la viscosidad, o ante otras condiciones como la presencia de anticuerpos específicos.



## **6. METODOLOGIA**

### **6.1 Materiales**

Todos los reactivos fueron de calidad analítica. Glucosa, trehalosa, HEPES, EDTA, MES, TEA, SDS,  $MgCl_2$ , 2-mercapto-etanol, SDS, glicerol, hemisulfato de hidrazina, molibdato de amonio, ácido L-ascórbico, DL-ditiotreitol, actina, ALD, PGK, GAPDH, ADH de levadura, D-fructosa 1,6 bisfosfato sal de sodio, D-glucosa 6-fosfato sal de sodio, ácido D-(-)-3-fosfoglicérico, DL-gliceraldehído 3-fosfato (GAP), citocalasina D, faloidina,  $NADP^+$ ,  $NADH$ , ATP y ADP se adquirieron de Sigma Co (St Louis MO, USA).  $KOH$ , acetato de  $Mg^{2+}$  y  $K^+$ , fosfato de  $Na^+$ ,  $H_2SO_4$ ,  $H_3PO_4$ , TCA,  $NaOH$  y  $K_2HPO_4$  fueron obtenidos de J.T Baker (Ecatepec, México). El acetato de  $Na^+$  se obtuvo de Merck (Darmstadt, Germany). Extracto de levadura por DIFCO (Cuautitlán, México) y peptona de Bioxon (Cuautitlán, México). La pro-albúmina fue de Celliance (San Francisco CA, USA). El cocktail inhibidor de proteasas (Complete) y la proteína A agarosa se adquirieron de Roche (Basel, Switzerland). El kit de quimioluminiscencia (ECL) se obtuvo de Amersham Biosciences (Arlington Heights, IL). Acrilamida/Bis acrilamida, TEMED, persulfato de amonio y el marcador de peso molecular fueron de Bio-Rad (Richmond, CA).

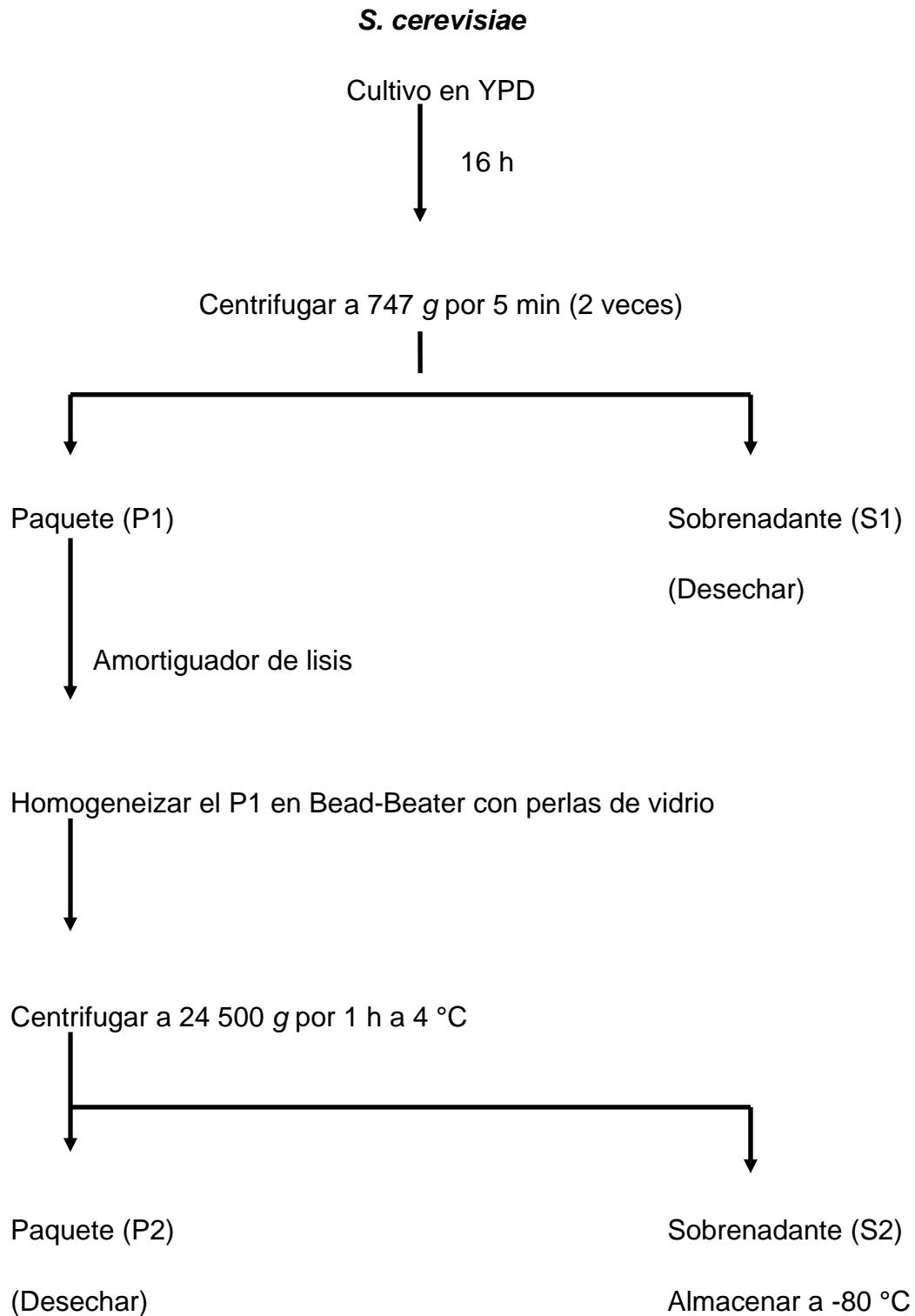
### **6.2 Anticuerpos**

Los anticuerpos policlonales de cabra anti-ALD, anti-PGAM, anti-ENO, anti-PK y los anticuerpos policlonales de conejo anti-HXK, anti-GPI, anti-PFK, anti-GAPDH, anti-TPI, anti-PGK fueron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). El anticuerpo monoclonal anti-actina fue donado por el Dr. JM Hernández

(Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN, México) [166]. Los anticuerpos secundarios peroxidados (HRP) anti-conejo, anti-cabra y anti-ratón fueron obtenidos de Jackson Immunoresearch Laboratories Inc. (West Grove, PA, USA).

### **6.3 Células y extractos citoplásmicos de levadura**

Se utilizó la cepa industrial de *S. cerevisiae* (La Azteca, S. A.). Las células se incubaron por 16 h en 500 mL de YPD (extracto de levadura 1%, peptona de gelatina 5%, dextrosa 5%) y centrifugaron dos veces con agua a 747 x g por 5 min en un rotor GSA (Sorval). El precipitado se lavó con agua estéril. Se calculó el peso húmedo de las células obtenidas y se resuspendió al 50% (ww/v) en un amortiguador de lisis (HEPES/KOH 100 mM pH 7.5, acetato de potasio 600 mM, acetato de Mg<sup>2+</sup> 10 mM, EDTA 1 mM, glicerol al 20%, 2-mercapto-etanol 8 mM y una tableta de inhibidor de proteasas "Complete"). Para permeabilizar las células se utilizaron 50 mg en 1 mL, incubadas con 1 mg de estreptolisina O (SLO) durante 30 minutos. Para todos los experimentos se agregaron células a una concentración final de 5 mg (ww) por mL. Para obtener los extractos citoplásmicos, las células fueron lisadas en el Bead-Beater (Biospec Products) con perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro por 20 seg x 3. Finalmente los extractos se centrifugaron a 24500 x g por 1 h a 4 °C en una ultracentrífuga Beckman y el sobrenadante se guardó a -80 °C [167] (Fig. 6). La concentración de proteína fue cuantificada por el método de Biuret [168].



**Figura 6. Diagrama de flujo para la obtención de extractos citoplásmicos a partir de *S. cerevisiae*.**

#### **6.4 Purificación de actina de *Saccharomyces cerevisiae* por medio de cromatografía de afinidad**

La actina de levadura no se encuentra disponible comercialmente. Por tal motivo se obtuvo con base en el protocolo descrito por Zechel [169]. Brevemente, 5 mg de DNasa I, que muestra alta afinidad por la actina, se unió covalentemente a una columna de Sefarosa 4B activada con 1 g de bromuro de cianógeno (Sigma-Aldrich). La resina se lavó y se humedeció con 1 mM de HCl frío por al menos 30 min. Posteriormente fue lavada con agua destilada y con el amortiguador de acoplamiento compuesto por  $\text{NaHCO}_3$  0.1 M / NaCl 0.5 pH 8.3–8.5. La proteína se mezcló con el gel (5-10 mg por mL de resina) e incubada toda la noche a 4 °C. El ligando sin reaccionar se eliminó por lavado, utilizando el amortiguador de acoplamiento  $\text{NaHCO}_3/\text{NaCl}$ . Los grupos sin reaccionar se bloquearon con glicina 0.2 M pH 8.0 por 2 h a temperatura ambiente. Para remover la solución de bloqueo de la resina, se lavó exhaustivamente primero con un amortiguador básico de acoplamiento a pH ~8.5 y después con un amortiguador de acetato 0.1 M pH 4 con NaCl 0.5 M. Este ciclo de lavado se completó utilizando amortiguadores de pH alto y bajo en cinco ocasiones. Los extractos citoplásmicos de levadura se sonicaron por 60 x 3 en un amortiguador G que contenía Tris 2 mM pH 7.9,  $\text{CaCl}_2$  0.2 mM, ATP 0.2 mM, DTT 0.2 mM y formamida 10%; y después se centrifugaron a 87651 x g por 1 h. Los extractos ya tratados se agregaron a la columna con DNasa I, previamente lavada con el amortiguador G y se incubaron durante toda la noche y lavados con el mismo amortiguador por centrifugación a 10303 x g por 15 min. La columna de DNasa I/ extracto citoplásmico se equilibró y

se lavó posteriormente con amortiguador G hasta no detectar proteína por el método de Bradford [170]. Posteriormente se eluyó la columna con amortiguador G +  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.2 M hasta no detectar proteína. Finalmente la G-actina fue eluida utilizando el amortiguador G con 40% de formamida y 20% de glicerol, la proteína se concentró con tubos Amicon y se cuantificó por el método de Bradford [170]. La pureza se evaluó con SDS-PAGE e inmunodetección. La polimerización de actina 5 mM se llevó a cabo con Tris-HCl 2 mM pH 8, ATP 1.2 mM,  $\text{CaCl}_2$  200 mM, KCl 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM y DTT 0.5 mM: La mezcla se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.

### **6.5 Aislamiento de proteínas asociadas a ALD y DNasa I por cromatografía de afinidad**

Se unió covalentemente 10 mg de ALD o DNasa I a una columna de Sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno (Sigma-Aldrich). La resina activada con 1 g de bromuro de cianógeno se lavó e hidrató con HCl 1 mM frío por al menos 30 minutos. Posteriormente la resina se lavó con agua destilada, 5-10 volúmenes de la columna, y con amortiguador de acoplamiento que contenía  $\text{NaHCO}_3$  0.1 M / NaCl 0.5 pH 8.3–8.5. La proteína se mezcló con el gel (5-10 mg por mL de resina) y se incubó toda la noche a 4 °C. El ligando sin reaccionar se eliminó por lavado, utilizando el amortiguador de acoplamiento  $\text{NaHCO}_3/\text{NaCl}$ . Los grupos sin reaccionar fueron bloqueados con glicina 0.2 M pH 8.0 por 2 horas a temperatura ambiente. Para remover la solución de bloqueo de la resina, se lavó exhaustivamente primero con un amortiguador básico de acoplamiento a pH ~8.5

y después con un amortiguador de acetato 0.1 M pH 4 con NaCl 0.5 M. Este ciclo de lavado se completó utilizando amortiguadores de pH 8.5 y 4 en cinco ocasiones. La resina lavada fue equilibrada en una columna con Tris 10 mM pH 7.4 (amortiguador de equilibrio). Mientras tanto los extractos citoplásmicos de levadura se ultracentrifugaron a 10303 x g por 30 minutos. Posteriormente se agregaron a la columna y se lavaron con amortiguador de equilibrio hasta que no se detectó proteína por el método de Bradford [170]. El material unido se eluyó utilizando concentraciones crecientes de Tris pH 7.4 (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 y 500 mM) en alícuotas de 3 mL y cuantificadas por el método de Bradford [170]. Los picos de proteína se obtuvieron entre 50-150 mM y se concentraron por centrifugación, utilizando tubos Amicon. Las proteínas asociadas a ALD y DNasa I se detectaron por medio de Western-Blot.

## **6.6 Inmunoprecipitación**

Se incubaron 3 µg/mL del anticuerpo respectivo con 7 µL de proteína A agarosa a 4°C durante 5 min, se mezclaron con 3 mg/mL de proteína de extracto citoplásmico de levadura y se dejó en agitación durante toda la noche a 4°C en un volumen final de 100 µL. Las muestras se colectaron a 5000 g x10 min y después se lavaron con amortiguador RIPA (Tris-HCl 20 mM, NaCl 316 mM, EDTA 2 mM, ortovanadato de sodio 20 mM, molibdato de sodio 20 mM, fluoruro de sodio 50 mM y 1% Triton X-100, pH 7.5). La pastilla se resuspendió en Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, 0.1% de Tween 20 e inhibidor de proteasas. Los precipitados fueron sujetos a Western-blot. Como control positivo se utilizó músculo de conejo [99].

## **6.7 Electroforesis y Western blot**

Todas las muestras fueron diluidas en 0.5 mL de amortiguador de muestra (Tris 500 mM pH 6.8, 10% glicerol, 10% SDS, 0.05% 2- $\beta$ -mercaptoetanol y 0.01% azul de bromofenol) y hervidas durante 5 min a 100 °C [171]. El SDS-PAGE se realizó con 10% PA. Las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de PVDF para realizar el inmunoblot utilizando fosfato de potasio 25 mM, fosfato de sodio 25 mM, Tris 12 mM, glicina 192 mM y 20% metanol, pH 7.0 [172]. Las membranas se bloquearon con albúmina 0.5% en TBS/T (Tris 50 mM, NaCl 104 mM, pH 7.6 y 0.1% Tween 20) durante 1 h y se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario. Posteriormente, se lavaron las membranas con TBS/T y se incubaron a 37 °C por 1 h con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa. Los anticuerpos se diluyeron en TBS/T. Una vez que las membranas fueron lavadas, las bandas se revelaron utilizando el kit de quimioluminiscencia (ECL kit) [99].

## **6.8 Tinción con plata**

El gel SDS-PAGE se incubó en el amortiguador I (30% etanol y 10% ácido acético) durante 8 min y se decantó. El amortiguador II (30% etanol, 10% acetato de sodio, 0.3% ácido acético y 0.1% tiosulfato de sodio) se agregó e incubó durante 15 min. Se lavó intensamente el gel con agua destilada primero 3x5 min y después 2x8 min. Se incubó el gel con la solución III [0.1% nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>), 3 % etanol y 0.024% formaldehído] durante 20 min. Se lavó una vez más el gel con agua destilada. Finalmente se incubó el gel con el amortiguador IV

(2.5% carbonato de sodio y 0.4% formaldehído) hasta observar las bandas, cambiando la solución una vez oxidada. Se detuvo la reacción con ácido acético al 5%.

### **6.9 Densitometría**

La intensidad de las bandas sin tratar (N/T) y preincubadas con faloidina (P) o citocalasina D (CD) de cada co-inmunoprecipitación se cuantificó utilizando el programa de análisis Image J 1.46. Para comparar las diferencias entre las bandas N/T con P o CD respectivamente, se realizó una ANOVA (Prueba de comparación múltiple de Dunnett) utilizando el programa GraphPad PRISM Versión 5.

### **6.10 Actividad de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa**

La actividad de la enzima se midió en un amortiguador con HEPES 20 mM,  $MgCl_2$  1 mM, DTT 1 mM y EDTA 1 mM a pH 7.5 en presencia de diferentes concentraciones de trehalosa (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 M), con  $NAD^+$  0.1 mM, Pi 8 mM y GAPDH 9  $\mu g/mL$ . Después de 15 segundos se añadió G3P 600  $\mu M$ . La absorbencia se midió a 340 nm en un espectrofotómetro Aminco/Ollis DW2000 de doble haz [173].

### **6.11 Actividad de aldolasa**

Se realizó en un amortiguador de fosfato de sodio 10 mM, EDTA 0.1 mM pH 7.6 con trehalosa (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 M). Después se agregó hemisulfato de hidrazina 3.5 mM, fructosa 1,6-bisfosfato 0.1 mM y ALD 9  $\mu g/mL$ . La temperatura se mantuvo constante a 20 °C. Se cuantificó la absorbencia en un



espectrofotómetro Aminco-Ollis DW 2000 de doble haz en modo “split”. La concentración de hidrazona se midió a 240 nm usando un coeficiente de adsortividad de  $2.73 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [174].

### **6.12 Actividad de fosfoglicerato cinasa**

Se midió en un amortiguador HEPES 20 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, DTT 1 mM y EDTA 1 mM, pH 7.5 con diferentes concentraciones de trehalosa (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 M), ATP 0.2 mM, PGK 1 mM y ácido D-(-)-3-fosfoglicérico 6 mM. A las muestras incubadas durante 10 minutos a 30 °C, se les agregó TCA 30%, se centrifugaron por 20 min a 5000 **g** y se neutralizaron con NaOH 1 mM. Posteriormente se agregó al sobrenadante NADH 0.16 mM y GAPDH 9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las muestras se incubaron en un baño de agitación (New Brunswick) durante 1 h a 20 °C. La reacción se detuvo con SDS al 5% dejando las muestras en frío. Para determinar la concentración de Pi agregamos a la muestra 0.5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3N y 0.1 ml de molibdato de amonio al 2.5%. Finalmente se agregó el reactivo reductor (hemisulfato de hidrazina/ ácido ascórbico) y se incubó durante 30 min. La absorbencia se midió a 820 nm en un espectrofotómetro 650 DU Beckman. Los resultados se encuentran en  $\mu\text{moles Pi (mg prot. min)}^{-1}$  [175].

### **6.13 Producción de etanol a partir de glucosa**

La producción de etanol se midió incubando 5 mg (ww)/mL de células permeabilizadas o 1 mg prot/mL de extracto citoplásmico de levadura en presencia de las siguientes concentraciones de fármacos que modifican la actina: faloidina 59  $\mu\text{M}$ , citocalasina D 400  $\mu\text{M}$  o latrunculina B 200  $\mu\text{M}$  [72]. En algunos

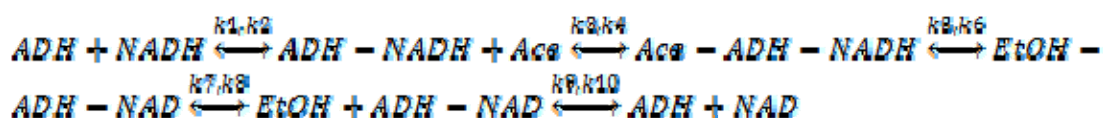
experimentos se agregó AbGAPDH, AbALD o AbPGK 48 mg/mL [176]. La fermentación se midió en un amortiguador MES-TEA 0.1 M, pH 7.0, con glucosa 20 mM y trehalosa 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 o 1 M, en un volumen final de 2 mL. Las muestras se incubaron a 20 °C durante distintos tiempos. Se detuvo la reacción con 0.1 mL de TCA al 30% y se centrifugó a 120 x g durante 25 min en una centrífuga clínica. El sobrenadante se neutralizó con NaOH 1 mM y el etanol se cuantificó en un amortiguador K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 114 mM pH 7.6 y NAD<sup>+</sup> 1.8 mM con una alícuota de 0.05 mL de la muestra y se agregó ADH una concentración final de 30 µg/mL. La absorbencia del NADH se midió a 340 nm en un espectrofotómetro Aminco/Ollis DW 2000 de doble haz. Los resultados se reportan: para las células permeabilizadas como EtOH µmol por mg de células (ww) y para los extractos citoplásmicos como EtOH µmol por mg prot.

Para calcular la concentración de etanol utilizamos la siguiente ecuación:

$$\Delta \text{ Absorbencia del NADH} / \text{Coef. de absorción del NADH} \times \text{mg prot.}$$

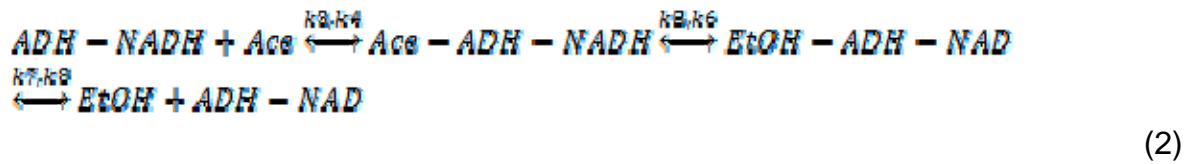
#### 6.14 Análisis cinético de la fermentación

La cinética enzimática de la alcohol deshidrogenasa (ADH) de *S. cerevisiae* exhibe un mecanismo de orden Bi Bi, donde primero se une el NADH y posteriormente el acetaldehído (Ace), se lleva a cabo la catálisis y el etanol (EtOH) se libera primero seguido por el NAD [177] (Ec. 1).



(Ec. 1)

Bajo las condiciones donde la ADH está saturada con NADH se observa un burst inicial y un mecanismo de orden Uni Bi (o Uni Uni en nuestras condiciones experimentales) tal y como se muestra en la Ecuación 2 (Ec. 2).



Por otro lado, cuando la glucólisis no se encuentra completamente activa, no se observa un “burst” inicial. Los datos obtenidos de la producción de etanol se ajustaron a una regresión no lineal utilizando la ecuación 3 en el programa Origin 6.0 © Software (Ec. 3).

$$[EtOH] = [EtOH]_0 + [EtOH]_b \cdot (1 - \exp^{-k_b \cdot t}) + [EtOH]_{ss} \cdot (1 - \exp^{-k_{ss} \cdot t}) \quad (3)$$

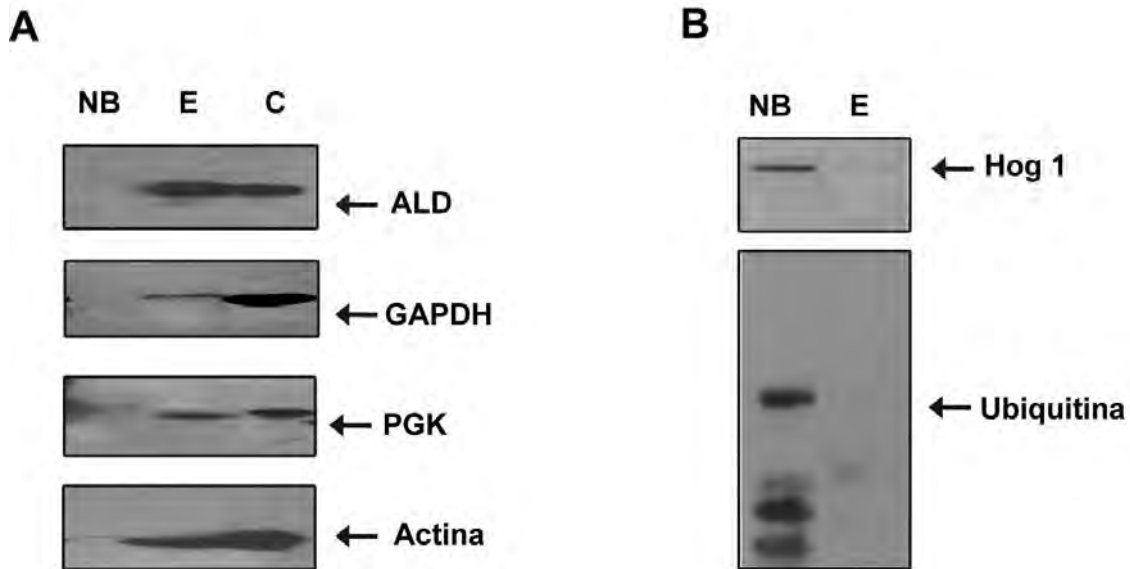
Donde  $[EtOH]$  es el etanol total acumulado en el tiempo;  $[EtOH]_0$  es la concentración inicial de etanol;  $[EtOH]_b$  es la concentración de etanol alcanzada con la constante de velocidad de la reacción durante el “burst” ( $k_b$ );  $[EtOH]_{ss}$  es la concentración de etanol alcanzada con la constante de velocidad de la reacción durante el estado estacionario ( $k_{ss}$ ) [177, 178].

## 7. RESULTADOS

### 7.1 En los extractos citoplásmicos de *Saccharomyces cerevisiae*, las enzimas de la glucólisis se asocian entre ellas y con la actina

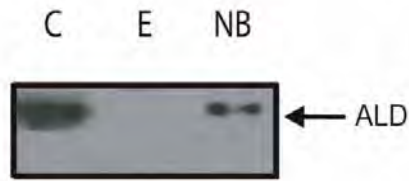
La asociación entre las enzimas parece controlar el metabolismo [26] y proteger contra situaciones de estrés [4]. En extractos musculares de ratón se ha observado que las asociaciones enzima-enzima y enzima-microtúbulos estabilizan la actividad [77, 83]. En *S. cerevisiae*, la asociación de las enzimas glucolíticas protege a la vía contra la inhibición mediada por la viscosidad de solutos compatibles. Es por lo tanto de interés identificar los factores que estabilizan las interacciones enzimáticas con el fin de comprender el metabolismo, así como para su aplicación biotecnológica.

En los mamíferos y en otras especies se ha observado que la aldolasa (ALD) se une a otras enzimas glucolíticas [4, 94]. Por tal motivo decidimos determinar en *S. cerevisiae* cuáles enzimas glucolíticas se unen a ALD y si se forma un metabolón. A una columna de Sefarosa 4D/ALD se le agregó extracto citoplásmico de levadura, las fracciones eluidas y colectadas se analizaron por WB. Encontramos en la fracción unida que enzimas como la GAPDH, PGK, ALD y actina estaban unidas a la ALD (Fig. 7A). Por otro lado, proteínas como la ubiquitina y Hog 1 se detectaron en la fracción libre (no unida) (Fig. 7B). Al parecer la columna de ALD retiene actina y otras enzimas glucolíticas, sugiriendo la existencia de un metabolón glucolítico unido a la actina.



**Figura 7. Proteínas asociadas a ALD.** La ALD se unió covalentemente a una columna de Sefarosa 4B, que se equilibró con Tris 10 mM pH 7.4. Después se agregó el extracto citoplásmico y se lavó la columna con el amortiguador de equilibrio para remover la fracción no unida (NB). La fracción unida fue eluida (E) con Tris 150 mM pH 7.4. La proteína se cuantificó por el método de Bradford. Las fracciones fueron sujetas a WB: A: Proteínas unidas (ALD, GAPDH, PGK y Actina), B: Proteínas no unidas ubiquitina y Hog-1. Como control positivo se utilizaron extractos citoplásmicos (C).

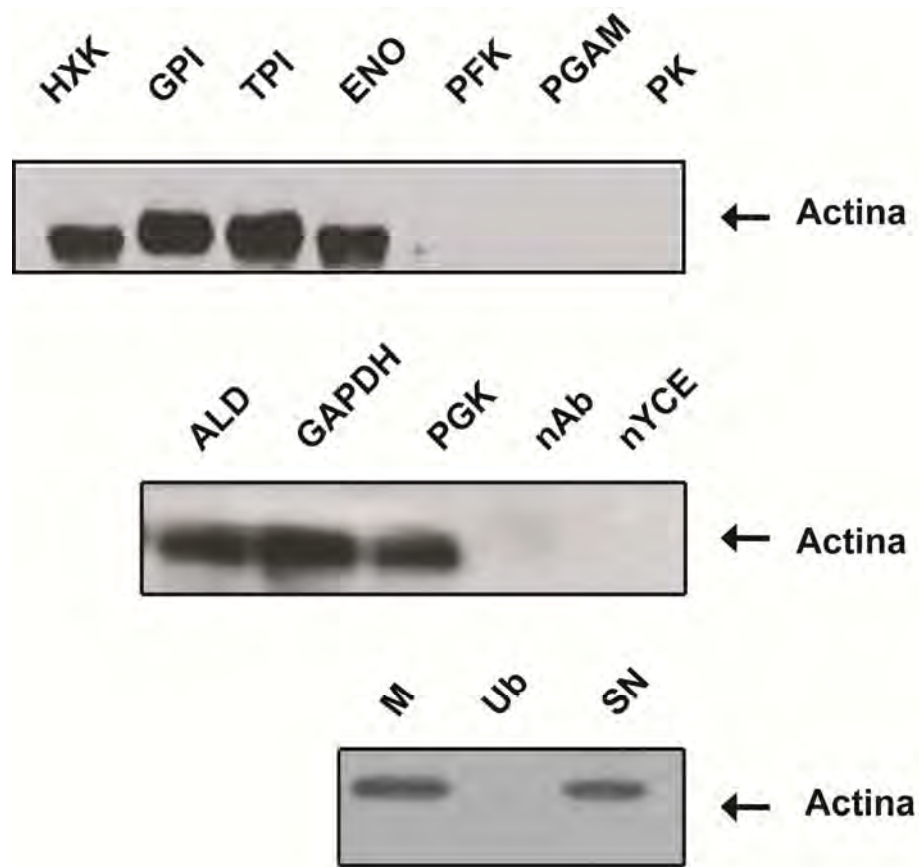
Para demostrar que esta asociación es una propiedad específica de las enzimas glucolíticas, montamos una columna de DNasa, una proteína ajena a la vía (Fig. 8). Al eluir el extracto citoplásmico observamos que la ALD no estaba unida a esta proteína, lo que sugiere que la unión de la ALD por las enzimas de la glucólisis es específica.



**Figura 8. La ALD no se une a DNasa I.** La DNasa I se unió covalentemente a una columna de Sefarosa 4B y se equilibró con Tris 10 mM pH 7.4. Se agregó extracto citoplásmico a la columna y se lavó con amortiguador de equilibrio para remover la fracción no unida (NB). La fracción unida fue colectada con Tris 150 mM pH 7.4 (E). La proteína se cuantificó por el método de Bradford. Las fracciones fueron sujetas a WB con anti-ALD. Se utilizó extracto muscular como control (C).

Para explorar aún más las interacciones de la actina y las enzimas de la glucólisis realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación. Inmunoprecipitamos cada una de las enzimas glucolíticas en un extracto citoplásmico de levadura y realizamos un WB con anti-actina (Fig. 9). Observamos que la actina co-inmunoprecipita con HXK, GPI, ALD, TPI, GAPDH, PGK y ENO, pero no precipita con PFK, PGAM o PK (Fig. 9); al parecer la mayoría de las enzimas interactúan con el citoesqueleto. Las pequeñas diferencias encontradas en el PM de las inmunoprecipitaciones se deben probablemente a la estequiometría de los complejos, así como al nivel de expresión de cada una de las enzimas utilizadas. Como control positivo incluimos una muestra de extracto muscular de conejo (M) y como control negativo utilizamos una muestra en ausencia del anticuerpo (nAb) y otra carente de extracto citoplásmico (nYCE). Además, en el caso de la ubiquitina, no se detectó co-inmunoprecipitación con la actina. Para demostrar que la actina estaba presente, incluimos el sobrenadante de las muestras donde no se añadió

anticuerpo (SN) (Fig. 9). Por lo tanto, los resultados de la co-inmunoprecipitación indican que un gran número de enzimas de la glucólisis interactúan de manera específica con la actina, dando lugar a complejos multienzimáticos. Posteriormente decidimos analizar si el estado de polimerización de la actina tenía efecto sobre la asociación enzimática.

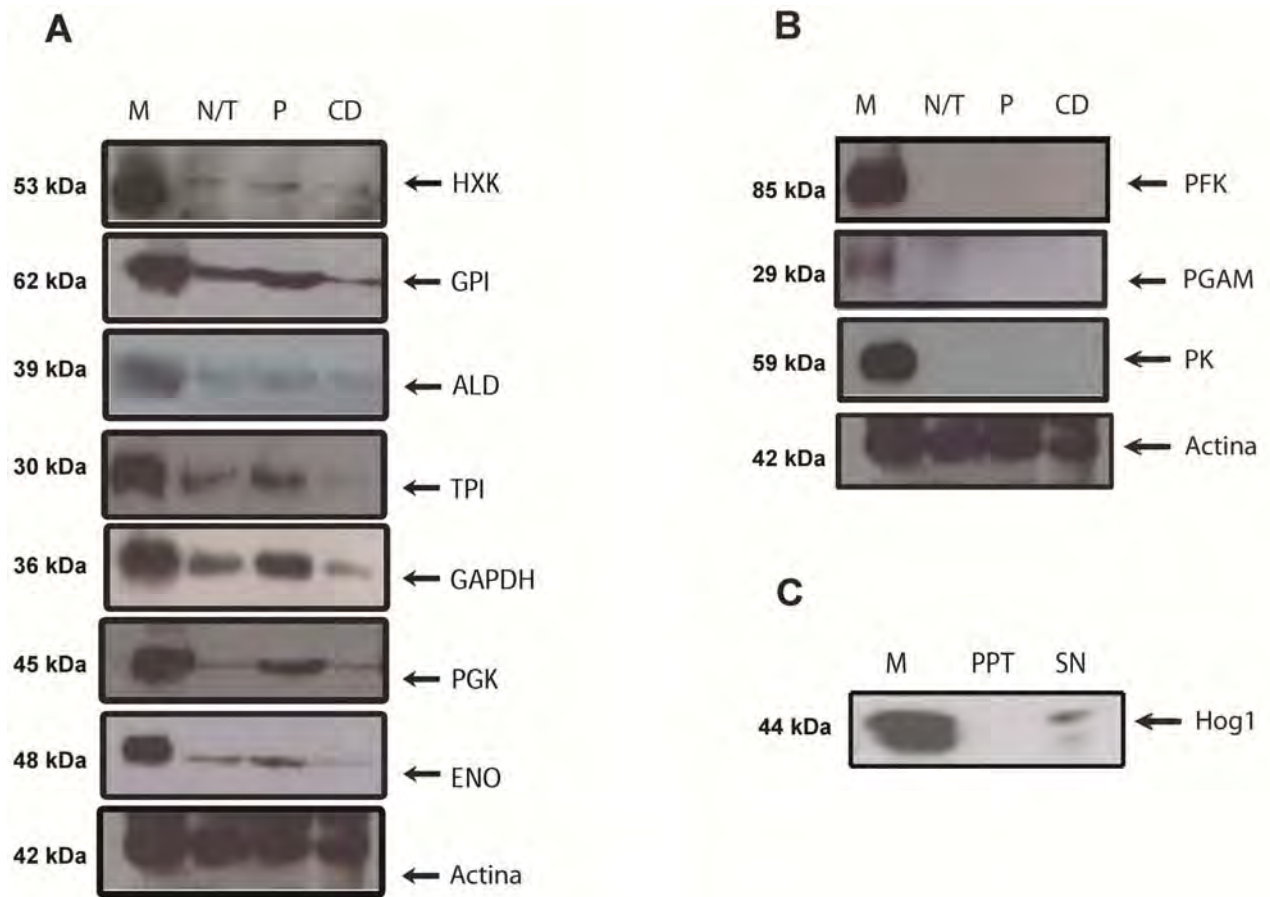


**Figura 9. Asociación de actina con enzimas glucolíticas.** Extractos citoplásmicos de levadura fueron inmunoprecipitados con diferentes anticuerpos: anti-HXK, anti-GPI, anti-TPI, anti-ENO, anti-PFK, anti-PGAM, anti-PK, anti-ALD, anti-GAPDH, anti-PGK. Como control positivo se utilizó extracto muscular (M). Los controles internos fueron: inmunoprecipitación sin anticuerpo (nAb), sin extracto citoplásmico (nYCE) e inmunoprecipitación con ubiquitina (Ub). Todos los precipitados fueron sujetos a WB con anti-actina.

## **7.2 La forma polimérica de la actina (F-actina) pero no el monómero, se une a las enzimas glucolíticas**

Sabemos que la actina alterna entre un estado monomérico (G-actina) y un estado filamentoso o polimérico (F-actina). Estudios previos en mamíferos sugieren que los diferentes estados de la actina muestran distinta afinidad por las enzimas glucolíticas [84, 179]. Para modificar los estados oligoméricos de la actina se utilizaron dos fármacos; la faloidina que promueve la polimerización o la citocalasina D que es un agente despolimerizante [72]. Los extractos citoplásmicos sin tratar (NT) o preincubados con faloidina (P) o citocalasina D (CD), se inmunoprecipitaron con anti-actina (Fig. 10). Los precipitados se sometieron a un western blot (WB) utilizando anticuerpos específicos contra cada una de las enzimas glucolíticas. Como se esperaba de los experimentos previos, las enzimas como la HXK, GPI, ALD, TPI, GAPDH, PGK y ENO (Fig. 10 A) precipitaban con actina. El tratamiento con los fármacos modificó la asociación de la forma siguiente: la faloidina intensificó e hizo más intensa la interacción de las enzimas con la actina, mientras que la citocalasina hizo más débil dicha asociación (Tabla 2). Por otro lado, las enzimas que no se unen a la actina como la PFK, PGAM y PK no mostraron ningún cambio aun con la presencia de los fármacos (Fig. 10 B). Como control positivo se utilizó extracto muscular de conejo (M) para todos los casos. El control negativo fue la co-inmunoprecipitación de actina con anti-Hog1, el cual permaneció en el sobrenadante (SN) (Fig. 10 C). Estos resultados sugieren fuertemente que el complejo glucolítico es dinámico, y se ensambla o disocia en coordinación con la interconversión entre actina F y actina G.





**Figura 10. Efecto de distintos fármacos sobre la asociación actina/enzimas glucolíticas.** Se utilizaron extractos citoplásmicos para analizar la interacción entre la actina y las enzimas glucolíticas. Se incluyeron muestras no tratadas (N/T) o tratadas con faloidina (P) y citocalasina D (CD). Cada muestra se inmunoprecipitó con anti-actina. Como control positivo se utilizó extracto muscular (M). Los precipitados con anti-actina fueron sujetos a WB con A: anti-HXK, GPI, ALD, TPI, GAPDH, PGK y ENO; B: anti-PFK, PGAM y PK. Como control de carga utilizamos actina. C: Hog1 fue utilizado como control negativo, que no fue detectado en el sobrenadante (SN).

**Tabla 2. Efecto de fármacos sobre la asociación actina-enzima**

La intensidad de las bandas co-inmunoprecipitadas de la Fig. 10: No tratadas (N/T) y tratadas con faloidina (P) o citocalasina D (CD) se cuantificaron por densitometría. El dato representa el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  SEM cada uno por triplicado. Los asteriscos indican diferencia estadística significativa respecto a los extractos sin tratar. Se utilizó una ANOVA (Dunnett's Multiple Comparison Test) con una \*P < 0.05 y \*\*P < 0.01. Los datos se encuentran en porcentajes.

---

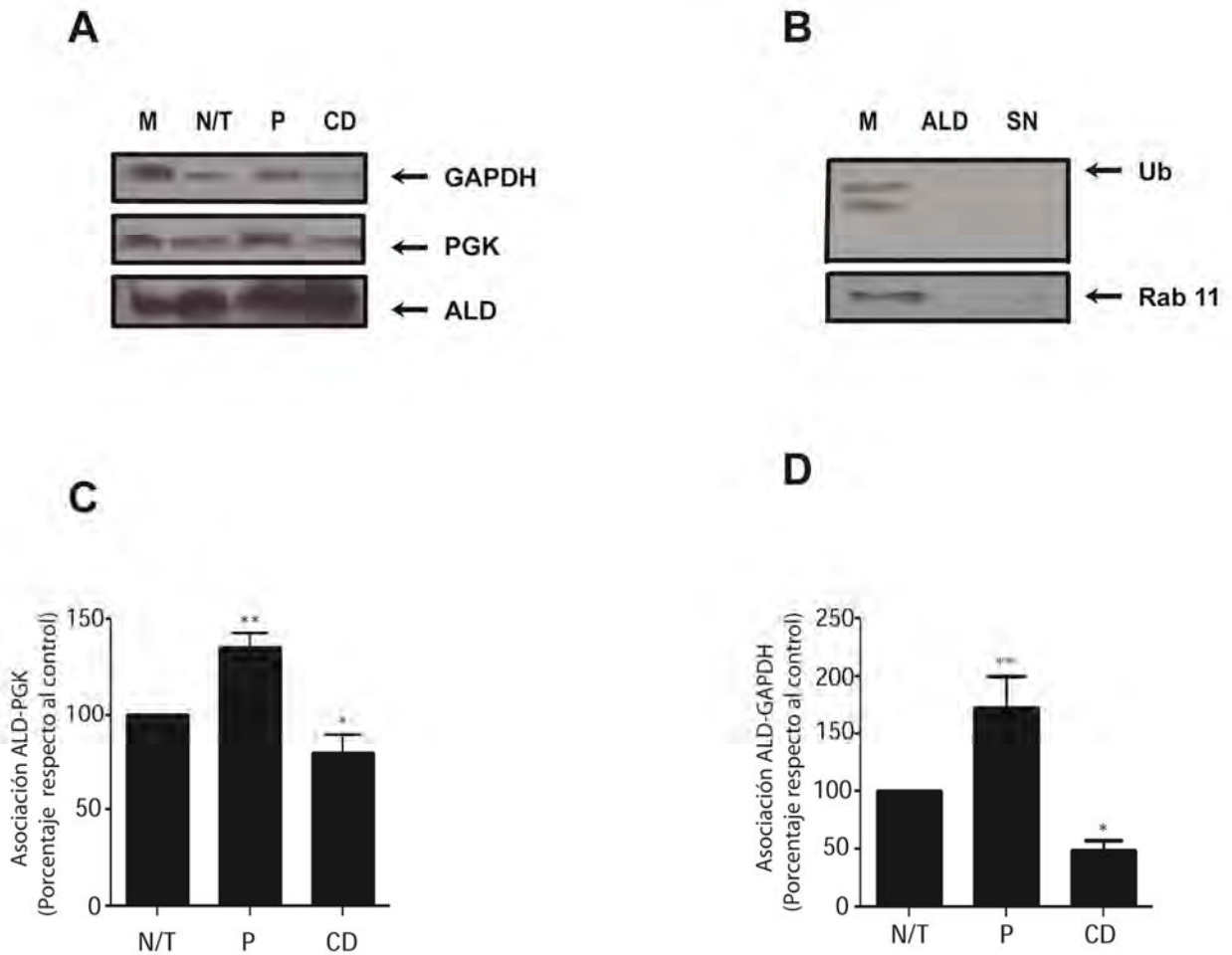
	<b>Enzimas (%)</b>						
	<b>HXK</b>	<b>GPI</b>	<b>ALD</b>	<b>TPI</b>	<b>GAPDH</b>	<b>PGK</b>	<b>ENO</b>
<b>Sin tratar</b> <b>N/T</b>	100	100	100	100	100	100	100
<b>Faloidina</b> <b>P</b>	136.4 $\pm$ 23**	259.4 $\pm$ 76**	209.0 $\pm$ 80	155.1 $\pm$ 22**	227.2 $\pm$ 20*	230.7 $\pm$ 56*	149.0 $\pm$ 33*
<b>Citocalasina D</b> <b>CD</b>	47.0 $\pm$ 14*	25.3 $\pm$ 9	52.6 $\pm$ 32	74.5 $\pm$ 4*	58.7 $\pm$ 6**	92.7 $\pm$ 53	44.3 $\pm$ 20*

---

### **7.3 La asociación enzimática se intensifica por la F-actina**

Una vez demostrado que la actina interactúa con la mayoría de las enzimas glucolíticas, decidimos evaluar si el estado oligomérico de la actina modifica la interacción enzima/enzima (Fig. 11). Se utilizó extracto citoplásmico incubado sin tratamiento (NT) o tratado con faloidina (P) o citocalasina D (CD). Después de la

incubación, la ALD fue inmunoprecipitada y se evaluó la co-inmunoprecipitación de la GAPDH y de la PGK. Mediante WB determinamos que la GAPDH, PGK y ALD co-inmunoprecipitan en todos los casos. Al comparar las muestras en ausencia de tratamiento (NT) con las tratadas con faloidina (P) encontramos un aumento en la interacción; por el contrario, el tratamiento con citocalasina D (CD) disminuye la interacción, sin embargo aun se detecta cierta asociación (Fig. 11 A). En todos los casos se utilizó extracto muscular de conejo como control positivo (M). Además, observamos que ni ubiquitina ni Rab 11 (proteína nuclear de la familia de Ras), usados como controles negativos, co-inmunoprecipitan con ALD (Fig. 11 B). La densitometría de las bandas en la Fig. 11 A muestra el aumento de la inmunoprecipitación con faloidina y disminución con citocalasina tanto con PGK (Fig. 11 C) como con GAPDH (Fig. 11 D). Estos resultados sugieren que el estado polimérico de la actina aumenta la asociación con las enzimas de la glucólisis.

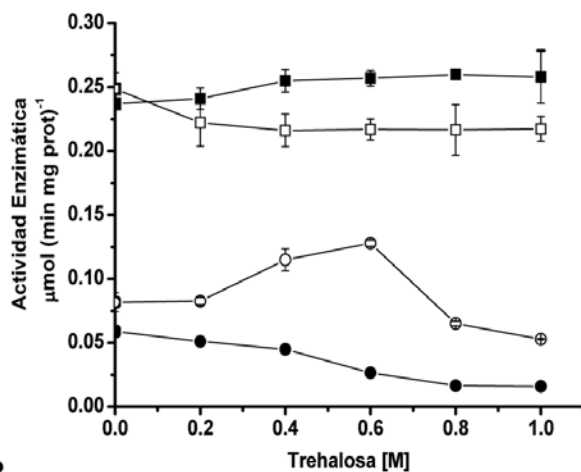
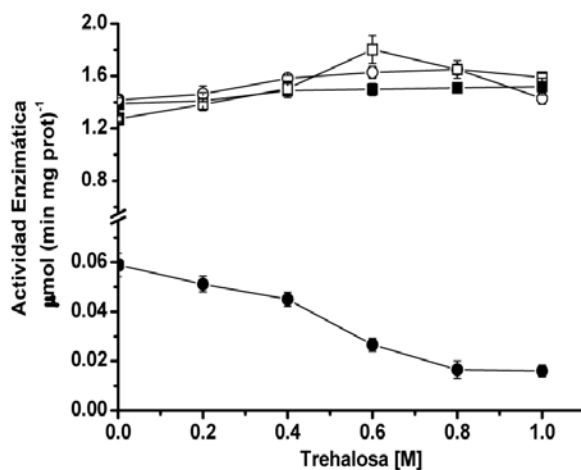


**Figura 11. Asociación de enzimas glucolíticas en presencia de diferentes fármacos.** Los extractos citoplásmicos se incubaron sin tratar (N/T) o en presencia de faloidina (P) y citocalasina D (CD). Las muestras fueron inmunoprecipitadas con anti-ALD. Como control positivo se utilizó extracto muscular (M). Los precipitados se sujetaron a WB con A: GAPDH o PGK; B: ubiquitina (Ub) y Rab 11 como control negativo. Como control de carga se utilizó ALD. Se llevaron a cabo densitometrías para estimar el grado de asociación entre C: ALD y PGK o D: ALD y GAPDH. Los datos representan el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  SEM. Se analizó con una One-way ANOVA (Dunnett's Multiple Comparison Test) con una  $*P < 0.05$  respecto a los extractos no tratados.

#### **7.4 La F-actina aumenta el efecto protector de la PGK y ALD contra la inhibición mediada por la trehalosa de la GAPDH**

En la mezcla, algunas enzimas de la glucólisis aumentan su resistencia a la inhibición mediada por la viscosidad dada por los solutos compatibles como la trehalosa [4]. Por tal motivo decidimos analizar si la presencia de actina mejoraba aun más la resistencia a la inhibición mediada por trehalosa de enzimas muy sensibles como la GAPDH, medianamente resistentes como la PGK o muy resistentes como la ALD, así como la mezcla de GAPDH con PGK o ALD (Fig. 12). Se evaluó la actividad de las enzimas aisladas en presencia de F-actina con diferentes concentraciones de trehalosa. La actividad de la GAPDH/actina fue de  $0.059 \mu\text{mol (min mg prot)}^{-1}$  y disminuyó a  $0.016 \mu\text{mol (min mg prot)}^{-1}$  con la concentración más alta de trehalosa (1 M) (Fig. 12 A y B). La PGK/actina mostró actividad de  $0.081 \mu\text{mol (min mg prot)}^{-1}$  que aumentó hasta  $0.12 \mu\text{mol (min mg prot)}^{-1}$  con 0.6 M de trehalosa y finalmente disminuyó a  $0.052 \mu\text{mol (min mg prot)}^{-1}$  con trehalosa 1 M (Fig. 12 A). La ALD/actina no se mostró afectada por la viscosidad, manteniéndose constante cerca de  $1.5 \mu\text{mol (min mg prot)}^{-1}$  independientemente de la concentración de trehalosa (Fig. 12 B). Al evaluar la actividad en la mezcla GAPDH/PGK/actina, observamos que la actividad de ambas enzimas era resistente a la inhibición por la trehalosa. La actividad de la GAPDH fue de  $0.25 \mu\text{mol (min mg prot)}^{-1}$  sin ser afectada por la trehalosa. Al comparar esta actividad con la de la mezcla GAPDH/PGK sin actina [4], ésta aumenta aproximadamente 1.6 veces (Fig. 12 A). Al medir la actividad por medio

de la PGK en la misma mezcla, obtuvimos  $0.24 \mu\text{mol} (\text{min mg prot})^{-1}$  que también se mantuvo constante (Fig. 12 A). En el caso de la mezcla GAPDH/ALD/actina, la GAPDH también se mostró resistente a la inhibición, manteniéndose constante en  $1.4 \mu\text{mol} (\text{min mg prot})^{-1}$  con las diversas concentraciones de trehalosa (Fig. 12 B). La mezcla con ALD y actina aumentan la actividad de la GAPDH hasta 20 veces, volviéndose completamente resistente a la inhibición mediada por la viscosidad (Fig. 12 B). La actividad de la ALD se mantuvo constante bajo todas las condiciones (Fig. 12 B). Los resultados en la Fig. 12 muestran que en presencia de actina la mezcla de enzimas GAPDH/PGK y GAPDH/ALD, aumenta la actividad tanto de la GAPDH como la PGK, además de generar resistencia contra la viscosidad. Estos resultados sugieren que la asociación actina/enzimas observada en el metabolón glucolítico puede proteger a las enzimas de la inhibición por diferentes agentes.

**A****B**

**Figura 12. Efecto de distintas concentraciones de trehalosa sobre la actividad de varias enzimas glucolíticas aisladas o en mezclas en presencia de actina.** Las enzimas aisladas o en mezcla fueron incubadas con 5 mM de F-actina. La actividad de cada una de las enzimas fue cuantificada en presencia de 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 o 1 M de trehalosa a 20°C durante 3 min. Las condiciones para cada ensayo están descritas en la metodología. (A) Círculo cerrado, GAPDH/actina; círculo abierto, PGK/actina; cuadro abierto, actividad de GAPDH en la mezcla GAPDH/PGK/actina; cuadrado cerrado, actividad de PGK en la mezcla GAPDH/PGK/actina. (B) Círculo cerrado, GAPDH/actina; círculo abierto, ALD/actina; cuadrado abierto, actividad de GAPDH en la mezcla GAPDH/ALD/actina; cuadrado cerrado, actividad de ALD en la mezcla GAPDH/ALD/actina.

## 7.5 La F-actina protege a la vía glucolítica completa contra la inhibición mediada por trehalosa

Una vez que se observó que la actina protege a algunas enzimas contra la inhibición, decidimos cuantificar el efecto de los diferentes estados de la actina sobre la fermentación, además de medir el efecto inhibitorio de las diferentes concentraciones de trehalosa (Fig. 13 y 14). Los experimentos se llevaron a cabo en células permeabilizadas con SLO (Fig. 13) así como en extractos citoplásmicos de levadura (Fig. 14), los cuales fueron sujetos a análisis cinético asumiendo que la alcohol deshidrogenasa es el paso limitante en esta vía (Ec. 3). El efecto de la actina y la trehalosa se determinó en cada una de las condiciones. El análisis cinético de los datos da lugar a las curvas ilustradas en las figuras. También se reportan los parámetros cinéticos tanto de las células permeabilizadas con SLO y de los extractos citoplásmicos (Tablas Figs. 13 y 14). El “burst” inicial en la actividad se puede interpretar como la producción de etanol al utilizar el NADH disponible, mientras que la segunda fase muestra disminución en la producción de etanol que refleja la necesidad de que el  $\text{NAD}^+$  sea liberado de la ADH, además de su reducción en otros niveles de la vía (GAPDH) [177, 178]. En las células permeabilizadas encontramos que la producción de etanol fue de  $20 \mu\text{mol (mg ww)}^{-1}$  en 16 min. Únicamente la concentración más alta de trehalosa (1 M) disminuye la producción de etanol a  $18 \mu\text{mol (mg ww)}^{-1}$  en 16 minutos, sin ser una diferencia significativa. Al ajustar los datos de la producción de etanol de las células permeabilizadas, el análisis cinético mostró que en el control la primera fase hay una producción rápida de etanol ( $k_b$ ), que disminuyó solo con 0.8 y 1 M

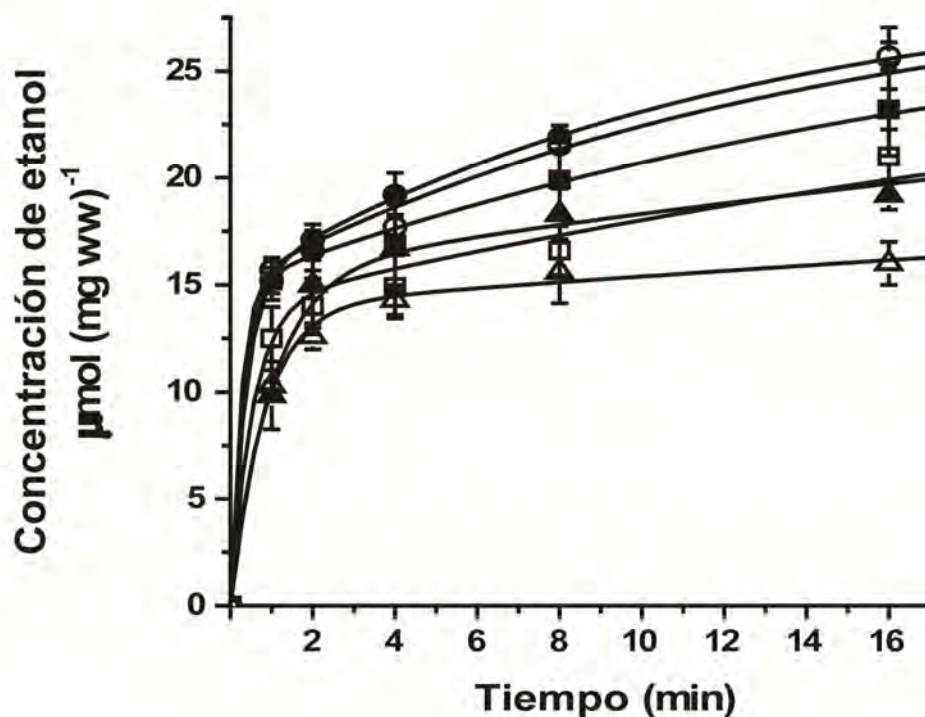


de trehalosa. En ausencia de trehalosa la  $k_b = 2.74 \text{ (min)}^{-1}$ , mientras que a 1 M de trehalosa  $k_b = 1.23 \text{ (min)}^{-1}$ . Durante la segunda fase, en ausencia de trehalosa la  $k_{ss} = 0.083 \text{ (min)}^{-1}$  disminuyendo la  $k_{ss} = 0.011 \text{ (min)}^{-1}$  con 1M de trehalosa (Fig. 13 A).

Para determinar el efecto que tiene el estado conformacional de la actina sobre la actividad de la vía glucolítica utilizamos faloidina, citocalasina D o latrunculina B. Encontramos que en presencia de faloidina la producción de etanol fue de  $40 \mu\text{mol (mg ww)}^{-1}$  en 16 min, el doble con respecto al control debido probablemente a que se generan uniones más estrechas entre las proteínas [72]. De manera interesante, también observamos que la faloidina previene la inhibición mediada por trehalosa sobre la fermentación. La cinética en presencia de faloidina indica un estallido inicial intenso en la producción de etanol, así como un estado estacionario más elevado de la producción de etanol. Se observó también que las constantes no se afectaron por la trehalosa. En contraste con la faloidina, la citocalasina disminuyó la producción de etanol a menos de  $10 \mu\text{mol (mg ww)}^{-1}$  en 16 min; es decir, la mitad con respecto al control y cuatro veces menos que las células con faloidina (Fig. 13 B). En presencia de citocalasina, la trehalosa inhibió la fermentación hasta alcanzar  $5 \mu\text{mol (mg ww)}^{-1}$  de etanol con 1 M de trehalosa. La cinética en presencia de citocalasina mostró que la  $k_b$  se mantenía constante, mientras que  $k_{ss}$  disminuyó drásticamente, aun teniendo concentraciones muy bajas de etanol (Fig. 13 C). La latrunculina B disminuyó la producción de etanol a menos de  $5 \mu\text{mol (mg ww)}^{-1}$  sin trehalosa y con 1 M la fermentación disminuyó a menos de  $3 \mu\text{mol (mg ww)}^{-1}$ . La cinética en presencia de latrunculina indica que el

estallido inicial de la actividad era mínimo y se observó que durante el estado estacionario la producción de etanol fue más lenta, incrementado marginalmente con la trehalosa (Fig. 13 D). Es así, que al parecer la F-actina pero no la G-actina, acelera la fermentación y previene contra la inhibición mediada por trehalosa.

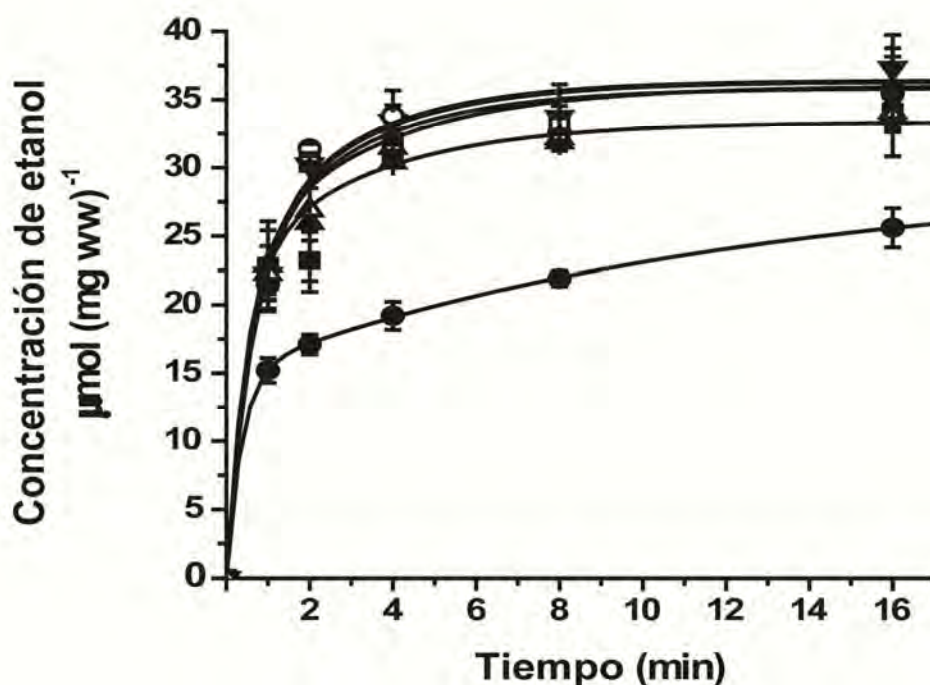
**A**



Células permeabilizadas con SLO: CONTROL				
Trehalosa (M)	$[EtOH]_b$ ( $\mu\text{mol EtOH/mg ww}$ )	$k_b$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$[EtOH]_{ss}$ ( $\mu\text{mol EtOH/mg ww}$ )	$k_{ss}$ ( $\text{min}^{-1}$ )
0	$15.0 \pm 0.27$	$2.74 \pm 0.21$	$14.4 \pm 0.74$	$0.083 \pm 0.011$
0.2	$15.0 \pm 2.62$	$3.77 \pm 2.14$	$14.5 \pm 1.10$	$0.073 \pm 0.006$
0.4	$14.9 \pm 1.18$	$3.53 \pm 0.37$	$16.0 \pm 0.65$	$0.043 \pm 0.006$
0.6	$12.6 \pm 1.86$	$3.02 \pm 0.66$	$16.0 \pm 0.22$	$0.037 \pm 0.005$
0.8	$15.5 \pm 1.21$	$1.03 \pm 0.17$	$14.0 \pm 0.07$	$0.022 \pm 0.003$
1.0	$14.0 \pm 1.84$	$1.23 \pm 0.09$	$14.0 \pm 2.03$	$0.011 \pm 0.001$

**Figura 13. Producción de etanol por células permeabilizadas en presencia de distintas concentraciones de trehalosa.** Los resultados muestran la fermentación de células permeabilizadas con estreptolisina O (SLO) (5 mg ww/mL). Los círculos cerrados indican el control sin trehalosa; los círculos abiertos 0.2 M trehalosa; cuadros cerrados 0.4 M trehalosa; cuadros abiertos 0.6 M trehalosa; triángulos cerrados 0.8 M trehalosa y triángulos abiertos 1 M trehalosa. La tabla muestra los parámetros cinéticos de la fermentación de las células permeabilizadas.

**B**

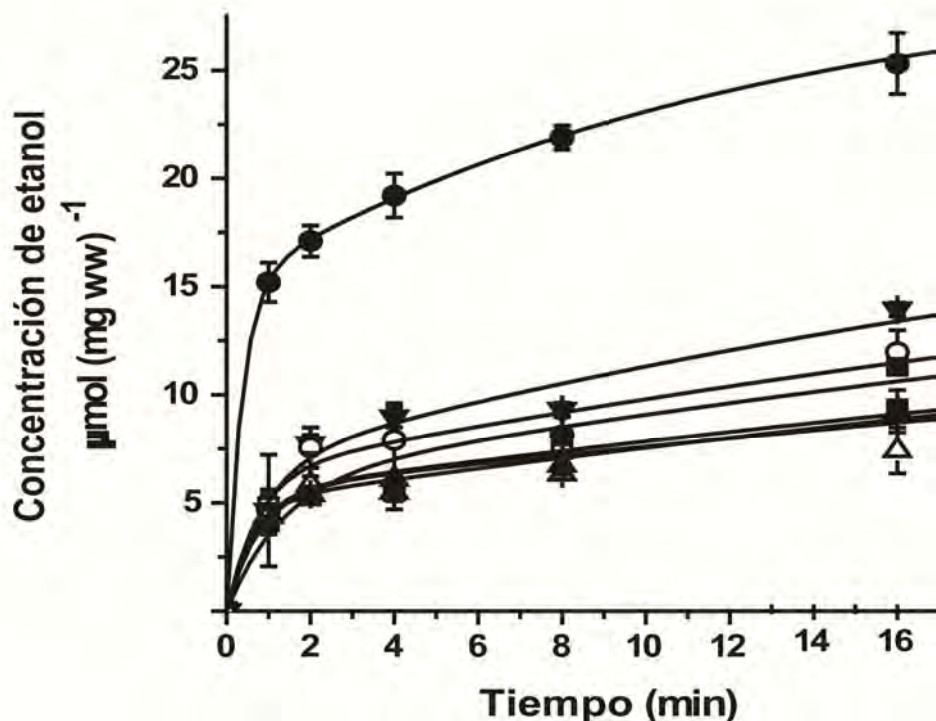


Células permeabilizadas con SLO: FALOIDINA				
Trehalosa (M)	$[EtOH]_b$ ( $\mu\text{mol EtOH/mg ww}$ )	$k_b$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$[EtOH]_{ss}$ ( $\mu\text{mol EtOH/mg ww}$ )	$k_{ss}$ ( $\text{min}^{-1}$ )
Control <sup>1</sup>	$15.1 \pm 0.26$	$2.69 \pm 0.21$	$14.4 \pm 0.70$	$0.080 \pm 0.010$
0	$23.4 \pm 1.15$	$1.62 \pm 0.26$	$13.0 \pm 0.77$	$0.357 \pm 0.011$
0.2	$23.3 \pm 1.93$	$1.62 \pm 0.43$	$13.0 \pm 1.28$	$0.349 \pm 0.019$
0.4	$22.8 \pm 1.91$	$1.61 \pm 0.46$	$13.1 \pm 1.25$	$0.350 \pm 0.019$
0.6	$23.0 \pm 3.33$	$1.57 \pm 0.35$	$13.0 \pm 1.28$	$0.200 \pm 0.046$
0.8	$23.0 \pm 1.72$	$2.03 \pm 0.52$	$13.0 \pm 1.00$	$0.303 \pm 0.017$
1.0	$22.2 \pm 0.54$	$2.15 \pm 0.29$	$11.1 \pm 0.48$	$0.315 \pm 0.046$

<sup>1</sup>Sin faloidina, sin trehalosa

**Figura 13. Producción de etanol por células permeabilizadas incubadas con faloidina en presencia de distintas concentraciones de trehalosa.** Los resultados muestran la fermentación de células permeabilizadas con SLO (5 mg ww/mL). Los círculos cerrados indican el control sin faloidina y sin trehalosa. Las siguientes muestras contienen faloidina 59  $\mu\text{M}$  en presencia o ausencia de trehalosa: los triángulos cerrados invertidos sin trehalosa; círculos abiertos 0.2 M trehalosa; cuadros cerrados 0.4 M trehalosa; cuadros abiertos 0.6 M trehalosa; triángulos cerrados 0.8 M trehalosa y triángulos abiertos 1 M trehalosa. La tabla muestra los parámetros cinéticos de la fermentación de las células.

C

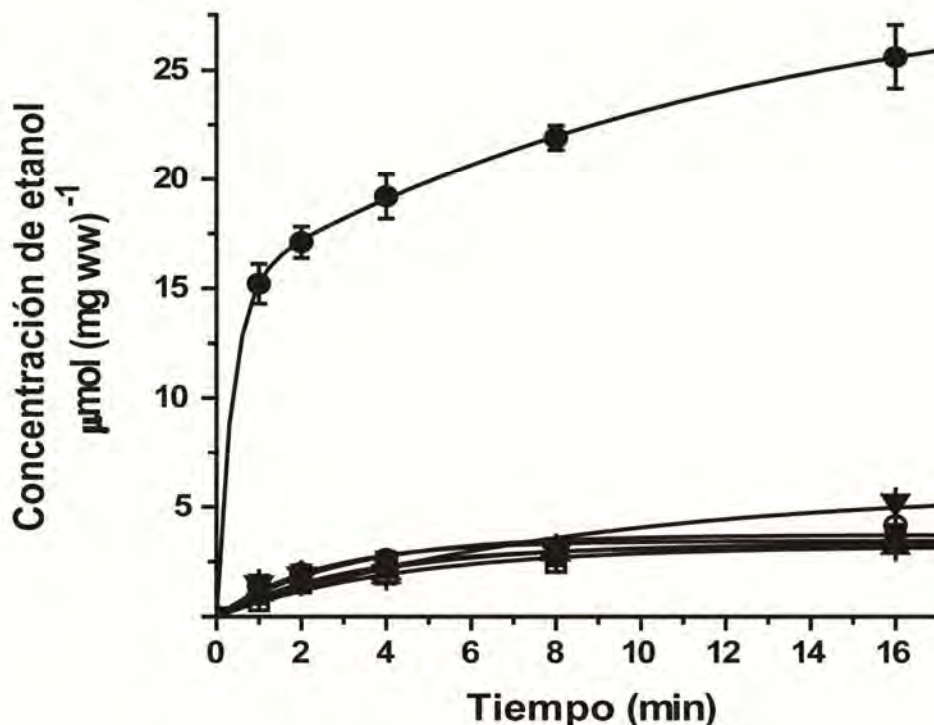


Células permeabilizadas con SLO: CITOCALASINA				
Trehalosa (M)	$[EtOH]_b$ ( $\mu\text{mol EtOH/mg prot}$ )	$k_b$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$[EtOH]_{ss}$ ( $\mu\text{mol EtOH/mg prot}$ )	$k_{ss}$ ( $\text{min}^{-1}$ )
Control <sup>1</sup>	$15.1 \pm 0.38$	$2.69 \pm 0.29$	$14.5 \pm 0.99$	$0.080 \pm 0.014$
0	$6.6 \pm 0.33$	$1.17 \pm 0.38$	$15.7 \pm 1.74$	$0.036 \pm 0.004$
0.2	$6.4 \pm 0.66$	$1.34 \pm 0.41$	$16.0 \pm 2.02$	$0.024 \pm 0.006$
0.4	$6.0 \pm 0.96$	$0.75 \pm 0.23$	$15.5 \pm 2.67$	$0.022 \pm 0.008$
0.6	$5.4 \pm 0.55$	$1.43 \pm 0.36$	$15.6 \pm 1.87$	$0.016 \pm 0.004$
0.8	$5.5 \pm 0.29$	$1.31 \pm 0.33$	$14.6 \pm 2.17$	$0.015 \pm 0.002$
1.0	$5.0 \pm 0.31$	$1.73 \pm 0.39$	$15.4 \pm 1.24$	$0.018 \pm 0.003$

<sup>1</sup>Sin citocalasina, sin trehalosa

**Figura 13. Producción de etanol por células permeabilizadas incubadas con citocalasina D en presencia de distintas concentraciones de trehalosa.** Los resultados muestran la fermentación de células permeabilizadas con SLO (5 mg ww/mL). Los círculos cerrados indican el control sin citocalasina y sin trehalosa. Las siguientes muestras contienen citocalasina 400  $\mu\text{M}$  en presencia o ausencia de trehalosa: los triángulos cerrados invertidos sin trehalosa; círculos abiertos 0.2 M trehalosa; cuadros cerrados 0.4 M trehalosa; cuadros abiertos 0.6 M trehalosa; triángulos cerrados 0.8 M trehalosa y triángulos abiertos 1 M trehalosa. La tabla muestra los parámetros cinéticos de la fermentación de las células.

D



Células permeabilizadas con SLO: LATRUNCULINA				
Trehalosa (M)	$[EtOH]_b$ ( $\mu\text{mol EtOH/mg prot}$ )	$k_b$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$[EtOH]_{ss}$ ( $\mu\text{mol EtOH/mg prot}$ )	$k_{ss}$ ( $\text{min}^{-1}$ )
Control <sup>1</sup>	$15.0 \pm 0.26$	$2.67 \pm 0.21$	$14.1 \pm 0.70$	$0.082 \pm 0.010$
0	ND	ND	$5.8 \pm 1.59$	$0.119 \pm 0.063$
0.2	ND	ND	$3.7 \pm 0.36$	$0.335 \pm 0.095$
0.4	ND	ND	$3.4 \pm 0.19$	$0.411 \pm 0.071$
0.6	ND	ND	$3.2 \pm 0.25$	$0.226 \pm 0.045$
0.8	ND	ND	$3.2 \pm 0.17$	$0.314 \pm 0.047$
1.0	ND	ND	$3.3 \pm 0.29$	$0.272 \pm 0.063$

<sup>1</sup>Sin latrunculina, sin trehalosa

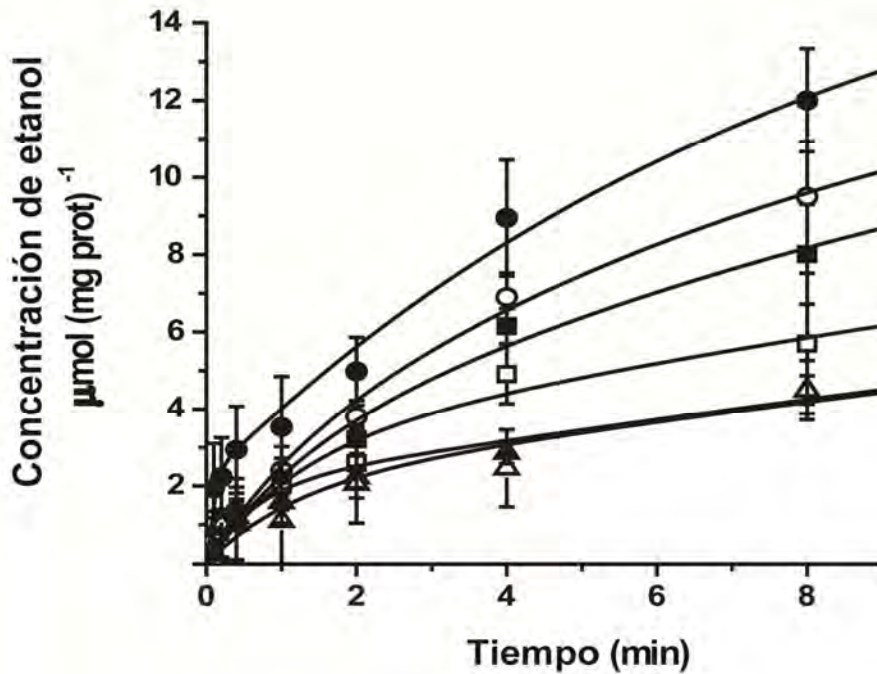
**Figura 13. Producción de etanol por células permeabilizadas incubadas con latrunculina B en presencia de distintas concentraciones de trehalosa.** Los resultados muestran la fermentación de células permeabilizadas con SLO (5 mg ww/mL). Los círculos cerrados indican el control sin latrunculina y sin trehalosa. Las siguientes muestras contienen latrunculina 200  $\mu\text{M}$  en presencia o ausencia de trehalosa: los triángulos cerrados invertidos sin trehalosa; círculos abiertos 0.2 M trehalosa; cuadros cerrados 0.4 M trehalosa; cuadros abiertos 0.6 M trehalosa; triángulos cerrados 0.8 M trehalosa y triángulos abiertos 1 M trehalosa. La tabla muestra los parámetros cinéticos de la fermentación de las células.

Los resultados en las células permeabilizadas sugieren que el citoesqueleto es un andamio o soporte para el metabolón glucolítico. Para explorar esta posibilidad decidimos eliminar la membrana plasmática, obteniendo extractos citoplásmicos (Fig. 14). En estos extractos se cuantificó la fermentación en muestras donde el estado de la actina variaba. La fermentación se evaluó a diferentes concentraciones de trehalosa. Los extractos no tratados produjeron cerca de  $12 \mu\text{mol}$  de etanol  $(\text{mg prot})^{-1}$  en 8 minutos y las adiciones crecientes de trehalosa disminuyeron la fermentación hasta  $4 \mu\text{mol}$  de etanol  $(\text{mg prot})^{-1}$ . De acuerdo con esto, observamos que la velocidad rápida ( $k_b$ ) en la producción de etanol de las células permeabilizadas disminuyó aproximadamente 45%, mientras que la fase lenta  $k_{ss}$  se inhibió hasta en un 80% (Fig. 14 A). Se observó que la faloidina incrementa la fermentación cerca de  $19 \mu\text{mol}$  de etanol  $(\text{mg prot})^{-1}$  en 8 min. La adición de diferentes concentraciones de trehalosa hasta 1 M disminuyó la producción de etanol a  $12 \mu\text{mol}$   $(\text{mg prot})^{-1}$  en 8 minutos. La fase rápida de la producción de etanol  $k_b$  fue similar al control, aunque resistente a la trehalosa, mientras que la fase lenta  $k_{ss}$  fue también mayor con respecto al control, pero se inhibió por la trehalosa sólo en un 35% (Fig. 14 B). Las muestras tratadas con citocalasina fermentaron hasta  $4 \mu\text{mol}$  de etanol  $(\text{mg prot})^{-1}$  en 8 minutos y la trehalosa 1 M inhibió esta producción de etanol hasta  $1 \mu\text{mol}$   $(\text{mg prot})^{-1}$ . La fermentación fue muy baja aun en ausencia de trehalosa y además el estallido inicial en la actividad desapareció (Fig. 14 C). Las muestras tratadas con latrunculina produjeron muy poco etanol, aproximadamente  $2 \mu\text{mol}$   $(\text{mg prot})^{-1}$  y las diferentes concentraciones de trehalosa inhibieron por completo la

fermentación (Fig. 14 D). Todo esto se ve reflejado en los datos cinéticos. Observamos por tanto, que en los extractos citoplásmicos, la producción de etanol es mucho menor que en las células permeabilizadas y que el estallido inicial rápido se perdió con la presencia de agentes despolimerizantes.



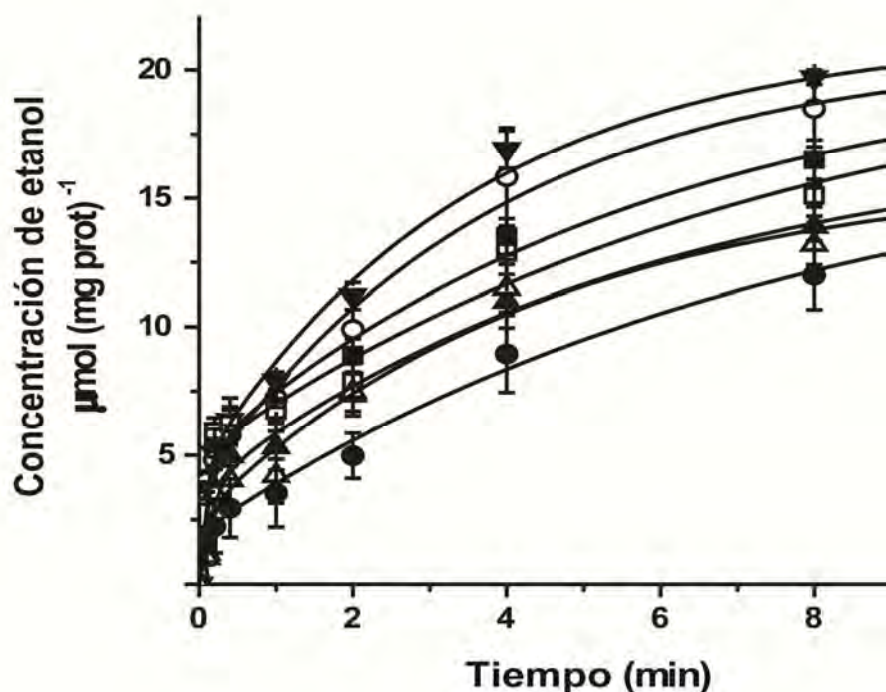
**A**



Extracto citoplásmico: CONTROL				
Trehalosa (M)	$[EtOH]_b$ ( $\mu\text{mol EtOH/mg prot}$ )	$k_b$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$[EtOH]_{ss}$ ( $\mu\text{mol EtOH/mg prot}$ )	$k_{ss}$ ( $\text{min}^{-1}$ )
0	$2.2 \pm 0.36$	$13.7 \pm 2.38$	$15.9 \pm 0.56$	$0.128 \pm 0.013$
0.2	$2.0 \pm 0.03$	$0.89 \pm 0.27$	$13.0 \pm 0.48$	$0.105 \pm 0.021$
0.4	$2.5 \pm 0.71$	$0.77 \pm 0.22$	$13.0 \pm 0.80$	$0.079 \pm 0.016$
0.6	$3.0 \pm 0.65$	$0.79 \pm 0.21$	$13.0 \pm 1.80$	$0.038 \pm 0.007$
0.8	$2.0 \pm 0.34$	$0.95 \pm 0.24$	$14.1 \pm 1.70$	$0.021 \pm 0.005$
1.0	$2.0 \pm 0.55$	$0.84 \pm 0.23$	$14.3 \pm 2.55$	$0.020 \pm 0.008$

**Figura 14. Fermentación en extractos citoplásmicos de levadura en presencia de distintas concentraciones de trehalosa.** Los resultados muestran la fermentación en extractos citoplásmicos ( $1 \text{ mg proteína} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Los círculos cerrados indican el control sin trehalosa; los círculos abiertos  $0.2 \text{ M}$  trehalosa; cuadros cerrados  $0.4 \text{ M}$  trehalosa; cuadros abiertos  $0.6 \text{ M}$  trehalosa; triángulos cerrados  $0.8 \text{ M}$  trehalosa y triángulos abiertos  $1 \text{ M}$  trehalosa. La tabla muestra los parámetros cinéticos de la fermentación en los extractos.

**B**

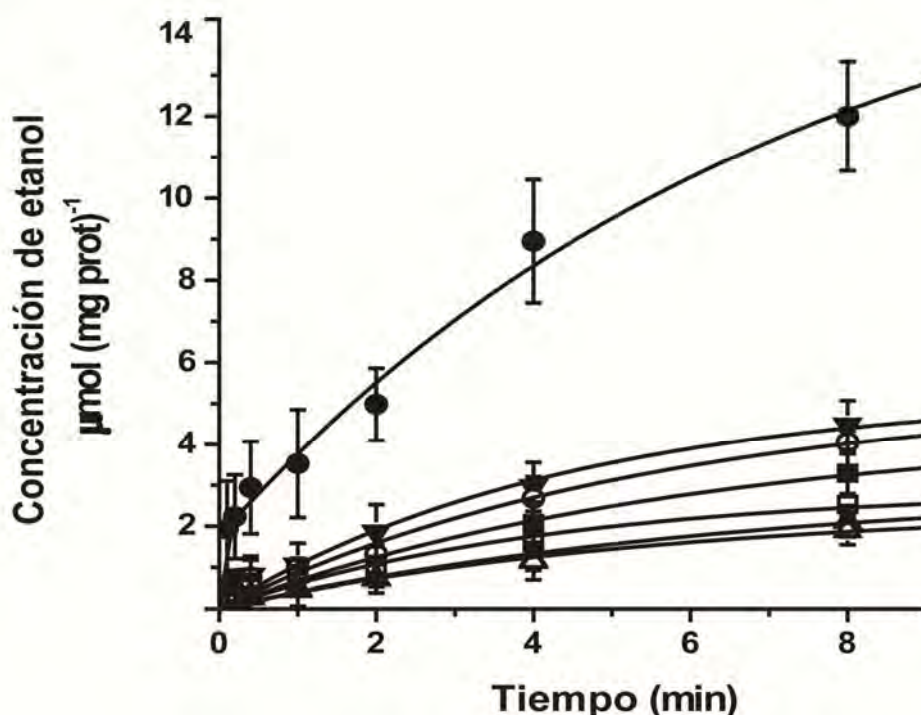


Extracto citoplásmico: FALOIDINA				
Trehalosa (M)	$[EtOH]_b$ ( $\mu\text{mol EtOH/mg prot}$ )	$k_b$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$[EtOH]_{ss}$ ( $\mu\text{mol EtOH/mg prot}$ )	$k_{ss}$ ( $\text{min}^{-1}$ )
Control <sup>1</sup>	$2.1 \pm 0.26$	$13.8 \pm 2.25$	$15.8 \pm 0.48$	$0.126 \pm 0.063$
0	$4.4 \pm 0.46$	$13.0 \pm 1.87$	$16.9 \pm 0.46$	$0.284 \pm 0.033$
0.2	$3.7 \pm 0.41$	$14.2 \pm 1.11$	$17.0 \pm 0.49$	$0.264 \pm 0.028$
0.4	$4.9 \pm 0.63$	$7.6 \pm 1.41$	$15.7 \pm 0.83$	$0.171 \pm 0.029$
0.6	$5.0 \pm 0.83$	$8.3 \pm 1.76$	$16.2 \pm 1.36$	$0.132 \pm 0.031$
0.8	$3.7 \pm 0.46$	$6.4 \pm 0.8$	$13.9 \pm 0.57$	$0.170 \pm 0.024$
1.0	$2.6 \pm 0.75$	$8.5 \pm 1.8$	$13.5 \pm 0.73$	$0.217 \pm 0.048$

<sup>1</sup>Sin faloidina, sin trehalosa

**Figura 14. Fermentación en extractos citoplásmicos de levadura incubados con faloidina en presencia de distintas concentraciones de trehalosa.** Los resultados muestran la fermentación en extractos citoplásmicos ( $1 \text{ mg proteína} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Los círculos cerrados indican el control sin faloidina y sin trehalosa. Las siguientes muestras contienen faloidina  $59 \mu\text{M}$  en presencia o ausencia de trehalosa: los triángulos cerrados invertidos sin trehalosa; círculos abiertos  $0.2 \text{ M}$  trehalosa; cuadros cerrados  $0.4 \text{ M}$  trehalosa; cuadros abiertos  $0.6 \text{ M}$  trehalosa; triángulos cerrados  $0.8 \text{ M}$  trehalosa y triángulos abiertos  $1 \text{ M}$  trehalosa. La tabla muestra los parámetros cinéticos de la fermentación en los extractos.

C

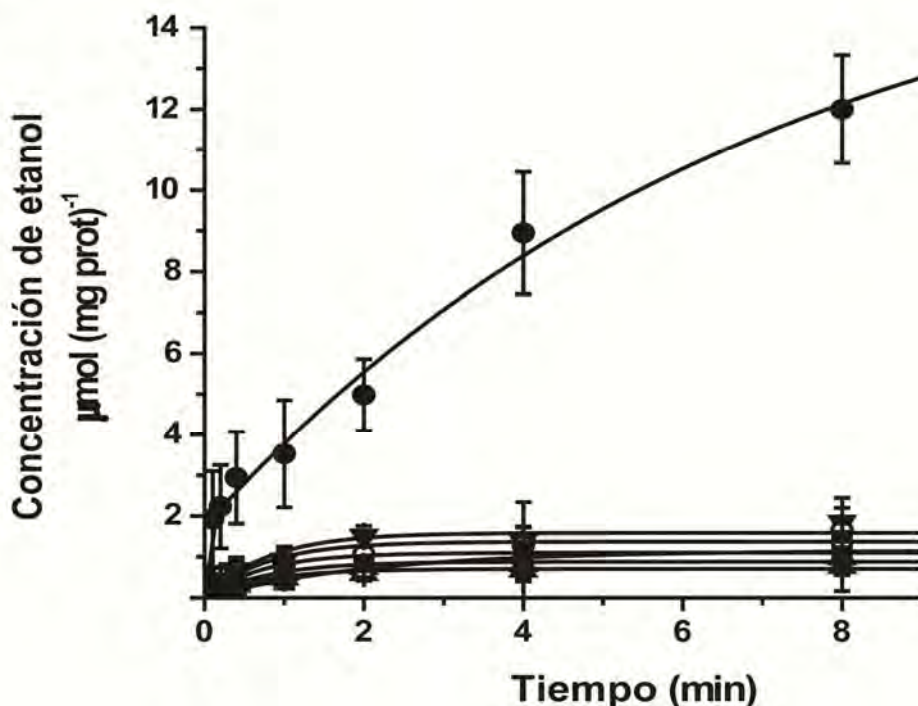


Extracto citoplásmico: Citocalasina				
Trehalosa (M)	$[EtOH]_b$ (µmol EtOH/mg prot)	$k_b$ (min <sup>-1</sup> )	$[EtOH]_{ss}$ (µmol EtOH/mg prot)	$k_{ss}$ (min <sup>-1</sup> )
Control <sup>1</sup>	2.0 ± 0.25	13.8 ± 2.25	15.7 ± 0.46	0.128 ± 0.009
0	ND	ND	5.2 ± 0.74	0.223 ± 0.058
0.2	ND	ND	5.3 ± 0.54	0.178 ± 0.061
0.4	ND	ND	4.4 ± 0.17	0.165 ± 0.073
0.6	ND	ND	2.9 ± 0.59	0.231 ± 0.091
0.8	ND	ND	3.0 ± 0.82	0.146 ± 0.063
1.0	ND	ND	2.5 ± 0.41	0.173 ± 0.048

<sup>1</sup>Sin citocalasina, sin trehalosa

**Figura 14. Fermentación en extractos citoplásmicos de levadura incubados con citocalasina D en presencia de distintas concentraciones de trehalosa.** Los resultados muestran la fermentación en extractos citoplásmicos (1 mg proteína·mL<sup>-1</sup>). Los círculos cerrados indican el control sin citocalasina y sin trehalosa. Las siguientes muestras contienen citocalasina 400 µM en presencia o ausencia de trehalosa: triángulos cerrados invertidos sin trehalosa; círculos abiertos 0.2 M trehalosa; cuadros cerrados 0.4 M trehalosa; cuadros abiertos 0.6 M trehalosa; triángulos cerrados 0.8 M trehalosa y triángulos abiertos 1 M trehalosa. La tabla muestra los parámetros cinéticos de la fermentación en los extractos.

D



Extracto citoplásmico: LATRUNCULINA				
Trehalosa (M)	$[EtOH]_1$ ( $\mu\text{mol EtOH/mg prot}$ )	$k_b$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$[EtOH]_2$ ( $\mu\text{mol EtOH/mg prot}$ )	$k_{ss}$ ( $\text{min}^{-1}$ )
Control <sup>1</sup>	$2.0 \pm 0.25$	$13.8 \pm 2.25$	$15.7 \pm 0.46$	$0.128 \pm 0.009$
0	ND	ND	$1.59 \pm 0.14$	$1.266 \pm 0.385$
0.2	ND	ND	$1.37 \pm 0.14$	$1.315 \pm 0.478$
0.4	ND	ND	$1.10 \pm 0.10$	$1.359 \pm 0.460$
0.6	ND	ND	$1.15 \pm 0.10$	$0.475 \pm 0.113$
0.8	ND	ND	$0.88 \pm 0.04$	$1.266 \pm 0.203$
1.0	ND	ND	$0.71 \pm 0.03$	$1.314 \pm 0.191$

<sup>1</sup>Sin latrunculina, sin trehalosa

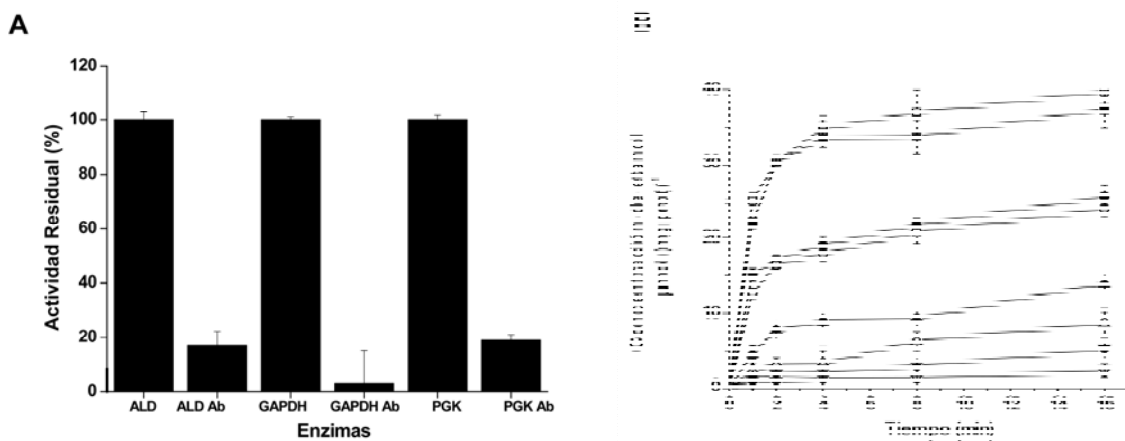
**Figura 14. Fermentación en extractos citoplásmicos de levadura incubados con latrunculina B en presencia de distintas concentraciones de trehalosa.** Los resultados muestran la fermentación en extractos citoplásmicos ( $1 \text{ mg proteína} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Los círculos cerrados indican el control sin latrunculina y sin trehalosa. Las siguientes muestras contienen latrunculina  $200 \mu\text{M}$  en presencia o ausencia de trehalosa: triángulos cerrados invertidos sin trehalosa; círculos abiertos  $0.2 \text{ M}$  trehalosa; cuadros cerrados  $0.4 \text{ M}$  trehalosa; cuadros abiertos  $0.6 \text{ M}$  trehalosa; triángulos cerrados  $0.8 \text{ M}$  trehalosa y triángulos abiertos  $1 \text{ M}$  trehalosa. La tabla muestra los parámetros cinéticos de la fermentación en los extractos.

La comparación de los datos de las células permeabilizadas y los extractos citoplásmicos indica que la producción de etanol *in situ* es más alta en la célula, probablemente debido a una mejor preservación de la arquitectura, sugiriendo fuertemente que el metabolón glucolítico está presente en la levadura y es estabilizado por el citoesqueleto. En contraste, los extractos citoplásmicos parecen ser más sensibles al fármaco debido probablemente a la mayor accesibilidad a las moléculas y a la difusión de éstas al separarse de su sitio de anclaje.

### **7.6 En complejo con F-actina, las enzimas son protegidas contra la inhibición por sus anticuerpos**

Los resultados sugieren que en la levadura la F-actina pero no la G-actina, favorece la organización de la vía glucolítica, haciendo más eficiente la fermentación. Al parecer en el complejo, las enzimas se protegen de la inhibición generada por los solutos compatibles. Para caracterizar un poco más el complejo glucolítico, decidimos probar el efecto de anticuerpos específicos contra GAPDH, PGK y ALD. Al analizar el efecto de los anticuerpos sobre su enzima correspondiente, encontramos que la actividad de cada una se inhibió aproximadamente 80% (Fig. 15 A). Por otro lado al agregar anti-ALD a las células permeabilizadas con estreptolisina O (SLO) (Fig. 15 B) encontramos que la fermentación fue resistente al anticuerpo, manteniendo la producción de etanol en  $20 \mu\text{mol (mg ww)}^{-1}$  en 16 min. Al favorecer la polimerización de actina con faloidina, encontramos que la producción de etanol fue de  $40 \mu\text{mol (mg ww)}^{-1}$  en 16 min, y no se afectó por la presencia del anticuerpo contra ALD. Sin embargo,

la presencia de citocalasina D y el anti-ALD inhibieron la fermentación hasta alcanzar  $6 \mu\text{mol}$  de etanol  $(\text{mg ww})^{-1}$  en 16 min. En el caso se las muestras tratadas con latrunculina y el anticuerpo la fermentación fue de  $2 \mu\text{mol}$  etanol  $(\text{mg ww})^{-1}$  en 16 min, la mitad con respecto a su control (Fig. 15 B). Se observaron efectos similares al utilizar anticuerpos contra GAPDH y PGK (datos no mostrados).

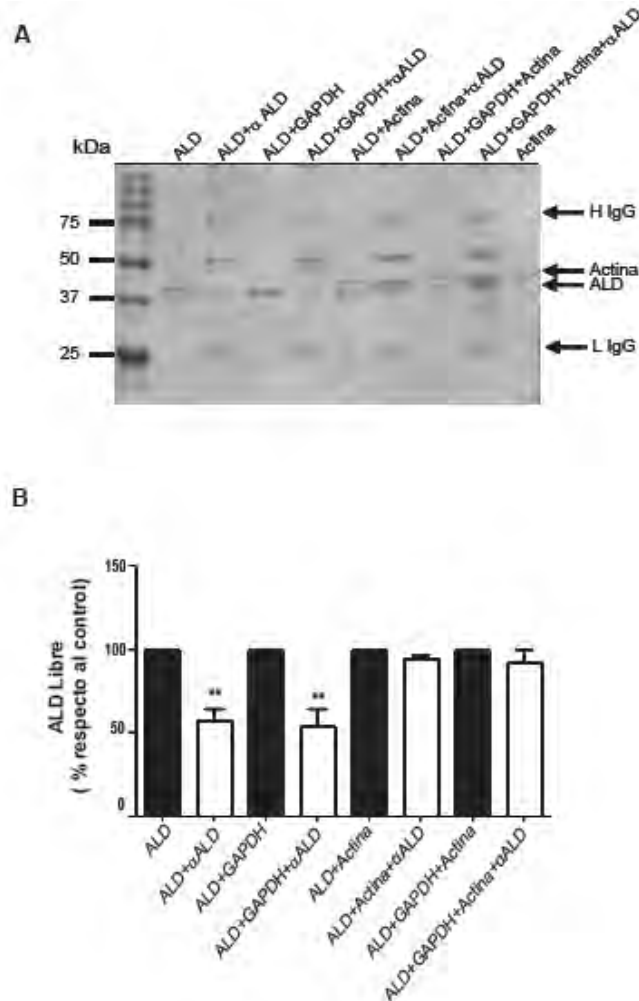


**Figura 15. Efecto de anticuerpos específicos en la actividad de la ALD y otras enzimas glucolíticas.**

(A) La actividad de ALD, GAPDH y PGK se cuantificó como se describe en los resultados en ausencia y presencia de  $48 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de anti-ALD, anti-GAPDH y anti-PGK. (B) El efecto del anticuerpo de ALD sobre la actividad de la misma se cuantificaron en células permeabilizadas con SLO sin tratar o tratadas con faloidina, citocalasina o latrunculina. Las condiciones utilizadas son las mismas que de la Fig. 13, los círculos cerrados indican células permeabilizadas con sin fármacos; círculos abiertos indican células permeabilizadas con anti-ALD; círculos cerrados indican células permeabilizadas tratadas previamente con faloidina; cuadrados abiertos indican células permeabilizadas con faloidina y anti-ALD; triángulos cerrados indican células permeabilizadas tratadas previamente con citocalasina D; triángulos abiertos indican células permeabilizadas con citocalasina D y anti-ALD; triángulos cerrados invertidos indican células permeabilizadas tratadas previamente con latrunculina B; triángulos abiertos invertidos indican células permeabilizadas tratadas previamente con latrunculina B y anti-ALD. El etanol se midió con ADH.

Los datos de la falta de inhibición por anticuerpos apoyan la idea que la F-actina promueve la formación de un complejo multienzimático glucolítico, donde las enzimas aisladas se protegen del alcance de diversos anticuerpos específicos. Además, posiblemente el citoesqueleto se encuentre formando una red parcialmente impermeable que evita que los anticuerpos alcancen a las enzimas. Sin embargo, este entramado puede hacerse permeable a algunas moléculas grandes como los anticuerpos al monomerizarse los filamentos de actina. El estado monomérico G-actina no parece favorecer la asociación, lo que expone parcialmente a las enzimas aisladas. Una posible explicación para estos datos podría ser que la modificación del citoesqueleto por los diferentes efectores en las células permeabilizadas, expone a las moléculas en el interior a los anticuerpos respectivos. Para evaluar el papel protector de los filamentos de actina, decidimos analizar *in-vitro* la protección brindada por la actina a algunas enzimas glucolíticas contra sus anticuerpos. Como un control inicial, analizamos la ALD en presencia o ausencia de su anticuerpo, así como la mezcla con GAPDH, actina o ambas, evaluando en cada caso el efecto sobre la ALD por medio de SDS-PAGE (Fig. 16 A). En el caso de la ALD y la mezcla ALD-GAPDH observamos que la presencia del anti-ALD sí tuvo efecto, a diferencia de las mezclas que contenían actina (Fig. 16 A). Mediante densitometría cuantificamos la intensidad de las bandas, identificando así las diferencias entre los diferentes tratamientos (Fig. 16 B). Observamos que aun en la mezcla aislada, carente de membrana, la actina parece prevenir el efecto del anticuerpo sobre su enzima específica (Fig. 16),

sugiriéndose con esto que al menos algunas de las enzimas están protegidas del medio por la actina.



**Figura 16. Efecto de la actina y GAPDH sobre la unión del anticuerpo para ALD a la ALD.** ALD se mezcló con su anticuerpo en ausencia y presencia de GAPDH, actina o la mezcla GAPDH/actina. (A) Se utilizó la mezcla para la actividad de ALD 9µg/ml; ALD 9 µg/ml (carriles 3, 5, 7 y 9), GAPDH 9µg/ml (carriles 4, 5, 8 y 9) y Actina 8.5 µg/ml (carriles 6, 7, 8, 9 y 10). Después de 30 min de incubación se llevo a cabo un SDS-PAGE con todas las muestras. Las bandas para las cadenas pesadas (H IgG) y ligeras (L) del anticuerpo se indica en el gel. (B) La densitometría se llevó a cabo entre las muestras no tratadas y tratadas. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes ± SEM. One-way ANOVA (Dunnett's Multiple Comparison Test) con una **\*\*P < 0.01** respecto a las muestras no tratados.



Los resultados presentados hasta ahora sugieren que: la F-actina sirve como andamio para las enzimas glucolíticas; que el metabolón glucolítico parece ser más eficiente para producir etanol a partir de glucosa que las enzimas aisladas y que el complejo metabólico protege a las enzimas glucolíticas contra distintas condiciones inhibitorias.

## **8. DISCUSIÓN**

Los metabolones son complejos de enzimas que participan en secuencia dentro de una vía metabólica [1, 46]. Se ha propuesto que los metabolones incrementan la eficiencia metabólica a través del paso directo de intermediarios a través de las enzimas, evitando así la difusión al medio [27, 29]. Además en estos complejos, los sitios activos individuales se pueden proteger de los inhibidores competitivos [30].

Recientemente, también se ha propuesto que las enzimas dentro de los metabolones están protegidas contra otras condiciones adversas, tales como el aumento de la viscosidad, que resulta de la acumulación de solutos compatibles en respuesta al estrés [4, 165].

### **8.1 Las enzimas de una vía metabólica pueden anclarse al citoesqueleto**

Aun es cuestión de debate la organización de la vía glucolítica en metabolones [93]. En los mamíferos, muchas enzimas glucolíticas interactúan con el citoesqueleto [83, 84, 92, 180] a través de dominios de unión específicos que se encuentran en la tubulina [181] y la actina [179, 180]. Los estudios detallados con actina polimerizada revelaron que la ALD y GAPDH están firmemente unidas a F-actina, PFK y PK presentan una unión bastante estrecha con F-actina y GPI, TPI, PGAM y ENO no interactúan con la actina o su unión es menos firme [76, 84, 89, 90, 98].

Las enzimas consecutivas como ALD, GAPDH y PGK se asocian e interactúan directamente con la actina [90]. Aunque cuatro de las enzimas de la

ruta glucolítica no se asocian con la actina directamente, se sugiere que si acaso existe un complejo enzimático de esta vía, estas enzimas no adsorbibles interactúan con una o más de las enzimas que se unen a actina [90]. Este mecanismo es conocido como “piggy backing” [74, 76, 90] y se observó en la PGAM, que interactúa con la LDH, que a su vez se une a F-actina [74, 90]. En los mamíferos, la ALD y GAPDH parecen anclar el complejo glucolítico a la actina [94, 182]. En la levadura, se ha demostrado que muchas enzimas glucolíticas se unen entre sí y a la actina. El papel de la actina como un andamio para la metabolón glucolítico parece ser dinámico, ya que los filamentos oligoméricos de actina, pero no los monómeros, mantienen dicha unión.

Las interacciones de las enzimas de la vía glucolítica/actina han sido descritas en eucariontes superiores [74]. Células de *S. cerevisiae* exhiben las mismas fuerzas electrostáticas que los eucariontes superiores [74]. Nuestros resultados indican que las interacciones de F-actina-enzimas también se producen en levadura (Figs. 7-11). Tal como se observa en los mamíferos, la mayoría de las enzimas glucolíticas de levadura se unen a la actina. Sin embargo, en la levadura algunas enzimas importantes, como PFK y PK, no se unen a la actina (Figs. 9 y 10).

Estas observaciones indican que en la levadura las interacciones son de baja afinidad, tal como se predijo por los estudios de Dinámica Browniana [74]. La baja afinidad se debe probablemente, al menos en parte, al hecho de que la actina de levadura tiene dos residuos menos de aminoácidos cargados negativamente en el N-terminal [74]. La diferencia en la estructura puede ser una de las razones de

la falta de asociación, ya que las superficies de las enzimas poseen sorprendentemente diferentes capacidades para la unión con actina [91, 183]. Tanto la ALD como GAPDH muestran una fuerte afinidad por la actina, tanto en el músculo [91] y en la levadura (Figs. 9 y 10). En contraste, en la levadura PFK, PGAM y PK no se unen actina (Figs. 9 y 10); una razón para esta diferencia puede ser la variación en la estructura de la enzima. En los mamíferos, la PFK es un homo-tetrámero, mientras que en especies de levadura como *S. cerevisiae* y *Kluyveromyces lactis*, PFK es un hetero-octámero [180]. De hecho, no se han detectado interacciones de PFK con F-actina [180]. Probablemente, las interacciones actina/enzima juegan un papel importante en la compartimentalización y la canalización de sustratos [74]. Por lo tanto, aunque la interacción de algunas enzimas de levadura por la actina sea débil, esto no significa que no existe un metabolón. Es posible un esquema de unión alternativa, en el cual algunas enzimas de levadura podrían interactuar con el citoesqueleto mediante “piggy backing” [74].

La vía glucolítica probablemente utiliza el citoesqueleto como un andamio [2, 91]. Las interacciones actina/enzima son electrostáticas [90], por lo que el pH, la fuerza iónica [97] y los cationes [76] modulan la unión [97] y por consiguiente la cinética de la enzima, las interacciones entre enzimas y la estructura de los filamentos de actina [184]. La asociación con el citoesqueleto estabiliza la estructura de la enzima [1, 47, 48], por ejemplo, la inactivación de la PFK dada por dilución se evita pero no se revierte por la adición de ALD; mientras que en presencia de microtúbulos la ALD reactiva por completo a la PFK [77, 83].

## **8.2 La asociación enzimas/actina protege y estabiliza la vía glucolítica**

En respuesta al estrés, los solutos compatibles se acumulan en el citoplasma y protegen a las membranas y las proteínas [110]. La estabilización es resultado de la disminución de la vibración proteica causada por el aumento de la viscosidad [121, 122]. Precisamente, la teoría de Kramer propone que la viscosidad del medio inhibe los movimientos estructurales de las proteínas y por lo tanto la catálisis. La viscosidad es probablemente la razón por la cual los solutos compatibles se eliminan rápidamente [150], ya que parece inhibir el crecimiento [131]. Durante la liofilización y la inactivación térmica, la H<sup>+</sup>-ATPasa de membrana plasmática de *K. lactis* se protegió por trehalosa; sin embargo, su actividad fue inhibida transitoriamente [122]. Se propuso que los solutos compatibles inhiben los flujos metabólicos a causa del aumento de viscosidad [185].

Muchos factores controlan la unión de las enzimas glucolíticas entre sí y con el citoesqueleto, siendo un importante modulador de funciones metabólicas [97]. Al parecer, la asociación/disociación de enzimas regula la actividad metabólica [26], tal y como observamos con la protección de varias enzimas de la vía glucolítica contra de la inhibición mediada por viscosidad [4]. Nosotros reportamos en este trabajo que las enzimas de la vía glucolítica junto con la F-actina forman un complejo (Figs. 9-14). Además, se demuestra que las enzimas de la glucólisis en asociación con la actina mantienen su actividad incluso a concentraciones altas de soluto compatible (Figs. 12-14). Las enzimas de este complejo fueron resistentes contra la inhibición mediada por trehalosa (Figs. 12-

14) y contra la inactivación por los anticuerpos (Figs. 15 y 16). Al parecer los complejos enzimáticos favorecen y hacen más estable el plegamiento proteico, al eliminar algunos estados conformacionales improductivos [162]. Esto explica el aumento de eficiencia catalítica y la resistencia contra la inhibición mediada por viscosidad [122].

Se ha descrito a la glucólisis como una serie de pasos individuales, por lo tanto la comprensión como un todo parece ser más difícil. Muchos grupos han estudiado el comportamiento de la vía glucolítica utilizando numerosos métodos experimentales y aproximaciones computacionales [186]. Sorensen [187] propuso un método en el que una vía bioquímica se ajusta a un modelo utilizando concentraciones experimentales de sustrato, así como propiedades dinámicas en las que el mecanismo enzimático se conoce. En consecuencia, las constantes de velocidad y las velocidades máximas de la vía glucolítica se pueden calcular a partir de datos experimentales mediante álgebra simple sin la integración de las ecuaciones cinéticas [185].

De manera interesante, bajo condiciones específicas, el comportamiento de la vía glucolítica presenta un rápido aumento en la actividad seguido por oscilaciones en la concentración de distintos intermediarios, coenzimas y moléculas extracelulares. La importancia biológica de este comportamiento se ha debatido [186]. Se han utilizado células intactas de *S. cerevisiae* para ajustes glucolíticos y oscilaciones de intermediarios [188-191] que han llevado a proponer un modelo que contempla un flujo metabólico inicial rápido seguido de una cinética más lenta [185, 187].

En nuestros experimentos se midió la tasa de producción de etanol (Fig. 13 y 14), el primer producto del ciclo catalítico de la ADH. La cinética de producción de etanol exhibe un "burst" inicial que representa un estado pre-estacionario de reacción rápida del acetaldehído que junto con ADH-NADH generan etanol. El complejo ADH-NADH formado, posteriormente es liberado. El NAD se libera para permitir que la ADH comience un nuevo ciclo catalítico [177, 178]. El "burst" inicial, por tanto, se origina cuando la ADH está completamente saturada con NADH, es decir, cuando el complejo ADH-NADH está ya formado (Ec. 2). Lo anterior se observó principalmente en las células permeabilizadas donde la concentración de NADH es alta (Figs. 13 y 14) como resultado de una glucólisis activa. En *S. cerevisiae*, Hald & Sørensen demostraron recientemente que la concentración de NADH se eleva inmediatamente cuando se agrega la glucosa [185]. Por lo tanto, el primer sustrato para la ADH se proporciona de inmediato y antes que el acetaldehído se acumule al final de la vía glicolítica. Es así que la amplitud del "burst" muestra la cantidad de ADH inicialmente en complejo con NADH antes de que la reacción de ADH alcance las condiciones para el estado estacionario.

Nuestros datos indican que cuando el citoesqueleto está intacto, se produce un estallido inicial en la actividad, probablemente como resultado de la actividad de la alcohol deshidrogenasa que está saturada con  $\text{NADH} + \text{H}^+$ ; posteriormente, ocurre una segunda fase en donde la cinética se encuentra en estado estacionario. La reducción del  $\text{NAD}^+$  necesario en esta segunda etapa, parece ser más eficiente en presencia de un citoesqueleto intacto que probablemente permita la canalización del NADH/NAD entre enzimas encargadas de la reducción y la

oxidación (Figs. 13-14). En extractos citoplásmicos, la inhibición de la glucólisis debido a la despolimerización del citoesqueleto es más evidente. Probablemente se deba a que al disgregarse los filamentos de actina las enzimas glucolíticas se disocian y difunden libremente en la célula.

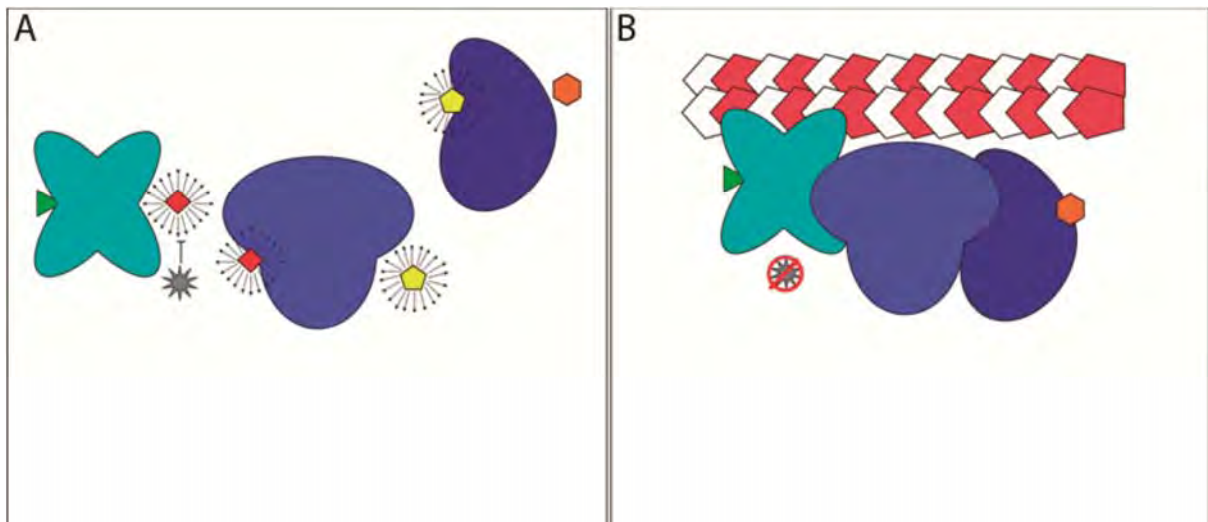
Se ha reportado que las células cosechadas cuando la glucosa se depleta o después, exhiben un flujo glucolítico constante, lo cual concuerda con la fase estacionaria observada en nuestros experimentos de fermentación (Figs. 13-14). El flujo constante parece ser el resultado de la "bifurcación supercrítica de Hopf" [185, 187] propuesta para el metabolismo de la glucosa, donde la saturación se encuentra cerca del punto de bifurcación de la glucosa, dando lugar a concentraciones estables de metabolitos. En consecuencia, las células depletadas de glucosa pueden ser utilizadas para estimar los flujos metabólicos del sistema [187]. La estequiometría y el tipo de los metabolitos, así como la ramificación de la red son necesarios para analizar el comportamiento cinético de un complejo de enzimas que trabajan juntas [186]. Parece que la estequiometría de la red induce restricciones dinámicas sobre los cambios de concentración derivados de la conservación de masas [185].

Es así que nuestros datos brindan mayor soporte al concepto de que el citoesqueleto es una red dinámica en la que diferentes proteínas interactúan. En donde este fenómeno apenas explorado parece modular vías metabólicas completas, tal y como se observa cuando se utilizan fármacos contra actina durante la fermentación (Figs. 13 y 14). El citoesqueleto además de asociarse con la vía glucolítica también lo hace con distintos organelos. Durante la división



celular, tanto la actina como la tubulina dirigen a la mitocondria hacia sitios específicos en la célula. La tubulina se encarga de controlar el acoplamiento de la fosforilación oxidativa mitocondrial al interactuar con VDAC [56].

En resumen, en el citoplasma, las enzimas glucolíticas parecen estar altamente organizadas [12] utilizando al citoesqueleto como un andamio [47] (Fig. 17). Por lo tanto, el citoesqueleto es necesario para la asociación, la estabilidad y la protección de las enzimas de la vía glucolítica y probablemente muchas otras. Tal parece que la asociación de la actina con las enzimas glucolíticas regula la catálisis y aumenta la resistencia contra la inactivación durante el estrés. Esto puede constituir una nueva propiedad y la razón de ser de metabolones.



**Figura 17. Ventajas de los metabolones.** A: En enzimas aisladas el sustrato (verde), los intermediarios (rojo y amarillo) y el producto (naranja), difunden en la fase acuosa (pequeñas flechas). Los intermediarios tóxicos e inhibidores (gris) se encuentran libres para ocupar el sitio activo de cada enzima. B: En los metabolones (mostramos el filamento de actina en rojo y blanco) la canalización permite la transferencia del sustrato (verde) desde el sitio activo de una enzima directamente al siguiente hasta obtener un producto final (naranja) sin difundir al citoplasma, evitando así que los inhibidores (gris) alcancen el sitio activo.

## 9. CONCLUSIONES

- Las enzimas de la glucólisis en *S. cerevisiae* se asocian específicamente entre sí.
- La asociación en metabolones de las enzimas de la vía glucolítica de *S. cerevisiae* es estabilizada por la actina F.
- El metabolón descrito en *S. cerevisiae* protege a las enzimas contra la inhibición por viscosidad o por anticuerpos.
- La protección a condiciones adversas o inhibidores es una ventaja más de la existencia del metabolón encontrado en *S. cerevisiae*.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Ovadi J & Saks V (2004) On the origin of intracellular compartmentation and organized metabolic systems. *Mol Cell Biochem* **256-257**, 5-12.
2. Srere PA (1987) Complexes of sequential metabolic enzymes. *Annu Rev Biochem* **56**, 89-124.
3. Minaschek G, Groschel-Stewart U, Blum S & Bereiter-Hahn J (1992) Microcompartmentation of glycolytic enzymes in cultured cells. *Eur J Cell Biol* **58**, 418-428.
4. Araiza-Olivera D, Sampedro JG, Mujica A, Pena A & Uribe-Carvajal S (2010) The association of glycolytic enzymes from yeast confers resistance against inhibition by trehalose. *FEMS Yeast Res* **10**, 282-289.
5. Ellis RJ & Minton AP (2003) Cell biology: join the crowd. *Nature* **425**, 27-28.
6. Chebotareva NA (2007) Effect of molecular crowding on the enzymes of glycogenolysis. *Biochemistry (Mosc)* **72**, 1478-1490.
7. Srere PA & Ovadi J (1990) Enzyme-enzyme interactions and their metabolic role. *FEBS Lett* **268**, 360-364.
8. Green DE, Murer E, Hultin HO, Richardson SH, Salmon B, Brierley GP & Baum H (1965) Association of integrated metabolic pathways with membranes. I. Glycolytic enzymes of the red blood corpuscle and yeast. *Arch Biochem Biophys* **112**, 635-647.
9. Clegg JS (1964) The Control of Emergence and Metabolism by External Osmotic Pressure and the Role of Free Glycerol in Developing Cysts of *Artemia Salina*. *J Exp Biol* **41**, 879-892.
10. Fulton AB (1982) How crowded is the cytoplasm? *Cell* **30**, 345-347.
11. Porter KR (1984) The cytomatrix: a short history of its study. *J Cell Biol* **99**, 3s-12s.
12. Clegg JS & Jackson SA (1989) Evidence for intermediate channelling in the glycolytic pathway of permeabilized L-929 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **160**, 1409-1414.
13. Ovadi J, Salerno C, Keleti T & Fasella P (1978) Physico-chemical evidence for the interaction between aldolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Eur J Biochem* **90**, 499-503.
14. Weber JP & Bernhard SA (1982) Transfer of 1,3-diphosphoglycerate between glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase via an enzyme-substrate-enzyme complex. *Biochemistry* **21**, 4189-4194.
15. Kvassman J & Pettersson G (1989) Evidence that 1,3-bisphosphoglycerate dissociation from phosphoglycerate kinase is an intrinsically rapid reaction step. *Eur J Biochem* **186**, 261-264.
16. Kellershohn N & Seydoux FJ (1979) Functional asymmetry of tetrameric glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the transient kinetics of reductive dephosphorylation of 1,3-diphosphoglycerate. *Biochemistry* **18**, 2465-2470.
17. Ashmarina LI, Muronetz VI & Nagradova NK (1984) Immobilized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase forms a complex with phosphoglycerate kinase. *Biochem Int* **9**, 511-521.
18. Malhotra OP, Prabhakar P, Sen Gupta T & Kayastha AM (1995) Phosphoglycerate-kinase-glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase interaction. Molecular mass studies. *Eur J Biochem* **227**, 556-562.
19. Sukhodolets MV, Muronetz VI & Nagradova NK (1987) Kinetic evidence for the interaction between rabbit muscle D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase. *Biochem Int* **15**, 373-379.
20. Sukhodolets MV, Muronetz VI, Tsuprun VL, Kaftanova AS & Nagradova NK (1988) Association of rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase. The biochemical and electron-microscopic evidence. *FEBS Lett* **238**, 161-166.

21. Khoroshilova NA, Muronetz VI & Nagradova NK (1992) Interaction between D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase and its functional consequences. *FEBS Lett* **297**, 247-249.
22. Stallcup WB & Koshland DE, Jr. (1973) Half-of-the sites reactivity and negative cooperativity: the case of yeast glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *J Mol Biol* **80**, 41-62.
23. Clegg JS (1984) Properties and metabolism of the aqueous cytoplasm and its boundaries. *Am J Physiol* **246**, R133-151.
24. Graham JW, Williams TC, Morgan M, Fernie AR, Ratcliffe RG & Sweetlove LJ (2007) Glycolytic enzymes associate dynamically with mitochondria in response to respiratory demand and support substrate channeling. *Plant Cell* **19**, 3723-3738.
25. Minton AP & Wilf J (1981) Effect of macromolecular crowding upon the structure and function of an enzyme: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry* **20**, 4821-4826.
26. Ovadi J & Srere PA (1996) Metabolic consequences of enzyme interactions. *Cell Biochem Funct* **14**, 249-258.
27. al-Habori M (1995) Microcompartmentation, metabolic channelling and carbohydrate metabolism. *Int J Biochem Cell Biol* **27**, 123-132.
28. Robinson JB, Jr., Inman L, Sumegi B & Srere PA (1987) Further characterization of the Krebs tricarboxylic acid cycle metabolon. *J Biol Chem* **262**, 1786-1790.
29. Cascante M, Sorribas A & Canela EI (1994) Enzyme-enzyme interactions and metabolite channelling: alternative mechanisms and their evolutionary significance. *Biochem J* **298 ( Pt 2)**, 313-320.
30. Jorgensen K, Rasmussen AV, Morant M, Nielsen AH, Bjarnholt N, Zagrobelny M, Bak S & Moller BL (2005) Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 280-291.
31. Moller BL & Conn EE (1980) The biosynthesis of cyanogenic glucosides in higher plants. Channeling of intermediates in dhurrin biosynthesis by a microsomal system from *Sorghum bicolor* (linn) Moench. *J Biol Chem* **255**, 3049-3056.
32. Han JW, Thieleczek R, Varsanyi M & Heilmeyer LM, Jr. (1992) Compartmentalized ATP synthesis in skeletal muscle triads. *Biochemistry* **31**, 377-384.
33. Cheung CW, Cohen NS & Rajiman L (1989) Channeling of urea cycle intermediates in situ in permeabilized hepatocytes. *J Biol Chem* **264**, 4038-4044.
34. Shatalin K, Lebreton S, Rault-Leonardon M, Velot C & Srere PA (1999) Electrostatic channeling of oxaloacetate in a fusion protein of porcine citrate synthase and porcine mitochondrial malate dehydrogenase. *Biochemistry* **38**, 881-889.
35. Vertessy B & Ovadi J (1987) A simple approach to detect active-site-directed enzyme-enzyme interactions. The aldolase/glycerol-phosphate-dehydrogenase enzyme system. *Eur J Biochem* **164**, 655-659.
36. Clegg JS & Jackson SA (1990) Glucose metabolism and the channeling of glycolytic intermediates in permeabilized L-929 cells. *Arch Biochem Biophys* **278**, 452-460.
37. Uhrig JF (2006) Protein interaction networks in plants. *Planta* **224**, 771-781.
38. Keleti T & Ovadi J (1988) Control of metabolism by dynamic macromolecular interactions. *Curr Top Cell Regul* **29**, 1-33.
39. Aman RA & Wang CC (1986) An improved purification of glycosomes from the procyclic trypomastigotes of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* **21**, 211-220.
40. Coe EL & Greenhouse WV (1973) Possible regulatory interactions between compartmentalized glycolytic systems during initiation of glycolysis in ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta* **329**, 171-182.

41. Dorn GW, 2nd & Scorrano L (2010) Two close, too close: sarcoplasmic reticulum-mitochondrial crosstalk and cardiomyocyte fate. *Circ Res* **107**, 689-699.
42. Kornmann B, Currie E, Collins SR, Schuldiner M, Nunnari J, Weissman JS & Walter P (2009) An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science* **325**, 477-481.
43. Lebedzinska M, Szabadkai G, Jones AW, Duszyński J & Wieckowski MR (2009) Interactions between the endoplasmic reticulum, mitochondria, plasma membrane and other subcellular organelles. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 1805-1816.
44. Ryazanov AG, Ashmarina LI & Mironetz VI (1988) Association of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with mono- and polyribosomes of rabbit reticulocytes. *Eur J Biochem* **171**, 301-305.
45. Martin LJ, Adams NA, Pan Y, Price A & Wong M (2011) The mitochondrial permeability transition pore regulates nitric oxide-mediated apoptosis of neurons induced by target deprivation. *J Neurosci* **31**, 359-370.
46. Srere PA (2000) Macromolecular interactions: tracing the roots. *Trends Biochem Sci* **25**, 150-153.
47. Keleti T, Ovadi J & Batke J (1989) Kinetic and physico-chemical analysis of enzyme complexes and their possible role in the control of metabolism. *Prog Biophys Mol Biol* **53**, 105-152.
48. Keller A, Peltzer J, Carpentier G, Horvath I, Olah J, Duchesnay A, Orosz F & Ovadi J (2007) Interactions of enolase isoforms with tubulin and microtubules during myogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1770**, 919-926.
49. Keleti T, Vertessy B & Welch GR (1988) The perfection of substrate-channelling in interacting enzyme systems: energetics and evolution. *J Theor Biol* **135**, 75-83.
50. Guerrero-Castillo S, Araiza-Olivera D, Cabrera-Orefice A, Espinasa-Jaramillo J, Gutierrez-Aguilar M, Luevano-Martinez LA, Zepeda-Bastida A & Uribe-Carvajal S (2011) Physiological uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation. Studies in different yeast species. *J Bioenerg Biomembr* **43**, 323-331.
51. Guerrero-Castillo S, Vazquez-Acevedo M, Gonzalez-Halphen D & Uribe-Carvajal S (2009) In *Yarrowia lipolytica* mitochondria, the alternative NADH dehydrogenase interacts specifically with the cytochrome complexes of the classic respiratory pathway. *Biochim Biophys Acta* **1787**, 75-85.
52. Schagger H & Pfeiffer K (2001) The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* **276**, 37861-37867.
53. Kostal V & Arriaga EA (2011) Capillary electrophoretic analysis reveals subcellular binding between individual mitochondria and cytoskeleton. *Anal Chem* **83**, 1822-1829.
54. Senning EN & Marcus AH (2010) Actin polymerization driven mitochondrial transport in mating *S. cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 721-725.
55. Xu X, Forbes JG & Colombini M (2001) Actin modulates the gating of *Neurospora crassa* VDAC. *J Membr Biol* **180**, 73-81.
56. Lemasters JJ & Holmuhamedov E (2006) Voltage-dependent anion channel (VDAC) as mitochondrial governor--thinking outside the box. *Biochim Biophys Acta* **1762**, 181-190.
57. Rostovtseva TK & Bezrukov SM (2008) VDAC regulation: role of cytosolic proteins and mitochondrial lipids. *J Bioenerg Biomembr* **40**, 163-170.
58. Rostovtseva TK, Antonsson B, Suzuki M, Youle RJ, Colombini M & Bezrukov SM (2004) Bid, but not Bax, regulates VDAC channels. *J Biol Chem* **279**, 13575-13583.
59. Pastorino JG & Hoek JB (2008) Regulation of hexokinase binding to VDAC. *J Bioenerg Biomembr* **40**, 171-182.

60. Balasubramanian R, Karve A & Moore BD (2008) Actin-based cellular framework for glucose signaling by Arabidopsis hexokinase1. *Plant Signal Behav* **3**, 322-324.
61. Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Piacentini M, Nagata S & Melino G (2005) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**, 1463-1467.
62. Xie GC & Wilson JE (1988) Rat brain hexokinase: the hydrophobic N-terminus of the mitochondrially bound enzyme is inserted in the lipid bilayer. *Arch Biochem Biophys* **267**, 803-810.
63. Porter ME & Johnson KA (1983) Transient state kinetic analysis of the ATP-induced dissociation of the dynein-microtubule complex. *J Biol Chem* **258**, 6582-6587.
64. Botstein D (1988) Why study the cytoskeleton in yeast? In *The Harvey Lectures, Series 82*, pp. 157-167, Cambridge, Massachusetts.
65. Michelot A & Drubin DG (2011) Building distinct actin filament networks in a common cytoplasm. *Curr Biol* **21**, R560-569.
66. Moseley JB & Goode BL (2006) The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 605-645.
67. Balasubramanian MK, Bi E & Glotzer M (2004) Comparative analysis of cytokinesis in budding yeast, fission yeast and animal cells. *Curr Biol* **14**, R806-818.
68. Engqvist-Goldstein AE & Drubin DG (2003) Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 287-332.
69. Ayscough KR & Drubin DG (1996) ACTIN: general principles from studies in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**, 129-160.
70. Pollard TD & Borisy GG (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**, 453-465.
71. Kovar DR, Sirotkin V & Lord M (2010) Three's company: the fission yeast actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol* **21**, 177-187.
72. Kustermans G, Piette J & Legrand-Poels S (2008) Actin-targeting natural compounds as tools to study the role of actin cytoskeleton in signal transduction. *Biochem Pharmacol* **76**, 1310-1322.
73. Welch GR, Keleti T & Vertessy B (1988) The control of cell metabolism for homogeneous vs. heterogeneous enzyme systems. *J Theor Biol* **130**, 407-422.
74. Waingeh VF, Gustafson CD, Kozliak EI, Lowe SL, Knull HR & Thomasson KA (2006) Glycolytic enzyme interactions with yeast and skeletal muscle F-actin. *Biophys J* **90**, 1371-1384.
75. Knull HR & Walsh JL (1992) Association of glycolytic enzymes with the cytoskeleton. *Curr Top Cell Regul* **33**, 15-30.
76. Walsh JL & Knull HR (1988) Heteromeric interactions among glycolytic enzymes and of glycolytic enzymes with F-actin: effects of poly(ethylene glycol). *Biochim Biophys Acta* **952**, 83-91.
77. Rais B, Ortega F, Puigjaner J, Comin B, Orosz F, Ovadi J & Cascante M (2000) Quantitative characterization of homo- and heteroassociations of muscle phosphofructokinase with aldolase. *Biochim Biophys Acta* **1479**, 303-314.
78. Walsh JL, Keith TJ & Knull HR (1989) Glycolytic enzyme interactions with tubulin and microtubules. *Biochim Biophys Acta* **999**, 64-70.
79. Volker KW, Reinitz CA & Knull HR (1995) Glycolytic enzymes and assembly of microtubule networks. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **112**, 503-514.
80. Real-Hohn A, Zancan P, Da Silva D, Martins ER, Salgado LT, Mermelstein CS, Gomes AM & Sola-Penna M (2010) Filamentous actin and its associated binding proteins are the stimulatory site

for 6-phosphofructo-1-kinase association within the membrane of human erythrocytes. *Biochimie* **92**, 538-544.

81. Campanella ME, Chu H & Low PS (2005) Assembly and regulation of a glycolytic enzyme complex on the human erythrocyte membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2402-2407.

82. Kovacs J, Low P, Pacz A, Horvath I, Olah J & Ovadi J (2003) Phosphoenolpyruvate-dependent tubulin-pyruvate kinase interaction at different organizational levels. *J Biol Chem* **278**, 7126-7130.

83. Vertessy BG, Orosz F, Kovacs J & Ovadi J (1997) Alternative binding of two sequential glycolytic enzymes to microtubules. Molecular studies in the phosphofructokinase/aldolase/microtubule system. *J Biol Chem* **272**, 25542-25546.

84. Arnold H, Henning R & Pette D (1971) Quantitative comparison of the binding of various glycolytic enzymes to F-actin and the interaction of aldolase with G-actin. *Eur J Biochem* **22**, 121-126.

85. Knull HR (1985) Extraction of glycolytic enzymes: myo-inositol as a marker of membrane porosity. *J Neurochem* **45**, 1433-1440.

86. Puchulu-Campanella E, Chu H, Anstee DJ, Galan JA, Tao WA & Low PS (2013) Identification of the components of a glycolytic enzyme metabolon on the human red blood cell membrane. *J Biol Chem* **288**, 848-858.

87. Walsh TP, Clarke FM & Masters CJ (1977) Modification of the kinetic parameters of aldolase on binding to the actin-containing filaments of skeletal muscle. *Biochem J* **165**, 165-167.

88. Pette D & Dolken G (1975) Some aspects of regulation of enzyme levels in muscle energy-supplying metabolism. *Adv Enzyme Regul* **13**, 355-377.

89. Poglazov BF & Livanova NB (1986) Interaction of actin with the enzymes of carbohydrate metabolism. *Adv Enzyme Regul* **25**, 297-305.

90. Bronstein WW & Knull HR (1981) Interaction of muscle glycolytic enzymes with thin filament proteins. *Can J Biochem* **59**, 494-499.

91. Masters CJ (1981) Interactions between soluble enzymes and subcellular structure. *CRC Crit Rev Biochem* **11**, 105-143.

92. Lehotzky A, Telegdi M, Liliom K & Ovadi J (1993) Interaction of phosphofructokinase with tubulin and microtubules. Quantitative evaluation of the mutual effects. *J Biol Chem* **268**, 10888-10894.

93. Brooks SP & Storey KB (1991) Where is the glycolytic complex? A critical evaluation of present data from muscle tissue. *FEBS Lett* **278**, 135-138.

94. Ouporov IV, Knull HR & Thomasson KA (1999) Brownian dynamics simulations of interactions between aldolase and G- or F-actin. *Biophys J* **76**, 17-27.

95. Forlemu NY, Waingeh VF, Ouporov IV, Lowe SL & Thomasson KA (2007) Theoretical study of interactions between muscle aldolase and F-actin: insight into different species. *Biopolymers* **85**, 60-71.

96. Ouporov IV, Knull HR, Lowe SL & Thomasson KA (2001) Interactions of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with G- and F-actin predicted by Brownian dynamics. *J Mol Recognit* **14**, 29-41.

97. Clarke FM & Masters CJ (1975) On the association of glycolytic enzymes with structural proteins of skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* **381**, 37-46.

98. Kurganov BI, Sugrobova NP & Mil'man LS (1985) Supramolecular organization of glycolytic enzymes. *J Theor Biol* **116**, 509-526.

99. Chiquete-Felix N, Hernandez JM, Mendez JA, Zepeda-Bastida A, Chagolla-Lopez A & Mujica A (2009) In guinea pig sperm, aldolase A forms a complex with actin, WAS, and Arp2/3 that plays a role in actin polymerization. *Reproduction* **137**, 669-678.
100. Schindler R, Weichselsdorfer E, Wagner O & Bereiter-Hahn J (2001) Aldolase-localization in cultured cells: cell-type and substrate-specific regulation of cytoskeletal associations. *Biochem Cell Biol* **79**, 719-728.
101. Tochio T, Tanaka H, Nakata S & Hosoya H (2010) Fructose-1,6-bisphosphate aldolase A is involved in HaCaT cell migration by inducing lamellipodia formation. *J Dermatol Sci* **58**, 123-129.
102. Cueille N, Blanc CT, Riederer IM & Riederer BM (2007) Microtubule-associated protein 1B binds glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Proteome Res* **6**, 2640-2647.
103. Brown AD & Simpson JR (1972) Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *J Gen Microbiol* **72**, 589-591.
104. Loo TW & Clarke DM (2007) Chemical and pharmacological chaperones as new therapeutic agents. *Expert Rev Mol Med* **9**, 1-18.
105. Romisch K (2004) A cure for traffic jams: small molecule chaperones in the endoplasmic reticulum. *Traffic* **5**, 815-820.
106. Hottiger T, De Virgilio C, Hall MN, Boller T & Wiemken A (1994) The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. II. Physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins in vitro. *Eur J Biochem* **219**, 187-193.
107. Hounsa CG, Brandt EV, Thevelein J, Hohmann S & Prior BA (1998) Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology* **144** ( Pt 3), 671-680.
108. Singer MA & Lindquist S (1998) Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotechnol* **16**, 460-468.
109. Felix CF, Moreira CC, Oliveira MS, Sola-Penna M, Meyer-Fernandes JR, Scofano HM & Ferreira-Pereira A (1999) Protection against thermal denaturation by trehalose on the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from yeast. Synergetic effect between trehalose and phospholipid environment. *Eur J Biochem* **266**, 660-664.
110. Ocon A, Hampp R & Requena N (2007) Trehalose turnover during abiotic stress in arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* **174**, 879-891.
111. Zancan P & Sola-Penna M (2005) Trehalose and glycerol stabilize and renature yeast inorganic pyrophosphatase inactivated by very high temperatures. *Arch Biochem Biophys* **444**, 52-60.
112. Holtman KM, Chang HM & Kadla JF (2004) Solution-state nuclear magnetic resonance study of the similarities between milled wood lignin and cellulolytic enzyme lignin. *J Agric Food Chem* **52**, 720-726.
113. Pastor JM, Salvador M, Argandona M, Bernal V, Reina-Bueno M, Csonka LN, Iborra JL, Vargas C, Nieto JJ & Canovas M (2010) Ectoines in cell stress protection: uses and biotechnological production. *Biotechnol Adv* **28**, 782-801.
114. Arguelles JC (2000) Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Arch Microbiol* **174**, 217-224.
115. Crowe JH, Crowe LM & Chapman D (1984) Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science* **223**, 701-703.
116. Nunes OC, Manaia CM, Da Costa MS & Santos H (1995) Compatible Solutes in the Thermophilic Bacteria *Rhodothermus marinus* and "*Thermus thermophilus*". *Appl Environ Microbiol* **61**, 2351-2357.
117. Blomberg A (2000) Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. *FEMS Microbiol Lett* **182**, 1-8.



118. Sleator RD & Hill C (2002) Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol Rev* **26**, 49-71.
119. Welsh DT (2000) Ecological significance of compatible solute accumulation by microorganisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 263-290.
120. Timasheff SN (1993) The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **22**, 67-97.
121. Kaushik JK & Bhat R (2003) Why is trehalose an exceptional protein stabilizer? An analysis of the thermal stability of proteins in the presence of the compatible osmolyte trehalose. *J Biol Chem* **278**, 26458-26465.
122. Sampedro JG & Uribe S (2004) Trehalose-enzyme interactions result in structure stabilization and activity inhibition. The role of viscosity. *Mol Cell Biochem* **256-257**, 319-327.
123. Sola-Penna M & Meyer-Fernandes JR (1998) Stabilization against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: why is trehalose more effective than other sugars? *Arch Biochem Biophys* **360**, 10-14.
124. Keller F, Schellenberg M & Wiemken A (1982) Localization of trehalase in vacuoles and of trehalose in the cytosol of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Arch Microbiol* **131**, 298-301.
125. Benaroudj N, Lee DH & Goldberg AL (2001) Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *J Biol Chem* **276**, 24261-24267.
126. Sampedro JG, Munoz-Clares RA & Uribe S (2002) Trehalose-mediated inhibition of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from *Kluyveromyces lactis*: dependence on viscosity and temperature. *J Bacteriol* **184**, 4384-4391.
127. Jain NK & Roy I (2008) Role of trehalose in moisture-induced aggregation of bovine serum albumin. *Eur J Pharm Biopharm* **69**, 824-834.
128. Sampedro JG, Cortes P, Munoz-Clares RA, Fernandez A & Uribe S (2001) Thermal inactivation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from *Kluyveromyces lactis*. Protection by trehalose. *Biochim Biophys Acta* **1544**, 64-73.
129. Sola-Penna M, Ferreira-Pereira A, Lemos AP & Meyer-Fernandes JR (1997) Carbohydrate protection of enzyme structure and function against guanidinium chloride treatment depends on the nature of carbohydrate and enzyme. *Eur J Biochem* **248**, 24-29.
130. Chilson OP & Chilson AE (2003) Perturbation of folding and reassociation of lactate dehydrogenase by proline and trimethylamine oxide. *Eur J Biochem* **270**, 4823-4834.
131. Wera S, De Schrijver E, Geyskens I, Nwaka S & Thevelein JM (1999) Opposite roles of trehalase activity in heat-shock recovery and heat-shock survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **343 Pt 3**, 621-626.
132. Garre E & Matallana E (2009) The three trehalases Nth1p, Nth2p and Ath1p participate in the mobilization of intracellular trehalose required for recovery from saline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **155**, 3092-3099.
133. Hengge-Aronis R, Klein W, Lange R, Rimmele M & Boos W (1991) Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by *rpoS* and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **173**, 7918-7924.
134. Jagdale GB & Grewal PS (2003) Acclimation of entomopathogenic nematodes to novel temperatures: trehalose accumulation and the acquisition of thermotolerance. *Int J Parasitol* **33**, 145-152.
135. Zentella R, Mascorro-Gallardo JO, Van Dijck P, Folch-Mallol J, Bonini B, Van Vaeck C, Gaxiola R, Covarrubias AA, Nieto-Sotelo J, Thevelein JM & Iturriaga G (1999) A *Selaginella*

lepidophylla trehalose-6-phosphate synthase complements growth and stress-tolerance defects in a yeast *tps1* mutant. *Plant Physiol* **119**, 1473-1482.

136. Sampedro JG, Guerra G, Pardo JP & Uribe S (1998) Trehalose-mediated protection of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from *Kluyveromyces lactis* during freeze-drying and rehydration. *Cryobiology* **37**, 131-138.

137. Liu FF, Ji L, Zhang L, Dong XY & Sun Y (2010) Molecular basis for polyol-induced protein stability revealed by molecular dynamics simulations. *J Chem Phys* **132**, 225103.

138. Jacob M & Schmid FX (1999) Protein folding as a diffusional process. *Biochemistry* **38**, 13773-13779.

139. Jacob M, Geeves M, Holtermann G & Schmid FX (1999) Diffusional barrier crossing in a two-state protein folding reaction. *Nat Struct Biol* **6**, 923-926.

140. Williams SP, Haggie PM & Brindle KM (1997) 19F NMR measurements of the rotational mobility of proteins in vivo. *Biophys J* **72**, 490-498.

141. Esmann M, Fedosova NU & Marsh D (2008) Osmotic stress and viscous retardation of the Na,K-ATPase ion pump. *Biophys J* **94**, 2767-2776.

142. Paz-Alfaro KJ, Ruiz-Granados YG, Uribe-Carvajal S & Sampedro JG (2009) Trehalose-mediated thermal stabilization of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *J Biotechnol* **141**, 130-136.

143. Sebollela A, Louzada PR, Sola-Penna M, Sarone-Williams V, Coelho-Sampaio T & Ferreira ST (2004) Inhibition of yeast glutathione reductase by trehalose: possible implications in yeast survival and recovery from stress. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 900-908.

144. Gates CA & Northrop DB (1988) Determination of the rate-limiting segment of aminoglycoside nucleotidyltransferase 2"-I by pH and viscosity-dependent kinetics. *Biochemistry* **27**, 3834-3842.

145. Tlapak-Simmons VL, Baron CA & Weigel PH (2004) Characterization of the purified hyaluronan synthase from *Streptococcus equisimilis*. *Biochemistry* **43**, 9234-9242.

146. Lamy L, Portmann MO, Mathlouthi M & Larreta-Garde V (1990) Modulation of egg-white lysozyme activity by viscosity intensifier additives. *Biophys Chem* **36**, 71-76.

147. Raber ML, Freeman MF & Townsend CA (2009) Dissection of the stepwise mechanism to beta-lactam formation and elucidation of a rate-determining conformational change in beta-lactam synthetase. *J Biol Chem* **284**, 207-217.

148. Kuhlbrandt W (2004) Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 282-295.

149. Faber-Barata J & Sola-Penna M (2005) Opposing effects of two osmolytes--trehalose and glycerol--on thermal inactivation of rabbit muscle 6-phosphofructo-1-kinase. *Mol Cell Biochem* **269**, 203-207.

150. Attfield PV (1987) Trehalose accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* during exposure to agents that induce heat shock response. *FEBS Lett* **225**, 259-263.

151. Thevelein JM & Hohmann S (1995) Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? *Trends Biochem Sci* **20**, 3-10.

152. Winderickx J, de Winde JH, Crauwels M, Hino A, Hohmann S, Van Dijck P & Thevelein JM (1996) Regulation of genes encoding subunits of the trehalose synthase complex in *Saccharomyces cerevisiae*: novel variations of STRE-mediated transcription control? *Mol Gen Genet* **252**, 470-482.

153. Basu A, Bhattacharyya S, Chaudhuri P, Sengupta S & Ghosh AK (2006) Extracellular trehalose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1760**, 134-140.

154. Jules M, Guillou V, Francois J & Parrou JL (2004) Two distinct pathways for trehalose assimilation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **70**, 2771-2778.

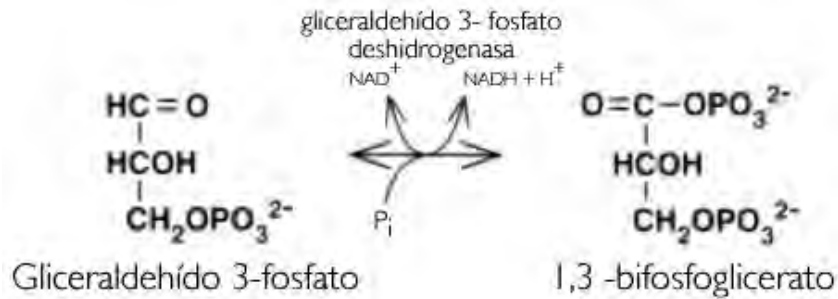
155. Nwaka S, Kopp M, Burgert M, Deuchler I, Kienle I & Holzer H (1994) Is thermotolerance of yeast dependent on trehalose accumulation? *FEBS Lett* **344**, 225-228.
156. Ratnakumar S & Tunnacliffe A (2006) Intracellular trehalose is neither necessary nor sufficient for desiccation tolerance in yeast. *FEMS Yeast Res* **6**, 902-913.
157. Winkler K, Kienle I, Burgert M, Wagner JC & Holzer H (1991) Metabolic regulation of the trehalose content of vegetative yeast. *FEBS Lett* **291**, 269-272.
158. Fernandez J, Soto T, Franco A, Vicente-Soler J, Cansado J & Gacto M (1998) Enhancement of neutral trehalase activity by oxidative stress in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Fungal Genet Biol* **25**, 79-86.
159. Nwaka S, Kopp M & Holzer H (1995) Expression and function of the trehalase genes NTH1 and YBR0106 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **270**, 10193-10198.
160. Hoffmann S & Holzhutter HG (2009) Uncovering metabolic objectives pursued by changes of enzyme levels. *Ann N Y Acad Sci* **1158**, 57-70.
161. Marcondes MC, Sola-Penna M, Torres Rda S & Zancan P Muscle-type 6-phosphofructo-1-kinase and aldolase associate conferring catalytic advantages for both enzymes. *IUBMB Life* **63**, 435-445.
162. Villali J & Kern D (2010) Choreographing an enzyme's dance. *Curr Opin Chem Biol* **14**, 636-643.
163. van Eunen K, Kiewiet JA, Westerhoff HV & Bakker BM (2012) Testing biochemistry revisited: how in vivo metabolism can be understood from in vitro enzyme kinetics. *PLoS Comput Biol* **8**, e1002483.
164. Mendes P & Kell DB (2001) MEG (Model Extender for Gepasi): a program for the modelling of complex, heterogeneous, cellular systems. *Bioinformatics* **17**, 288-289.
165. Araiza-Olivera D, Chiquete-Felix N, Rosas-Lemus M, Sampedro JG, Pena A, Mujica A & Uribe-Carvajal S (2013) A glycolytic metabolon in *Saccharomyces cerevisiae* is stabilized by F-actin. *FEBS J* **280**, 3887-3905.
166. Pasten-Hidalgo K, Hernandez-Rivas R, Roa-Espitia AL, Sanchez-Gutierrez M, Martinez-Perez F, Monrroy AO, Hernandez-Gonzalez EO & Mujica A (2008) Presence, processing, and localization of mouse ADAM15 during sperm maturation and the role of its disintegrin domain during sperm-egg binding. *Reproduction* **136**, 41-51.
167. Lebedeva N, Auffret Vander Kemp P, Bjornsti MA, Lavrik O & Boiteux S (2006) Trapping of DNA topoisomerase I on nick-containing DNA in cell free extracts of *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)* **5**, 799-809.
168. Gornall AG, Bardawill CJ & David MM (1949) Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* **177**, 751-766.
169. Zechel K (1980) Isolation of polymerization-competent cytoplasmic actin by affinity chromatography on immobilized DNase I using formamide as eluant. *Eur J Biochem* **110**, 343-348.
170. Bradford MM (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.
171. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
172. Towbin H, Staehelin T & Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354.
173. Bergmeyer HU (1983) *Methods of Enzymatic Analysis*. In ed^eds), pp. 202-203.
174. Sygusch J & Beaudry D (1984) Catalytic activity of rabbit skeletal muscle aldolase in the crystalline state. *J Biol Chem* **259**, 10222-10227.

175. Katewa SD & Katyare SS (2003) A simplified method for inorganic phosphate determination and its application for phosphate analysis in enzyme assays. *Anal Biochem* **323**, 180-187.
176. Zepeda-Bastida A, Chiquete-Felix N, Uribe-Carvajal S & Mujica A (2010) The acrosomal matrix from guinea pig sperm contains structural proteins, suggesting the presence of an actin skeleton. *J Androl* **32**, 411-419.
177. Ganzhorn AJ, Green DW, Hershey AD, Gould RM & Plapp BV (1987) Kinetic characterization of yeast alcohol dehydrogenases. Amino acid residue 294 and substrate specificity. *J Biol Chem* **262**, 3754-3761.
178. Dickinson FM & Monger GP (1973) A study of the kinetics and mechanism of yeast alcohol dehydrogenase with a variety of substrates. *Biochem J* **131**, 261-270.
179. Mejean C, Pons F, Benyamin Y & Roustan C (1989) Antigenic probes locate binding sites for the glycolytic enzymes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, aldolase and phosphofructokinase on the actin monomer in microfilaments. *Biochem J* **264**, 671-677.
180. Schwock J, Kirchberger J, Edelmann A, Kriegel TM & Kopperschlager G (2004) Interaction of 6-phosphofructokinase with cytosolic proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **21**, 483-494.
181. Volker KW & Knull H (1997) A glycolytic enzyme binding domain on tubulin. *Arch Biochem Biophys* **338**, 237-243.
182. Lowe SL, Atkinson DM, Waingeh VF & Thomasson KA (2002) Brownian dynamics of interactions between aldolase mutants and F-actin. *J Mol Recognit* **15**, 423-431.
183. Lowe SL, Adrian C, Ouporov IV, Waingeh VF & Thomasson KA (2003) Brownian dynamics simulations of glycolytic enzyme subsets with F-actin. *Biopolymers* **70**, 456-470.
184. O'Reilly G & Clarke F (1993) Identification of an actin binding region in aldolase. *FEBS Lett* **321**, 69-72.
185. Hald BO & Sorensen PG (2010) Modeling diauxic glycolytic oscillations in yeast. *Biophys J* **99**, 3191-3199.
186. Henson MA, Muller D & Reuss M (2002) Cell population modelling of yeast glycolytic oscillations. *Biochem J* **368**, 433-446.
187. Hynne F, Dano S & Sorensen PG (2001) Full-scale model of glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biophys Chem* **94**, 121-163.
188. Dano S, Hynne F, De Monte S, d'Ovidio F, Sorensen PG & Westerhoff H (2001) Synchronization of glycolytic oscillations in a yeast cell population. *Faraday Discuss*, 261-276; discussion 325-251.
189. Richard P, Diderich JA, Bakker BM, Teusink B, van Dam K & Westerhoff HV (1994) Yeast cells with a specific cellular make-up and an environment that removes acetaldehyde are prone to sustained glycolytic oscillations. *FEBS Lett* **341**, 223-226.
190. Richard P, Teusink B, Hemker MB, Van Dam K & Westerhoff HV (1996) Sustained oscillations in free-energy state and hexose phosphates in yeast. *Yeast* **12**, 731-740.
191. Teusink B, Passarge J, Reijenga CA, Esgalhado E, van der Weijden CC, Schepper M, Walsh MC, Bakker BM, van Dam K, Westerhoff HV & Snoep JL (2000) Can yeast glycolysis be understood in terms of in vitro kinetics of the constituent enzymes? Testing biochemistry. *Eur J Biochem* **267**, 5313-5329.

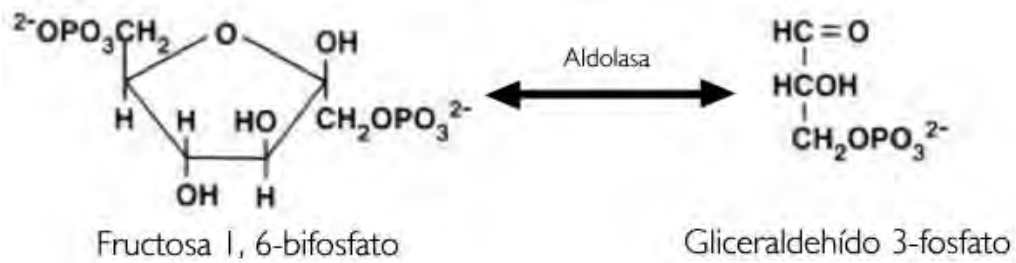
## 11. ANEXO

### 11.1 Reacciones enzimáticas

#### 11.1.1 Reacción catalizada por GAPDH



#### 11.1.2 Reacción catalizada por ALD



#### 11.1.3 Reacción catalizada por PGK

